

Wpływ genu RYR1^T na kształtowanie się cech mikrostrukturalnych mięśnia *longissimus lumborum* świń

Joanna Bogucka¹, Wojciech Kapelański²

¹Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy, Katedra Biotechnologii Zwierząt, Zakład Histologii Zwierząt,

ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

²Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy, Katedra Hodowli Trzody Chlewej, ul. Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz

Badaniami objęto 190 świń należących do czterech grup: pbz, pietrain, złotnicka pstra oraz mieszańce trójrasowe pietrain x (wbp x pbz). W każdej grupie zwierząt określono genotyp świń poprzez identyfikację mutacji genu receptora ryanodiny (RYR1) przy zastosowaniu metody PCR/RFLP. Do badań histologicznych pobrano próbki mięśnia *longissimus lumborum* i zamrożono w ciekłym azocie. Po wykonaniu preparatów mikroskopowych poddano je reakcjom histochemicznym, w celu wyróżnienia typów włókien mięśniowych różniących się metabolizmem, określenia procentowego udziału tłuszczu śródmięśniowego oraz glikogenu w badanym mięśniu. Celem pracy było określenie wpływu genu RYR1^T na kształtowanie się cech mikrostrukturalnych mięśnia *longissimus lumborum* świń. Porównanie mikrostruktury tkanki mięśniowej świń o odmiennych genotypach (RYR1^{CC}, RYR1^{CT} i RYR1^{TT}) nie wykazało ich wpływu na udziały procentowe i średnicę włókien mięśniowych odmiennych typów (STO, FTO i FTG) oraz na zawartość tłuszczu śródmięśniowego i glikogenu w mięśniu najdłuższym lędźwi. Analiza statystyczna wykazała jedynie istotnie większą liczbę włókien mięśniowych u homozygot dominujących w porównaniu z homozygotami recesywnymi w grupie mieszańców 3-rasowych pietrain x (wbp x pbz).

SŁOWA KLUCZOWE: mikrostruktura / mięśnie / gen RYR1 / świnię / pbz / pietrain / złotnicka pstra

Znaczenie genu RYR1^T w hodowli i użytkowaniu świń jest bardzo duże, ponieważ jest on tzw. genem głównym, warunkującym podatność zwierząt na stres i cechy fizykochemiczne mięsa [6, 11]. Gen ten u świń ma wpływ zarówno na cechy umięśnienia i otluszczenia tuszy, jak i na jakość mięsa [13].

Istotne znaczenie może mieć również oddziaływanie genotypu RYR1 na cechy charakteryzujące mikrostrukturę mięśnia najdłuższego grzbietu [2, 3, 4, 17].

Celem pracy było określenie wpływu genu RYR1^T na kształtowanie się cech mikrostrukturalnych mięśnia *longissimus lumborum* świń.

Materiał i metody

Badaniami objęto łącznie 190 szt. świń (w połowie loszki i wieprzki), należących do następujących grup rasowych: polska biała zwistoucha – 30 szt., pietrain – 30 szt., złotnicka pstra – 30 szt. i mieszańce trójrasowe knur pietrain x locha F₁ (wbp x pbz) – 100 szt. Zwierzęta utrzymywano w jednakowych warunkach chlewni zarodowej AG-RO-WRONIE we Wroniu k. Wąbrzeźna. Zastosowano żywienie do woli z automatów paszowych.

W każdej grupie określono genotyp świń poprzez identyfikację mutacji genu receptora ryanodiny (RYR1), przy zastosowaniu metody PCR/RFLP wg Fujii i wsp. [5] oraz Kurył i Korwin-Kossakowskiej [10].

Po uzyskaniu masy ciała ok. 105 kg wszystkie zwierzęta ubijano, zgodnie ze standardami obowiązującymi w przemyśle mięsnym. W 45 minut po uboju zwierząt pobierano próby mięśni z odcinka lędźwiowego, między 4. i 5. kręgiem lędźwiowym. Bezpośrednio po pobraniu próby mrożono w ciekłym azocie, o temperaturze -196°C , i przewożono do laboratorium Zakładu Histologii Zwierząt Wydziału Zootechnicznego ATR w Bydgoszczy, gdzie wykonywano stosowne preparaty histologiczne i oceniano mikrostrukturę badanych mięśni.

