

Балацький В.М., кандидат біологічних наук,
Корінний С.М., кандидат сільськогосподарських наук,
Баньковська І. Б., кандидат сільськогосподарських наук,
Гіболенко О.С., молодший науковий співробітник.

Інститут свинарства і агропромислового виробництва Національної академії аграрних наук України

АСОЦІАЦІЯ ГЕНУ РИЛІЗИНГ-ФАКТОРА ГОРМОНА РОСТУ З ЯКІСТЮ М'ЯСА СВИНЕЙ ВЕЛИКОЇ БІЛОЇ ПОРОДИ УКРАЇНСЬКОЇ СЕЛЕКЦІЇ.

Рецензент – кандидат біологічних наук К.Ф. Почерняєв

Проведено дослідження щодо пошуку асоціації гену GHRH (рилізинг-фактора гормону росту) з показниками якості м'яса свиней великої білої породи української селекції. Встановлено, що м'ясо свиней з генотипом BB характеризується більш високими показниками ніжності у порівнянні з гетерозиготними тваринами, в той же час вміст жиру в ньому був на 0,69 % та 0,50 % вищим, ніж у м'язевій тканині особин з генотипом AB та AA, відповідно. Отримана молекулярна інформація щодо зв'язку GHRH генотипів (AluI-поліморфізм) з вмістом внутрішньом'язового жиру та ніжністю м'яса може бути використана в маркер-супровідній селекції на покращення якості м'яса.

Ключові слова: якість м'яса, ген рилізинг-фактора гормону росту (GHRH), велика біла порода свиней.

В сучасних системах інтенсивного виробництва свинини існує тенденція розведення та відгодівлі переважно м'ясних генотипів свиней з перспективою подальшого загального підвищення їх м'ясної продуктивності за рахунок направленої селекції на підвищену енергію росту та м'ясність туш. При цьому перевага надається саме пісній свинині із зниженим вмістом внутрішньом'язового жиру. На жаль, селекційний тиск на перерозподіл інтенсивності біологічних і фізіологічних процесів в організмі свиней суттєво змінює якість м'язової тканини, що негативно впливає на остаточну якість м'ясних продуктів.

На шляху вирішення цієї проблеми науковцями і практиками проводиться поглиблене вивчення впливу на якість м'яса комплексу факторів, пов'язаних з годівлею свиней, технологією їх утримання, транспортуванням та організацією забою тварин. В останні роки увага дослідників акцентується на генетичній складовій, зокрема пошуку локусів геному, асоційованих з параметрами якості м'яса і складу туш та розробці відповідних генетичних маркерів. Їх використання дозволяє значно покращити оцінку племінних тварин і отримувати лінії свиней та кросбредне поголів'я не тільки з високими показниками м'ясної продуктивності, але й з необхідним рівнем фізико-хімічних характеристик м'яса.

За останні роки встановлено ряд генів, що певним чином асоційовані з різними показниками якості м'яса свиней. До них, наприклад, відносяться гени родини катепсинасів (Cathepsins), [19, 20, 13, 7], ріанодин-рецепторний ген [15] та інші. Можливим генетичним маркером властивостей м'язової тканини вважається також локус рилізинг-фактора (гормона) гормону росту (*GHRH*, growth hormone releasing hormone), що приймаючи участь у контролі метаболізму гормону росту впливає на ряд ознак м'ясної продуктивності та якості м'яса свиней [14, 17, 18].

Однак, ефективне використання цього гена-кандидата в якості генетичного маркера фізико-хімічних характеристик свинини можливе лише після отримання достовірної інформації про силу асоціативних зв'язків в тих породах і лініях свиней, де планується використання цих маркерів в селекційному процесі.

Велика біла порода свиней є найбільш численною породою і широко використовується у світі. За даними FAO на 2007 рік [11] велику білу породу розводили у 117 країнах всіх континентів. Враховуючи таку значну роль великої білої породи, її чисельність і вплив на генофонд домашніх свиней важливо мати інформацію про генетичні маркери якості м'яса та силу їх асоціації з ознаками продуктивності свиней саме цієї породи. Однак, є лише окремі повідомлення про результати дослідження асоціації гену *GHRH* з якістю м'яса свиней великої білої породи. Так, в роботі Pierzchala M., [17] показано, що *GHRH/AluI* поліморфізм асоційований з товщиною шпиків і виходом м'яса в тушах свиней польської великої білої породи (Polish Large White). Подібний результат отримано Eun Seok Cho et al.[9]. В роботі Piorowska K., et al.[18] виявлено зв'язок *GHRH/AluI* – поліморфізму з такими показниками якості м'яса свиней польської великої білої породи, як вологоутримуюча здатність та інтенсивність забарвлення, однак не знайдено зв'язок із вмістом внутрішнього жирового жиру.

