

דו"ח מדעי מסכם (תלת-שנתי) לתכנית 362-0457-17

מוגש למעצת החלב

ינואר 2018

איתור סמנים גנטיים הנמצאים בתאחיזה לתכונות איכות בשר בגזע ההולשטיין
הישראלי

**Identification of genetic variations associated with meat quality traits in
Israeli Holstein cattle**

מגישה: מירי כהן-צינדר

מנהל המחקר החקלאי, היחידה לבקר לבשר, נוה-יער

Miri Cohen-Zinder, Beef Cattle Section, Newe Ya'ar, ARO

mirico@volcani.agri.gov.il

הממצאים הדו"ח זה הנם תוצאות ניסויים.

הניסויים אינם מהווים המלצות לחקלאים.

חתימת החוקר _____ מירי צינדר

Abstract

Holstein is the major dairy breed in the Israeli milk industry, supplies about 45% of fresh beef marketed to the Israeli market each year. Holstein's meat quality, which is cultivated for the production of milk, varies according to age, physical condition, management, feeding regime, and genetic characteristics within the breed. As of today, the selection of Holstein as dairy breed, does not take into consideration the quality of meat. Since Holstein is a significant source of fresh meat marketed locally, it is necessary, to detect genetic markers that will serve as a tool for cultivating meat quality traits in this breed. Establishment of a phenotypic database will allow the measurement and quantification of organoleptic, chemical, and physical parameters (=traits) that define meat quality in the Holstein breed. At a later stage, it will be possible to genetically map chromosomal regions harbouring genes and polymorphisms that are associated with such traits, aiming to improve the quality of the meat by means of markers-based selection.

In the current study, we created a phenotypic database for the meat of Holstein fattening calves. For this purpose, we collected (from the slaughterhouse at Beit Shean), the *longissimus dorsi* (LD) muscle of Israeli Holstein calves (N = 116) used to measure 12 parameters for meat quality, including key phenotypes such as tenderness, intramuscular fat content (IMF%), and water holding capacity (WHC). In addition, we extracted genomic DNA from the blood samples of these calves, which we used to detect genotypes of known genetic polymorphisms, derived from four genes (*CAPNI*, *CAST*, *DGATI*, *FASN*) found to be associated with either with tenderness (shear force, IMF%, and fatty acid profile in meat in several cattle breeds and populations.

תקציר

ענף החלב הישראלי, המבוסס על גזע ההולשטיין פריזי (שחור-לבן) מספק כ 45% מבשר הבקר הטרי המשווק לשוק הישראלי כל שנה. איכות הבשר של ההולשטיין, המטופח לייצור חלב, חסרת אחידות ומשתנה בהתאם לגיל, המצב הגופני, תנאי ממשק הגידול, משטר ההזנה ומאפיינים גנטיים משתנים בתוך הגזע. נכון להיום, טיפוח עדר החלב לא מתחשב באיכות הבשר. מכיוון שההולשטיין מהווה מקור ייצור משמעותי של הבשר הטרי המשווק מקומית, קיימת חשיבות רבה לפיתוח סמנים גנטיים אשר ישמשו ככלי לטיפוח תכונות איכות הבשר בגזע זה. יצירת מסד נתונים פנוטיפיים, תאפשר למדוד ולכמת פרמטרים אורגנולפטניים, כימיים ופיסיקליים לתכונות המגדירות את איכות הבשר בגזע

ההולשטיין. בשלב מאוחר יותר, ניתן יהיה באמצעות אוכלוסית מדגם מתאימה, למפות גנטית תכונות הנמצאות בתאחיזה לפרמטרים אלה, מתוך מטרה, לשפר את איכות הבשר באמצעות סלקציה גנטית מבוססת סמנים.

במסגרת עבודה זו, בנינו מסד פנוטיפים ראשוני, המתבסס על בשר-עגלי פיטום מגזע ההולשטיין. לשם כך, אספנו מבית המטבחים "בקר תנובה" בית-שאן, נתחי אנטריקוט שריר ה- *longissimus dorsi* של עגלי שחור לבן (הולשטיין ישראלי; $n=116$) לצורך ביצוע אנליזות פנוטיפיות. לשם כך, יצרנו מסד פנוטיפי, באמצעותו אנו מודדים כיום 12 פרמטרים לאיכות בשר, ביניהם כאלה המגדירים תכונות מפתח כמו רכות (*tenderness*), תכולת שומן תוך שרירי המהווה מדד לשיוש (*intramuscular fat content; IMF%*), ויכולת אחיזת נוזלים בנתח (*water holding capacity; WHC*) בנתח. בנוסף, הפקנו דנ"א גנומי מדוגמאות הדם של עגלים אלה, בו השתמשנו לקביעת גנוטיפים של סמנים גנטיים ידועים מסוג SNPs, שמקורם בארבעה גנים (*Calpain, Calpastatin, DGAT1, FASN*) אשר הציגו בספרות תאחיזה לאחת מהתכונות הבאות: רכות בשר / תכולת שומן תוך שרירי / אינדקס חומצות שומן, במספר גזעים ואוכלוסיות בקר.