Zamrożone próbki mięśni przenoszono do kriostatu firmy Leica i cięto na skrawki o grubości 10 μm w temperaturze około -25°C . Następnie skrawki umieszczano na szkiełku podstawowym i poddawano procesom barwienia, stosując odmienne reakcje histochemiczne. Przeprowadzono następujące reakcje histochemiczne i metody barwienia:

- kombinowana reakcja na aktywność NADH-TR i ATP-azy miofibrylarniej dla wyróżnienia trzech typów włókien mięśniowych (STO – wolno kurczących się oksydacyjnych, FTO – szybko kurczących się oksydacyjnych i FTG – szybko kurczących się glikolitycznych), wg Ziegana [18];

- reakcja PAS (Periodic Acid Schiff), w celu wykazania zawartości glikogenu we włóknach mięśniowych;

- barwienie czerwienią oleistą (Oil Red) dla określenia zawartości tłuszczu śródmięśniowego.

Reakcje histochemiczne (PAS, Oil Red) przeprowadzone zostały wg metodyki opisanej przez Dubowitza i wsp. [1].

Pomiary średnicy włókien mięśniowych, określenie procentowego udziału włókien STO, FTO i FTG oraz liczby włókien na powierzchni 1,089 mm² przeprowadzono przy zastosowaniu Systemu Analizy Obrazu Q 500 MC firmy Leica (Cambridge, England).

Procentową zawartość tłuszczu śródmięśniowego na powierzchni 2,178 mm² również określono przy zastosowaniu Systemu Analizy Obrazu Q 500 MC firmy Leica.

Oceny zawartości glikogenu w tkance mięśniowej na powierzchni 1,089 mm² dokonano przy pomocy programu komputerowego autorstwa Śrutka i Kłosowskiej [16].

Otrzymane wyniki analizowano statystycznie, obliczając średnią arytmetyczną (\bar{x}) i odchylenie standardowe (Se). Istotność różnic między grupami badano przy pomocy analizy wariancji w układzie nieortogonalnym oraz testu Duncana. Wszystkie obliczenia oraz wielkości współczynników korelacji prostych uzyskano przy użyciu programu komputerowego STATISTICA PL [15].

Wyniki i dyskusja

Genetycznie uwarunkowana podatność świń na stres wiąże się z istniejącym polimorfizmem genu RYR1, którego allele mogą tworzyć trzy rodzaje genotypów: RYR1^{CC} (homozygoty dominujące), RYR1^{CT} (heterozygoty) i RYR1^{TT} (homozygoty recesywne). Negatywne skutki obciążeń stresowych objawiają się głównie u osobników będących homozygotami recesywnymi (RYR1^{TT}). Rola recesywnego genu RYR1^T w kształtowaniu cech użytkowych świń, w tym jakości tusz i mięsa, jest już udowodniona i ze względu na stosunkowo duże możliwości ich kształtowania nie powinna być pomijana przy rozważaniu innych czynników determinujących cechy produkcyjne świń, a w szczególności ilości i jakości pozyskiwanego mięsa.

Częstość występowania genotypów RYR1 u świń badanych grup zestawiono w tabeli 1. W badanej populacji zwierząt było 32,11% homozygot dominujących (NN), 42,63% heterozygot (Nn) oraz 25,26% homozygot recesywnych (nn). Homozygoty nn dominowały u świń rasy pietrain (27 sztuk), wystąpiły również u mieszańców (18 sztuk) i wśród świń rasy złotnickiej pstrej (3 sztuki). Homozygot recesywnych nie stwierdzono u zwierząt rasy pbz. Homozygoty dominujące występowały wśród mieszańców (28 sztuk), a także wśród zwierząt rasy pbz (21 sztuk) oraz złotnickiej pstrej (12 sztuk). Zwierząt odpornych na stres nie stwierdzono w obrębie rasy pietrain. Heterozygoty występowały we wszystkich grupach, najliczniej jednak wśród mieszańców (53 sztuki).

W badanej populacji świń zmutowany gen RYR1^T występował z największą częstotliwością w rasie pietrain. Dane z piśmiennictwa oceniają częstość występowania tego genu w populacji świń czysto rasowych pietrain na 31-100% [9]. Obecność genu RYR1^T wpływa na dobrą mięsność knurów, a dziedziczenie umożliwia uzyskiwanie z dużą pewnością bardzo dobrej mięsności potomstwa. Wraz ze wzrostem mięsności związanej z genem RYR1^T może dojść do pogorszenia jakości mięsa [9, 11, 12, 13].

Wyniki dotyczące powiązań między genotypami w odniesieniu do RYR1 a mikrostrukturą tkanki mięśniowej przedstawiono w tabeli 2.

