

PRACA DOKTORSKA

Mgr inż. Anna Wojciechowska

**Analiza wpływu polimorfizmu genu  
kalpastatyny i kalpainy 3 w odniesieniu do cech  
użytkowości mięsnej wybranych ras owiec**

Promotor

Prof. dr hab. Sławomir Mroczkowski

Promotor pomocniczy

Dr inż. Ewa Grochowska

*Część badań została przeprowadzona w ramach grantu nr N N311 521440, otrzymanego z Narodowego Centrum Nauki, który został uzyskany w Zakładzie Genetyki i Hodowli Zwierząt, Uniwersytetu Technologiczno – Przyrodniczego w Bydgoszczy.*

*Praca powstała dzięki wsparciu projektu „Realizacja II etapu Regionalnego Centrum Innowacyjności” współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego w ramach regionalnego Programu operacyjnego Województwa Kujawsko – Pomorskiego w latach 2007-2013.*

*Składam wyrazy wdzięczności Promotorowi  
prof. dr hab. inż. Sławomirowi Mroczkowskiemu  
za możliwość realizacji niniejszej pracy, cenne  
wskazówki oraz cierpliwość i poświęcony czas.*

*Szczególne podziękowania kieruję do Pani dr inż.  
Ewy Grochowskiej - Promotora pomocniczego  
za przekazaną mi wiedzę merytoryczną  
i praktyczną, za cierpliwość, życzliwość  
i wszelakie wsparcie.*

*Moim bliskim za mobilizację i wiarę w moje  
możliwości serdecznie dziękuję.*

*Material biologiczny do badań oraz dane dotyczące owiec ras kamieniecka i pomorska zostały udostępnione przez członków Zakładu Hodowli Owiec i Kóz, Wydziału Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie. Niniejszym chciałabym bardzo serdecznie podziękować profesorowi Stanisławowi Milewskiemu (Zakład Hodowli Owiec i Kóz, Wydział Bioinżynierii Zwierząt, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie) za efektywną współpracę oraz udostępnienie materiałów biologicznych i danych wykorzystanych w tych badaniach.*

**Lista skrótów:**

PCR - Polymerase Chain Reaction (Reakcja Łańcuchowa Polimerazy)

RFLP - Restriction Fragments Length Polymorphism (Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych)

SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism (Polimorfizm Konformacyjny Jednoniciowego DNA)

MSSCP - Multitemperature Single Strand Conformation Polymorphism (Wielotemperaturowy Polimorfizm Konformacyjny Jednoniciowego DNA)

*CAPN3* - gen kalpajny 3

*CAST* - gen kalpastatyny

$\bar{X}$  - średnia arytmetyczna

$S_x$  - odchylenie standardowe

m. c. 56. dzień - masa ciała w 56. dniu życia jagniąt

m. c. 2. dzień - masa ciała w 2. dniu życia jagniąt

m. stat. - miary statystyczne

## SPIS TREŚCI

<b>1. WSTĘP I CEL BADAŃ .....</b>	<b>7</b>
<b>2. PRZEGLĄD LITERATURY .....</b>	<b>8</b>
2.1. KALPASTATYNA .....	8
2.2. POLIMORFIZM W GENIE <i>CAST</i> .....	9
2.3. KALPAINY .....	10
2.4. POLIMORFIZM W GENIE <i>CAPN</i> .....	11
2.5. METODY WYKORZYSTYWANE DO OKREŚLENIA POLIMORFIZMU GENÓW <i>CAST</i> i <i>CAPN</i> .....	12
<b>3. MATERIAŁ I METODY.....</b>	<b>13</b>
3.1. MATERIAŁ ZWIERZĘCY .....	13
3.2. POBRANIE KRWI I IZOLACJA GENOMOWEGO DNA .....	13
3.3. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA DNA .....	14
3.4. AMPLIFIKACJA WYBRANYCH FRAGMENTÓW DNA W REAKCJI PCR .....	14
3.5. TRAWIENIE PRODUKTU AMPLIFIKACJI GENU <i>CAST</i> ENZYMAMI RESTRYKCYJNYMI (RFLP).....	15
3.6. WYKRYWANIE POLIMORFIZMU GENU KALPAINY 3 <i>CAPN3</i> METODĄ MSSCP .....	16
3.7. SEKWENCJONOWANIE FRAGMENTU GENU <i>CAPN3</i> .....	16
3.8. ANALIZOWANE CECHY UŻYTKOWOŚCI TUCZNEJ I MIĘSNEJ....	16
3.8.1. Masa ciała jagniąt i ich przyrosty .....	17
3.8.2. Ocena poubojowa jagniąt.....	17
3.9. OPRACOWANIE STATYSTYCZNE.....	18
<b>4. WYNIKI.....</b>	<b>20</b>
4.1. IZOLACJA DNA, OCENA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA DNA, AMPLIFIKACJA ORAZ OCENA JAKOŚCIOWA PRODUKTÓW PCR.....	20
4.2. REAKCJA RFLP, WYKRYCIE ALLELI I GENOTYPÓW GENU <i>CAST</i> .....	20
4.3. REAKCJA MSSCP, WYKRYCIE ALLELI I GENOTYPÓW <i>CAPN3</i> ....	21
4.4. FREKWENCJA ALLELI I GENOTYPÓW .....	21
4.4.1. Gen <i>CAST</i> .....	21
4.4.2. Gen <i>CAPN3</i> .....	22

4.5. SNP WYKRYTE W GENIE <i>CAPN3</i> .....	23
4.6. WPŁYW POLIMORFIZMU BADANYCH GENÓW NA MASĘ CIAŁA ORAZ JEJ PRZYROSTY .....	23
4.6.1. Gen <i>CAST</i> .....	23
4.6.2. Gen <i>CAPN3</i> .....	26
4.7. WPŁYW POLIMORFIZMU BADANYCH GENÓW NA ANALIZOWANE CECHY POUBOJOWE.....	27
<b>5. DYSKUSJA.....</b>	<b>27</b>
<b>6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI.....</b>	<b>35</b>
<b>7. STRESZCZENIE .....</b>	<b>36</b>
<b>8. SUMMARY.....</b>	<b>38</b>
<b>9. LITERATURA .....</b>	<b>40</b>
<b>10. TABELI I RYCINY .....</b>	<b>48</b>

## 1. WSTĘP I CEL BADAŃ

Na przełomie lat 80. i 90. polskie owczarstwo przeżyło kryzys powodujący lawinową redukcję pogłowia owiec. Jako powód wskazywano zmiany gospodarcze, jakie dokonywały się w Europie Środkowej i Wschodniej. Stan pogłowia wg danych GUS szacowany na 2012 rok był około 22 – krotnie mniejszy niż w 1986 roku, kiedy wynosił 5mln sztuk. Obserwowana tendencja była spowodowana stopniowym spadkiem zapotrzebowania na wełnę ze strony przemysłu włókienniczego wynikającym z zastąpienia wełny przez syntetyczne tkaniny oraz napływu obcej wełny z Australii i Nowej Zelandii (Klepacki 2005). Dlatego też pod koniec lat 90. postawiono na użytkowanie owiec w kierunku mięsnym, wprowadzając w 1996 roku program mający na celu odbudowę pogłowia w Polsce - „Program rozwoju krajowego owczarstwa do roku 2010” Dotyczył on wsparcia finansowego w celu odbudowy pogłowia w Polsce, odtwarzania zasobów genetycznych ras lokalnych oraz propagowania prozdrowotnych właściwości mięsa owczego. Po wejściu Polski w struktury Unii Europejskiej skierowano aktywność produkcji owczarskiej również na odtwarzanie zasobów genetycznych ras lokalnych wprowadzając dopłaty oraz dotacje dla owiec matek (Rokicki 2010). To właśnie prozdrowotne właściwości, walory odżywcze oraz smakowe mięsa owczego sprawiły, że jest to jedno z najdroższych mięs w Europie i cieszy się dużym zainteresowaniem wśród konsumentów. Należy podkreślić, że jagnięcina zawiera wiele składników odżywczych m.in. wielonienasycone kwasy tłuszczowe pochodzenia egzogenego, których pozytywne działanie antynowotworowe, przeciwutleniające, czy redukujące udział tkanki tłuszczowej jest powszechnie znane (Milewski 2006). Jej kruchość, smak i delikatność była ceniona od dawna. Dlatego też coraz większą uwagę skupia się na działaniach dążących do zwiększania jakości i ilości mięsa jagnięcego, jednocześnie starając się zwiększyć dochodowość oraz konkurencyjność gałęzi gospodarki jaką jest produkcja tegoż żywca w Polsce. W dobie aktualnego rozwoju tradycyjnych metod hodowlanych wspieranych ukierunkowaną selekcją opartą o znajomość uwarunkowań genetycznych możliwe staje się uzyskiwanie zwierząt wyróżniających się pożądanymi cechami. Wykorzystywanie w tym celu technik genetyki molekularnej przyczynia się do osiągnięcia szybszego postępu hodowlanego. Markery genetyczne cech użytkowych owiec pozostają jeszcze nie tak dokładnie poznane jak w przypadku trzody chlewnej czy bydła (red. Świtoński, 2004). Dotychczas wykazano związek polimorfizmu w genie kodującym np. miostatynę z otluszczeniem, czy ze wzrostem masy mięśniowej (Boman i wsp., 2009; Boman i wsp., 2010; Clop i wsp., 2006); kalpastatynę powiązano z wyciekami termicznymi, kruchością mięsa, wiązaniem wody (Byun i wsp., 2009; Kołczak, 2008; Nowak, 2005); a kalpainę3 powiązano z masą ciała



przy urodzeniu, oraz po odsadzeniu, z kruchością mięsa i regeneracją mięśni (Chung i wsp., 2009).

Celem badań było określenie frekwencji alleli i genotypów genów kalpastatyny i kalpainy<sup>3</sup> w populacji owiec ras: kamieniecka, pomorska i merynos polski odmiana barwna. Ponadto za cel postawiono sobie poszukiwanie powiązań pomiędzy poszczególnymi genotypami a cechami użytkowości mięsnej w badanej grupie zwierząt.

## 2. PRZEGLĄD LITERATURY

### 2.1. KALPASTATYNA

Kalpastatyna jest białkiem, którego masa cząsteczkowa wynosi  $60.10^3$ - $70.10^3$  Da, składającym się z czterech miejsc inhibitorowych zbudowanych z powtarzających się 130-aminokwasowych struktur (Jakubiec – Puka 1993). Znanych jest kilka różnorodnych izoform kalpastatyny, które posiadają jedną, trzy lub cztery domeny oraz różne N-terminalne sekwencje (Goll i wsp., 1998). Gen kodujący kalpastatynę (*CAST*) zlokalizowano u owiec na 5 chromosomie i przypisano mu znaczącą rolę w procesie formowania się mięśni za życia oraz ich rozpadu po uboju (Palmer i wsp., 1999). Został on wybrany i opisany przez Palmera i wsp. w 1999 roku jako gen kandydujący na cechy jakości mięsa owczego. Wykorzystując metodę PCR-RFLP zamplifikowano fragment genu *CAST* długości 622pz, w kolejnym etapie poddano go trawieniu enzymami restrykcyjnymi *MspI* i *NcoI*. Na podstawie wyników wskazano dwa polimorficzne warianty alleli M i N (Palmer i wsp., 1999). Kalpastatyna jest endogennym inhibitorem kalpain, które we włóknie mięśniowym w obecności jonów wapnia tworzą kompleks kalpainy – kalpastatyna (CCS) (Greguła – Kania i Gruszecki 2007). Kompleks CCS wykazuje swoją aktywność w procesie wzrostu mięśni (Goll i wsp., 1992) oraz kruszenia mięsa podczas jego dojrzewania (Koohmaraire 1992); (Greguła – Kania i Gruszecki 2007); (Kończak 2008). Ponadto wspomniany kompleks jest zaangażowany w proces przemian protein (Goll i wsp., 1992), migrację mioblastów (Dedieu i wsp., 2003) oraz wzrost mięśni szkieletowych (Goll i wsp., 1998). Aktywność kalpastatyny może być zmienna w różnych mięśniach tej samej tuszy zwierzęcej, o czym świadczą różnice w szybkości degradacji białek cytoszkieletowych mięśnia w okresie poubojowym (Melody i wsp., 2004). Powiązanie genu kalpastatyny z procesami tenderyzacji mięsa, a szczególnie z procesem kruszenia jest aspektem niezwykle istotnym z punktu widzenia konsumentów. To właśnie podczas procesu dojrzewania mięso nabywa pożądanych przez konsumentów cech smakowości i kruchości. Kruchość mięsa określana jest jako łatwość rozdrabniania podczas początkowego nagryzania mięsa, łatwość rozdrabniania w czasie żucia oraz

odczucia związane z pozostałościami po żuciu (charakter i wielkość resztek) (Kończak 2008). Te wszystkie aktywności wyraźnie wpływają na jakość mięsa jagnięcego, dlatego gen kodujący kalpastatynę jest doskonałym genem kandydującym na cechy mięsa owczego. Szereg zmian genetycznych wpływających na cechy mięsa zostało już opisanych (Lonergan i wsp., 1995; Ciobanu i wsp., 2004), jak również znaleziono powiązania pomiędzy kruchością mięsa a genem *CAST* u świń (Koćwin – Podsiadła i wsp., 2003) i bydła (Casas i wsp., 2006)

## 2.2. POLIMORFIZM W GENIE *CAST*

Wiele badań przeprowadzonych różnymi metodami genetyki molekularnej w Polsce i na świecie dowiodło, że w genie kalpastatyny zwierząt gospodarskich występuje polimorfizm. U kóz polimorfizm *CAST* wykryli m.in. Zhou i Hickford w 2008 roku, u świń Kurył i wsp. w 2003 roku, u bydła Juszcuk – Kubiak w 2004 roku. Wśród owiec polimorfizm wykryto u ras takich jak: plenna owca olkuska, polska owca górską, suffolk, polska owca długowłnista, mieszańce (F<sub>1</sub>) merynos polski x owca romanowska (Kaczor, 2006); merynos polski, berrichon du cher, czarnogłówek (Szkudlarek – Kowalczyk i wsp., 2011); syntetyczna linia owiec BCP i SCP (Greguła – Kania, 2011); ile de france, owca kołudzka, mieszańce ile de france x owca kołudzka (Szkudlarek - Kowalczyk, 2014); owca dalagh (Azari i wsp., 2012), owca iranian karakul (Shahroudi i wsp., 2006); owca balkhi, owca kajli (Khan i wsp., 2012); owca kajli, owca lohi, owca thalli (Suleman i wsp., 2012); owca iranian zel (Dehnavi i wsp., 2011); owca lori (Nanekarani i wsp., 2011); owca romney (Byun i wsp., 2008); owca arabic (Mohammadi i wsp., 2008); owca romney, corriedale, merynos, polwarth, kelso, coopworth (Byun i wsp., 2009); merynos, romney, corriedale, pol dorset (Zhou i wsp., 2006); owca makoei (Ranjbari i wsp., 2012); owca thin tail, jonggol, kissar, priangan, margawati, fat tail (Dagong i wsp., 2011); owca ghezel, arkhamerino (Elyasi i wsp., 2009), owca iranian kurdi (Nassiry i wsp., 2007); owca atabi (Nanekarani i wsp., 2011). Badania, w których zastosowano techniki PCR-RFLP obejmowały *locus MspI/CAST*, *NcoI/CAST*, *Hin6I/CAST*, *TaqI/CAST*, w nielicznych z nich podjęto próby i ustalono powiązania pomiędzy polimorfizmem *CAST* a cechami użytkowości mięsnej. Wśród analizowanych cech znalazły się: przyrosty w poszczególnych okresach życia jagniąt (Chung i Davis, 2012), średnie dobowe przyrosty (Khan i wsp., 2012), masa ciała (Sutikno i wsp., 2011), wysokość klatki piersiowej, średnia szerokość klatki piersiowej (Szkudlarek – Kowalczyk, 2014). Wyniki badań przeprowadzonych przy zastosowaniu techniki SSCP wykazały związek polimorfizmu w genie *CAST* z cechami takimi jak: wydajność rzeźna połędwicy (Bickerstaffe i wsp., 2008), masa ciała przy urodzeniu (Byun i wsp., 2008) czy przyrosty dobowe do momentu odsadzenia (Byun i wsp., 2008; Nassiry i wsp., 2006).

### 2.3. KALPAINY

Kalpainy to wewnątrzkomórkowe neutralne proteiny cysteinowe, występujące we wszystkich komórkach kręgowców. W obrębie tkanki mięśniowej występują w miofibrach głównie na linii Z (Dransfield 1999). Dotychczas w mięśniach szkieletowych opisano 9 form izomerycznych kalpainy (EC 3.4.22.17), wśród których najlepiej poznany u ssaków są: kalpaina 3, zwana kalpainą p94 oraz kalpainy 1 i 2, odpowiednio nazywane  $\mu$ - i m-kalpainami w zależności od koncentracji jonów wapnia niezbędnej do ich aktywacji (Lee i wsp., 2008). Kalpaina 1 wymaga stężenia 10–40  $\mu$ M, natomiast kalpaina 2 1–2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (Lee i wsp., 2008). Poznanie właściwości kalpainy 3 przez długi czas było niemożliwe, ze względu na szybką autolizę w warunkach laboratoryjnych, oraz związek z titiną, która prawdopodobnie wpływa na jej aktywność (Sorimachi i wsp., 1995). Ponadto odkryto kalpainy nietypowe u drożdży, grzybów, insektów: 5, 6, 10; inne specyficzne kalpainy tkankowe: nCl-2, n-Cl-3, n-Cl-4... (Sreenan i wsp., 2001), oraz kalpainę C – prawdopodobnie nieaktywną katalitycznie wyodrębnioną podczas badań *Drosophila melanogaster* (Spadoni i wsp., 2003). Aktywacja systemu kalpainowego zależy od stężenia jonów wapnia i specyficznego inhibitora jakim jest kalpastatyna (Goll i wsp., 2003). Innymi czynnikami wpływającymi na pracę systemu kalpainowego są: temperatura oraz pH (Goll i wsp., 1998). Optymalne pH powinno wynosić 7.0 (Kendall i wsp., 1993). Dowiedziono, że aktywność kalpain różni się w zależności od gatunku zwierząt, rodzaju mięśnia, czynników wpływających na mięso w pierwszych godzinach po uboju lub podczas jego przetwarzania i czynników zewnętrznych takich jak: sposób żywienia, rodzaj chowu (Nowak 2005). Ustalono, że w związku z możliwościami degradacyjnymi kalpain takimi jak: degradowanie włókien mięśniowych białek związanych z błoną komórkową, wielu enzymów, receptorów hormonów sterydowych i czynników wzrostu, odgrywają one ważną rolę w procesach fuzji mioblastów, proliferacji, wzrostu oraz migracji komórek jak również transformacji onkologicznej (Goll i wsp., 1998; Carragher i Frame, 2002). Ustalono, że w procesie dojrzewania mięsa, kalpainy przyczyniają się do zmiany proteolitycznych białek cytoszkieletowych (tropomiozyny, troponiny T, I, białka C, desminy, titiny, nebuliny, wikuliny, laminy, spektryny), które to pełnią funkcje stabilizacyjne w układzie przestrzennym grubych i cienkich filamentów oraz wybranych regulacyjnych miofibrili (Geesink i Koohmaraie, 1999; Kristensen i Purslow, 2001). Dowiedziono, że kalpaina-10 zaburza wydzielanie i działanie insuliny w żywym organizmie (Sreenan i wsp., 2001). Stwierdzono także, że kalpainy pełnią znaczącą rolę w procesie wzrostu i rozwoju mięśni oraz procesie dojrzewania poubojowego mięsa (Goll i wsp., 1998). Dowiedziono również, że system kalpainowy wpływa na proces kruszenia mięsa, o czym świadczy m.in. przyspieszenie proteolizy *post mortem*, gdy mięśnie są poddane inkubacji w

roztworze jonów wapnia i wstrzymanie proteolizy po inkubacji z chelatorami jonów wapnia (Koohmaraie 1992).

