

ВПЛИВ ПОЛІМОРФІЗМУ ГЕНА КАТЕПСИНУ *F* НА ЯКІСТЬ М'ЯСА СВИНЕЙ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ ПОРОДИ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ

*Т. В. Буслик, канд. біол. наук,
М. О. Льченко, канд. с.-г. наук,
Є. К. Олійниченко, аспірант,
І. Б. Баньковська, д-р с.-г. наук,
В. М. Балацький, д-р с.-г. наук*

Інститут свинарства і агропромислового виробництва НААН
вул. Шведська Могила 1, м. Полтава, 36013, Україна

*Однонуклеотидний поліморфізм $g.22G>C$ гена катепсину *F* (*CTSF*) у популяції свиней великої білої породи української селекції визначений з використанням методу ПЛР-ПДРФ. Досліджено зв'язок генотипів за однонуклеотидним поліморфізмом $g.22G>C$ гена *CTSF* з фізичними та хімічними показниками якості м'яса свиней.*

*За допомогою однофакторного дисперсійного аналізу показано вірогідний вплив генотипу за однонуклеотидним поліморфізмом $g.22G>C$ гена *CTSF* на показники вологоутримуючої здатності м'яса, енергетичної цінності, загальної вологи та вмісту кальцію у м'ясі свиней великої білої породи із силою впливу на формування досліджуваної ознаки $\eta^2=6,39\%$ ($p=0,03$), $\eta^2=6,51\%$ ($p=0,036$), $\eta^2=6,54\%$ ($p=0,035$) та $\eta^2=6,33\%$ ($p=0,042$), відповідно.*

*Обґрунтовано можливість проведення маркерної селекції на покращення якості м'яса товарної свинини за однонуклеотидним поліморфізмом $g.22G>C$ гена *CTSF*.*

Ключові слова: ОДНОНУКЛЕОТИДНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ, КАТЕПСИН *F*, СВИНІ, МАРКЕРНА СЕЛЕКЦІЯ, ЯКІСТЬ М'ЯСА.

Якість свинини має генетичну обумовленість і змінюється в залежності від породи, живої маси, віку тварин, а також умов зовнішнього середовища.

Для того, щоб задовольнити нові споживчі вимоги, виробникам товарної свинини для підвищення якості свинини важливо прийняти нові методи, які дозволяють виконувати підбір тварин з оптимальними генотипами. З цією метою бажано проводити аналіз генетичних факторів, що обумовлюють рівень кількості і якості свинини. Однак, існує ряд проблем стосовно швидкості оцінки цих показників. Практично їх можна визначити лише після забою тварин.

Розвиток сучасної науки дозволяє використовувати інноваційні методи прогнозування кількості і якості м'яса за допомогою ДНК-маркерів. Сьогодні вже визначено кілька десятків основних генів, що впливають на якість свинини і в даний час активно використовуються за кордоном, ряд із них почали досліджувати і в Україні (наприклад, *CTSS*, *CTSL*, *CTSB*, *CTSK*, *IGF2*) [1, 2]. Однонуклеотидні поліморфізми цих генів можна ідентифікувати та використовувати для встановлення зв'язків з фізичними та хімічними показниками якості м'яса в конкретних стадах свиней, які, у свою чергу, можуть бути використані для відбору тварин, що несуть найбільш бажані генотипи.

Катепсини (*CTSS*, *CTSL*, *CTSB*, *CTSK*, *CTSF*) – це лізосомальні протеїнази з широким спектром функцій, що синтезуються у більшості, якщо не у всіх, тканинах та типах клітин [3]. Ці ферменти, як правило, синтезуються як препрокатепсини, відіграють важливу роль у реакціях катаболізму основних білків, а також беруть участь у обробці та презентації антигенів, що впливають на імунну відповідь [4], обробку гормонів та проензимів з подальшим

впливом на регуляцію біохімічного шляху [3]. Висока активність катепсину скелетних м'язів свиней пов'язана з відомими вадами м'яса, а саме: надмірна м'якість, липкість, темний колір, металевий присмак, обумовлений кристалами тирозину та утворення білих плівок на поверхні розрізання [5]. Також катепсини залучені у процес автолізу, що відбувається в післязабойний період у м'ясі. Тому гени, що кодують ці ферменти, можуть розглядатися як перспективні гени-кандидати для покращення якості м'яса.