מבוא

ענף החלב הישראלי, המבוסס על גזע ההולשטיין-פריזי, מספק בין 40 ל 45% מבשר הבקר הטרי המשווק לשוק המקומי כל שנה. איכות הבשר של גזע זה, המטופח לייצור חלב, חסרת אחידות ומשתנה בהתאם לגיל, המצב הגופני, תנאי ממשק הגידול, משטר ההזנה ומאפיינים גנטיים משתנים בתוך הגזע. נכון להיום, טיפוח עדר החלב לא מתחשב באיכות הבשר. מכיוון שההולשטיין מהווה מקור ייצור משמעותי של הבשר הטרי המשווק מקומית, קיימת חשיבות רבה לפיתוח סמנים גנטיים אשר ישמשו ככלי לטיפול תכונות איכות הבשר בגזע זה. בעולם מושקע מזה מספר שנים מאמץ ניכר לטיפול הרכב הטבחה ואיכותה (תכונות בעלות ערך כלכלי רב), כדי לטייב את הנתחים הטריים ומוצרי הבשר המעובדים, כחלק מדרישות הצרכנים והתעשייה, בהתאמה, תוך התמקדות באיתור סמנים הנמצאים בתאחיזה לתכונות האורגנולפטיות (חושיות, נתפסות ע"י החושים: רכות, עסיסיות, טעם, מרקם), הפיזיקאליות והביוכימיות (כגון מרקם, מידת השיוש (*marbling*), הרכב חומצות השומן, pH, צבע, מבנה והרכב הסיבים בשריר).

מחקרים בגזעים שונים של בקר וחזירים הראו כי אתרי תכונות כמותיות (*quantitative trait loci, QTLs*) נמצאים בתאחיזה לתכונות איכות בשר [1-4], כמו גם סמנים הממוקמים בתוך גנים הנמצאים בתאחיזה לאותן תכונות [5-7]. בכמה איזורים גנומים אותרו בסמיכות זה לזה QTLs הנמצאים בתאחיזה לתכונות חלב ותכונות בשר [8-12]. למשל, בכרומוזום מספר 4 בבקר, נמצא QTL בתאחיזה לכמות חלב בגזע החום השוויצרי בסמוך לסמן BMS1788 [8]. בעבודה אחרת, נמצא באותו האיזור QTL לכמות השומן התוך שרירי בבשר, באוכלוסיות בקר אוסטרליות מגזעי הרפורד, אנגוס וברהמה

[9]. בכרומוזום 18 בבקר נמצאו שני QTLs בתאחיזה לרכות הבשר המרוחקים זה מזה כ 20 סנטימורגן בגזעי הרפורד, שרולה ולימוזין [10], ובבקר אירי מגזע מעורב [11]. בין שני QTLs אלו, נמצא QTL שלישי לכמות חלב באוכלוסיית ההולשטיין הגרמני [12]. נראה שאיזור זה בכרומוזום 18 משלב בין איזורים הנמצאים בתאחיזה לתכונות איכות בשר ותכונות ייצור חלב. בשנים האחרונות נערכות סריקות זיקה כלל גנומיות (Genome-wide association studies) בבקר, לאיתור QTLs הנמצאים בתאחיזה למספר תכונות טבחה ואיכות בשר, תוך שימוש בשבבי דנ"א המכילים עשרות ומאות אלפי סמנים המכסים את הגנום בצורה מיטבית. בחלק מעבודות אלה אף שויכו גנים מועמדים למסלולים ביולוגיים רלוונטיים [2, 4, 13].

מטרת המחקר:

1. בניית מאגר פנוטיפי המבוסס על איסוף נתחי בשר משריר ה *LM* (*Longissimus dorsi* muscle) של כ 100 עגלי הולשטיין ואפיונם עבור תכונות איכות בשר על בסיס מדדים כימיים, פיזיקליים ואורגנולפטיים.

2. סריקה של גנים ידועים בעלי תפקיד ביולוגי מוגדר בתחום איכות הבשר, לצורך איתור וריאנטים גנומיים (מסוג Single Nucleotide Polymorphisms) אשר יכולים לשמש כסמנים לתכונות איכות בשר (בדגש על רכות ותכולת שומן תוך שריר) בעגלי הולשטיין.

מהלך ביצוע העבודה

קביעת פנוטיפים עבור 10-12 תכונות איכות בשר על בסיס מדדים כימיים, פיזיקליים ואורגנולפטיים בשריר ה *LD* של 116 עגלים מגזע ההולשטיין הישראלי.

1. עבודה בבית המטבחיים - העבודה בבית המטבחיים בקר תנובה (בית שאן), כוללת הגעה

שלנו (אחת לשלושה שבועות) לאיסוף דמים ונתחי אנטריקוט משריר ה *LD* של עגלי הולשטיין ישראלי. בכל שחיטה אנו נמצאים בבית המטבחיים במשך יומיים עוקבים כמפורט: ביום הראשון מקבלים את מספרי הזיהוי (ממשלתי, אוזן) והשחיטה של העגלים, אוספים דמים (במעמד השחיטה) מכל עגל לצורך הפקת דנ"א (זיהוי גנומי), ולאחר השחיטה אוספים את דוח השחיטה הכולל נתוני איכות טבחה כמו משקל, משקל חי, סטטוס כשרות, משק מקור, משק מגדל ועוד. כעבור 24 שעות אנו מנטרים מדדי pH (מדד חומציות הטבחה), טמפ', וצבע של הטבחה, ולאחר מכן מלווים על פס הייצור את חיתוך הנתחים מטבחות הניסוי היעודיות. החיתוך מתבצע משריר ה *LD* בין צלעות 12-13 (בחיבור שבין האנטריקוט לסינטה) ונאספים נתחי האנטריקוט. 24 שעות לאחר

השחיטה, הנתחים נארזים ומשונעים בקירור למעבדה לאיכות בשר בנוה יער להמשך האנליזות.

