

DOI: 10.5281/zenodo.3911645

УДК: 636.237.21.082.13

## ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА КОРОВ ЧЕРНО-ПЕСТРОЙ ПОРОДЫ ПО ЛАКТОПРОТЕИНАМ

Татьяна ЛУПОЛОВА, Алла ГАНДЖА, Янина КУЛЕШЕВИЧ

**Abstract.** Systematic genetic monitoring in populations allows to control the level of genetic diversity, to use the capabilities of marker selection, including the assessment of intra-breed differentiation, the formation of an optimal genealogical structure and selection for heterosis. The article provides information about the genetic structure of the populations of Belarusian Black-and-White cows at the lactoprotein loci *CSN3*, *LALBA*, *BLG*. In two farms at the *LALBA*, *BLG* loci, the most frequently encountered (from 42% to 51%) is the heterozygous genotype *AB*. At the *CSN3* locus *AA* homozygotes were predominant (65% – 72%). Alleles had an almost equal frequency – 61% and 62% for *LALBA<sup>A</sup>* and 39% – 38% for *LALBA<sup>B</sup>*. The frequencies *CSN3<sup>A</sup>* and *CSN3<sup>B</sup>* had almost the same values – 0.806 – 0.853 and 0.194 – 0.147, respectively. In genetically equilibrium ( $\chi^2 < 3.84$ ) cow populations, the occurrence of the *BLG<sup>A</sup>* allele was 0.549 and 0.486, *BLG<sup>B</sup>* – 0.451 and 0.514. The average heterozygosity is determined at the level of 39.6% – 43.4%.

**Key words:** Cattle; Belarusian black-motley breed; Genotype; Polymorphism; Allele; Heterozygosity; Lacto-proteins.

**Реферат.** Систематический генетический мониторинг в популяциях позволяет контролировать уровень генетического разнообразия, использовать возможности маркерной селекции, включая оценку внутривидовой дифференциации, формирование оптимальной генеалогической структуры и селекцию на гетерозис. В статье приводится информация о генетической структуре популяций белорусских черно-пестрых коров в локусах лактопротеинов *CSN3*, *LALBA*, *BLG*. В двух хозяйствах, в локусах *LALBA*, *BLG* наиболее часто встречаемым – от 42% до 51% является гетерозиготный генотип *AB*. В локусе *CSN3* преимущественно обладали гомозиготы *AA* (65 % – 72 %). Аллели имели практически равную частоту – 61 % и 62 % для *LALBA<sup>A</sup>* и 39 % – 38 % для *LALBA<sup>B</sup>*. Частоты *CSN3<sup>A</sup>* и *CSN3<sup>B</sup>* имели практически одинаковые значения – 0,806 – 0,853 и 0,194 – 0,147 соответственно. В генетически равновесных ( $\chi^2 < 3,84$ ) популяциях коров, встречаемость аллеля *BLG<sup>A</sup>* составила – 0,549 и 0,486, *BLG<sup>B</sup>* – 0,451 и 0,514. Средняя гетерозиготность определена на уровне 39,6 % – 43,4 %.

**Ключевые слова:** Крупный рогатый скот; Белорусская черно-пестрая порода; Генотип; Полиморфизм; Аллель; Гетерозиготность; Лактопротеины.

### ВВЕДЕНИЕ

В практике племенной работы для совершенствования животных всё большее применение находят молекулярно-генетические методы. ДНК-маркеры используют в качестве критериев отбора, выявления генетических аномалий, а так же определения степени родства и генетической гетерогенности (Юльметьева, Ю. и др. 2015).

Полиморфизм аллелей генов на уровне ДНК разрешает проводить тестирование аллелей маркерных генов, в том числе, детерминирующих продуктивные признаки, как у молочных коров, так и у быков.

Геномная селекция, основанная на анализе полиморфизма генов лактопротеинов *CSN3*, *BLG*, *LALBA* дает информацию о некоторых показателях молочной продуктивности коров, составе белка и качестве молока, что повышает точность племенной оценки коров (Gengler, N. 2016, Харламов, А.В. и др. 2019).

