

THE EFFECT OF THE *CAST*/ *MSPI*, *HINFI*, *RSAL* GENE AND INTERACTION BETWEEN *CAST* AND *RYRI* GENES ON QUALITATIVE TRAITS

Kluzáková E., Dvořáková V., Stupka R., Šprysl M., Čítek J., Okrouhlá M., Brzobohatý L.

Czech University of Life Sciences Prague, Czech Republic

kluzakova@af.czu.cz

Abstract

The aim of this study was performed association analyses between polymorphisms of *calpastatin* identified with *HinfI*, *MspI* and *RsaI* restriction endonucleases in pigs and meat quality characteristics and also interaction between *CAST* and *RYRI* genes. The investigations were conducted on 470 pigs. Some meat quality characteristics, electric conductivity, temperature, pH and drip loss were determined. Statistically significant influence of *CAST*/*HinfI* genotype on electric conductivity ($P < 0,001$) were found. Moreover, the results of *CAST*/*MspI* show similar effect on this trait. Moreover, it was found the interaction between *CAST*/*MspI* and *RYRI* on drip loss ($P < 0,04$).

Key Words: pig, *CAST*, *RYRI*, polymorphism, allele, qualitative traits

V současné době je konzumenty požadována vysoká kvalita vepřového masa. Ta je podmíněna složitým komplexem znaků, které jsou závislé na druhu, genetickém pozadí, metabolických procesech (*antemortem*), proteinových komplexech ve svalech, vlivu životního prostředí atd. (Ciobanu et al., 2004). Mezi důležité faktory ovlivňující kvalitu vepřového masa patří řada kandidátních/příčinných genů, jako je například kandidátní gen *calpastatin* (*CAST*) či příčinný gen ryandinového receptoru (*RYRI*). Ty ovlivňují senzorké a fyzikální ukazatele, mezi které řadíme např. vzhled, barva, chuť, obsah tuku, textura, pH, elektrická vodivost a teplota.

Ernst et al., (1998) lokalizovali prasečí *CAST* na chromozomu 2 a identifikovali tři polymorfismy pomocí restrikčních enzymů *MspI*, *HinfI*, *RsaI*. Gen má 30 exonů a je dlouhý přes 160 kb (databáze Ensembl). Gen *CAST* ovlivňuje calpain systém prostřednictvím zejména dvou enzymů a to μ -calpain a m-calpain. Tento komplex ovlivňuje rozklad svalových bílkovin v období *post mortálních* změn (Kristen et al., 2002). Navíc calpain proteázy mají důležitý vliv na výměnu látek ve svalu (Melody et al., 2004).

Asociační studie genu *CAST*, *RYRI* a kvalitativními znaky jatečné hodnoty u prasat publikovala řada autorů. Ciobanu et al. (2004) našli statisticky průkazný vliv *calpastatinu* na řadu kvalitativních ukazatelů masa, jako je křehkost a šťavnatost masa. Krzęcio et al. (2008, 2005) uvádějí významný vliv genu *CAST*/*RsaI* na kvalitu masa a s tím spojené fyzikální hodnoty a to na pH a elektrickou vodivost. Mezi další autory, kteří provedli asociační studii u genu *CAST* a kvalitativními znaky jatečné hodnoty patří například Kurył et al. (2003) či Koćwin-Polsiadła et al. (2003). Koćwin-Polsiadła et al. (2003) provedli asociační studii s cílem prozkoumat interakce mezi polymorfismem genu *CAST* pomocí restrikčních

enzymů *MspI*, *HinfI*, *RsaI* a genem *RYRI* na kvalitu vepřového masa. Autoři uvádějí, že našli statisticky průkazné interakce mezi genem *CAST* a *RYRI* na hodnotu pH_{45} (*CAST*/*RsaI* x *RYRI*) a odkap (*CAST*/*HinfI* x *RYRI*).

Cílem této práce bylo provést genotypování u tří polymorfismů genu *CAST*/*MspI*, *HinfI*, *RsaI* a genu *RYRI*, provést asociační analýzu genu *CAST* při zahrnutí vlivu genu *RYRI* a otestovat případné interakce mezi těmito geny na kvalitativní ukazatele jatečné hodnoty prasat.