II. קביעת פנוטיפים לאיכות בשר: עם ההגעה למעבדה הנתחים נשקלים (מגיעים במשקל של כ

1 ק"ג לעגל), ומבצעים בדיקות pH, טמפרטורה וצבע. הנתחים מיושנים במקרר יעודי למשך 24 שעות, ולמחרת נלקחים שוב מדדי ה pH והצבע. כעבור 48 שעות מהשחיטה, מתקיימת חלוקה מדוקדקת של כל נתח לתת נתחים, לצורך כיסוי של כל האנליזות המבוצעות. חלק מהבשר מוקפא ישירות, חלק נטחן וחלק עובר ייבוש בהקפאה.

III. פנוטיפים נבחנים: כל הפרמטרים הנבחנים (אורגנולפטיים, פיסיקליים וכימיים) לאיכות בשר מתוארים בטבלה 1.

ממד נבחן	תכונת שיוך
pH (24, 48 ש')	נראות / חיי מדף
טמפרטורה	נראות / חיי מדף
צבע שריר; צבע שומן (L^* , a^* , b^*)	נראות / חיי מדף
אגירת נוזלים (Water holding capacity)	נראות / חיי מדף
אובדן נגר (Drip loss)	נראות / חיי מדף
אובדן נוזלים לאחר הפשרה (Thawing loss)	נראות / חיי מדף
אובדן נוזלים במהלך הבישול (Cook loss)	אורגנולפטיות / פיסיקלית
רכות (tenderness)	אורגנולפטיות / פיסיקלית
אורך סרקומרים	פיסיקלית
תכולת שומן תוך שרירי (IMF%)	אורגנולפטיות / כימית
תכולת קולגן (כללי; מסיס)	אורגנולפטיות / פיסיקלית
תכולת חלבון	כימית
חומר יבש	כימית
חומר אורגני	כימית

טבלה 1. פרמטרים נבחנים לאיכות בשר. L^* – lightness * , מעיד על רמת החומציות וכוסר אחזקת הנוזלים בנתח; a^* – redness – נמצא במתאם עם תכולת הברזל בשריר; b^* – yellowness – נמצא במתאם עם מדד L^* (אך אינו ספציפי לבשר).

קביעת גנוטיפים

ארבעה סמנים גנטיים (ממוקמים בארבעה גנים שונים), אשר נמצאו בעבר אחוזים לתכונות איכות בשר, נסרקו על גבי דנ"א גנומי של עגלי ההולשטיין להם נקבעו המדדים הפנוטיפיים לאיכות בשר. הסמנים שנבחרו מתוארים בטבלה 2. לגנים בהם ממוקמים סמנים אלה, תפקידים הקושרים אותם לפרמטרים שונים באיכות הבשר. קלפסטטין (CAST; calpastatin), וקלפאין (μ -CAPN1)

(calpain), אנזימים פרוטאוליטיים המעורבים בריכוך נתחי הבשר לאחר השחיטה, סמנים בגנים המקודדים לחלבונים אלה, נמצאו בתאחיזה לרכות בשר באוכלוסיות בקר שונות. *DGAT1* (diacylglycerol O-acyltransferase 1), אנזים מיקרוזומלי המקטלז את השלב הסופי של סינתזת טרי-גליצרידים בחלב, בעבר נמצא באסוציאציה עם אחוז השומן בחלב וכן עם תכולת השומן התוך שריר בנתח. *FASN* (Fatty-acid synthase), אנזים המשמש כרגולטור לביוסנתזה *de-novo* של חומצות שומן ארוכות שרשרת, ב domain הקרוי thioesterase (TE), האחראי על השלב הטרמינלי בסינתזה של חומצות שומן. פולמיפורפיזמים הקיימים ב TE domain נמצאו כמשפיעים על הרכב חומצות השומן בנתח. עבור כל סמן נעשה שימוש ב assay ספציפי (TaqMan allelic discrimination; Applied Biosystems) אשר הכיל פרובים ייעודיים, אשר עוצבו על מנת להגביר את כל אחד משני האללים הקיימים עבור כל סמן. הפרובים והאללים הייעודיים עבור כל סמן מוצגים בטבלה 3.

סמן / גן	כרומוזום בבקר	אללים של הסמן	מיקום הסמן ע"ג הכרומוזום (UMD 3.1)	החלפת חומצה אמינית	תכונה אחוזה לסמן	SNP rs#
CAST	7	A/G	98,535,683	T182A	רכות	rs210072660
CAPN1	29	C/G	44,069,063	G316A	רכות	rs17872000
DGAT1	14	A/K*	1,802,265-1,802,266	K232A	שומן תוך-שרירי	rs109234250; rs109326954
FASN	19	A/G	51,402,032	A2266T	הרכב חומצות שומן	rs41919985

טבלה 2. סמנים גנטיים, מיקומם והתכונה אליה נמצאו אחוזים בעבודות קודמות (נלקח מתוך Shor-Shimoni וחבוריה 2016).

פריימר / פרוב	רצף	תוצר	גן
Forward	TGTCGATCTTTTAGACCAAGTCACA	Calpastatin	CAST
Reverse	AGCTGGTTTCGGCAGATGCT		
VIC	AAAGAGCACTGTTCC		
FAM	AAGAGCGCTGTTCC		
Forward	AGCTGCTCCCGCATGTAAG	μ -Calpain	CAPN1

		GGCTGGGCAGGTCAGT	Reverse
		TCCACGCCGTTCCA	VIC
		CCACGGCGTTCCA	FAM
<i>DGAT1</i>	Diacylglycerol-O-acyltransferase1	CCGCTTGCTCGTAGCTTTG	Forward
		CCGCGGTAGGTCAGGTTG	Reverse
		AGGTAAGGCGGCCAA	VIC
		CAGGTAAGAAGGCCAAC	FAM
<i>FASN</i>	Fatty acid synthase	GGCTCCACCACCGTGTTT	Forward
		ACCTCCTGTACACTGTAGGCCATAG	Reverse
		TGGCCACCAAGCT	VIC
		TGGCCGCCAAGCT	FAM

