

ANALYSIS OF THE SELECTED GENES INFLUENCING QUALITY PORK PRODUCTION

ANALÝZA VYBRANÝCH GENŮ OVLIVŇUJÍCÍCH MASNOU UŽITKOVOST PRASAT

Verner J., Knoll A.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00, Brno, Česká republika

E-mail: verjan2@post.cz

ABSTRACT

Porcine *MYF-4*, *MYF-5*, *GDF-8* and *IGF-2* genes play key roles in growth and muscle development regulation and are considering to be candidate genes. To verify these polymorphisms, Large White and Landrace breeds of pigs were tested. There were studied these meat characteristics: weights of neck, loin, shoulder and ham, lean meat content and back-fat thickness. To compare some meat characteristics between obtained genotypes, it was used the mixed models procedure of SAS 8.2 including following effects: *MYF-4* and *IGF-2* genes, breed, sex and year of the slaughter. Significant associations within Landrace breed were found out.

Keywords: *MYF-4*, *IGF-2*, pig, meat production

ABSTRAKT

Pod kontrolou genů *MYF-4*, *MYF-5*, *GDF-8* a *IGF-2* je regulován růst a svalový vývoj. Všechny tyto geny jsou považovány za kandidátní. Na ověření polymorfismů těchto genů byla testována prasata plemen bílé ušlechtilé a landrase. Byly sledovány tyto znaky masné produkce: hmotnost krkovice, kotlety, plece a kýty, podíl hlavních masitých částí a výška hřbetního tuku. K porovnání znaků masné užitkovosti mezi genotypy byla použita metoda smíšeného modelu programu SAS verze 8.2 s těmito efekty: *MYF-4* a *IGF-2*, plemeno, pohlaví a rok porážky. U plemene landrase byly zjištěny významné rozdíly.

Klíčová slova: *MYF-4*, *IGF-2*, prase, masná produkce

ÚVOD

Masná užitkovost je u prasat ovlivňována mnoha faktory a souvisí s počtem svalových vláken tvořících se během embryonálního vývoje proliferací a diferenciací myoblastů. Diferenciace a formování svalových vláken během myogeneze jsou determinovány zejména genetickými faktory a do jisté míry také těmi faktory prostředí, které jsou schopny ovlivnit prenatální myogenezi (Rehfeldt *et al.*, 2000). Počet svalových vláken (myofibril) při narození se zdá být určující pro maximální kapacitu libového masa, což potvrzují i současné výzkumy

naznačující, že zvířata s větším počtem svalových vláken průměrné velikosti produkují více masa lepší kvality (Händel a Stickland, 1984, 1988 - cit. Te Pas a Visscher, 1994). Z hlediska genové determinace působí na tvorbu svaloviny tzv. MYOD rodina svalově specifických regulačních faktorů, růstově regulační faktory podobné inzulinu (*IGF-2*) a nebo transformační; růstové faktory β (*GDF-8*). Tyto geny jsou považovány za kandidátní pro masnou užitkovost z hlediska jejich klíčového významu v diferenciaci myofibril. MYOD rodina zahrnuje čtyři myogenní faktory: *MYF-3*, *MYF-4*, *MYF-5* a *MYF-6*. Gen *MYF-3* (myoblasty determinující protein 1) plní hlavní funkci ve fúzení fibroblastů v myoblasty (Knoll, 2002). Diferenciace myoblastů v myofibrily se děje pod kontrolou genu *MYF-4* (myogeninu) (Hasty *et al.*, 1993), u něhož se předpokládá, že by mohl být ve vztahu k proměnlivosti počtu tvořených svalových vláken, vedoucí k proměnlivosti v množství svalů a tudíž i k hmotnosti libového masa (Soumilion *et al.*, 1997). Te Pas *et al.* (1999) zjistili asociaci polymorfismu genu *MYF-4* u prasat plemene Yorkshire s hmotností při narození, rychlostí růstu, hmotností libového masa ve 200 dnech a s výškou hřbetního tuku. Pod kontrolou genu *MYF-5*, jenž se exprimuje v dělicích se myoblastech, prochází zárodečné svalové buňky kontinuálním mitotickým dělením. Pro gen *MYF-5* statistické analýzy zatím neodhalily žádné asociace s hmotností při narození, rychlostí růstu, hmotností jatečného těla a výškou hřbetního tuku. Aktivací genů *MYF-6* a *MYF-4* (myogeninu) je započata konečná diferenciace myoblastů do svalových fibril. Teprve nedávno byl gen *MYF-6* zmapován pomocí radiačního hybridního panelu, a to na chromozómu 5 (Rohrer, 2003), přičemž v intronu 1 byly zjištěny celkem tři jednonukleotidové polymorfismy (Vykoukalová *et al.*, 2003). Gen myostatinu (*GDF-8*) je členem TGF- β superrodiny a je nezbytný pro svalový růst a vývoj. Působí jako negativní regulátor množství kosterní svaloviny tím, že blokuje funkci myogeninu a zamezuje tak tvorbě dalších svalových myofibril v embryonálním stadiu. Stratil *et al.* (1999) zjistili v oblasti promotoru mutaci T→A, která byla v asociaci s hmotností při narození u yorkshirských prasat. Yang *et al.* (2002) došli k závěru, že tato mutace může být molekulárním markerem QTL pro procento libového masa. *IGF-2* (inzulinu podobný růstový faktor 2) se považuje za kandidátní gen pro masnou užitkovost a plodnost. Jedná se o růst stimuluující peptidy, které jsou strukturními homology inzulinu, mající i obdobnou biologickou funkci. Jeho role spočívá v regulaci proliferace a diferenciaci myoblastů (Florini *et al.*, 1986, 1991; Magri *et al.*, 1994 – cit. Gerrard *et al.*, 1998). U tohoto genu se standardně testuje mutace v intronu 7. Mnohé výsledky výzkumu naznačují také možnou asociaci s ukazateli jatečného těla (obsahem libového masa) a s konverzí krmiva.