Немаловажным является поддержание генетической гетерозиготности – генетического разнообразия, которая вызвана адаптационной необходимостью не только в природных, но и в селекционных популяциях. Именно местные породы хорошо адаптированы к условиям климата, кормовой базе и обладают устойчивым иммунитетом к заболеваниям, распространенным на территории республики. Уменьшение генотипического разнообразия ставит на грань риска возникновения возможных будущих адаптаций у крупного рогатого скота. Гетерозиготность популяции является надежной мерой изменчивости, поскольку служит оценкой вероятности того, что два аллеля данного локуса, взятые наугад из генофонда популяции, окажутся различными (Айала, Ф. 1988).

Целью исследования явилось определение генетической структуры популяций коров белорусской черно-пестрой породы в локусах лактопротеинов – *CSN3* (каппа-казеина), *LALBA* (альфа-лактальбумина) и *BLG* (беталактоглобулина).

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

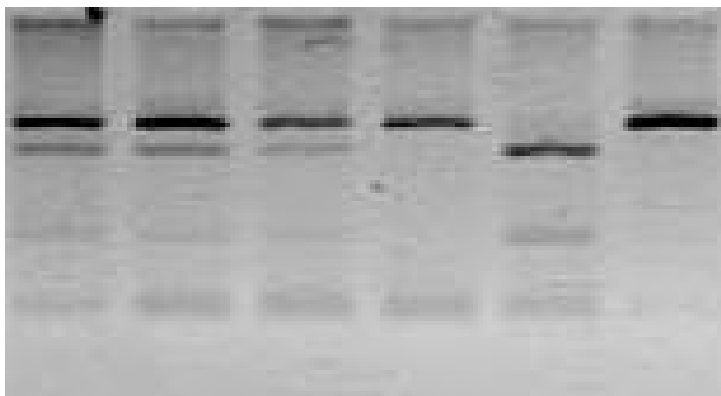
Исследованию подверглись группы животных черно-пестрой породы, филиала «Экспериментальная база «Жодино» Республиканского дочернего унитарного предприятия по племенному делу «Заречье» и «РУСП «Племенной завод «Красная Звезда». Оценка полиморфизма генов *CSN3*, *LALBA* и *BLG* проводилась на базе РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по животноводству», г. Жодино, методом полимеразной цепной реакции.

Оценка полиморфизма гена каппа-казеина проводилась путем амплификации фрагмента гена *CSN3* с использованием праймеров:

CAS1 5' - ATA GCC AAA TAT ATC CCA ATT CAG T - 3'

CAS2 5' - TTT ATT AAT AAG TCC ATG AAT CTT G - 3'

Длина амплифицированного фрагмента – 530 п.о. При расщеплении продуктов амплификации рестриктазой *HindIII* при 37°C были идентифицированы следующие генотипы (рис. 1):



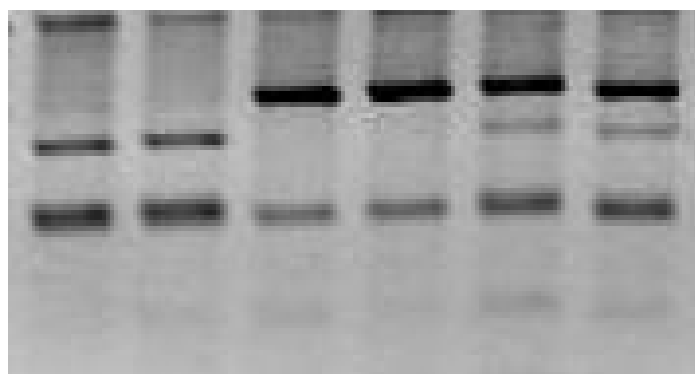
**Рисунок 1.** Рестрикция ампликатов (№ 1 – 6) с использованием рестриктазы *HindIII*  
Генотип *CSN3*<sup>AA</sup> – фрагмент 530 п.о. (4, 6); генотип *CSN3*<sup>AB</sup> – фрагменты 530, 400 и 130 п.о. (1, 2, 3); генотип *CSN3*<sup>BB</sup> – фрагменты 400 и 132 п.о. (5)

