

## POLIMORFIZM GENU KALPASTATYNY W POPULACJI OWIEC RASY MERYNOS POLSKI\*

Magdalena Szkudlarek-Kowalczyk, Ewa Wiśniewska,  
Sławomir Mroczkowski

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy,  
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

*Niektóre badania wykazały, że polimorficzne warianty genu kalpastatyny są powiązane z cechami takimi, jak masa ciała jagniąt przy urodzeniu oraz tempo wzrostu do momentu odsadzenia, co jest bardzo ważne przy dominującym obecnie mięsnym kierunku użytkowania owiec. Dlatego też celem badań było określenie polimorfizmu w genie kalpastatyny (CAST) w grupie 206 owiec rasy merynos polski, pochodzących z sześciu stad utrzymywanych na terenie województwa kujawsko-pomorskiego. Polimorfizm w owczym genie kalpastatyny został zidentyfikowany metodą PCR-RFLP według metodyki Palmera i in. (1998). Zamplikowany produkt o długości 622 pz poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi MspI i NcoI. Częstość allele M/MspI wyniosła średnio 84,5% i wahała się w granicach od 74,7 do 100,0% w zależności od stada, natomiast częstość allele M/NcoI wyniosła średnio 99,5% w badanej grupie owiec (od 96,9 do 100,0% w poszczególnych stadach).*

Kalpastatyna jest endogennym inhibitorem endogennych proteaz sakroplazmatycznych – kapalin. Układ kalpainowy złożony jest z kilku form izomerowych kapalin zależnych od stężenia jonów wapnia oraz ich specyficznego inhibitora – kalpastatyny. Kalpastatyna hamując aktywność kapalin w istotny sposób wpływa na proces kruszenia mięsa podczas jego dojrzewania (Kończak, 2008). Badania przeprowadzone na owcach wykazały, że istnieje powiązanie pomiędzy genotypami tego genu identyfikowanymi metodą PCR-SSCP, a cechami takimi jak: masa ciała przy urodzeniu oraz tempo wzrostu do momentu odsadzenia (Byun i in., 2008), a także tempem wzrostu w poszczególnych okresach życia jagniąt (Nassiry i in., 2006). Wykazano także związek między polimorfizmem genu CAST (identyfikowanym metodą PCR-RFLP), a jakością mięsa innych gatunków zwierząt gospodarskich, m.in. bydła (Juszczuk-Kubiak i in., 2004) i świń (Kurył i in., 2003). U świń stwierdzono, że najcieńszą słoniną w niektórych punktach pomiaru oraz najmniejszą zawartością słoniny w połędwicy charakteryzowały się zwierzęta o genotypie DD w locus CAST/MspI i EF w locus CAST/RsaI. Z kolei zwierzęta o genotypach DD w locus CAST/MspI i FF w locus CAST/RsaI były najlepsze pod względem powierzchni „oka” połędwicy. Podobną zależność odnotowano dla masy mięsa w półtuszy (Kurył i in., 2003). Badania przeprowadzone na bydle dowiodły natomiast, że mięso zwierząt o genotypie GC

---

\*Praca naukowa współfinansowana w ramach Projektu „Stypendia dla doktorantów 2008/2009 – ZPORR” współfinansowanego przez Unię Europejską z Europejskiego Funduszu Społecznego oraz Budżetu Państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego.

identyfikowanym przez enzym restrykcyjny *AluI* okazało się najmniej wartościowe pod względem kulinarnym. Charakteryzowało się ono większym wyciekaniem termicznym niż stwierdzony w mięsie buhajów o genotypie CC i GG. Mięso buhajów GC było ciemniejsze niż mięso zwierząt o genotypie GG. Ogólna zawartość barwników hemowych oznaczona metodą Hornsey'a była najwyższa w mięsie buhajów o genotypie GC i różniła się od stwierdzonej w mięsie zwierząt CC (Juszczuk-Kubiak i in., 2004).

W Polsce dotychczas podjęto badania mające na celu identyfikację genotypów genu *CAST* w następujących rasach owiec: plenna owca olkuska, polska owca górską, suffolk, polska owca długowłnista oraz u mieszańców (F1) merynos polski × owca romanowska (Kaczor, 2006) i w populacji plenno-mięsnych owiec linii syntetycznych BCP i SCP (Greguła-Kania i Gruszecki, 2007). Nie ma natomiast wiadomości na temat frekwencji alleli genu *kalpastatyny* w populacji merynosa polskiego, dominującej rasy owiec w województwie kujawsko-pomorskim, jak też jednej z najliczniej reprezentowanych w Polsce. Rasa ta przeznaczona jest do użytkowania zarówno wełnistego, jak i mięsnego. Jednak w obecnych realiach polskiego owczarstwa bardziej interesujący dla hodowców, z ekonomicznego punktu widzenia, jest mięsny kierunek użytkowania owiec merynosowych. Celem podjętych badań było określenie polimorfizmu genu *kalpastatyny* w grupie 206 owiec rasy merynos polski.