Předmětem této práce bylo studium detekce polymorfismů genů *MYF-4*, *MYF-5*, *GDF-8* a *IGF-2*, určení frekvencí jednotlivých genotypů a alel v souboru sledovaných zvířat a vyhodnocení vztahů zjištěných polymorfismů k vybraným znakům masné produkce prasat plemen bílé ušlechtilé, landrase a durok.

METODIKA A MATERIÁL

Prasečí genomová DNA byla izolována z krve ošetřené EDTA a uchována při -20°C. Pomocí technologie PCR-RFLP byla DNA amplifikována a naštěpena. Podmínky cyklování

jsou uvedeny v Tab.1. K syntéze nových řetězců byly použity primery navržené Te Pasem *et al.* (MYF-4, 1996), Stratilem a Čepicou (MYF-5, 1999), Stratilem a Kopečným (GDF-8, 1999) a Knollem *et al.* (IGF-2, 2000). Kvalita PCR produktů očekávaných délek byla ověřena na 1,4 % agarózovém gelu. Štěpení 10 µl každého produktu bylo provedeno použitím restričních endonukleáz *MspI*, *HpaII*, *DraI* a *BcnI* a bylo ověřeno na 2 - 3 % agarózovém gelu. Statistická analýza byla provedena pomocí GLM modelu SAS/STAT, verze 8.02. Do modelové rovnice byly zahrnuty následující efekty:

$$Y_{ijklmn} = \mu + MYF4_i + IGF-2_j + plem_k + pohl_l + rok_m + e_{ijklmn}$$

Tab. 1 Podmínky PCR

Lokus	Velikost produktu (bp)	Úvodní denaturace	Denaturace	Annealing	Elongace	Závěrečná elongace
MYF-4	353	95°C/4min	95°C/1min	60°C/1min	72°C/60s	72°C/5min
MYF-5	1200	95°C/2min	94°C/1min	58°C/1min	72°C/90s	72°C/10min
DGF-8	1027	95°C/2min	95°C/30s	52°C/30s	72°C/90s	72°C/7min
IGF-2	1600	95°C/2min	95°C/30s	70°C/30s	72°C/90s	72°C/7min

VÝSLEDKY A DISKUZE

MYF-4

Byl získán úsek očekávané délky 353 bp. Alela A obsahovala polymorfni štěpné místo a byla naštěpena do dvou fragmentů o délkách 219 a 134 bp, zatímco alela B zůstala neštěpená o délce 353 bp (Obr.1). Frekvence genotypů a alel jsou ukázány v Tab.1.

MYF-5

Amplifikovaný fragment délky 1200 bp byl naštěpen do 1000 a 190 bp (alela A) a 550, 450 a 190 bp (alela B) (Obr.2). Frekvence genotypů a alel jsou ukázány v Tab.1.

