

ГЕНЕТИЧЕН ПОЛИМОРФИЗЪМ В ЛОКУСА НА КАЛПАСТАТИНОВИЯ (CAST) ГЕН И МЕСНА ПРОДУКТИВНОСТ ПРИ СВИНЕ

Радостина Стойкова-Григорова^{1*}, Катерина Стефанова², Иван Атанасов², Пенка Маринова¹

¹Институт по животновъдни науки – Костинброд

²Агробиоинститут – София

*Автор за кореспонденция: rstoikova@abv.bg

Резюме

Целта на настоящето изследване е да се проучи генетичния полиморфизъм в три участъка от локуса на CAST гена и да се анализира ефективността на влиянието му върху угоителните и кланични качества при свине. Генотипирани са 49 животни от Дунавска бяла порода чрез метода Полиморфизъм на рестрикционните фрагментни дължини (PCR-RFLP анализ) и съответните рестрикционни ензими - *HinfI*, *MspI* и *RsaI*. На 45 животни са проследени фенотипните признаци: живо тегло – при раждане, на 21-ви ден и при тестване; среден дневен прираст за целия период и след 21-ви ден; възраст дебелина на сланина, дебелина на m. Longissimus dorsi и съдържание на постно месо. Установено е високо генетично вариране и в трите изследвани участъка от локуса на гена, като в *CAST/HinfI* са определени два генотипа – хомозиготен BB с честота 78% и хетерозиготен AB с честота 22%. В *CAST/MspI* се наблюдават три генотипа с честоти - 55% за генотип DD, 35% за генотип CD и 10% за генотип CC. В *CAST/RsaI* участъка най-високата установена честотата е на генотип EE - 60%. Хетерозиготните животни с генотип EF са 30%, а най-ниска е честотата на генотип FF – 10%. Анализът на резултатите показва достоверно по-високо живо тегло при раждане на хомозиготните животни по алаел D в *CAST/MspI* участъка от локуса на гена в сравнение с хетерозиготните прасета.

Ключови думи: генетично вариране, калпастатин, угоителни и кланични качества, *HinfI*, *MspI*, *RsaI*

Увод

Фенотипната проява на количествените признаци при животните зависи, както от множество гени, така и от външната среда, в която те се проявяват. При свинете са идентифицирани „кандидат“ гени свързани с икономически важни признаци като интензитет на растеж, състав на кланичен труп, качество на месото. Генетичното подобрене на тези признаци се счита за по-ефективно при познаване на биологичните процеси, регулиращи развитието, диференциацията и растежа на скелетния мускул.

При свинете ген на калпастатина (CAST) е локализиран в хромозома 2 и е част от калпаиновата система, която е от значение за формирането на скелетната мускулатура и влияе на крехкостта на месото *post mortem*, в зависимост от протеолизата на основните

структурни мускулни протеини (миофибриларни – актин, миозин и α -актинин). Този ген е специфичен инхибитор на μ - и m - калпаиновите протеази, които се активират от концентрацията на Ca^{2+} йони (Barnoy et al., 1996) стимулират контракцията на мускула *preigor*, бързата гликолиза и спадането на рН. Сравнително по-ограничени са проучванията за влиянието на генетичното вариране в CAST гена и качеството на кланичния труп при свинете (Choi et al., 2006). Основавайки се на факта, че в локуса на CAST са установени полиморфни участъци свързани с някои показатели за месната продуктивност радица автори го определят като един от основните генетични маркери (Borowska et al., 2014; Choi et al., 2006; Choy et al., 2002; Klosowska et al., 2005; Lee et al., 2003).

У нас изследвания свързани с проучване на нуклеотидния полиморфизъм на калпастатина и калипин гена и влиянието им върху фенотипното проявление на продуктивни признаци са проведени при овце (Georgieva et al., 2015; Bozhilova-Sakova et al., 2016; Dimitrova et al., 2016).

Целта на настоящето изследване е да се проучи генетичния полиморфизъм в три участъка от локуса на калпастатиновия (CAST) ген и да се анализира ефективността на влиянието му върху угоителните и кланични качества при свине.

Материал и методи

Проучването е проведено с 49 ремонтни прасета (9 мъжки и 40 женски) от Дунавска бяла порода отглеждани в Земеделски институт, Шумен. Генотипирани са 8 линии, с минимум по 5 животни от линия. Прасетата са развъждани при традиционни условия и хранени със стандартна концентратна смеска, за съответната категория животни.

