

ОЦЕНКА ВЗАИМОСВЯЗИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CAPN1 С РОСТОВЫМИ ХАРАКТЕРИСТИКАМИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

^{1,2}Косян Д.Б., ²Русакова Е.А., ²Кван О.В.

¹ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт мясного скотоводства», Оренбург, e-mail: vniims.or@mail.ru;

²ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет», Оренбург, e-mail: kosyan.diana@mail.ru

Проведен анализ влияния полиморфизма гена CAPN1 на рост и развитие бычков калмыцкой породы. В результате проведенных исследований выявлено, что наличие полиморфизма по гену CAPN1 влияет на ростовые характеристики животных. Анализ данных показал, что различия в массе наблюдаются начиная с 3 месяцев между животными III и I групп. В III группе живая масса в этом возрасте была на 2,2% и 1,4% больше, чем в I и II группах соответственно. Живая масса во II группе, в сравнении с I, была больше на 1,8%. С увеличением возраста животного разница по массе продолжала увеличиваться. В годовалом возрасте разница составила 6,3% и 3,2% соответственно. На момент окончания эксперимента разница между I и III группами была 6,2%, а между III и II – 3,5%. Анализ динамики среднесуточных приростов показал, что максимальный прирост наблюдался период с 13-го по 14-й месяц. Расчет абсолютного прироста животных показал, что животные III группы характеризовались более высокими результатами в сравнении с I и II. Анализ динамики роста подопытных бычков наглядно демонстрирует, что между носительством мутации CAPN1 и интенсивностью роста есть тесная связь, а гомозиготное состояние (CC) находится в определенной связи с повышенной энергией роста.

Ключевые слова: крупный рогатый скот, полиморфизмы, рост и развитие, длиннейшая мышца, полиморфизм гена CAPN1, интенсивность роста.

ASSESSMENT OF THE RELATIONSHIP BETWEEN POLYMORPHISM OF CAPN1 GENE WITH GROWTH PERFORMANCE OF CATTLE

^{1,2}Kosyan D.B., ²Rusakova E.A., ²Kvan O.V.

¹All-Russian research Institute of meat cattle breeding, Orenburg, e-mail: vniims.or@mail.ru;

²Orenburg State University, Orenburg, e-mail: kosyan.diana@mail.ru

Analysis of influence of gene polymorphism CAPN1 on the amino acid composition of the flesh of bulls Kalmyk breed. The result of the research work revealed that the presence of the polymorphism effect of gene CAPN1 on the growth characteristics of the animals. Data analysis showed that differences in weight can be observed for three months between animals I and II groups. In group III, the live weight at this age were 2.2% and 1.4% more than in I and II groups, respectively. Live weight in group II compared with I, was more by 1.8%. With increasing age of the animal is the difference in weight continued to increase. At one year of age, the difference was 6.3 and 3.2%, respectively. At the end of the experiment, the difference between I and III groups was 6.2% between III and II is 3.5%. The analysis of dynamics of average daily gains showed that maximum growth was observed between 13 to 14 months. The calculation of the absolute gain of animals showed that animals of group III were characterized by higher results in comparison with I and II. The analysis of the dynamics of growth of experimental calves clearly shows that between the accumulation of mutations in CAPN1 and growth rate are closely connected, and the homozygous state (CC) is in a certain connection with the high-energy growth.

Keywords: cattle, polymorphisms, growth and development, longissimus, polymorphism CAPN1 gene, the intensity of growth.

Мясная продуктивность крупного рогатого скота имеет важное значение в отрасли животноводства, особенно в получении качественной продукции.

Развитие молекулярной биологии предопределило развитие такой отрасли, как маркерная селекция. Этому способствовал прогресс в понимании представлений о путях и методах исследования различных процессов в организме животного, которые обусловлены не только действием генов, но и факторами внешней среды [1-3]. Так, правильное

выращивание и откорм молодняка определяют уровень мясной продуктивности в равной степени с активностью генов [4]. Особое значение данные процессы играют в селекции, которая направлена на получение животных с хозяйственно ценными признаками.

