

УДК 636.27(477).034.082:575.22

DOI: <https://doi.org/10.31073/abg.67.07>

ВИВЧЕННЯ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНУ БЕТА-КАЗЕЇНУ У КОРІВ МОЛОЧНИХ ПОРІД ВІТЧИЗНЯНОЇ СЕЛЕКЦІЇ

В. І. ЛАДИКА¹, Ю. І. СКЛЯРЕНКО², Ю. М. ПАВЛЕНКО¹, А. І. МАЛІКОВА

¹Сумський національний аграрний університет (Суми, Україна)

²Інститут сільського господарства Північного Сходу НААН (Сад, Україна)

<https://orcid.org/0000-0001-6748-7616> – В. І. Ладика

<https://orcid.org/0000-0002-6579-2382> – Ю. І. Склярєнко

<https://orcid.org/0000-0002-4128-122X> – Ю. М. Павленко

<https://orcid.org/0000-0002-4277-0172> – А. І. Малікова

Sklyrenko9753@ukr.net

Проведені дослідження щодо вивчення поліморфізму гену бета-казеїну в популяціях худоби сумського внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної та української бурої молочної порід. Дослідження проведені у племінних заводах Державного підприємства «Дослідне господарство Інституту сільського господарства Північного Сходу НААН». Визначення поліморфізму гена бета-казеїну проводили в генетичній лабораторії Інституту фізіології імені Богомольця НАН за допомогою молекулярно-біологічного аналізу розпізнавання алелів, методом полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі. Встановлено, що корови досліджуваних порід характеризуються поліморфізмом за локусом CSN2. Алель A2 переважав за частотою у тварин обох груп. Між ними встановлена різниця за частотою цього алеля, на перевагу тваринам української бурої молочної породи (у 1,4 рази). Не встановлено різниці між фактичними та очікуваними частотами генотипів у корів обох порід.

Результати молекулярно-генетичного аналізу великої рогатої худоби двох порід відображають генетичну структуру за досліджуваним локусом, яка відповідає породним характеристикам швіцької та голштинської порід.

Ключові слова: генотип, бета-казеїн, алель, порода, гетерозиготність

STUDY OF BETA-CASEIN GENE POLYMORPHISM IN DOMESTIC BREED DAIRY COWS

V. I. Ladyka¹, Yu. I. Skliarenko², Yu. M. Pavlenko¹, A. I. Malikova¹,

¹Sumy National Agrarian University (Sumy, Ukraine)

²Institute of Agriculture of the North-East of NAAS of Ukraine (Sad, Ukraine)

Studies have been conducted on the study of beta-casein gene polymorphism in Sumy inbred cattle populations of the Ukrainian black-spotted dairy and Ukrainian brown dairy breeds. The research was carried out in the breeding plants of the State Enterprise "Experimental Farm of the Institute of Agriculture of the North East of the National Academy of Sciences". Determination of polymorphism of the beta-casein gene was carried out in the genetic laboratory of the Bogomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences using a molecular biological analysis of allele recognition, using the polymerase chain reaction (PCR) method in real time. It was established that cows of the studied breeds are characterized by polymorphism at the CSN2 locus. Allele A2 prevailed in frequency in animals of both groups. A difference in the frequency of this allele was established between them, to the advantage of animals of the Ukrainian brown dairy breed (by 1.4 times). No difference was found between actual and expected frequencies of genotypes in cows of both breeds.

The results of the molecular genetic analysis of the cattle of the two breeds reflect the genetic structure at the studied locus, which corresponds to the breed characteristics of the Swiss and Holstein.

Keywords: genotype, beta-casein, allele, breed, heterozygosity

Сучасний розвиток галузі тваринництва не можливо уявити без впровадження інноваційних розробок як вітчизняних, так і іноземних науковців. Особлива увага повинна приділятися розробкам у галузі молекулярної біології з метою збільшення обсягів виробництва продукції та підвищення її якості (Hladii et al., 2018).

Серед дослідників відбувається дискусія щодо можливості покращення якісних характеристик молока, використовуючи відбір тварин, який заснований на молекулярних маркерах. З цією метою науковці рекомендують використовувати параметри популяції (частоти генотипів та алелів) як інструмент вдосконалення добору. Так в окремих програмах з селекції молочної худоби все частіше використовують дослідження поліморфізму генів білків молока. Перевагою ДНК-технологій, на думку науковців, можна вважати можливість визначення генотипу тварин незалежно від їх віку, фізіологічного стану, статі. В свою чергу вони дозволяють значно підвищити точність та ефективність добору, одночасно зменшивши генерацію інтервалів, що дозволяє прискорити ефект добору (Miluchová et al., 2018; Zepeda-Batista et al., 2017).

