**УДК [636.4:612.176] : 636. 082. 22**

**ВПЛИВ СТРЕСЧУТЛИВОСТІ СВИНЕЙ З ВИКОРИСТАННЯ ДНК - ТЕСТІВ НА ЯКІСТЬ М’ЯСА**

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССУСТОЙЧИВОСТИ СВИНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДНК-ТЕСТОВ НА КАЧЕСТВО МЯСА**

**INFLUENCE STRES** **SENSITIVITY PIGS THE USING DNA TEST FOR QUALITY MEAT**

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

**А.П. Кайнаш,** кандидат технічних наук, доцент

(Вищий навчальний заклад Укоопспілки «Полтавський університет економіки і торгівлі»)

**Н.А. Офиленко, А.П. Кайнаш**

**N.A. Ofilenko, A.P. Kaіnash**

**Анотація.** Проведено вивчення впливу стресчутливості на якість м’яса свиней Великої білої та Полтавської м’ясної порід. Стресчутливість свиней визначали за допомогою виявлення мутантного алеля галотанового гена RYR1, який виділяли із ДНК крові. 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 струсчутливість, мали кращі показники якості м’яса за такими ознаками як рН, інтенсивність забарвлення, ніжність, втрати при кулінарній обробці, але показник «вологоутримуючі властивості» був дещо гірший.

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

**Аннотация.** Проведено изучение влияния стрессустойчивости на качество мяса свиней Большой белой и Полтавской мясной пород. Стрессустойчивость свиней определяли с помощью выявления мутантного алеля галотанового гена RYR1, который выделяли с ДНК крови. Было установлено, что в стрессустойчивых свиней в ответ на неблагоприятный условия повышается ригидность мышц, вызывается удушье, кожная гиперемия, гипертермия, выраженное угнетение. Свиньи, которые были освобождены от мутантного гена, который определяет стрессчуствительность, имели лучшие показатели качества мяса за такими признаками как рН, интенсивность окрашивания, нежность, потери при кулинарной обработке, но показатель «влагоудерживающей способность» был немного хуже.

***Ключевые слова:*** стрессустойчивость, качество, порода, ДНК, ген, аппликация ферментов, праймеры, специфические маркеры, рН мяса, интенсивность окрашивания.

***Summary.*** The study of the influence of stress sensitivity meat quality of pigs Large White and Poltava meat breeds. Stress sensitivity pigs was determined by identifying mutant RYR1 allele halothane gene, which was isolated from the blood DNA. 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». 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.

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

**Постановка проблеми в загальному вигляді.** Під час промислового виробництва м’яса свинини частина тварин не може пристосуватися до технологічних процесів, що призводе до збільшенню захворюваності та зниженню 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.** Вперше в наукову літературу поняття «Стрес» ввів канадський вчений Г. Сельє [1], що визначив його як стан тварини, що складається з усіх неспецифічних змін в біологічній системі.

Специфічний характер визначається наявністю сукупності постійних симптомів, найважливішими серед яких є: збільшення коркового шару надниркових залоз із зменшенням в них ліпідів і холестерину і виникненням язв шлунково-кишкового тракту. Неспецифічне ж його походження визначається тим, що він виникає при дії факторів зовнішнього середовища і ділиться на три стадії: тривога, резистентність і виснаження.

Встановлено, що під час відлучання поросят від свиноматки, перехід на інший корм, транспортування, переведення тварин в інше приміщення та ін. – є стрес – фактором [2-4].

При стресових навантаженнях різко знижується приріст живої маси, збільшується використання кормів і т.д. [5-7].

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 (РSS).

Поряд із вказаними вище втратами, РSS – синдром також обумовлює значне погіршення якості м’яса. М’ясо тварин, що підлягали стресам, стає недоброякісним, блідим, м’яким, ексудативним (синдром РSЕ) і темним, щільним, сухим (синдром DFD) [5 - 7].

На початку 90-х років було запропоновано декілька тестів для встановлення генотипів із стресчутливості, в 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]. В 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**. Вивчення впливу стресчутливості на якість м’яса свиней проводилась в умовах товарного репродуктору в Полтавській області та Інституті свинарства АПВ НААН України.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** Виділення ДНК проводили із клітин крові за допомогою реагенту “Chelex – 100”.

При застосуванні цього метода до 300 мкл крові додавали 1000 мкл стерильної дистильованої води та перемішували струшуванням. Цю суміш інкубували 15-30 хв. при кімнатній температурі, періодично перемішуючи струшуванням. Центрифугували 1 хв. при 8000 об/хв. Обережно видаляли надосадкову рідину залишивши 20-30 мкл рідини над осадком. Додавали 170-180 мкл 5% стерильного водяного розчину Chelex-100 та інкубували 15-30 хв. при 56 °С. Ретельно перемішували струшуванням та витримували 8 хв. на водяній бані при 100 °С. Знову ретельно перемішували струшуванням, після чого центрифугували 5 хв. при 8000 об/хв. Зберігали зразки при -20°С. Для ампліфікації використовували 5 мкл надосадкової рідини, після кожного розморожування зразки перемішували та центрифугували 5 хв. при 8000 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 таблиці 1.