#### **2.4. POLIMORFIZM W GENIE *CAPN***

Geny, które kodują kalpainy są określane mianem potencjalnych genów kandydujących na QTL cech związanych z jakością mięsa zwierząt (Chung i wsp., 2001). Badania dotyczące polimorfizmu genów kalpainy prowadzono: u drobiu (Sorimachi i wsp., 1995; Lee i wsp., 2008), gryzoni (Doktor 2011), bydła i trzody chlewnej (Smith i wsp., 2001); (Yang i wsp., 2008, 2009). Badania dotyczące bydła wskazały na istotną korelację między polimorfizmami w genie *CAPN1* a kruchością mięsa wołowego (Page i wsp., 2002). Dzięki temu, geny kalpain u bydła stały się markerami genetycznymi, które pozwalają identyfikować bydło, którego mięso będzie wyróżniało się wysoką kruchością (Casas i wsp., 2006). U drobiu stwierdzono związek polimorficznych form genu *CAPN1* z cechami jakości mięsa kurcząt (Zhang i wsp., 2008) oraz powiązanie w genie kalpainy 3 pomiędzy polimorfizmem pojedynczych nukleotydów a cechami tuszek kurcząt (Zhang i wsp., 2008). Badania dotyczące polimorfizmu kalpain u owiec nie były prowadzone na tak szeroką skalę jak u bydła. Polimorficzne formy genu kodującego kalpainy wykryto u owiec reprezentujących rasy: owce dalagh (Azarii i wsp., 2012); owce kurdi (Nassiry i wsp., 2007); owce zel (Dehnavi i wsp., 2012); owce karakul (Shahroudi i wsp., 2006); owce barki (Shehata i wsp., 2014); owce romney (Fang i wsp., 2013); irańskie owce wełniste, irańskie owce mięsne (Tahmoorespour i wsp., 2005). Obecność dwóch alleli genu *CAPN* (A i B), które znajdowały się w eksonach 5 i 6 opisał Chung i wsp. w 1999 roku. Polimorfizm zidentyfikowano metodą PCR-SSCP (Chung i wsp., 1999). Zhou i wsp. w 2006 roku donieśli o polimorfizmie genu *CAPN3* w eksonie 10, a w 2007 roku Chung i wsp. donieśli o polimorfizmie w eksonie 12 i 13 genu *CAPN3*. Podjęto próby i wykazano powiązania polimorfizmu z wybranymi cechami użytkowości mięsnej badanych owiec, takimi jak: masa ciała po urodzeniu, masa ciała po odsadzeniu od piersi matki, masa ciała po całkowitym odsadzeniu (Chung i wsp., 2012), masy wyrębów tuszy oraz wzrost masy mięśniowej bez negatywnego wpływu na kruchość mięsa (Bickerstaffe i wsp., 2008); dobowe przyrosty masy ciała po odsadzeniu, masa chudego mięsa (Shehata i wsp., 2014), wykorzystując metodę PCR-SSCP.

## **2.5. METODY WYKORZYSTYWANE DO OKREŚLENIA POLIMORFIZMU GENÓW *CAST* i *CAPN***

W dobie aktualnego rozwoju technik genetyki molekularnej szybka identyfikacja i charakterystyka mutacji genetycznych są coraz bardziej dostępne. W celu wykrywania polimorfizmu stosowane są różne metody, jedne z nich pozwalają potwierdzać wcześniej zidentyfikowane mutacje, a inne służą do poszukiwania nowych, dotąd niepoznanych. Do potwierdzania wcześniej określonych polimorfizmów wykorzystywana jest technika PCR-RFLP (ang. Restriction Fragments Length Polymorphism), czyli polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych. Są one dziedzicznymi sekwencjami DNA, które ujawniają się utworzeniem lub zanikiem fragmentu rozpoznawanego przez endonukleazy restrykcyjne albo zmianę liczby nukleotydów między tymi lokalizacjami. Są one dziedziczone jako proste cechy kodominujące (Słomski 2004). Wykrywanie tegoż polimorfizmu przebiega dzięki zastosowaniu enzymów restrykcyjnych po wcześniejszej amplifikacji produktu. Enzymy restrykcyjne rozpoznają specyficzne miejsca w dwuniciowym DNA i przecinają obie nici w wyznaczonym miejscu (Słomski 2008). Wynik reakcji wizualizowany w świetle UV na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym ukazuje specyficzny dla danego genotypu wzór prążków. Wystąpienie zmiany w położeniu prążków oznacza, że w badanym DNA zaszła mutacja. PCR-RFLP pozwala identyfikować mutacje punktowe, małe delecje lub też insercje (Kurzański i wsp., 1998). Kolejną metodą wykorzystywaną do potwierdzania wcześniej wskazanych polimorfizmów, jak również do wykrywania nieznanych dotąd mutacji w badanym fragmencie DNA jest MSSCP (z ang. Multitemperature Single Strand Conformation Polymorphism). Jest to technika, która opiera się na właściwościach fizycznych kwasów nukleinowych takich jak różnice w ruchliwości elektroforetycznej jednoniciowych cząsteczek DNA w zależności od konformacji w jakiej występują (Kaczanowski i wsp., 2001). MSSCP jest wykorzystywana do wstępnej selekcji prób do sekwencjonowania (Ślemp-Migiel i wsp., 2009). Najbardziej wiarygodne wyniki otrzymywane są, gdy analiza dotyczy produktów PCR o długości od 150 do 350 pz. Przed rozpoczęciem reakcji produkty PCR poddawane są denaturacji termicznej w buforze denaturującym w temperaturze 95°C. W celu rozdzielenia produktu PCR przeprowadzana jest elektroforeza pionowa na żelu poliakrylamidowym z dodatkiem lub bez glicerolu, w krokowo zmieniającej się temperaturze, co powoduje zmianę konformacji przestrzennej analizowanych fragmentów DNA. Cząsteczki DNA, które różnią się choć jednym nukleotydem rozdzielają się na żelu w kolejnych etapach temperaturowych dzięki zmianie ruchliwości elektroforetycznej (Kaczanowski i wsp., 2001). W celu wizualizacji żeli wykorzystywany jest zestaw dedykowanych odczynników Silver Stain DNA Kit. Technika ta pozwala w kolejnych etapach na wycięcie z żelu wybranych prążków, zreampifikowanie ich techniką PCR, a następnie sekwencjonowanie,

aby potwierdzić zmiany na poziomie sekwencji genu. W porównaniu do SSCP, technika MSSCP umożliwia przeprowadzenie analiz w krótszym czasie, wykorzystując mniejsze nakłady finansowe oraz przede wszystkim wykazuje większą czułość wykrywania zmian genetycznych (Ślemp-Migiel i wsp., 2009).

### **3. MATERIAŁ I METODY**

#### **3.1. MATERIAŁ ZWIERZĘCY**

Materiał zwierzęcy obejmował 273 jagnięta pochodzące z trzech stad utrzymywanych na terenie trzech województw. Pierwsze stado stanowiły osobniki rasy merynos polski odmiany barwnej użytkowane w typie wełnisto – mięsno – plennym, które pochodziły z województwa kujawsko – pomorskiego, z Zakładu Doświadczalnego Kołuda Wielka, Instytutu Zootechniki, Państwowego Instytutu Badawczego. Jagnięta doświadczalne utrzymywane były systemem alkierzowo – pastwiskowym, żywione granulowaną mieszanką treściwą CJ (1 kg = 185g BO i 10,5 MJ) i sianem z traw w systemie „do woli”. Drugie stado obejmowało wełnisto – mięsne owce rasy kamieniecka pochodzące z Zakładu Produkcyjno – Doświadczalnego w Bałcynach, z województwa warmińsko – mazurskiego. Owce utrzymywane były w tradycyjnych budynkach halowych, ze stropem użytkowym, na głębokiej ściółce. Jagnięta otrzymywały pasze stałe takie jak sianokiszonka z traw i roślin motylkowatych oraz siano łąkowe, natomiast paszą uzupełniającą była mieszanka treściwa CJ. Zwierzęta miały stały dostęp do wody oraz lizawek pastewnych. Trzecie stado reprezentowały mięsne owce pomorskie utrzymywane w miejscowości Szczzenurze w województwie pomorskim. Warunki utrzymania oraz sposób żywienia w tym stadzie były bardzo zbliżone do tych panujących w stadzie owiec kamienieckich. Żywienie tych zwierząt było zgodne z normami Instytutu Zootechniki (IZ, 1998). Badaniami objęto zarówno tryki jak i maciorki. Liczba zwierząt wykorzystanych w badaniach z uwzględnieniem rasy, płci i typu urodzenia została zaprezentowana w Tabeli 1.

#### **3.2. POBRANIE KRWI I IZOLACJA GENOMOWEGO DNA**

Krew obwodowa została pobrana z żyły jarzmowej zwierząt do sterylnych probówek zawierających antykoagulant K<sub>2</sub>EDTA (Profilab, Polska) przez lekarza weterynarii w 2012 roku. Probówki z krwią przechowywano w temperaturze 4°C do czasu ekstrakcji kwasu deoksyrybonukleinowego. Izolację genomowego DNA wykonano w oparciu o procedurę MasterPure™ DNA Purification Kit for Blood (Epicentre Biotechnologies, USA) według protokołu

producenta. Wyizolowane DNA przechowywano w temperaturze 4° C lub mrożono w temperaturze -20° C.

### **3.3. ANALIZA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA DNA**

Następnie przeprowadzono ocenę jakości i ilości wyizolowanego materiału. W celu potwierdzenia obecności DNA w próbach wykonano elektroforezę w 2% żelu agarozowym (Prona Agarose, Hiszpania) z dodatkiem barwnika Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Niemcy) w ilości 0,5 µl Midori Green na 10 ml w 1x buforze TBE; (10xTBE: 0,89M Tris, 0,89M kwasu borowego, 0,02M EDTA, pH 8). Na żel agarozowy наносono 5µl DNA zawieszzonego w 2µl obciążacza 6x Loading Dye Solution (Thermo Scientific, USA). Elektroforezę wykonano w buforze 1xTBE, przez 60min, przy napięciu 120V w aparacie firmy Cleaver Scientific LTD. Następnie żele wizualizowano w świetle ultrafioletowym przy użyciu transiluminatora i archiwizowano w postaci zdjęć przy pomocy aparatu G:Box Chemi XR5 (Syngene, Wielka Brytania). Obecność na żelu prążka bez smug świadczyła o prawidłowo wykonanej izolacji DNA, a jego intensywność o stężeniu DNA w próbce. W celu dokładnej oceny stężenia DNA w każdej badanej próbce przeprowadzono pomiary przy użyciu spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Określono stężenie DNA (µg/ml) i jego czystość (stosunek absorbancji przy 260 nm i 280 nm, A260/A280) w analizowanych próbach. Na podstawie uzyskanych danych wykonano rozcieńczenia wszystkich prób buforem TE do stężenia 50 ng/µl.

### **3.4. AMPLIFIKACJA WYBRANYCH FRAGMENTÓW DNA W REAKCJI PCR**

Amplifikacja fragmentu genu kalpainy 3 (*CAPN3*) o długości 168pz – nazywana dalej CAPN3, została przeprowadzona wg metodyki Zhou i wsp. (2007) z modyfikacjami Grochowskiej (2015). Mieszanina reakcyjna o objętości 20 µl składała się z: 75 ng DNA, 0,25 µM każdego z primerów (forward i reverse), 150 µM dNTP (Thermo Scientific, USA), 1U polimerazy DreamTaq (Thermo Scientific, USA) w 1 x stężonym buforze reakcyjnym z MgCl<sub>2</sub> o stężeniu 2mM. Pierwszym etapem reakcji PCR była wstępna denaturacja w temperaturze 94°C trwająca 2 minuty. Kolejne 3 etapy przebiegły w 35 cyklach powtarzalnych. Były to: denaturacja w temperaturze 94°C trwająca 30 sekund, przyłączanie starterów w temperaturze 59 °C trwające 30 sekund oraz elongacja w temperaturze 72 °C przez 30 sekund. Ostatnim etapem była końcowa elongacja w temperaturze 72 °C przez 5minut.

Amplifikację fragmentu genu kalpastatyny (*CAST*) o długości 622pz - nazywaną dalej CAST, wykonano wg metodyki Palmera i wsp. (1998) z modyfikacjami Grochowskiej (2012). Mieszanina reakcyjna składała się z: 125ng

DNA, 20pmol każdego z primerów (1C i 1D), 200  $\mu$ M dNTP (Thermo Scientific, USA), 1U polimerazy DreamTaq (Thermo Scientific, USA) i 1x stężonego buforu z  $MgCl_2$  o stężeniu 2mM dopełnionych wodą do objętości 30  $\mu$ l. Pierwszym etapem reakcji PCR była wstępna denaturacja w temperaturze 95°C trwająca 5 minut. Kolejne 3 etapy przebiegły w 35 cyklach powtarzalnych. Były to: denaturacja w temperaturze 95°C trwająca 60 sekund, annealing w temperaturze 62°C trwający 60 sekund oraz elongacja w temperaturze 72°C przez 120 sekund. Ostatnim etapem była końcowa elongacja w temperaturze 72°C przez 10 minut. Reakcje amplifikacji przeprowadzono w termocyklerach Mastercycler pro S (Eppendorf, Niemcy). W celu oceny jakościowej produktów reakcji PCR przeprowadzono rozdział elektroforetyczny uzyskanych amplikonów w 2% żelu agarozowym (Prona Agarose, Hiszpania) z dodatkiem barwnika Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Niemcy). Nakładano próby wielkości 5 $\mu$ l produktu PCR zawieszonego w 2 $\mu$ l obciążacza 6xLoading Dye Solution (Thermo Scientific, USA). Elektroforeza przebiegała w buforze 1xTBE (10xTBE: 0,89M Tris, 0,89M kwasu borowego, 0,02M EDTA, pH 8,0), przez 60min, przy napięciu 120V w aparacie firmy Cleaver Scientific LTD. Wzorcem masy molekularnej użytym na żelu był pBR322 DNA/AluI firmy Thermo Scientific, USA. Następnie żele wizualizowano w świetle ultrafioletowym przy użyciu transiluminatora i archiwizowano w postaci zdjęć przy pomocy aparatu G:Box Chemi XR5 (Syngene, Wielka Brytania). Obecność jednego prążka o długości 168pz świadczyła o prawidłowym przebiegu reakcji PCR o nazwie CAPN3, natomiast obecność prążka o długości 622pz reakcji PCR o nazwie CAST.

### **3.5. TRAWIENIE PRODUKTU AMPLIFIKACJI GENU *CAST* ENZYMAMI RESTRYKCYJNYMI (RFLP)**

W celu wykrycia obecności polimorficznych form genu *CAST* przeprowadzono trawienie używając trzech enzymów restrykcyjnych *MspI*, *NcoI* (Thermo Scientific, USA) wg metodyki Palmera i wsp. (1998) z modyfikacjami Grochowskiej (2012), *Hin6I*, według metodyki Palmera i wsp., (2000) z modyfikacjami Grochowskiej (2012). Warunki reakcji oraz składy mieszanin reakcyjnych przedstawiono w Tabeli 2. Produkty reakcji hydrolizy rozdzielono elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym (Prona Agarose, Hiszpania) z dodatkiem barwnika Midori Green DNA Stain (Nippon Genetics Europe GmbH, Niemcy), przez 90min, pod napięciem 120V względem markera pBR322 DNA/AluI firmy Thermo Scientific, (USA). Żele wizualizowano w świetle ultrafioletowym przy użyciu transiluminatora i archiwizowano w postaci zdjęć przy pomocy aparatu G:Box Chemi XR5 (Syngene, Wielka Brytania).



### **3.6. WYKRYWANIE POLIMORFIZMU GENU KALPAINY 3 CAPN3 METODĄ MSSCP**

W celu wykrycia polimorfizmu w genie *CAPN3* przeprowadzono reakcję MSSCP. Reakcję wykonano wg metodyki Grochowskiej (2013), wykorzystując aparat DNA Pointer (K. Kucharczyk T.E.). 1 $\mu$ l produktu PCR zawieszono w 10  $\mu$ l obciążacza (Zhou i wsp., 2007) zdenaturowano w temperaturze 95°C przez 7 min i schłodzono na lodzie. Następnie wykonano elektroforezę pionową na 10% żelu poliakrylamidowym (K. Kucharczyk T.E., Polska) z dodatkiem 5% glicerolu w buforze 0,5 TBE. Przebiegała ona w czterech etapach: 1) preelektroforeza w temperaturze 20°C przez 100Vh, 2) faza I w temperaturze 15 °C przez 800Vh, 3) faza II w temperaturze 10 °C, przez 800Vh oraz 4) faza III w temperaturze 5°C przez 800Vh. Żele wizualizowano poprzez wysrebrzenie przy użyciu kitu Silver Stain Kit (Kucharczyk Techniki Elektroforetyczne Sp.z o.o., Polska) i archiwizowano w postaci zdjęć zrobionych za pomocą aparatu G:Box Chemi XR5, (Syngene, Wielka Brytania).

### **3.7. SEKWENCJONOWANIE FRAGMENTU GENU CAPN3**

Produkty PCR osobników homozygotycznych oraz heterozygotycznych reprezentujących specyficzne profile prążków MSSCP oczyszczono przy użyciu zestawu odczynników ExoSAP-IT®Affymetrix (USA) i poddano sekwencjonowaniu w obu kierunkach w firmie Genomed (Warszawa).

W celu przeszukania bazy danych NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) w poszukiwaniu sekwencji homologicznych do sekwencji otrzymanych w wyniku sekwencjonowania wykorzystano algorytm BLAST. Następnie sekwencje nukleotydowe osobników homozygotycznych i heterozygotycznych dopasowano i porównano względem siebie i sekwencji alleli: 01, 02 oraz 04 (numery GenBank odpowiednio: DQ660376.1, DQ660377.1 oraz JN940729.1) obejmujących 10. ekson genu *CAPN3* owiec przy pomocy programu DNA Dragon firmy Sequentix (Niemcy).

### **3.8. ANALIZOWANE CECHY UŻYTKOWOŚCI TUCZNEJ I MIĘSNEJ**

Dane dotyczące płci, typu urodzenia oraz cech użytkowości mięsnej, badanych owiec ras kamieniecka i pomorska zostały udostępnione przez Zakład Hodowli Owiec i Kóz Uniwersytetu Warmińsko – Mazurskiego w Olsztynie. Pochodziły one z dokumentacji hodowlanej prowadzonej przez Związek Hodowców Owiec i Kóz zgodnie z wytycznymi właściwymi dla regionu. Dane dotyczące owiec rasy merynos barwny zostały zebrane w Instytucie Zootechniki Państwowego Instytutu Badawczego, Zakładu Doświadczalnego Kołuda Wielka w ramach grantu nr NN311 521440 finansowanego przez Narodowe Centrum

Nauki zrealizowanego w Zakładzie Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno – Przyrodniczego w Bydgoszczy.

### 3.8.1. Masa ciała jagniąt i ich przyrosty

Masę ciała i przyrosty dobowe kontrolowano w poszczególnych okresach życia 273 jagniąt.

W badanych grupach owiec ras kamieniecka, pomorska i merynos barwny kontrolowano masę ciała w 2. i 56. dniu życia zwierząt. Przyrosty masy ciała pomiędzy 2. a 56. dniem życia jagniąt obliczono wykorzystując wyniki ważeń zgodnie z poniższymi wzorami.