Для амплификации фрагмента гена *LALBA* настройки ПЦР-программы были следующими: «горячий старт» - 5 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация – 1 мин при 94°C, отжиг – 1 мин при 63°C, синтез – 1 мин при 72°C; элонгация – 10 мин при 72°C, с использованием праймеров:

LAC 1: 5' - AAGAGTTGGATGGAATCACC - 3';

LAC 2: 5' - TTCAAATTGCTGGCATCAAGC - 3'

Длина амплифицированного фрагмента – 430 п.о. При расщеплении продуктов амплификации рестриктазой *MhII* при 37°C установлены следующие генотипы (рис. 2):



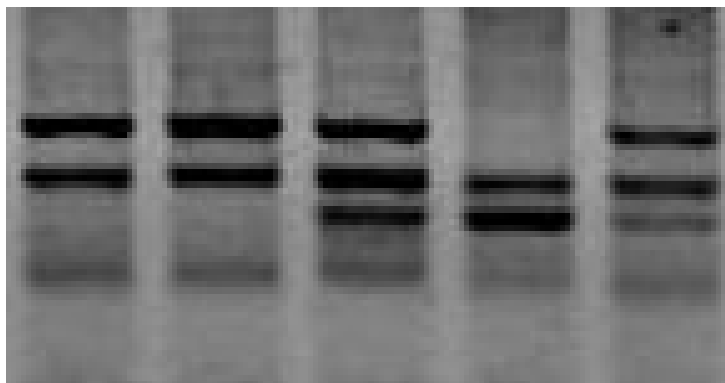
**Рисунок 2.** Рестрикция ампликатов (№ 1 – 6) с использованием рестриктазы *MhII*  
Генотип *LALBA*<sup>AA</sup> – фрагмент 328 и 102 п.о. (3, 4); генотип *LALBA*<sup>AB</sup> – фрагменты 328, 211, 117 и 102 п.о. (5, 6); генотип *LALBA*<sup>BB</sup> – фрагменты 211, 117 и 102 п.о. (1, 2)

Реакцию рестрикции полученных продуктов амплификации гена *BLG* проводили с использованием эндонуклеазы *HaeIII* при 37°C следующими праймерами:

LG 1: 5' - TGTGCTGGACACCGACTACAAAAAG - 3'

LG 2: 5' - GCTCCCGGTATATGACCACCCCTCT- 3'

Аmplificированный фрагмент длиной 247 п.о. установил следующие генотипы (рис. 3):



**Рисунок 3.** Рестрикция амплификатов (№ 1-5) с использованием рестриктазы *HaeIII*  
Генотип  $BLG^{AA}$  – фрагмент 148 и 99 п.о. (1, 2); генотип  $BLG^{AB}$  – фрагменты 148, 99 и 74 п.о. (3, 5); генотип  $BLG^{BB}$  – фрагменты 99 и 74 п.о. (4)

Детекцию результатов трех этапов работы – выделения ДНК, амплификации фрагмента гена и рестрикции продуктов амплификации – осуществляли электрофоретическим методом с последующей визуализацией на трансиллюминаторе в проходящем УФ-свете с длиной волны 260 нм при помощи компьютерной видеосистемы и программы VITran. В качестве маркера использовались ДНК плазмиды pBR322, расщепленную рестриктазой *AluI*, либо рестриктазой *BsuRI*.

Частота аллелей (для двухаллельных систем) была определена по формулам (1, 2).

$$p(A) = (2AA + AB) / 2n, \quad (1)$$

$$q(B) = (2BB + AB) / 2n, \quad (2)$$

где  $p(A)$  – частота аллеля А;

$q(B)$  – частота аллеля В.