Багатьма дослідженнями встановлено, що генетичні фактори мають вагомий вплив на перетравність молока та молочних білків. Науковцям відомі природні генетичні поліморфізми всіх шести білків молока (казеїнів, альфа-лактоальбуміна та бета-лактоглобуліна. В останній час особливо почали приділяти увагу питанню впливу генотипу корови на перетравність молока людиною в аспекті гена бета-казеїну (Anna Maria et al., 2016; Jiménez-Montenegro et al., 2022; Sebastiani et al., 2022).

За результатами досліджень інших науковців, встановлено, що цей ген складається з дев'яти екзотів та вісьми нітронів. Це найбільш поліморфний ген з усіх казеїнів великої рогатої худоби. До 2020 року виділяли п'ятнадцять генетичних варіантів: A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I, J, K, L. Для двох варіантів A4 та B2, нуклеотидні заміни ще не виявлені. Додатковий варіант A5 не впливає на структуру білка. Науковці стверджують, що головним чином всі варіанти бета-казеїну різняться 1-3 амінокислотними замінами в різних положеннях. У цілому їх можна віднести до A2-типу (10 варіантів) та A1-типу (5 варіантів), у залежності від наявності в положенні 67-білкової послідовності проліну або гістидину (Ramakrishnan et al., 2023; Raynes et al., 2015; Vigolo et al., 2023).

Породи великої рогатої худоби істотно різняться за частотами алелів гену бета-казеїну У молочної худоби Європи, Америки та Австралії середня частка алеля A1 складає 0,35, а алеля A2 – 0,61. Розподіл частоти істотно залежить від породи. Варіант A1 частіше зустрічається у тварин айрширської та червоної датської порід (в межах 0,51–0,72), навпаки менша його частота характерна тваринам джерсейської, швіцької порід (0,04–0,14) (Vigolo et al., 2023). Найбільш розповсюджена в світі голштинська порода характеризується частотою алеля A1 в межах 0,25–0,51 (Cie'sli'nska et al., 2022).

Питання щодо дослідження гену бета-казеїну в популяціях молочної худоби за останні десять років приділялася велика увага в країнах з розвиненим молочним скотарством (Нова Зеландія, Австралія, Сполучені штати Америки та інші). Серед дослідників також часто виникають суперечки щодо впливу генотипу за цим геном на технологічні характеристики, перетравність молока та здоров'я людини (Vitte et al., 2022; Kirk et al., 2017). В нашій країні це питання почали вивчати в 2019 році науковці Сумського національного аграрного університету, Інституту сільського господарства Північного Сходу НААН, Інституту розведення і генетики тварин ім. М.В. Зубця НААН, Інституту тваринництва НААН. Ними досліджені за цим геном популяції вітчизняних лебединської, сірої української, бурої карпатської та інших порід та методи виявлення алелів гену бета-казеїну (Ladyka et al., 2023; Kulibaba et al., 2023).

У результаті породного перетворення лебединської породи за використання кращого світового генофонду швіцької та голштинської порід, було створено українську буру молочну породу та сумський внутрішньопородний тип української чорно-рябої молочної породи. Подальша селекційна робота, яка направлена на їхнє вдосконалення, має певні складнощі, що пов'язано з відсутністю власної селекційної бази плідників. Тому значний вплив на формування господарсько-корисних ознак мають бугаї світового генофонду швіцької та голштинської порід. Водночас останнім часом відбувається звуження генеалогічної структури досліджуваних вітчизняних селекційних формувань та підвищення умовної кровності за швіцькою та голштинською породами, про що свідчать результати багатьох досліджень (Ladyka et al., 2022; Hladii et al., 2018; Ladyka et al., 2019; Ladyka et al., 2022). Все це може призводити до підвищення гомозиготності популяції. Особливо актуальне це питання може стояти у випадку використання неоцінених за генами білків молока плідників, що може призвести до збільшення в популяції тварин з небажаними генотипами за відповідними генами.

З огляду на це **метою** роботи було дослідження поліморфізму гену бета-казеїну у корів української бурої молочної та сумського внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведені у племінних заводах з розведення української бурої молочної породи ($n = 30$) та сумського внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи ($n = 30$) ДП ДГ ІСГПС НААН Сумського району Сумської області.

Визначення поліморфізму гену бета-казеїну проводили в генетичній лабораторії Інституту фізіології ім. Богомольця НАН за допомогою молекулярно-біологічного аналізу розпізнавання алелів методом полімеразно ланцюгової реакції (ПЛР) у реальному часі.