Ген катепсину *F* у свиней локалізований в хромосомі 2(SSC2) p14-p17. Однонуклеотидний поліморфізм *g.22 G>C* гена *CTSF* обумовлений нуклеотидною заміною *G* на *C*, що в свою чергу призводить до заміни глутамінової кислоти на аспарагінову в поліпептидному ланцюзі фермента катепсину *F*.

У роботах V. Russo et al., 2004 акцентовано увагу на значну асоціацію поліморфізму *g.22 G>C* гена катепсину *F* (*CTSF*) з середньодобовим приростом та товщиною хребтового сала [6]. Генотип *g.22CC* гена катепсину *F* підвищував показники росту та зменшував жирність туші [7]. Науковцями з університету штату Айова було досліджено вплив однонуклеотидного поліморфізму гена *CTSF* на якість так званої «сухої шинки» (Dry-Cured Hams), продукт переробки свинини, який є характерним для країн Середземноморського регіону, таких як Італія, Іспанія та Португалія [8]. Автори роботи показали достовірний вплив генотипу за локусом *CTSF* на показники якості м'яса (вміст внутрішньом'язевого жиру та рівень рН). Натомість у роботах польських науковців не виявлено достовірного впливу поліморфізму на економічно важливі риси свиней [9].

Метою дослідження було проаналізувати вплив поліморфізму *g.22 G>C* гена катепсину *F* на фізичні та хімічні показники якості м'яса свиней великої білої породи української селекції.

Матеріали і методи. Дослідження були проведені в умовах племінного заводу з розведення свиней великої білої (ВБ) породи ДП ДГ «Степне» Полтавського району Полтавської області. Для проведення фізико-хімічних досліджень м'язової тканини відбирали 200 г найдовшого м'яза спини між 9-12 грудними хребцями після 48-годинного дозрівання півтуші за температури +4 °C (n = 102). Для проведення генетичних досліджень відбирали по 1 г м'язової тканини.

Оцінка якості продуктів забою проводилася за загальноприйнятими методиками зоохімічного аналізу [10], чинними нормативними документами, а також з урахуванням рекомендацій ВАСГНІЛ (від 26.09.1986) та ДСТУ ISO2917-2001.

ДНК виділяли з м'язової тканини з використанням іонообмінної смоли Chellex-100 [11]. Генотипування проводили методом ПЛР-ПДРФ (полімеразна ланцюгова реакція, поліморфізм довжин рестрикційних фрагментів) [7]. Для ПЛР використовували праймери наступної структури: прямий – AGGGAGGGCTGGAGACGGAGTA та зворотній – TCATCTGGCTCAGCTCCAC. Рестрикцію продуктів ПЛР здійснювали за допомогою ендонуклеази *Rsa* I відповідно до рекомендацій виробника (Thermo SCIENTIFIC, Литва).

Фрагменти рестрикції розділяли у 8 % поліакриламідному гелі (ПААГ). Візуалізацію електрофореграми, після її фарбування у бромистому етидії, проводили на транслюмінаторі в УФ світлі.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерної програми *GenAlex* [12]. Силу впливу генотипу на ознаку обчислювали методом однофакторного дисперсійного аналізу за допомогою сучасних пакетів прикладних програм *Microsoft Excel* 2007 [13].