ДНК-анализи

Биологичните проби са взети от гърба и плешката на животните (50–60 косъма) и са съхранявани в стерилен контейнер при +4°C.

Генотипирането на включените в експеримента животни по CAST гена е извършено по метода PCR-RFLP. Анализът е проведен в лабораторията на Агробιοинститут, София и включва следните стъпки:

1. *Изолиране на геномна ДНК*

Геномната ДНК на включените в изследването животни е изолирана от космена луковица с помощта на комерсиален кит Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) по оригиналния протокол на производителя. Оценката на количеството и качеството на изолираната ДНК е измерено УВ-спектрофотометрично.

2. *Полимеразно верижна реакция (PCR анализ)*

За амплифициране на проучваните участъци в локуса на гена чрез полимеразно верижна реакция (PCR) са използвани следните праймери по (Ernst et al., 1998; Choi et al., 2006) Forward: 5' GCG TGC TCA TAA AGA AAA AGC 3'; Reverse: 5' TGC AGA TAC ACC AGT AAC AG 3'. Реакционната смес с краен обем 25 μ l е приготвена чрез кит за амплификация MyTaq HS Mix-BIOLINE. Процесът е извършен в Mastercycler-Eppendorf. Условията при които е проведена амплификацията са: първоначална денатурация - 94 °C за 4 min, допълнителна денатурация - 94 °C за 1 min, амплификация - 56 °C за 1 min, слепване на фрагментите - 72 °C за 50 sec, повторение на цикъла – от

стъпка 2 до стъпка 4 – 38 пъти, допълнителна амплификация - 72 °C за 3 min, съхранение при 4 °C.

3. Полиморфизъм на рестрикционните фрагментни дължини (PCR- RFLP анализ)

Анализът за установяване на полиморфизмите по дължина на фрагментните дължини (RFLP) е проведен чрез три рестрикционни ендонуклеази *HinfI*, *MspI* и *RsaI*, като пробите са инкубирани в термостат за 3 часа на 37 °C.

Идентификацията на получените фрагменти след амплификацията и след Рестрикционния анализ е извършена чрез електрофореза на 1,5% агарозен гел за PCR продуктите, на 2.5% гел за ензима *RsaI*, на 3.5% гел за *HinfI* и *MspI*, наситен с флуоресцентно багрило RedGel. За точното определяне на дължината на получените ДНК фрагментите в базови двойки (bp) е използвана контрола - DNA Ladder, 100 bp.

Величина на *in vivo* контролирани селекционни признаци за месна продуктивност

При 45 от животните на които е направен ДНК анализ са проследени и фенотипните признаци: живо тегло – при раждане, 21-ви ден и при тестване; среден дневен прираст за цял период и след 21-ви ден; възраст.

Прижизнената оценка на кланичните показатели е направена с апарат Piglog 105 при живо тегло на прасетата 90-100 кг (при приключване на опита) и включва следните измерения: дебелина на сланина – на 7 cm (L1) и 10 cm (L2) от медиалната линия, съответно между 3-4-ти лумбален прешлен и между 3-4-то ребро и дебелина на m. Longissimus dorsi (m. LD) и прогнозен процент на постно месо.

Статистическа обработка

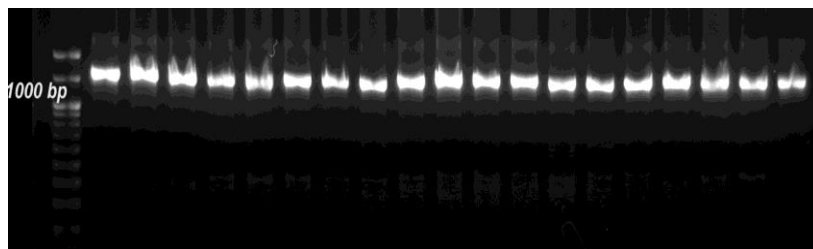
Анализът на данните от генотипирането включва изчисляване честотите на алелите и съответните генотипове на животните по CAST гена чрез програмата GENAlex. Данните за величината на изследваните фенотипни признаци са обработени по метода на вариационната статистика. Достоверността на разликите между групите е определена по Fisher и t-тест по Student.

Резултати и обсъждане

След проведената Полимеразно верижна реакция (PCR) при всички анализирани животни са получени амплифицирани PCR продукти на CAST гена с дължина ~ 1600 bp. Резултатите са визуализирани на 1.5 % агарозен гел (фиг. 1).