Materiál a metodika

Na pokusné testovací stanici Katedry speciální zootechniky ČZU v Praze byly provedeny testace jatečných prasat u následujících kombinací kříženců: (BUxL)x(PNxBO) – 36 prasat, (BUxL)x(BOxPN) – 64 prasat, (BUxL)x(BOxD) – 72 prasat, (BUxL)xPIC – 36 prasat, (BUxL)xPN – 155 prasat, PICxFH – 62 prasat, BUxL – 23 prasat a jednoho plemene BU – 22 prasat (celkem 470 prasat). Prasata byla naskladněna v živé hmotnosti 30 kg a poražena v cca 108 kg živé hmotnosti. Výživa u všech jatečných prasat v testu probíhala podle norem potřeby živin (Šimeček et al., 2000) *ad-libitně* (324 ks) a dávkovaně (146 ks). Při porážce byl proveden běžný jatečný rozbor (Walsta a Mercus, 1995) a odebrána krev. Po porážce zvířete byly zjištěny následující hodnotící ukazatelé:

- elektrická vodivost v MLLT (*musculus longissimus lumborum et thoracis*) a MS (*muculus semimembranosus*) (přístrojem LATKA, 50 minut *post mortem*) v mS^{-1} ,
- teplota (pomocí vpichového pH metru 330i v MLLT v místě posledního hrudního obratle) v $^{\circ}\text{C}$,

- pH₄₅ (pomocí vpichového pH metru 330i v MLLT v místě posledního hrudního obratle),
- odkap (procentuální podíl hmotnosti odkapané masové šťávy z celkové hmotnosti vzorku za 24 hodin při teplotě 4 a 6°C) v procentech.

Po odebrání byla krev ošetřena chemickou látkou EDTA a následně byla izolována vysokomolekulární DNA. Pro genotypování genu *CAST* byly převzaty primery od Ernst et al. (1998). Byla vytvořena reakční směs (25µl) o obsahu: 100 ng genomické DNA, standard PCR buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM od každého dNTP, 10 pmol primery, 2% DMSO a 1,0 U LA DNA polymerase (Top Bio, Praha, ČR). Podmínky cyklování: 2 min při 95 °C, následovalo 32 cyklů: 95 °C (1 min), 58,5 °C (1 min), 68 °C (1 min) a závěrečná elongace 68 °C (7 min). PCR produkt byl štěpen třemi restrikcími enzymy a byly získány fragmenty o přibližné délce *MspI* (~C -760/D -370), *HinfI* (~A -790/B -500) a *RsaI* (~E -360/F -250).

Výsledky byly vyhodnoceny matematicko-statistickým programem SAS (9.1 institute) procedurou GLM. Byl použit model, který zahrnoval následující fixní efekty: kombinaci křížence, pohlaví a výživu, jako kovarianta byla použita hmotnost jatečně upraveného těla.

$$Y_{ijklmn} = \mu + a_i | b_j + c_k + d_l + e_m + \beta X_n + e_{ijklmn}$$

Y_{ijklmn} = znak jatečné hodnoty;

μ = celkový průměr;

a_i = vliv genotypu genu *CAST* ($i = 1, 2, 3$);

b_j = vliv genotypu genu *RYRI* ($j = 1, 2, 3$);

c_k = vliv kombinace křížence ($k = 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8$);

d_l = vliv pohlaví ($l = 1, 2$);

e_m = vliv výživy ($m = 1, 2$);

β = regresní koeficient na hmotnost JUT;

X_n = hmotnost JUT zvířete n;

e_{ijklmn} = náhodná chyba.

Výsledky a diskuze

Byly získány fragmenty genu *CAST* očekávané délky: *MspI* (neštěpená alela C - 275+407+749, štěpená alela D

- 275+407+105+369+275), *HinfI* (neštěpená alela A - 163+513+755, štěpená alela B - 163+513+174+370+211), *RsaI* (neštěpená alela E - 998+345+89, štěpená alela F - 998+163+182+89) a fragmenty genu *RYRI* (neštěpená alela T - 134 a štěpená alela C - 84+50). V předkládané studii byla vytvořena asociační analýza mezi genem *CAST* u tří polymorfismů a genem *RYRI* a mezi těmito geny bylo provedeno vyhodnocení vlivu zmíněných genů a jejich interakcí.