Метою наших досліджень було провести аналіз *GHRH/AluI* поліморфізму гену в популяції свиней великої білої породи української селекції та встановити зв'язок гену рилізінг-фактора гормону росту з фізико-хімічними та хімічними показниками якості м'яса.

Матеріали і методи. Дослідження проведено на поголів'ї свиней великої білої породи української селекції, що відгодовувалося до середньої живої маси 109 кг в умовах племзаводу ДП «ДГ «Степне», Полтавського району, Полтавської області, на раціонах, що склалися з використанням кормів власного виробництва відповідно до існуючих норм годівлі. Дослідне поголів'я – 72 голови, характеризувалося приблизно рівним співвідношенням кабанчиків та свинок. Усі тварини були генотиповані по ріднодиректорному гену (*RYR1*), мутація с.1843 С>Т в якому є причиною генетичних вад м'яса у свиней [15]. Піддослідні свині мали генотип с.1843 СС, мутантний алель Т, був відсутній.

Після 48 годинного дозрівання туш свиней при температурі +2–4 °С в холодильній камері мініцеку господарства проводили відбір зразків м'язової тканини з найдовшого м'язу спини (*M. longissimus dorsi*) на рівні 10–12 грудних хребців для подальших генетичних та хімічних досліджень.

Фізико-хімічні показники якості м'язової тканини досліджувалися в умовах лабораторії зоотехнічного аналізу за методиками, описаними [5] та методичними рекомендаціями ВАСГНІЛ [4]. Активна кислотність (рН) визначалася за допомогою портативного рН-метра рН-150М (Білорусь); вологоутримуюча здатність – прес-методом; ніжність м'яса на приладі Уорнера-Братцлера в модифікації В. І. Максакова; інтенсивність забарвлення – методом екстракції, на фотометрі КФК-3

Дослідження хімічних показників м'яса проводили за загальноприйнятими методиками зоохімічного аналізу, описаними [6] та нормативними документами [1, 2, 3]. Для цього у м'ясі, висушеному до повітряно-сухого стану при температурі 60–65 °С, визначалися у процентному відношенні на 100 г м'яса: вміст загальної вологи – висушуванням при температурі 100–105 °С; «сирий» жир – екстрагуванням петролейним ефіром за методом Сокслета; «сира» зола – спалюванням у муфельній печі при температурі 525 °С; протеїн – розрахунковим методом; після мінералізації м'яса в наважці золи визначали вміст кальцію – трилонометричним методом та фосфору – колориметричним методом.

Генотипування за *GHRH* локусом виконували у відповідності до протоколу Baskin and Pomr [8] з використанням праймерів наступної структури:

F: GTAAGGATGC(C/T)(A/G)CTCTGGGT;

R: TGCCTGCTCATGATGTCCTGGA.

Геномну ДНК виділяли сорбентним методом з використанням набору “Diatom™ DNA Prep 100” kit (“Isogen”, Росія).

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводили в ампліфікаторі Терцик (ДНК-Технологія, Росія) в реакційній суміші, яка вміщувала по 10 pmol праймерів, 2.0 mM

MgCl₂, 2.5 mM кожного з dNTP та 1 одиницю Taq DNA полімерази (рекомбінантної) (Fermentas, Литва), кінцевий об'єм суміші 25 мл.

Для рестрикційного аналізу використовували ендонуклеазу *AluI* (Fermentas, Литва). ПЛР продукти та ДНК фрагменти після рестрикції розділяли у 4% агарозному гелі. Забарвлення ДНК в гелі проводили у розчині етидію броміду (0,5 мкг/мл).

Алелю А *GHRH* гена відповідали фрагменти рестрикції розміром 250 і 100 пар нуклеотидів (п.н.), алелю В – 230 і 100 п.н.