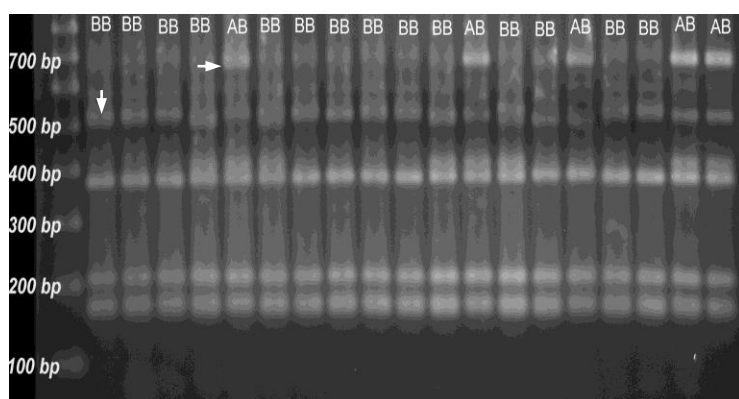
На фигурите 2, 3 и 4 са представени резултати след проведения анализ по Полиморфизъм на рестрикционните фрагментни дължини, след използването на трите специфични ендонуклеази *HinfI*, *MspI* и *RsaI*. По броя и големината на получените фрагменти са определени алелите и съответните генотипове.

След рестрикцията с ензим *HinfI* са установени 5 фрагментна с големина съответстващи на 174, 200, 372, 503 и 646 bp (Ernst et al., 1998; Kluzakova et al., 2014). Профилът на алел А е представен от 4 фрагмента: 174, 200, 372 и 646 bp, като полиморфния фрагмент е с големина ~ 700 bp, а за алел В са характерни фрагментите: 174, 200, 372 и 503 bp, с вариabilen фрагмент с големина ~ 500 bp (фиг. 2).



Фигура 1. PCR продуктите след амплификацията на CAST ген, визуализирани на 1.5 % агарозен гел

Figure 1. PCR products of CAST gene, after amplification, visualized in 1.5 % agarose gel



Забележка: със стрелки са означени полиморфните фрагменти определящи алелите, съответно: алел A~700 bp и алел B~500 bp

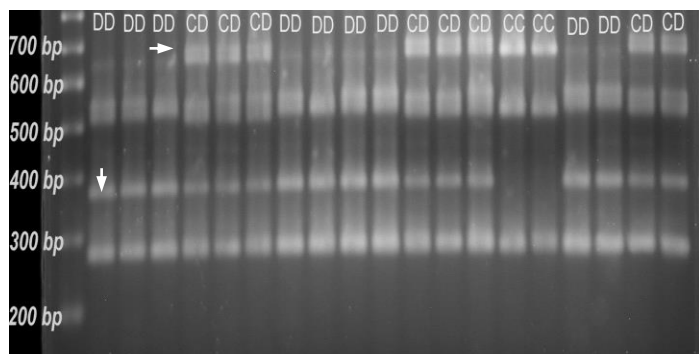
Note: arrows indicate polymorphic fragments for each allele, respectively: allele A~700 bp and allele B~500 bp

Фигура 2. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на CAST гена, визуализиране на сегментите на 2.5 % агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендонуклеаза HinfI

Figure 2. Results of PCR-RFLP analysis of CAST gene, segment digested with the restriction endonuclease HinfI, visualized in 2.5 % agarose gel

Рестрикционният анализ с ензим *MspI* показва наличие на 4 фрагмента съответстващи на 275, 369, 500 и 650 bp (Ernst et al., 1998; Kluzakova et al., 2014). В този участък на гена профила на алел С е представен от 3 фрагмента: 275, 500 и 650 bp, с полиморфен фрагмент ~ 700 bp, при алел D фрагментите са: 275, 369 и 500 bp, полиморфен фрагмент ~ 370 bp (фиг. 3).

Идентифицираните алели след обработка на PCR продуктите на CAST гена с ендонуклеаза *RsaI* са представени на фигура 4. Установени са 7 фрагмента с големина съответстващи на 90, 130, 160, 180, 250, 330 и 650 bp (Ernst et al., 1998; Kluzakova et al., 2014). Профилът на алел Е е представен от фрагментите: 90, 160, 180, 330 и 650 bp, с вариabilен фрагмент с големина ~ 360 bp. Другият алел F в този участък е с профил: 90, 130, 160, 180, 250 и 650 bp, като той се определя от полиморфен фрагмент с големина ~ 250 bp.