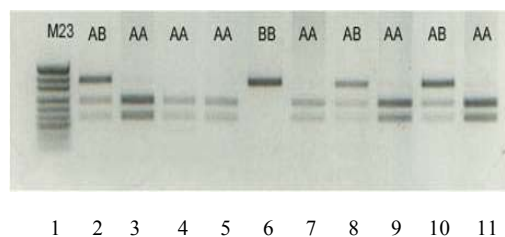
GDF-8

Amplikon o délce 1027 bp byl štěpen na fragmenty 422 bp (alela T) a 358 bp (alela A) (Obr.3). Frekvence genotypů a alel jsou ukázány v Tab.2.

IGF-2

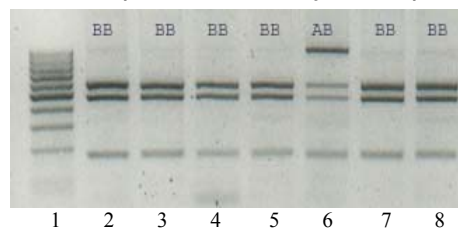
PCR produkt v délce 1600 bp byl naštěpen na fragmenty 900 bp (alela A) a 800 a 100 bp (alela B) (Obr.4). Frekvence genotypů a alel jsou ukázány v Tab.2.

Obr.1 Štěpení MYF-4 enzymem *MspI*



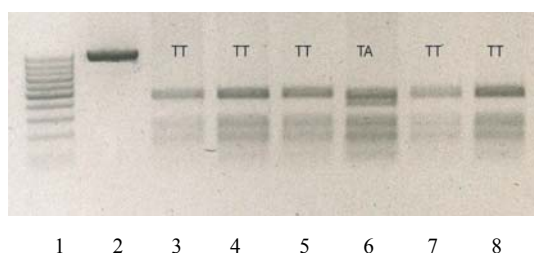
1 pUC19 DNA / *MspI* marker
2-11 naštěpené PCR produkty

Obr. 2 Štěpení MYF-5 enzymem *HpaII*



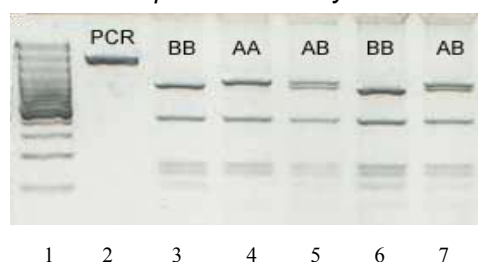
1 GeneRuler 100bp DNA Ladder
2-8 naštěpené PCR produkty

Obr. 3 Štěpení GDF-8 enzymem *DraI*



1 GeneRuler 100 bp DNA Ladder
2 PCR produkt, 3-8 naštěpené PCR produkty

Obr. 4 Štěpení IGF-2 enzymem *BclI*



1 GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus
2 PCR produkt, 3-7 naštěpené PCR produkty

Tab.1 Frekvence genotypů u plemene bílé ušlechtilé

Genotyp <i>MYF-4</i>	Četnost	Počet zvířat	Genotyp <i>MYF-5</i>	Četnost	Počet zvířat	Genotyp <i>GDF-8</i>	Četnost	Počet zvířat	Genotyp <i>IGF-2</i>	Četnost	Počet zvířat
<i>AA</i>	38,5	55	<i>AA</i>	-	-	<i>TT</i>	95,1	58	<i>AA</i>	7,8	9
<i>AB</i>	49	70	<i>AB</i>	4,0	2	<i>TA</i>	3,3	2	<i>AB</i>	15,5	18
<i>BB</i>	12,6	18	<i>BB</i>	96,0	51	<i>AA</i>	1,6	1	<i>BB</i>	76,7	89

Tab.2 Frekvence genotypů u plemene landrase

Genotyp <i>MYF-4</i>	Četnost	Počet zvířat	Genotyp <i>MYF-5</i>	Četnost	Počet zvířat	Genotyp <i>GDF-8</i>	Četnost	Počet zvířat	Genotyp <i>IGF-2</i>	Četnost	Počet zvířat
<i>AA</i>	56,8	25	<i>AA</i>	-	-	<i>TT</i>	100	19	<i>AA</i>	5,3	2
<i>AB</i>	36,4	16	<i>AB</i>	1	4,6	<i>TA</i>	-	-	<i>AB</i>	26,3	10
<i>BB</i>	6,8	3	<i>BB</i>	21	95,5	<i>AA</i>	-	-	<i>BB</i>	68,4	26

Tab.3 Průměrné hodnoty v jednotlivých genotypech u vybraných ukazatelů masné produkce u pl. bílé ušlechtilé

