

УДК 636.222/.27(477).033.082.2

ПОКАЗАТЕЛИ МЯСНОЙ ПРОДУКТИВНОСТИ АБЕРДИН-АНГУС X ЧЕРНО-ПЕСТРЫХ БЫКОВ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ГЕНОТИПОВ ПО ГЕНАМ ТИРЕОГЛОБУЛИНА (TG5), КАЛЬПАИНА (CAPN1) И МИОСТАТИНА (MSTN)

Н. А. Сонич, О. А. Епишко, Л. А. Танана, В. В. Пешко, О. В. Вертинская

УО «Гродненский государственный аграрный университет»

г. Гродно, Республика Беларусь

(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

Ключевые слова: полиморфизм, ген, ПЦР, MSTN, TG5, CAPN1.

Аннотация. В качестве позиционных и функциональных генов-кандидатов, связанных с качеством мяса, в статье рассмотрены гены MSTN, TG5, CAPN1 у мясных пород крупного рогатого скота Беларуси. Изучен полиморфизм генов, который выявил различия в соотношении предпочтительных генотипов у животных абердин-ангусской породы. Изучены убойные показатели помесных быков (абердин-ангусская x черно-пестрая) в зависимости от генотипов по генам тиреоглобулина (TG5), кальпаина CAPN1 и миостатина (MSTN).

INDICATORS OF MEAT EFFICIENCY ABERDEEN – ANGUS X BLACK AND MOTLEY BULLS DEPENDING ON GENOTYPES ON TIREOGLOBULIN (TG5) OF KALPAIN (CAPN1) AND MIOSTATIN'S (MSTN) GENES

N. A. Sonich, O. A. Epishko, L. A. Tanana, V. V. Peshko, O. V. Vertinskaya

El «Grodno state agrarian university»

Grodno, Republic of Belarus

(Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

Key words: polymorphism, gene, PCR, MSTN, TG5, CAPN1.

Summary. Polymorphism of genes, which revealed distinctions in the ratio of preferable genotypes at animals Aberdeen – Angus breed, is studied. Study lethal indicators Aberdeen Angus x black and motley bulls depending on genotypes of genes of a tireoglobulin (TG5), kalpain (CAPN1) and a miostatin (MSTN).

(Поступила в редакцию 03.06.2019 г.)

Введение. В настоящее время разведением мясного скота в Республике Беларусь занимаются 263 сельскохозяйственные организации, в 231 скот содержится на отдельных фермах.

Ускоренное развитие мясного скотоводства сегодня следует рассматривать как проблему государственного значения, решение которой позволит в интересах всего населения в перспективе удовлетворить платежеспособный спрос на говядину за счет отечественного производства. Объемы реализации крупного рогатого скота на убой сокращаются, и перспектив их роста в ближайшее время без применения кардинальных мер не ожидается. Основным источником поступления говядины в стране остается молочное животноводство [1], поэтому сегодня в стране ведется большая работа по наращиванию мясного поголовья. Однако развитие мясного скотоводства предусматривает не только увеличение объемов производства мяса, но и улучшение его качества.

На эффективность производства продукции животноводства оказывают влияние множество факторов, одним из наиболее значительных является генетический потенциал животных, используемых в племенной работе [2, 3], и определенные условия кормления. Генетическое усовершенствование существующих пород животных – длительный и трудоемкий процесс, т. к. большинство экономически значимых показателей имеют полигенную природу, то есть определяются многими генами. Маркерная селекция в качестве дополнительного метода может стать мощным инструментом селекционного отбора животных, характеризующихся желательными показателями продуктивности. Применение маркерной селекции возможно с целью сокращения временного интервала на выявление животных-носителей желательных аллелей по контролируемым или улучшаемым признакам. Использование информативных ДНК-маркеров позволяет вести отбор в раннем возрасте по признакам, сцепленным с полом или проявляющимся в зрелом возрасте, а также характеризующимся полигенной природой наследования [4].

Миостатин – белок, подавляющий избыточный рост мышечной ткани, он образуется в мышцах животных, затем выделяется в кровь, оказывая свое действие на мышцы за счет связывания с рецепторами ACVR2B (activin type II receptor). Миостатин активен в мышцах, используемых для движения (скелетные мышцы) до и после рождения. Это обычно ограничивает рост мышц, гарантируя, что мышцы не становятся слишком большими.

