

4
НОМЕР

БОИЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН



Вельмовский П.В.

2018

УЧРЕДИТЕЛИ

УРАЛЬСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ РАН
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

УДК 591.4: 636;591.8:636.2+611.73.019

Д.Б. Косян, С.А. Мирошников, Е.А. Русакова

ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CAST С СТРУКТУРНО-МЕХАНИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ МЯСА БЫЧКОВ КАЛМЫЦКОЙ ПОРОДЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН, Оренбург, Россия

Цель. Выявление предполагаемых причинно-следственных мутаций в гене CAST, а также проверка связи этих мутаций со структурно-механическими свойствами мяса бычков калмыцкой породы КРС.

Материалы и методы. С помощью Уорнера-Брацлера в модификации Максакова проведена оценка структурно-механических свойств мяса. В ходе процесса амплификации установлена разная степень выраженности мутационной аллели в гене CAST.

Результаты. По мере увеличения срока созревания мяса все образцы характеризовались изменением показателя сопротивления в процессе резания. Установлено снижение показателя усилия, приложенного в процессе разрезания, на 18 сутки созревания мяса во всех исследуемых группах (в III группе на 71,9%; во II – на 65,9%; в I – 70,3%. При этом отсутствовала разница между II и III группами. К 18-суточному созреванию образцов мясо всех генотипов имело минимальные различия – 4,07% с I группой. Установлено достоверное влияние генотипа на физико-механические показатели нежности мяса при созревании.

Заключение. В ходе исследований установлено, наиболее перспективным вариантом генотипа, который можно рассматривать как материал для селекционной работы, является гомозиготное проявление аллеля T гена CAST, поскольку установлена взаимосвязь наличия полиморфизма с изменениями в структурно-механических свойствах мяса в ходе созревания.

Ключевые слова: генетика, ДНК, генотип, ген CAST, полимеразная цепная реакция (ПЦР).

D.B. Kosyan, S.A. Miroshnikov, E.A. Rusakova

ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP OF CAST GENE POLYMORPHISM WITH THE STRUCTURAL AND MECHANICAL PROPERTIES OF MEAT OF BULLS KALMYK BREED OF CATTLE

Federal Research Center for Biological Systems and Agrotechnologies RAS, Orenburg, Russia

Objective. Identification of the alleged cause-effect mutations in the CAST gene, as well as verification of the relationship of these mutations with the structural and mechanical properties of meat calves of the Kalmyk cattle breed.

Materials and methods. Using the Warner-Bratzler modification Maksakova assessment of structural-mechanical properties of meat. During the process of amplification set different degrees of expression of a mutant allele of a gene in a CAST.

Results. As the period of meat maturation increased, all samples were characterized by a change in the resistance index during cutting. A decrease in the index of effort applied in the process of cutting, on the 18th day of maturation of meat in all study groups (in group III by 71.9%; in II-by 65.9%; in I – 70.3%. There was no difference between groups II and III. To 18-day mutational maturation of the meat samples of the dispersion characteristics of all the ratio of genotypes had the effect of minimal micelles difference of 4.07% I group. We found a significant influence of genotype on physico-mechanical parameters tenderness of the meat when ripe.

Conclusions. In the course of studies it was found that the most promising variant of the genotype, which can be considered as a material for breeding work, is a homozygous manifestation of the allele T of the gene CAST, since the relationship of the presence of polymorphism with changes in the structural and mechanical properties of meat during maturation.

Keywords: genetics, DNA, the genotype, CAST gene, polymerase chain reaction (PCR).

Введение

Генетические маркеры, связанные с качественными характеристиками мяса, создают возможность сохранения их в различных популяциях [1]. Информация об ассоциированности маркера с несколькими признаками необходима для оптимизации выбора комплекса характеристик объекта. Трудность в получении этой информации при анализе искусственных популяций заключается в том, что гомозиготный генотип встречается достаточно редко, что приводит к исключению этого генотипа из анализа. В последнее время селекция, проводимая для увеличения частоты редковстречаемых аллелей в искусственных популяциях, используется для обеспечения существования всех генотипов для анализа [2, 3].