Średnie dobowe przyrosty masy ciała jagniąt [g] pomiędzy 2. a 56. dniem życia wyliczono według wzorów:

$$P_{2-56} = \frac{m_{56} - m_2}{54} \times 1000$$

gdzie:

$P_{2-56}$  – przyrosty masy ciała zwierzęcia w przedziale wiekowym 2-56 dni wyrażone w gramach

$m_{56}, m_2$  – masy ciała jagniąt w wieku 2 i 56 dni, wyrażone w kilogramach

### 3.8.2. Ocena poubojowa jagniąt

Spśród badanych zwierząt 30 osobników rasy merynos polski odmiany barwnej zostało poddanych ubojowi w ramach grantu nr NN311 521440 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki zrealizowanego w Zakładzie Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Uniwersytetu Technologiczno – Przyrodniczego w Bydgoszczy wg procedur opisanych przez Krupińskiego i wsp. (2009). Wśród nich były same tryczki. Tusze zwierząt podzielono na poszczególne wyreby i wykonano pomiary wg metodyki Krupińskiego i wsp. (2009):

1. Masa partii przodu [g]
2. Masa partii środka [g]
3. Masa partii zadu [g]
4. Masa szyi [g]
5. Masa goleni przedniej [g]
6. Masa karkówki [g]
7. Masa łopatki [g]
8. Masa łąty i mostka z żebrami [g]
9. Masa antrykotu [g]
10. Masa combra [g]

11. Masa polędwiczki [g]
12. Masa goleni tylnej [g]
13. Masa udźca [g]
14. Masa udźca przed dysekcją [g]
15. Masa tkanki mięśniowej w udźcu [g]
16. Masa tkanka tłuszczowej w udźcu [g]
17. Masa tkanka kostnej w udźcu [g]
18. Procentowa [%] zawartość tkanki mięśniowej w udźcu
19. Procentowa [%] zawartość tkanki tłuszczowej w udźcu
20. Procentowa [%] zawartość tkanki kostnej w udźcu

### 3.9. OPRACOWANIE STATYSTYCZNE

Na podstawie wyników reakcji RFLP oszacowano frekwencje alleli i genotypów w trzech analizowanych *locus*: *MspI/CAST*, *NcoI/CAST*, *Hin6/CAST*. Następnie obliczono częstości występowania genotypów uzyskanych jako zestawione kombinacje z trzech *loci CAST* analizowanych metodą PCR-RFLP. Natomiast wyniki reakcji MSSCP posłużyły do obliczenia frekwencji alleli, i genotypów dla każdej rasy oddzielnie (Palmer i wsp., 2000; Greguła-Kania, 2011). Dla danych dotyczących genotypów wykrytych metodą RFLP oraz MSSCP wykonano analizę sprawdzającą czy populacja jest w równowadze Hardy'ego-Weinberga stosując test zgodności  $\chi^2$ .

Charakterystykę statystyczną mas ciała jagniąt w 2. i 56. dniu oraz przyrostów dobowych przeprowadzono w oparciu o wyliczenia podstawowych miar położenia i zmienności takich jak: średnia arytmetyczna ( $\bar{X}$ ) i odchylenie standardowe ( $S_x$ ). Obliczenia wykonano osobno dla każdej rasy jagniąt.

Analizę wpływ polimorfizmu genów kalpastatyny i kalpainy 3 na badane cechy użytkowości mięsnej wykonano, stosując wieloczynnikową analizę wariancji wykonaną w dwóch wariantach. W tym celu stworzono modele liniowe oddzielne dla każdej wykorzystanej metody badania molekularnego (RFLP i MSSCP). Analizę wariancji wykonano dla każdej rasy osobno, uwzględniając następujące czynniki: genotyp, płeć oraz typ urodzenia (model 1 – trójczynnikiowy).

Model 1.

$$y_{ijkl} = \mu + a_i + b_j + c_k + (ab)_{ij} + (ac)_{ik} + (bc)_{jk} + e_{ijkl}$$

gdzie:

$y_{ijkl}$  – badana cecha

$\mu$  – średnia

$a_i$  – wpływ płci jagnięcia (samiec, samica)

$b_j$  – wpływ typu urodzenia jagnięcia (pojedynczy, bliźniaczy)

$c_k$  – wpływ genotypów kalpastatyny/kalpainy 3

$(ab)_{ij}, (ac)_{ik}, (bc)_{jk}$  – interakcja pierwszego stopnia między czynnikami

$e_{ijkl}$  – błąd losowy

Ponadto w ramach przeprowadzonych analiz statystycznych za pomocą analizy wariancji, biorąc pod uwagę wszystkie badane zwierzęta, zastosowano model uwzględniający: rasę, genotyp, płć oraz typ urodzenia (model 2 – czteroczynnikowy)

Model 2.

$$y_{ijklm} = \mu + a_i + b_j + c_k + d_l + (ab)_{ij} + \dots + (cd)_{kl} + e_{ijklm}$$

gdzie:

$y_{ijklm}$  – badana cecha

$\mu$  – średnia

$a_i$  – wpływ płci jagnięcia (tryk, macioroka)

$b_j$  – wpływ typu urodzenia jagnięcia (pojedynczy, bliźniaczy)

$c_k$  – wpływ genotypów kalpastatyny/kalpainy 3

$d_l$  – wpływ rasy (kamieniecka/ pomorska/ merynos polskie odmiana barwna)

$(ab)_{ij}, (ac)_{ik}, (bc)_{jk}$  – interakcja pierwszego stopnia między czynnikami

$e_{ijklm}$  – błąd losowy

Cechy poubojowe zostały określone jedynie w grupie tryczków merynosa barwnego, dlatego model liniowy (model 1) uproszczono, zawierał on tylko dwa czynniki (typ urodzenia oraz genotyp).

W celu stwierdzenia między którymi grupami zachodzą istotne różnice pomiędzy średnimi wartościami badanych cech ilościowych zastosowano testy post hoc Tukey'a.

Ze względu na bardzo małą liczebność ( $n=1$ ), z analiz statystycznych zostały wyłączone osobniki o genotypach: BB w locus *Hin6I/CAST*, oraz cc w obrębie rasy merynos barwny; jak również osobniki o genotypach cc i cd spośród jagniąt kamienieckich

Wszystkie obliczenia związane z opracowaniem statystycznym wykonano za pomocą programu Statistica v.12 firmy Statsoft.

## **4. WYNIKI**

### **4.1. IZOLACJA DNA, OCENA JAKOŚCIOWA I ILOŚCIOWA DNA, AMPLIFIKACJA ORAZ OCENA JAKOŚCIOWA PRODUKTÓW PCR**

Wyizolowany przy użyciu wybranego zestawu do izolacji DNA charakteryzował się wysoką jakością i zadowalającym stężeniem. Elektroforetyczny rozdział genomowego DNA wykazał obecność w każdej próbie pojedynczego prążka bez smug, który świadczył o prawidłowo przeprowadzonej izolacji i o wysokiej jakości badanych preparatów. Wykorzystując aparat NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) otrzymano wyniki pomiarów spektrofotometrycznych, na podstawie których stwierdzono, że stosunek absorpcji A260 do A280 wahał się pomiędzy 1,7 a 1,9, co potwierdziło wysoką jakość badanego materiału DNA. Na podstawie uzyskanych wyników wykonano rozcieńczenia, wyrównując stężenia DNA we wszystkich próbach do wartości 50 ng/μl. W wyniku rozdziału elektroforetycznego produktu, otrzymanego po amplifikacji fragmentu genu *CAPN3* wg metodyki Zhou i wsp. (2007), uzyskano wyraźny prążek o długości 168 pz, natomiast w przypadku produktu PCR, będącego wynikiem powielenia fragmentu genu *CAST* wg metodyki Palmer i wsp. (1998), prążek miał długość 622 pz. Wyniki te potwierdziły prawidłowy, dokładny i specyficzny charakter przeprowadzonych reakcji PCR.

### **4.2. REAKCJA RFLP, WYKRYCIE ALLELI I GENOTYPÓW GENU *CAST***

Dzięki zastosowaniu trzech reakcji RFLP, wykryto polimorfizm w trzech miejscach restrykcyjnych genu kalpastatyny w objętej badaniami grupie owiec. Enzym *MspI* rozpoznawał tranżycję G/A, enzym *NcoI* rozpoznawał tranżycję T/C, a enzym *Hin6I* transwersję G/T. Zastosowanie wyżej wymienionych enzymów powodowało wystąpienie różnic w długościach produktów otrzymanych po trawieniu ampliconów o długości 622 pz uzyskanych w reakcji powielania fragmentu genu *CAST*. Rezultatem hydrolizy allela M enzymem restrykcyjnym *MspI* było powstanie dwóch fragmentów o długości 336 pz i 286 pz. Natomiast w wyniku hydrolizy allela N enzymem *NcoI* powstały dwa fragmenty o długości 374 pz i 248 pz (Palmer i wsp., 1998). W przypadku allela

A rozpoznawanego przez enzym *Hin6I*, w wyniku trawienia powstawały dwa fragmenty o długości 342 pz i 280 pz (Palmer i wsp., 2000). Przykładowe zdjęcia rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji hydrolizy ampikonów enzymami restrykcyjnymi przedstawiono na rycinach 1, 2 i 3. Kombinacje zestawione na podstawie wyników z trzech miejsc restrykcyjnych w *locus CAST* zostały rozpoznane jako haplotypy o nazwie: „a”, „e”, „d”, „c” i „b” (Palmer i wsp., 2000, Greguła-Kania 2011). Haplotypy „a”, „e”, „d”, „c” i „b” powstały z następujących zestawień, odpowiednio:

M(*MspI*)A(*Hin6I*)M(*NcoI*),

N(*MspI*)A(*Hin6I*)M(*NcoI*),

N(*MspI*)B(*Hin6I*)M(*NcoI*),

M(*MspI*)B(*Hin6I*)M(*NcoI*),

N(*MspI*)A(*Hin6I*)N(*NcoI*).

### **4.3. REAKCJA MSSCP, WYKRYCIE ALLELI I GENOTYPÓW *CAPN3***

W wyniku reakcja MSSCP, której poddano amplifikowane w reakcji PCR fragmentu genu *CAPN3*, wykryto łącznie trzy wzory prążków reprezentujące trzy allele *CAPN3* o nazwie 01, 02, 04. Genotypami homozygotycznymi były: 01'01; 02'02, a heterozygotycznymi genotypy: 01'02; 01'04 (Rycina 4). Stwierdzono obecność każdego z wykrytych alleli i genotypów we wszystkich badanych rasach owiec.

### **4.4. FREKWENCJA ALLELI I GENOTYPÓW**

#### **4.4.1. Gen *CAST***

W przeprowadzonych badaniach własnych, które obejmowały 273 jagnięta ras: kamieniecka, pomorska, merynos barwny zidentyfikowano w *locus MspI/CAST* allele M i N (Tabela 3) oraz genotypy MM, MN, NN (Tabela 3). W *locus NcoI/CAST* stwierdzono obecność alleli M i N (Tabela 3) oraz genotypów MM oraz MN (Tabela 3). Natomiast w *locus Hin6I/CAST* zidentyfikowano dwa allele A i B (Tabela 3), oraz trzy genotypy AA, AB, BB (Tabela 3).

Kombinacje przedstawionych powyżej alleli z *locus MspI/CAST*, *NcoI/CAST* i *Hin6I/CAST* zestawione razem dały pięć haplotypów o nazwach: a, b, c, d, e w ośmiu układach genotypowych: aa, ab, ac, cd, cc, ee, ae, ad (Tabela 4).

We wszystkich trzech rasach objętych badaniami własnymi w *locus MspI/CAST* z najwyższą frekwencją występował genotyp MM. W populacji owiec kamienieckich frekwencja genotypu MM była najwyższa i wynosiła 87,01% (Tabela 3), wśród owiec rasy pomorskiej wynosiła niewiele mniej (87%),

natomiast najniższa była w obrębie jagniąt rasy merynos barwy (71,88%) (Tabela 3). Jedynie w populacji jagniąt merynos barwny pojawiły się osobniki homozygotyczne o genotypie NN/*MspI*, chociaż ich częstość była niska i wynosiła 4,16%.

Analiza częstości genotypów w *locus NcoI/CAST* wykazała, że u wszystkich badanych ras z najwyższą częstością występował genotyp MM - 100% jagniąt rasy kamieniecka i merynos barwny oraz 94% jagniąt pomorskich - były to zwierzęta homozygotyczne. Obecność genotypu MN stwierdzono jedynie w populacji owiec pomorskich (6%) (Tabela 3).

Analizując frekwencję genotypów w *locus Hin6I/CAST* stwierdzono obecność dwóch genotypów AA, AB wśród owiec pomorskich oraz trzech genotypów AA, AB, BB w populacjach owiec kamienieckich i merynosa barwnego. Genotypem najczęściej występującym u wszystkich trzech analizowanych w badaniach własnych ras był AA (Tabela 3). W obrębie owiec kamienieckich jego frekwencja wynosiła 85,71%, pomorskich 97,00%, natomiast w przypadku owiec rasy merynos barwny 64,58% (Tabela 3). W grupie owiec pomorskich nie zidentyfikowano osobników homozygotycznych o genotypie BB.

Wyniki analiz dotyczących kombinacji alleli zestawionych z trzech miejsc restrykcyjnych w *CAST* dały możliwość utworzenia pięciu haplotypów (a, b, c, d, e) oraz ośmiu genotypów (aa, ab, ac, ad, ae, cc, cd, ee). W obrębie wszystkich badanych populacji jagniąt stwierdzono, że z najwyższą częstością występował haplotyp a, natomiast z najniższą haplotyp d. Nie stwierdzono obecności wszystkich alleli (a, b, c, d, e) oraz wszystkich genotypów (aa, ab, ac, cd, cc, ee, ae, ad) (Tabela 4) jednocześnie w żadnej z badanych grup owiec. Wśród jagniąt rasy kamieniecka najczęściej występującym genotypem był aa – 76,62%, a genotypy cd i cc występowały najrzadziej (1,30%, 1,30%) (Tabela 4). Podobnie jak w populacji owiec kamienieckich w grupie owiec pomorskich z najwyższą częstością występował genotyp aa (84,00%), natomiast z najniższą ac (3,00%) (Tabela 4). Populacja owiec pomorskich charakteryzowała się najmniejszym polimorfizmem w zakresie badanych kombinacji haplotypów. Wśród owiec rasy merynos barwny zaobserwowano cztery spośród pięciu alleli (a, c, d, e) łączące się w sześć genotypów (aa, ac, ae, ee, ad, cc) z frekwencją odpowiednio: 41,66%, 29,17%, 18,75%, 4,17%, 5,21%, 1,04% (Tabela 4).

Badania zgodności rozkładu empirycznego genotypów z rozkładem teoretycznym wynikającym z prawa Hardy'ego – Weinberg'a, za pomocą testu  $\chi^2$  we wszystkich trzech analizowanych *loci CAST* wśród badanych jagniąt wykazały, że objęte badaniami własnymi populacje za wyjątkiem jagniąt rasy kamieniecka w *locus Hin6I/CAST* nie były w równowadze genetycznej.

#### **4.4.2. Gen *CAPN3***

Analiza wyników reakcji MSSCP dotyczących zamplifikowanego fragmentu genu *kalpain3* o długości 168pz wykazała obecność trzech alleli

(Tabela 5) oraz czterech genotypów 01'01, 01'02, 02'02, 04'01 u trzech badanych ras owiec. Najwyższą częstością wyróżniał się genotyp 01'02, która wynosiła odpowiednio: w obrębie owiec rasy kamieniecka 35,06%, wśród owiec pomorskich 69,00%, a w populacji owiec rasy merynos barwny 48,96%. Genotyp 04'01 występował najrzadziej. Jego obecność stwierdzono wśród jagniąt kamienieckich, pomorskich oraz merynosa barwnego, z następującą częstością: 9,09%, 5,00%, 8,33% (Tabela 5).

#### **4.5. SNP WYKRYTE W GENIE *CAPN3***

Przeszukanie bazy danych NCBI GenBank przy użyciu sekwencji nukleotydowych otrzymanych po sekwencjonowaniu produktów PCR osobników homozygotycznych pozwoliło na znalezienie sekwencji czterech alleli genu *CAPN3* wśród owiec: 01, 02, i 04 (Tabela 6). Analiza sekwencji nukleotydowych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania produktów PCR osobników reprezentujących poszczególne wzory prążków MSSCP wykazała, iż wystąpienie czterech różnych profili fragmentów DNA jest wynikiem obecności polimorfizmów w trzech pozycjach: G/T w pozycji 91. oraz C/T w pozycji 103. i 139. (licząc od pierwszego nukleotydu 10. eksonu genu *CAPN3* w sekwencji GenBank nr DQ660376.1). Wszystkie w/w SNP znajdują się w 10. eksonie i obejmują trzecie pozycje poszczególnych kodonów. Są to mutacje synonimiczne, czyli takie które nie zmieniają sekwencji aminokwasów w produkcie białkowym. W Tabeli 6. przedstawiono haplotypy genu *CAPN3* wykryte w eksonie 10., natomiast ich graficzne dopasowanie zobrazowano na Rycinie 3.

#### **4.6. WPŁYW POLIMORFIZMU BADANYCH GENÓW NA MASĘ CIAŁA ORAZ JEJ PRZYROSTY**

Badaną populację jagniąt scharakteryzowano statystycznie pod względem cech mas ciała w 2. i 56. dniu oraz przyrostów dobowych w Tabelach 7-10. Natomiast wpływ polimorfizmu w genach *CAST* i *CAPN3* w zakresie cech użytkowości mięsnej przedstawiono w Tabelach 11-13.

##### **4.6.1. Gen *CAST***

###### **4.6.1.1. Owce kamienieckie**

Zastosowany wieloczynnikowy model analizy wariancji w celu weryfikacji wpływu badanego polimorfizmu *CAST* dał podstawy do stwierdzenia, że w populacji jagniąt rasy kamienieckiej czynnikiem istotnie statystycznie różnicującym masę ciała w 56. dniu oraz przyrosty dobowe pomiędzy 2. i 56. dniem był genotyp w *locus MspI/CAST* ( $p=0,002$ ). Nie stwierdzono natomiast statystycznie istotnego powiązania pomiędzy polimorfizmem w *locus*



*MspI/CAST* a masą ciała w 2. dniu życia jagniąt kamienieckich (Tabela 8). Masa ciała jagniąt w 2. dniu po urodzeniu była wyrównana i wynosiła w grupie osobników o genotypie MN (4,94kg), w grupie zwierząt o genotypie MM (4,93kg). Natomiast najwyższą średnią masą w 56. dniu (17,41kg) oraz najwyższe przyrosty dobowe (231,07g) oznaczono u jagniąt z genotypem MM (Tabela 8).

Populacja owiec kamienieckich była monomorficzna pod względem *NcoI/CAST* co uniemożliwiło ocenę wpływu genotypu na analizowane cechy: masę ciała w 2. i 56. dniu, oraz przyrosty dobowe. Masa ciała jagniąt o genotypie MM w *locus NcoI/CAST* w 2. dniu życia wynosiła średnio 4,94kg, a w 56. dniu wynosiła 17,13kg, natomiast średnie przyrosty dobowe wynosiły 225,77g (Tabela 7).

Analizy statystyczne wykonane na podstawie wyników ważeń i badań molekularnych dały podstawy do stwierdzenia że czynnikiem istotnie różnicującymi masę ciała w 2. dniu życia owiec był genotyp w *locus Hin6I/CAST* ( $p=0,017$ ). Istotne różnice stwierdzono pomiędzy masą jagniąt o genotypie AB i BB (Tabela 8). Nie wykazano statystycznie istotnego powiązania pomiędzy genotypem w *locus Hin6I/CAST* a masą ciała w 56. dniu oraz przyrostami dobowymi masy ciała pomiędzy tymi dniami w badanej grupie owiec kamienieckich (Tabela 8). Osobniki o genotypie BB/*Hin6I* charakteryzowały się najwyższą średnią wartością masy w 2. dniu (5,70kg) oraz najwyższymi średnimi przyrostami dobowymi (233,21g). Natomiast jagnięta o genotypie AA/*Hin6I* wyróżniały się najwyższą średnią masą ciała w 56. dniu życia (17,40kg) (Tabela 8).

