

ПОЛІМОРФІЗМ ГЕНІВ CSN2 ТА TNF- α У ПОПУЛЯЦІЇ КОРІВ ГОЛШТИНСЬКОЇ ПОРОДИ, ЯКА РОЗВОДИТЬСЯ В УКРАЇНІ

Р.О. КУЛІБАБА ¹, Ю.В. ЛЯШЕНКО ², М.І. САХАЦЬКИЙ ¹

¹ Національний університет біоресурсів і природокористування України, вул. Героїв Оборони 15, Київ, 03041, Україна

² Інститут тваринництва НААН України, вул. Тваринників 1-А, Харків, 61026, Україна

E-mail: romankx37@gmail.com

Досліджено особливості генетичної структури популяції великої рогатої худоби голштинської породи, яка розводиться в Україні, за локусами бета-казеїну та фактору некрозу пухлини альфа. За використання методів алей-специфічної ПЛР (AS-PCR) та ПЛР з рестрикційним аналізом (PCR-RFLP) проаналізовано поліморфізм гену бета-казеїну (CSN2) за алейними варіантами A¹ та A² та фактору некрозу пухлини альфа (TNF- α) за SacI-поліморфізмом у промоторній ділянці гену (маркерна мутація –824 A>G) та RsaI-поліморфізмом у четвертому екзоні. Доведено, що обидва локуси є поліморфними у дослідній популяції корів. За кожним з поліморфних локусів встановлені основні генетико-популяційні параметри популяції корів голштинської породи. За локусом CSN2 встановлено суттєве превалювання частоти алейю A² над A¹ (0,78 проти 0,22). За SacI- та RsaI поліморфізмом TNF- α виявлено максимальні (1,980 та 1,988) значення рівня поліморфності локусу (кількість ефективних алейів). За обома мутаціями в гені TNF- α встановлений фактичний паритет за значенням частот відповідних алейів (0,55 та 0,45 для SacI-поліморфізму; 0,54 та 0,46 для RsaI-поліморфізму). За RsaI-поліморфізмом у четвертому екзоні TNF- α у дослідній популяції тварин зафіксовано відхилення від стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, виявлений суттєвий ексцес гетерозиготних особин (25 %). За результатами аналізу параметрів молочної продуктивності особин із різними генотипами за локусом CSN2 з'ясовано, що особини з генотипом A²A² характеризуються більшими значеннями стандартного надоя у порівнянні з особинами з генотипом A¹A¹ ($p = 0,042$). За SacI- та RsaI-поліморфізмом гену TNF- α вірогідних відмінностей за параметром стандартного надоя за дві лактації між особинами з різними генотипами не виявлено.

Ключові слова: поліморфізм, ген, маркер, селекція, велика рогата худоба, бета-казеїн, рестрикція.

Вступ. Розвиток сучасних молекулярно-генетичних підходів до проведення селекційної ро-

боти з тваринами (геномна селекція, маркер-асоційована селекція, ген-асоційована селекція) призводить до необхідності визначення специфічних характеристик генофондних та комерційних порід сільськогосподарських тварин (Mrode et al, 2019; Zalewska et al, 2021). Значний прогрес, який демонструє сучасна маркер-асоційована селекція у тваринництві, спонукає до необхідності пошуку нових об'єктів для досліджень — у першу чергу це стосується алейних варіантів різних функціональних генів, продукти яких пов'язані з господарсько-корисними ознаками тварин (Wakchaue et al, 2015). Збільшення кількості досліджень, у яких висвітлено особливості генетичної структури популяцій великої рогатої худоби у всьому світі з урахуванням наявної варіативності локальних/нативних порід різних регіонів, сприяє формулюванню нових завдань, виконання яких дасть можливість суттєво змінити стале уявлення про загальні акценти та тренди сучасної селекції у молочному скотарстві. В цьому контексті, до одного з найбільш перспективних напрямів у практичній генетиці великої рогатої худоби, відноситься завдання отримання молока, що містить у своєму складі виключно A2 форму бета-казеїну (A2 молоко) (Cieślińska et al, 2019; Sebastiani et al, 2022; Jiménez-Montenegro et al, 2022).

Як відомо, у великої рогатої худоби молекула бета-казеїну представлена двома найбільш поширеними формами — A1 та A2 (Kaskous 2020; Antonopoulos et al, 2021). Згідно даних Sebastiani зі співавторами, існують й інші альтернативні варіанти бета-казеїну (12 різних варіантів), однак, у контексті питань органічної продукції та потенційного впливу на здоров'я людини, саме варіанти A1 та A2 мають першочергове значення (Sebastiani et al, 2020). Варіанти A1 та A2 відрізняються наяв-

ністю відповідної амінокислоти у позиції 67 молекули бета-казеїну (Sebastiani et al, 2020). У випадку з бета-казеїном A1 у положенні 67 знаходиться гістидин (His), у A2 — пролін (Pro) (Thiruvengadam et al, 2020). Різні амінокислотні залишки (His та Pro) в молекулі бета-казеїну відповідають конкретним алелям гену бета-казеїну (*CSN2*) за певною варіативною позицією в поліморфному сайті ДНК — наявністю цитозину (алель A²), або аденіну (алель A¹) (Dai et al, 2016; Kay et al, 2021).

При потраплянні A1 форми бета-казеїну в шлунково-кишковий тракт відбувається утворення β-казоморфіну 7, що призводить до низки негативних наслідків для організму людини (Sahin et al, 2018; Gaudry et al, 2021). Наявність проліну або гістидину в положенні 67 молекули бета-казеїну й визначає фізіологічний ефект від вживання коров'ячого молока — у випадку з A2 формою молекули, утворення β-казоморфіну 7 не відбувається (Cieślińska et al, 2022). Питання, стосовно визначення ступеня негативного впливу A1 форми бета-казеїну на організм людини та оцінки ризиків розвитку низки захворювань (діабет 1-го типу, ішемічна хвороба серця, атеросклероз, аутизм та інші) досі залишається відкритим та дискусійним, що тільки підкреслює актуальність досліджень (Thirupathy et al, 2019; Kumar et al, 2021).

У практичній генетиці великої рогатої худоби за останні роки активно проводиться робота зі створення стад корів-продуцентів A2 молока (Mencarini et al, 2013; Fernández-Rico et al, 2022; Sebastiani et al, 2022). Декілька років тому цей тренд з'явився і в Україні, що, в свою чергу, визначається потенційною привабливістю порід ВРХ української селекції, в яких частка бажаного алеля A² може бути достатньо високою (Ladyka et al, 2021; Kulibaba et al, 2023).