Результати й обговорення. В результаті ПЛР-ПДРФ-аналізу гена *CTSF* ДНК свиней великої білої були визначені фрагменти ДНК, аналогічні до описаних в роботі V. Russo et al. 2004 [7] (рис.). Для гомозиготи за алелем *g.22G* (генотип *GG*) характерний фрагмент 118 п.н., для гомозиготи за алелем *g.22C* (генотип *CC*) характерні два фрагменти 97 п.н.+ 21 п.н., для

гетерозиготи (генотип *GC*) – фрагменти 118 п.н.+ 97 п.н.+ 21 п.н. Для оцінки генотипу інформативними для нас на електрофореграмі були 2 фрагменти: 118 п.н. та 97 п.н.

Частота алелів і генотипів, отриманих в результаті генотипування вибірки тварин за геном *CTSF* наведені в таблиці 1. В представленій вибірці свиней великої білої породи вітчизняної селекції виявлено присутність як алелю *G* (0,443), так і алелю *C* (0,557). Для порівняння, у великій білій породі італійської селекції частота алелю *G* становила у різних популяціях 0,306 [14] та 0,430 [6]. Також отриманий нами розподіл характерний для порід П'єтрин та Гемпшир, де частоти алелю *G* становлять 0,444 та 0,375, відповідно [14].

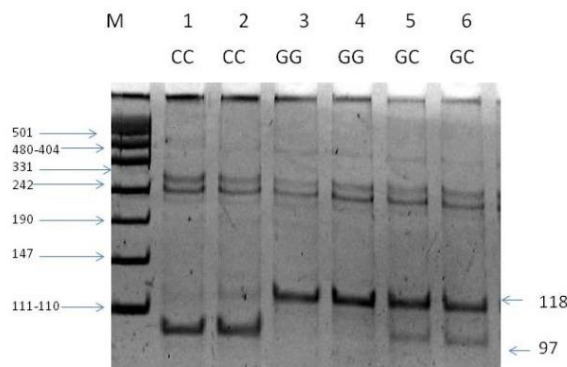


Рис. Електрофорез у 8 % ПААГ продуктів *Rsa* I рестрикції фрагменту локусу *CTSE* ампліфікованих у ПЛІР (М-маркер молекулярної маси, *pUC19/MspI*, 1-6 – зразки ДНК свиней).

Щодо розподілу генотипів, то для досліджуваної популяції не було виявлено достовірного відхилення від панміктичної рівноваги, розрахованої за формулою Гарді-Вайнберга, що свідчить про те, що представлена популяція знаходиться в стані генетичної рівноваги, а *CTSE*-локус не залучений у селекційний процес.

Таблиця 1

Розподіл *CTSE*-алелів за локусом *g.22 G>C* і відповідних генотипів у свиней великої білої породи, *n*=102

Порода	Частоти алелів		Частоти генотипів фактичні/очікувані			χ^2	<i>F</i>
	<i>C</i>	<i>G</i>	<i>CC</i>	<i>GC</i>	<i>GG</i>		
ВБ	0,557	0,443	0,311/0,310	0,491/0,494	0,198/0,197	0,004	0,006

Примітка: *n* – кількість тварин у вибірці, χ^2 – відхилення між фактичними та очікуваними частотами генотипів відносно закону Харді-Вайнберга, *F* – індекс фіксації Райта.

Більшість ознак, що визначають смакові якості і товарний вид свинини (вологоутримуюча здатність, колір, ніжність, мрамуровість тощо) є показниками високого рівня успадкування. Так, ступінь успадкування інтенсивності забарвлення м'яса складає 0,71, вологоутримуючої здатності – 0,59, вмісту триптофану – 0,58, площі м'язового волокна – 0,54, дещо гірше успадковується вміст жиру в м'язовій тканині [10].

Вплив поліморфізму гену *CTSE* на фізичні та хімічні показники якості м'яса свиней ВБ породи зазначені в таблиці 2.