Зразки крові відбирали у моновети об'ємом 2,7 мл ("Sarstedt", Німеччина) з наступним заморожуванням зразків та їх зберіганням при -20°C . Для отримання ДНК для подальшого генотипування використовували набір для очищення геномної ДНК Monarch® New England BioLab (США) згідно з протоколом виробника. Для проведення алельної дискримінації використовувалась система TagMan@Genotyping та набір праймерів та зондів.

Підрахунок частот алелів проводили із врахуванням кількості гомозигот і гетерозигот, знайдених за відповідним алелем за формулою:

$$P(A) = \frac{2N_1 + N_2}{2n}$$

де N_1 і N_2 – відповідно число гомозигот і гетерозигот для досліджуваного алеля;

n – число вибірки.

З метою оцінки статистичної достовірності розбіжності розподілів одержаних результатів використовували критерій Пірсона:

$$\chi^2 = \frac{\sum(\Phi - T)^2}{T}$$

де: Φ – фактична кількість генотипів;

T – теоретична кількість генотипів.

Фактичну (наявну) гетерозиготність визначали шляхом прямого підрахунку за формулою:

$$H_o = \frac{N_2}{n}$$

Очікувану гетерозиготність визначали за формулою:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

де p_1, p_2, p_n – частоти алелів.

Для генетичної характеристики поголів'я також визначали рівень гомозиготності (C_a):

$$C_a = (p(A)^2 + p(B)^2) * 100;$$

рівень поліморфності, N_a :

$$Na = 1/Ca;$$

тест гетерозиготності, визначали шляхом співставлення відношень між емпіричними гетерозиготами і емпіричними гомозиготами з аналогічним відношенням, отриманими за теоретичними даними;

коефіцієнт ексцесу (D) кількісно оцінює нехватку або перебільшення фактичної гетерозиготності у досліджуваних популяцій в порівнянні з теоретично розрахованим показником.

Отримані результати обробляли методом варіаційної статистики за допомогою пакету програм Statistica 6,0.

Результати й обговорення. За результатами проведених досліджень нами, у досліджуваних групах корів української бурої молочної породи та сумського внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи встановлена різниця за частотами генотипів гену бета-казеїну. Коровам української бурій молочної породи характерна більша частота генотипу A2A2 ($P < 0,01$). При цьому частоти генотипів A1A1 та A1A2 були вищими у корів сумського внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи (табл. 1).

1. Частота генотипів та алелів за локусом gena бета-казеїну

Порода	Розподіл*	Генотипи						Частота алеля		χ^2
		A1A1		A1A2		A2A2		A1	A2	
		n	частота	n	частота	n	частота			
СВТУЧРМ	Ф	7	0,23	11	0,37	12	0,40	0,417	0,583	1,81
	О	5,2	0,17	14,6	0,49	10,2	0,34			
УБМ	Ф	2	0,07	6	0,20	22	0,73	0,167	0,833	2,35
	О	2,8	0,03	27,8	0,28	69,4	0,69			

* Ф – фактична; О – очікувана

Частота алеля A2 була вищою, ніж алеля A1 у корів української бурої молочної породи, майже у 5 разів, тоді як у корів сумського внутрішньопородного типу лише у 1,4 рази. Нами встановлено ступінь відповідності фактичного розподілу генотипів очікуваним значенням. Розрахунок за формулою Харді-Вайнберга не показав наявності різниці між фактичними та очікуваними частотами генотипів у тварин досліджуваних порід. Фактична гетерозиготність у корів української бурої молочної та сумського внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи була меншою ніж очікувана (рис. 1).



Рис. 1. Гетерозиготність за геном бета-казеїну

Вища ступінь гомозиготності характерна коровам української бурої молочної породи, що свідчить про достатній рівень її консолідації. Відповідно число ефективного діючих алелів було вищим у тварин сумського внутрішньопородного типу української чорно-рябої молочної породи. Негативне значення тесту гетерозиготності підтверджує отримані дані щодо меншої чисельності гетерозигот ніж теоретично розрахована кількість. Ці дані підтверджує і коефіцієнту ексцесу D (табл. 2).