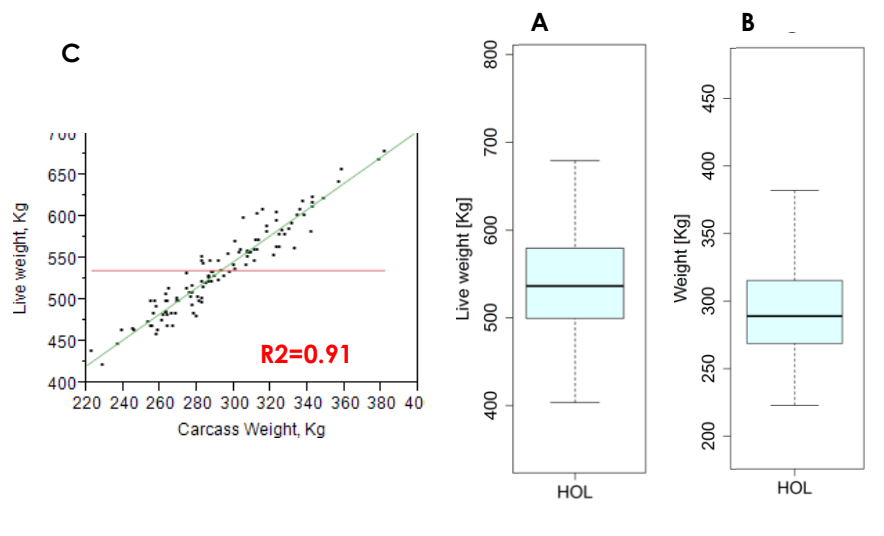
טבלה 3. רצפי פרובים ופריימרים (נלקח מתוך Shor-Shimoni וחבוריה 2016).

מבחנים סטטיסטיים – בוצעו באמצעות תוכנת JMP (JMP statistical software; SAS) – pair-wise מבחני בוצעו לחישוב תדירויות גנוטיפים בכל סמן. סטיות משו"מ הארדי-ווינברג (HW equilibrium) חושבו באמצעות מבחן הסתברות חי-בריבוע (Chi Square likelihood) test), עם ערך סף למובהקות $p \leq 0.05$. מבחני אסוציאציה של גנוטיפ – סמן בוצעו באמצעות מבחן F ($p \leq 0.05$).

תוצאות ודיון

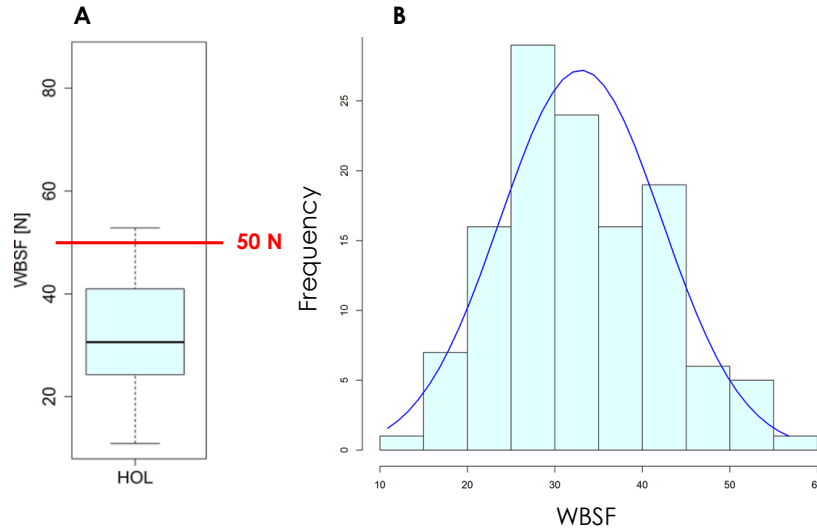
אפיון מדדים פנוטיפיים

נתוני טבחה: מצאנו כי קיים מתאם גבוה בגזע ההולשטין בין משקל חי ובין תפוקת טבחה (איור 1 - A). הערך הממוצע של משקל חי כפי שנמדד בעגלי ההולשטיין עומד על 535.8 ק"ג ואילו משקל טבחה ממוצע הוא 292.8 ק"ג (אחוז טבחה ממשקל חי עמד על כ 54%).



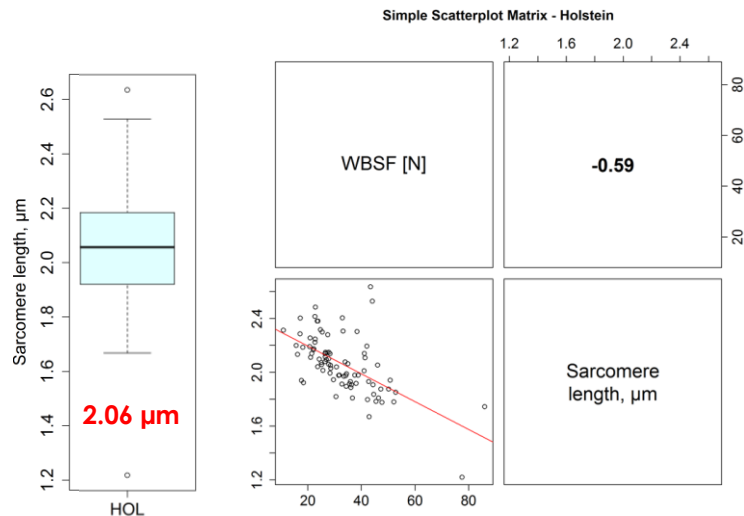
איור 1. נתוני משקל חי (A) משקל טבחה (B) ומקדם המתאם ביניהם (C); $R^2=0.91$ ($P \leq 0.001$) בעגלי הולשטיין ($n=116$).