Гаплотипы в μ -кальпаине (CAPN1) [4] и SNP в кальпастатине (CAST) [5] связаны с нежностью мяса у крупного рогатого скота [6]. Важнейшей составляющей качества мяса, с точки зрения потребителей, является нежность мяса [7, 8]. Это зависит не только от производственных факторов, таких как порода, генотип, возраст, рацион питания, структура роста или убойный вес, но и от технологических факторов, таких как условия забоя скота, время выдержки и процесса приготовления [9, 10]. Способность прогнозировать нежность мяса является одной из основных проблем, стоящих перед мясной промышленностью, поскольку нежность мяса в посмертный период сильно варьирует между особями, а потребители требуют качественного продукта. Посмертный протеолиз ключевых миофибриллярных белков эндогенными ферментами в мышечной клетчатке является ключевым фактором, способствующим нежности мяса [11]. В протеолитической системе кальпаина μ -кальпаин (CAPN1) отвечает за расщепление миофибриллярных белков, в то время как кальпастатин (CAST) ингибирует μ - и m -кальпаин (CAPN2) активность и, следовательно, регулирует посмертный протеолиз.

Включение молекулярной информации в селекционные программы было рекомендовано для повышения их эффективности [12]. S. Allais et al. (1995) предложил использовать полиморфизм кальпастатина для прогнози-

рования нежности говядины, поскольку различные однонуклеотидные полиморфизмы (SNP) в гене CAST ассоциированы с нежностью мяса [13]. Недавно некоторые из этих полиморфизмов были включены в качестве коммерческих генетических маркеров в некоторые отрасли животноводства. Однако для обеспечения их правильного использования в селекционных программах необходимо, чтобы воздействие полиморфизмов оценивалось в разных популяциях.

Таким образом, целью данного исследования было выявление предполагаемых причинно-следственных мутаций в гене CAST, а также проверка связи этих мутаций со структурно-механическими свойствами мяса бычков калмыцкой породы крупного рогатого скота (КРС).

Материалы и методы

Объектом исследований являлись животные (n=50) калмыцкой породы крупного рогатого скота.

У исследуемых групп животных были отобраны образцы крови для дальнейшего анализа и выявления полиморфизма гена CAST. Кровь получали из яремной вены. Полученные образцы крови помещали в пробирки объемом 10 мл, содержащих 600 мкл этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА). Процесс выделения ДНК из образцов цельной крови исследуемых животных проводился при помощи специфических наборов «ДНК-Экстран-1» («Синтол», Россия). В таблице 1 указаны праймеры, которые были использованы в ходе амплификации фрагмента гена CAST.

Таблица 1. Последовательность праймеров фрагмента гена CAST

№	Наименование гена	Последовательность праймеров	Источник
1	CAST	5'- ACATTCTCCCCACAGTGCC-3' 5'-GACAGA GTCTGCGTTTTGCTC-3')	(GenBank accession AF159246

ПЦР в реальном времени проводили на программируемом амплификаторе АНК-32 («Синтол», Россия) в объеме реакционной смеси 25 мкл, содержащей 60 мМ трис-НСl (рН 8,5), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ меркаптоэтанол; 0,1 мМ тритон X-100; 0,2 мМ дНТФ, 1 ед. Таq ДНК полимеразы, в количестве 0,5 мкМ каждого из праймеров. Процесс амплификации гена CAST проводился по следующей схеме:

1. 95°C – 120 сек x 1;
2. 64°C – 40 сек x 40;
3. 95°C – 20 сек x 40.

Для влияния взаимосвязи разных аллельных вариаций гена CAST со свойствами мяса, в частности его структурно-механическими характеристиками, из исследуемого поголовья КРС (n=50), учитывая результаты генетического анализа, животные были разделены на 3 группы: I группа – отсутствие мутационной аллели (СС); II – гетерозиготное проявление мутационной аллели (СТ); III – наличие мутационной аллели (ТТ). В качестве подопытных животных выступали бычки калмыцкой породы крупного рогатого скота. В 15 месячном возрасте проводили убой животных.

Для оценки структурно-механических свойств мяса был использован прибор Уорнер-Братцлера, представленного в модификации Максакова. В соответствии с рекомендациями Р.М. Салаватулина (1983) и др. была определена влагоудерживающая способность (ВУС). Исследования были выполнены в условиях лаборатории молекулярной генетики и испытательного центра ФГБНУ ФНЦ БСТ РАН.

Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия достоверности по Стьюденту (t-критерий) с помощью пакета программ «Statistica 10.0» («Stat Soft Inc.», США).