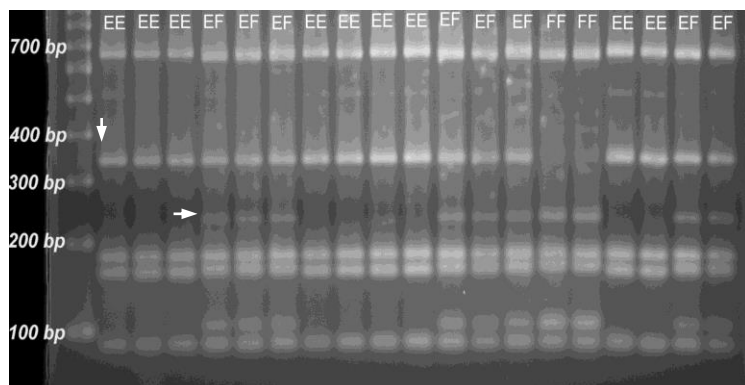


Забележка: със стрелки са означени полиморфните фрагменти определящи алелите, съответно: алел C~700 bp и алел D~370 bp

Note: arrows indicate polymorphic fragments for each allele, respectively: allele C~700 bp and allele D~370 bp

Фигура 3. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на CAST гена, визуализиране на сегментите на 2.5% агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендонуклеаза MspI

Figure 3. Results of PCR-RFLP analysis of CAST gene, segment digested with the restriction endonuclease MspI, visualized in 2.5 % agarose gel



Забележка: със стрелки са означени полиморфните фрагменти определящи алелите, съответно: алел E~360 bp и алел F~250 bp

Note: arrows indicate polymorphic fragments for each allele, respectively: allele E~360 bp and allele F~250 bp

Фигура 4. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на CAST гена, визуализиране на сегментите на 3.5 % агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендонуклеаза RsaI

Figure 4. Results of PCR-RFLP analysis of CAST gene, segment digested with the restriction endonuclease RsaI, visualized in 3.5 % agarose gel

Честотите на генотиповете и алелите от проучвания локус са представени на таблица 1.

Таблица 1. Алелни и генотипни честоти в локуса на гена в изследваното стадо Дунавска Бяла порода (n=49)

Table 1. Allele and genotype frequencies in CAST polymorphic sites in the studies pigs from the Danube White breed (n=49)

Полиморфен участък Polymorphic sites	<i>CAST/HinfI</i>			<i>CAST/MspI</i>			<i>CAST/RsaI</i>		
Генотипове Genotypes	AA	AB	BB	CC	CD	DD	EE	EF	FF
Брой животни (n) number of animals (n)	0	11	38	5	17	27	29	15	5
Генотипни честоти Genotype frequency	0	0.22 (22%)	0.78 (78%)	0.10 (10%)	0.35 (35%)	0.55 (55%)	0.60 (60%)	0.30 (30%)	0.10 (10%)
Алелни честоти Allele frequency	A = 0.11 (11%)		B = 0.89 (89%)		C = 0.28 (28%)		D = 0.72 (72%)		E = 0.74 (74%) F = 0.26 (26%)

Резултатите показват, че в стадото Дунавска бяла порода, в *CAST/HinfI* участъка на гена се наблюдават два генотипа, като хомозиготния по алел В генотип (BB) е със сравнително по-висока честота от хетерозиготния АВ генотип. Сравнение между данните в това изследване и европейски породи (Rybarczyk et al., 2010) показва, че сходни алелни и генотипни честоти се наблюдават в *CAST/Hinf* при кръстоски на Германски Ландрас х Голяма Бяла. Авторите установяват висока честота на генотип BB (91.2%) и по-ниска на хетерозиготния АВ (8.8%). Идентични са резултатите за отсъствие на хомозиготния по алел А генотип.

При тестираните животни в другите два полиморфни участъка от локуса на гена *CAST/MspI* и *CAST/RsaI* се наблюдават три генотипа. Рестрикцията с ензим *MspI* показва най-висока честотата на генотип DD и най-ниска на генотип CC, докато при *CAST/RsaI* най-висока е стойността за хомозиготните по алел Е животни и най-ниска за другия хомозиготен генотип FF. В съответствие с нашите резултати са тези на Choi et al. (2006). В проучената извадка на прасета кръстоски между Ландрас и корейски месни свине, процентното разпределение на генотипните честоти в *CAST/RsaI* е съответно 53.8% за гетонип EE, 31.8% за генотип EF и 14.4% за хомозиготния по алел F генотип (FF). В *CAST/Hinf* участъка разпределението на чесотите по генотипове е: BB - 62.7%, AB - 27.3% и AA - 10%.