Wbrew oczekiwaniom, porównanie mikrostruktury tkanki mięśniowej świń o odmiennych genotypach (RYR1^{CC}, RYR1^{CT}, RYR1^{TT}) nie wykazało ich wpływu na udział procentowy i średnicę włókien mięśniowych odmiennych typów (STO, FTO i FTG) oraz na zawartość tłuszczu śródmięśniowego i glikogenu w mięśni najdłuż-

Tabela 1 – Table 1Częstość występowania genotypów RYR1 u świń badanych grup
Frequency of occurrence of genotype RYR1 according to group of pigs

Grupa Group		Genotyp – Genotype			
		NN	Nn	nn	
pbz	n	21	9	–	
	%	70,00	30,00	–	
	wieprzki	n	11	4	–
	barrows	%	18,03	4,94	–
	loszki	n	10	5	–
	gilts	%	16,39	6,17	–
Pietrain	n	–	3	27	
	%	–	10,00	90,00	
	wieprzki	n	–	–	15
	barrows	%	–	–	31,25
	loszki	n	–	3	12
	gilts	%	3,70	25,00	
złp	n	12	15	3	
	%	40,00	50,00	10,00	
	wieprzki	n	6	7	2
	barrows	%	9,84	8,64	4,17
	loszki	n	6	8	1
	gilts	%	9,84	9,88	2,08
P x (wbp x pbz)	n	28	54	18	
	%	28,00	54,00	18,00	
	wieprzki	n	17	24	9
	barrows	%	27,87	29,63	18,75
	loszki	n	11	30	9
	gilts	%	18,03	37,04	18,75
Razem Total	n	61	81	48	
	%	32,11	42,63	25,26	

pbz – polska biała zwisłoucha – Polish Landrace; P – pietrain; złp – złotnicka pstra – Złotnicka Spotted; wbp – wielka biała polska – Polish Large White

szym lędźwi. Analiza statystyczna wykazała jedynie istotnie większą liczbę włókien mięśniowych u homozygot dominujących (204,17) w porównaniu z homozygotami recesywnymi (179,11) w grupie mieszańców 3-rasowych pietrain x (wbp x pbz). Brak różnic w proporcjach poszczególnych typów włókien mięśniowych między zwierzętami o genotypach RYR1^{CC} i RYR1^{TT} wykazali również Essen-Gustavson i wsp. [2]. Wicke i wsp. [17] stwierdzili zwiększenie średnic wszystkich typów włókien mięśniowych oraz mniejszy udział włókien STO u homozygot wrażliwych na stres (RYR1^{TT}) w porównaniu z homozygotami RYR1^{CC}. Natomiast Fiedler i wsp. [3, 4] stwierdzili istotnie więcej włókien FTG u homozygot RYR1^{TT}.

Mikrostruktura tkanki mięśniowej, wg wielu autorów [7, 8, 14], ma istotny wpływ na jakość mięsa, którą warunkuje obecność cienkich włókien mięśniowych oraz brak

Tabela 2 – Table 2

Cechy mikrostruktury *m. longissimus lumborum* w zależności od genotypu RYR1
 Microstructural traits of *longissimus lumborum* muscle of pigs in dependence from genotype RYR1

Wyszczególnienie Specification	Grupa Group	Genotyp – Genotype					
		NN		Nn		nn	
		\bar{x}	Se	\bar{x}	Se	\bar{x}	Se
1	2	3	4	5	6	7	8
Udział włókien (%) Proportion of fibres (%)							
STO							
	pbz	15,56	2,92	15,07	4,51	–	–
	pietrain	–	–	15,45	2,10	12,58	3,96
	złp	13,27	3,15	14,30	4,09	13,55	3,35
	P x (wbp x pbz)	16,09	4,25	16,69	4,28	16,75	6,37
	średnio average	14,97	1,50	15,38	1,00	14,30	2,18
FTO							
	pbz	15,01	4,44	13,06	4,38	–	–
	pietrain	–	–	15,54	10,25	16,77	5,25
	złp	23,66	3,81	23,31	2,48	25,87	1,58
	P x (wbp x pbz)	16,45	4,10	16,67	6,68	16,40	5,34
	średnio average	18,37	4,63	17,15	4,38	19,70	5,36
FTG							
	pbz	69,43	4,33	71,87	4,88	–	–
	pietrain	–	–	69,01	8,15	70,65	5,93
	złp	63,07	4,94	62,39	3,55	60,58	4,84
	P x (wbp x pbz)	67,47	6,49	66,64	7,57	66,85	9,14
	średnio average	66,66	3,26	67,48	4,01	66,03	5,09
Średnica włókien (μm) Fibre diameter (μm)							
STO							
	pbz	44,56	4,17	43,70	4,26	–	–
	pietrain	–	–	38,86	1,96	44,85	6,68
	złp	47,95	3,37	48,36	3,73	44,94	3,87
	P x (wbp x pbz)	46,93	5,72	48,14	5,32	50,18	7,60
	średnio average	46,48	1,74	44,77	4,48	46,66	3,05
FTO							
	pbz	42,52	3,86	40,89	2,59	–	–
	pietrain	–	–	39,83	2,84	43,33	5,04
	złp	41,01	3,48	41,85	3,61	42,34	1,89
	P x (wbp x pbz)	46,16	5,90	48,75	6,13	48,30	8,06
	średnio average	43,23	2,65	42,83	4,03	44,66	3,19
FTG							
	pbz	56,09	5,67	55,42	2,91	–	–
	pietrain	–	–	54,31	1,41	57,26	6,80
	złp	56,92	4,07	57,63	5,00	58,49	8,72
	P x (wbp x pbz)	60,90	6,56	63,41	7,01	63,10	8,82
	średnio average	57,97	2,57	57,70	4,05	59,62	3,08