Результаты и обсуждение

Анализ калмыцкой породы КРС по наличию полиморфизма гена CAST продемонстрировал меньшую степень встречаемости полиморфизма данного гена, а именно среди 50 голов было выявлено 7 (16 %) животных с генотипом ТТ (желательный), 35 (70 %) животных с генотипом СТ и 8 особей с генотипом СС (14%). Частота аллеля С составила 0,51, а аллеля Т – 0,49. Частота встречаемости генотипа СС составила 0,16; СТ – 0,70; а ТТ – 0,14.

Таблица 2. Частота встречаемости полиморфизмов гена CAST у животных калмыцкой породы крупного рогатого скота (n=50)

Ген	n	СС		СТ		ТТ		Частота аллелей	
		n	%	n	%	n	%	С	Т
CAST	50	8	14	35	70	7	16	0,51	0,49

Анализ показателей усилия при разрезании длиннейшей мышцы спины показал, что образцы сырого мяса, полученные от животных III группы, характеризовались наименьшим усилием при разрезании во все периоды созревания. Так, при созревании до 4 сут. они на 35,7% имели меньшее сопротивление при разрезании, по сравнению с образцами, полученными от I группы и на (11,2%) по сравнению с животными II группы (табл. 3).

Таблица 3. Показатели нежности длиннейшей мышцы спины (усилие, приложенное в процессе разрезания, кг/см²)

Период созревания, сутки	Генотип		
	I группа	II группа	III группа
4	0,64±0,05	0,44±0,06	0,32±0,04
18	0,19±0,03	0,15±0,02	0,09 ±0,03

По мере увеличения срока созревания мяса все образцы характеризовались изменением показателя сопротивления в процессе резания. Установлено снижение показателя усилия, приложенного в процессе разрезания, на 18 сутки созревания мяса во всех исследуемых группах (в III группе на 71,9%; во II – на 65,9%; в I – 70,3%. При этом отсутствовала разница между II и III группами. К 18-суточному созреванию образцов мясо всех генотипов имело минимальные различия – 4,07% с I группой.

Дисперсионным анализом однофакторного комплекса установлена сила влияния генотипа на физико-механические показатели нежности мяса. Показано достоверное влияние генотипа на физико-механические показатели нежности мяса при созревании, составившее 56%, на долю других факторов приходилось 44% ($P > 0,95$) (табл. 4).

Таблица 4. Влияние генотипа на структурно-механические свойства длиннейшей мышцы спины в процессе созревания

	Период созревания, сутки	Показатель силы влияния				
		η^2_x	η^2_z	η^2_y	F_x	P_x
Физико-механические показатели нежности мяса	4	0,40	0,50	1,00	2,12	$P < 0,95$
	18	0,35	0,65	1,00	0,59	$P < 0,95$

Примечание: Критерий Фишера при $v_1 =$ количество градаций-1=3-1=2; $v_2 = N - v_1 = 8 - 2 = 6$: 27,0 - $P > 0,999$; 10,9 - $P > 0,99$; 5,1 - $P > 0,95$

Согласно литературным источникам, технологические свойства мясной продукции определяются различными факторами. В числе наиболее значимых (вкус, питательная ценность) соотношение тканей в туше, а так же содержание влаги, форма связи данной влаги и ее распределением. Механическое воздействие на белковые мицеллы может привести к удерживанию влаги и разрушению белковых молекул за счет температурного воздействия, все это указывает на качество технологии и кулинарии мясопродуктов [14-16].

Заключение

Таким образом, наиболее перспективным вариантом генотипа, который можно рассматривать как материал для селекционной работы, является гомозиготное проявление аллеля T гена CAST, поскольку установлена взаимосвязь наличия полиморфизма с изменениями в структурно-механических свойствах мяса КРС в ходе созревания.