Привабливість бета-казеїну в якості об'єкта для маркер-асоційованої селекції (MAS) визначається його специфічними характеристиками відносно ДНК-маркерів, що стали вже класичними для молочного скотарства, такими як пролактин (*PRL*), бета-лактоглобулін (*LGB*), лептин (*LEP*), рецептор гормону росту (*GHR*) та інші (Singh et al, 2014). Алельні варіанти бета-казеїну виступають у ролі якісних

ознак, так як цільова мутація повністю визначає тип продукту — A1 або A2 форму бета-казеїну в молоці (та, відповідно, і тип молока). Однак, незважаючи на перспективність використання бета-казеїну в якості функціональної одиниці селекційної роботи, залишається відкритим питання стосовно впливу інших генів на загальні параметри молочної продуктивності тварин. З цієї точки зору, недостатньо просто проводити відбір особин за алельними варіантами *CSN2*, необхідно також враховувати фактор впливу інших локусів, так як отримання продукції, молока A2, може супроводжуватися зниженням показників молочної продуктивності (надій, вміст жиру і білка), що, фактично, може повністю перекреслити переваги проведеної селекційної роботи.

Поряд з класичним підходом до селекційного покращення продуктивних ознак тварин у молочному скотарстві до перспективних напрямлень племінної роботи відноситься завдання дослідження параметрів резистентності до захворювань різної етіології, в першу чергу до маститу (Sender et al, 2013; Gogoi et al, 2021; Suprovych et al, 2022; Saranya et al, 2023). У цьому контексті, одним з найбільш перспективних об'єктів є ген фактору некрозу пухлини альфа (*TNF-α*), різні алельні варіанти якого пов'язані з проявом резистентності тварин до захворювань (Pal et al, 2020).

Ген фактору некрозу пухлини альфа (*TNF-α*) відноситься до одного з найбільш цікавих та актуальних об'єктів досліджень у практичній генетиці великої рогатої худоби впродовж вже двох десятиріч. Широкий спектр фізіологічних функцій *TNF-α*, пов'язаних з регуляцією активності імунної системи, привів до появи великої кількості досліджень з пошуку асоціативного зв'язку різних алельних варіантів гена з показниками резистентності корів (Konnai et al, 2006; Wojdak-Maksymiec et al, 2013; Wojarojc-Nosowicz et al, 2018). Слід зазначити, що в якості об'єкта досліджень можуть виступати не тільки комерційні, але й локальні (аборигенні) породи корів (Cheng et al, 2016; Sattar et al, 2019). При цьому, питання стосовно асоціацій різних алелів *TNF-α* з продуктивними ознаками тварин залишається, фактично, відкритим. Дослідження з аналізу зв'язку алельних

варіантів *TNF-α* з показниками молочної продуктивності та репродуктивних функцій корів різних порід проводяться, однак їх кількість є суттєво меншою у порівнянні з кількістю публікацій, присвячених питанням резистентності. У якості прикладу можна навести роботи Yudin NS et al та Mohsen TUC et al (Yudin et al, 2013; Mohsen et al, 2022).

Основною метою селекційної роботи у молочному скотарстві є, в решті решт, отримання безпечної та якісної продукції для споживача, що додатково підкреслює важливість поєднання завдань MAS у напрямі підвищення як параметрів молочної продуктивності, так і загальної резистентності тварин (Weigel et al, 2018). Більш того, для багатьох питань у цій галузі, саме комбінація методичних підходів маркер-асоційованої та геномної селекції є оптимальною стратегією покращення ознак тварин (Враїнік et al, 2023). З урахуванням завдання зі створення експериментальних популяцій корів-продуцентів А2 молока та одночасним формуванням підґрунтя для забезпечення подальшого проведення маркер-асоційованої селекції на резистентність до захворювань різної етіології (в першу чергу — до маститу) необхідно проводити типування особин не тільки за алельними варіантами бета-казеїну, але й за іншими локусами, до яких відноситься і ген фактору некрозу пухлини альфа. У цьому контексті, саме аналіз комплексних генотипів є ефективним інструментом дослідження варіативності популяцій особин з різними генотипами за бета-казеїном та варіантами маркерів, асоційованих з адаптаційними ознаками тварин, до яких відносяться й різні алелі *TNF-α*.

Таким чином, кінцевою ідеєю загального проєкту досліджень (частиною якого є запропонована стаття) є проведення маркер-асоційованої селекції молочних порід великої рогатої худоби за локусом бета-казеїну, з метою отримання експериментальних груп тварин-продуцентів А2 молока, які є також оптимізованими за параметрами адаптаційних якостей (у першу чергу — резистентності до захворювань).

Матеріали і методи. Дослідження проведені у лабораторії молекулярно-генетичних досліджень кафедри біології тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України.

Виділення ДНК проводили за використання комерційного набору реагентів DNA-sorb-B nucleic acid extraction kit (AmpliSens), згідно рекомендаціям виробника (http://lightgene.com.ua/wp-content/uploads/2017/06/DNA-sorb-B_PM_220217.pdf). В якості біологічного матеріалу використовували цільну кров тварин, отриману від ветеринарної служби господарства (СТОВ «Агросвіт»).

В якості об'єкта досліджень використовували корів голштинської породи (молочний напрям продуктивності, n = 98).

Генотипування особин проводили за використання методів алель-специфічної ПЛР (AS-PCR) у випадку з локусом бета-казеїну. Для типування за локусом фактору некрозу пухлини альфа використовували метод ПЛР-ПДРФ (ПЛР з рестрикційним аналізом, PCR-RFLP).

Для проведення ампліфікації для кожного з локусів використовували відповідні праймери, структуру яких наведено у табл. 1.

Ампліфікацію проводили за відповідними для кожного локусу програмами. Для *CSN2* ви-

Таблиця 1. Нуклеотидна структура праймерів

Локус	Праймер	Нуклеотидна структура	Джерело
<i>CSN2</i>	854 F 854 R (A1) 854 R (A2)	gcccagatgagagaagtgagg gatgttttggaggagctgttat gatgttttggaggagctgttag	Keating et al, 2008
<i>TNF-α</i> (SacI-поліморфізм)	F R	gagaaatgggacaacctcca ccaggaactcgctgaaactc	Bojarojć-Nosowicz et al, 2011
<i>TNF-α</i> (RsaI-поліморфізм)	F R	gggtgacttgctctaactcatc aggcctcacttcctacatcccta	Higuchi et al, 1999

користували модифікований протокол ампліфікації: один цикл — денатурація 94 °C 5 хв; 10 циклів — денатурація 94 °C 30 с, відпал 66 °C 30 с, елонгація 72 °C 30 с; 25 циклів — денатурація 94 °C 30 с, відпал 64 °C 30 с, елонгація 72 °C 30 с (Kulibaba et al, 2023). Стадію фінальної елонгації не використовували.