	<i>MYF-4</i>			<i>IGF-2</i>		
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>
prům. výška hřb. tuku (mm)	13,49	12,67	12,92	13,28	12,54	13,25
krkovice (kg)	3,89	3,88	3,87	3,90	3,89	3,86
kotleta (kg)	4,70	4,64	4,53	4,45	4,72	4,70
plec (kg)	4,30	4,24	4,21	4,22	4,32	4,21
kýta (kg)	8,45	8,51	8,52	8,43	8,55	8,49
HMC (%)	53,14	53,75	54,63	53,02	54,83	53,67

Tab.4 Průměrné hodnoty v jednotlivých genotypech u vybraných ukazatelů masné produkce u pl. landrase

	<i>MYF-4</i>			<i>IGF-2</i>		
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>
prům. výška hřb. Tuku (mm)	10,67	14,75 ^A	14,92	13,99	13,27	13,12
krkovice (kg)	3,69	3,55	3,47	3,22	3,73	3,77^B
kotleta (kg)	4,91	4,85	4,61	4,75	4,86	4,76
plec (kg)	4,17	3,99	3,92	4,01	4,01	4,07
kýta (kg)	8,63	8,27	8,15	8,37	8,46	8,22
HMC (%)	55,53	53,34 ^B	55,45	54,00	55,29	55,02

^A P = ≤ 0,01, ^B P = ≤ 0,05

Geny *MYF-5* a *GDF-8* nebyly zahrnuty do statistické analýzy ze dvou důvodů: komerční plemena byla v genu *MYF-5* monomorfní pro alelu *B* a u *GDF-8* nebyly pro malý počet jedinců detekovány všechny genotypy.

U plemene bílé ušlechtilé nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly. V genu *MYF-4* vykazoval genotyp *AA* nejvyšší hodnoty u hmotnosti krkovice, kotlety a plece. Genotyp *BB* potom u hm. kýty a v podílu hlavních masitých částí. V genu *IGF-2* vykazoval genotyp *AA* nejvyšší hodnoty u průměrné výšky hřbetního tuku a hm. krkovice a genotyp *AB* měl nejvyšší hodnoty u hm. kotlety, plece, kýty a v podílu hlavních masitých částí.

V genu *MYF-4* byl u plemene landrase zjištěn vysoce průkazný rozdíl u průměrné výšky hřbetního tuku a průkazný rozdíl u podílu hlavních masitých částí. Genotyp *AA* vykazoval nejvyšší hodnoty u hm. krkovic, kotlety, plece a kýty a v podílu hlavních masitých částí, zatímco genotyp *BB* měl nejvyšší hodnotu pouze u výšky hřbetního tuku. V genu *IGF-2* byl zjištěn průkazný rozdíl u hm. krkovic, která byla nejvyšší v genotypu *BB*. Genotyp *AA* měl nejvyšší hodnotu u průměrné výšky hřbetního tuku, zatímco hm. kotlety, kýty a podíl hlavních masitých částí byly nejvyšší v genotypu *AB*.

U plemene Large White zjistili Cieślak *et al.* (2000) frekvence *A* 0,4, *B* 0,6 pro gen *MYF-4*. Cieślak *et al.* (2000) testovali celkem 229 zvířat různých plemen (Pietrain, Zlotnicka Spotted, Polská landrase, [Pi x ZS], Polský LW, [LW x Pi]). Pozorovali asociace u hmotnosti kýty, kotlety, půlky jatečného těla, plochy zádového svalu a podílu hlavních masitých částí a u všech těchto ukazatelů zjistili statisticky významné rozdíly. Největší hmotnost masa u kýty byla u zvířat s genotypem *AB* (podle Cieślak *et al.* *AC*), u kotlety *AA* (*CC*) a u HMČ *AA* (*CC*).

Soumilion *et al.* (1997) testovali *MspI* polymorfismus celkem u 7 plemen (Meishan, Pietrain, Duroc, Hampshire, Great Yorkshire, Holandská landrase a divoké prase) a zjistili nulový výskyt alely *A* u plemene Meishan. Plemeno Great Yorkshire se zase vyznačovalo vysokou frekvencí alely *B*. Te Pas *et al.* (1996, 1999) zjistili signifikantní rozdíl mezi genotypy *AA* a *BB* a popsali průkazné rozdíly mezi genotypy *MYF-4* a hmotností prasat při narození, jatečnou hmotností, intenzitou růstu a obsahem libového masa ve velké populaci prasat plemen Yorkshire. Podle Soumilion *et al.* (1997) měl podíl hlavních masitých částí v jednotlivých genotypech následující hodnoty: *AA* 57,26, *AB* 56,36 a *BB* 56,74.