*Таблиця 1*

Структура праймерів для ПЛР-ампліфікації ДНК свині

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

Електрофоретичне розділення фрагментів ДНК проводили в 6%, 10% поліакріламідному гелях у тріс-боратному електрофорезному буфері (ТВЕ: 0,0879 М Тріс, 0,089 М борна кислота, 0,002 М ЕДТА рН 8,0), згідно методичних рекомендацій.

Для нанесення зразків на гель використовували буфер такого складу: 0,25% бромфенольний синій, 0.25% ксилолціанол, 30% гліцерин. Електрофорез проводили1 годину при напрузі 2 Вольт/см гелю. Фарбування гелів проводилась 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 таблиці 2.

*Таблиця 2*

**Розподіл RYR - 1 алелів і генотипів в свиней**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| №п/п | Порода | Кількість тварин | Частота алелів | Частота генотипів |
| RYR–1C | RYR-1T | RYR-1C/C | RYR-1C/T | RYR-1Т/Т |
| 1 | Велика біла | 30 | 0,946 | 0,054 | 0,902 | 0,078 | 0,020 |
| 2 | Полтавська м’ясна  | 30 | 1,000 | 0,000 | 1,000 | 0,000 | 0,000 |

Нами було встановлено, 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‑С) і мутантного алеля (RYR1‑Т) склали відповідно: 0,946 і 0,054, частоти генотипів розподілились таким чином: RYR1С/С – 0,902; RYR1 С/Т – 0,078 і RYR1 Т/Т – 0,020.

Після досягнення живої маси цих свиней 100 кг їх забили для визначення якості м’яса за такими показниками як активна кислотність, інтенсивність фарбування, ніжність, волого утримуюча властивість та втрати при кулінарному обробітку.

Базовим показником при оцінці якості м’яса вважається активна кислотність (рН). Її рівень відображає інтенсивність протікання процесу автолізу в туші і тісно пов’язаний з формуванням смакових і технологічних властивостей м’яса. Одержані результати досліджень активної кислотності м’язової тканин піддослідних свиней засвідчили, що в цілому порушень процесу дозрівання туш після забою не спостерігалося (табл. 3). Показники рН м’яса свиней знаходився в межах норми.

*Таблиця 3*

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

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №з/п | Поєднання | рН | Інтенсивність забарвлення, од. екст.×1000 | Ніжність, с | Втрати при кулінарній обробці, % | Вологоутримуючі властивості, % |
| 1 | Велика біла | 5,60 ± 0,09 | 78,67 ± 4,32 | 8,91± 0,45 | 22,99± 1,15 | 57,26± 0,08 |
| 2 | Полтавська м’ясна  | 5,32 ±0,36 | 74,63 ± 4,25 | 7,73± 0,66 | 20,21± 0,87 | 52,31± 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 2 групи. Темнішим виявилося м’ясо свиней великої білої породи (78,67 од. екст. × 1000).

За показником ніжності м’язової тканини ніжніше м’ясо було у молодняка 2  групи — 7,73 с.

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

**Висновки.** Було встановлено, що свині, які були звільнені від мутантного гена, що визначає струсчутливість, мали кращі показники якості м’яса за такими показниками як рН, інтенсивність забарвлення, ніжність, втрати при кулінарній обробці, але вологоутримуючі властивості були дещо нижчі ніж у паралельній групі.

**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. //Стресс-факторы в промышленном животноводстве. – М.: Россельхоиздат,1976. – С. 125 – 127.

Ustinov D.A. Uhudshenie kachestva mjasa pri stresse. //Stress-faktory v promyshlennom zhivotnovodstve. – M.: Rossel'hoizdat,1976. – S. 125 – 127.

1. Sellier P. La consibilite a l/ halothane: ese liaisons aves les perfornacos. //Elevage. Porcin. – 1980. - №91. – P. 16 – 18.
2. Meller Z. Spoloby notposnawania i wykruwania wrazliwoski swin na stress. //Megycyna Veterynaryina. – 1978. – R. 34. - №1. – S. 5 – 7.
3. Willeke H., Amler K., Fischer K. Der Einfluss des Halothanstatus der Sau auf deren Wurfgrosse. //Zuchtungskunde. – 1984. – v. 56. - №1. – P. 20 – 26.
4. Poltarsky J., Bulla J. Vykrmova schoprost osiperych v zavislosti od reakcie na halothan. //Pol/nohospodarstvo. – 1985. – B. 31. - №7. – s. 621 – 627.
5. Карнаускас А.К. Реакция чистопородных и помесных свиней на технологические стрессы: Автореф. дис. на соискание кандидата с.-х. наук. –Тарту, 1987. – 25 с.

Karnauskas A.K. Reakcija chistoporodnyh i pomesnyh svinej na tehnologicheskie stressy: Avtoref. dis. na soiskanie kandidata s.-h. nauk. –Tartu, 1987. – 25 s.

1. Webb A. Role of halothane test in pig improvement. //Pig News inform. – 1981. – v. 2. - №1. – P. 17 – 18.
2. 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. //Sciense. – 1991. – Vol. 253. – P. 448 – 451.