У випадку з *TNF-α* використовували наступні протоколи ампліфікації: один цикл — денатурація 94 °C 5 хв; 35 циклів — денатурація 94 °C 30 с, відпал 30 с (60 °C для *TNF-α* *SacI*; 63 °C для *TNF-α* *RsaI*), елонгація 72 °C 30 с; фінальна елонгація — 72 °C 10 хв. Об'єм кінцевої суміші в усіх випадках склав 20 мкл, концентрація праймерів — 0,2 мкМ.

Рестрикцію фрагментів гену *TNF-α* проводили з використанням ендонуклеаз рестрикції *SacI* та *RsaI* («Thermo Fisher Scientific», США) відповідно до протоколів виробника.

Продукти ампліфікації/рестрикції розділяли в агарозних 1,5%-них гелях за напруги 120 В упродовж 40 хв. В якості барвника використовували етидіум бромід.

Візуалізацію фрагментів ДНК в гелі проводили в ультрафіолетовому спектрі (312 нм). Для визначення розміру ампліфікованих/рестрикційних фрагментів використовували маркер молекулярних мас GeneRuler 50 bp (Thermo Fisher Scientific).

У випадку з *CSN2* (фрагмент 7-ого екзону гена) на електрофореграмі представлений фрагмент ДНК розміром 854 п.н.

Для *TNF-α* (*SacI*-поліморфізм у промоторній ділянці гена, -824 A>G) — розмір ампліфікованого фрагменту складає 249 п.н. Алель А представлений на електрофореграмі фрагментом розміром 168 та 81 п.н.; алель G — 249 п.н.

Для *TNF-α* (*RsaI*-поліморфізм у четвертому екзоні) — розмір ампліфікованого фрагменту складає 1233 п.н. Алель С представлений фрагментом розміром 1233 п.н.; алель Т — 928 та 305 п.н.

За загальною схемою, дослідження було розділено на два пов'язаних етапи. На першому етапі проводили генетико-популяційні дослідження — визначення параметрів генетичної мінливості дослідної популяції корів за локусами бета-казеїну та фактору некрозу пухлини альфа. На другому етапі проводили порівнян-

ня значень середнього надою по групах тварин з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами.

За результатами індивідуального типування особин розраховували загальні генетико-популяційні параметри: частоти генотипів і алелів, фактичну (H_o) та очікувану (H_e) гетерозиготність, коефіцієнт гомозиготності (C_a), кількість ефективних алелей (n_e), індекс фіксації Райта (F_{is}), відповідність стану генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом методом χ^2 . Розрахунки генетико-популяційних параметрів проводили за використання програмного забезпечення GENALEX version 6.5 (Peakall et al, 2012).

В якості показника молочної продуктивності використовували значення середнього надою за 305 днів лактації (кг) для двох лактацій. Аналіз продуктивних параметрів тварин з різними генотипами за локусами *CSN2* та *TNF-α* проводили за використання однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) та критерію множинних порівнянь Тьюкі-Крамеру в якості інструменту post-hoc тестування. Розрахунки проводили у середовищі Microsoft Excel з використанням Real Statistics Resource Pack (<http://www.real-statistics.com/free-download/real-statistics-resource-pack/>). Перевірку розподілу на нормальність проводили за критерієм Шапіро-Уїлка. У випадку, якщо розподіл вірогідно відрізнявся від нормального, використовували критерій Краскела-Уолліса та тест Неменї.

Результати досліджень та їх обговорення. За результатами проведених генетико-популяційних досліджень встановлено, що локуси бета-казеїну та фактору некрозу пухлини альфа (дві мутації) у дослідній популяції корів є поліморфними.

За локусом *CSN2* встановлено наявність особин зі всіма можливими генотипами (A^1A^1 , A^1A^2 та A^2A^2). На рис. 1 наведено електрофореграму продуктів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну.

У випадку з маркерною системою AS-PCR, яку ми використовували для типування особин ВРХ за локусом *CSN2*, наявність ампліфікованого фрагменту лише в позиції для алеля A^1 для кожної з проб, вказує на генотип A^1A^1 ; наявність фрагменту тільки в позиції для алеля A^2 — вказує на генотип A^2A^2 ; наявність фраг-

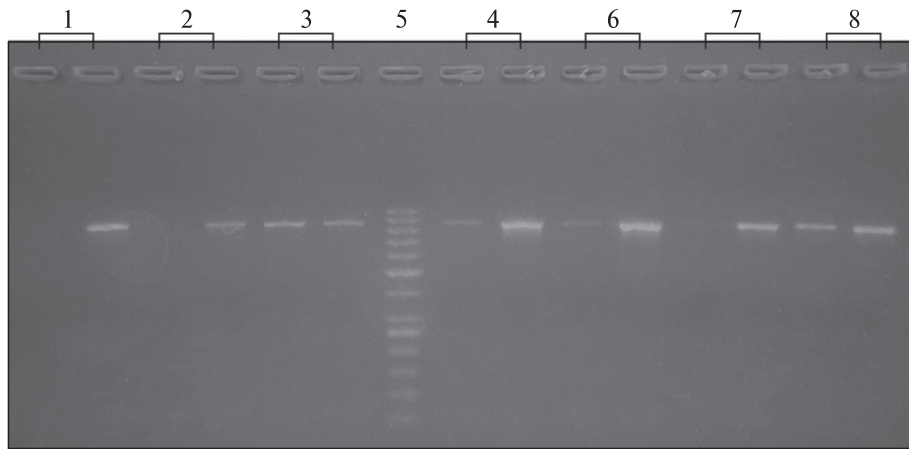


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації фрагменту сьомого екзону гену бета-казеїну в дослідній популяції корів. 1–8 – номери проб; 1, 2, 4, 6, 7 – генотип A^2A^2 ; 3, 8 – генотип A^1A^2 ; 5 – маркер молекулярних мас GeneRuler 50 bp

ментів в обох позиціях – на гетерозиготний генотип A^1A^2 . Типування особин за локусом бета-казеїну за використання AS-PCR проводили з урахуванням аналізу інтенсивності флуоресценції фрагментів ДНК на основі методичних підходів, які були розроблені нами раніше (Kulibaba et al, 2023).