### Material i metody

Badaniom poddano 206 owiec (12 tryków i 194 maciorki) rasy merynos polski pochodzących z 6 stad utrzymywanych na terenie województwa kujawsko-pomorskiego w standardowych warunkach środowiskowo-żywniowych. Materiał biologiczny stanowiła krew obwodowa pobrana z żyły jarzmowej do probówek zawierających antykoagulant  $K_2EDTA$ . DNA wyizolowano z krwi przy użyciu zestawu odczynników Master Pure DNA Purification Kit for Blood (Epicentre Biotechnologies) według instrukcji producenta. DNA powielono następnie za pomocą techniki PCR według metodyki Palmera i in. (1998). Zamplifikowany produkt o długości 622 pz poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi: *MspI* i *NcoI* (Fermentas). Trawienie tymi endonukleazami pozwoliło rozróżnić allele M i N. Enzym *MspI* rozpoznając allel M ciął produkt na fragmenty o długości 336 pz i 286 pz, natomiast enzym *NcoI* wykrywając allel N powodował powstanie produktów o długości 374 pz i 248 pz (Palmer i in., 1998).

Rozdział produktów trawienia przeprowadzono w 1,5% żelu agarozowym w buforze  $1\times TBE$  przez 60 minut, pod napięciem 120 V w obecności markera wielkości pUC19 DNA/*MspI* (Fermentas). Wyliczono następnie frekwencje alleli i genotypów genu *kalpastatyny* (*MspI* i *NcoI*) dla całej badanej grupy zwierząt oraz w obrębie płci i poszczególnych stad.

### Wyniki

Przeprowadzona analiza molekularna wykazała obecność alleli M i N w *locus* *CAST/MspI* w czterech spośród sześciu stad poddanych badaniom własnym, natomiast dwa z nich (stado I i III) okazały się być homozygotyczne pod względem allela

M. Allel N identyfikowany przez restryktazę *NcoI* wykryto tylko w jednym stadzie owiec merynosowych (nr IV), a jego średnia częstość dla całej grupy wyniosła tylko 0,5% (Tab. 1). Ponadto, tylko w dwóch stadach (V i VI) wykryto genotypy NN w *locus* CAST/*MspI*. W żadnym z sześciu stad nie zidentyfikowano natomiast genotypów NN w *locus* CAST/*NcoI*.

Tabela 1. Frekwencje (%) alleli genu kalpastatyny w zależności od stada owiec merynosowych  
Table 1. Frequencies (%) of calpastatin gene alleles according to the flock of Merino sheep

Stado Flock	Allel Allele	<i>MspI</i> (%)	<i>NcoI</i> (%)
I	M	100,0	100,0
	N		
II	M	90,0	100,0
	N	10,0	
III	M	100,0	100,0
	N		
IV	M	90,6	96,9
	N	9,4	3,1
V	M	74,7	100,0
	N	25,3	
VI	M	84,0	100,0
	N	16,0	
Razem	M	84,5	99,5
Total	N	15,5	0,5

Tabela 2. Frekwencje (%) genotypów genu kalpastatyny w zależności od stada owiec merynosowych  
Table 2. Frequencies (%) of calpastatin genotypes according to the flock of Merino sheep

Stado Flock	Genotyp Genotype	<i>MspI</i> (%)	<i>NcoI</i> (%)
I (n = 12)	MM	100,0	100,0
	MN		
	NN		
II (n = 20)	MM	80,0	100,0
	MN	20,0	
	NN		
III (n = 18)	MM	100,0	100,0
	MN		
	NN		
IV (n = 32)	MM	81,0	93,7
	MN	19,0	6,3
	NN		
V (n = 77)	MM	53,2	100,0
	MN	42,9	
	NN	3,9	
VI (n = 47)	MM	70,2	100,0
	MN	27,7	
	NN	2,1	
Razem	MM	70,9	99,0
Total (n = 206)	MN	27,2	1,0
	NN	1,9	

Tabela 3. Frekwencje (%) alleli genu kalpastatyny w zależności od płci owiec merynosowych  
 Table 3. Frequencies (%) of calpastatin gene alleles according to the sex of Merino sheep