רכות: ערכי shear force (SF) נמדדו באמצעות מכשיר ה- Texture Analyzer מסוג INSTRON הקיים במעבדתנו (באמצעות אנליזת Warner-Bratzner Shear Force) לאחר הכנת הדוגמאות על פי פרוטוקול קבוע (Cohen-Zinder et al., 2017) – פרוטוקול בישול והכנת הנתחים לגזירה, מופיע בפרק התוצאות של המאמר העוסק בהשפעת הזנה במורנינגה מכונפת על איכות הבשר של טלאים מגזע אסף (Cohen-Zinder et al., 2017). ערכי SF ממוצעים שהתקבלו עד כה עבור נתחי ההולשטיין בשריר ה-LD עומדים על 32 ניוטון [N] (איור 2) ועל פי אינדיקציות מהספרות מדובר בנתחים בעלי רכות גבוהה במיוחד (נתח נחשב "קשה" למאכל אם נדרשים מעל 50 ניוטון בכדי לגזור אותו לאחר הבישול – צליה). ערך ממוצע לגזירה של 32 ניוטון מעיד על פוטנציאל רכות הבשר הקיים בגזע זה, אשר בבסיסו מטופח לחלב. קיימת וריאציה חלקית לתכונת הרכות בגזע זה (איור 2).



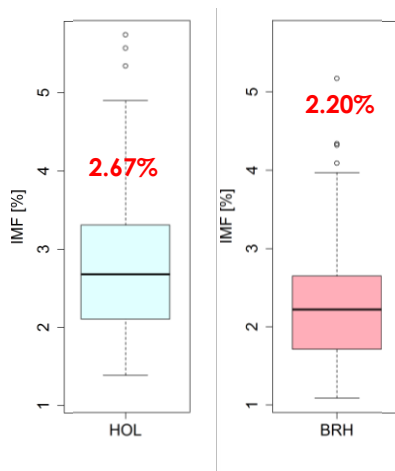
איור 2. רכות (tenderness) – ערכי SF בנתחי בשר (שריר ה LD) מבושלים של עגלי הולשטיין (A). ערך ממוצע 32N. עקומת התפלגות ערכי SF בתוך הגזע (B).

אורך סרקומרים: תאי השריר (מיוציטים) בנויים סיבים (מיופברילות) המאפשרים את כיוון השריר. הסיבים בנויים יחידות חוזרניות הקרויות סרקומרים. אינדיקציות בספרות מצביעות על כך כי קיים מתאם חיובי בין אורך הסרקומרים בשריר ובין רכות הנתח המתקבלת. אורך הסרקומרים הממוצע אשר התקבל עבור נתחי בשר מעגלי ההולשטיין מוצג באיור ועומד על $2.06\mu\text{m}$ (איור 3). עוד מצאנו כי קיים מתאם גבוה בין אורך הסרקומר ורכות הנתח (איור 3). – פרוטוקול השיטה באמצעותה ניתן לקבוע אורך סרקומרים מצורף מתוך פרק החומרים והשיטות של המאמר העוסק בהשפעת הזנה במורניגה מכונפת על איכות הבשר של טלאים מגזע אסף (Cohen-Zinder et al., 2017).



איור 3. אורך סרקומרים בנתחי בשר מעגלי הולשטיין (שריר ה LD) וקורלציה בין רכות בערכי SF ואורך סרקומרים. מקדם המתאם שלילי ($R^2=-0.59$; $P\leq 0.001$) ומעיד על מתאם גבוה בין רכות בשר לאורך הסרקומרים בשריר.

תכולת שומן תוך שרירי: תכולת השומן התוך שרירי (intra-muscular fat content; IMF%) הממוצעת שנמצאה בנתחי עגלים מגזע ההולשטיין עומדת על 2.67% ותואמת את ממצאי הספרות עבור נתחים משריר זה. בהשוואה לנתחים מקבילים מגזע אוסטרלי מעורב, אותם בדקנו לצורך השוואה, מצאנו כי רמות השומן בהולשטיין אף גבוהות יותר (איור 4).



איור 4. תכולת שומן תוך שרירי בנתחי בשר של עגלי הולשטיין (HOL; $n=116$) וגזע אוסטרלי מעורב (BRH; $n=103$). תכולת השומן בנתחי הולשטיין עומדת על 2.67% ונבדלת באופן מובהק מזו שנמצאה בעגלי האוסטרלי המעורב ($P\leq 0.05$).

תכונות נראות וחיי מדף ותכונות כימיות: מדדים נוספים הנבחנים בנתחי הבשר של גזע ההולשטיין מסוכמים בטבלה 2. כרפרנס מוצגים המדדים המתקבלים בתכונות אלה בנתחים מקבילים של גזע אוסטרלי מעורב (נתחים אלה נאספים מבית המטבחיים בקר תנובה ואופיינו תחת זהים לאלה של ההולשטיין). שריר: LD, מיקום הנתח: בין צלעות 12-13, סוג הנתח: אנטריקוט. מצאנו כי תכולת החלבון בנתחי בשר ההולשטיין גבוהה יותר באופן מובהק מזו של נתחי האוסטרלי המעורב (0.0005). לתכולת החלבון בבשר חשיבות תזונתית רבה. עוד מצאנו יתרון לנתחי ההולשטיין בתכולת הנוזלים שאבדו לאחר ההפשרה (thawing loss; TL) ($p=0.0001$), ובתכולת הנוזלים שאבדו לאחר הבישול ($p=0.048$).