(Работа выполнена в рамках тематического плана по госзаданию № 0761-2018-0011)

ЛИТЕРАТУРА

1. Van Eenennaam A.L., Li J., Thallman R.M., Quaas R.L., Dikeman M.E., Gill C.A. et al. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J Anim Sci.* 2007. 85: 891-900.
2. Johnston D.J., H.-U. Graser Estimated gene frequencies of GeneSTAR markers and their size of effects on meat tenderness, marbling, and feed efficiency in temperate and tropical beef cattle breeds across a range of production systems. *J Anim Sci.* 2010. 88: 1917-1935.
3. Chessa S., Nicolazzi E.L., Nicoloso L., Negrini R., Marino R., Vicario D. et al. Analysis of candidate SNPs affecting milk and functional traits in the dual-purpose Italian Simmental cattle. *Livest Sci.* 2015. 173: 1-8.
4. Bennett G.L., Shackelford S.D., Wheeler T.L., King D.A., Casas E., Smith T.P.L. Selection for genetic markers in beef cattle reveals complex associations of thyroglobulin and casein1-S1 with carcass and meat traits. *J Anim Sci.* 2013. 91: 565-571.
5. Tait Jr., Shackelford S.D., Wheeler T.L., King D.A., Casas E., Thallman R.M. et al. μ -Calpain, calpastatin, and growth hormone receptor genetic effects on pre-weaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in Angus cattle selected to increase minor haplotype and allele frequencies. *J Anim Sci.* 2014. 92: 456-466.
6. White S.N., Casas E., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G. et al. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. *J Anim Sci.* 2005. 83: 2001-2008.
7. Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G. et al. Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim Sci.* 2006. 84: 520-525.
8. Cushman R.A., Tait Jr. R.G., McNeel A.K., Forbes E.D., Amundson O.L., Lents C.A. et al. A polymorphism in myostatin influences puberty but not fertility in beef heifers, whereas μ -calpain affects first calf birth weight. *J Anim Sci.* 2015. 93: 117-126.
9. Miller M.F., Huffman K.L., Gilbert S.Y., Hamman L.L., Ramsey C.B. Retail consumer acceptance of beef tenderized with calcium chloride. *J Anim Sci.* 1995. 73 (8): 2308-2314.
10. Ouali A., Herrera-Mendez C.H., Coulis G., Becila S., Boudjellal A., Aubry L., Sentan-

- dreuRevisiting M.A. the conversion of muscle into meat and the underlying mechanisms. Meat Science. 2006. 74(1): 44-58.
11. Geay Y., Bauchart D., Hocquette J.F., Culioli J. Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. Reproduction Nutrition Development. 2001. 41(1): 1-26.
 12. Maltin C., Balcerzak D., Tilley R., Delday M. Determinants of meat quality: Tenderness Proceedings of the Nutrition Society. 2003. 62(2): 337-347.
 13. Meuwissen T.H.E., Goddard M.E. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. Genetics Selection Evolution. 1996. 28(2): 161-176.
 14. Allais S., Journaux L., Levéziel H., Payet-Duprat N., Raynaud P., Hocquette J.F., Lepetit J., Rousset S., Denoyelle C., Bernard-Capel C., Renand G. Effects of polymorphisms in the calpastatin and μ -calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. J Anim Sci. 2011. 89 (1): 1-11.
 15. Bar-endse W., B.E. Harrison, R.J. Hawken, D.M. Ferguson, J.M. Thompson, M.B. Thomas, R.J. Bunch Epistasis between calpain 1 and its inhibitor calpastatin within breeds of cattle. Genetics. 2007. 176(4): 2601-2610.
 16. Costello S., O'Doherty E., Troy D.J., Ernst C.W., Kim K.S., Stapleton P., Sweeney T., Mullen A.M. Association of polymorphisms in the calpain I, calpain II and growth hormone genes with tenderness in bovine *M. longissimus dorsi*. Meat Science. 2007. 75(4): 551-557.

Поступила 24.12.2018

(Контактная информация: Русакова Елена Анатольевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», г. Оренбург, 9 Января, 29, тел.: +7(919)860-24-78; elenka_rs@mail.ru;

Косян Дианна Багдасаровна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий Российской академии наук», г. Оренбург, 9 Января, 29, kosyan.diana@mail.ru;

Мирошников Сергей Александрович, доктор биологических наук, член-корреспондент, директор ФГБНУ «Федеральный научный центр биологических систем и агротехнологий РАН», 460000, г. Оренбург, ул. 9 Января, 29, тел.: 89198424699, e-mail: sergey_ru01@mail.ru.)

Образец ссылки на статью:

Косян Д.Б., Мирошников С.А., Русакова Е.А. Оценка взаимосвязи полиморфизма гена CAST с структурно-механическими свойствами мяса бычков калмыцкой породы крупного рогатого скота. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2018. 4. 7с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2018-4/Articles/DBK-2018-4.pdf>) DOI: 10.24411/2304-9081-2018-14022.