Популяційні параметри були розраховані з використанням комп'ютерних програм [16]. Обробку експериментальних даних для визначення асоціації генотипів з показниками якості м'яса проводили методом однофакторного дисперсійного аналізу з використанням табличного процесора Microsoft Office Excel 2007.

Результати досліджень. Поліморфізм генетичних маркерів є необхідною передумовою для встановлення їх зв'язку з певними продуктивними ознаками сільськогосподарських тварин. Нами проведено ДНК-типування дослідної групи свиней великої білої породи української селекції за геном *GHRH* (*GHRH/AluI* маркер), на основі чого визначені популяційні показники, що характеризують рівень його поліморфізму. В таблиці 1 подано частоти алелів і генотипів та рівні гетерозиготності гену.

В досліджуваній популяції свиней великої білої породи за геном *GHRH* виявлено обидва алелі, при цьому алель В зустрічався частіше, ніж А. В роботах Piorkowska K., et al.[18] та Franco et al., [14] для порід польська велика біла, ландрас та п'єтрен отримано подібний результат. Фактичний розподіл *GHRH* генотипів не відрізнявся від теоретично очікуваного, локус знаходився у стані рівноваги, відповідно до формули Гарді-Вайнберга, селекційний тиск на локус відсутній. Рівень гетерозиготності, як один з показників поліморфізму локусу, характеризувався середнім значенням.

1. Частоти алелів і генотипів та гетерозиготність локусу *GHRH* (*GHRH/AluI* маркер) в великій білій породі свиней української селекції

Генотипи	Кількість тварин	Частоти генотипів	Очікувані частоти генотипів	Частоти алелів		Ho	He	PIC
				А	В			
AA	5	0,07	0,08					
AB	29	0,40	0,39					
BB	38	0,53	0,53					
локус <i>GHRH</i>	72			0,27	0,73	0,40	0,39	0,317

Примітка: Ho – фактична гетерозиготність; He – очікувана гетерозиготність; PIC – поліморфний вміст локусу.

Визначено також поліморфний вміст локусу (PIC). Відомо, що PIC вищий за 0,5 характеризує локус як високополіморфний, 0,5-0,25 – локус з середнім рівнем поліморфізму (найбільш бажаний для проведення асоціативних досліджень), нижче за 0,25 – з низьким рівнем поліморфізму [10]. В досліджуваній мікропопуляції великої білої породи PIC локусу *GHRH* мав середнє значення (0,317), що дозволило зробити висновок про можливість проведення асоціативного аналізу.

Генотиповані за *GHRH* локусом, тварини дослідної групи були оцінені за 11 хімічними та фізико-хімічними показниками якості м'язової тканини, що найбільш повно характеризують органолептичні та технологічні властивості свинини. Для асоціативного аналізу було сформовано три групи тварин з різними генотипами і методом однофакторного дисперсійного аналізу визначено вплив генотипів на показники якості м'яса. Результати асоціативного аналізу подані в таблиці 2.

2. Вплив *GHRH* генотипів (*AluI*-поліморфний сайт) на окремі показники якості м'яса свиней великої білої породи української селекції.

Показник	Генотипи			D2	P BB/AA BB/AB AB/AA
	BB	AB	AA		
Вологість,%	1.47 (0.251)	1.53 (0.342)	1.42 (0.259)	1.54	0.671 0.413 0.520
Загальна вода,%	75.89 (2.667)	75.78 (1.568)	74.95 (1.066)	1.22	0.442 0.839 0.270
Вміст білку, g/100g	21.80 (2.106)	21.67 (1.529)	22.69 (1.291)	5.86	0.106 0.224 0.173
Сухий залишок, g/100g	25.58 (2.696)	25.76 (1.467)	26.47 (1.018)	1.10	0.477 0.761 0.313
Зола, g/100g	1.09 (0.123)	1.13 (0.087)	1.13 (0.073)	3.48	0.535 0.149 0.904
Жир, g/100g	1.93 (1.040)	1.43 (0.653)	1.24 (0.615)	9.11	0.153 0.029 0.550
Волого-утримуюча здатність,%	55.97 (2.086)	56.73 (3.896)	56.24 (2.106)	1.72	0.452 0.551 0.321
Кальцій, g/100g	0.043 (0.008)	0.046 (0.009)	0.050 (0.009)	6.90	0.064 0.105 0.415
Фосфор, g/100g	0.178 (0.050)	0.190 (0.044)	0.222 (0.050)	6.03	0.071 0.299 0.157
pH м'яса (48 годин)	5.50 (0.193)	5.54 (0.301)	5.71 (0.475)	4.71	0.068 0.575 0.287
Ніжність м'яса	7.33 (1.700)	4.96 (1.557)	6.50 (0.396)	34.00	0.345 0.001 0.067