2. Генетична мінливість досліджуваних порід за локусом бета-казеїну

Порода/тип	Ca	Na	% гомозигот	Тест гетерозиготності	D
СВТ УЧРМ	51,4	1,94	63	-0,360	-0,245
УБМ	72,0	1,38	80	-0,135	-0,280

Згідно наших результатів у тварин української бурої молочної породи спостерігаємо високу частоту бажаного генотипу A2A2 та алеля A2. Отримані нами результати узгоджуються з частотами які наводять інші дослідники. Так наприклад частка алеля A1 в популяції голштинської худоби знаходиться в межах 0,25–0,51, в той час як в популяції швіцької худоби – 0,14 (Cie’sli’nska et al., 2022). Про більш високу частоту алеля A1 в популяції швіцької породи зазначають інші дослідники (Parashar, 2015; Ahmet Fatih, 2018). Частка генотипів A2A2 серед корів Італійської популяції голштинської породи не перевищує 0,37, що майже в повній мірі відповідає результатам наших досліджень (Sebastiani et al., 2022). Генетична структура серед корів досліджуваних порід за розподілом алелів та генотипів локусу CSN2 відображає породні специфічності характерні голштинській та швіцькій породам. Це пояснюється широким використанням плідників цих порід на маточному поголів’ї досліджуваних порід.

Висновки: Досліджувані групи корів молочних порід характеризуються поліморфізмом за локусом CSN2. У обох дослідних групах переважає алель A2. У тварин української бурої молочної породи його частота вище у 1,4 рази.

Результати молекулярно-генетичного аналізу великої рогатої худоби двох порід відображають генетичну структуру за досліджуваним локусом, яка відповідає породним характеристикам швіцької та голштинської.

Перспективним напрямком вважаємо дослідження щодо встановлення впливу генотипу за бета-казеїном на якісні та технологічні ознаки молока корів.

REFERENCES

- Ahmet Fatih, D., & Bahattin, C. (2018). Discussions of Effect A1 and A2 Milk Beta-Casein Gene on Health. *Approaches in Poultry, Dairy & Veterinary Sciences*, 3 (2), 216–221. <https://doi.org/10.31031/APDV.2018.03.000556>
- Anna Maria, C., Savino, S., Bulgari, J., & Monti, E. (2016). Detecting β -Casein Variation in Bovine Milk. *Molecules*, 21 (2), 141. <https://doi.org/10.3390/molecules21020141>
- Bentivoglio, D., Finco, A., Bucci, G., & Staffolani, G. (2020). Is There a Promising Market for the A2 Milk? Analysis of Italian Consumer Preferences. *Sustainability*, 12 (17), 6763. <https://doi.org/10.3390/su12176763>
- Cie’sli’nska, A., Fiedorowicz, E., Rozmus, D., Sienkiewicz-Szłapka, E., Jarmołowska, B., & Kami’nski, S. (2022). Does a Little Difference Make a Big Difference? Bovine β -Casein A1 and A2 Variants and Human Health -An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 15637. <https://doi.org/10.3390/ijms232415637>
- Hladii, M. V., & Polupan Yu. P., (Red.). (2018). *Seleksiini, henetychni ta biotekhnolohichni metody udoskonalennia i zberezhenia henofondu porid silskohospodarskykh tvaryn* [Breeding, genetic and biotechnological methods of improvement and preservation of the gene pool of agricultural animal breeds]. TOV «Firma «Tekhservis». [In Ukrainian].
- Hladii, M. V., Polupan, Yu. P., Kovtun, S. I., Kuzebnyi, S. V., Vyshnevskyi, L. V. Kopylov, K. V., & Shcherbak, O. V. (2018). Naukovi ta orhanizatsiini aspekty rozvedennia, henetyky, biotekhnolohii vidtvorennia ta zberezhenia henofondu u tvarynnyystvi [Scientific and organizational aspects of breeding, genetics, biotechnology of reproduction and preservation of the gene pool in animal husbandry] *Rozvedennia i henetyka tvaryn – Animal breeding and genetics*, 56, 5–14. [In Ukrainian]. <https://doi.org/10.31073/abg.56.01>
- Jiménez-Montenegro, L., Alfonso, L., Mendizabal, J. A., & Urrutia, O. (2022). Worldwide Re-