Płeć Sex	Allel Allele	<i>MspI</i> (%)	<i>NcoI</i> (%)
Tryki Rams	M	87,5	91,7
Maciorki Ewes	N	12,5	8,3
	M	84,3	100,0
	N	15,7	

Tabela 4. Frekwencje (%) genotypów genu kalpastatyny w zależności od płci owiec merynosowych  
 Table 4. Frequencies (%) of calpastatin genotypes according to the sex of Merino sheep

Płeć Sex	Genotyp Genotype	<i>MspI</i> (%)	<i>NcoI</i> (%)
Tryki Rams	MM	75,0	83,3
(n = 12)	MN	25,0	16,7
	NN		
Maciorki Ewes	MM	70,6	100,0
(n = 194)	MN	27,3	
	NN	2,1	

Genotyp *MM/MspI* wystąpił ze średnią częstością 70,9%, a *MN* i *NN* w tym *locus* z częstością odpowiednio 27,2% i 1,9%. Frekwencja genotypów w *locus CAST/MspI* na poziomie zbliżonym do średniej całej populacji owiec objętej badaniami własnymi wystąpiła tylko w stadzie VI. Co ciekawe, wszystkie allele wystąpiły w grupie tryków, a w grupie maciorek nie stwierdzono obecności allele *N/NcoI* (Tab. 3).

### Omówienie wyników

Badania przeprowadzone przez Kaczor (2006) na grupie mieszańców merynos polski × owca romanowska wykazały występowanie genotypów *MM*, *MN* i *NN* w *locus CAST/MspI* z częstością zbliżoną, jak w badanej populacji zwierząt, która wyniosła 68%, 27% i 5% odpowiednio dla genotypów *MM*, *MN* i *NN*. Podobnie jak w objętej badaniami własnymi populacji owiec merynosowych, frekwencje alleli *M* i *N* w *locus CAST/MspI* z częstością 85% i 15% oraz genotypów *MM*, *MN* i *NN* z częstością odpowiednio 70,27%, 28,82% i 0,9% wystąpiły w grupie 111 tryków rasy Arabic utrzymywanych w Iranie (Mohhamadi i in., 2008). Ponadto, frekwencje alleli i genotypów identyfikowane restryktazą *MspI* zbliżone do wykrytych w grupie tryków poddanych badaniom własnym wystąpiły w grupie irańskich owiec rasy Kurdi i wyniosły 88% i 12% odpowiednio dla alleli *M* i *N*, oraz 76% i 24% dla genotypów *MM* i *MN* (Nassiry i in., 2007).

Generalnie większy polimorfizm genu kalpastatyny w *locus CAST/MspI* oraz *CAST/NcoI* obserwowano w stadach: V i VI. Powodem mniejszego zróżnicowania genotypów kalpastatyny w stadach: I, II, III i IV w porównaniu ze stadami V i VI mogła być ich mniejsza liczebność. W konsekwencji, w stadach V w danym sezo-

nie użytkowano rozplodowo mniej tryków (od 2 do 3), co prawdopodobnie mogło wpłynąć na zmniejszenie różnorodności genotypów kalpastatyny.

Wyższe od średnich frekwencje alleli genu kalpastatyny dla owiec merynosowych objętych badaniami własnymi zidentyfikowano w *locus* CAST/*MspI* w populacji 95 owiec ras: tsigai, valachian, east fresian, lacaune oraz mieszańców tsigai i lacaune utrzymywanych na terenie Słowacji. Allele M i N wystąpiły z częstością odpowiednio 94% i 6% (Gábor i in., 2009).

W odróżnieniu od badań własnych, w których frekwencja allela N/*MspI* była niska i wahała się od 0 do 25,3% w poszczególnych stadach (średnio 15,5% dla całej grupy), w badaniach przeprowadzonych przez Elyasi i in. (2009) na grupie 137 owiec ras: Ghezel, Arkhamerino i ich mieszańców, częstość tego allela była dość wysoka i wynosiła od 31% w grupie owiec rasy Ghezel do 52% w grupie owiec rasy Arkhamerino, średnio aż 47% dla całej badanej grupy owiec (Elyasi i in., 2009).

W znanej literaturze nie odnotowano dotychczas informacji na temat frekwencji alleli i genotypów w owczym genie kalpastatyny identyfikowanych przy użyciu restryktazy *NcoI*.

