

ВПЛИВ СТРЕСЧУТЛИВОСТІ СВИНЕЙ ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ДНК-ТЕСТІВ НА ЯКІСТЬ М'ЯСА

Н. О. Офіленко, кандидат сільськогосподарських наук, доцент;

А. П. Кайнаш, кандидат технічних наук, доцент

(Вищий навчальний заклад Укоопспілки

«Полтавський університет економіки і торгівлі»)

Анотація. Предметом даного дослідження є вивчення стресчутливості свиней великої білої та полтавської м'ясної порід. **Метою** дослідження було вивчення впливу стресчутливості на якість м'яса свиней за допомогою ДНК-тестів. **Методика дослідження.** Стресчутливість свиней визначали за допомогою виявлення мутантного алеля галотанового гена *RYR1*, який виділяли із ДНК крові. **Результати.** Було встановлено, що у стресчутливих свиней у відповідь на несприятливі умови підвищується ригідність м'язів, виникає задуха, шкірна гіперемія, гіпертермія, виражене пригнічення. Свині, які були звільнені від мутантного гена, що визначає стресчутливість, мали кращі показники якості м'яса за такими ознаками, як рН, інтенсивність забарвлення, ніжність, втрати під час кулінарної обробки, але показник «вологоутримуюча здатність» був дещо гірший. **Висновки.** Тобто, можна зробити висновок, що свині полтавської м'ясної породи мали кращі показники якості м'яса, тому що були вільні від мутантного алеля галотанового гена *RYR1*, що відповідає за стресчутливість свиней.

Ключові слова: стресчутливість, якість, порода, ДНК, ген, аплікація фрагментів, праймери, специфічні маркери, рН м'яса, інтенсивність забарвлення.

Постановка проблеми в загальному вигляді та зв'язок із найважливішими науковими чи практичними завданнями. Під час промислового виробництва м'яса свинини частина тварин не може пристосуватися до технологічних процесів, що призведе до збільшення захворюваності та зниження якості товарної свинини. Знання адаптаційних можливостей організму, механізму їх реакцій і способів їх активізації має велике значення для ефективного використання свиней. Практичну цікавість представляє визначення стресчутливості тварин.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Уперше в наукову літературу поняття «стрес» увів канадський учений Г. Сельє [1], який визначив його як стан тварини, що складається з усіх неспецифічних змін у біологічній системі.

Специфічний характер визначається наявністю сукупності постійних симптомів, найважливішими серед яких є збільшення коркового шару надниркових залоз із зменшенням у

них ліпідів і холестерину й виникненням язв шлунково-кишкового тракту. Неспецифічне ж його походження визначається тим, що він виникає під час дії факторів зовнішнього середовища та ділиться на три стадії: тривога, резистентність і виснаження.

Було встановлено, що під час відлучання поросят від свиноматки, перехід на інший корм, транспортування, переведення тварин в інше приміщення тощо є стрес-факторами [2–4].

У разі стресових навантажень різко знижується приріст живої маси, збільшується використання кормів і т. д. [5–8].

У стресчутливих свиней у відповідь на несприятливі впливи підвищується ригідність м'язів, виникає задуха, очагова шкірна гіперемія, гіпертермія, виражене пригнічення. Це явище посиленої чутливості до стресів отримало назву «стресовий синдром» (PSS).

Поряд із вищевказаними втратами, PSS синдром також обумовлює значне погіршення якості м'яса. М'ясо тварин, що підлягали стрес-

сам, стає недоброякісним, блідим, м'яким, ексудативним (синдром PSE) і темним, щільним, сухим (синдром DFD) [5–8].

На початку 90-х рр. XX ст. було запропоновано декілька тестів для встановлення генотипів із стресчутливості, у тому числі і ДНК-тест [9], який відрізнявся від інших високою точністю, надійністю і вірогідністю. Крім того, ДНК-тест легко визначає носіїв «стресової» мутації і може використовуватись для відбракування стресчутливих тварин у відношенні алелей RYR1-гена.

Доказано, що шкідливий вплив мутантного алеля галотанового гена на якість м'яса у свиней залежить від їх породної залежності. За результатами проведених експериментів зазначено, що тварини nn і Nn генотипів порід гемпшир і йоркшир помітно поступаються нормальним гомозиготам NN за показниками вологоутримуючої здатності, забарвлення, морфологічної структури м'яса, тоді як у порід дюрок, ландрас вірогідно значної різниці за цими якісними параметрами не виявлялось [7]. У зв'язку з цим, за наявності технологічних складностей і високої собівартості утримання гомозиготних ліній стресчутливих тварин, призначених для отримання гетерозиготних комерційних свиней, канадські дослідники [2] вважають економічно доцільним видалення мутантного RYR1 алеля із стад, що селекціонуються.