Przeprowadzona wieloczynnikowa analiza wariancji dotycząca haplotypów *CAST* wykazała, istotne statystycznie powiązanie pomiędzy polimorfizmem w genie kalpastatyny a cechami takimi jak: masa ciała w 56. dniu ( $p=0,0006$ ), oraz dobowe przyrosty masy ( $p=0,000205$ ) (Tabela 9). Charakterystyka opisowa wskazała, że najwyższą średnią wartością masy ciała w 2. dniu (4,97kg) wyróżniały się jagnięta o genotypie ae, natomiast najwyższą średnią masę ciała w 56. dniu (18,25kg) oraz najwyższe przyrosty dobowe (250,92g) osiągały jagnięta o genotypie ad (Tabela 9). Najniższą średnią wartość masy ciała w 2. dniu życia jagniąt (4,53kg) zaobserwowano wśród osobników o genotypie ac, natomiast wśród osobników o genotypie cd wykazano najwyższe średnie wartości masy ciała w 56. dniu (13,54kg) oraz najwyższe średnie wartości przyrostów dobowych masy ciała (154,44g). Istotne różnice stwierdzono w zakresie cechy masa ciała w 56. dniu życia wśród jagniąt o genotypach: aa i ac, jak również w obrębie cechy przyrosty dobowe masy ciała w grupie zwierząt o genotypach aa i ae (Tabela 9).

#### 4.6.1.2. Owce pomorskie

Wśród badanych jagniąt pomorskich poddanych kontroli masy ciała i przyrostów dobowych nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w obrębie tych cech pomiędzy grupami jagniąt o zróżnicowanych polimorficznie genotypach *CAST* we wszystkich trzech analizowanych *loci*. W *locus NcoI/CAST* najwyższą średnią masę ciała w 2. dniu życia (4,24kg) zaobserwowano wśród owiec o genotypie MM, a najniższą średnią masę ciała w 2. dniu wyróżniały się osobniki MN (4,02kg). Natomiast w 56. dniu życia jagniąt osobniki o genotypie MN w *locus NcoI/CAST* charakteryzowały się najwyższą średnią masę ciała (21,61kg), a osobniki o genotypie MM najniższą (21,57kg). Najwyższe średnie przyrosty dobowe pomiędzy 2. a 56. dniem życia stwierdzono wśród zwierząt o genotypie MN (325,75g) (Tabela 8).

W *locus MspI/CAST* podobnie jak w *locus NcoI/CAST* wykazano, że genotyp nie jest czynnikiem istotnie statystycznie różnicującym analizowane cechy ilościowe. Osobniki o genotypie MM/*MspI* wyróżniały się najwyższą średnią masę ciała w 2. dniu po urodzeniu (4,24kg), a osobniki o genotypie MN odznaczały się najwyższą średnią masę ciała w 56. dniu (21,60kg) oraz najwyższymi przyrostami dobowymi pomiędzy 2.a 56. dniem życia (323,87g) (Tabela 8).

Jagnięta o genotypie AA w *locus Hin6I/CAST* odznaczały się najwyższą średnią masę ciała (4,23kg) w 2. dniu, a jagnięta o genotypie AB najwyższą średnią masę ciała w 56. dniu (22,02kg) oraz najwyższymi przyrostami dobowymi (336,74g) (Tabela 8). Nie stwierdzono istotnego powiązania pomiędzy genotypem w *locus Hin6I/CAST* a analizowanymi cechami (Tabela 8).

Analizując wartości badanych cech dotyczących wzrostu jagniąt do wieku 56 dni w zależności od haplotypów stwierdzono, że najwyższą średnią masę ciała w 2. dniu wyróżniały się jagnięta o genotypie aa (4,25kg), a w 56. dniu zwierzęta o genotypie ac (22,02kg). Wyróżniały się one również najwyższym średnim przyrostem dobowym wynoszącym średnio 336,74g. Jednak różnice te nie były statystycznie istotne.

#### 4.6.1.3. Merynos polski odmiana barwna

Stosując wieloczynnikowy model analizy wariancji do opracowania statystycznego wyników w badaniach dotyczących jagniąt rasy merynos barwny wykazano, że genotyp w *locus MspI/CAST* był czynnikiem istotnie statystycznie różnicującymi masę ciała w 56. dniu ( $p=0,005$ ) oraz przyrosty dobowe masy ciała ( $p=0,003$ ) (Tabela 8). Osobniki o genotypie MN/*MspI* cechowała najwyższa średnia masa ciała w 2. dniu życia (4,94kg), a osobniki o genotypie NN/*MspI* odznaczały się najwyższą masę ciała w 56. dniu życia (20,30kg) oraz najwyższymi średnimi przyrostami dobowymi (291,20g) (Tabela 8).

Również nie stwierdzono istotnego wpływu genotypu *NcoI/CAST* na masę ciała w 2. i 56. dniu życia jagniąt, oraz na ich przyrosty dobowe (Tabela 8). Wśród

jagniąt merynos barwny w *locus NcoI/CAST* średnia masa ciała w 2. dniu wynosiła 4,85kg, w 56. dniu 19,19kg, a średnie przyrosty dobowe wynosiły 265,68g (Tabela 8).

Analizy statystyczny wykonane na podstawie wyników w *locus Hin6I/CAST* nie wykazały statystycznie istotnych powiązań pomiędzy stwierdzonym polimorfizmem w *locus Hin6I/CAST* a masą ciała w 2., 56. dniu życia oraz przyrostami dobowymi (Tabela 8). Osobniki o genotypie BB/*Hin6I* charakteryzowały się najwyższą średnią masą ciała w 2. dniu (5,30kg), najniższą średnią masą ciała w 56. dniu (18,00kg) i najniższymi średnimi przyrostami dobowymi (235,18g). Zwierzęta o genotypie AA/*Hin6I* cechowała najwyższa średnia masa ciała w 56. dniu (19,69kg) oraz najwyższe średnie przyrosty dobowe (274,13g) (Tabela 8).

Wieloczynnikowa analiza wariancji dotycząca haplotypów *CAST* wykazała, że nie są one czynnikami istotnie różnicującymi masę ciała w 2. dniu ( $p=0,91$ ), ale różnicują istotnie statystycznie takie cechy jak: masa ciała w 56. dniu ( $p=0,014$ ), oraz dobowe przyrosty masy ( $p=0,012$ ) (Tabela 9). Istotnie statystycznie różnice w zakresie cechy: masa ciała w 56. dniu zaobserwowano pomiędzy osobnikami o genotypach ae i ac, oraz aa i ac, natomiast dla cechy przyrosty dobowe istotnie statystycznie różniącymi się genotypami były aa i ac. Charakterystyka opisowa wykazała, że najwyższą średnią wartością masy ciała w 2. dniu (5,08kg) oraz w 56. dniu (20,29kg) wyróżniały się jagnięta o zwierzęta o genotypie aa, natomiast a najwyższymi przyrostami masy (291,20g) wyróżniały się jagnięta o genotypie ee (Tabela 9).

#### **4.6.2. Gen CAPN3**

##### **4.6.2.1. Owce kamienieckie**

Analizując wyniki dotyczące mas ciała oraz przyrostów dobowych jagniąt kamienieckich w zależności od polimorfizmu genu *CAPN3*, stwierdzono, że wśród owiec kamienieckich najwyższą masą ciała w 2. dniu wyróżniały się jagnięta o genotypie 02'02 (5,01kg), a najniższą - 4,86kg osobniki o genotypie 01'02. Osobniki o genotypie 04'01 cechowała najwyższa masa ciała w 56. dniu oraz największe przyrosty dobowe (247,00g) (Tabela 10). Jednakże różnice te były statystycznie nieistotne.

##### **4.6.2.2. Owce pomorskie**

Spośród owiec pomorskich najwyższą średnią masą ciała w 2. dniu życia odznaczały się osobniki o genotypie 01'01 (4,38kg), a najniższą zwierzęta o genotypie 01'02 (4,17kg) (Tabela 10). Wśród jagniąt o genotypie 03'01 zaobserwowano najwyższą średnią masę ciała w 56. dniu (22,66g) oraz najwyższe średnie przyrosty dobowe (340,34g). Najniższe przyrosty dobowe stwierdzono w obrębie jagniąt o genotypie 01'01 (308,87g) (Tabela 10). Pod

względem badanych genotypów różnice dotyczące analizowanych cech ilościowych nie były istotne statystycznie.

#### 4.6.2.3. Merynos polski odmiana barwna

Analizując cechy dotyczące jagniąt merynosa barwnego wykazano, że osobniki o genotypie 01'01 charakteryzowały się najwyższą masą ciała w 2. dniu (5,02kg) oraz 56. dniu (19,30kg). Największe przyrosty dobowe stwierdzono wśród osobników o genotypie 04'01 (279,63g). Jagnięta o genotypie 02'02 wyróżniały się najniższą średnią masą ciała w 56. dniu życia (18,46kg) oraz najniższymi średnimi przyrostami dobowymi masy ciała (254,04g) (Tabela 10). Zastosowany wieloczynnikowy model analizy wariancji nie wykazał istotnego statystycznie powiązania genotypu w *locus CAPN3* z masą ciała w 2., 56. dniu życia oraz z przyrostami dobowymi (Tabela 10).

### 4.7. WPŁYW POLIMORFIZMU BADANYCH GENÓW NA ANALIZOWANE CECHY POUBOJOWE

W grupie badanych jagniąt rasy merynos polski odmiana barwna nie stwierdzono istotnego statystycznie powiązania pomiędzy genotypami genu kalpastatyny w locus: *MspI/CAST*, *NcoI/CAST*, *Hin6I/CAST* oraz haplotypami z analizowanymi cechami poubojowymi (Tabele 11,12).

Wyniki wieloczynnikowej analizy wariancji dotyczące osobników rasy merynos barwny wskazały istotny wpływ genotypu w *locus CAPN3* na masę tkanki kostnej w udźcu [g] ( $p=0,025$ ) oraz na procentową zawartość tkanki mięśniowej w udźcu ( $p=0,021$ ) (Tabela 13). Istotne statystycznie różnice dla cechy masa tkanki kostnej w udźcu stwierdzono pomiędzy zwierzętami o genotypach 02'02 i 01'01, wskazując na przewagę tryczków o genotypie 02'02 ( $p=0,019$ ). Analiza wyników procentowej zawartości tkanki mięśniowej w udźcu wykazała istotne różnice pomiędzy osobnikami 02'02 a 01'01. Procentowa zawartość tkanki mięśniowej w udźcu była istotnie wyższa w przypadku grupy 01'01 ( $p=0,019$ ) (Tabela 13). Osobniki z genotypem 02'02 w *locus CAPN3* wyróżniały się najwyższymi średnimi wartościami analizowanych cech poubojowych (Tabela 13).

## 5. DYSKUSJA

Dynamiczny rozwój technik genetyki molekularnej umożliwia coraz szybszą i bardziej dokładną ocenę zwierząt pod kątem pożądanых cech oraz pozwala na prowadzenie ukierunkowanej selekcji. Wykorzystanie odpowiednich metod detekcji polimorfizmów zależy przede wszystkim od celu hodowlanego, dostępności aparatury badawczej oraz zasobów finansowych i czasowych.

W badaniach własnych wykorzystano trzy techniki molekularne: PCR-RFLP, MSSCP oraz sekwencjonowanie. Analizy PCR-RFLP pozwoliły zidentyfikować genotypy genu kalpastatyny w *locus MspI*, *NcoI*, *Hin6I* w populacji jagniąt trzech ras: kamieniecka, pomorska i merynos barwny. Technika MSSCP została wykorzystana do wykrycia polimorfizmu w eksonie 10. genu kalpaina3 wśród wszystkich badanych ras. Sekwencjonowanie umożliwiło oznaczenie kolejności nukleotydów charakterystycznej dla poszczególnych wzorców prążków otrzymanych metodą MSSCP.

Analiza polimorfizmu genu kalpastatyny w *locus MspI* w badaniach własnych wykazała obecność dwóch alleli (M i N) w grupie jagniąt kamienieckich, pomorskich i merynos barwny. Także Szkudlarek-Kowalczyk i wsp. w 2011, badając owce merynosa polskiego utrzymywane w 6 stadach donieśli o występowaniu dwóch alleli M i N w *locus MspI/CAST*. Również Nassiry i wsp. (2007) badając irańskie owce kurdi, stwierdzili obecność alleli M i N w *locus MspI/CAST*. Do podobnych stwierdzeń doszli Palmer i wsp (1998), Suleman i wsp. (2012) oraz Gabor i wsp. (2009) na podstawie badań polimorfizmu genu *CAST* w obrębie wielu różnych ras owiec.

Wśród owiec kamienieckich i pomorskich w badaniach własnych zaobserwowano znacznie wyższą częstość allele M niż allele N. Podobne wyniki (M=94%, N=6%) podają Gabor i wsp. (2009) w oparciu o badania 96 zwierząt reprezentujących pięć ras owiec utrzymywanych na Słowacji. Shahroudi i wsp. (2006), badając 100 osobników irańskiej rasy karakuł, również stwierdzili wysoką frekwencję allele M/*MspI* w genie kalpastatyny, gdzie allel M występował z częstością 79%, a N 21%.

Do podobnych stwierdzeń jak w badaniach własnych dotyczących jagniąt merynosa barwnego doszli Suleman i wsp. (2012). Badając polimorfizm genu *CAST* wśród pakistańskich owiec lohi donieśli, że allel M występował z częstością 87%, a frekwencja allele N wynosiła 13%. Również Szkudlarek-Kowalczyk i wsp. (2011) wykazali, że w grupie owiec merynos polski frekwencje zidentyfikowanych alleli w *locus MspI/CAST* wynosiły odpowiednio: M=84,5%, N=15,5%. Także Dehnavi i wsp. w 2012 na podstawie badań 200 irańskich owiec zel wykazali, że allel M/*MspI* występował z wyższą częstością niż allel N/*MspI*. Frekwencja allele M wynosiła 85,5%, a allele N była równa 14,5% (Dehnavi i wsp., 20012). Mohammadi i wsp. (2008) podają podobne do otrzymanych w badaniach własnych frekwencje alleli w *locus MspI/CAST* w populacji 111 owiec arabskich pochodzących z Iranu. Allel M wystąpił z częstością 85%, natomiast frekwencja allele N wynosiła 15% (Mohammadi i wsp., 2008).

Odmienny stosunek liczbowy pod względem frekwencji alleli w obrębie genu kalpastatny w porównaniu do badań własnych stwierdzono w analizach przeprowadzonych przez Elyasi i wsp. (2009) w obrębie populacji trzech ras owiec ghezal, arkhamerino i ich mieszańców. Frekwencje alleli wynosiły odpowiedni: M=53%, N=47% (Elyasi i wsp., 2009).

Spośród wszystkich trzech badanych ras jedynie w grupie jagniąt merynosa barwnego stwierdzono obecność wszystkich trzech genotypów MM, MN, NN w

*locus MspI/CAST* (MM=71,88%, MN=23,96%, NN=4,17%). Podobne jak w badaniach własnych wartości frekwencji genotypów *CAST* podaje Kaczor (2006), która badała mieszance merynos polski x owca romanowska oraz populację rasy plennej owiec olkuskich. Częstość uzyskanych genotypów w wynikach Kaczor (2006) w grupie mieszańców przedstawiała się następująco: MM=68%, MN=27%, NN=5%, a w przypadku owcy olkuskiej, frekwencje genotypów wynosiły: MM=68,2%, MN=22,7%, NN=9,1% (Kaczor, 2006). Również Dehnavi i wsp. (2012), prowadząc badania wśród populacji irańskich owiec stwierdzili obecność trzech genotypów o frekwencjach MM=75%, MN=21%, NN=4%. Zbliżone wartości frekwencji genotypów padają Nassiry i wsp. (2007), którzy w obrębie populacji owiec kurdi wykazali, że aż 76% osobników wyróżniało się genotypem homozygotycznym MM w *locus MspI/CAST*. Badania przeprowadzone w populacji owiec indonezyjskich przez Sutikno i wsp. (2011) wykazały podobnie jak w badaniach własnych obecność trzech genotypów w *locus MspI/CAST* (MM=75%, MN=23%, NN=2%). Także Khan i wsp. (2012) stwierdzili obecność trzech genotypów MM, MN i NN w *locus MspI/CAST* wśród pakistańskich owiec rasy kajli.

Nieco odmienne wyniki od tych uzyskanych w badaniach własnych wykazano, badając irańskie owce dalagh, u których stwierdzono obecność również trzech genotypów w *locus MspI/CAST*, ale o nieco różnych od powyżej opisanych frekwencjach: MM=36%, MN=38%, NN=26% (Azari i wsp., 2012).

W obrębie populacji owiec kamienieckich i pomorskich w badaniach własnych stwierdzono obecność dwóch genotypów w *locus MspI/CAST*: MM i MN, podobnie jak w obrębie owiec rasy ile de france w badaniach Szkudlarek-Kowalczyk i wsp. (2011), gdzie częstość genotypu MM wynosiła 90% i była znacznie wyższa niż MN, która wynosiła 10%. Także Gabor i wsp. (2009), analizując polimorfizm wśród pięciu ras owiec utrzymywanych na Słowacji wykazali podobne frekwencje dwóch wykrytych genotypów (M=87%, N=13%). Do podobnych stwierdzeń w wyniku badań nad polimorfizmem w genie *CAST*, w obrębie owiec ras suffolk i polskich owiec długowłnistych, doszła Kaczor (2006), która wykazała, że frekwencja heterozygot MM wynosiła odpowiednio 97,5% i 79%, a genotyp MN występował z częstością odpowiednio 2,5% i 21%. Również Nassiry i wsp., (2007) wykazali w populacji irańskich owiec kurdi obecność dwóch genotypów MM i MN w *locus MspI/CAST*, których frekwencje wynosiły odpowiednio 76% i 24%.

Nieco odmienne od wyników uzyskanych w badaniach własnych wartości frekwencji genotypów *CAST* podają Elyasi i wsp., (2005) badając populację owiec arkhamerino i mieszańców ghezel x arkhamerino. Zaobserwowane genotypy MN/*MspI* w obrębie owiec arkhamerino występowały z częstością 47,62%, a wśród mieszańców ghezel x arkhamerino frekwencja MN/*MspI* wynosiła 46,67% (Elyasi i wsp., 2005).

Na podstawie badań własnych stwierdzono niewielkie zróżnicowanie w *locus NcoI/CAST* wśród ras kamieniecka i pomorska, u których wykazano obecność tylko allele M. Obecność allele N wykazano jedynie w grupie owiec

pomorskich, ale jego frekwencja była niska i wynosiła 3%. Badania Szkudlarek – Kowalczyk i wsp. (2011) dotyczące owiec rasy czarnogłówka dały wynik wyższy od uzyskanego w badaniach własnych. Frekwencja allele *N/NcoI* wynosiła 18,6%. Również Dehnavi i wsp. (2012) badając owce irańskie wykazali wyższą niż uzyskana w badaniach własnych frekwencję allele *N/NcoI* (14,5%). Nieco niższą częstość allele *N/NcoI* wynoszącą 2,4% stwierdzili Szkudlarek - Kowalczyk i wsp. (2010) w populacji owiec kamienieckich. W badaniach własnych nie stwierdzono obecności allele *N* wśród owiec kamienieckich i merynosa barwnego. Do podobnych wniosków doszła Szkudlarek-Kowalczyk w 2011 roku, badając populacje owiec ras merynos polski, berrichon du cher i czarnogłówka. Natomiast Sutikno i wsp. (2011), analizując populację owiec indonezyjskich wykazali podobnie jak w badaniach własnych wśród owiec pomorskich obecność dwóch genotypów w *locus NcoI/CAST* (MM=92%, MN=8%).