В други научни публикации Kluzakova et al. (2012, 2014) правят анализ на алелното състояние в участъците на локуса на гена *CAST/MspI*, *CAST/Hinf* и *CAST/RsaI* при хибридни породи свине отглеждани в Чехия. В заключение е посочено, че се наблюдава висок генетичен полиморфизъм, като навсякъде честотата на животните с хетерозиготен генотип е най-висока.

Установеното генетично вариране в трите участъка на локуса на CAST даде възможност да определим ефективността на влиянието на полиморфизма върху някои угоителни и кланични качества на свинете в стадото Дунавска бяла порода, което е представено на таблици 2, 3 и 4.

Таблица 2. Угоителни и кланични качества на свинете в *CAST/HinfI* участъка от локуса на гена

Table 2. The relationship between the *CAST/HinfI* polymorphism and fattening and slaughter traits in pigs

Показатели Traits	CAST / HinfI					
	Генотип AA Genotype AA n = 35			Генотип AB Genotype AB n = 10		
	$\bar{X}$	Sd	CV	$\bar{X}$	Sd	CV
Живо тегло, kg Live weight, kg						
- при раждане - Birth weight	1.51	0.29	19.33	1.32	0.29	21.66
- на 21- и ден - at 21 days	4.87	0.64	13.14	4.8	0.67	13.99
- при приключване на опита - at the end of the experiment	93.46	6.90	7.38	93.5	5.28	5.64
Възраст, дни Age, days	240.26	41.78	17.39	250.1	40.99	16.39
Среден дневен прираст за целия период, g Average daily gain for the whole period, g	392.03	98.87	25.22	383.7	71.20	18.56
Среден дневен прираст след 21 ден, g Average daily gain after 21 days, g	391.31	115.71	29.57	404	76.15	18.85
Дебелина на сланина, mm Backfat thickness, mm						
- на 7 cm от медиалната линия, между 3/4 лумбален прешлен (L1) - at 7 cm from medial midline, between 3/4 lumbar vertebrae (L1)	17.86	5.88	32.94	19.7	6.38	32.38
- на 10 cm от медиалната линия, между 3/4 ребро (L2) - at 10 cm from medial midline, between 3/4 rib (L2)	15.57	4.22	27.08	17.1	2.85	16.64
- L1+ L2	33.43	8.50	25.72	36.8	7.83	21.27
Дебелина на m.LD, mm Dept of m.LD, mm	41.20	5.12	12.43	40	6.36	15.80
Съдържание на постно месо, % Lean meat content, %	53.29	4.18	7.85	52.51	4.42	8.41

Забележка: Не са установени статистически достоверни разлики между групите

Note: No statistically significant differences between the groups

Таблица 3. Угоителни и кланични качества на свинете в *CAST/MspI* участъка от локуса на гена

Table 3. The relationship between the *CAST/MspI* polymorphism and fattening and slaughter traits in pigs

Показатели Traits	<i>CAST / MspI</i>					
	Генотип DD Genotype DD n = 26			Генотип CD Genotype CD n = 15		
	$\bar{X}$	Sd	CV	$\bar{X}$	Sd	CV
Живо тегло, kg Live weight, kg						
- при раждане - Birth weight	1.53 *	0.32	20.67	1.33	0.25	18.73
- на 21- и ден - at 21 days	4.77	0.50	12.51	4.87	0.65	13.26
- при приключване на опита - at the end of the experiment	92.81	7.28	7.85	95.67	4.85	5.07
Възраст, дни Age, days	241.42	39.66	16.43	245.80	48.22	19.62
Среден дневен прираст за целия период, g Average daily gain for the whole period, g	383.39	103.76	27.07	403.73	82.88	20.53
Среден дневен прираст след 21 ден, g Average daily gain after 21 days, g	375.58	119.30	31.77	425.60	91.60	21.55
Дебелина на сланина, mm Backfat thickness, mm						
- на 7 cm от медиалната линия, между 3/4 лумбален прешлен (L1) - at 7 cm from medial midline, between 3/4 lumbar vertebrae (L1)	17.69	5.95	33.60	19.60	6.14	31.32
- на 10 cm от медиалната линия, между 3/4 ребро (L2) - at 10 cm from medial midline, between 3/4 rib (L2)	15.00	4.45	29.64	16.87	3.12	18.46
- L1+ L2	32.69	8.89	27.21	36.47	8.04	22.03
Дебелина на m.LD, mm Dept of m.LD, mm	41.58	5.38	12.93	40.13	4.93	12.27
Съдържание на постно месо, % Lean meat content, %	53.73	4.31	8.03	52.35	4.16	7.95