Формування цілей статті (постановка завдання). Завданням дослідження було вивчення впливу стресчутливості на якість м'яса свиней.

Виклад основного матеріалу дослідження з повним обґрунтуванням отриманих наукових результатів. Вивчення впливу стресчутливості на якість м'яса свиней проводилось в умовах товарного репродуктора в Полтавській області та Інституті свинарства АПВ НААН України.

Виділення ДНК проводили із клітин крові за допомогою реагенту «Chelex-100».

Під час застосування цього методу до 300 мкл крові додавали 1 000 мкл стерильної дистильованої води та перемішували струшуванням. Цю суміш інкубували 15–30 хв за кімнатної температури, періодично перемішуючи струшуванням. Центрифугували 1 хв при 8 000 об/хв. Обережно видаляли надосадкову рідину, залишивши 20–30 мкл рідини над осадком. Додавали 170–180 мкл 5 %-го стерильного водяного розчину Chelex-100 та інкубували 15–30 хв за температури 56 °С. Ретельно перемішували струшуванням та витримували 8 хв на водяній бані за температури 100 °С. Знову ретельно перемішували струшуванням, після чого центрифугували 5 хв при 8 000 об/хв. Зберігали зразки за температури мінус 20 °С. Для ампліфікації використовували 5 мкл надосадкової рідини, після кожного розморожування зразки перемішували та центрифугували 5 хв при 8 000 об/хв.

Цей метод, завдяки своїй простоті та доступності, дозволив значно скоротити термін проведення тестування тварин.

У пробірку із ДНК додавали розчин для ПЛР (тест-набір). Реакцію аплікації фрагментів генів RYR-1, GH здійснювали з використанням праймерів, що наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Структура праймерів для ПЛР-ампліфікації ДНК свині

Локус	Послідовність з 5' кінця
RYR1-F	GTGCTGGATGTCCTGTGTTCCCT
R	CTGGTGACATAGTTGATGAGGTTTG
gGH F	ACCGGCTGTGATGGCTGCAGGCAA
R	AGGTACTCCATCCAGAACGCCAG

Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводили в 6 %-му, 10 %-му поліакриламідному гелях у тріс-боратному електрофорежному буфері (ТБЕ: 0,0879 М Тріс, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА рН 8,0), згідно з методичними рекомендаціями.

Для нанесення зразків на гель використовували буфер такого складу: 0,25 %-й бромфенольний синій, 0,25 %-й ксилолціанол, 30 %-й гліцерин. Електрофорез проводили 1 год за напруги 2 Вольт/см гелю. Фарбування гелів проводилось за допомогою бромистого етидія

10 хв із наступним багаторазовим відмиванням у дистильованій воді. Візуалізацію фрагментів ДНК проводили в УФ світлі та фотографували.

Розміри отриманих в ПЛР, або в результаті рестрикції продуктів виявляли за допомогою специфічних маркерів (ДНК фага λ , що оброблена ферментом рестрикції pSTI) на електрофореграмах.

Нами було тестовано 60 голів свиней у віці 6 місяців за допомогою молекулярно-генетичного тесту. За допомогою цього тесту були отримані популяційно-генетичні характеристики щодо розповсюдження мутантного алеля RYR1 гена.

Результати досліджень наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Розподіл RYR-1 алелів і генотипів у свиней

Порода	Кількість тварин	Частота алелів		Частота генотипів		
		RYR-1C	RYR-1T	RYR-1 C/C	RYR-1 C/T	RYR-1 T/T
Велика біла	30	0,946	0,054	0,902	0,078	0,020
Полтавська м'ясна	30	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000

Установлено, що свині полтавської м'ясної породи вільні від мутантного алеля RYR1 гена. Суттєва концентрація рецесивного алеля RYR1-гена відмічена у свиней великої білої породи, де частота нормального (RYR1-C) і мутантного алеля (RYR1-T) становили відповідно: 0,946 і 0,054, частоти генотипів розподілились так: RYR1C/C – 0,902; RYR1 C/T – 0,078 і RYR1 T/T – 0,020.

Після досягнення живої маси цих свиней у 100 кг їх забили для визначення якості м'яса за такими показниками, як активна кислотність, інтенсивність фарбування, ніжність, волого-

утримуюча властивість та втрати під час кулінарної обробки.

Базовим показником під час оцінки якості м'яса вважається активна кислотність (pH). Її рівень відображає інтенсивність протікання процесу автолізу в туші й тісно пов'язаний із формуванням смакових і технологічних властивостей м'яса. Одержані результати досліджень активної кислотності м'язової тканин піддослідних свиней засвідчили, що загалом порушень процесу дозрівання туш після забою не спостерігалось (табл. 3). Показник рН м'яса свиней знаходився в межах норми.