1	2	3	4	5	6	7	8
Liczba włókien na powierzchni 1.089 mm ²	pbz	254,71	27,92	252,11	23,54	-	-
Number of fibres per 1.089 mm ² area	pietrain	-	-	234,00	41,76	226,67	40,52
	złp	268,42	22,35	250,60	22,12	256,67	44,77
	P x (wbp x pbz)	204,17 ^a	38,24	191,92	33,14	179,11 ^b	37,16
	średnio average	242,43	33,84	232,16	28,05	220,82	39,11
Udział tłuszczu (%)	pbz	3,15	1,73	3,38	2,89	-	-
Intramuscular fat (%)	pietrain	-	-	4,72	2,84	3,34	2,21
	złp	2,93	2,29	2,90	2,51	3,32	2,70
	P x (wbp x pbz)	2,84	2,49	2,54	2,66	2,50	2,54
	średnio average	2,97	0,16	3,39	0,95	3,05	0,48
Udział glikogenu (%/pow. 1,089 mm ²)	pbz	40,33	16,59	40,84	15,87	-	-
Glycogen (%/area 1.089 mm ²)	pietrain	-	-	44,02	15,59	38,55	21,96
	złp	40,66	14,51	43,21	14,34	52,49	7,95
	P x (wbp x pbz)	38,17	13,88	37,65	17,79	29,37	19,03
	średnio average	39,72	1,35	41,43	2,86	40,14	11,64

a, b – wartości oznaczone różnymi literami różnią się od siebie istotnie przy P≤0,05;

a, b – significant differences between means are marked with the different letters – P≤0,05

pbz – polska biała zwistoucha – Polish Landrace; P – pietrain; złp – złotnicka pstra – Zlotnicka Spotted; wbp – wielka biała polska – Polish Large White

oznak ich degeneracji, niewielki udział śródmięśniowej tkanki łącznej z niskim poziomem tłuszczu. Struktura mięśnia ma także bezpośredni związek z kruchością, soczystością i barwą mięsa oraz występowaniem wady wodnistości. Są to więc cechy ważne z punktu widzenia zarówno producenta przetworów mięsnych, jak i ich bezpośrednich odbiorców, czyli konsumentów.

W badaniach własnych kształtowanie się cech mikrostrukturalnych mięśnia *longissimus lumborum* świń nie zależało jednak od występowania genu RYR1^T.

PIŚMIENNICTWO

1. DUBOVITZ V., BROOKE M.H., NEVILLE H.E., 1973 – Muscle Biopsy: A Modern Approach (Eds) W.B. Saunders Company Ltd, London, Philadelphia, Toronto.
2. ESSEN-GUSTAVSSON B., KARLSTRÖM K., LUNDSTRÖM K., 1992 – Muscle fibers characteristics and metabolic response at slaughter in pigs of different halothane genotypes and their relation to meat quality. *Meat Sci.* 31, 1-11.
3. FIEDLER I., ENDER K., WICKE M., MAAK S., von LENGERKEN G., MEYER W., 1999 – Structural and functional characteristics of muscle fibers in pigs with different malignant hyperthermia susceptibility (MHS) and different meat quality. *Meat Sci.* 53, 9-15.
4. FIEDLER I., KUHN G., HARTUNG M., KÜCHENMEISTER U., NÜRNBERG K., REHFELDT C., HUBER K., KŁOSOWSKA D., 2001 – Effect of the malignant hyperthermia syndrome (MHS) on meat quality, muscle characteristics and metabolic traits of the Longissimus muscle in Pietrain pigs. *Arch. Tierz., Dummerstorf* 44, 2, 203-217.