Использование ДНК-маркеров позволяет оценить гены, играющие значительную роль в формировании и регуляции ряда физиологических процессов. Поскольку ген обладает различными аллельными вариантами (полиморфизмы), связанными с вариативностью уровня продуктивности, то «считывание» этих вариантов позволит выявить желательные сочетания аллелей и позволят провести селекцию животных по генотипам [4; 5].

В раннее проведенных исследованиях по оценке влияния полиморфизма гена *CAPN1*, который обуславливает модификацию мышечной структуры, была выявлена не только зависимость структурно-механических свойств мяса от наличия или отсутствия желательного аллеля, но и изменение аминокислотного состава мяса на примере валина. Этот факт позволил констатировать, что наличие этого гена в желательной аллельной форме способствует изменению в белковом синтезе [6]. Полученные данные позволили предположить, что животные, имеющие данную мутацию, будут характеризоваться более ускоренными темпами роста при стандартном кормлении. Это обусловлено тем, что данная аминокислота играет ключевую роль в метаболизме мышц и восстановлении поврежденных тканей [7; 8].

Таким образом, изучение биологических и генетических закономерностей, влияющих на процессы роста и развития животных крупного рогатого скота, а также возможность применения полученных знаний в практике современного животноводства и селекционного процесса позволит получить животных с новыми качественными хозяйственно полезными признаками [9].

Исходя из вышесказанного, целью нашего исследования была оценка влияния наличия полиморфизма гена *CAPN1* на рост и развитие животных при условиях стандартного кормления.

Материалы и методы

Хозяйственный эксперимент был проведен в условиях ООО «Агробизнес» Республики Калмыкия, лабораторные исследования – на базе испытательного центра Всероссийского научно-исследовательского института мясного скотоводства.

Для прижизненной оценки взаимосвязи влияния различных аллельных вариантов гена *CAPN1* на рост и развитие была использована кровь бычков калмыцкой породы крупного рогатого скота (КРС) (n=70). Исследование проводилось с использованием ПЦР в реальном времени.

Выделение ДНК из крови проводили с использованием комплекта реагентов для выделения геномной ДНК из цельной крови «ДНК-Экстран-1» («Синтол», Россия).

Для амплификации были использованы праймеры, последовательность которых соответствовала фрагменту гена CAPN1 (5'-AGCAGCCCACCATCAGAGAAA – 3'; 5'-TCAGCTGGTTCGGCAGAT – 3').

Объем реакционной смеси составил 25 мкл и содержал 60 mM трис-HCl (pH 8,5), 1,5 mM MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM меркаптоэтанол; 0,1 mM тритон X-100; 0,2 mM дНТФ, 1 ед. Taq ДНК полимеразы, по 0,2 мкМ каждого из праймеров. Амплификацию гена CAPN1 проводили на программируемом амплификаторе АНК-32 («Синтол», Россия) по следующему режиму:

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

На основании результатов лабораторных испытаний по анализу наличия полиморфизма по гену CAPN1 из общего числа животных было сформировано 3 группы животных (n=15): I – без мутационной аллели (GG); II – гетерозиготное ее проявление (GC); III – с наличием полиморфизма в гене CAPN1 (CC).

На следующем этапе была проведена оценка особенностей роста и развития подопытных животных с целью оценки наличия взаимосвязи между исследуемыми параметрами.

Кормление животных осуществлялось в соответствии с нормами, предусматривающими один и тот же уровень кормления, рассчитанный на получение 900-1000 г среднесуточного прироста (Калашников А.П. и др., 2003). Уровень кормления во всех сравниваемых группах был одинаковым и вполне соответствовал потребностям растущего молодняка.

Контроль роста подопытных животных проводился путем ежемесячного индивидуального взвешивания (утром до кормления). На основании этих данных были рассчитаны среднесуточный прирост массы тела, относительная скорость роста в отдельные возрастные периоды.

Относительная скорость роста подопытных животных вычислялась по формуле С. Броди:

$$K = \frac{W_2 - W_1}{0,5(W_2 + W_1)} \times 100,$$

где K – относительная скорость роста;

W_1 – начальная живая масса, кг;

W_2 – конечная живая масса, кг.

Учет проводился до 14 месяцев.

Статистическая обработка проводилась с применением общепринятых методик при помощи приложения Statistica 10.0, включая определение средней арифметической величины (M), стандартной ошибки средней (m). Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. Оценку статистической значимости различий между группами проводили с помощью t-критерия Стьюдента (О.Ю. Реброва, 2002).