AA, BB – число особей с гомозиготным генотипом;

AB – число особей с гетерозиготным генотипом;

n – число особей в группах;

Определение генетического равновесия проводилось с помощью теста  $\chi^2$ , согласно закону Харди-Вайнберга, по формуле (3):

$$\chi^2 = (\Phi - T)^2 / T, \quad (3)$$

где  $\Phi$  – фактическое количество особей в популяции с определенным генотипом;

T – теоретически ожидаемое количество особей.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Ген, кодирующий бычий LALBA, локализован у КРС в 5 хромосоме и состоит из 2023 п.н., включая четыре экзона и три интрона.  $\beta\alpha$ -LA характеризуется наличием нескольких полиморфных вариантов: в позициях +15, +21, +54 и -1689, относительно точки старта транскрипции 5' фланкирующего региона. Варибельность в этом регионе может приводить к различной способности связывания РНК-полимеразы и факторов транскрипции, участвующих в регуляции экспрессии гена.

Учитывая роль  $\alpha$ -лактальбумина в биосинтезе лактозы и продукции молока в целом, ген  $\beta\alpha$ -LA может быть использован как потенциальный генетический маркер молочной продуктивности крупного рогатого скота, в частности удойности и белковомолочности. Уровень же проявления признаков молочной продуктивности у коров, несущих в своем геноме аллели А и В гена альфа-лактальбумина различается в зависимости от породной принадлежности (Костюнина, О. 2005).

В наших исследованиях было установлено, что наибольшую численность крупного рогатого скота филиала Э/Б «Жодино» РУП «Заречье» составил гетерозиготный генотип AB – 148 особей

(51,21%), гомозиготный генотип –  $LALBA^{BB}$  был обнаружен только у 13,49 % особей. На предприятии «РУСП «Племенной завод «Красная Звезда», гетерозиготных  $AB$  и гомозиготных  $AA$  особей составило примерно одинаковое количество: 136 (42%) голов и 133 (41%) соответственно. Частота гомозиготных особей  $BB$  – 55 (17%) (табл. 1).

**Таблица 1.** Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена  $LALBA$  у коров в черно-пестрой породе

| N   | Частота встречаемости |               |              |         |       | $\chi^2$ |
|---|-----------------------|---------------|--------------|---------|-------|----------|
|   | Генотипов             |               |              | аллелей |       |          |
|   | AA                    | AB            | BB           | A       | B     |          |
| <b>РУП «Заречье»</b>                          |                       |               |              |         |       |          |
| 289   | 102 (107,18) *        | 148 (137,63)* | 39 (44,183)* | 0,609   | 0,391 | 1,6      |
| <b>РУСП «Племенной завод «Красная Звезда»</b> |                       |               |              |         |       |          |
| 324   | 133 (124,55)*         | 136 (152,27)* | 55 (46,54)*  | 0,620   | 0,379 | 3,85     |

\* Теоретическое ожидаемое число. То же для табл. 2, 3.

Как можно видеть выше, аллели в анализируемых популяциях имели практически равную частоту – 61 % и 62 % для  $LALBA^A$  и 39 % – 38 % для  $LALBA^B$ .

Исследуемые популяции в локусе  $LALBA$  находились в генетическом равновесии в соответствии с законом Харди-Вайнберга ( $\chi^2 = 1,6 - 3,85$ ).

$BLG$  – является основным сывороточным белком коровьего и овечьего молока (~3 г/л), а также присутствует во многих других видах млекопитающих; заметным исключением являются люди. Его структура, свойства и биологическая роль неоднократно пересматривались. Существуют несколько генетических вариантов белка, основные из которых у КРС были помечены как  $A$  и  $B$ . Из-за ее обилия и простоты очистки она была подвергнута широкому спектру биофизических исследований. Бычий  $BLG$  является относительно небольшим белком. До недавнего времени генотип бета-лактоглобулина не включали в программы селекционного процесса, так как полиморфизм молочных белков можно было оценить только у лактирующих коров, а производители могли быть оценены только путем типирования молочных белков их дочерей. Благодаря методу ДНК-диагностики стало возможным идентифицировать генотип гена бета-лактоглобулина у производителей и молодняка, что, значительно ускоряет решение селекционных задач.