Известна мутация гена миостатина (MSTN) — nt821(del11), которая приводит к усиленному формированию мышечной массы (феномен

«двойной мускулатуры»). Мутации, которые уменьшают производство миостатина, приводят к чрезмерно быстрому росту мышечной ткани (фенотип двойной мускулатуры). Однако развитие двойной мускулатуры связано с такими негативными последствиями, как снижение рождаемости и затруднениями при отеле.

В качестве позиционного и функционального гена-кандидата, связанного с качеством мяса, рассматривается ген тиреоглобулина (TG5), находящийся в области центромеры хромосомы 14 крупного рогатого скота. TG5 – гликопротеин и предшественник тиреоидных гормонов трийодтиронина и тетраiodтеранина, которые участвуют в образовании жировых клеток и мраморности. Точный механизм влияния полиморфизма гена TG5 на формирование качественных признаков мясной продуктивности еще неизвестен, но установлена связь его вариантов с мраморностью, в частности, содержанием внутримышечного жира в длиннейшей мышце спины [5]. Исследования, проведенные на группах скота ангусской породы, в коммерческих линиях скота, а также в группах скота породы Вагю, показали, что скот, гомозиготный или гетерозиготный по аллелю Т (генотипы ТТ или СТ), отличается более высокой мраморностью по сравнению с животными, несущими генотип гомозиготный по аллелю С (генотип СС). В группах скота породы Вагю различия в степени мраморности между гомозиготными генотипами достигала 14-20% [1, 6].

Еще одним потенциальным геном мясной продуктивности рассматривают ген кальпастин (CAPN1) – белок-ингибитор активности кальпаина, который участвует в процессе регуляции протеолиза при созревании мяса, специфично угнетая протеолитическую активность кальпаинов. Кальпастин не только ингибирует активность кальпаина и его связываемость с мембранами. Мутация гена кальпаина, картированного на 29 хромосоме крупного рогатого скота, представлена полиморфизмом 2 нуклеотидов, обуславливающим аминокислотную замену (глицин/аланин) и приводящим к более высокой нежности мяса по сравнению с глициновым аллелем (>30%) [7].

Использование генов-маркеров позволяет изучать, контролировать и прогнозировать важные параметры у животных. Установлено влияние генотипов генов MSTN, TG5, CAPN1 на физико-химические показатели нежности мяса при созревании. Отмечается, что гены миостатина, кальпаина и тиреоглобулина ответственны за формирование нежности мяса.

Цель работы – изучить влияние генов MSTN, TG5, CAPN1 на показатели мясной продуктивности абердин-ангусс х черно-пестрых быков.

Материал и методика исследований. Исследования проводились на базе отраслевой научно-исследовательской лаборатории «ДНК-технологий» УО «Гродненский государственный аграрный университет». В качестве объекта исследований использовали абердин-ангус х черно-пестрых быков (n=74), содержащихся в РСУП «Олекшицы» Берестовицкого района Гродненской области.

Для изучения полиморфизма генов MSTN, TG5, CAPN1 провели генотипирование животных по разработанной методике ПЦР-ПДРФ-анализа с некоторыми модификациями температурных и временных режимов.

В качестве биопроб для проведения ДНК-тестирования использовали биологический материал в виде ткани (ушной выщип). В процессе взятия каждую пробу подписывали индивидуальным номером. С целью длительного хранения и использования для ряда анализов, ДНК выделяли перхлоратным методом.

Для диагностики точечной мутации MSTN использовали праймеры:

MSTN – 1: 5' GGG GGG GAG AGA TTT TGG GCT TGA TTG TGA – 3'

MSTN – 2: 5' GGG GGG GTG CAA TAA TCC AAT CCC ATC CAA- 3'.

Для диагностики точечной мутации TG5 использовали праймеры:

TG5 – 1: 5' GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG – 3'

TG5 – 2: 5' GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA- 3'.

Для диагностики точечной мутации CAPN1 использовали праймеры:

CAPN1 – 1: 5' TCT TCT CAG AGA AGA GCG-CAG – 3'

CAPN1 – 2: 5' CTG-CGC-CAT-TAC-TAT-AGA-TC- 3'.

ПЦР-анализ выполняли согласно протоколу, представленному в таблице 1.