Достоверност – $p < 0.05$ *

Significant – $p < 0.05$ *

Таблица 4. Угоителни и кланични качества на свинете в *CAST/RsaI* участъка от локуса на гена

Table 4. The relationship between the *CAST/RsaI* polymorphism and fattening and slaughter traits in pigs

Показатели Traits	CAST / RsaI					
	Генотип EE Genotype EE n = 27			Генотип EF Genotype EF n = 14		
	$\bar{X}$	Sd	CV	$\bar{X}$	Sd	CV
Живо тегло, kg Live weight, kg						
- при раждане - Birth weight	1.51	0.33	21.61	1.36	0.24	17.75
- на 21- и ден - at 21 days	4.77	0.59	12.28	4.86	0.67	13.77
- при приключване на опита - at the end of the experiment	92.82	7.14	7.69	95.86	4.98	5.19
Възраст, дни Age, days	243.41	40.23	16.53	242.29	48.005	19.81
Среден дневен прираст за целия период, g Average daily gain for the whole period, g	380.85	102.60	26.94	410.07	82.15	20.03
Среден дневен прираст след 21 ден, g Average daily gain after 21 days, g	375.37	116.99	31.17	429.57	93.81	21.84
Дебелина на сланина, mm Backfat thickness, mm						
- на 7 cm от медиалната линия, между 3/4 лумбален прешлен (L1) - at 7 cm from medial midline, between 3/4 lumbar vertebrae (L1)	17.56	5.87	33.45	20.00	6.16	30.82
- на 10 cm от медиалната линия, между 3/4 ребро (L2) - at 10 cm from medial midline, between 3/4 rib (L2)	15.11	4.40	29.10	16.79	3.22	19.15
- L1+ L2	32.67	8.72	26.70	36.79	8.24	22.40
Дебелина на m.LD, mm Dept of m.LD, mm	41.22	5.58	13.55	40.71	4.55	11.17
Съдържание на постно месо, % Lean meat content, %	53.670	4.24	7.90	52.36	4.32	8.25

Забележка: Не са установени статистически достоверни разлики между групите

Note: No statistically significant differences between the groups

Анализът на резултатите показва, че статистически достоверна разлика има само при живото тегло при раждане, като хомозиготните прасета по алел D в *CAST/MspI* участъка от локуса на гена, са с достоверно по-високо тегло от хетерозиготните животни ($p < 0.05\%$). Формирането и растежа на скелетните мускули е обусловено от активността на специфични фактори, които промотират синтеза и намаляват мускулната деградация (Smith et al., 2007). С изявен антикатаболитен ефект са биологично активните вещества катехоламини. Тяхното влияние е свързано най-вече със специфичния ензим калпаин, който „инициира“ миофибрилното разграждане на

протеините. Калпастатинът е ендегенен инхибитор на калпаина. Този факт дава основание на редица автори (Dargelos et al., 2002; Goll et al., 1998; Goll et al., 2008) да посочват, че прекомерната експресия на CAST в скелетната мускулатура предизвиква хипертрофия на мускулните клетки и едновременно с това ги предпазва от атрофия. Barnou et al. (1996) в *in vitro* проучване съобщават, че нивото на калпастатина достоверно намалява в процеса на формиране на миообластите, а Goll et al. (2003) установяват, че системата се включва в регулацията на обмяна на протеина по време на растежа.

При стойностите на някои показатели като възраст, среден дневен прираст и живо тегло също се наблюдават съществени разлики между групите, но поради високата величината на вариационните коефициенти те са недоказани. По величина на коефициента на вариране за признака среден дневен прираст се наблюдават близки стойности на установените генотипове при *CAST/MspI* и *CAST/RsaI*, докато при *CAST/Hinf* са по-ниски. Измеренията за дебелината на сланината са сходни във всички групи, като характерни за този показател са високите по стойност вариационни коефициенти (19.15% -33.45%).