Аналіз результатів оцінки якості м'яса свиней породи ВБ в залежності від генотипа за одноступінчастим поліморфізмом *g.22 G>C* гена *CTSE* свідчить, що показник вологоутримуючої здатності м'яса тварин з генотипом *GC* був вищим ніж у тварин з генотипом *CC* на 4,57 % ($p<0,05$). Вологоутримуюча здатність м'яса обумовлювала його ніжність і соковитість. Чим більша утримуюча здатність білків, тим міцніше м'ясо зв'язує воду і менше втрачає її під час термічної обробки. При порівнянні тварин з генотипом *CC* та *GC* за геном *CTSE* виявлено, що м'ясо тварин, які несуть в геномі гетерозиготний генотип *GC* володіє меншою енергетичною цінністю на 5,44 % ($p<0,05$). Також, показано негативний вплив

мутантного алелю *C* на вміст фосфору. Вміст фосфору у м'ясі тварин, які несуть в геномі гомозиготний генотип *GG* був вищий на 3,62 %, порівняно з м'ясом тварин генотипу *CC*.

Таблиця 2

Вплив однонуклеотидного поліморфізму *g.22 G>C* гена *CTSF* на фізичні та хімічні показники якості м'яса свиней, $n=102$, ($M\pm m$)

Показники	Генотипи			Сила впливу генотипу η^2 , %
	<i>CC</i> ($n=31$)	<i>GC</i> ($n=50$)	<i>GG</i> ($n=21$)	
Вологоутримуюча здатність, %	52,11±1,030	54,49±0,664 ^{#,*}	51,50±1,167	6,39 ($p=0,03$)
Ніжність, с	10,84±±0,365	10,39±0,290	10,54±0,516	0,87 ($p=0,638$)
pH	5,51±0,014	5,51±0,010	5,50±0,021	0,33 ($p=0,835$)
Втрати при термічній обробці, %	15,17±0,898	15,80±0,478	16,89±0,769	2,19 ($p=0,320$)
Енергетична цінність, ккал	141,32±2,847	133,63±1,651*	136,33±2,219	6,51 ($p=0,036$)
Загальна волога, %	72,34±0,334	73,23±0,184	72,87±0,253	6,54 ($p=0,035$)
Зола, %	1,15±0,027	1,19±0,016	1,18±0,027	2,31 ($p=0,313$)
Протеїн, %	21,25±0,280	21,69±0,161	21,95±0,169	4,39 ($p=0,119$)
Жир, %	9,21±1,195	9,47±0,864	6,60±0,926	3,53 ($p=0,169$)
Кальцій, %	0,051±0,0012	0,048±0,0010	0,050±0,0009	6,33 ($p=0,042$)
Фосфор, %	0,133±0,0027	0,129±0,0019	0,138±0,0040*	5,50 ($p=0,070$)

Примітка: *достовірність різниці, порівняно з показником фізико-хімічних якостей з генотипом *CC*, $p\leq 0,05$
достовірність різниці порівняно з показником фізико-хімічних якостей з генотипом *GG*, $p\leq 0,05$

За результатом проведеного однофакторного дисперсійного аналізу встановлено достовірний вплив однонуклеотидного поліморфізму *g.22 G>C* гена *CTSF* на показники вологоутримуючої здатності м'яса ($\eta^2=6,39$ %, $p=0,03$), енергетичної цінності, ($\eta^2=6,51$ %, $p=0,036$), загальної вологи ($\eta^2=6,54$ %, $p=0,035$) та вмісту кальцію у м'ясі ($\eta^2=6,33$ %, $p=0,042$).

ВИСНОВКИ

1. У великій білій породі вітчизняної селекції визначено поліморфізм за однонуклеотидним поліморфізмом *g.22 G>C* гена *CTSF* з частотою зустрічання мажорного алелю *G* (0,443).

2. У дослідженій вибірці популяції свиней ВБ породи відхилення в розподілі *CTSF*-генотипів від рівноваги, розрахованої за формулою Гарді-Вайберга, не є достовірним. Це свідчить про те, що *CTSF*-локус не залучений у селекційний процес.

3. Виявлено статистично значущий вплив генотипу за однонуклеотидним поліморфізмом *g.22 G>C* гена *CTSF* на показники вологоутримуючої здатності м'яса, енергетичної цінності, загальної вологи та вмісту кальцію у м'ясі свиней великої білої породи.