Таблица 1 – Компоненты и концентрации реакционных смесей генов MSTN, TG5 и CAPN1

Реагенты	Концентрация на 1 пробу		
	MSTN	TG5	CAPN1
dH ₂ O	До 20 мкл	До 25 мкл	До 10 мкл
dNTP	2,0 мМ	2,0 мМ	0,8 мкл
MgCl ₂	1.5 мМ	1.25 мМ	1 мкл
Буфер	1х	1х	1х
Taq полимераза	1 е. а.	1 е. а.	1 е. а.
MSTN – 1	15-25 пМ	15-25 пМ	15-25 пМ
MSTN – 2	15-25 пМ	15-25 пМ	15-25 пМ
Проба ДНК	100-200 нг	100-200 нг	100-200 нг

Режим амплификации гена MSTN:

x1: 94⁰С – 4 мин;

x40: 94⁰С – 30 с, 68⁰С – 30 с, 72⁰С – 30 с;

x1: 72⁰С – 5 мин.

ПЦР-продукт:

Генотип AA = 119 bp,

Генотип BB = 108 bp,

Генотип AB = 119/108 bp (рисунок 1).

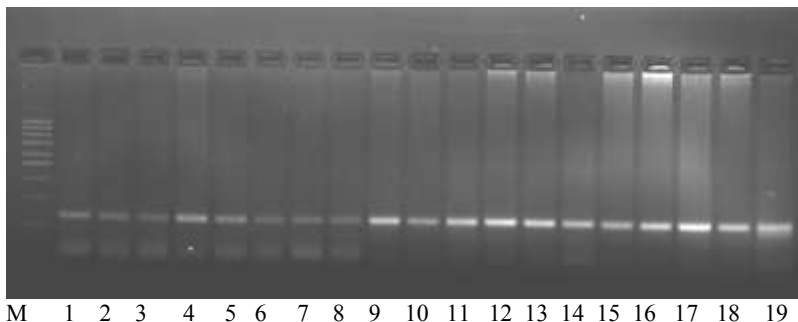


Рисунок 1 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа идентификации мутации гена MSTN, ассоциированной с мясной продуктивностью крупного рогатого скота, на основе ПЦР-анализа

Примечание – M – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь); 1-18 – генотип AA; 19 – генотип AB

Детекцию результатов ПЦР-анализа MSTN осуществляли методом горизонтального электрофореза в 3% агарозном геле в TBE буфере при УФ-свете с использованием бромистого этидия.

Режим амплификации гена TG:

x1: 94⁰С – 4 мин;

x31: 94⁰С – 1 мин, 57⁰С – 1 мин, 72⁰С – 1 мин;

x1: 72⁰С – 4 мин.

На этапе ПДРФ применялась эндонуклеаза рестрикции – PvuI, с генерацией генотип специфических фрагментов: ТТ (норма) = 473/75 bp; СС (способствует накоплению внутримышечного жира) = 295/178/75 bp; СТ (предрасположен к накоплению внутримышечного жира) = 473/295/178/75 bp (рисунок 2).

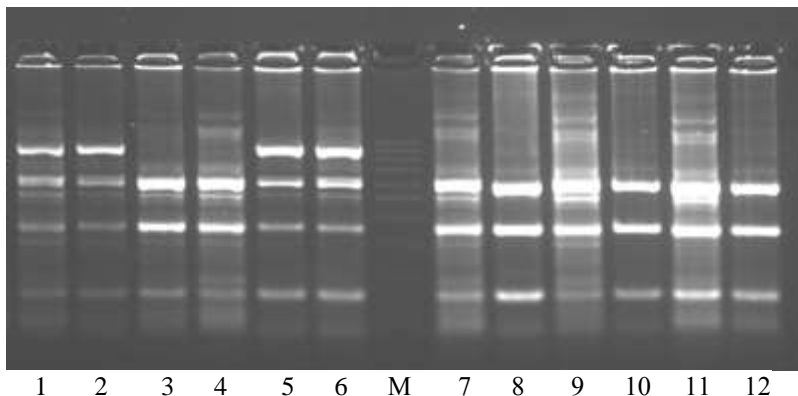


Рисунок 2 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа определения гена тиреоглобулина (TG5) у крупного рогатого скота мясного направления продуктивности

Примечание – М – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь); 1, 2, 5, 6 – генотип CT; 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12 – генотип CC

Режим амплификации CAPN1:

x1: 93⁰C – 5 мин, 93⁰C – 1 мин, 59⁰C – 1 мин;

x1: 72⁰C – 1 мин;

x35, 72⁰C – 5 мин;

12⁰C – удержание.