У дослідній популяції корів голштинської породи виявлено особин зі всіма можливими за локусом бета-казеїну генотипами, однак співвідношення відповідних алелів суттєво різнилося. У цілому, для дослідної популяції є характерним значне переважання частоти алелю A^2 проти A^1 (0,78 vs 0,22). Також виявлена достатньо велика кількість гомозиготних за алелем A^2 особин. За результатами досліджень встановлено, що дослідна популяція тварин знаходиться в стані генетичної рівноваги за Харді-Вайнбергом, що вказує на відсутність вираженої дії відбору за локусом бета-казеїну на цьому етапі. За умови відсутності суттєвих змін та модифікації програми розведення голштинської породи в господарстві, варіації у значеннях частот алелів A^1 та A^2 будуть відсутніми.

Значення показника індексу фіксації Райта дорівнює 0,018, що додатково вказує на відсутність активних формують процесів та повністю відповідає рівноважному стану популяції корів. У свою чергу, значення кількості ефективних алелів вказує на середній рівень поліморфності локусу (1,52) відносно класичної двохалельної системи.

У порівняльному аспекті, переважання частоти алелю A^2 у голштинської породи корів також відмічене для популяцій, які розводяться в Хорватії (65,0 %), Греції (74,4 %), Словаччині (76,18 %) (Ivanković et al, 2021; Antonopoulos et al, 2021; Miluchová et al, 2023).

У той же час, у голштинських молочних корів, які розводяться у Туреччині, співвідношення частот алелів A^1 та A^2 є більш вирівняним – 0,44 проти 0,56 (Soyudal et al, 2019). У свою чергу, для інших популяцій голштинських корів є характерною протилежна ситуація – превалювання частоти алеля A^1 (0,54) (Hanusová et al, 2010). Таку ситуацію можна пояснити поступовим проведенням племінної роботи на підвищення частоти алеля A^2 локусу бета-казеїну, з метою отримання відповідної продукції (молока A^2). Про це свідчать результати аналізу публікацій за останні три роки у порівнянні з роботами десятирічної давнини. Саме тому ми бачимо наступний тренд – поступове збільшення бажаного алеля A^2 у популяціях корів голштинської молочної породи у різних регіонах світу, внаслідок популяризації молочної продукції типу A^2 . Подібної думки дотримується також Kamiński зі співавторами (Kamiński et al, 2022).

Суттєва варіативність частоти алеля A^2 локусу бета-казеїну залежно від популяції у межах однієї породи великої рогатої худоби була відмічена нами і в попередньому дослідженні, де в якості об'єкту використовували різні по-

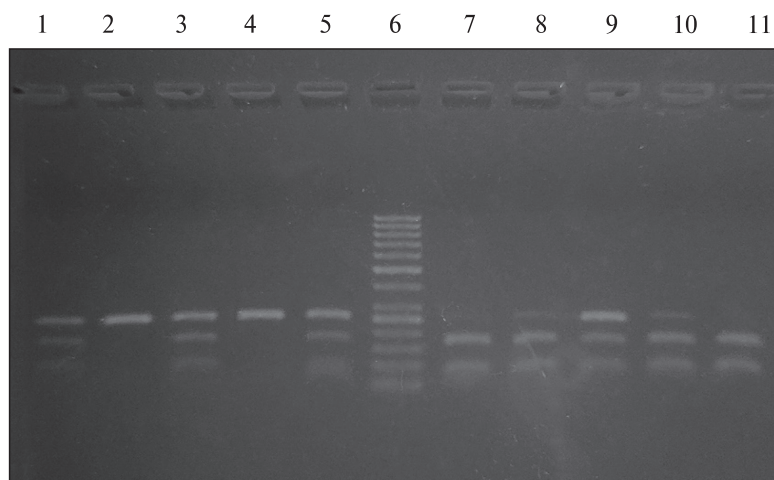


Рис. 2. Електрофореграма продуктів рестрикції промоторного фрагменту гену *TNF-α* (–824 A>G) у дослідній популяції корів. 1–11 – номери проб; 1, 3, 5, 9 – генотип AG; 2, 4 – генотип GG; 7, 8, 10, 11 – генотип AA; 6 – маркер молекулярних мас GeneRuler 50 bp

пуляції корів української чорно-рябої молочної породи (Kulibaba et al, 2023). Популяційна специфічність варіативності частоти алеля у межах однієї породи виникає, на нашу думку, внаслідок особливостей селекційної роботи, яка проводиться у господарстві (селекція на отримання продуцентів А2 молока, селекція на резистентність до маститу та інше).

З урахуванням всього вищенаведеного виникає цілком закономірне питання – чому, незважаючи на економічну привабливість проєкту з отримання експериментальних груп тварин з бажаним генотипом А²А², в дослідній популяції великої рогатої худоби фінальної фіксації (набування мономорфного стану) алелю А² не відбувається? Відповідь, на нашу думку, полягає в особливостях племінної роботи, яка проводиться з тваринами. З метою зниження матеріальних затрат для отримання нащадків використовується типований за алельними варіантами бета-казеїну сім'яний матеріал плідників. Однак, при такому методичному підході, за умови відсутності вибракування особин (корів) з небажаними генотипами А¹А¹ та А¹А² з племінного ядра, відбувається поступове збільшення частки алеля А² у популяції, але без можливості його остаточної фіксації. Через декілька генерацій ми отримаємо популяцію тварин у стані генетичної рівноваги, в якій вже не будуть відбуватися активні формоутворю-

ючі процеси та суттєві зміни частот відповідних алелів. Саме таку картину ми й спостерігаємо у випадку дослідної породи корів.

За *SacI*-поліморфізмом локусу *TNF-α* встановлено наявність особин зі всіма можливими варіантами генотипів – AA, AG та GG. Відповідно, локус *TNF-α* за мутацією –824 A>G є поліморфним у дослідній популяції корів. Електрофореграма продуктів рестрикції промоторного фрагменту гену *TNF-α* наведена на рис. 2.

На відміну від бета-казеїну для дослідження поліморфізму локусу фактору некрозу пухлини альфа використовували класичний рестрикційний аналіз. На представленій електрофореграмі наявність одного фрагменту ДНК, розміром 249 п.н., вказує на генотип GG (мутація –824 A>G призводить до втрати сайту рестрикції для *SacI*); наявність двох фрагментів, розміром 168 та 81 п.н., вказує на генотип AA. Гетерозиготний генотип AG представлений комбінацією трьох фрагментів розміром 249, 168 та 81 п.н. відповідно. Отримані патерні рестрикції повністю відповідають очікуванам.