W *locus Hin6I/CAST* w badaniach własnych wykazano obecność dwóch alleli. Allel *A* zdecydowanie przewyższał częstością występowania allel *B*. Najwyższy poziom allelomorfa *B* stwierdzono wśród owiec merynos barwny (18,23%), mniejszy u populacji owiec kamienieckich (8,44%) i najmniejszy w obrębie owiec pomorskich (1,5%). Podobne wyniki uzyskali Wiśniewska i wsp. (2011) wśród owiec kamienieckich, gdzie frekwencja allele *B* była znacznie niższa niż allele *A* i wyniosła 15%. Zbliżone frekwencje stwierdzili Szkudlarek-Kowalczyk i wsp. (2011) w grupie owiec kołudzkich, gdzie allel *A* (96,05%) występował z częstością znacznie wyższą niż allel *B* (3,50%).

W badaniach własnych wśród osobników rasy kamieniecka i merynos barwny stwierdzono obecność trzech genotypów: *AA*, *AB*, *BB*. Szkudlarek-Kowalczyk i wsp. (2011), którzy prowadzili badania nad polimorfizmem w *locus Hin6I/CAST* w obrębie ras merynos polski, berrichon du cher i czarnogłówka stwierdzili obecność tylko dwóch genotypów (*AA*, *AB*). Natomiast w populacji owiec pomorskich w badaniach własnych wykazano obecność tylko dwóch genotypów: *AA*, *AB*, w przeciwieństwie do badań Wiśniewskiej i wsp. (2011), którzy wykazali obecność trzech genotypów, spośród których genotyp *BB* wystąpił z częstością 1%. W badaniach własnych genotyp *AA* występował z najwyższą częstością we wszystkich badanych rasach.

Zestawienie wszystkich trzech wyżej opisanych alleli w *locus MspI/CAST*, *NcoI/CAST* i *Hin6I/CAST* pozwoliło otrzymać haplotypy o nazwach *a*, *c*, *d*, *e* (Greguła-Kania 2011, Palmer i wsp., 2000). Kombinacje alleli, które stworzyły konkretne haplotypy: *a*, *b*, *c*, *d*, *e* to odpowiednio:  $M_{(MspI)}A_{(Hin6I)}M_{(NcoI)}$ ,  $N_{(MspI)}A_{(Hin6I)}N_{(NcoI)}$ ,  $M_{(MspI)}B_{(Hin6I)}M_{(NcoI)}$ ,  $N_{(MspI)}B_{(Hin6I)}M_{(NcoI)}$ ,  $N_{(MspI)}A_{(Hin6I)}M_{(NcoI)}$ . Wszystkich pięciu haplotypów nie stwierdzono u żadnej z badanych ras owiec. Cztery haplotypy stwierdzono w populacji owiec merynos barwny oraz kamieniecka (*a*, *c*, *d*, *e*). Haplotyp *b* stwierdzono jedynie u owiec pomorskich, gdzie łącznie wykazano obecność również czterech haplotypów (*a*, *b*, *c*, *e*). Greguła-Kania i Gruszecki (2007) badając populacje owiec plenno-mięsnych syntetycznych linii BCP i SCP podobnie do wyników badań własnych stwierdzili

obecność czterech haplotypów (a, b, c, d). Także Greguła-Kania (2011), prowadząc badania nad polimorfizmem w genie *CAST* wśród owiec syntetycznych linii BCP i SCP wykazała obecność czterech tych samych haplotypów (a, b, c, e).

Na podstawie badań własnych wykazano obecność ośmiu genotypów: aa, ab, ac, ad, ae, cc, ee, cd. Z najwyższą frekwencją w trzech badanych grupach rasowych występował genotyp aa, a z najniższą genotyp cc (1%) i cd (1%) w obrębie owiec kamienieckich, ab (6%) wśród owiec pomorskich i cc (1%) w populacji owiec merynosa barwnego.

Oprócz techniki PCR-RFLP metodą często wykorzystywaną do wykrywania polimorfizmu genetycznego jest SSCP, którą posłużyli się Roberts i wsp. (1996), badając populacje owiec dorset down oraz corriedale pod względem polimorfizmu w genie *CAST*. Na podstawie wyników analiz wykazali obecność trzech alleli: a, b, c i czterech genotypów *CAST*: ab, bc, ac, aa. Podobnie Ranjabari i wsp. (2012) w wyniku badań nad polimorfizmem genu kalpastatyny wśród owiec makoei wykazali obecność trzech alleli: A, B, C oraz czterech genotypów: AA, BB, AB i AC, których frekwencje wynosiły odpowiednio 31%, 4%, 63% i 2% (Ranjabari i wsp., 2012).

Analiza polimorfizmu metodą PCR-RFLP w *locus MspI/CAST* w obrębie owiec kamienieckich wykazała istotny statystycznie wpływ genotypu w *locus MspI/CAST* na masę ciała w 56. dniu życia jagniąt ( $p=0,002$ ). Natomiast w *locus Hin6I* stwierdzono istotnie statystyczne powiązanie genotypu z masą ciała w 2. dniu życia ( $p=0,017$ ). Ze względu na monomorficzność populacji owiec kamienieckich pod względem *NcoI/CAST* niemożliwe było przeprowadzenie analiz powiązania genotypu w *locus NcoI/CAST* z cechami: masa ciała i przyrosty dobowe. Na podstawie badań własnych w grupie owiec pomorskich nie stwierdzono istotnego statystycznie powiązania pomiędzy genotypem a analizowanymi cechami zwierząt. Wśród badanych jagniąt rasy merynos barwny w *locus MspI/CAST* stwierdzono istotny wpływ genotypu na masę ciała w 56. dniu życia oraz na przyrosty dobowe między 2. a 56. dniem. Natomiast nie wykazano istotnie statystycznego powiązania pomiędzy genotypem w *locus NcoI/CAST* i *Hin6I/CAST* a badanymi cechami wśród jagniąt merynosa barwnego. Do podobnych stwierdzeń doszła Szkudlarek – Kowalczyk (2014), która badając owce ile de france wykazała istotny statystycznie wpływ genotypu w *locus MspI/CAST* na masę ciała w 30. i 70. dniu życia oraz na przyrosty pomiędzy 10. a 30. dniem życia jagniąt. Osobniki o genotypie MN/*MspI* charakteryzowały się wyższymi wartościami tych cech.

Natomiast nieco odmienne do badań własnych wyniki dotyczące istotnie statystycznego braku powiązania pomiędzy grupami zróżnicowanymi genotypowo w *locus MspI/CAST* a masą ciała rocznych jagniąt stwierdził Dehnavi i wsp. (2012) wśród irańskich owiec zel. Mimo braku istotnych różnic Dehnavi i wsp. wykazali, że najwyższą wartością badanej cechy charakteryzowały się zwierzęta o genotypie MN/*MspI*. Także wśród owiec kamienieckich objętych badaniami własnymi osobniki o genotypie MN/*MspI*



charakteryzowały się najwyższą średnią masą ciała w 2. dniu życia. W obrębie owiec pomorskich zwierzęta o genotypie MN/*MspI* i MN/*NcoI* cechowała najwyższa masa ciała w 56. dniu oraz najwyższe przyrosty dobowe. W przeciwieństwie do badań własnych nie wykazano wpływu genotypu genu *CAST* na masę ciała indonezyjskich jagniąt badanych przez Sutikno i wsp. (2011) - najwyższymi wartościami badanych cech charakteryzowały się osobniki o genotypie MM/*MspI* i MM/*NcoI*.

Do podobnych do badań własnych stwierdzeń doszli Khan i wsp. (2012) badając pakistańskie owce kajli, którzy wykazali istotny statystycznie wpływ genotypu *CAST* na średnie dobowe przyrosty od urodzenia do 4. miesiąca życia jagniąt. Natomiast w drugiej badanej przez Khan i wsp. rasie owiec balkhi wykazano obecność dwóch genotypów MM/*MspI* i MN/*MspI*, które istotnie statystycznie różnicowały badane grupy jagniąt w zakresie cech: średnie dobowe przyrosty od urodzenia do 4. miesiąca oraz średnie dobowe przyrosty między 4. a 8. miesiącem życia.

Zestawienie wyników z analiz PCR-RFLP w trzech miejscach restrykcyjnych wykazało obecność sześciu genotypów w populacji merynosa barwnego i wśród owiec kamienieckich oraz czterech genotypów w obrębie owiec pomorskich. Również Szkudlarek – Kowalczyk (2014) stwierdziła wśród owiec kołudzkich i mieszańców owiec kołudzkich x ile de france obecność sześciu genotypów (aa, ab, ac, ae, be, ee), a w grupie owiec ile de france wykazała obecność czterech (aa, ac, ae, ce) spośród siedmiu zidentyfikowanych w całej analizowanej populacji genotypów. W badaniach własnych wśród owiec kamienieckich i pomorskich nie stwierdzono istotnego statystycznie powiązania genotypów z masą ciała w 2., 56. dniu oraz przyrostami dobowymi masy ciała. Także Szkudlarek – Kowalczyk (2014), badając polimorfizm genu *CAST* w obrębie owiec kołudzkich i mieszańców owiec kołudzkich x ile de france nie stwierdziła istotnego statystycznego wpływu genotypu na masę ciała w 2., 56. dniu oraz przyrosty dobowe masy ciała. Również analizy polimorfizmu w genie *CAST* przeprowadzone przez Gregułę - Kania (2012) w populacji owiec plenno-mięsnych linii syntetycznych BCP i SCP nie dowiodły istotnego wpływu genotypów *CAST* na cechy dotyczące masy ciała przy urodzeniu, w 28., 56., 70. i 120. dniu oraz na przyrosty dobowe. Wykazały natomiast, że zwierzęta o genotypie ae charakteryzowały się największymi masami ciała przy urodzeniu, w 28., 56., 70. i 120. dniu oraz największymi przyrostami dobowymi od urodzenia do 28., 56., 70. dnia. Nieco odmienne wyniki uzyskano w badaniach własnych, gdzie osobniki o genotypie ae charakteryzowały się najwyższą masą ciała jedynie w 56. dniu wśród owiec merynos barwny. W badaniach własnych przeciwnie do wyników Greguły - Kania (2012) jagnięta kamienieckie o genotypie cc wyróżniały się najwyższą masą ciała w 2. i 56. dniu oraz najwyższymi przyrostami dobowymi masy ciała. Natomiast jagnięta owiec pomorskich o genotypie aa charakteryzowały się najwyższą średnią masą ciała w 2. dniu, a jagnięta o genotypie ac w 56. dniu. oraz najwyższymi przyrostami dobowymi. Także Nassiry i wsp. (2006), badając grupę irańskich owiec kurdi

wykazali wyniki nieco odmienne do tych uzyskanych w badaniach własnych. Na podstawie analiz statystycznych wykazali, że osobniki o genotypie ab różniły się istotnie statystycznie wyższym średnim przyrostem dobowym od urodzenia do odsadzenia, oraz wyższym średnim przyrostem pomiędzy 9. a 12. miesiącem życia od osobników o genotypach aa i ac.

W populacji owiec merynos barwny objętej badaniami własnymi, wykazano istotne różnice pomiędzy genotypami zestawionymi z trzech miejsc restrykcyjnych, a masą ciała w 56. dniu życia jagniąt oraz przyrostami dobowymi. Do podobnych stwierdzeń doszła Szkudlarek - Kowalczyk (2014), która wykazała, że wśród jagniąt rasy ile de france występowały istotne statystycznie różnice pomiędzy masą ciała w 30. dniu życia jagniąt o różnych genotypach.

Ta sama technika PCR-RFLP co w badaniach własnych została wykorzystana przez Chung i Davis (2012) w badaniach dotyczących intronu 25 genu kalpastatyny w populacji 359 owiec ras polypay, targhee oraz ich mieszańców. Wykorzystano w nich inny, niż w badaniach własnych enzym restrykcyjny *TaqI*, który rozpoznaje SNP A/G w nukleotydzie 208. Stwierdzono obecność dwóch alleli A i B i trzech genotypów AA, AB, i BB w *locus TaqI/CAST*, wśród których osobniki o genotypie AA charakteryzowały się najwyższymi wartościami cech: masa ciała po urodzeniu (5,16kg) i średnie dobowe przyrosty masy ciała (0,22kg), a zwierzęta o genotypie BB wyróżniały się najniższą średnią masą ciała po urodzeniu (4,68kg) oraz najniższymi średnimi przyrostami dobowymi (0,20kg). Na podstawie wyników stwierdzono istotne statystycznie powiązanie polimorfizmu w *locus TaqI/CAST* z cechami takimi jak: masa ciała przy urodzeniu oraz średnimi dobowymi przyrostami masy ciała.

Analizując wpływ polimorfizmu w obrębie genu kalpastatyny w grupie tryczków merynosa barwnego nie stwierdzono istotnie statystycznego powiązania pomiędzy badanymi wariantami genotypów w *locus MspI/CAST*, *NcoI/CAST*, *Hin6I/CAST* w zakresie cech użytkowości mięsnej. Na możliwe powiązania wskazują badania Szkudlarek – Kowalczyk (2014), w której wykazano statystycznie istotną różnicę w zakresie wszystkich trzech SNP (*locus NcoI/CAST* –  $p<0,01$ , *locus MspI/CAST* i *Hin6I/CAST* –  $p<0,05$ ) pod względem cechy określonej przyżyciowo: wysokość klatki piersiowej. Choć osobniki o genotypie MN/*NcoI* cechowały się wyższymi wartościami cech takich jak szerokość w barkach, biodrach i długość skośna tułowia, to różnice te nie były istotne statystycznie. Ponadto Szkudlarek - Kowalczyk (2014) analizując pomiary wykonane na tuszach jagnięcych wykazała istotne statystycznie powiązania pomiędzy szerokością klatki piersiowej a polimorfizmem w *locus MspI/CAST* ( $p<0,01$ ) i *Hin6I/CAST* ( $p<0,05$ ).

Również badania nad wpływem poszczególnych alleli genu kalpastatyny (PCR-RFLP i PCR-SSCP) przeprowadzone przez Bickerstaffe i wsp. (2008), wskazały istotne statystycznie oddziaływanie alleli a, A i B na wydajność połędwicy. U osobników z allelem A, zaobserwowano 15% wzrost masy połędwicy.

Jednocześnie podobnie jak w badaniach własnych Greguła - Kania (2012) nie stwierdziła istotnego wpływu genotypów *CAST* wśród syntetycznych plennomięśnych owiec linii BCP i SCP na wybrane cechy opisujące umięśnienie jagniąt. Najwyższymi wartościami analizowanych cech charakteryzowały się osobniki o genotypie ae, przeciwnie do wyników badań własnych (aa). Badania wpływu poszczególnych genotypów na kruchość owczego mięsa przeprowadzone przez Zhou i wsp. (2008) podobnie jak badania własne nie wskazały istotnych różnic w odniesieniu do badanej cechy.

Również technika PCR-SSCP jest metodą wykorzystywaną do analizy polimorfizmu genetycznego. Byun i wsp. (2008) stosując PCR-SSCP wykazali wśród owiec rasy ramney obecność trzech alleli (A, B, C) oraz stwierdzili wpływ trzech genotypów *CAST*: AA, BB, BC na masę ciała jagniąt przy urodzeniu, jak również brak istotnego wpływu na tempo wzrostu od urodzenia do odsadzenia. W badaniach przeprowadzonych nieco później w 2009 roku Ci sami autorzy, wykorzystując metodę PCR-SSCP wykazał brak istotnego związku pomiędzy genotypami a długowiecznością i płodnością owiec (Byun i wsp., 2009).

Wyniki analizy molekularnej w zakresie polimorfizmu w genie kalpiny 3 wykazały w badaniach własnych obecność trzech alleli 01, 02, 04, spośród których allel 02 występował z najwyższą częstością (51,30%) wśród owiec kamienieckich, a allel 01 w populacji owiec pomorskich (57,00%) i merynosa barwnego (59,90%). Genotypy *CAPN3*, które zostały wykryte przy użyciu reakcji MSSCP to: 01'02, 02'02, 01'01, oraz 04'01. Wszystkie cztery genotypy wystąpiły w obrębie każdej rasy objętej badaniami własnymi. Największą frekwencją we wszystkich grupach rasowych charakteryzował się genotyp 01'02, a najmniejszą 04'01. Nassiry i wsp. (2007) w badaniach nad polimorfizmem genu *CAPN* metodą SSCP, obejmujących irańskie owce kurdi, stwierdzili obecność dwóch alleli A (96%) i B (4%) oraz dwóch genotypów AA i AB, spośród których wyższą frekwencją wyróżniał się genotyp AB (92%). Wyniki Nassiry i wsp. (2007) znacznie różnią się od wyników przedstawionych przez Tahmoorespour i wsp. (2005), który wykazał w grupie irańskich owiec baluchi, że allel A występował z częstością 56%, a allel B 44% w grupie irańskich owiec baluchi. Również nieco odmienne wyniki od tych przedstawionych przez Nassiry i wsp. (2007) i Tahmoorespour i wsp. (2005), wykazali Shahroudi i wsp. (2006) w obrębie irańskich owiec karakuł. Frekwencja allela A w populacji owiec karakuł wynosiła 79%, a allela B 21%. Frekwencje genotypów AA i AB w *CAPN* wynosiły tyle samo co frekwencje alleli (odpowiednio 79% i 21%) (Shahroudi i wsp., 2006). Podobnie Chung i wsp. (2000) wykorzystując również technikę SSCP wskazali obecność dwóch alleli o nieco odmiennych frekwencjach: A - 69%, B - 31%. Natomiast obecność trzech genotypów G1, G2, G3 w *locus CAPN* o częstości odpowiednio: 8,2%, 89,1%, 2,7% wykazali Azari i wsp. (2012) badając owce dalagh. Chung i wsp. (2007), analizujący polimorfizm w genie *CAPN*, wykorzystując technikę SSCP, wykazali zróżnicowanie genetyczne w dwóch segmentach genu kalpiny: *CAPN31112* i *CAPN31213* i opisali obecność dwóch alleli (A i B) i trzech genotypów (AA, AB, BB) w każdym z nich. Metodą

SSCP posłużyli się Zhou i wsp. (2007) badając polimorfizm genu *CAPN* w obrębie ras: merynos, corriedale, romney, poll dorset i mieszańców NZ. W wyniku badań stwierdzili obecność trzech alleli o frekwencjach: \*01 (39%), \*02 (50%) i \*03 (11%) oraz trzech genotypów o frekwencjach \*01/\*01 (15,2%), \*01/\*02 (39,4%) i \*02/\*02 (25,8%).

W grupie badanych owiec kamienieckich, pomorskich i merynos barwny nie stwierdzono istotnego statystycznie powiązania genotypu genu *CAPN3* z badanymi cechami ilościowymi: masa ciała w 2., 56. dniu po urodzeniu oraz przyrosty dobowe masy ciała pomiędzy tymi dniami. Wśród owiec pomorskich jagnięta o genotypie 01'01 wyróżniały się najwyższą średnią masą ciała w 2. dniu życia, a w populacji merynosa barwnego osobniki z genotypem 01'01 odznaczały się najwyższą średnią masą ciała w 2. i 56. dniu. Chung i wsp. (2007), analizując polimorfizm *CAPN* z wykorzystaniem techniki SSCP, stwierdzili istotne statystycznie powiązanie genotypu BB w segmencie *CAPN31112* z masą po urodzeniu jagniąt, wykluczyli natomiast związek genotypów *CAPN* z masą ciała jagniąt podczas odsadzenia i po odsadzeniu.