Результаты исследования

В результате проведенных исследований выявлено, что наличие полиморфизма по гену CAPN1 влияет на ростовые характеристики животных.

Анализ данных показал, что различия в массе наблюдаются, начиная с 3 месяцев между животными III и I групп, при рождении животные всех исследуемых групп характеризовались сходной живой массой. Так, в III группе живая масса в этом возрасте была на 2,2% и 1,4% больше, чем в I и II группах соответственно. Живая масса во II группе, в сравнении с I, была больше на 1,8%.

С увеличением возраста животного разница по массе продолжала увеличиваться. В 8 месяцев животные III группы имели в среднем живую массу 227,7 кг, в то время как животные I и II групп отставали по данному показателю на 8,4% ($P < 0,05$) и 4,0% соответственно. Разница между I и II группами была незначительной.

В годовалом возрасте разница составила 6,3% и 3,2% соответственно. На момент окончания эксперимента разница между I и III группами была 6,2%, а между III и II – 3,5% (рис. 1).

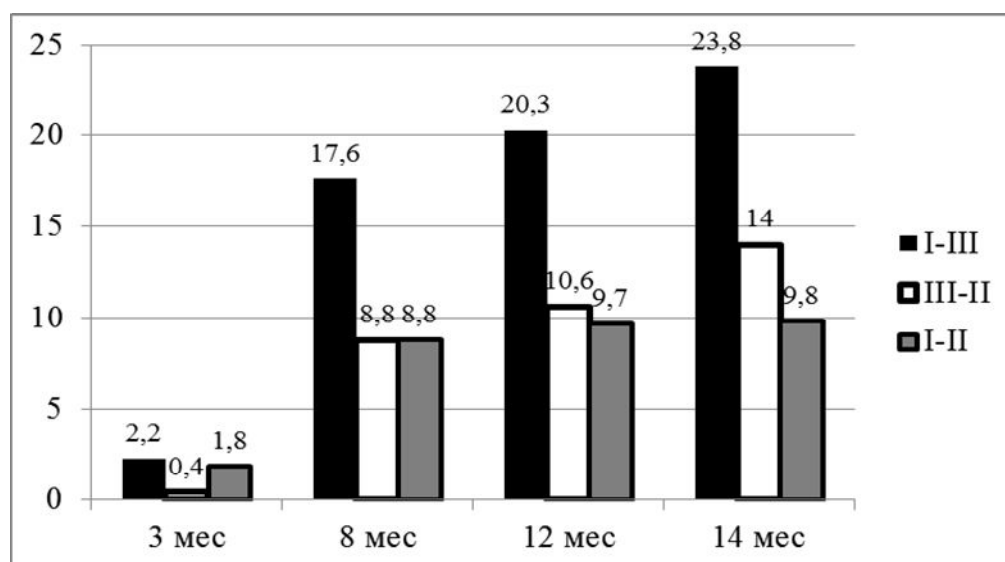


Рис. 1. Динамика разницы в живой массе между сравниваемыми группами, кг

Анализ динамики среднесуточных приростов показал, что максимальный прирост наблюдался период с 13-го по 14-й месяц, причем распределение между группами было не

одинаковым. Так, в I группе этот показатель составил 1042 г, во II – 1047 г, а в III – 1082 г. Причем следует отметить, что разница между I и II группами была незначительной, а животные III группы по данному показателю превышали своих сверстников из I группы на 13% ($P>0,99$), из II – 12,6% (таблица 1).

Таблица 1

Динамика среднесуточных приростов бычков разных генотипов, г

Возрастной период, мес.	Группа		
	I	II	III
0-8	734±3,78	773±6,26	809±6,51
9-12	939±3,16	945±7,09	960±2,70
13-14	1042±6,01	1047±11,4	1082±3,81

Расчет абсолютного прироста животных показал, что животные III группы характеризовались более высокими результатами в сравнении с I и II. Так, в период с 7-го по 8-й месяц этот показатель в группе с генотипом GG был равен 20,2 кг, разница составила между группами GG и CC – 1,9%, и 1,7% - между животными с генотипами CC и GC. С увеличением времени разница в данных эколого-генетических группах также увеличивалась.