V asociační analýze byl nalezen vliv genu *CAST* na elektrickou vodivost. Statisticky průkazný vliv byl nalezen mezi genem *CAST/HinfI* a elektrickou vodivostí v MLLT. Stejný trend byl nalezen i u elektrické vodivosti MS (statisticky neprůkazné) (tab. 1). Podobné výsledky byly nalezeny u mutace *CAST/MspI*, kde u alely C byly zjištěny nejvyšší hodnoty elektrické vodivosti v MLLT i MS. Navíc u odkapu masové šťávy byla nalezena statisticky průkazná interakce mezi mutací *CAST/MspI* a genem *RYRI*, přičemž u jedinců s alelou C byly naměřeny nejvyšší hodnoty u teploty a odkapu a naopak nejnižší hodnota u pH₄₅ (statisticky neprůkazné) (tab. 2). Tedy z tabulky 2 vyplývá, že nejhorší kvalitativní ukazatele vepřového masa budou mít jedinci s genotypem CC. Dále z této asociační studie vyplynul výrazný vliv příčinné mutace genu *RYRI* na elektrickou vodivost v MLLT, pH₄₅ a odkap (tab. 2). Naopak mezi mutací *CAST/RsaI* u znaku charakterizující kvalitu masa nebyl nalezen žádný statistický průkazný vliv. Pouze byl nalezen trend alely E na vyšší hodnoty elektrické vodivosti v MLLT a MS (tab. 3). Tento fakt si vysvětlujeme nízkou frekvencí četnosti genotypu *EE* oproti genotypu *AA* u mutace *CAST/HinfI* a genotypu *CC* u mutace *CAST/MspI* (tab. 1, 2, 3). K podobným závěrům vlivu genu *CAST* na kvalitativní znaky vepřového masa došli autoři Koćwin-Polsiadła et al. (2003), kde interakce mezi genem *CAST* a genem *RYRI* byly statisticky významné u pH₄₅ (*CAST/RsaI* x *RYRI*) a u odkapu (*CAST/HinfI* x *RYRI*). Také Krzęcio et al. (2008) uvádějí, že gen *CAST/RsaI* má významný vliv na kvalitu vepřového masa, a to na pH a elektrickou vodivost. To potvrzují další práce Koćwin-Polsiadła et al. (2003) a Krzęcio et al. (2005, 2008).

Tabulka 1. Asociační analýza mezi genem *CAST/HinfI* a genem *RYRI* a vybranými znaky kvality masa

| Ukazatel | <i>AA</i> (LSMEAN) | <i>AB</i> (LSMEAN) | <i>BB</i> (LSMEAN) | <i>CAST/HinfI</i> | <i>RYRI</i> | <i>CAST/HinfI</i> <i>RYRI</i> |
|------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------|-------------|---------------------------------|
| Evml (mS) | 6,35 (26) ^A | 4,36 (101) ^B | 4,47 (131) ^B | 0,0012 | 0,24 | 0,31 |
| Evms (mS) | 4,45 (26) | 3,98 (101) | 3,89 (131) | 0,58 | 0,24 | 0,31 |
| t (°C) | 33,55 (25) | 35,07 (104) | 34,72 (135) | 0,43 | 0,23 | 0,51 |
| pH ₄₅ | 6,39 (26) | 6,49 (95) | 6,49 (115) | 0,75 | 0,32 | 0,21 |
| Odkap (%) | 11,11(14) | 11,48 (39) | 11,89 (27) | 0,64 | 0,14 | 0,48 |

Evml – elektrická vodivost v *musculus longissimus lumborum et thoracis*, Evms – elektrická vodivost v *muculus semimembranosus*, ^{A,B} difference mezi skupinami - P<0,0001

Tabulka 2. Asociační analýza mezi genem *CAST/MspI* a genem *RYR1* a vybranými znaky kvality masa

| Ukazatel | CC (LSMEAN) | CD (LSMEAN) | DD (LSMEAN) | <i>CAST/MspI</i> | <i>RYR1</i> | <i>CAST/MspI RYR1</i> |
|------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-----------------------|
| Evml (mS) | 4,83 (64) | 4,40 (163) | 4,42 (104) | 0,11 | <,0001 | 0,15 |
| Evms (mS) | 4,10 (64) | 4,03 (163) | 3,85 (104) | 0,52 | 0,22 | 0,97 |
| t (°C) | 35,01 (70) | 34,72 (147) | 34,04 (107) | 0,14 | 0,64 | 0,11 |
| pH ₄₅ | 6,35 (69) | 6,37 (137) | 6,39 (96) | 0,84 | 0,001 | 0,90 |
| Odkap (%) | 13,32 (32) | 10,83 (41) | 11,35 (19) | 0,07 | 0,001 | 0,04 |

Evml – elektrická vodivost v *musculus longissimus lumborum et thoracis*, Evms – elektrická vodivost v *mutulus semimembranosus*

Tabulka 3. Asociační analýza mezi genem *CAST/RsaI* a genem *RYR1* a vybranými znaky kvality masa

| Ukazatel | EE (LSMEAN) | EF (LSMEAN) | FF (LSMEAN) | <i>CAST/RsaI</i> | <i>RYR1</i> | <i>CAST/RsaI RYR1</i> |
|------------------|----------------|----------------|----------------|------------------|-------------|-----------------------|
| Evml (mS) | 5,55(16) | 4,55 (154) | 4,83 (40) | 0,40 | 0,001 | 0,38 |
| Evms (mS) | 5,09(16) | 4,22 (154) | 4,40 (40) | 0,61 | 0,71 | 0,62 |
| t (°C) | 33,50 (20) | 34,67 (158) | 34,36 (40) | 0,34 | 0,05 | 0,17 |
| pH ₄₅ | 6,33 (20) | 6,23(132) | 6,28 (36) | 0,56 | 0,63 | 0,15 |
| Odkap (%) | 9,54 (12) | 8,83 (38) | 10,70(18) | 0,52 | 0,79 | 0,82 |