- search Trends on Milk Containing Only A2-Casein: ABibliometric Study. *Animals*, 12 (15), 1909. DOI: 10.3390/ani12151909
- Kirk, B., Mitchell, J., Jackson, M., Amirabdollahian, F., Alizadehkhaiyat, O., & Clifford, T. (2017). A2 Milk Enhances Dynamic Muscle Function Following Repeated Sprint Exercise, a Possible Ergogenic Aid for A1-Protein Intolerant Athletes? *Nutrients*, 9 (2), 94. <https://doi.org/10.3390/nu9020094>
- Kulibaba, R., Sakhatskyi, M., & Liashenko, Y. (2023). Comparative analysis of A1 and A2 allele detection efficiency for bovine CSN2 gene by AS-PCR methods. *Acta Biochim Pol.*, 70 (1), 205–209.
- Ladyka, V. I., Polupan, Yu. P., & Vdovichenko, U. V. (2019). *Conservation of gene pools of local cattle breeds*. Lublin.
- Ladyka, V. I., Pavlenko, Yu. M., & Skliarenko, Yu. I. (2022). *Usage of DNA Testing by CSN2 and CSN3 Genes for conservation and Improvement of the North–East of Ukraine*. Baltija Publishing.
- Ladyka, V., Skliarenko, Y., Pavlenko, Y., Kovtun, S., Drevytska, T., Dosenko, V., Vechorka, V., & Malikova, A. (2023). Evaluation of stud bulls by beta-casein genotype in the context of conservation of local cattle breeds in Ukraine. *Scientific Papers. Series D. Animal Science*, LXVI, 1, 42–47. https://animalsciencejournal.usamv.ro/pdf/2023/issue_1/Art5.pdf
- Ladyka, V. I., Skliarenko, Yu. I., & Pavlenko Yu. M. (2022). *Osoblyvosti formuvannia henealohichnoi struktury sumskoho vnutrishnoporodnoho typu ukraïnskoi chorno–riaboi molochnoi porody ta henetychna otsinka tvaryn za lokusamy pov'iazany z yakisnymy pokaznykamy molochnoi produktyvnosti* [Peculiarities of the formation of the genealogical structure of the Sumy intrabreed type of the Ukrainian black and spotted dairy breed and the genetic evaluation of animals by loci associated with qualitative indicators of milk productivity]. Oldi+. [In Ukrainian].
- Miluchová, M., Gábor, M., Candrák, J., Trakovická, A., & Candráková, K. (2018). Association of HindIII-polymorphism in kappa-casein gene with milk, fat and protein yield in holstein cattle. *Acta Biochimica Polonica*, 65 (3), 403–407. https://doi.org/10.18388/abp.2017_2313
- Parashar, A., Saini, K. (2015). A1 milk and its controversy-a review. *International Journal of Bioassays*, 4.12, 4611–4619.
- Ramakrishnan, M., Zhou, X., Dydak, U., & Savaiano, D. A. (2023). Gastric Emptying of New-World Milk Containing A1 and A2 B-Casein Is More Rapid as Compared to Milk Containing Only A2 B-Casein in Lactose Maldigesters: A Randomized, Cross-Over Trial Using Magnetic Resonance Imaging. *Nutrients*, 15, 801. <https://doi.org/10.3390/nu15040801>
- Raynes, J. K., Day, L., Augustin, M. A., Carver, J. A. (2015). Structural differences between bovine A1 and A2 β -casein alter micelle self-assembly and influence molecular chaperone activity. *Journal of Dairy Science*, 98 (4), 2172–2182. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8800>
- Sebastiani, C., Arcangeli, C., Torricelli, M., Ciullo, M., D'avino, N., Cinti, G., Fisichella, S., & Biagetti, M. (2022). Marker-assisted selection of dairy cows for β -casein gene A2 variant. *Italian Journal of Food Science*, 34 (2), 21–27. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v34i2.2178>
- Skliarenko, Yu. I. (2018) Henezys porodnoho peretvorennia lebedynskoi khudoby z vykorystanniam svitovoho henofondu [The genesis of breed transformation of Swan cattle using the world gene pool]. MakDen. [In Ukrainian].
- Vigolo, V., Visentin, E., Ballancin, E., Lopez-Villalobos, N., Penasa, M., & De Marchi, M. (2023). β -Casein A1 and A2: Effects of polymorphism on the cheese-making process. *J. Dairy Sci.*, 106, 5276–5287. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23072>
- Vitte, K., Kerziene, S., Klementavičiūtė, J., Vitte, M., Dilbiene, V., & Stankevičius, R. (2022) Relationship between β -casein genotypes (A1A1, A1A2, and A2A2) and coagulation properties of milk and the fatty acid composition and sensory characteristics of dairy products (soft cheese, sour cream, and butter). *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science*, 71, 21–32. <https://doi.org/10.1080/09712119.2022.2046005>

Zepeda-Batista, J. L., Saavedra-Jiménez, L. A., Agustín Ruíz-Flores Núñez-Domínguez, R., & Rodolfo Ramírez-Valverde, L. A. (2017). Potential influence of κ -casein and β -lactoglobulin genes in genetic association studies of milk quality traits. *Asian-Australas J. Anim. Sci.*, 30 (12), 1684–1688. <https://doi.org/10.5713/ajas.16.0481>

Одержано редколегією 11.04.24 р.

Прийнято до друку 25.06.24 р.