За результатами досліджень встановлено, що дослідна популяція корів характеризується дуже близькими значеннями частот алелів А та G (0,55 проти 0,45). За співвідношенням генотипів найбільшу кількість складають осо-

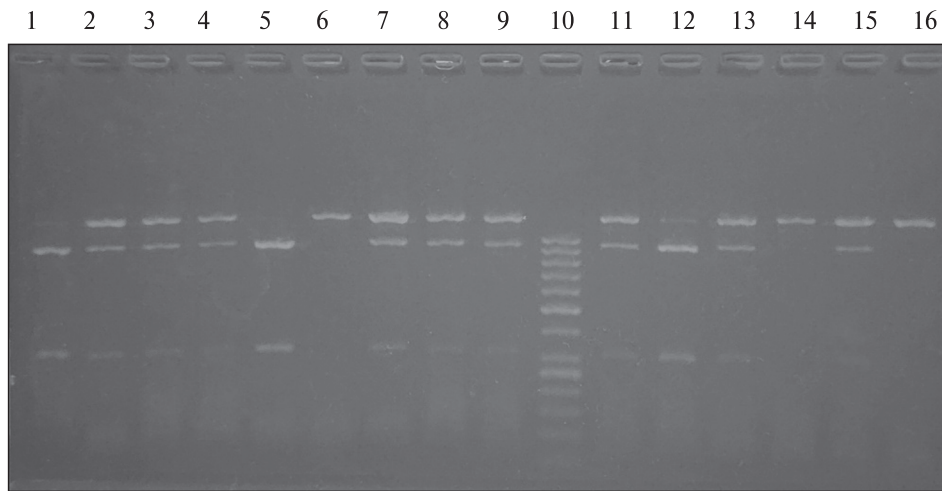


Рис. 3. Електрофореграма продуктів рестрикції екзонного фрагменту гену *TNF-α* (*RsaI*-поліморфізм) у дослідній популяції корів. 1–16 – номери проб; 1, 5, 12 – генотип ТТ; 2–4, 7–9, 11, 13, 15 – генотип СТ; 6, 14, 16 – генотип СС; 10 – маркер молекулярних мас GeneRuler 50 bp

бини з гетерозиготним генотипом AG (47), найменшу – гомозиготи GG (21). Гомозиготні за алелем А особи займають проміжне положення (30). За результатами аналізу співвідношення фактичної та очікуваної кількості особин з різними генотипами встановлена відсутність відхилення від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом. Значення індексу фіксації Райту (F_{is}) приймає майже мінімальне можливе значення (0,03), що також свідчить про генетичну рівновагу в дослідній популяції. При цьому, на відміну від локусу бета-казеїну, рівень поліморфності локусу (кількість ефективних алелів) досягає, практично, максимального значення (1,98), що визначається

близькими значеннями частот алелів локусу *TNF-α* (табл. 2).

У свою чергу, за *RsaI*-поліморфізмом четвертого екзону гену *TNF-α* у дослідній популяції корів встановлено наявність особин зі всіма можливими варіантами генотипів – СС, СТ та ТТ. Відповідно, локус *TNF-α* є поліморфним. Електрофореграму продуктів рестрикції фрагменту гену *TNF-α* наведено на рис. 3.

На представленій електрофореграмі наявність одного фрагменту, розміром 1233 п.н., вказує на генотип СС; двох фрагментів, розміром 928 та 305 п.н. – на генотип ТТ; трьох фрагментів, розміром 1233, 928 та 305 п.н. –

Таблиця 2. Генетична структура дослідної популяції тварин за локусами *CSN2* та *TNF-α*

Локус	Генотипи						Частоти алелів		χ^2
	О			Е					
<i>CSN2</i>	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²	A ¹	A ²	0,027
	5	33	60	4,75	33,63	59,62	0,22	0,78	
<i>TNF-α</i> SacI	AA	AG	GG	AA	AG	GG	A	G	0,119
	30	47	21	29,65	48,51	19,84	0,55	0,45	
<i>TNF-α</i> RsaI	CC	CT	TT	CC	CT	TT	C	T	6,20
	22	61	15	28,58	48,69	20,73	0,54	0,46	

Примітка. О – фактична кількість особин з певним генотипом за кожним з дослідних локусів; Е – очікувана кількість особин з певним генотипом за кожним з дослідних локусів.

на гетерозиготний генотип СТ. Отримані патерни рестрикції повністю відповідають очікуванню.

За розподілом частот алелів дослідна популяція корів дуже схожа до результатів за *SacI*-поліморфізмом локусу *TNF-α* — значення частот протилежних алелів С і Т близькі та складають 0,54 та 0,46 відповідно. У той же час, розподіл генотипів за кожним з локусів суттєво відрізняється, що й призвело до певних особливостей. Так, за *RsaI*-поліморфізмом локусу *TNF-α* дослідна популяція тварин демонструє максимальний, у порівнянні з іншими локусами, рівень фактичної гетерозиготності (0,622), що, на тлі значень показника H_e , призводить до суттєвого ексцесу гетерозигот (рівень аутбридингу складає 25 %).

Кількість гетерозиготних особин майже втричі переважає кількість гомозигот за окремими алелями. У той же час рівень поліморфності локусу, як і в попередньому випадку, є дуже високим та досягає максимального значення (1,988) серед всіх досліджених генів. Особливості розподілу генотипів призвели до відхилення від рівноважного стану за Харді-Вайнбергом, що свідчить про вплив добору, або дрейф генів.

У табл. 2 наведено дані стосовно особливостей генетичної структури популяції корів голштинської породи за всіма виявленими поліморфними локусами.

Загальні параметри генетичної мінливості дослідної популяції за виявленими поліморфними локусами наведено у табл. 3.

Таблиця 3. Основні генетико-популяційні характеристики дослідної породи корів за локусами *CSN2* та *TNF-α*.

Локус	C_a	n_e	H_o	H_e	F_{is}
<i>CSN2</i>	0,657	1,522	0,337	0,343	0,018
<i>TNF-α SacI</i>	0,505	1,980	0,479	0,495	0,033
<i>TNF-α RsaI</i>	0,503	1,988	0,622	0,497	-0,252

Примітка. C_a — коефіцієнт гомозиготності; n_e — кількість ефективних алелів; H_o — фактична гетерозиготність; H_e — очікувана гетерозиготність; F_{is} — індекс фіксації Райта.

Таблиця 4. Показники середнього надою особин з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами ($M \pm SE$)

Локус	Генотип		
Перша лактація			
CSN2	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²
	7182,4 ± 312,63 ^a	8313,1 ± 178,16 ^{ab}	8428,9 ± 148,25 ^b
TNF-α SacI	AA	AG	GG
	8203,1 ± 244.12 ^a	8364,5 ± 191,04 ^a	8365,6 ± 263,51 ^a
TNF-α RsaI	CC	CT	TT
	8571,8 ± 236,01 ^a	8160,1 ± 197,87 ^a	8810,8 ± 434,76 ^a
Друга лактація			
CSN2	A ¹ A ¹	A ¹ A ²	A ² A ²
	9345,6 ± 685,54 ^a	9728,2 ± 273,56 ^a	9905,3 ± 221,01 ^a
TNF-α SacI	AA	AG	GG
	9994,9 ± 389,63 ^a	10063,3 ± 262,67 ^a	9581,0 ± 332,23 ^a
TNF-α RsaI	CC	CT	TT
	10262,1 ± 453.45 ^a	9955,8 ± 257,66 ^a	9953,2 ± 548,97 ^a

Примітка. Різні індекси (a, b) вказують на вірогідність різниці, збіг індексів вказує на відсутність вірогідності різниці.