Evml – elektrická vodivost v *musculus longissimus lumborum et thoracis*, Evms – elektrická vodivost v *mutulus semimembranosus*

Závěr

Cílem práce bylo provést asociační analýzu mezi genem *CAST/MspI*, *HinfI*, *RsaI* při zahrnutí vlivu genu *RYR1* a otestovat případné interakce mezi těmito geny na kvalitativní ukazatele jatečné hodnoty prasat. Z dosažených výsledků je patrné, že byl nalezen statisticky průkazný vliv calpastatinu na kvalitativní ukazatele vepřového masa. Nejvíce průkazné hodnoty byly nelezeny u mutace *CAST/HinfI* (nejvyšší hodnoty elektrické vodivosti v MLLT a MS, a nejnižší hodnota pH₄₅ u jedinců s genotypem AA). Podobný trend byl nalezen i mutace *CAST/MspI* (nejvyšší hodnoty elektrické vodivosti v pečení a kotletě, teploty včetně odkapu a nejnižší hodnota pH₄₅ u jedinců s genotypem CC). Naopak nebyl nalezen statistický průkazný vliv mutace *CAST/RsaI* ani interakce s genem *RYR1* (kromě odkapu). Tento skutečnost si vysvětlujeme nízkou četností testovaných genotypů.

Přehled literatury

CIOBANU DC, BASTIAANSEN JW, LONERGAN SM, THOMSEN H, DEKKERS JC, PLASTOW GS, ROTHSCHILD MF 2004: New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *J Anim Sci* 82, 2829 – 2839.

ERNST CW, ROBIC A, YERLE M, WANG L, ROTHSCHILD MF 1998: Mapping of calpastatin and three microsatellites to porcine chromosome 2q2.1-q2.4. *Anim Genet* 29, 212 – 215.

KOĆWIN-PODSIADŁA M, KURYŁ J, KRZĘCIO E, ZYBERT A, PRZYBYLSKI W 2003: The interaction between calpastatin and *RYR1* genes for some pork quality traits. *Meat Sci* 65, 731 – 735.

KRISTENSEN L, THERKILDSEN M, RIIS B, SØRENSEN MT, OKSBJERG N, PURSLOW PP, ERTBJERG E 2002: Dietary-induced changes of muscle growth rate in pigs: Effects on in vivo and postmortem muscle proteolysis and meat quality. *J Anim Sci* 80, 2862 – 2871.

KRZĘCIO E, KURYŁ J, KOĆWIN-PODSIADŁA M, MONIN G 2005: Association of calpastatin (*CAST/MspI*) polymorphism with meat quality parameters of fatteners and its interaction with *RYR1* genotypes. *J Anim Breed Genet* 122, 251 – 258.

KRZĘCIO E, KOĆWIN-PODSIADŁA M, KURYŁ J, ZYBERT A, SIECZKOWSKA H, ANTOSIK K 2008: The effect of interaction between genotype *CAST/RsaI* (calpastatin) and *MYOG/MspI* (myogenin) on carcass and meat quality in pigs free of *RYR1*^T allele. *Meat Sci* 80, 1106 – 1115.

KURYŁ J, KAPELAŃSKI W, PIERZCHAŁA M, GRAJEWSKA S, BOCIAN M 2003: Preliminary observations on the effect of calpastatin gene (*CAST*) polymorphism on carcass traits in pigs. *Anim Sci Pap Rep* 21, 87 – 95.

Melody JL, Lonergan SM, Rowe J, Huiatt TW, Mayes MS, Huff-Lonergan E 2004: Early postmortem biochemici influence tenderness and waterholdingcapacity of free porcine muscles. Journal of Animal Science, 82, 1195-1205.

SAS[®] Propriety Software Release 9.01 of the SAS[®] systém for Microsoft[®] Windows[®]. SAS Institute Inc., Cary, NC., 2001.

ŠIMEČEK K, ZEMAN L, HEGER J 2000: Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro prasata. MZLU v Brně: 124.

WALSTRA P, MERKUS GSM 1995: Procedure for assessment of the lean meat percentage as a consequence of the new EU reference dissection method in pig carcass classification. DLO- Research Institute for Animal Science and Health Research Branch, Zeist, The Netherlands, 1 – 22.

Článek vznikl v rámci řešení výzkumného záměru MSM 6046070901.