За весь учетный период разница в абсолютном приросте составляла в группах GG-CC, CC-CG и GG-GC 13,42, 9,67 и 3,45 кг соответственно. Максимальные значения прироста были достигнуты в периоды 11-12 месяцев и 13-14 месяцев (рис. 2).

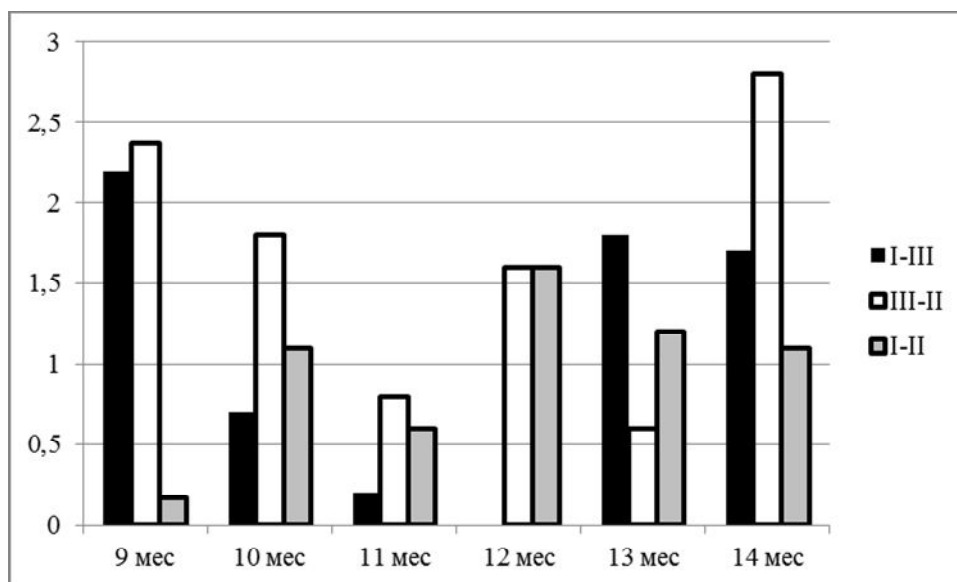


Рис. 2. Динамика разницы в абсолютном приросте животных сравниваемых групп, кг

За весь учетный период разницы в абсолютном приросте составляли в парах групп I-III, III-II и I-II – 5,6, 5,2 и 0,4 кг соответственно. По итогам исследований нами была проведена оценка относительной скорости роста бычков (таблица 2).

Динамика относительной скорости роста подопытных бычков, %

Возрастной период, мес.	Группа		
	I	II	III
0-8	144	147	149
9-12	42	41	40
13-14	18	17	18

Различия между группами по величине относительной скорости роста имели место на протяжении всего эксперимента, причем наиболее значительными были в период до 8 месяцев. Закономерно, что величина данного показателя в III группе оказалась наибольшей и превышала значение этого показателя на 5% в I и на 2% - во II группе. Между тем в последующие периоды: 9-12 и 13-14 месяцев, I группа не уступала аналогам из II и III групп. Это развитие событий связано с меньшей живой массой животных I группы в начале оцениваемых периодов. В конечном итоге при оценке динамики роста предпочтение отдается абсолютным, а не относительным величинам.

Анализируя гомо- и гетерозиготное проявление гена, следует отметить, что явная разница в показателях была отмечена непосредственно в группе животных-носителей генотипа CC. Разница между GG и GC была незначительной. Данный факт можно объяснить тем, что именно в состоянии CC данный полиморфизм оказывает видимое влияние на ростовые характеристики.

В научной литературе ген CAPN1 определяется как ген, кодирующий комплекс протеолитических ферментов, которые определяются как фактор, инициирующий декомпозицию мышечных тканей и волокон. В ходе исследований было определено существование двух основных типов кальпаинов, каждый из которых проявляет свою активность при различных концентрациях Ca^{2+} . Так, кальпаин А, или μ -кальпаин, активен при концентрации Ca^{2+} 50-100 мкМ, а кальпаин В, или М-кальпаин, активен при концентрации Ca^{2+} 1-2 мкМ [10].