В потвърждение на това изследване е публикация на Choi et al. (2006). Авторите правят анализ на влиянието на генетичния полиморфизъм при прасета от двата пола, кръскоски F2 между корейски месни свине и Ландрас в трите участъка на локуса на гена *CAST/MspI*, *CAST/Hinf* и *CAST/RsaI* върху някои икономически важни показатели свързани с растежа (угояването) и качеството на месото при свинете, като тегло: при раждане, на 12-та седмица, на 30-та седмица и при клане, дебелина на сланина в кланичния труп. В заключение е посочено, че най-добре изразена достоверна връзка има между генетичния полиморфизъм в два от участъците *CAST/Hinf* и *CAST/RsaI* върху тегловното развитие на прасетата. В подкрепа на тези автори са и проучванията на Borowska et al. (2014), Choy et al. (2002) и Lee et al. (2003), които определят CAST като е важен кандидат ген, както за качеството на месото, така и за мускулния растеж. Доказаната в по-горе цитираните изследвания достоверна връзка между мутации в различни участъци от локуса на CAST гена и икономически важни признаци представлява интерес за бъдещи изследвания, които да изяснят възможността за въвеждане на калпастатина като генетичен маркер в селекционните програми в свиневъдството.

Изводи

• В генотипираното стадо чистопородни свине от Дунавска бяла порода в трите полиморфни участъка е установено генетично вариране със съответните алелни и генотипни честоти:

- в *CAST/HinfI* полиморфния участък се наблюдават два генотипа – хомозиготен BB с честота 78% и хетерозиготен AB с честота 22%.
- в *CAST/MspI* са установени три генотипа с честоти - 55% за генотип DD, 35% за генотип CD и 10% генотип CC.
- в *CAST/RsaI* участъка най-високата установена честотата е на генотип EE - 60%. Хетерозиготните животни с генотип EF са 30%, а най-ниска е честотата на генотип FF – 10%.

- Установено е достоверно по-високо живо тегло при раждане на хомозиготните животни по алел D в *CAST/MspI* участъка от локуса на гена в сравнение с хетерозиготните прасата.

Genetic Polymorphism of the Calpastatin (CAST) Gene and Meat Production of Pigs

Radostina Stoikova-Grigorova^{1*}, Katerina Stefanova², Ivan Atanasov², Penka Marinova¹

Abstract

The aim of this study was to perform the *CAST* gene polymorphisms genotyping and to verify its possible influence on the fattening and slaughter traits in pigs. DNA was isolated from plucked hair of 49 animals from Danube white breed. Genotyping was performed by polymerase chain reaction method (PCR method), the analysis of the polymorphism of the restriction fragment lengths (RFLP) and three restriction enzymes *HinfI*, *MspI* and *RsaI*. In the total 45 pigs the performance were tested for some phenotypic parameters: live weight - at birth, at 21 days and at the end of the experiment, average daily gain for the whole period and after 21 days, age, backfat thickness, dept of m. Longissimus dorsi and lean meat content. Analysis of genotyping at CAST locus from pigs showed high levels of genetic variability. In *CAST/HinfI* were determined two genotypes - homozygous BB with frequency 78% and heterozygous with frequency 22%. Three different genotypes were determined for *CAST/MspI* and *CAST/RsaI*. Genotype frequencies were 55%, 35%, 10% for DD, CD, CC in *CAST/MspI* and 60%, 30%, 10% for EE, EF in *CAST/RsaI*, respectively. The study was identified a significant effect of the *CAST/MspI* polymorphism on live weight at birth of pigs. The pigs of DD genotype showed a significant higher live weight at birth as compared to CD animals.

Keywords: calpastatin, fattening and slaughter traits, genetic variation, *HinfI*, *MspI*, *RsaI*

Литература

- Barnoy, S., T. Glaser, N. S. Kosower (1996): The rple of the calpastain (the specific calpain inhibitor) in myoblast differentiation and fusion, Biochemical and Biophysical Resesearch Communications, 220:933.
- Borowska, A., T. Szwaczkowski, M. kocwin-Podsiadla, S. Kaminski, A. Rusc, E. Krzeczio-Nieczyporukq (2014): Association of fifty single nucleotide polymerphisms within candidate genes with meatness in pigs, Czech Journal of Animal Science, 59(5): 227.
- Bozhilova-Sakova, M. and I. Dimitrova (2016): PCR-RFLP Analysis of CAST Gene in one Bulgarian Sheep Breed, Athens: ATINER'S Conference Paper Series. No: AGR2015-1824.
- Choi, B. H., J. S. Lee, G. W. Jang, H. Y. Lee, J. W. Lee, K. T. Lee, H. Y. Chung, H. S. Park, S. J. Oh, S. S. Sun, K. H. Myung, I. C. Cheong, T. H. Kim (2006): Mapping of the porcine Capastatin gen and association study of its variance with economic traits in pigs, Asian-Australasian journal animal science, 19(8): 1085-1089.
- Choy, Y. H., T. H. Kim, B. H. Choi, I. C. Cheong, H. K. Lee, K. S. Seo, S. D. Kim, Y. I. Chung (2002): Genetic analysis of carcass characteristics in crossbred pigs. Cross between Landrace and Korean wild boar, Asian-Australasian Journal of Animal Science, 15: 1080.