5. FUJII J., OTSU K., ZORZATO F., DE LEON, KHANNA V.K., WEILER J.E., O'BRIEN P.J., MACLENNAN D.H., 1991 – Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253, 448-451.
6. GOODWIN R.N., CHRISTIAN L.L., LOUIS C.F., BERGER P.J., PRUSA K.J., BEITZ D.C., 1994 – Effect of the Hal gene on pork carcass composition and eating quality traits. *J. Anim. Sci.* 72, 1, 249.
7. KŁOSOWSKA D., 1973 – Czerwone i białe włókna w mięśniach różnych ras świń. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 139, 199-205.
8. KŁOSOWSKA D., 1975 – O związku między strukturą mięśnia a właściwościami mięsa. *Przegląd Hodowlany* 20, 14-15.
9. KOĆWIN-PODSIADŁA M., KURYŁ J., PRZYBYLSKI W., 1993 – Fizjologiczne i genetyczne tło występowania wad wieprzowiny indukowanych stresem. *Prace i Mat. Zoot.* 44, 5-31.
10. KURYŁ J., KORWIN-KOSSAKOWSKA A., 1993 – Genotyping of Hal locus by PCR method explains some cases of incomplete penetrance of Haln gene. *Anim. Sci. Pap.* 4, 271-278.
11. KURYŁ J., KORWIN-KOSSAKOWSKA A., KOĆWIN-PODSIADŁA M., 1994 – Genetyczne uwarunkowanie stresowości u świń. *Konf. nauk. „Świnie rasy Pietrain w Polsce”, AR Poznań.*
12. KURYŁ J., WRÓBLEWSKI T., 1992 – The effect of halothane – sensitivity gene (HALⁿ) in pigs on litter size, piglets live weight and rate of piglets survival to the age of 9-11 weeks. *Anim. Sci. Pap. Rep.* 9, 47-52.
13. LENARTOWICZ P., KULISIEWICZ J., 2000 – Wpływ genotypu w locus RYR1 („halotanowego”) na umięśnienie tuszy i poziom wybranych składników lipidowych mięsa wieprzowego. *Rocz. Nauk. Zoot.* 5, 99-103.
14. SOŚNICKI A., DOMAŃSKI J., 1983 – Występowanie włókien olbrzymich w tkance mięśniowej świń a wodniistość mięsa. *Gosp. Mięsna* 2, 17-18.
15. Statistica PL, 1995.
16. ŚRUTEK M., KŁOSOWSKA D., 2002 – Metoda oceny zawartości glikogenu, wykazanego na podstawie reakcji histochemicznej (PAS) w tkance mięśniowej indyków przy wykorzystaniu systemu analizy obrazów mikroskopowych. *Rocz. Nauk. Zoot.* 16, 31-36.
17. WICKE M., LENGGERKEN G., MAAK S., FIEDLER I., ENDER K., 1998 – Relationship between structural traits of longissimus muscle, MHS-genotype and meat quality in pigs. 44th ICoMST, August 30th-September 4th, 1998, Barcelona, Spain, 294-295.
18. ZIEGAN J., 1979 – Kombinationen enzymhistochemischer Methoden zur Fasertypendifferenzierung und Beurteilung der Skelettmuskulatur. *Acta Histochemica* 65, 34-40.

Joanna Bogucka, Wojciech Kapelański

Influence of RYR1^T gene on formation of microstructural traits of *longissimus lumborum* muscle in pigs

Summary

The studies were carried out with 190 pigs, representing the following four groups: Polish Landrace, Pietrain, Zlotnicka Spotted and crossbreds Pietrain x (Polish Large White x Polish Landrace). In every group of animals genotype RYR1 with method PCR/RFLP was qualified. We obtained the following genotypes of animals: RYR1^{CC}, RYR1^{CT} and RYR1^{TT}. The samples of

muscle *longissimus lumborum* collected for microstructure studies were frozen with liquid nitrogen. Then, the prepared microscopic preparations were subjected to a histochemical reaction for differentiation of the types of muscle fibers varying in enzymatic activity. Proportion of each muscle fiber types, intramuscular fat content and proportional participation of glycogen in muscle were determined. The aim of investigations was to determine the influence of RYR1 genotype on microstructural traits of *longissimus lumborum* muscle in pigs. The results of histological analyses of the *longissimus lumborum* muscle did not show any influence of RYR1 genotype on proportional participation and diameter of muscle fibre (STO, FTO and FTG) and on intramuscular fat content and proportional participation of glycogen in muscle. Statistical analysis showed only significantly higher number of muscle fibers in RYR1^{CC} genotype compared with RYR1^{TT} in crossbreds Pietrain x (Polish Large White x Polish Landrace).