4. Значущу перевагу ($p<0,05$) за важливим технологічним показником здатності м'язової тканини утримувати вологу мали тварини з гетерозиготним генотипом *GC*.

Перспективи досліджень. Однонуклеотидний поліморфізм *g.22 G>C* гена *CTSF* може бути використаний в маркерній селекції для прогнозування і поліпшення показників якості м'яса свиней великої білої породи української селекції. Маркерний скринінг племінного поголів'я свиней в Україні за цим однонуклеотидним поліморфізмом дозволить проводити спрямовану маркерну селекцію свиней на покращення якості м'яса.

THE INFLUENCE OF THE POLYMORPHISM OF CATHEPSIN F GENE ON THE MEAT QUALITY OF UKRAINIAN LARGE WHITE PIGS

T. Buslyk, M. Ilchenko, Y. Oliinychenko, I. Bankovska, V. Balatsky

Institute of Pig Breeding and Agro-Industrial Production of NAAS
1, Shvedska Mogila str., Poltava, 36013, Ukraine

S U M M A R Y

Single nucleotide polymorphism *g.22 G>C* for Cathepsin *F* (*CTSF*) gene in the population of Ukrainian Large White pig breed was evaluated using PCR-PRLF method. A quantitative assessment of the relationship of genotypes to the single nucleotide polymorphism of *CTSF* gene with physical and chemical parameters of the meat quality is given.

Using a one-factor dispersive analysis, the probable effect of the genotype of the polymorphism *g.22 G>C* for *CTSF* gene on the moisture holding capacity, the energy value, total moisture and calcium content in the meat of pigs of Ukrainian Large White pig breed with the effect on the formation of the test feature is $\eta^2 = 6.39\%$ ($p = 0.03$), $\eta^2 = 6.51\%$ ($p = 0.036$), $\eta^2 = 6.54\%$ ($p = 0.035$) and $\eta^2 = 6.33\%$ ($p = 0.042$), respectively.

The possibility of conducting marker selection for improving the quality of commercial pork for the polymorphism *g.22 G>C* for *CTSF* gene is substantiated.

Keywords: POLYMORPHISM OF THE GENE, GENOTYPE, CATHEPSIN F, PIGS, MARKER ASSOCIATED SELECTION, MEAT QUALITY.

ВЛИЯНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА КАТЕПСИНА F НА КАЧЕСТВО МЯСА СВИНЕЙ КРУПНОЙ БЕЛОЙ ПОРОДЫ УКРАИНСКОЙ СЕЛЕКЦИИ.

Т. В. Буслик, Н. А. Ильченко, Е. К. Олейниченко, И. Б. Баньковская, В. Н. Балацкий

Институт свиноводства и агропромышленного производства НААН
ул. Шведская Могила 1, г. Полтава, 36013, Украина

А Н Н О Т А Ц И Я

Однонуклеотидный полиморфизм *g.22 G>C* гена катепсина F (*CTSF*) в популяции свиней крупной белой породы определен с использованием метода ПЦР-ПДРФ. Исследована связь генотипов за однонуклеотидным полиморфизмом *g.22G>C* гена *CTSF* с физическими и химическими показателями качества мяса свиней.

С помощью однофакторного дисперсионного анализа показано вероятное влияние генотипа за однонуклеотидным полиморфизмом *g.22G>C* гена *CTSF* на показатели влагоудерживающей способности мяса, энергетической ценности, общей влаги и содержания кальция в мясе свиней крупной белой породы с силой влияния на формирование исследуемого признака $\eta^2 = 6,39\%$ ($p = 0,03$), $\eta^2 = 6,51\%$ ($p = 0,036$), $\eta^2 = 6,54\%$ ($p = 0,035$) и $\eta^2 = 6,33\%$ ($p = 0,042$), соответственно.