Ciobanu, D., J. Bastiaansen, S. Lonengan, H. Thomsen, J. Dekkers, G. Plastow and M. Rothschild (2004): New alleles calpastatin gene are associated with quality trait in pigs, *Journal of Animal Science*, 82:2829-2839.

Dargelos, E., C. Moyen, S. Dedieu, P. Vechambre, S. Poussard, K. Veillier-Devillers, J.J. Brustis, P. Cottin (2002): Development of an inducible system to assess p94 (CAST3) function in cultured muscle cells, *Journal of Biotechnology*, 96: 271.

Dimitrova, I., M. Bozhilova-Sakova (2016): PCR-RFLP analysis of Callipyge (CLPG) gene in Karakachan sheep breed. *Bulgarian Journal Agricultural Science* 22(3): 482–484.

Ernst, W. C., A. Robic, M. Yerle, L. Wang, M. F. Rothschild (1998): Mapping of calpastatin and three microsatellites to porcine chromosome 2q2.1-q2.4, *Animal Genetics*, 29: 212-215.

Georgieva, S., D. Hristova, I. Dimitrova, N. Stancheva, N. Stancheva, M. Bozhilova-Sakova (2015): Molecular analysis of ovine calpastatin (CAST) and myostatin (MSTN) gene in Synthetic Population Bulgarian Milk sheep using PCR-RFLP, *Journal of Bioscience and Biotechnology*, 4(1): 95-99.

Goll, D. F., G. Neti, S. W. Mares, V. F. Thompson (2008): Myofibrillar protein turnover. The proteasome and the calpains, *Animal Science*, 86(14_suppl): E 19.

Goll, D. F., V. F. Thompson, H. Lee, W. Wei, J. Cong (2003): The calpain system Physiological, review, 83:731.

Goll, D. F., V. F. Thompson, R. G. Taylor, A. Ouali (1998): The calpain system and skeletal muscle growth, *Canadian Journal of Animal Science*, 78: 503.

Klosowska, D., J. Kuril, G. Elminowska-Wenda, W. Kapelanski, K. Walasik, M. Pierzchala, D. Cieslak, J. Bogucka (2005): An association between genotypes at the porcine loci MSTN (GDF8) and CAST and microstructural characteristics of the m. longissimus lumborum: a preliminary, *Archiv Tierzucht, Dummerstorf*, 48, 1, 50.

Kluzakova, E., R. Stupka, M. Sprysl, J. Cítek (2014): The influence of CAST/MspI, HinfI, RsaI polymorphism on production traits in pigs, *Genetika*, 46 (1): 149-158.

Kluzakova, E., V. Dvořáková, R. Stupka, M. Sprysl, J. Cítek, M. Okrouhlá, L. Brzobohatý (2012): The effect of calpastatin (CAST/MspI and CAST/HinfI and CAST/RsaI) and its interaction with RYR1 genotypes on carcass and meat quality of crossbred pigs, *Research in pig breeding*, 6(1).

Lee, H. K., S. S. Lee, T. H. Kim, G. J. Jeon, H. W. Jung, Y. S. Shin, J. Y. Han, B. H. Choi, I. C. Cheong (2003): Detection of imprinted Quantitative Trait loci (QTL) for growth in pigs, *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 16: 1087.

Rybarczyk, A., M. Kmiec, F. Napierała, W. Natalczyk-Szymkowska (2010): The effect of calpastatin (CAST/HinfI and CAST/Hpy188I) polymorphism and its interaction with RYR1 genotypes on carcass and pork quality of crossbred pigs, *Animal Science Papers and Reports*, 28 (3): 253-260.

Smith, I. J., S. L. Dodd (2007): Calpain activation causes a proteasome-dependent increase in protein degradation and inhibits the Act signalling pathway in rat diaphragm muscle, *Exp. Physiol.* 92(3): 561.