Возрастающее значение производства белковой продукции диктует необходимость использования генетических и селекционных методов для повышения экономической эффективности этого производства (Xiang, Lei-Wen et al. 2019).

У коров белорусской черно-пестрой породы в анализируемых хозяйствах (табл. 2), также установлено два аллельных варианта гена  $BLG$ , что позволило распределить исследуемые популяции на 3 генотипа:  $AA$ ,  $AB$  и  $BB$ . Наибольшую численность составили гетерозиготные генотипы  $AB$  – 139 особей (48%) в РУП «Заречье» и 166 особей (51%) на предприятии «РУСП «Племенной завод «Красная Звезда». Приблизительно одинаковое количество гомозиготных особей распределилось по генотипам  $AA$  – 71 гол. (25%) и  $BB$  – 79 гол. (27%) в первой популяции, во второй, генотипом  $-LALBA^{AA}$  обладали 95 особей (29%) и  $LALBA^{BB}$  – 63 особи (19%).

**Таблица 2.** Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена  $BLG$  у коров в черно-пестрой породе

| N   | Частота встречаемости |               |             |         |       | $\chi^2$ |
|---|-----------------------|---------------|-------------|---------|-------|----------|
|   | Генотипов             |               |             | аллелей |       |          |
|   | AA                    | AB            | BB          | A       | B     |          |
| <b>РУП «Заречье»</b>                          |                       |               |             |         |       |          |
| 289   | 71 (68,26)*           | 139 (144,4)*  | 79 (76,35)* | 0,486   | 0,514 | 0,4      |
| <b>РУСП «Племенной завод «Красная Звезда»</b> |                       |               |             |         |       |          |
| 324   | 95 (97,65)*           | 166 (160,44)* | 63 (65,90)* | 0,549   | 0,451 | 0,4      |

В генетически равновесных ( $\chi^2 = 0,4$ ) популяциях коров, встречаемость аллеля  $BLG^A$  составила – 0,549 и 0,486, аллеля  $BLG^B$  – 0,451 и 0,514.

Полученные нами данные о структуре гена  $BLG$  согласуются с результатами других авторов. Так, в исследованиях Н.Ю. Сафины и др. (2018) у голштинского скота, частота встречаемости аллеля  $A$  достигала значения – 0,47,  $B$  – 0,53, генотипа  $AA$  – 20,8 % (44 гол.),  $AB$  – 49,8 % (105 гол.),  $BB$  – 29,4 % (62 гол.).

Один из наиболее изученных генетических маркеров является ген молочного белка каппа-казеина, который расположен в 6-й хромосоме. У крупного рогатого скота чаще встречаются аллели  $A$  и  $B$  этого гена. Они различаются двумя аминокислотными заменами ( $\text{Thr } 136 \rightarrow \text{Iso}$  и  $\text{Asp } 148 \rightarrow \text{Ala}$ ). Животные с генотипом  $CSN^{BB}$  характеризуются высокой белкомолочностью, их молоко обладает хорошими сыродельческими качествами.

Однако, сведения о массовой доле жира и количественных показателях молочной продуктивности коров – носителей различных аллелей этого гена имеют весьма противоречивый характер (Галстян, А. и др. 2016).

В этом локусе, преимуществом обладали гомозиготы  $AA$  – 188 (65%) в РУП «Заречье», гетерозиготный генотип –  $AB$  имели 90 особей (31,14%), гомозиготный  $BB$  – 11 (3,81%). В «РУСП «Племенной завод «Красная Звезда», гомозиготные особи, также встречались чаще  $CSN^{AA}$  – 72%. Гомозиготный генотип  $CSN^{BB}$  в данной популяции составил всего – 2% (табл. 3).