Analizy locus *CAPN3* w badaniach własnych wykazały istotne statystycznie powiązanie genotypu z masą tkanki kostnej w udźcu ( $p=0,025$ ) oraz z procentową zawartością tkanki mięśniowej w udźcu ( $p=0,021$ ). Istotne statystycznie różnice w obrębie cech: masa tkanki kostnej w udźcu [g] oraz procentowa zawartość tkanki mięśniowej w udźcu stwierdzono pomiędzy zwierzętami o genotypach 02'02 a 01'01. Masa tkanki kostnej w udźcu [g] była istotnie statystycznie wyższa wśród jagniąt o genotypie 02'02 ( $p=0,019$ ), natomiast procentowa zawartość tkanki mięśniowej w udźcu była istotnie wyższa wśród tryczków o genotypie 01'01 ( $p=0,019$ ). Osobniki o genotypie 02'02 w locus *CAPN3* wyróżniały się najwyższymi średnimi wartościami analizowanych cech poubojowych.

## 6. PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Metoda PCR-RFLP, która została wykorzystana w badaniach nad polimorfizmem genu kalpastatyny w populacji owiec kamienieckich, pomorskich i merynosa barwnego pozwoliła zidentyfikować następujące allele i genotypy genu *CAST* w locus:

- *MspI* (allele: M i N oraz genotypy: MM, MN, NN)
- *NcoI* (allele: M i N oraz genotypy: MM, MN, NN)
- *Hin6I* (allele: A i B oraz genotypy: AA, AB, BB),  
co dało łącznie pięć haplotypów (a, b, c, d, e) oraz osiem genotypów (aa, ab, ac, ad, ae, cc, cd, ee).

2. Największym różnicowaniem w zakresie polimorfizmu w genie *CAST* charakteryzowały się owce kamienieckie oraz owce merynosa barwnego. Mniejsze różnicowanie występowało w obrębie jagniąt pomorskich.

3. Zastosowanie metody MSSCP w badaniach własnych nad polimorfizmem w genie *CAPN3* jagniąt pozwoliło na identyfikację trzech alleli oraz czterech genotypów.

4. W wyniku sekwencjonowania produktów PCR genu *CAPN3* stwierdzono, obecność trzech polimorfizmów: G/T w pozycji 91. oraz C/T w pozycji 103. i 139, w 10. eksonie.

5. Na podstawie wyników opracowania statystycznego stwierdzono istotny wpływ polimorfizmu w genie *CAST* w *locus MspI* na masę ciała w 56. dniu życia jagniąt rasy kamienieckiej, oraz na masę ciała w 56. dniu i przyrosty dobowe w populacji merynosa barwnego, a także genotypu w *locus Hin6I* na masę ciała w 2. dniu życia jagniąt kamienieckich.

6. Wpływ genotypów w *locus CAPN3* na wyniki użytkowości rzeźnej tryczków merynosa barwnego został potwierdzony statystycznie tylko w odniesieniu do cech: masa tkanki kostnej w udźcu oraz procentowa zawartość tkanki mięśniowej w udźcu. W zakresie obydwóch cech istotne statystycznie różnice stwierdzono pomiędzy osobnikami o genotypach 02'02 i 01'01.

7. W celu pełniejszego wyjaśnienia powiązania polimorfizmów w obrębie genów *CAST* i *CAPN3* z cechami użytkowości tucznej i mięsnej oraz wykorzystania ich w doskonaleniu genetycznym tych cech, wskazane byłoby przeprowadzenie badań wśród większej i bardziej zróżnicowanej rasowo populacji zwierząt.

## 7. STRESZCZENIE

Celem badań było określenie frekwencji alleli i genotypów genów *kalpastatyny* i *kalpainy3* w populacjach owiec ras: kamieniecka, pomorska i merynos polski odmiana barwna. Ponadto za cel postawiono sobie poszukiwanie powiązań pomiędzy poszczególnymi genotypami a cechami użytkowości mięsnej w badanych grupach zwierząt.

Materiał badawczy stanowiły 273 jagnięta pochodzące z trzech stad utrzymywanych na terenie trzech województw. Pierwsze stado stanowiły osobniki rasy merynos polski odmiany barwnej użytkowane w typie wełnisto – mięsno – plennym utrzymywane w województwie kujawsko - pomorskim, drugie stado obejmowało wełnisto – mięsne jagnięta rasy kamieniecka pochodzące z województwa warmińsko – mazurskiego oraz trzecie stado reprezentowały mięsne owce pomorskie utrzymywane w województwie pomorskim. Badaniami objęto zarówno maciorki jak i tryczki.

W wyniku przeprowadzonych analiz PCR-RFLP zidentyfikowano w *locus MspI/CAST* allele M i N oraz genotypy MM, MN, NN. Z najwyższą frekwencją występował genotyp MM. W populacji owiec kamienieckich frekwencja genotypu MM była najwyższa i wynosiła 87,01%, wśród owiec rasy pomorskiej wynosiła niewiele mniej (87%), natomiast najniższa była w obrębie jagniąt rasy merynos barwy (71,88%). W *locus NcoI/CAST* stwierdzono obecność alleli M i

N oraz genotypów MM oraz MN. Badane populacje owiec kamienieckich i merynosa barwnego były homozygotyczne pod względem *locus NcoI/CAST*. Obecność genotypu MN stwierdzono jedynie w populacji owiec pomorskich (6%). Natomiast w *locus Hin6I/CAST* zidentyfikowano dwa allele A i B oraz trzy genotypy AA, AB, BB. Genotypem najczęściej występującym w obrębie wszystkich trzech analizowanych ras był AA. Wśród owiec kamienieckich jego frekwencja wynosiła 85,71%, pomorskich 97,00%, natomiast w przypadku owiec rasy merynos barwny 64,58%.

Kombinacje przedstawionych powyżej alleli z *locus MspI/CAST*, *NcoI/CAST* i *Hin6I/CAST* zestawione razem dały pięć haplotypów o nazwach: a, b, c, d, e, w ośmiu układach genotypowych: aa, ab, ac, cd, cc, ee, ae, ad. W obrębie wszystkich badanych populacji jagniąt stwierdzono, że z najwyższą częstością występował haplotyp a, natomiast z najniższą haplotyp d. Największe zróżnicowanie w genie *CAST* cechowało owce kamienieckie (ac, ae, ad, aa, cd, cc) oraz owce merynos barwny (ac, ae, ad, aa, cc, ee). Mniejsze zróżnicowanie charakteryzowało populację jagniąt pomorskich (ac, ae, aa, ab).

Analiza wyników reakcji MSSCP dotycząca polimorfizmu genu *kalpain3* wykazała obecność trzech alleli 01, 02, 04 oraz czterech genotypów 01'01, 01'02, 02'02, 04'01 u wszystkich trzech badanych ras owiec. Najwyższą częstością wyróżniał się genotyp 01'02, która wynosiła odpowiednio: w obrębie owiec rasy kamieniecka 35,06%, wśród owiec pomorskich 69,00%, a w populacji owiec rasy merynos barwny 48,96%. Genotyp 04'01 występował najrzadziej.

Analiza sekwencji nukleotydowych, które otrzymano w wyniku sekwencjonowania produktów PCR osobników reprezentujących poszczególne wzory prążków MSSCP wykazała, iż wystąpienie czterech różnych profiliów fragmentów DNA jest wynikiem obecności polimorfizmów w trzech pozycjach: G/T w pozycji 91. oraz C/T w pozycji 103. i 139. (licząc od pierwszego nukleotydu 10. eksonu genu *CAPN3* w sekwencji GenBank nr DQ660376.1). Wszystkie w/w SNP znajdują się w 10. eksonie i obejmują trzecie pozycje poszczególnych kodonów.

Na podstawie analiz statystycznych badanych cech ilościowych owiec rasy kamieniecka stwierdzono istotne statystycznie powiązania polimorfizmu w *locus MspI/CAST* z masą ciała w 56. dniu życia, oraz w *locus Hin6I/CAST* z masą ciała w 2. dniu. W populacji owiec merynos barwny genotyp w *locus MspI/CAST* był czynnikiem istotnie statystycznie różnicującym masę ciała w 56. dniu oraz przyrosty dobowe.

Powiązanie polimorfizmu w *locus CAPN3* z pomiarami wykonanymi na tuszach zwierzęcych tryczków merynosa barwnego zostało potwierdzone statystycznie tylko dla cech: masa tkanki kostnej w udźcu [g] oraz procentowa zawartość tkanki mięśniowej w udźcu [%]. Istotne statystycznie różnice dla obu cech: masa tkanki kostnej w udźcu [g] oraz procentowa zawartość tkanki mięśniowej w udźcu stwierdzono pomiędzy osobnikami o genotypach 02'02 i 01'01.

## 8. SUMMARY

The aim of the present study was to evaluate the frequency of *CAST* and *CAPN3* alleles and genotypes in three Polish sheep breeds: Kamieniecka, Pomeranian, Coloured Polish Merino. In addition, the aim was to find associations between calpastatin, calpain3 genotypes and meat performance traits in the studied groups of animals.

The studied material consisted of 273 sheep from three flocks kept in three voivodships. The first flock constituted the individuals of the Coloured Polish Merino sheep used in the wool-meat-prolific type, the second flock included woolly-meat lambs of the Kamieniecka sheep and the third flock representing meat Pomeranian sheep. The studies included both ewes and rams.

As a result of the carried out analyzes PCR-RFLP, in the *locus MspI/CAST*, two alleles: M and N and three genotypes: MM, MN, NN genotypes were identified. The MM genotype was present with the highest frequency. In the population of the Kamieniecka sheep, the attendance of MM genotype was the highest and was 87.01%, among the Pomeranian sheep it was slightly less (87.00%), while the lowest was within the Coloured Polish Merino sheep (71.88%). In the *locus NcoI/CAST* the presence of M and N alleles as well as MM and MN genotypes were found. The studied populations of Kamieniecka and Coloured Polish Merino sheep were homozygous for the *locus NcoI/CAST*. The presence of the MN genotype was found only in the population of Pomeranian sheep (6.00%). While, two alleles: A and B and three genotypes: AA, AB, BB were identified in the *locus Hin6I/CAST*. The genotype AA was the most frequently found in all three analyzed breeds. Its attendance was 85.71% among Kamieniecka sheep, 97.00% in Pomeranian sheep, while in the case of Colored Polish Merino sheep attendance was 64.58%.

Combinations of the above presented alleles from the *locus MspI/CAST*, *NcoI/CAST* and *Hin6I/CAST* was put together and gave five haplotypes named: a, b, c, d, in eight genotypic systems: aa, ab, ac, cd, cc, ee, ae, ad. The haplotype a was the most frequent, and the haplotype d was the lowest frequent in all tested lamb populations. The highest variation in the *CAST* gene was found in the Kamieniecka sheep (ac, ae, ad, aa, cd, cc) and Coloured Merino sheep (ac, ae, ad, aa, cc, ee). The group of Pomeranian sheep was characterized the smaller variations (ac, ae, aa, ab).

As a result of the MSSCP reaction presence was confirmed of three alleles 01, 02, 04 and four genotypes 01'01, 01'02, 02'02, and 04'01 in *CAPN3*, in all three tested sheep breeds. The highest frequency was found in the genotype 01'02, which was respectively: within the Kamieniecka sheep 35.06%, among Pomeranian sheep 69.00%, and in the Coloured Polish Merino sheep 48.96%. Genotype 04'01 was the least common.

The occurrence of four different profiles of DNA fragments is the result of polymorphisms in three positions: G/T in position 91 and C/T in position 103. and 139. This was showed on the basis the analysis of nucleotide sequences that

were obtained by sequencing PCR products of individuals representing band patterns of MSSCP. All SNPs are in the 10th exon and include the third positions of individual codons.

On the basis of statistical analysis of the traits in the Kamieniecka sheep, statistically significant associations of the polymorphism in the *locus MspI/CAST* with lamb body weight at 56th day and in the *locus Hin6I/CAST* with body weight on the 2nd day were found. Genotype in the *locus MspI/CAST* was a statistically significant factor differentiating body weight on the 56th day and body weight gain in the population of Coloured Polish Merino sheep.

Influence of *CAPN3* genotypes on carcasses measurements was found in population Coloured Polish Merino only for traits: bone tissue in leg [g] and percentage of muscle tissue in leg [%]. Statistically significant differences for both traits: bone mass in the leg [g] and percentage of muscle tissue in the leg were found between individuals with genotypes 02'02 and 01'01.



## 9. LITERATURA

1. Ahani Azari M., Dehnavi E., Yousefi S., Shahmohamadi L. 2012. Polymorphism of calpastatin, calpain and myostatin genes in native Dalagh sheep in Iran. *Slovak J. Anim. Sci.*, 45, (1): 1-6.
2. Bickerstaffe, R., Gately K., Morton J.D., 2008. The association between polymorphic variations in calpain 3 with the yield and tenderness of retail lamb meat cuts. <http://www.icomst.helsinki.fi/ICoMST2008/CD%20Papers/General%20speakers+posters-3p%20papers/Session4/4.1.Bickerstaffe.pdf>.
3. Boman I.A., Klemetsdal G., Blichfeldt T., Nafstad O., Vage D.I., 2009. A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (MSTN) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (Ovisaries). *Animal Genetics* 40, 418-422.
4. Boman I.A., Klemetsdal G., Nafstad O., Blichfeldt T., Våge D.I., 2010. Impact of two myostatin (MSTN) mutations on weight gain and lamb carcass classification in Norwegian White Sheep (*Ovis aries*). *Genetics Selection Evolution* 42, 4-11.
5. 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): 572-3.
6. Byun S.O., Zhou H. , Hickford J.G.H. 2009. Haplotypic diversity within the ovine calpastatin (CAST) gene. *Mol. Biotechnol.* 41: 133–137.
7. Carragher N.O., Frame M.C. (2002). Calpain: a role in cell transformation and migration. *Int. J. Bioch. Cell Biol.*, 34 (12): 1539–1543.
8. Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase Jr. C.C., Johnson D.D., Smith T.P L. 2006. Effects of calpastatin and m-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J Anim. Sci.* 84: 520-525.
9. Chung H. and Davis M. 2012. PCR-RFLP of the Ovine Calpastatin Gene and its Association with Growth. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 7: 641-652.
10. Chung H. Y., Davis M. E., Hines H. C., Wulf D. M. 1999. Effect of the calpain proteolysis and calpain genotype on meat tenderness of Angus

Bulls. Ohio State University Research and Reviews: Beef and sheep.  
<http://ohioline.osu.edu/sc170/sc170-4.html>.

11. Chung H. Y., Davis M. S., and Hines H. C. 2001. Relationship of genetic variants in the ovine calpain regulatory gene with growth. The Ohio State University. Midwestern Section. March 19–21, Des Moines. Am. Soci. Anim. Sci. Supplement 2. 79: 32-110. P:37.
12. Ciobanu D.C., Bastiaansen J.W.M., Lonergan S.M., Thomsen H., Dekkers J.C.M., Plastow G.S., Rothschild M.F. 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. J. Anim. Sci. 82: 2829-2839.
13. Cloup A., Marcq F., Takeda H., Pirottin D., Tordoir X., Bibe B., Bouix J., Caiment F., Elsen J.M., Eychenne F., Larzul C., Laville E., Meish F., Milenkovic D., Tobin J., Charlier C., Georges M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nat. Genet. 38: 813–818.
14. Dagong M.I. A., Sumantri C., Noor R.R., Herman R., Yamin M. 2011. Genetic Polymorphisms of the Coding Region (Exon 6) of Calpastatin in Indonesian Sheep. Media Peternakan, 190-195.
15. Dehnavi E., Ahani Azari M., Hasani S., Nassiri M., Mohajer M., Khan Ahmadi A.R., Shahmohamadi L., Yousefi S. Association between Yearling Weight and Calpastatin and Calpain Loci Polymorphism in Iranian Zel Sheep. 2012. Iranian Journal of Applied Animal Science, Volume (2): 131-135.
16. Dehnavi E., Azari M.A., Hasani S., Nassiry M.R., Mohajer M., Ahmadi A.K., Shahmohamadi L., Yousefi S., 2012. Polymorphism of Myostatin Gene in Intron 1 and 2 and Exon 3, and Their Associations with Yearling Weight, Using PCR-RFLP and PCR-SSCP Techniques in Zel Sheep. Biotechnology Research International doi:10.1155/2012/472307 (ID 472307).
17. Doktor J. 2011. Enzymy proteolityczne z rodziny kalpain a jakość mięsa drobiowego, Wiadomości Zootechniczne, R. XLIX (2011), 1: 157–160.
18. Dransfield E.: 1999. Meat tenderness-the  $\mu$ -calpain hypothesis. 45th ICoMST, 220-228.

19. 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.
20. Fang, Q., Forrest R.H., Zhou H., Frampton C.M., Hickford J.G. 2013. Variation in exon 10 of the ovine calpain 3 gene (CAPN3) and its association with meat yield in New Zealand Romney sheep. *Meat Science*, 94: 388-390.
21. Geesink G.H., Koohmaraie M. 1999. Postmortem proteolysis and calpain/calpastatin activity in callipyge and normal lamb biceps femoris during extended postmortem storage. *J. Anim. Sci.* 77 (6): 1490-501.
22. Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. 2003. The Calpain System. *Physiol. Rev* 83: 731–801.
23. Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Ouali A. 1998. The calpain system and skeletal muscle growth. *Can. J. Anim. Sci.*, 78 (4): 503–512.
24. Goll DE, Thompson VF, Taylor RG, Zaleweska T (1992). Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin . *Bio. Essays*, 14 (8): 549-556.
25. Greguła-Kania M., Gruszecki T.M. 2007. Analiza polimorfizmu w genie kalpastatyny u owiec linii syntetycznych BCP i SCP. Materiały konferencyjne LXXII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego im. Michała Oczapowskiego. Warszawa.
26. Greguła - Kania M., 2011. New allelic variant of the ovine calpastatin gene. *African Journal of Biotechnology* Vol. 10(61): 13082-13085.
27. Greguła – Kania M., 2012. Effect of calpastatin gene Polymorphism on lamb growth and muscling. *Ann. Anim. Sci.* 12 (1): 63-72.
28. Grochowska, 2012. Maszynopis.
29. Grochowska, 2013. Maszynopis.
30. Grochowska, 2015. Maszynopis.
31. GUS, 2012. Główny Urząd Statystyczny. Departament Rolnictwa., 2012. Pogłowie bydła i owiec według stanu w czerwcu 2012 r. <http://stat.gov.pl/obszary-tematyczne/rolnictwo-lesnictwo/produkcja->

zwierzeca-zwierzeta-gospodarskie/poglowie-bydla-i-owiec-wedlug-  
stanu-w-czerwcu-2014-r-,5,13.html [Retrieved 25 November 20152.

32. Jakubiec – Puka A. 2013. Rola proteolitycznego systemu kalpainowego w komórkach zwierzęcych. *Postępy Biochemii* 39(4), 251-258.
33. Juszczyk – Kubiak E., Rosochacki S., J., Wicińska K., Szreder T., 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.
34. Kaczanowski R., Trzeciak L., Kucharczyk K., 2001. *Electrophoresis* 22, 3539 – 3545.
35. 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.
36. Kendall T.L., Koohmaraie M., Arbona J.R., Williams S.E., Young L.L. (1993). Effect of pH and ionic strength on bovine m-calpain and calpastatin activity. *J. Anim. Sci.*, 71: 96–104.
37. Khan S., Muhammad N.R., Ghaffar A., Khan M.F.U. 2012. Calpastatin (CAST) Gene Polymorphism and its Association with Average Daily Weight Gain in Balkhi and Kajli Sheep and Beetal Goat Breeds. *Pakistan J. Zool.*, vol 44(2), 377-382.
38. Klepacki B. [2005]: *Prowadzenie efektywnych gospodarstw owczarskich po przystąpieniu Polski do Unii Europejskiej. [W:] Poradnik dla producentów jagniąt rzeźnych. R. Niżnikowski (red.). Twigger, Warszawa.*
39. Koćwin M.P. i Kurył J., 2003. The effect of interaction between genotype at loci CAST, RYR1 and RN on pig carcass quality and pork traits. *Anim. Sci. Paper and Report*, 21: 61-65.
40. Koohmaraie, M. 1992. The Role of Ca(2+)- dependent Proteases (calpains) in Post Mortem Proteolysis and Meat Tenderness. *Biochimie*, 74: 239-245.
41. Kołczak T. 2008. Jakość wołowiny. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1 (56): 5–22.