На этапе ПДРФ применялась эндонуклеаза рестрикции – Pst I (Tth1111) с генерацией генотип специфических фрагментов: AA – 341 bp, GA – 341/195/146 bp, GG – 195/146 bp (рисунок 3).

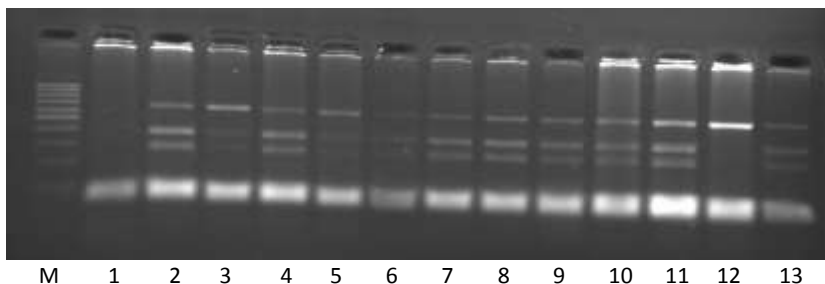


Рисунок 3 – Электрофореграмма технического результата предложенного способа идентификации мутации гена CAPN1, ассоциированной с мясной продуктивностью крупного рогатого скота, на основе ПЦР-анализа

Примечание – М – ДНК-маркер 50bp (ОДО «Праймтех», Беларусь); 2, 3, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13 – генотип GA; 12 – генотип AA

При проведении контрольного убоя быков учитывали предубойную живую массу (кг); массу парной и охлажденной туши (кг); убойный выход и выход туши (%); массу внутреннего жира (кг); морфологический состав туш путем проведения обвалки левых полутуш после 24-часового охлаждения (0^0 - 4^0 C). Каждую полутушу расчленили на 5 естественно-анатомических частей: шейную – по последнему шейному позвонку, плечелопаточную – по контуру лопатки, спинно-реберную – по последнему грудному позвонку, поясничную с пашиной – по последнему поясничному позвонку и тазобедренную с последующим взвешиванием костей, сухожилий и мякоти.

Основной цифровой материал был обработан методом биометрической статистики по П. Ф. Рокицкому [5]. Из статистических показателей рассчитывали среднее значение (M), ошибку средней арифметической (m), уровень значимости (P). В работе приняты следующие обозначения уровня значимости: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$.

Результаты исследований и их обсуждение. В результате проведенных исследований выявлен полиморфизм по всем изучаемым генам: миостатину (MSTN), тиреоглобулину (TG) и кальпаину (CAPN1). В изучаемой популяции быков частота генотипов гена MSTN^{BB} составила 18%, генотипа MSTN^{AB} – 36% и генотипа MSTN^{AA} – 46%.

Анализ абердин-ангус x черно-пестрых быков по гену CAPN1 выявил наличие генотипов: CAPN1^{AA} – 20%, CAPN1^{GA} – 65%; CAPN1^{GG} – 15%. Среди исследованных животных по гену TG распределение генотипов было следующим: TG^{CC} – 44,5%, TG^{CT} – 52,8% и всего 2,7% животных были с генотипом TG^{TT}.

После проведения генотипирования и изучения генетической структуры популяции для оценки убойных показателей были сформированы 3 группы животных по 6 голов в каждой с комплексными генотипами по генам MSTN, CAPN1 и TG. В первую группу вошли животные с генотипом MSTN^{AA} CAPN1^{AA} TG^{CC}, во вторую – MSTN^{AB} CAPN1^{GA} TG^{CT}, в третью – MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}.