Polimorfizm w owczym genie CAST identyfikowano również przy użyciu metody PCR-SSCP (Byun i in., 2008; Nassiry i in., 2006). W badaniach tych stwierdzono obecność trzech alleli: A, B i C. Wykazano również, że ww. allele są powiązane z cechami takimi jak: masa ciała jagniąt przy urodzeniu i tempo wzrostu do momentu odsadzenia (Byun i in., 2008) oraz przyrosty dobowe w poszczególnych okresach życia jagniąt (Nassiry i in., 2006). Dlatego też przypuszcza się, że polimorfizm w owczym genie kalpastatyny identyfikowany metodą PCR-RFLP może istotnie wpływać na cechy mięsne jagniąt. Z tego względu konieczne jest wykonanie badań na większej populacji zwierząt oraz przeprowadzenie oceny przyżyciowej i analizy poubojowej jagniąt celem stwierdzenia powiązań lub ich braku z polimorficznymi wariantami występującymi w genie kalpastatyny owiec.

#### Piśmiennictwo

- Byun S.O., Zhou H., Forrest R.H., Frampton C.M., Hickford J.G. (2008). Association of the ovine calpastatin gene with birth weight and growth rate to weaning. *Anim Genet.*, 39 (5): 572–573.
- Elyasi G., Shoja J., Nassiry M.R., Pirahary O., Javanmard A. (2009). Allelic and genotypic frequency of calpastatin gene in Ghezel and Arkhamerino sheep and their crossbreds. *J. New Agr. Sci.*, 4 (13), p. 3.
- Gábor M., Trakovicová A., Miluchová M. (2009). Analysis of polymorphism of CAST gene and CLPG gene in sheep by PCR-RFLP method. *Lucrari Stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*, 42 (2): 470–476.
- Greguła-Kania M., Gruszecki T.M. (2007). Analiza polimorfizmu w genie kalpastatyny u owiec linii syntetycznych BCP I SCP. *Mat. konf. LXXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego im. Michała Oczapowskiego*, Warszawa, 11–16.09.2007.
- Juszczuk-Kubiak E., Rosochaci S.J., Wicińska K., Szreder T., Sakowski T. (2004). A novel RFLP/*AluI* polymorphism of the bovine calpastatin (CAST) gene and its association with selected traits of beef. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 22 (2): 195–204.
- Kaczor U. (2006). Identyfikacja polimorfizmu (*MspI*) genu kalpastatyny (*locus* CAST) w wybranych populacjach owiec. *Mat. konf. LXXI Zjazdu Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, Bydgoszcz, 18–20.09.2006, *Kom. Nauk.*, 4, s. 16.

- Kończak T. (2008). Jakość wołowiny. ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość, 1 (56): 5–22.
- 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 (2): 87–95.
- Mohammadi M., Beigi Nasir I.M.T., Alami-Saeid K., Fayazi J., Mamoe M., Sadr A.S. (2008). Polymorphism of calpastatin gene in Arabic sheep using PCR-RFLP. Afr. J. Biotechnol., 7 (15): 2682–2684
- Nassiry M.R., Tahmoorespour M., Javadmanesh A., Soltani M., Far S.F. (2006). Calpastatin polymorphism and its association with daily gain in Kurdi sheep. Iran. J. Biotechnol., 4 (3): 188–192.
- Nassiry M.R., Shahrودي F.E., Tahmoorespour M., Javadmanesh A. (2007). Genetic variability and population structure in beta-lactoglobulin, calpastatin and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. Pak. J. Biol. Sci., 10 (7): 1062–1067.
- Palmer B.R., Roberts N., Hickford J.G., Bickerstaffe R. (1998). Rapid communication: PCR-RFLP for *MspI* and *NcoI* in the ovine calpastatin gene. J. Anim. Sci., 76: 1499–1500.

Zatwierdzono do druku 19 VI 2011

MAGDALENA SZKUDLAREK-KOWALCZYK, EWA WIŚNIEWSKA,  
SŁAWOMIR MROCZKOWSKI

### Polymorphisms of the calpastatin gene in Polish Merino sheep

#### SUMMARY

Some studies have shown that polymorphic variants of calpastatin gene are associated with characteristics such as birth weight of lambs and growth rate until weaning. These characteristics are very important considering the dominant meat-type breeding of sheep. Therefore, the aim of the study was to identify polymorphisms in the calpastatin gene (CAST) in 206 Polish Merino sheep from six flocks maintained in the Kujawsko-Pomorskie province. Polymorphism in the ovine calpastatin gene was identified using the PCR-RFLP method in accordance with the method described by Palmer et al. (1998). Amplified product of 622 bp was digested with restriction enzymes *MspI* and *NcoI*. The frequency of *M/MspI* allele averaged 84.5% and ranged from 74.7% to 100.0% depending on the flock, while the frequency of *M/NcoI* allele averaged 99.5% in the tested group of sheep (from 96.9% to 100,0% in different flocks).

Key words: sheep, polymorphism, calpastatin, PCR-RFLP