מדד נבחן [%]	נתח הולשטיין	נתח אוסטרלי מעורב	P-value
תכולת חלבון כללי [CP]	24.1	23.7	0.0005
חומר יבש [DM]	25.4	25.6	0.1783
תכולת מים	74.6	74.4	0.1783
אגירת נוזלים בנתח [WHC]	43.7	43.9	0.6050
אובדן נוזלים לאחר הפרשה [THL]	3.60	6.69	0.0001
אובדן נוזלים בבישול [CL]	23.1	24.0	0.0480

טבלה 4. הבדלים בתכולת חלבון, ח"י, מים, אגירת נוזלים בנתח, אובדן נוזלים מנתח לאחר הפרשה, אובדן נוזלים במהלך הבישול, בנתחי שריר ה LD של עגלי הולשטיין בהשוואה לעגלי אוסטרלי מעורב.

אנליזה גנטית

תדירויות אללים וגנוטיפים של ארבעת הסמנים בגזע ההולשטיין מוצגות בטבלה 5. התדירויות מוצגות בהשוואה לגזעי בקר אחרים, בלדי, לימוזין וסימנטל עבור כל סמן בכל גן.

		CAST						CAPNI					
Breed	N*	AA	AG	GG	A	G		CC	GC	GG	C	G	
BAL	18	0.50	0.12	0.38 ^a	0.56	0.44 ^a		0.88	0.12	0.00 ^a	0.94	0.06 ^a	
LIM	33	0.88	0.09	0.03 ^b	0.93	0.07 ^b		0.52	0.45	0.03 ^b	0.74	0.26 ^{a,b}	
HOL	216	0.26	0.44	0.30^c	0.48	0.52^a		0.34	0.46	0.20^c	0.57	0.43^b	
SIM	105	0.46	0.19	0.35 ^a	0.55	0.45 ^a		0.92	0.08	0.00 ^a	0.96	0.04 ^a	
	X ²		66.9*			26.5*				128.2* (≤0.0001)		68.3*	

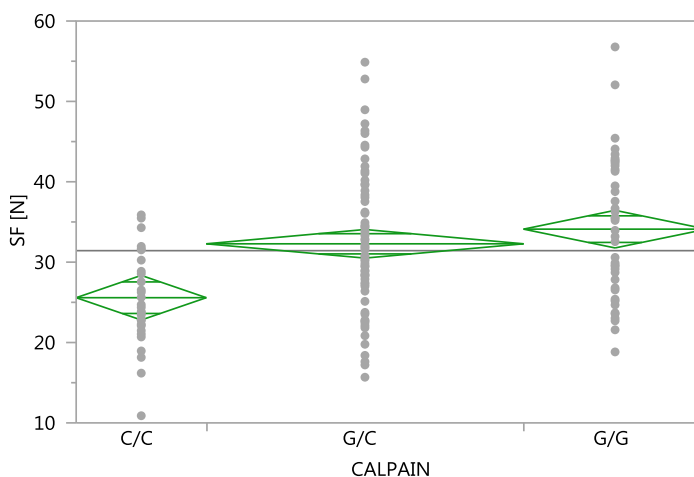
		DGATI						FASN					
Breed	N*	AA	AK	KK	A	K		GG	AG	AA	G	A	
BAL	18	0.06	0.63	0.31 ^a	0.38	0.62 ^a		0.63	0.31	0.06 ^a	0.78	0.22 ^a	
LIM	33	0.27	0.58	0.15 ^a	0.56	0.44 ^a		0.18	0.40	0.42 ^b	0.38	0.62 ^b	
HOL	216	0.72	0.23	0.05^b	0.84	0.16^b		0.28	0.48	0.24^b	0.52	0.48^b	
SIM	105	0.77	0.20	0.03 ^b	0.87	0.13 ^b		0.65	0.33	0.02 ^a	0.81	0.19 ^a	
	X ²		58.5* (≤0.0001)			28.8*				74.4*		18.2* (≤0.0001)	

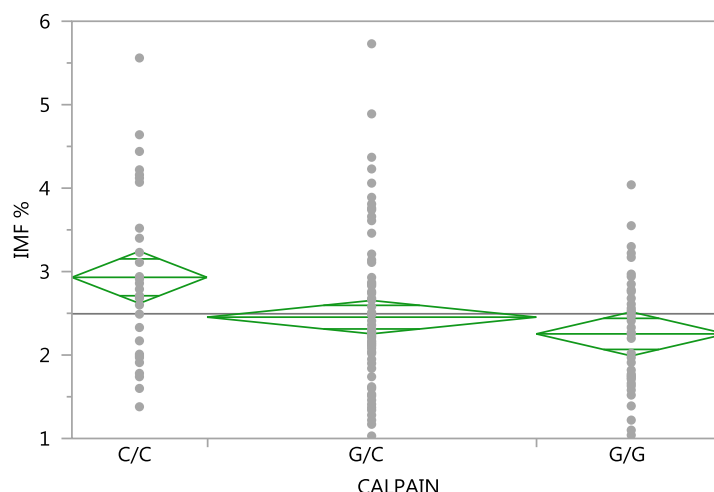
טבלה 5. תדירויות אללים וגנוטיפים עבור הסמנים בגנים: *CAST*, *CAPNI*, *DGATI* ו- *FASN*. בארבעה גזעי בקר: הולשטיין (HOL), בלדי (BAL), לימוזין (LIM), סימנטל (SIM). בגן *DGATI* קיים סמן די-אללי המתבטא כגנוטיפ באופן הבא: AA - CG/CG; AK - CG/AA; KK - AA/AA. תדירויות אללים וגנוטיפים השונות באופן מובהק, מסומנות באותיות לטיניות קטנות. * $P \leq 0.0001$.