42. Kristensen L., and Purslow P.P., 2001. The effect of ageing on the water-holding capacity of pork: role of cytoskeletal proteins. *Meat Sci.* 58:17–23.
43. Krupiński J., 2009. Ocena użytkowości mięsnej jagniąt na tle wymogów oraz metod stosowanych w krajach Unii Europejskiej. IZ-PIB, Kraków.
44. Kuryl, J., Kapelanski, W., Pierzchała, M., Grajewska, S. and 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.
45. Kurzawski G, Zajączek S, Górski B i wsp. Analizy molekularne DNA i RNA w wykrywaniu dziedzicznych predyspozycji do nowotworów. *Współ Onkol* 1998; 4: 6-12. Lee S.J.,
46. Lonergan, S. M., Ernst, C. W., Bishop, M. D., Calkins, C. R. and Koochmaraie, M. 1995. Relationship of Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) at the Bovine Calpastatin Locus to Calpastatin Activity and Meat Tenderness. *J. Anim. Sci.*, 73: 3608-3612.
47. McPherron A.C. (1999). Myostatin and the control of skeletal muscle mass: Commentary. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9 (5): 604–607.
48. Melody J.L., Lonergan S.M., Rowe L.J., Huiatt T.W., Mayes M.S., Huff-Lonergan E. 2004. Early post mortem biochemical factors influence tenderness and water-holding capacity of three porcine muscles. *J. Animal Sci.*, 82, 1195-1205.
49. Milewski S., 2006. Walory prozdrowotne produktów owczarskich. *Medycyna Weterynaryjna* 62(5), 516-519.
50. Nanekarani S., Asadi N., Khederzadeh S., 2011. Genotypic Frequency of Calpastatin Gene in Lori Sheep By PCR-RFLP. *Method. 2nd International Conference on Environmental Science and Development IPCBEE vol.4 IACSIT Press, Singapore.*
51. 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.
52. Nassiry M.R., Sharoudi E.F., Tahmoorespour M., Javadmanesh A. 2007. Genetic variability and population structure in betalactoglobulin,

- calpastatin and calpain loci in Iranian Kurdi sheep. *Pakistan J. biol. Sci.*, 10: 1062-1067.
53. Nowak M. (2005). Rola kalpain w procesie kruszenia mięsa. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 1 (42): 5–17.
54. Page B.T., Casas E., Heaton M.P., Cullen N.G., Hyndman D.L., Morris C.A., Crawford A.M., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Keele J.W., Smith T.P.L. (2002). Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.*, 80 (12): 3077–308.
55. Palmer B.R., Morton J.D., Roberts N., Ilian M.A., Bickerstaffe R. 1999. Marker – assisted selection for meat quality and the ovine calpastatin gene. *Proc. N. Z. Soc. Anim. Prod.*, 59: 266-268.
56. 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.
57. Palmer B.R., Su H.Y., Roberts N., Hickford J.G.H., Bickerstaffe R. 2000. Single nucleotide polymorphisms in an intron of the ovine calpastatin gene. *Anim. Biotechnol.* 11: 63- 67.
58. Ranjbari M., Hashemi A., Mardani K., Darvishzadeh R. 2012. Allelic Polymorphism of Makoei Sheep Calpastatin Gene Identified by Polymerase Chain Reaction and Single Strand Conformation Polymorphism. *J. Agr. Sci. Tech.* Vol. 14: 533-538.
59. Roberts N., Palmer B., Hickford J.G.H., Bickerstaffe R. 1996. PCR-SSCP in the ovine calpastatin gene. *Animal Genetics.* 27: 211-222.
60. Rokicki T., 2010. Wpływ zmiany zasad dotowania na chów i hodowlę owiec w Polsce i UE. [www.wne.sggw.pl/czasopisma/pdf/PRS\\_2010\\_T10\(25\)\\_z1\\_s106.pdf](http://www.wne.sggw.pl/czasopisma/pdf/PRS_2010_T10(25)_z1_s106.pdf).
61. Shahroudi E.F., Nassiry M.R., Valizadh R., Moussavi A.H., Tahmoorespour M., Ghasi H. 2006. Genetic polymorphism at MTNR1A CAST and CAPN loci in Iranian Karakul sheep. *Iran. J. Biotechnol.*, 4: 117-122.
62. Shehata M.F., Ismail I.M., Ibrahim A.H.M. 2014. Variation in exon 10 of the ovine calpain3 gene and its association with growth and carcass traits in egyptian barki lambs. *Egypt. J. Genet. Cytol.*, 43:231-240.

63. Szkudlarek – Kowalczyk M., Wiśniewska E., Mroczkowski S. 2011. Polimorfizm genu kalpastatyny owiec. *JCEA* 12(3): 425–432.
64. Szkudlarek – Kowalczyk M., 2014. Polimorfizm genów kalpastatyny i miostatyny i jego powiązanie z cechami użytkowości mięsnej owiec. Rozprawa Doktorska. Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy w Bydgoszczy.
65. Słomski R. (red.), 2004. Analiza DNA. Teoria i praktyka, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.
66. Smith T.P., Simmen F.A., Zhao G., Vallet J.L. (2001). Rapid communication: Nucleotide sequences of two isoforms of porcine micromolar calciumactivated neutral protease 1 cDNA. *J. Anim. Sci.*, 79 (2): 552–553.
67. Sorimachi H., Tsukahara T., Okada-Ban M., Sugita H., Ishiura S., Suzuki K. (1995). Identification of a third ubiquitous calpain species – Chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1261 (3): 381–393.
68. Spadoni C, Farkas A, Sinka R, Tompa P, Friedrich P. 2003. Molecular cloning and RNA expression of a novel *Drosophila* calpain, Calpain C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303(1):343-9.
69. Sreenan S.K., Zhou Y.P., Otani K., Hansen P.A., Currie K.P., Pan C.Y., Lee J.P., Ostrega D.M., Pugh W., Horikawa Y., Cox N.J., Hanis C.L., Burant C.F., Fox A.P., Bell G.I., Polonsky K.S. 2001. Calpains play a role in insulin secretion and action. *Diabetes* 50(9):2013-20.
70. Suleman M., Khan S. U., Naeem Riaz M., Yousaf M., Shah A., Ishaq R., Ghafoor A. 2012. Calpastatin (CAST) gene polymorphism in Kajli, Lohi and Thalli sheep breeds. *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(47): 10655-10660.
71. Sutikno M. Y., Sumantri C., 2011. Association of Polymorphisms Calpastatin Gene with Body Weight of Local Sheep in Jonggol Indonesia. *Media Peternakan – Journal of Animal Science and Technology*, V, 1-6.
72. Ślemp-Migiel A., Strzelczyk J.K., Rother M., Wiczowski A., 2009. Zastosowanie techniki MSSCP do wykrycia różnic genetycznych w obrębie genu *ERG11* *Candida albicans* wrażliwych i opornych na leki azolowe. *Medical Mycology / Mikologia*. Vol. 16 (1), 5-9.

73. Świtoński M. red. Postępy genetyki molekularnej bydła i trzody chlewnej. Poznań 2004.
74. Tahmoorespour M. 2005. Study on the calpain calpastatin gene polymorphism by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism and its relation to average daily gain in Iranian baluchi sheep. Ph.D Thesis. Ferdowsi University, Mashhad, Iran.
75. Yang X., Liu D., Yu H., Guo L., Liu H. (2008). Cloning, expression, and polymorphism of the porcine calpain 10 gene. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 40 (4): 356–363.
76. Yang X., Guo L., Zhai C., Yu H., Liu H., Liu D. (2009). Expression, characterization, and variation of the porcine calpain 7 gene. *Acta Agr. Scand., Sect. A – Anim. Sci.*, 59 (4): 204–210.
77. Zhang Z.R., Liu Y.P., Jiang X., Du H.R., Zhu Q. (2008). Study on association of single nucleotide polymorphism of CAPN1 gene with muscle fibre and carcass traits in quality chicken population. *J. Anim. Breed. Genet.*, 125 (4): 258–264.
78. Zhou, H., Hickford, J.G.H. & Fang, Q. 2006. Single nucleotide polymorphisms of the ovine 3 (CAPN 3) gene. *Molecular & Cellular Probes* 31, 78-79. Zhou H., Hicford J.G.H., Gong H., 2007. Polymorphism of the ovine calpastatin gene. *Molecular and Cellular Probes* 21, 242-244.
79. Zhou H., Hickford J.G.H., Fang Q., 2008. Variation in the coding region of the myostatin (GDF8) gene in Steep. *Molecular and Cellular Probes* 22, 67-68. doi:10.1016/j.mcp.2007.08.004.



## 10. TABELE I RYCINY

Tabela 1. Liczba (n) oraz udział zwierząt (%) wykorzystanych w badaniach z uwzględnieniem rasy, płci i typu urodzenia.

Czynniki		Liczba owiec (n)			Udział %
		Kamieniecka	Pomorska	Merynos barwny	
Płeć	Tryki	40	54	52	53,5%
	Maciorki	37	46	44	46,5%
Łącznie		77	100	96	273
Typ urodzenia	Pojedyncze	30	62	28	44,0%
	Bliźniacze	47	38	68	56,0%

Tabela 2. Składy mieszanin i warunki hydrolizy enzymatycznej *MspI*, *NcoI* i *Hin6I* produktu PCR reakcji CAST (Grochowska, 2012).

Składnik	Objętość dla jednej próby	Temperatura (°C)	Czas inkubacji (h)
H <sub>2</sub> O	0,4	37	4
Bufor	1,0		
<i>MspI</i> (Thermo Scientific, USA)	0,6		
Produkt PCR	8,0		
H <sub>2</sub> O	0,4	37	4
Bufor	1,0		
<i>NcoI</i> (Thermo Scientific, USA)	0,6		
Produkt PCR	8,0		
H <sub>2</sub> O	0,4	37	4
Bufor	1,0		
<i>Hin6I</i> (Thermo Scientific, USA)	0,6		
Produkt PCR	8,0		

Tabela 3. Frekwencje (%) genotypów *MspI/CAST*, *NcoI/CAST*, *Hin6I/CAST* i alleli w obrębie badanych ras owiec.

Rasa	n	Miejsce restrykcyjne	Genotyp	Frekwencje genotypów (%)	Chi <sup>2</sup> /P	Allele	Frekwencje alleli (%)
pomorska	87	<i>MspI</i>	MM	87,00	0,48/	M	93,50
	13		MN	13,00	0,49	N	6,50
	94	<i>NcoI</i>	MM	94,00	0,09/	M	97
	6		MN	6,00	0,76	N	3
	97	<i>Hin6I</i>	AA	97,00	0,02/	A	98,50
	3		AB	3,00	0,88	B	1,50
kamieniecka	67	<i>MspI</i>	MM	87,01	0,37/	M	97,00
	10		MN	12,99	0,54	N	3,00
	77	<i>NcoI</i>	MM	100,00	-	M	100
	66	<i>Hin6I</i>	AA	85,71	4,58/ 0,03	A	91,56
	9		AB	11,69		B	8,44
	2		BB	2,60			
merynos barwny	69	<i>MspI</i>	MM	71,88	1,27/ 0,26	M	83,85
	23		MN	23,96		N	16,15
	4		NN	4,16			

	96	<i>NcoI</i>	MM	100,00	-	M	100
	62	<i>Hin6I</i>	AA	64,58	2,25/ 0,13	A	81,77
	33		AB	34,38		B	18,23
	1		BB	1,04			

P - prawdopodobieństwo

Tabela 4. Frekwencje (%) genotypów *CAST* w obrębie badanych ras owiec.

Kamieniecka			Pomorska			Merynos barwny		
Genotyp	Liczba (n)	Frekwencja (%)	Genotyp	Liczba (n)	Frekwencja (%)	Genotyp	Liczba (n)	Frekwencja (%)
ac	7	9,09	ac	3	3,00	ac	28	29,17
ae	7	9,09	ae	7	7,00	ae	18	18,75
ad	2	2,60	ab	6	6,00	ad	5	5,21
aa	59	76,62	aa	84	84,00	aa	40	41,66
cc	1	1,30				cc	1	1,04
cd	1	1,30				ee	4	4,17

Tabela 5. Frekwencje (%) genotypów i alleli *CAPN3* wykrytych przy użyciu reakcji MSCP w obrębie badanych ras owiec.

Rasa	n	Genotyp	Frekwencje genotypów (%)	Chi <sup>2</sup> /P	Allele	Frekwencje alleli (%)
kamieniecka	27	01'02	35,06	1,02/ 0,80	01	44,16
	26	02'02	33,77		02	51,30
	17	01'01	22,08		04	4,54
	7	04'01	9,09			
pomorska	69	01'02	69,00	0,76/ 0,86	01	57,00
	6	02'02	6,00		02	40,50
	20	01'01	20,00		04	2,50
	5	04'01	5,00			
merynos barwny	47	01'02	48,96	1,78/ 0,61	01	59,90
	11	02'02	11,46		02	35,94
	30	01'01	31,25			
	8	04'01	8,33		04	4,16

P - prawdopodobieństwo

Tabela 6. Allele genu kalpiny 3 (*CAPN3*) wykryte w eksonie 10. owiec ras: kamieniecka, pomorska i merynos polski odmiany barwnej.

Pozycja nukleotydu	SNP	Allel		
		01	02	04
22	-	C	C	C
91	T/G	G	T	T
103	C/T	C	T	T
139	C/T	C	C	T

<sup>a</sup>Pozycje nukleotydów są liczone od pierwszego nukleotydu 10. eksonu genu *CAPN3* owiec (nr GenBank DQ660376.1).

Tabela 7. Charakterystyka statystyczna cech: masa ciała w 2. i 56. dniu oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec.

		Rasa			Razem
		kamieniecka	pomorska	merynos barwny	
n		77	100	96	273
Cecha	Miary statystyczne				
Masa ciała w 2. dniu [kg]	$\bar{X}$	4,94	4,22	4,85	4,64
	$S_x$	0,62	0,55	0,87	0,76
	CV	12,48	13,02	17,95	16,46
Masa ciała w 56. dniu [kg]	$\bar{X}$	17,13	21,57	19,19	19,48
	$S_x$	3,53	3,66	3,42	3,96
	CV	20,61	16,99	17,82	20,31
Przyrosty dobowe P <sub>2-56</sub> [g]	$\bar{X}$	225,77	321,32	265,68	274,80
	$S_x$	60,12	65,34	57,70	72,33
	CV	26,63	20,34	21,72	26,32

Tabela 8. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec.

Miejsce restrykcyjne	Genotypy	Miary statystyczne	m.c. w 2. dniu [kg]	m.c. 56. dniu [kg]	przyrosty dobowe P <sub>2-56</sub> [g]
<b>kamieniecka</b>					
<b><i>MspI</i></b>	<b>MM</b>	$\bar{X}$	4,93	17,41 A	231,07 A
		$S_x$	0,64	3,50	58,76
	<b>MN</b>	$\bar{X}$	4,94	15,21 B	190,21 B
		$S_x$	0,40	3,26	59,94
<b><i>NcoI</i></b>	<b>MM</b>	$\bar{X}$	4,94	17,13	225,77
		$S_x$	0,62	3,53	60,12
<b><i>Hin6I</i></b>	<b>AA</b>	$\bar{X}$	4,96	17,40	229,26
		$S_x$	0,61	3,63	59,08
	<b>AB</b>	$\bar{X}$	4,57 a	15,02	197,70
		$S_x$	0,51	3,10	58,58
	<b>BB</b>	$\bar{X}$	5,70 b	16,62	233,21
		$S_x$	0,71	3,13	111,38



Tabela 8. Wpływ polimorfizmu w genie CAST na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec - ciąg dalszy.

Miejsce restrykcyjne	Genotypy	Miary statystyczne	m.c. w 2. dniu [kg]	m.c. 56. dniu [kg]	przyrosty dobowe P <sub>2-56</sub> [g]
<b>pomorska</b>					
<b>MspI</b>	<b>MM</b>	$\bar{X}$	4,24	21,57	320,93
		$S_x$	0,57	3,63	64,73
	<b>MN</b>	$\bar{X}$	4,11	21,60	323,87
		$S_x$	0,41	4,06	72,05
<b>NcoI</b>	<b>MM</b>	$\bar{X}$	4,24	21,57	321,03
		$S_x$	0,55	3,60	64,36
	<b>MN</b>	$\bar{X}$	4,02	21,61	325,76
		$S_x$	0,47	4,92	86,44
<b>Hin6I</b>	<b>AA</b>	$\bar{X}$	4,23	21,56	320,84
		$S_x$	0,52	3,70	66,14
	<b>AB</b>	$\bar{X}$	3,83	22,02	336,74
		$S_x$	1,26	2,57	32,07

Tabela 8. Wpływ polimorfizmu w genie CAST na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec - ciąg dalszy.

Miejsce restrykcyjne	Genotypy	Miary statystyczne	m.c. w 2. dniu [kg]	m.c. 56. dniu [kg]	przyrosty dobowe P <sub>2-56</sub> [g]
<b>merynos barwny</b>					
<b>MspI</b>	<b>MM</b>	$\bar{X}$	4,64	18,14 A	250,00 A
		S <sub>x</sub>	0,67	2,52	46,12
	<b>MN</b>	$\bar{X}$	4,94	19,49 B	269,43 B
		S <sub>x</sub>	0,91	3,66	60,88
	<b>NN</b>	$\bar{X}$	4,30	20,03	291,20
		S <sub>x</sub>	0,88	2,83	52,08
<b>NcoI</b>	<b>MM</b>	$\bar{X}$	4,85	19,19	265,68
		S <sub>x</sub>	0,87	3,42	57,70
<b>Hin6I</b>	<b>AA</b>	$\bar{X}$	4,89	19,69	274,13
		S <sub>x</sub>	0,90	3,32	54,64
	<b>AB</b>	$\bar{X}$	4,75	18,29	250,73
		S <sub>x</sub>	0,82	3,52	61,59

AB – średnie oznaczone różnymi wielkimi literami różnią się istotnie statystycznie (p < 0,01)

ab – średnie oznaczone różnymi małymi literami różnią się istotnie statystycznie (p < 0,05)

Tabela 9. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* (haplotypy) na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec.

Genotypy	Miary statystyczne	m.c. 2. dzień [kg]	m.c. 56. dzień [kg]	przyrosty dobowe [g]
<b>kamieniecka</b>				
<b>aa</b>	$\bar{X}$	4,96	17,67 A	235,45 A
	$S_x$	0,62	3,32	56,42
<b>ac</b>	$\bar{X}$	4,53	14,39 B	182,60
	$S_x$	0,58	3,45	56,42
<b>ad</b>	$\bar{X}$	4,70	18,25	250,93
	$S_x$	0,14	1,65	33,26
<b>ae</b>	$\bar{X}$	4,97	14,58	177,97 B
	$S_x$	0,46	3,38	59,9

Tabela 9. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* (haplotypy) na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec – ciąg dalszy.