**Таблица 3.** Частоты встречаемости аллелей и генотипов гена  $CSN3$  у коров в черно-пестрой породе

| N   | Частота встречаемости |             |            |         |       | $\chi^2$ |
|---|-----------------------|-------------|------------|---------|-------|----------|
|   | Генотипов             |             |            | аллелей |       |          |
|   | AA                    | AB          | BB         | A       | B     |          |
| <b>РУП «Заречье»</b>                          |                       |             |            |         |       |          |
| 289   | 188 (187,7) *         | 90 (90,38)* | 11 (10,9)* | 0,806   | 0,194 | 0,003    |
| <b>РУСП «Племенной завод «Красная Звезда»</b> |                       |             |            |         |       |          |
| 324   | 235 (235,7)*          | 83 (81,25)* | 6 (7,0)*   | 0,853   | 0,147 | 0,2      |

В обеих популяциях частоты  $CSN^{3A}$  и  $CSN^{3B}$  примерно одинаковы – 0,806–0,853 и 0,194–0,147 соответственно. Проверка генетической гипотезы методом  $\chi^2$  показала генетическое равновесие в стаде.

Полиморфизм данного гена, а также более низкая частота встречаемости  $CSN^{3B}$  находят подтверждение и в исследованиях на других породах коров. Не высокая частота аллеля  $B$ , установлена также у коров черно-пестрой породы молдавского типа, (0,0968), красной эстонской (0,0484) и голштинской (0,180) пород (Луполова, Т.А. и др. 2017).

В связи с тем, что для племенной работы важным является установление ценных генотипов с точки зрения продуктивности, учитывая при этом генетическую изменчивость, необходимым является вычисление гетерозиготности (или гомозиготности) популяций коров по исследуемым генам (табл. 4).

**Таблица 4.** Средняя гетерозиготность по четырем локусам у коров черно-пестрой породы

| Локус   | Число особей   |       | Гетерозиготность |
|---|----------------|-------|------------------|
|   | Гетерозиготных | Всего |                  |
| <b>РУП «Заречье»</b>                          |                |       |                  |
| <i>LALBA</i>                                  | 148            | 289   | 0,512            |
| <i>BLG</i>                                    | 139            | 289   | 0,481            |
| <i>CSN</i>                                    | 90             | 289   | 0,311            |
| Среднее                                       |                |       | 0,434            |
| <b>РУСП «Племенной завод «Красная Звезда»</b> |                |       |                  |
| <i>LALBA</i>                                  | 136            | 324   | 0,419            |
| <i>BLG</i>                                    | 166            | 324   | 0,512            |
| <i>CSN</i>                                    | 83             | 324   | 0,256            |
| Среднее                                       |                |       | 0,396            |



Анализируя данные средней гетерозиготности двух популяций видно, что генетическая изменчивость составляет 39,6 %–43,4 %, что указывает на генетическое разнообразие животных по анализируемым локусам.

### ВЫВОДЫ

В результате исследования обнаружен полиморфизм генов-лактопротеинов *CSN3*, *BLG*, *LALBA*. Установлены три генотипа АА, АВ и ВВ.

Наибольшей частотой в двух животноводческих хозяйствах 80,6 % и 85,3 % обладал аллель *CSN3* типа А, самой низкой *CSN3<sup>B</sup>* – 14,7 % и 19,4 %. Преимуществом обладали гомозиготы АА (65 % – 72 %).

В локусах *LALBA*, *BLG* наиболее часто встречаемым – от 42 % до 51% оказался гетерозиготный генотип. Аллели имели практически равную частоту – 61 % и 62 % для *LALBA<sup>A</sup>* и 38 %–39 % для *LALBA<sup>B</sup>*. В генетически равновесных ( $P \leq 0,05$ ) популяциях коров, встречаемость аллеля *BLG<sup>A</sup>* составила – 0,549 и 0,486, *BLG<sup>B</sup>* – 0,451 и 0,514.