תאחיזה

1. הסמן CAPN1 (מיקום ע"ג כרומוזום 29, שינוי חומצה אמינית - G316A, אללים: G/C) -

נמצא באסוציאציה מובהקת ל shear-force, כמדד לרכות בשר ($p \leq 0.0001$), ולתכולת שומן תוך שרירי ($p=0.0048$), כאשר הגנוטיפ המשפר את רכות הנתח C/C הוא הגנוטיפ המעלה את תכולת השומן התוך שרירי. עוד מצאנו כי גנוטיפ זה אחוז באופן מובהק לתכולה גבוהה יותר של ח"י בנתח ($p=0.0024$) איור 5. הגנוטיפ המעלה את רכות הבשר C/C, נמצא בהסכמה עם ממצאי הספרות, כאשר, בגזעי בקר נוספים, נמצא כי גנוטיפ הומוזיגוט ל C, היה אחוז לרכות גבוהה בנתח (14-16). ממצאים אלה, לצד התאחיזה המובהקת שנמצאה בין הפולימורפיזם בגן ובין shear-force בגודל מדגם קטן יחסית של 116 עגלים, מחדדת את הצורך לבחון את הסמן בגן CAPN1 תחת אוכלוסית מדגם גדולה יותר בגזע ההולשטיין, זאת על מנת לקבוע האם ניתן להשתמש בו כסמן לתכונה זו. באופן מענין, על פי תדירות האללים של הסמן (טבלה 5), נראה כי אלל C נמצא בתדירות גבוהה יותר בגזע ההולשטיין (0.57) בעוד הגנוטיפים C/C ו- C/G נמצאים אף הם בתדירות גבוהה (טבלה 5).





איור 5. מבחן F למובהקות הסמן CAPN1 בגן קלפאין לרכות בשר (shear-force, SF) למעלה, ותכולת שומן תוך-שרירי, למטה. ($p \leq 0.05$).

2. הסמן CAST (מיקום ע"ג כרומוזום 7, שינוי חומצה אמינית - T182A, אללים: A/G) –

סמן זה נמצא באסוציאציה מובהקת לאיכות בשר, כאשר A/A הוא הגנוטיפ המעלה ($p \leq 0.05$). ממצא זה תואם את ממצאי הספרות, לפיהם גנוטיפ A/A אך גם A/G נמצאים בתאחיזה לרכות בשר משופרת (17-19). יחד עם זאת, תדירות האלל המעלה מעט נמוכה יותר מזו של האלל G.

3. הסמן DGAT1 (מיקום ע"ג כרומוזום 14, שינוי חומצה אמינית - K232A, אללים:

AA/GC) – נמצא בתאחיזה מובהקת לתכולת השומן התוך שרירי בנתחים ($p = 0.04$), כאשר האלל AA הוא האלל המעלה את תכולת השומן בבשר. נכון להיום, קיימת מחלוקת בספרות בנוגע לאלל המעלה בסמן זה K232A את תכולת השומן התוך שרירי. למשל, בעבודתם של Thaller וחבוריו (20) נמצא כי האלל K (AA) נמצא בתאחיזה לתכולת שומן גבוהה יותר בנתח בעגלי הולשטיין גרמני. בעבודה אחרת, של Pannier וחבוריו (21) לא נמצאה תאחיזה בין אלל זה (K) ובין תכולת שומן תוך שרירי. במקרה זה, עלינו לבחון את התפלגות K232A באוכלוסית מדגם גדולה יותר (21).

4. הסמן FASN (מיקום ע"ג כרומוזום 19, שינוי חומצה אמינית - A2266T, אללים: A/G

בסמן זה, לא נמצאה תאחיזה לאף אחד מהפנוטיפים הנבחנים. ייתכן כי בחינתו בהתייחס להרכב חומצות השומן בנתחים, תוביל לאיתור תאחיזה מסוג זה, בדומה לזו שנמצאה בעבודות אחרות אחרת

סיכום: כיילנו לראשונה, מערכת פנוטיפית המודדת מעל 12 פרמטרים המגדירים איכות בשר בגזע ההולשטיין. מערכת זו יכולה לשמש כפלטפורמה לבחינת פנוטיפים שונים (אורגנולפטיים, כימיים, פיסיקליים וטכנולוגיים) לאיכות בשר: (i) בגזעי בקר נוספים (ii) בצאן. עוד מצאנו כי בהשוואה לגזע האוסטרלי המעורב (יבוא) קיים ייתרון לגזע ההולשטיין בנקודות מפתח כמו רכות בשר ותכולת שומן תוך שרירי, המבוקשות הן ע"י הצרכנים (שיפור ברכות, שליטה בתכולת השומן התוך שרירי, יצירת נתחים "רזים" יותר, "שמנים" יותר וכו') והן ע"י התעשייה והמגדלים (תגמול, פרימיום, תשלום עבור איכות גבוהה והדירה). בהתייחס לסמנים שנבחנו, מצאנו כי לסמן הממוקם בגן קלפאין (CAPN1) תאחיזה גבוהה לרכות בשר, על אף שנבחן בגודל מדגם קטן יחסית. בשלב זה עלינו לבחון פולימורפיזם זה ואף נוספים בגן המקודד לקלפאין (אנזים פרוטאוליטי המעורב בתהליך ריכוך הנתח ב 24 שעות ראשונות לאחר השחיטה) באוכלוסיות מדגם גדולות יותר, על מנת לבסס את ההשערה כי יכול לשמש כסמן גנטי לרכות בשר בגזע ההולשטיין.