Таблиця 3

Фізико-хімічні показники якості м'яса свиней
Великої білої і Полтавської м'ясної порід

Порода	pH	Інтенсивність забарвлення, од. екст. $\times 1\,000$	Ніжність, с	Втрати під час кулінарної обробки, %	Вологоутримуючі властивості, %
Велика біла	5,60 $\pm$ 0,09	78,67 $\pm$ 4,32	8,91 $\pm$ 0,45	22,99 $\pm$ 1,15	57,26 $\pm$ 0,08
Полтавська м'ясна	5,32 $\pm$ 0,36	74,63 $\pm$ 4,25	7,73 $\pm$ 0,66	20,21 $\pm$ 0,87	52,31 $\pm$ 1,01

Інтенсивність забарвлення або колір м'яса має важливе значення для формування його зовнішнього вигляду та ряду технологічних якостей. Порівняно кращий показник мали підсвинки другої групи. Темнішим виявилось м'ясо свиней великої білої породи (78,67 од. екст. $\times 1\,000$).

За показником ніжності м'язової тканини

ніжніше м'ясо було в молодняка другої групи — 7,73 с.

Важливим якісним фактором кулінарних властивостей свинини є її здатність утримувати достатню кількість вологи. Результати аналізу вологості не виявили великої різниці між групами, тому що вона знаходилася в межах норми.

Висновки із зазначених проблем та перспективи подальших досліджень у поданому напрямку. Було встановлено, що свині полтавської м'ясної породи, які були звільнені від мутантного гена, що визначає стресчутливість, мали кращі показники якості м'яса за такими показниками, як рН, інтенсивність забарвлення, ніжність, втрати під час кулінарної обробки, але вологоутримуючі властивості були дещо нижчі, ніж у паралельній групі (велика біла порода). Представляє цікавість у подальшому вивченні впливу мутантного алеля галотанового гена RYR1, що відповідає за стресчутливість, на репродуктивні властивості свиней.

ЛІТЕРАТУРА

1. Selye H. A. Syndrome produced by diverse nocuous agents. – Nature. – 1936. – Vol. 138. – № 3478. – P. 32.
2. Устинов Д. А. Ухудшение качества мяса при стрессе / Д. А. Устинов // Стресс-факторы в промышленном животноводстве. – Москва : Россельхозиздат, 2005. – С. 125–127.
3. Балацкий В. Генная диагностика гипертермического синдрома в популяциях свиней разных генотипов / В. Балацкий, Е. Метлицкая, А. Биндюг // Свиноводство. – 2000. – № 6. – С. 8–10.
4. Биндюг О. А. До оцінки методів визначення стрессхильності у свиней / О. А. Биндюг // Вісник Полтавської аграрної академії. – 2002. – № 5–6. – С. 20–21.
5. Биндюг О. А. Фізіологічний стан та продуктивність свиней різного рівня стрессхильності : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. с.-г. наук спец. 06.02.01 / О. А. Биндюг. – Полтава, 2004. – 23 с.
6. Poltarsky J., Bulla J. Vykrmova schoprost osiperych v zavislosti od reakcie na halothan. //Polnohospodarstvo. – 1985. – В. 31. – № 7. – S. 621 – 627.

7. Карнаускас А. К. Реакция чистопородных и помесных свиней на технологические стрессы : автореф. дис. на соискание канд. с.-х. наук. –Тарту, 1987. – 25 с.
8. Розведення свиней : навч. посіб. / Нагаєвич В. М., Герасимов В. І., Березовський М. Д., та ін.; за ред. Нагаєвича В. М., Герасимова В. І. – Харків : Еспада, 2005. – 296 с.
9. Fujii J., Otsu K., Zorzato F., DeLeon S., Khanna V., Weiler J., O'Brien P., MacLennan D. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia //Science. – 1991. – Vol. 253. – P. 448 – 451.