Таким образом, обнаруженный полиморфизм, равновесные частоты генов, а также установленная гетерозиготность (39,6 %–43,4 %), указывает на генетическое разнообразие, устойчивость генофонда по генам лактопротеинов *LALBA*, *BLG*, *CSN3* и соответствующий подбор пар для скрещиваний с желательными генами в анализируемых популяциях.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. АЙАЛА, Ф., КАЙГЕР, Дж. (1988). Современная генетика: Т.3, 332 с. ISBN 5-03 000496-3.
2. ГАЛСТЯН, А.Г. и др. (2016). Научные основы и технологические принципы производства молочных консервов геродиетического назначения. В: Вопросы питания, № 85(5), с. 114-119. ISSN0042-8833.
3. КОСТЮНИНА, О. В. (2005). Молекулярная диагностика генетического полиморфизма основных молочных белков и их связь с технологическими свойствами молока: Диссертация канд. биол. наук. Дубровицы, ВГНИИЖ. 127 с.
4. ЛУПОЛОВА, Т. А., ГУМИНСКАЯ, Е.Ю., ПЕТКУ, В. С., МАКАРОВА А. В. (2017). Парное различие генетической структуры пород крупного рогатого скота по лактопротеинам. In: Știința agricolă, nr. 1, pp. 99-103. ISSN 1857-0003.
5. САФИНА, Н.Ю. и др. (2018). Полиморфизм гена β-лактоглобулина (LGB) и его взаимосвязь с экономически важными признаками голштинского скота. В: Достижения науки и техники АПК, Т. 32, № 9, с. 78-80. ISSN 0235-2451.
6. САФИНА, Н.Ю., ЮЛЬМЕТЬЕВА, Ю. Р. ШАКИРОВ, Ш.К. (2018). Влияние комплекса полиморфизма генов κ-казеина (*CSN3*) и пролактина (*PRL*) на молочную продуктивность коров первотелок голштинской породы. В: Молочнохозяйственный вестник, № 1 (29), с. 74-82. ISSN 2225-4269.
7. ХАРЛАМОВ, А.В., ПАНИН, В.А., КОСИЛОВ, В.И. (2019). Влияние воздействия генов *CSN3* и *LGB* на показатели молочной продуктивности коров (обзор). В: Известия Оренбургского государственного аграрного университета, № 6 (80), с. 223-225. ISSN 2073-0853.
8. ЮЛЬМЕТЬЕВА, Ю.Р., ШАКИРОВ, Ш.К. (2015). Молекулярно-генетические аспекты селекции молочного скота в Республике Татарстан. В: Достижения науки и техники АПК, Т. 29, № 5, с. 83-84. ISSN 0235-2451.
9. GENGLER, N. (2016). Capitalizing on fine milk composition for breed inland management of dairy cows. In: Journal of dairy Science, nr. 99(5), pp. 4071-4079. ISSN 0022-0302.
10. XIANG, LEI-WEN et al. (2019). Interactions of β-Lactoglobulin With Small Molecules. In: Encyclopedia of Food Chemistry, vol. 2, pp. 560-565. ISBN 9780128140451.

### СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

ЛУПОЛОВА Татьяна Анатольевна\*  <https://orcid.org/0000-0003-4604-9267>

кандидат с.-х. наук, доцент, Кафедра биологии и экологии, Факультет технолога – биологический, Учреждение образования «Мозырский государственный педагогический университет имени И.П. Шамякина», Республика Беларусь

E-mail: LupolovT@tut.by

**ГАНДЖА Алла Ивановна**

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по животноводству», зав. лабораторией молекулярной биотехнологии и ДНК-тестирования, Республика Беларусь

*E-mail: belniig@tut.by; AGandja@mail.ru*

**КУЛЕШЕВИЧ Янина Павловна**  <https://orcid.org/0000-0003-3826-3933>

Факультет технолого-биологический, Учреждение образования «Мозырский государственный педагогический университет имени И.П. Шамякина», Республика Беларусь

*E-mail: yanakul18@gmail.com*

*\*Corresponding author: LupolovT@tut.by*

Received: 10.03.2020

Accepted: 05.05.2020