מאמרים שפירסמנו תוך כדי מחקר זה:

Cohen-Zinder M., Orlov A., Trophymiuk O., Agmon R., Kabiya R., Shor-Shimoni E., Wagner E.K., Hussey K., Leibovich H., Miron J., & Shabtay A. (2017). Dietary supplementation of *Moringa oleifera* silage increases meat tenderness of Assaf lambs. *Small Ruminant Research*. 151: 110-116.

Einav Shor-Shimoni., Ariel Shabtay., Rotem Agmon., & Cohen-Zinder M. (2017). Detection of Allelic and Genotypic Frequencies of Polymorphisms Associated with Meat Quality in the Mediterranean Baladi Cattle. *The Open Agriculture Journal*. 10: 1-10.

ספרות מצוטטת

1. Tizioto P.C, Decker J.E, Taylor J.F, Schnabel R.D, Mudadu M.A, Silva F.L, Mourão G.B, Coutinho L.L, Tholon P, Sonstegard T.S, Rosa A.N, Alencar M.M, Tullio R.R, Medeiros S.R, Nassu R.T, Feijó G.L, Silva L.O, Torres R.A, Siqueira F, Higa R.H, Regitano L.C. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. *Physiol Genomics*., 2013. 45(21): p. 1012-20.
2. Miar Y, Plastow G.S, Moore S.S, Manafiazar G, Charagu P, Kemp R.A, Van Haandel B, Huisman A.E, Zhang C.Y, McKay R.M, Bruce H.L, Wang Z. Genetic

and phenotypic parameters for carcass and meat quality traits in commercial crossbred pigs. *J Anim Sci.* 2014. 92(7): p. 2869-84.

3. Xiangxue Xie, Qingxiang Meng, Zhenliang Cui, and Liping Ren. Effect of Cattle Breed on Meat Quality, Muscle Fiber Characteristics, Lipid Oxidation and Fatty Acids in China. *Asian-Australas J Anim Sci.* 2012. p. 25(6): 824–831.

4. Ferguson D.M, and Warner R.D. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Sci.*, 2008. 80: p 12-19.

5. Utrera A. R. and Van Vleck L. D., Heritability estimates for carcass traits of cattle: a review. *Genet. Mol. Res.*, 2004. 3(3): p. 380-394.

6. Ma J, Yang J, Zhou L, Zhang Z, Ma H, Xie X, Zhang F, Xiong X, Cui L, Yang H, Liu X, Duan Y, Xiao S, Ai H, Ren J, Huang L. Genome-wide association study of meat quality traits in a White Duroc×Erhualian F2 intercross and Chinese Sutai pigs. *PLoS One.* 2013. 8(5): e 64047.

7. Lomiwes D., et al., Small heat shock proteins and their role in meat tenderness: a review. *Meat Sci*, 2014. **96**(1): p. 26-40.

8. Maltin C, Balcerzak D, Tilley R, and Delday M. Determinants of meat quality: tenderness. *Proc Nutr Soc.* 2003. 62(2):337-47.

9. Huff-Lonergan E and Lonergan S.M. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Sci.* 2005. 71(1):194-204.

10. Jurie C, Picard B, Hocquette JF, Dransfield E, Micol D, and Listrat A. Muscle and meat quality characteristics of Holstein and Salers cull cows. *Meat Sci.* 2007. 77(4): p 459-66.

11. Daley C.A, Abbott A, Doyle P.S, Nader G.A, and Larson S. A review of fatty acid profiles and antioxidant content in grass-fed and grain-fed beef. *Nutr J.* 2010. 10;9:10. doi: 10.1186/1475-2891-9-10.

12. Buege, D. R. 1988. Pricing and value of Holstein beef. *Meat Facts and Analysis* 88-1. 7 pp. Univ. WI-Extension.

13. Nour, A. Y. M., M. L. Thonney, J. R. Stouffer, and W. R. C. White. 1983a. Changes in carcass weight and characteristics with increasing weight of large and small cattle. *J. Anim. Sci.* 57:1154-1165.

14. Page BT, Casas E, Heaton MP, Cullen NG, Hyndman DL, Morris CA, et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of animal science*. 2002; 80(12): 3077-85.
15. Bonilla CA, Rubio MS, Sifuentes AM, Parra-Bracamonte GM, Arellano VW, Mendez MR, et al. Association of CAPN1 316, CAPN1 4751 and TG5 markers with bovine meat quality traits in Mexico. *Genetics and molecular research : GMR*. 2010; 9(4): 2395-405.
16. Van Eenennaam AL, Li J, Thallman RM, Quaas RL, Dikeman ME, Gill CA, et al. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *Journal of animal science*. 2007; 85(4): 891-900.
17. Calvo JH, Iguacel LP, Kirinus JK, Serrano M, Ripoll G, Casasus I, et al. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat science*. 2014; 96(2 Pt A): 775-82.
18. Allais S, Leveziel H, Payet-Duprat N, Hocquette JF, Lepetit J, Rousset S, et al. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds. *Journal of animal science*. 2010; 88(2): 446-54.
19. Allais S, Journaux L, Leveziel H, Payet-Duprat N, Raynaud P, Hocquette JF, et al. Effects of polymorphisms in the calpastatin and mu-calpain genes on meat tenderness in 3 French beef breeds. *Journal of animal science*. 2011; 89(1): 1-11.
20. Thaller G, Kuhn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, et al. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal genetics*. 2003; 34(5): 354-7.
21. Pannier L, Mullen AM, Hamill RM, Stapleton PC, Sweeney T. Association analysis of single nucleotide polymorphisms in DGAT1, TG and FABP4 genes and intramuscular fat in crossbred *Bos taurus* cattle. *Meat science*. 2010; 85(3): 515-8.