На другому етапі досліджень проведено аналіз значень стандартного надою за двома лактаціями для особин з різними генотипами за виявленими поліморфними локусами. Значення показників надою для особин за різними генотипами наведено у табл. 4.

За результатами експерименту стосовно локусу бета-казеїну для першої лактації встановлено, що особини з генотипом A^2A^2 характеризуються вірогідно вищим значенням надою порівняно з особинами з генотипом A^1A^1 ($p = 0,042$). Різниця між значенням надою для гомозиготних особин перевищує 1200 кг. Гетерозиготні особини займають проміжне положення.

На другу лактацію ситуація дещо змінюється. Гомозиготні особини за алелем A^2 також демонструють максимальні значення надою у порівнянні з особинами з іншими генотипами, але різниця не є достовірною ($p = 0,749$). Перевищення значень показнику досягає 560 кг. Відсутність вірогідності відмінностей на тлі наявної тенденції можна пояснити малим об'ємом вибірки особин з генотипом A^1A^1 ($n = 5$). У будь-якому разі, результати статистичного аналізу демонструють перспективність проведення подальших досліджень з обов'язковим збільшенням вибіркової сукупності тварин.

За геном фактору некрозу пухлини альфа за обома поліморфними системами вірогідних відмінностей за показником стандартного надою за двома лактаціями між особинами з різними генотипами не виявлено. Приймаючи до уваги загальну спрямованість галузі молочного скотарства на отримання експериментальних груп тварин-продуцентів A_2 молока на тлі актуалізації питань з покращення адаптаційних якостей великої рогатої худоби, відсутність контрпродуктивного ефекту від різних алельних варіантів гену $TNF-\alpha$, як одного з найбільш перспективних генів-кандидатів у контексті резистентності до захворювань, є, безумовно, позитивним фактором.

Наявність вірогідної різниці між показниками стандартного надою для корів з різними генотипами за локусом бета-казеїну підтверджується роботами низки авторів, що проводилися на комерційних та локальних породах великої рогатої худоби (Kumar et al, 2019;

Ivanković et al, 2021). Дані стосовно підвищених значень надою, які є характерними для особин голштинської породи з генотипом A^2A^2 підтверджуються результатами, отриманими Olenski зі співавторами у Польщі, а також Ristanic зі співавторами у Сербії (Olenski et al, 2010; Ristanic et al, 2020).

Підвищені значення надою у корів з гомозиготним за алелем A^2 генотипом є додатковою позитивною передумовою для проведення маркер-асоційованої селекції в напрямку отримання продуцентів A_2 молока, що є особливо актуальним у контексті питання безпечної та органічної продукції тваринництва.

Висновки. За результатами проведених досліджень встановлено особливості генетичної структури популяції корів голштинської породи, яка розводиться в Україні, за локусами бета-казеїну ($CSN2$) та фактору некрозу пухлини альфа ($TNF-\alpha$). Доведено, що обидва локуси є поліморфними за трьома маркерними системами у дослідній популяції корів. За кожним з поліморфних локусів встановлено основні генетико-популяційні параметри. За результатами аналізу параметрів молочної продуктивності особин з різними генотипами за локусом бета-казеїну з'ясовано, що особини з генотипом A^2A^2 характеризуються більшими значеннями стандартного надою у порівнянні з особинами з генотипом A^1A^1 ($p = 0,042$). За $SacI$ - та $RsaI$ -поліморфізмом гена $TNF-\alpha$ вірогідних відмінностей за параметром стандартного надою за дві лактації між особинами з різними генотипами не виявлено.

Дотримання етичних стандартів. Дослідження проведені за використання цільної крові в якості джерела біологічного матеріалу, яка була отримана від ветеринарної служби господарства з розведення та утримання великої рогатої худоби.

Конфлікт інтересів. Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Дослідження проведені в межах фінансування науково-дослідної роботи за темою №110/8-пр-2022 «Розробити технологію молекулярно-генетичного забезпечення селекційного процесу зі створення стад корів-продуцентів A_2 молока».

CSN2 AND TNF-α GENE POLYMORPHISM IN HOLSTEIN CATTLE RAISED IN UKRAINE

R.O. Kulibaba, Yu.V. Liashenko, M.I. Sakhatskyi

National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine
 Heroiv Oborony Str. 15, Kyiv, 03041 Ukraine
 Institute of Animal Science, the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine
 Tvarinnykiv Str. 1-A, Kharkiv, 61026, Ukraine
 E-mail: romankx37@gmail.com

The genetic structure of the Holstein cattle population raised in Ukraine was studied by beta-casein and tumor necrosis factor alpha gene polymorphism. Polymorphism of the beta-casein gene (*CSN2*) was analyzed by A¹ and A² allelic variants using allele-specific PCR (AS-PCR) and the tumor necrosis factor alpha (*TNF-α*) gene using PCR with restriction fragment length polymorphism analysis (PCR-RFLP) that included the *SacI*-polymorphism in the promoter region of the gene (marker mutation –824A > G) and the *RsaI*-polymorphism in the fourth exon. It was demonstrated that both loci are polymorphic in the research cattle population. For each of the polymorphic loci, main genetic parameters of the Holstein cattle population were determined. For the *CSN2* locus, a significant prevalence of allele A² frequency over A¹ was established (0.78 versus 0.22). In the case of the *SacI*- and *RsaI*-polymorphisms of *TNF-α*, maximum values (1.980 and 1.988) were found for the locus's polymorphism level (number of effective alleles). For both *TNF-α* gene mutations, actual parity was established by distribution of allele frequencies (0.55 and 0.45 for *SacI*-polymorphism; 0.54 and 0.46 for *RsaI*-polymorphism). Regarding the *RsaI*-polymorphism in the fourth exon of *TNF-α*, there was a deviation from the state of genetic equilibrium according to Hardy-Weinberg, with a significant excess the number of heterozygous individuals (25 %) in the research population. Analysis of the milk production of individuals with different *CSN2* genotypes revealed that individuals with the A²A² genotype had higher standard milk yields compared to individuals with the A¹A¹ genotype ($p = 0.042$). There were no significant differences in milk yield for two lactations between individuals with different genotypes by *SacI*- and *RsaI*-polymorphisms of the *TNF-α* gene.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