В функциональном отношении было выявлено, что именно кальпаиновая протеаза играет ключевую роль в улучшении качества мяса за счет действия белков титина и тубулина. Результаты молекулярно-генетических исследований, в частности секвенирования II регуляторной субъединицы гена CAPN1, показали важность полиморфизма этого участка генома. В практическом отношении проведен ряд исследований, доказывающих, что наличие данного полиморфизма у сельскохозяйственных животных способствует формированию качественно полезного признака, а именно нежность мяса [11].

Параллельно с этим проводятся дополнительные исследования по выявлению зависимости ряда других признаков от наличия полиморфизма гена CAPN1, в частности

качества мяса после убоя или особенности роста животного. В работах Chung et al. было показано, что точечные мутации в участке гена кальпаина III овцы влияют на формирование жировой прослойкой вокруг бедер и внутренних органов [12]. В исследованиях, проведенных на КРС, были получены результаты, доказывающие взаимосвязь с такими свойствами, как рост, динамика массы и т.д. Полученные нами данные по анализу динамики роста подопытных бычков наглядно демонстрируют, что между носительством мутации CAPN1 и интенсивностью роста есть тесная связь, а гомозиготное состояние гена C находится в определенной связи с повышенной энергией роста.

Исходя из этого, продолжение исследований в данной области представляется достаточно перспективным и требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования (Грант Президента-МК-3631.2017.11)

Список литературы

1. Мирошников С.А., Кван О.В., Дерябин Д.Г. и др. Влияние пробиотических препаратов на обмен химических элементов в организме животных // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2006. – № 12-2 (62). – С. 151-154.
2. Гетманцева Л.В. Молекулярно-генетические аспекты селекции животных // Молодой ученый. – 2010. – № 12. - Т. 2. – С. 199-201.
3. Катмаков П.С., Анфимова Л.В. Весовой рост молодняка крупного рогатого скота разного генетического происхождения // Вестник Ульяновской ГСХА. – 2013. – № 1 (21). - URL: <http://cyberleninka.ru/article/n/vesovoy-rost-molodnyaka-kрупного-rogatogo-skota-raznogo-geneticheskogo-proishozhdeniya> (дата обращения: 30.01.2017).
4. Сурундаева Л.Г., Косян Д.Б., Русакова Е.А. и др. Ранняя диагностика аминокислотного состава мяса крупного рогатого скота по носительству мутации гена CAPN1 // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. - URL: <http://www.science-education.ru/116-12561> (дата обращения: 21.01.2017).
5. Русакова Е.А., Королев В.Л., Заверюха А.Х., Харламов А.В. Влияние фитазы на элементный статус цыплят-бройлеров при различном уровне обменной энергии в рационе // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 10 (146). – С. 122-125.
6. Сизова Е.А., Русакова Е.А. Структурно-функциональная реорганизация печени на фоне различной минеральной обеспеченности рациона // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2009. – № 6. – С. 136.
7. Гладырь Е.А., Зиновьева Н.А., Волкова В.В. и др. Характеристика аллелофонда

крупного рогатого скота некоторых мясных пород, разводимых на территории южного Урала и Западной Сибири // Достижения науки и техники АПК. – 2013. – № 3. – С. 61-63.

8. Shi M., Gao X., Ren H. et al. Association analysis of CAPN1 gene variants with carcass and meat quality traits in Chinese native cattle // African Journal of Biotechnology. – 2014. – V. 10, № 75. – P. 17367-17371.

9. Tang L., Yang D., Ouyang W. et al. Association of polymorphisms in the Pit-1 intron 5 with body measurements in Chinese Cattle // Afr. J. Biotech. – 2012. – 11 (42). – P. 9906–9910.

10. Sazili A., Lee G., Parr T. et al The effect of altered growth rates on the calpain proteolytic system and meat tenderness in cattle // Meat Sci. - 2004. – 66 (1). - 195-201.

11. Chung H.Y., Davis M.E., Hines H.C. Genetic variants detected by PCR-RFLP in intron 6 of the bovine calpastatin gene // Anim. Genet. - 2001. – 32 (1). - P. 53-63.

12. Zhang L., Liu J., Zhao F., Ren H. et al. Genome-Wide Association Studies for Growth and Meat Production Traits in Sheep // PLoS ONE. - 2013 – 8 (6). - P. 665-669.