Обоснована возможность проведения маркерной селекции на улучшение качества мяса товарной свинины за однонуклеотидным полиморфизмом *g.22G>C* гена *CTSF*.

Ключевые слова: ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА, ГЕНОТИП, КАТЕПСИН F, СВИНЬИ, МАРКЕРНАЯ СЕЛЕКЦИЯ, КАЧЕСТВО МЯСА.

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Polymorphisms of the porcine cathepsins, growth hormone-releasing hormone and leptin receptor genes and their association with meat quality traits in Ukrainian Large White breed / V. Balatsky, I. Bankovska, R. N. Pena et al. // *Mol Biol Rep.* – 2016. – Vol. 43. – P. 517–526.
2. Баньковская И. Б. Связь полиморфизма генов катепсинов *CTSS*, *CTSL*, *CTSB*, *CTSK* с показателями качества мяса и сала свиней украинской крупной белой породы / И. Б. Баньковская, В. Н. Балацкий, Т. В. Буслик // *Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. Сборник научных трудов. Горки, 2016.* – Вып. 19 (1). – С. 198–204.

3. Cysteine cathepsins: Cellular roadmap to different functions / K. Brix, A. Dunkhorst, K. Mayer, S. Jordans // *Biochimie*. – 2008. – Vol. 90 (2). – P. 194–207.
4. *Zavašnik-Bergant T.* Cysteine cathepsins in the immune response / T. Zavašnik-Bergant, Turk B // *Tissue antigens*. – 2006. – Vol. 67(5). – P. 349–355.
5. Proteases in fresh pork muscle and their influence on bitter taste formation in dry-cured ham / R. Virgili, G. Parolari, C. Schivazappa et al. // *J. Food Biochem.* – 1998. – Vol. 22. – P. 53–63.
6. Association of the CTSB,CTSF and CSTB genes with growth, carcass and meat quality traits in heavy pigs / V. Russo, R. Davoli, L. Nanni Costa et al. // *Italian Journal of Animal Science*. – 1998. – Vol. 2. – P. 67–69.
7. Single nucleotide polymorphisms in several porcine cathepsin genes are associated with growth, carcass, and production traits in Italian Large White pigs / V. Russo, L. Fontanesi, E. Scotti et al. // *J. Anim. Sci.* – 2008. – Vol. 86. – P. 3300–3314.
8. Effect of three cathepsin genes on processing quality traits of fresh and dry-cured hams / A. M. Ramos, K. Stalder, N. T. Nguyen, M. F. Rothschild // *Proc. Midwest Regional Meet. Am. Soc. Anim. Sci., Des Moines, IA. – USA, 2005.* – P. 21-23.
9. The association between polymorphisms of three cathepsins and economically important traits in pigs raised in Poland / K. Piórkowska, K. Ropka-Molik, R. Eckert, K. Żukowski // *Livestock Science*. – 2012. – Vol. 150 (1-3). – P. 316–323.
10. *Поливо́да А. М.* Оценка качества свинины по физико-химическим показателям / *А. М. Поливо́да* // *Свинарство*. – 1976. – Вып. 24. – С. 57–62.
11. *Walsh P. S.* Chelex-100 as a medium for extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material / P. S. Walsh, D. A. Metzger, R. Higuchi // *BioTechniques*. – 1991. – Vol. 10. – P. 506.
12. *Peakall R.* GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P. E. Smouse // *Molecular Ecology Notes*. – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295.
13. *Плохинский Н. А.* Руководство по биометрии для зоотехников / Н. А. Плохинский // М.: Колос, 1969. – 255 с.
14. Linkage mapping of the porcine cathepsin F (CTSF) gene close to the QTL regions for meat and fat deposition traits on pig chromosome 2 / V. Russo, , L. Fontanesi, R. Davoli, S. Galli // *Anim. Genet.* – 2004. – Vol. 35. – P. 155–157.

Рецензент – К. Ф. Почерняєв, д. с.-г. н., зав. відділу фізіології та здоров'я тварин Інституту свинарства і АПВ НААН України.