Примітка: У дужках – стандартне квадратичне відхилення, *S*;
 η^2 – сила впливу генотипу на показник якості м'яса;
p – рівень значимості різниці показників між групами з різними генотипами, за Стьюдентом,

Встановлено, що м'ясо тварин з гомозиготним генотипом BB характеризується більш високим показником ніжності у порівнянні з тваринами, що мають гетерозиготний генотип, рівень значимості склав $p \leq 0,001$, Також спостерігається тенденція до більш високих значень показника ніжності м'яса у свиней з генотипом AA у порівнянні з гетерозиготними особинами AB, Отже, можна зробити припущення про певну

адитивну взаємодію алелів гену *GHRH*, в наслідок чого гетерозиготні тварини мають більш низькі показники ніжності м'яса у порівнянні з гомозиготними.

Виявлено зв'язок *GHRH* генотипів із вмістом внутрішньом'язового жиру ($p \leq 0,05$), що є одним з базових показників при оцінці пісної свинини. В м'язовій тканині свиней з генотипом ВВ вміст жиру був на 0,69% та 0,50% вищий, ніж у свиней з генотипом АВ та АА, відповідно. Очевидно, можна вести мову про асоціацію алелю В *GHRH* гену (*AluI*-поліморфізм) з більш високим вмістом жиру в м'ясі свиней,

Висновки. Виявлено асоціацію гену *GHRH* (рилізинг-фактора гормону росту) з показниками, які характеризують консистенцію м'яса та його смакові властивості. Отримана молекулярна інформація щодо зв'язку генотипів *GHRH* гену (*AluI*-поліморфізм) з вмістом внутрішньом'язового жиру та ніжністю м'яса може бути використана в маркер-супровідній селекції на покращення якості м'яса свиней великої білої породи української селекції.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. ГОСТ 9793-74 «Мясные продукты. Методы определения содержания влаги».
2. ГОСТ 23042-86 «Мясо и мясные продукты. Методы определения жира».
3. ГОСТ 9794-74 «Продукты мясные. Методы определения общего фосфора».
4. Методические рекомендации по оценке мясной продуктивности, качества мяса и подкожного жира свиней. – М.: 1987, Протокол ОЖ ВАСХНИЛ №10 от 26.09.1987.
5. Поливода А. М. Методика оценки качества продуктов убоя у свиней / А. М. Поливода, Р. В. Стробыкина, М. Д. Любецкий // Методики исследований по свиноводству. – Харьков, 1977. – С. 48–56.
6. Попов А. В. Основы биологической химии и зоотехнического анализа / Попов А. В., Ковындиков М. С., Сенник С. Я. – М.: Колос, 1973. – 302 с.
7. Balatsky V.N., Pochernyaev K.F., Buslyk T.V., Dykan O.S., Korinnyi S.N., Pena R. N., Doran O. Sequence variation in the cathepsin B (CTSB), L (CTSL), S (CTSS) and K (CTSK) genes in Ukrainian pig breeds // Global J. Anim. Breed. Genet. – 2015. – 3 (3).- pp. 117-124.
8. Baskin LC& Pomp D. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the porcine growth hormone-releasing hormone gene // Journal of Animal Science.- 1997.- 75.- p. 2285.
9. Eun Seok Cho, Da Hye Park, Byeong-Woo Kim, Won Youg Jung, Eun Jung Kwon & Chul Wook Kim. Association of *GHRH*, *H-FABP* and *MYOG* Polymorphisms with Economic Traits in Pigs // Asian-Australian Journal Animal Science.- 2009.- 3.- p. 307-312.
10. Hao LL, Yu H, Zhang Y, Sun SC, Liu SC, Zeng YZ, Ali YX, Jiang HZ. Single nucleotide polymorphism analysis of exons 3 and 4 of *IGF-1* gene in pigs // Genet. Mol. Res. – 2011.- 10. – p.1689-1695.
11. FAO. 2007. The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture – in brief, edited by Dafydd Pilling & Barbara Rischkowsky. Rome.
12. Fisher P., Mellett F.D., Hoffman L.C Halothane genotype and pork quality. 1. Carcass and meat quality characteristics of three halothane genotypes // Meat Science.- 2000.- 54.- p. 97-105.
13. Fontanesi L., Speroni C., Buttazzoni L., Scotti E., Dall'Olio S., Davoli R. & Russo V. Association between polymorphisms in Cathepsin and cystatin genes with meat production and carcass traits in Italian Duroc pigs: confirmation of the effects of a Cathepsin L (CTSL) gene marker // Molecular Biology Report, 2012.-39(1). – p. 109-115.
14. Franco M.M., Antunes R.C., Silva H.D. & Goulart L.R. Association of *PIT1*, *GH* and *GHRH* polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. Journal of Applied Genetics// 2005. – 46(2) – p.195-200.
15. Fujii J., Otsu K., Zorzato F., DeLeon S., Khanna V.K., Weiler J.E., O'Brien P.J., MacLennan D.H. Identification of mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia // Science.-1991.- 253.- p. 448-451.

16. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. – 2006.- 6.- p. 288-295.

17. Pierzchala M., Blicharski T. & Kuryl J. Growth rate and carcass quality in pigs as related to genotype at loci *POUIF1/RsaI* (*Pit1/RsaI*) and *GHRH/AluI* // *Animal Science Papers and Report*.- 2003.-21 (3).- p. 159-166.

18. Piorkowska K., Ropka-Molik K., Oczkowicz M., Rozycki M., Zukowski K. Association study of *PIT1* and *GHRH* SNPs with economically important traits in pigs of three breeds reared in Poland. *Animal Science Papers and Reports*. – 2013.- 31(4) – p. 303-314.

19. Russo V., Davoli R., Nanni Costa L., Fontanesi L., Baiocco C., Buttazzoni L., Galli S., Virgili R. Association of the *CTSB*, *CTSF* and *CSTB* genes with growth, carcass and meat quality traits in heavy pigs // *Italian Journal Animal Science*.- 2003.- 2(Suppl.1)- p. 67-69.

20. Russo V., Fontanesi L., Scotti E., Beretti F., Davoli R., Nanni Costa L., Virgili R. and Buttazzoni L. Single nucleotide polymorphisms in several porcine cathepsin genes are associated with growth, carcass, and production traits in Italian Large White pigs // *Journal Animal Science*. – 2008.- 86.- p. 3300-3314.

Балацкий В.Н., Коринный С.Н., Баньковская И. Б., Гиболенко Е.С. Ассоциация гена рилизинг-фактора гормона роста с качеством мяса свиней крупной белой породы украинской селекции.

Проведен поиск ассоциации гена GHRH (рилизинг-фактора гормона роста) с показателями качества мяса свиней крупной белой породы украинской селекции. Установлено, что мясо свиней с генотипом BB характеризуется более высокими показателями нежности в сравнении с гетерозиготными животными, в то же время содержание жира в нём было на 0,69 % и 0,50 % выше, чем в мышечной ткани особей с генотипом AB и AA, соответственно. Полученная молекулярная информация о связи GHRH генотипов (AluI-полиморфизм) с содержанием внутримышечного жира и нежностью мяса может быть использована в маркер-сопроводительной селекции на улучшение качества мяса.

Ключевые слова: качество мяса, ген рилизинг-фактора гормона роста (GHRH), крупная белая порода свиней.

Balatsky V.M., Korinnyi S.M., Bankovska I.B., Gibolenko O.S. Association of releasing factor of growth hormone gene with meat quality of Large White breed pigs of the Ukrainian selection.

A search of the association of the GHRH (growth hormone releasing hormone) gene with meat quality of Large White breed pigs of Ukrainian selection was carried. It is found that the meat of pigs with BB genotype is characterized by a higher index of the tenderness in comparison with the heterozygous animals, while the fat content in it was higher on 0.69% and 0.50% than in the muscle tissue of individuals with the genotype AB and AA, respectively. The molecular information about the connection of GHRH genotypes (AluI-polymorphism) with the content of intramuscular fat and meat tenderness can be used in marker-assisted selection to improve meat quality.

Keywords: meat quality, GHRH (growth hormone releasing hormone) gene, Large White breed of pigs.