Kolaříková *et al.* (2003) zjistili pro gen *IGF-2* u plemene bílé ušlechtilé frekvence genotypů *AA* 1,65, *AB* 33,88 a *BB* 64,46 a významné rozdíly mezi pohlavími v procentu libového masa a výšce hřbetního tuku.

ZÁVĚR

U všech kandidátních genů pro masnou užitkovost bylo ověřeno štěpení restričními endonukleázami *MspI*, *HpaII*, *DraI* a *BcnI*. Výsledkem bylo zastoupení všech tří genotypů, každý s různými hodnotami pro vybrané ukazatele masné užitkovosti. U genu *MYF-5* nebyl detekován genotyp *AA*, protože u těchto dvou a dalších komerčních plemen byl zjištěn monomorfismus a u genu *GDF-8* nebyly detekovány genotypy *TA* a *AA* u plemene landrase. Proto nebyly tyto geny zahrnuty do statistické analýzy. U plemene bílé ušlechtilé nebyly zjištěny žádné signifikantní rozdíly. V genu *MYF-4* byl u plemene landrase zjištěn vysoce průkazný rozdíl u průměrné výšky hřbetního tuku a průkazný rozdíl u podílu hlavních masitých částí. V genu *IGF-2* byl u plemene landrase zjištěn průkazný rozdíl u hm. krkovic.

Práce byla vypracována jako část výzkumného záměru MSM 432100001 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR, v rámci Grantové agentury ČR jako projekt č. 523/03/H076 a jako projekt FRVŠ č. 239/2005.

LITERATURA

- Gerrard D. E., Okamura C. S., Ranalletta M. A. M., Grant A. L. (1998): Developmental expression and location of *IGF-I* and *IGF-II* mRNA and protein in skeletal muscle. *Journal of Animal Science*, 76, 1006-1011.
- Hasty P., Bradley A., Morris J. H., Edmondson D. G., Venuti J. M., Olson E. N., Klein W. H. (1993): Muscle deficiency and neonatal death in mice with a target mutation in the myogenin gene. *Nature*, 364, 501-506.
- Kolaříková O., Putnová L., Urban T., Adámek J., Knoll A., Dvořák J. (2003): Associations of the *IGF-2* gene with growth and meat efficiency in Large White pigs. *Journal of Applied Genetics*, 4, 509-513.
- Knoll A. (2002): Importance of the *MYOD* family genes in pigs. In *Current Problems of Breeding, Health and Production of Pigs. Proceedings of the 11th International Symposium*, February 19-29, 26.
- Knoll A., Putnová L., Dvořák J., Čepica S. (2000): A *NciI* PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor 2 (*IGF-2*) gene. *Animal Genetics*, 31, 140-157.
- Rehfeldt C., Fiedler I., Dietl G., Ender K. (2000): Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livestock Production Science*, 66 (2): 177-188.
- Soumilion A., Erkens J.H.F., Lenstra J.A., Rettenberger G., Te Pas M.F.W. (1997): Genetic variation in the porcine myogenin gene locus. *Mammalian Genome*, 8, 564-568.
- Stratil A., Kopečný M. (1999): Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin gene. *Animal Genetics*, 30, 468-470.
- Te Pas M. F. W., Soumilion A., Van Den Bosch T. J., Veninga G., Meuwissen T. H. E. (1996): Association between polymorphism in the porcine myogenin gene locus and growth traits. 47th Annual Meeting of EAAP, 26-29 August, 1996, Lillehammer, Norway
- Te Pas M. F. W., Soumilion A., Harders F. L., Verburg F. J., Van Den Bosch T. J., Gauesloot P., Meuwissen T. H. E. (1999): Influences of myogenin genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness and lean weight of pigs. *Journal of Animal Science*, 77, 2352-2356.
- Te Pas M. F. W., Visscher A. H. (1994): Genetic regulation of meat production by embryonic muscle formation - a review. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 111, 404-412.
- Vykoukalová Z., Knoll A., Dvořák J., Rohrer G. A., Čepica S. (2003): Linkage and radiation hybrid mapping of the porcine *MYF-6* gene to chromosome 5. *Animal Genetics*, 34, 232-240.
- Yang X., Liu D., Li J., Yu L., Xia Y., Yang J. (2002): Studies on porcine myostatin in 5' promoter region. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier, France.