Изучение мясной продуктивности было произведено зависимости от генотипов по генам MSTN, CAPN1 и TG по результатам контрольного убоя подопытных быков в возрасте 16 на ОАО «Волковыцкий мясокомбинат» по методике ВНИИМС. Данные контрольного убоя представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Убойные показатели абердин-ангус х черно-пестрых быков, разводимых в РСУП «Олекшицы» Берестовицкого района Гродненской области ($M \pm m$)

Показатель	генотип MSTN ^{AA} CAPN1 ^{AA} TG ^{CC} (n=6)	MSTN ^{AB} CAPN1 ^{GA} TG ^{CT} (n=6)	MSTN ^{BB} CAPN1 ^{GG} TG ^{TT} (n=6)
	Предубойная масса, кг	528,7±5,73	581,7±7,49***
Масса парной туши, кг	305,6±8,43	344,0±4,75**	362,2±5,73***
Выход туши, %	57,8±1,45	59,1±0,23	59,5±0,13
Масса внутреннего жира, кг	12,4±0,85	12,2±0,58	12,3±0,75
Выход внутреннего жира, %	2,4±0,18	2,1±0,08	2,0±0,11
Убойная масса, кг	317,9±8,48	356,2±5,25**	376,7±6,21***
Убойный выход, %	60,2±1,50	61,2±0,26	61,6±0,29

Из данных таблицы 2 видно, что быки с генотипом MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT} превосходили по убойным показателям животных с альтернативными генотипами. Так, преимущество по предубойной массе у быков с генотипом MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}, по сравнению с животными первой группы, составило 83 кг, или 15,7% ($P < 0,001$), по массе парной туши – 56 кг, или 18,5% ($P < 0,001$), по выходу туши – 1,7 п. п. ($P < 0,05$), по убойной массе – 58,8 кг, или 18,5% ($P < 0,001$), по убойному выходу – 1,4 п. п.

Быки с генотипом MSTN^{AB} CAPN1^{GA} TG^{CT} также превосходили животных с генотипами MSTN^{AA} CAPN1^{AA} TG^{CC}: по предубойной массе на 53 кг, или 10,0% ($P < 0,001$), массе парной туши на 38,45 кг, или 12,6% ($P < 0,01$), по выходу туши на 1,3 п. п., по убойной массе на 38,3 кг, или 12,0% ($P < 0,001$), по убойному выходу на 1,0 п. п. Разница по убойным показателям между животными третьей и второй групп составила по предубойной живой массе 30 кг, или 5,2% ($P < 0,05$), по убойной массе 20,5 кг, или 5,8%, по убойному выходу 0,36 п. п.

По выходу внутреннего жира различия между группами были незначительными и составили 0,3-0,4 п. п.

Морфологический состав является важным качественным показателем мясной продуктивности. Содержание наиболее ценных в пищевом отношении тканей (мышцы и жир) определяют ценность мяса как продукта питания. Нами также был изучен морфологический состав полутуш подопытных быков с разными генотипами генов MSTN, CAPN1 и TG, результаты которого представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Морфологический состав полутуш подопытных быков разных генотипов (M±m)

Показатель	генотип		
	MSTN ^{AA} CAPN1 ^{AA} TG ^{CC} (n = 6)	MSTN ^{AB} CAPN1 ^{GA} TG ^{CT} (n = 6)	MSTN ^{BB} CAPN1 ^{GG} TG ^{TT} (n = 6)
Масса охлажденной полутуши, кг	149,3±2,91	164,5±2,23***	174,7±1,60***
в т. ч. мякоти, кг	125,3±2,78	138,5 ±0,87***	147,8±1,35***
костей и сухожилий, кг	24,0±0,52	26,0±0,45*	26,9±0,54**
Содержалось в полутуше, %:			
мякоти	83,9	84,2	84,6
костей и сухожилий	16,1	15,8	15,4
Коэффициент мясности	5,2	5,33	5,50

Анализ морфологического состава полутуш подопытных животных показал, что при убое в 16-месячном возрасте от быков с генотипом MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT} получены туши с более высоким выходом мяса по сравнению со сверстниками первой и второй групп. Так, в полутушах быков с генотипом MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT} содержание мяса было больше на 22,5 кг, или 18,0% (P<0,001), в полутушах животных с генотипом генов MSTN^{AB} CAPN1^{GA} TG^{CT} – на 13,2 кг, или 10,5% (P>0,05), чем у сверстников первой группы.

По коэффициенту мясности быки с генотипом MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT} превосходили своих сверстников с генотипом MSTN^{AA} CAPN1^{AA} TG^{CC} и MSTN^{AB} CAPN1^{GA} TG^{CT} на 5,8 и 3,2% соответственно.