Genotypy	Miary statystyczne	m.c. 2. dzień [kg]	m.c. 56. dzień [kg]	przyrosty dobowe [g]
<b>pomorska</b>				
<b>aa</b>	$\bar{X}$	4,25	21,55	320,37
	$S_x$	0,54	3,67	65,63
<b>ab</b>	$\bar{X}$	4,02	21,61	325,76
	$S_x$	0,48	4,92	86,44
<b>ac</b>	$\bar{X}$	3,83	22,08	336,74
	$S_x$	1,26	2,57	32,07
<b>ae</b>	$\bar{X}$	4,19	21,59	322,25
	$S_x$	0,38	3,57	64,42

Tabela 9. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* (haplotypy) na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec – ciąg dalszy.

Genotypy	Miary statystyczne	m.c. 2. dzień [kg]	m.c. 56. dzień [kg]	przyrosty dobowe [g]
<b>merynos barwny</b>				
<b>aa</b>	$\bar{X}$	5,08	20,29 a	281,71 a
	$S_x$	0,94	3,61	58,01
<b>ac</b>	$\bar{X}$	4,75	18,41 ab	253,11 b
	$S_x$	0,86	3,58	62,71
<b>ad</b>	$\bar{X}$	4,78	17,60	237,41
	$S_x$	0,54	3,42	59,54
<b>ae</b>	$\bar{X}$	4,61	18,29 c	253,50
	$S_x$	0,71	2,31	44,12
	$S_x$	0,88	2,83	52,08

ABC – średnie oznaczone różnymi wielkimi literami różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,01$ )  
abc – średnie oznaczone różnymi małymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ )

Tabela 10. Wpływ polimorfizmu w genie *CAPN3* na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec.

Genotypy	Miary statystyczne	m.c. 2. dzień [kg]	m.c. 56. dzień [kg]	przyrosty dobowe [g]
<b>kamieniecka</b>				
<b>01'01</b>	$\bar{X}$	4,95	17,76	237,31
	$S_x$	0,45	4,00	72,74
<b>01'02</b>	$\bar{X}$	4,86	16,83	221,70
	$S_x$	0,71	3,37	55,14
<b>02'02</b>	$\bar{X}$	5,01	16,71	216,72
	$S_x$	0,60	3,79	63,72
<b>04'01</b>	$\bar{X}$	4,93	18,27	247,00
	$S_x$	0,55	1,79	31,21

Tabela 10. Wpływ polimorfizmu w genie *CAPN3* na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec – ciąg dalszy.

Genotypy	Miary statystyczne	m.c. 2. dzień [kg]	m.c. 56. dzień [kg]	przyrosty dobowe [g]
<b>pomorska</b>				
<b>01'01</b>	$\bar{X}$	4,38	21,06	308,87
	$S_x$	0,40	3,15	54,90
<b>01'02</b>	$\bar{X}$	4,17	21,58	322,47
	$S_x$	0,60	3,89	69,39
<b>02'02</b>	$\bar{X}$	4,23	22,25	333,70
	$S_x$	0,43	2,72	48,32
<b>04'01</b>	$\bar{X}$	4,28	22,66	340,34
	$S_x$	0,47	3,86	71,37

Tabela 10. Wpływ polimorfizmu w genie *CAPN3* na masę ciała w 2. i 56. dniu życia oraz przyrosty dobowe jagniąt w obrębie analizowanych ras owiec – ciąg dalszy.

Genotypy	Miary statystyczne	m.c. 2. dzień [kg]	m.c. 56. dzień [kg]	przyrosty dobowe [g]
<b>merynos barwny</b>				
<b>01'01</b>	$\bar{X}$	5,02	19,30	264,51
	$S_x$	0,87	3,69	64,74
<b>01'02</b>	$\bar{X}$	4,88	19,28	266,78
	$S_x$	0,74	3,47	58,05
<b>02'02</b>	$\bar{X}$	4,75	18,46	254,04
	$S_x$	0,92	3,29	49,90
<b>04'01</b>	$\bar{X}$	4,16	19,26	279,63
	$S_x$	0,87	2,60	40,74



Tabela 11. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego.

		<i>MspI</i>			<i>NcoI</i>	<i>Hin6I</i>	
Cecha	M. stat.	MM	MN	NN	MM	AA	AB
Masa partii przodu; g	$\bar{X}$	2564.00	2801.36	2673.33	2749.00	2768,67	2693,57
	$S_x$	328.03	501.73	267.69	458,96	402,64	525,95
Masa partii środka; g	$\bar{X}$	1662.00	1849.32	1716.67	1804,83	1816,00	1768,93
	$S_x$	193.09	362.30	143.38	327,77	258,19	400,17
Masa partii zadu; g	$\bar{X}$	2152.00	2347.73	2193.33	2299,67	2297,00	2286,79
	$S_x$	178.28	415.89	191.85	327,63	287,82	458,60
Szyja; g	$\bar{X}$	333.00	380.91	356.67	370,50	376,56	363,57
	$S_x$	36.16	78.02	54.85	71,70	70,09	75,51
Goleń przednia; g	$\bar{X}$	292.00	324.09	315.00	317,83	314,68	321,43
	$S_x$	27.06	50.70	21.79	46,27	37,26	56,11
Karkówka; g	$\bar{X}$	542.00	578.41	571.67	571,67	594,69	545,36
	$S_x$	99.79	105.33	66.58	99,49	98,00	97,99

Tabela 11. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		<i>MspI</i>			<i>NcoI</i>	<i>Hin6I</i>	
Cecha	M. stat.	MM	MN	NN	MM	AA	AB
Łopatka; g	$\bar{X}$	1025.00	1122.73	1065.00	1100,67	1115,94	1083,21
	$S_x$	110.57	214.52	122.58	193,74	160,65	230,96
Łata i mostek z żebrami; g	$\bar{X}$	957.00	1079.77	995.00	1050,83	1059,38	1041,07
	$S_x$	103.78	220.83	80.47	199,30	162,66	240,59
Antrykot; g	$\bar{X}$	483.00	535.68	493.33	522,67	528,44	516,07
	$S_x$	73.96	102.28	35.12	94,36	78,80	112,29
Comber; g	$\bar{X}$	534.00	568.86	528.33	559,00	578,13	537,13
	$S_x$	88.20	120.98	31.75	109,63	82,14	134,40
Połędwiczka; g	$\bar{X}$	58.00	63.41	63.33	62,50	64,38	60,36
	$S_x$	7.58	14.09	11.55	12,85	10,63	15,12
Goleń tylna; g	$\bar{X}$	397.00	424.32	418.33	419,17	416,88	421,79
	$S_x$	27.06	71.65	30.55	63,15	47,39	79,31

Tabela 11. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		<i>MspI</i>			<i>NcoI</i>	<i>Hin6I</i>	
Cecha	M. stat.	MM	MN	NN	MM	AA	AB
Udziec; g	$\bar{X}$	1758.00	1924.55	1781.67	1882,50	1895,94	1867,14
	$S_x$	153.32	346.87	167.80	312,06	248,10	381,75
Udziec przed dysekcją; g	$\bar{X}$	1744.00	1911.14	1770.00	1869,17	1882,81	1853,57
	$S_x$	151.55	345.36	160.93	310,45	247,03	379,60
Udziec mięśnie; g	$\bar{X}$	1249.00	1393.18	1311.67	1361,00	1359,06	1363,21
	$S_x$	112.77	239.03	119.30	217,51	172,83	266,58
Udziec tłuszcz; g	$\bar{X}$	236.00	232.95	198.33	230,00	243,13	215,00
	$S_x$	34.71	77.44	31.75	68,52	58,05	78,30
Udziec kości; g	$\bar{X}$	259.00	285.00	260.00	278,17	280,63	275,36
	$S_x$	14.75	49.45	21.79	44,34	43,32	46,96
Udziec % tkanki mięśniowej	$\bar{X}$	71.60	73.05	74.11	72,92	72,25	73,67
	$S_x$	0.33	2.28	0.81	2,07	2,21	1,65

Tabela 11. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		<i>MspI</i>			<i>NcoI</i>	<i>Hin6I</i>	
Cecha	M. stat.	MM	MN	NN	MM	AA	AB
Udział % tkanki tłuszczowej	$\bar{X}$	13,48	11,98	11,19	12,15	12,86	11,34
	$S_x$	0,90	2,46	1,24	2,24	2,16	2,13
Udział % tkanki kostnej	$\bar{X}$	14,92	14,97	14,70	14,93	14,89	14,99
	$S_x$	1,20	1,14	0,45	1,08	0,95	1,24

AB – średnie oznaczone różnymi wielkimi literami różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,01$ )

ab – średnie oznaczone różnymi małymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ )

Tabela 12. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego.

		Genotypy			
Cecha	M. stat.	ae	aa	ac	ee
Masa partii przodu; g	$\bar{X}$	2556,25	2946,11	2701,15	2770,59
	$S_x$	378,25	415,55	546,53	513,01
Masa partii środka; g	$\bar{X}$	1687,50	1942,22	1785,00	1827,94
	$S_x$	213,01	271,63	411,78	373,06
Masa partii zadu; g	$\bar{X}$	2157,50	2418,33	2298,85	2332,65
	$S_x$	205,37	325,72	475,01	437,34
Szyja; g	$\bar{X}$	333,75	402,22	366,15	356,67
	$S_x$	41,71	77,46	77,95	54,85
Goleń przednia; g	$\bar{X}$	292,50	324,44	323,85	315,00
	$S_x$	31,22	42,02	57,63	21,79
Karkówka; g	$\bar{X}$	540,00	626,67	545,00	571,67
	$S_x$	15,11	95,33	101,98	66,58

Tabela 12. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		<b>Genotypy</b>			
<b>Cecha</b>	<b>M. stat.</b>	<b>ae</b>	<b>aa</b>	<b>ac</b>	<b>ee</b>
<b>Łopatka; g</b>	$\bar{X}$	1023,75	1173,89	1987,31	1065,00
	$S_x$	127,63	171,82	239,86	122,58
<b>Łata i mostek z żebrami; g</b>	$\bar{X}$	951,25	1128,89	1045,77	995,00
	$S_x$	118,91	172,79	249,75	80,47
<b>Antrykot; g</b>	$\bar{X}$	490,00	557,22	520,77	493,33
	$S_x$	83,47	81,17	115,43	35,13
<b>Comber; g</b>	$\bar{X}$	551,25	606,67	542,69	528,33
	$S_x$	91,59	83,93	138,21	31,75
<b>Połędwiczka; g</b>	$\bar{X}$	60,00	66,67	61,15	63,33
	$S_x$	7,07	11,99	15,43	11,55
<b>Goleń tylna; g</b>	$\bar{X}$	396,25	425,56	423,46	418,33
	$S_x$	31,19	57,58	82,29	30,55

Tabela 12. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na cechy poubojowe wśród trzczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		<b>Genotypy</b>			
<b>Cecha</b>	<b>M. stat.</b>	<b>ae</b>	<b>aa</b>	<b>ac</b>	<b>ee</b>
<b>Udziec; g</b>	$\bar{X}$	1765,00	1992,22	1877,69	1781,67
	$S_x$	176,21	269,90	395,20	167,80
<b>Udziec przed dysekcją; g</b>	$\bar{X}$	1751,25	1978,89	1864,23	1770,00
	$S_x$	173,99	269,78	392,91	160,93
<b>Udziec mięśnie; g</b>	$\bar{X}$	1255,00	1421,11	1373,85	1311,67
	$S_x$	129,29	188,66	274,36	119,30
<b>Udziec tłuszcz; g</b>	$\bar{X}$	238,75	260,00	214,23	198,33
	$S_x$	39,45	66,33	81,44	31,75
<b>Udziec kości; g</b>	$\bar{X}$	257,50	297,78	276,15	260,00
	$S_x$	16,58	50,38	48,78	21,79
<b>Udziec tkanki mięśniowej %</b>	$\bar{X}$	71,64	71,91	73,85	74,11
	$S_x$	0,36	2,71	1,58	0,81

Tabela 12. Wpływ polimorfizmu w genie *CAST* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		Genotypy			
Cecha	M. stat.	ae	aa	ac	ee
Udział tkanki tłuszczowej %	$\bar{X}$	13,57	13,09	11,20	11,19
	$S_x$	1,01	2,58	2,15	1,24
Udział tkanki kostnej %	$\bar{X}$	14,78	15,00	14,95	14,70
	$S_x$	1,34	0,96	1,29	0,45

AB – średnie oznaczone różnymi wielkimi literami różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,01$ )  
 ab – średnie oznaczone różnymi małymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ )



Tabela 13. Wpływ polimorfizmu w genie *CAPN3* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego.

		Genotypy		
Cecha	Miary statystyczne	01'01	01'02	02'02
Masa partii przodu; g	$\bar{X}$	2550,71	2724,38	3003,57
	$S_x$	425,71	487,65	345,36
Masa partii środka; g	$\bar{X}$	1737,14	1772,19	1947,14
	$S_x$	301,81	361,66	263,36
Masa partii zadu; g	$\bar{X}$	2127,86	2286,56	2501,43
	$S_x$	293,62	423,19	234,14
Szyja; g	$\bar{X}$	344,29	363,75	412,14
	$S_x$	70,03	74,89	54,53
Goleń przednia; g	$\bar{X}$	295,71	319,38	336,43
	$S_x$	43,05	52,28	26,10
Karkówka; g	$\bar{X}$	520,71	563,75	640,71
	$S_x$	73,62	90,78	114,29

Tabela 13. Wpływ polimorfizmu w genie *CAPN3* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		Genotypy		
Cecha	Miary statystyczne	01'01	01'02	02'02
Łopatka; g	$\bar{X}$	101071	1098,44	1195,71
	$S_x$	170,18	216,05	125,58
Łata i mostek z żebrami; g	$\bar{X}$	992,14	1044,69	1123,57
	$S_x$	218,46	214,34	138,25
Antrykot; g	$\bar{X}$	520,71	503,44	568,57
	$S_x$	90,02	100,96	77,44
Comber; g	$\bar{X}$	548,57	544,06	603,57
	$S_x$	87,64	125,14	90,68
Połędwiczka; g	$\bar{X}$	57,14	62,81	67,14
	$S_x$	11,13	14,14	10,75
Goleń tylna; g	$\bar{X}$	391,43	421,56	441,43
	$S_x$	61,29	69,71	43,37

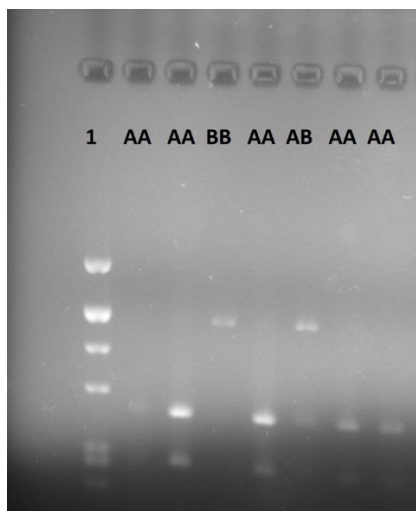
Tabela 13. Wpływ polimorfizmu w genie *CAPN3* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		Genotypy		
Cecha	Miary statystyczne	01'01	01'02	02'02
Udziec; g	$\bar{X}$	1735,71	1868,13	2062,14
	$S_x$	233,42	355,30	193,00
Udziec przed dysekcją; g	$\bar{X}$	1725,71	1854,38	2046,43
	$S_x$	233,73	353,49	193,82
Udziec mięśnie; g	$\bar{X}$	1272,86	1358,13	1455,71
	$S_x$	167,63	250,52	155,31
Udziec tłuszcz; g	$\bar{X}$	203,57	220,00	279,29
	$S_x$	32,50	76,51	55,56
Udziec kości; g	$\bar{X}$	249,29 a	276,25 a	3003,57 b
	$S_x$	39,31	39,31	345,36
Udziec % tkanki mięśniowej	$\bar{X}$	73,79 a	73,32 a	1947,14 b
	$S_x$	0,61	1,85	263,36

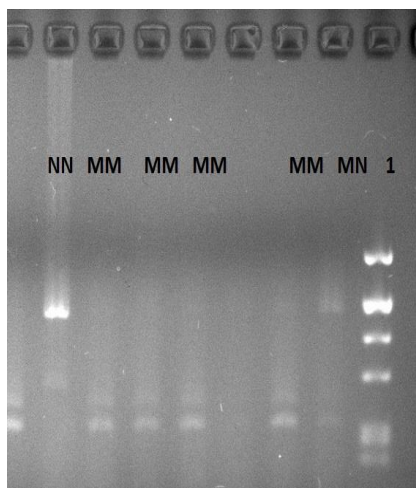
Tabela 13. Wpływ polimorfizmu w genie *CAPN3* na cechy poubojowe wśród tryczków merynosa barwnego – ciąg dalszy.

		Genotypy		
Cecha	Miary statystyczne	01'01	01'02	02'02
Udział % tkanki tłuszczowej	$\bar{X}$	11,78	11,63	2501,43
	$S_x$	0,87	2,25	234,14
Udział % tkanki kostnej	$\bar{X}$	14,43	15,04	412,14
	$S_x$	0,86	1,10	54,53

AB – średnie oznaczone różnymi wielkimi literami różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,01$ )  
 ab – średnie oznaczone różnymi małymi literami różnią się istotnie statystycznie ( $p < 0,05$ )



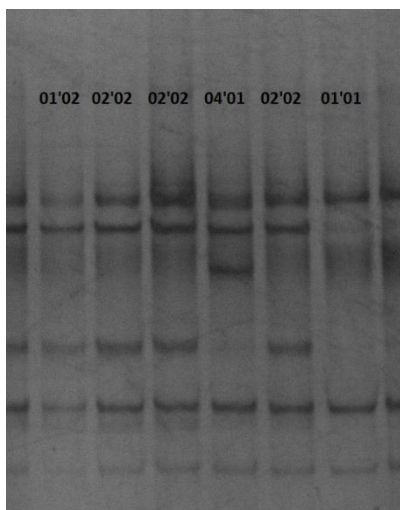
Rycina 1. Rozdział elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych genu *CAST* w locus *Hin6I* (*Tor 1*: marker molekularny pBR322 DNA/AluI).



Rycina 2. Rozdział elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych genu *CAST* w locus *MspI* (*Tor 1*: marker molekularny pBR322 DNA/AluI).



Rycina 3. Rozdział elektroforetyczny fragmentów restrykcyjnych genu *CAST* w locus *NcoI* (*Tor 1*: marker molekularny pUC19/MspI).



Rycina 4. Rozdział elektroforetyczny fragmentu genu *CAPN3* o długości 168pz.

```

CAPN3*01  ctctcag GATGTCCTACGATGATTTTATCTACCATTCACAAAGCTGGAGATCTGCAACC 60
CAPN3*02  ----- 60
CAPN3*04  ----- 60

CAPN3*01  TCACAGCTGATGCCCTGGAGTCCGACAAGCTTCAGACGTGGACAGTGTCCTGGAACGAGG 120
CAPN3*02  -----T-----T----- 120
CAPN3*04  -----T-----T----- 120

CAPN3*01  GCCGCTGGGTGAGGGGCTGCTCTGCCGGAGGCTGCCGCAACTTCCCAG 168
CAPN3*02  -----C----- 168
CAPN3*04  -----T----- 168

```

Rycina 5. Dopasowanie sekwencji nukleotydowych alleli genu kalpiny 3 (*CAPN3*) owiec. Nukleotydy w eksonie 10. (01, nr GenBank DQ660376) zaznaczono wielkimi literami, natomiast w intronie małymi. Nukleotydy w sekwencjach alleli 02 i 04 identyczne z sekwencją 01 zaznaczono myślnikami. Przedstawione sekwencje alleli 01, 02 oraz 04 odpowiadają sekwencjom zdeponowanym w bazie danych NCBI GenBank odpowiednio pod numerami: DQ660376.1, DQ660377.1 oraz JN940729.1.