REFERENCES

1. Selye, H. A. Syndrome produced by diverse nocuous agents. – Nature. – 1936. – Vol. 138. – № 3478. – S. 32.
2. Ustinov, D. A. Uхудshenie kachestva mjasa pri stresse. //Stress-factory v promyshlennom zhivotnovodstve. – M. : Rossel'hoizdat, 2005. – S. 125–127.
3. Balatskiy, V. Gennaya diagnostika gipertermicheskogo sindroma v populyatsiyah sviney raznyih genotipov / V. Balatskiy, E. Metlitskaya, A. Bindyug// Svinovodstvo. – 2000. – № 6. – S. 8–10.
4. Bindyug, O. A. Do otsinki metodiv viznachennya stres shilnosti u sviney / O. A. Bindyug // Visnik PoltavskoYi agrarnoYi akademiyi. – 2002. – № 5–6. – S. 20–21.
5. Bindyug, O. A. Fiziologichniy stan ta produktivnist sviney riznogo rivnya stresshilnosti: aftoreferat disertatsiyi na zdobuttya naukovo-go stupenya kandidata silskogospodarskih nauk za spetsialnistyu / O. A. Bindyug. – Poltava, 2004. – 23 s.
6. Poltarsky, J., Bulla, J. Vykrmova schoprost osiperych v zavislosti od reakcie na halothan.

- // Polnohospodarstvo. – 1985. – В. 31. – № 7. – С. 621–627.
7. Karnauskas, A. K. Reakcija chistoporodnyh i pomeshnyh sviney na tehnologicheskie stressy : avtoref. dis. na soiskanie kandidata s.-h. nauk. – Tartu, 1987. – 25 s.
 8. Rozvedennya sviney: Navch. posibn. / Nagavich, V. M., Gerasimov, V. I., Berezovskiy, M. D. ta inshi; za red. Nagatvicha V. M., Gerasimova V. I. – H. : Espada, 2005. – 296 s.
 9. Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., DeLeon, S., Khanna, V., Weiler, J., O'Brien, P., MacLennan, D. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia // Science. – 1991. – Vol. 253. – S. 448–451.

Н. А. Офіленко, кандидат сільськогосподарських наук, доцент; **А. П. Кайнаш**, кандидат технічних наук, доцент (Вище навчальне закладення Укоопсоюзу «Полтавський університет економіки і торгівлі»). **Влияние стрессоустойчивости свиней с использованием ДНК-тестов на качество мяса.**

Аннотация. Предметом данного исследования есть изучение стрессоустойчивости свиней Большой белой и Полтавской мясной пород. **Целью** исследования было изучение влияния стрессоустойчивости на качество мяса свиней с помощью ДНК-тестов. **Методы исследования.** Стрессоустойчивость свиней определяли с помощью выявления мутантного алеля галотанового гена RYR1, который выделяли с ДНК крови. **Результаты.** Было установлено, что у стрессоустойчивых свиней в ответ на неблагоприятные условия повышается ригидность мышц, вызывается удушье, кожная гиперемия, гипертермия, выраженное угнетение. Свиньи, которые были освобождены от мутантного гена, который определяет стрессочувствительность, имели лучшие показатели качества мяса по таким признакам как pH, интенсивность окрашивания, нежность, потери при кулинарной обработке, но показатель «влагоудерживающая способность» был немного хуже. **Выводы.** Можно сделать вывод, что свиньи Полтавской мясной породы имели лучшие показатели качества мяса, потому что были свободны от мутантного алеля галотанового гена RYR1, который отвечает за стрессоустойчивость свиней.

Ключевые слова: стрессоустойчивость, качество, порода, ДНК, ген, аппликация ферментов, праймеры, специфические маркеры, pH мяса, интенсивность окрашивания.

N. Ofilenko, Candidate of Agriculture Sciences, Associate Professor; **A. Kainash**, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor (Poltava University of Economics and Trade). **Influence stress sensitivity pigs the using DNA test for quality meat.**

Purpose. The present study is pigs stress sensitivity the Large White and Poltava meat breeds. The aim of the study was to study the effect stress sensitivity quality pork using DNA - tests. Stress sensitivity pigs was determined by identifying mutant RYR1 allele halothane gene, which was isolated from the blood DNA. **Methods.** Study of stress sensitivity the quality of pork was conducted in terms of commodity loudspeakers in Poltava region and pig APV Institute of NAAS of Ukraine. DNA isolation was performed using blood cell reagent "Chelex – 100". **Results.** It was found that in stress sensitivity pigs in response to the unfavorable conditions of increased muscle stiffness, caused by suffocation, skin flushing, pyrexia, expressed oppression. Pigs that have been exempted from the mutant gene that determines stress sensitivity had better meat quality parameters for such features as pH, color intensity, tenderness, loss during cooking, but the figure of "water retention capacity" was a little bit worse. **Conclusions.** Thus, one can conclude that pigs Poltava meaty breed had better quality meat because they were free of the mutant allele halothane RYR1 gene that is responsible for stress sensitivity pigs.

Keywords: stress sensitivity, quality, breed, DNA, gene, application of enzymes, primers specific markers, meat pH, the intensity of staining.

Надійшло 07.07.2016

Надійшло в переробленому вигляді 15.08.2016

Прийнято 10.09.2016