Известно, что питательная ценность, вкусовые качества и кулинарные свойства отдельных анатомических частей туши неодинаковы. Наиболее ценными считаются поясничная и тазобедренная части. Результаты изучения соотношения естественно-анатомических частей в полутушах подопытных быков представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Соотношение естественно-анатомических частей в полутушах подопытных бычков (M±m)

Анатомические части	MSTN ^{AA} CAPN1 ^{AA} TG ^{CC} (n = 6)		MSTN ^{AB} CAPN1 ^{GA} TG ^{CT} (n = 6)		MSTN ^{BB} CAPN1 ^{GG} TG ^{TT} (n = 6)	
	кг	%	кг	%	кг	%
полутуша	149,3±2,9	100	164,47± 2,23***	100	174,7± 1,6***	100
шейная	14,9±1,0	10,0	16,1±0,93	9,8	17,3±0,24	9,9
плечелопаточная	25,4±0,96	17,0	26,5±0,26	16,1	27,8±0,74*	15,9
спиннореберная	43,4±1,62	29,1	45,9±0,3	27,9	47,0±0,9*	26,9
поясничная	14,6±0,53	9,8	16,5±0,54*	10,0	17,6± 0,54**	10,1
тазобедренная	51,0±0,72	34,1	59,5±1,11***	36,2	65,0±0,79***	37,2

Анализ полученных данных свидетельствует о различиях между животными изучаемых генотипов по абсолютной массе естественно-анатомических частей их полутуш. По выходу поясничного и тазобедренного отрубов преимущество было у быков с генотипами $MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}$. Они превосходили по данному показателю сверстников с генотипом $MSTN^{AA} CAPN1^{AA} TG^{CC}$ на 0,3 и 3,1 п. п. соответственно. Разница по выходу поясничного и тазобедренного отрубов между животными с генотипами $MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}$ и $MSTN^{AB} CAPN1^{GA} TG^{CT}$ составила 0,1 и 1,0 п. п. соответственно.

Заключение. Изучение показателей мясной продуктивности абердин-ангус х черно-пестрых быков в 16-месячном возрасте свидетельствует о том, что быки с генотипами $MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}$ превосходили животных с генотипами $MSTN^{AA} CAPN1^{AA} TG^{CC}$ по предубойной массе на 83 кг, или 15,7% ($P < 0,001$), по массе парной туши – 56 кг, или 18,5% ($P < 0,001$), по выходу туши – 1,7 п. п. ($P < 0,05$), по убойной массе на 58,8 кг или 18,5% ($P < 0,001$), по убойному выходу на 1,4 п. п. Изучение морфологического состава и естественно анатомических частей абердин-ангус х черно-пестрых быков показало, что более мясные туши были получены от животных с генотипами $MSTN^{BB} CAPN1^{GG} TG^{TT}$: в их полутушах содержание мякоти было также больше, чем у сверстников с альтернативными генотипами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Амерханов, Х. Производство говядины и пути его увеличения в России / Х. Амерханов // Молоч. и мясн. скотоводство, 2003. – № 6. – С. 3-10.
2. Зелепухин, А. Племенные ресурсы мясного скотоводства России / А. Зелепухин, Ф. Каюмов // Молоч. и мясн. скотоводство, 2003. – № 6. – С. 24-35.
3. Эрнст, Л. К. Перспективы селекции сельскохозяйственных животных / Л. К. Эрнст // Науч. тр. ВИЖа. – 2005. – В. 63. – Т. 1. – С. 41.
4. Prediction of empty body composition of double-muscled beef cows / L. O. Fiems [et. al.] // Livest. Prod. Sci., 2005. – 92. – P. 249-259.
5. Spelman, R. J. Genetic and economic responses for within-family markers-assisted selection in dairy cattle breeding schemes / R. J. Spelman, D. J. Garrick // J. Dairy Sci. 1998. – Vol. 81. – P. 2942-2950.
6. Primer-directed enzymatic amplification of with a thermostable DNA polymerase / R. K. Saici [et. al.] // Science. – 1988. – P. 487-491.
7. Wiesner, I. Insertion of a reamplification round into the ISSR-PCR protocol gives new flax fingerprinting patterns / I. Wiesner, D. Wiesnerova // Cell Mol. Biol. Letters. – 2003. – Vol. 8. – P. 743-748.