Antonopoulos D, Vougiouklaki D, Laliotis GP, Tsironi T, Valasi I, Chatzilazarou A, Halvatsiotis P, Houhoula D (2021) Identification of Polymorphisms of the *CSN2* Gene Encoding β-Casein in Greek Local Breeds of Cattle. *Vet Sci* 8, 257. <https://doi.org/10.3390/vetsci8110257>

- Bojarojc-Nosowicz B, Kaczmarczyk E, Jastrzebska A (2018) Relationship between polymorphism in the tumour necrosis factor-alpha gene and selected indices and cell subpopulations in naturally bovine leukaemia virus-infected and healthy cows. *Veterinarni Medicina* 63(3):101–109. <https://doi.org/10.17221/135/2017-VETMED>
- Bojarojc-Nosowicz B, Kaczmarczyk E, Stachura A, Kotkiewicz M (2011) Polymorphism in the promoter region of the tumor necrosis factor-alpha gene in cattle herds naturally infected and uninfected with the Bovine Leukemia Virus. *Polish J Veterinary Sci* 14(4):671–673. <https://doi.org/10.2478/v10181-011-0101-0>
- Brajnik Z, Ogorevc J (2023) Candidate genes for mastitis resistance in dairy cattle: a data integration approach. *J Anim Sci Biotechnol* 14:10. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00821-0>
- Cheng Y, Huang CS, Tsai H-J (2016) Relationship of bovine *TNF-α* gene polymorphisms with the risk of bovine tuberculosis in Holstein cattle. *J Vet Med Sci* 78(5):727–732. <https://doi.org/10.1292/jvms.15-0506>
- Cieślińska A, Fiedorowicz E, Zwierzchowski G, Kordulewska N, Jarmołowska B, Kostyra E (2019) Genetic Polymorphism of β-Casein Gene in Polish Red Cattle – Preliminary Study of A1 and A2 Frequency in Genetic Conservation Herd. *Animals (Basel)*. 9(6):377. <https://doi.org/10.3390/ani9060377>
- Cieślińska A, Fiedorowicz E, Rozmus D, Sienkiewicz-Szlapka E, Jarmołowska B, Kamiński S (2022) Does a Little Difference Make a Big Difference? Bovine β-Casein A1 and A2 Variants and Human Health – An Update. *Int J Mol Sci* 23:15637. <https://doi.org/10.3390/ijms232415637>
- Dai R, Fang Y, Zhao W, Liu S, Ding J, Xu K, Yang L, He C, Ding F, Meng H (2016) Identification of alleles and genotypes of beta casein with DNA sequencing analysis in Chinese Holstein cow. *J Dairy Res* 8(3):312–316. <https://doi.org/10.1017/S0022029916000303>
- Fernández-Rico S, Mondragyn ADC, Lypez-Santamarina A, Cardelle-Cobas A, Regal P, Lamas A, Ibarra IS, Cepeda A, Miranda JM (2022) A2 Milk: New Perspectives for Food Technology and Human Health. *Foods* 11(16):2387. <https://doi.org/10.3390/foods11162387>
- Gogoi A, Das B, Chabukdhara P, Phookan A, Phangchopi D (2021) Livestock Breeding for Disease Resistance: A Perspective Review. *Agricultural Reviews*. <https://doi.org/10.18805/ag.R-2169>
- Hanusová E, Huba J, Oravcová M, Polák P, Vrtková I (2010) Genetic Variants of Beta-casein in Holstein Dairy cattle in Slovakia. *Slovak J Anim Sci* 43(2):63–66

- Higuchi M, Miyashita N, Awata T (1999) Rapid communication: a PCR-RFLP in the coding region of the bovine tumor necrosis factor- α locus. *J Animal Sci* 77(12):3400–3401. <https://doi.org/10.2527/1999.77123400x>
- Ivanković A, Pećina M, Ramljak J, Pašić V (2021) Genetic polymorphism and effect on milk production of CSN2 gene in conventional and local cattle breeds in Croatia. *Mljekarstvo* 71(1):3–12. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2021.0101>
- Jiménez-Montenegro L, Alfonso L, Mendizabal JA, Urrutia O (2022) Worldwide Research Trends on Milk Containing Only A2-Casein: A Bibliometric Study. *Animals* 12(15):1909. <https://doi.org/10.3390/ani12151909>
- Kamiński S, Zabolewicz T, Oleński K, Babuchowski A (2023) Long-term changes in the frequency of beta-casein, kappa-casein and beta-lactoglobulin alleles in Polish Holstein-Friesian dairy cattle. *Anim Feed Sci* 32(2):205–210. <https://doi.org/10.22358/jafs/157531/2023>
- Kaskous S (2020) A1- and A2-Milk and Their Effect on Human Health. *J Food Engineer Technol* 9(1):15–21. <https://doi.org/10.32732/jfet.2020.9.1.15>
- Kay SIS, Delgado S, Mittal J, Eshraghi RS, Mittal R, Eshraghi AA (2021) Beneficial Effects of Milk Having A2 β -Casein Protein: Myth or Reality? *The J Nutrit* 151(5):1061–1072. <https://doi.org/10.1093/jn/nxaa454>
- Konnai S, Usui T, Ikeda M, Kohara J, Hirata T, Okada K, Ohashi K, Onuma M (2006) Tumor necrosis factor- α genetic polymorphism may contribute to progression of bovine leukemia virus-infection. *Microbes Infect* 8(8):2163–2171. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.017>
- Kuellenberg de Gaudry D, Lohner S, Bischoff K, Schmucker C, Hoerrlein S, Roeger C, Meerpohl JJ (2021) A1- and A2 beta-casein on health-related outcomes: a scoping review of animal studies. *Europ J Nutrit* 61(1):1–21. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02551-x>
- Kulibaba R, Sakhatskyi M, Liashenko Yu (2023) Comparative analysis of A1 and A2 allele detection efficiency for bovine CSN2 gene by AS-PCR methods. *Acta Biochimica Polonica* 70(1):205–209. https://doi.org/10.18388/abp.2020_6530
- Kumar A, Singh RV, Chauhan A, Ilayakumar K, Kumar S, Kumar A, Bhushan B (2019) Genetic association analysis reveals significant effect of β -casein A1/A2 loci on production & reproduction traits in Frieswal crossbred cows. *Biol Rhythm Res* 1–14. <https://doi.org/10.1080/09291016.2019.1571705>
- Kumar R, Kadirvel G, Das M, Puro K, Katiyar R, Singh M, Lyngdoh E, Mishra VK (2021) A1 and A2 Milk: Myth vs. Reality – A mini review. *Indian J Hill Farming* 34(2):249–254
- Ladyka V, Pavlenko Y, Sklyarenko Y (2021) β -casein gene polymorphism use in terms of brown dairy cattle preservation. *Arch Zootec* 70(269):88–94. <https://doi.org/10.21071/az.v70i269.5422>
- Mencarini IR, Woodford KB, Old KM (2013) Comparing herd selection strategies for A2 beta-casein. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production* 73:149–154
- Miluchová M, Gábor M, Candrák J (2023) The Effect of the Genotypes of the CSN2 Gene on Test-Day Milk Yields in the Slovak Holstein Cow. *Agriculture* 13(1):154. <https://doi.org/10.3390/agriculture13010154>
- Mohsen TU, AL-Khuzai HMH (2022) Effect of TNF- α gene polymorphism on fertility insufficiency in Holstein cows. *Inter J Health Sci* 6(S4):8066–8070. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS4.10411>
- Mrode R, Ojango JMK, Okeyo AM, Mwacharo JM (2019) Genomic Selection and Use of Molecular Tools in Breeding Programs for Indigenous and Crossbred Cattle in Developing Countries: Current Status and Future Prospects. *Front Genet* 9:694. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00694>
- Oleński K, Kamiński S, Szyda J, Cieslińska A (2010) Polymorphism of the beta-casein gene and its associations with breeding value for production traits of Holstein-Friesian bulls. *Livestock Science* 131(1):137–140. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.02.023>
- Pal A, Chakravarty AK (2020) Disease resistance for different livestock species. *Genet Breed Disease Resistance of Livestock* 271–296. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816406-8.00019-X>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28:2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Ristanic M, Glavinic U, Vejnovic B, et al (2020) Beta-casein gene polymorphism in Serbian Holstein-Friesian cows and its relationship with milk production traits. *Acta Veterinaria-Beograd* 70(4):497–510. <https://doi.org/10.2478/acve-2020-0037>
- Şahin O, Boztepe S, Aytekin I (2018) A1 and A2 Bovine Milk, the Risk of Beta-casomorphin-7 and Its Possible Effects on Human Health:(I) A1 and A2 Milk and the Risk of Beta-casomorphin-7. *Selcuk J Agr Food Sci* 32(3):632–639. <https://doi.org/10.15316/SJAIFS.2018.146>
- Saranya GN, de Jong E, Schenkel FS, Fonseca PAS, Chud TCS, Powell D, Wachoski-Dark G, Ronksley PE, Miglior F, Orsel K, Barkema HW (2023)

- Underlying genetic architecture of resistance to mastitis in dairy cattle: A systematic review and gene prioritization analysis of genome-wide association studies. *J Dairy Sci* 106(1):323–351. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21923>
- Sattar H, Firyal S, Awan AR, Rehman HU, Hasni MS, Aqib AI (2019) Genetic Association of Bovine TNF-α Gene Polymorphism with Clinical and Sub-clinical Mastitis in Sahiwal Cows. *Pakistan J Zoology* 15(6):1–4. <https://doi.org/10.17582/journal.pjz/2019.51.6.sc2>
- Sebastiani C, Arcangeli C, Ciullo M, Torricelli M, Cinti G, Fisichella S, Biagetti M (2020) Frequencies Evaluation of β-Casein Gene Polymorphisms in Dairy Cows Reared in Central Italy. *Animals* 10(2):252. <https://doi.org/10.3390/ani10020252>
- 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. *Ital J Food Sci* 34(2):21–27. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v34i2.2178>
- Suprovych TM, Salyha YuT, Suprovych MP, Fedorovych EI, Fedorovych VV, Chornyj IO (2022) Genetic Polymorphism of BoLA-DRB3.2 Locus in Ukrainian Cattle Breeds. *Cytol Genet* 56(4):319–330 <https://doi.org/10.3103/S0095452722040089>
- Grażyna S, Korwin-Kossakowska, Pawlik A, Hameed A, Abdel KG, Jolanta O (2013) Genetic Basis of Mastitis Resistance in Dairy Cattle – A Review. *Ann Animal Sci* 13(4):663–673. <https://doi.org/10.2478/aoas-2013-0043>
- Singh U, Deb R, Alyethodi RR, Alex R, Kumar S, Chakraborty S, Sharma A (2014) Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine* 6(2):49–58. <https://doi.org/10.1016/j.bgm.2014.03.001>
- Soyudal B, Ardicli S, Samli H, Dincel D, Balci F (2019) Association of polymorphisms in the CSN2, CSN3, LGB and LALBA genes with milk production traits in Holstein cows raised in Turkey. *J Hel-*
- lenic Vet Med Soc* 69(4):1271–1282. <https://doi.org/10.12681/jhvms.19617>
- Thirupathy VR, Pramod S, Lasna S, Bibin B (2019) Impact of A1/A2 Milk on Health: Facts and Implications. *Dairy and Vet Sci J* 9(3):555761. <https://doi.org/10.19080/JDVS.2019.09.555761>
- Thiruvengadam M, Venkidasamy B, Thirupathi P, Chung IM, Subramanian U (2020) β-Casomorphin: A comple-te health perspective. *Food Chemistry* 337:127765. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127765>
- Wakchaure R, Ganguly S, Praveen PK, Kumar A, Sharma S (2015) Marker Assisted Selection (MAS) in Animal Breeding: A Review. *J Drug Metab Toxicol* 6:e127. <https://doi.org/10.4172/2157-7609.1000e127>
- Weigel KA, Shook GE (2018) Genetic Selection for Mastitis Resistance. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 34(3):457–472. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.001>
- Wojdak-Maksymiec K, Szyda J, Strabel T (2013) Parity-dependent association between TNF-α and LTF gene polymorphisms and clinical mastitis in dairy cattle. *BMC Vet Res* 9:114. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-114>
- Yudin NS, Aitnazarov RB, Voevoda MI, Gerlinskaya LA, Moshkin MP (2013) Association of Polymorphism Harbored by Tumor Necrosis Factor Alpha Gene and Sex of Calf with Lactation Performance in Cattle. *Asian-Australasian J Anim Sci (AJAS)* 26(10):1379–1387. <https://doi.org/10.5713/ajas.2013.13114>
- Zalewska M, Puppel K, Sakowski T (2021) Associations between Gene Polymorphisms and Selected Meat Traits in Cattle – A Review. *Animal Bioscience* 34(9):1425–1438. <https://doi.org/10.5713/ab.20.0672>

Надійшла в редакцію 24.09.23
Після доопрацювання 12.10.23
Прийнята до друку 18.01.24