

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja HORVAT ALEKSIĆ

**VPLIV POLIMORFIZMOV IZBRANIH  
KANDIDATNIH GENOV NA KAKOVOST MESA  
BIKOV SLOVENSKE LISASTE PASME**

MAGISTRSKO DELO

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA

Anja HORVAT ALEKSIĆ

**VPLIV POLIMORFIZMOV IZBRANIH KANDIDATNIH GENOV NA  
KAKOVOST MESA BIKOV SLOVENSKE LISASTE PASME**

MAGISTRSKO DELO

**EFFECT OF POLYMORPHYSMS AT SELECTED CANDIDATE  
GENES ON MEAT QUALITY TRAITS IN SLOVENIAN SIMMENTAL  
BULLS**

M. SC. THESIS

Ljubljana, 2016

Na podlagi Statuta Univerze v Ljubljani ter po sklepu Senata Biotehniške fakultete z dne 2. 11. 2015 je bilo potrjeno, da kandidatka izpolnjuje pogoje za magistrski Podiplomski študij bioloških in biotehniških znanosti ter opravljanje magisterija znanosti s področja genetike. Za mentorja je bil imenovan prof. dr. Peter Dovč, za somentorja pa doc. dr. Martin Škrlep.

Analize so potekale v obdobju 2011–2015 in so bile opravljene na Kmetijskem inštitutu Slovenije. Naloga je bila opravljena v sodelovanju Kmetijskega inštituta Slovenije in Katedre za genetiko, animalno biotehnologijo in imunologijo, Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Milena Kovač  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Simon Horvat  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: izr. prof. dr. Marjeta Čandek Potokar  
Kmetijski inštitut Slovenije, Oddelek za živinorejo

Datum zagovora:

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Anja Horvat Aleksić

### KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Md
DK	UDK 575:637.5:636.2 (497.4) (043)=163.6
KG	lisasti biki/govedo/kakovost mesa/geni/ <i>CAST/LEP/SCD1/CAPN1/DGAT1</i> /
AV	HORVAT ALEKSIĆ, Anja
SA	DOVČ, Peter (mentor)/ ŠKRLEP, Martin (somentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Podiplomski študij bioloških in biotehnoloških znanosti, področje genetika
LI	2016
IN	VPLIV POLIMORFIZMOV IZBRANIH KANDIDATNIH GENOV NA KAKOVOST MESA BIKOV SLOVENSKE LISASTE PASME
TD	Magistrsko delo
OP	IX, 43 str., 12 pregl., 13 sl., 69 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	V zadnjih desetletjih je ob hitrem razvoju molekularne genetike prišlo do odkritja precejšnjega števila potencialnih povezav med genetskimi polimorfizmi in lastnostmi kakovosti mesa. V naši raziskavi smo preverili frekvence kandidatnih genov <i>CAST</i> , <i>LEP</i> , <i>SCD1</i> , <i>CAPN1</i> in <i>DGAT1</i> ter njihov vpliv na lastnosti kakovosti govejega mesa. Analizirali smo meso 116 slovenskih bikov lisaste pasme, vključenih v preizkus potomcev. Opravili smo analize mesa (vključno z barvo, trdoto mesa, izgubo mesnega soka, pH) in genotipizacijo ter statistično ovrednotili vpliv genov na kakovost mesa. Vsi analizirani geni so v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, kar pomeni, da na njihovo razporeditev v populaciji niso vplivali dejavniki selekcije. Pri genu <i>DGAT1</i> genotipa KK nismo našli, medtem ko je bila frekvanca genotipov AA 94 % in KA le 6 %, kar nakazuje na fiksacijo alela A. Pri <i>LEP</i> je bila frekvanca genotipov pri AA 62 %, AB 35 % in BB le 3 %. Pri <i>CAPN1</i> so bile frekvence genotipov podobno razporejene kot pri <i>LEP</i> , in sicer CC 6 %, CT 36 % in TT 58 %. Frekvence genotipov pri <i>CAST</i> so CC 22 %, CG 42 % in GG 36 %. Genotipi na lokusu <i>SCD1</i> so imeli frekvence AA 32 %, AV 46 % in VV 22 %. Pri vseh proučevanih genih smo našli statistično značilne vplive na kakovost mesa. <i>CAST</i> nakazuje vpliv na marmoriranost in delež vode v mesu, <i>LEP</i> vpliva na zamaščenost, izcejo mesnega soka in barvo mesa, <i>SCD1</i> in <i>DGAT1</i> vplivata na količino maščobe, marmoriranost in barvo mesa, <i>CAPN1</i> pa nakazuje vpliv na debelino mišice. Gena <i>LEP</i> in <i>SCD1</i> bi bilo smiselno uporabiti pri selekciji, ker imata močan vpliv na lastnosti kakovosti mesa in bi z njima lahko bistveno izboljšali kakovost mesa.

#### KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Md
DC	UDC 575:637.5:636.2 (497.4) (043)=163.6
CX	Simmental bulls/cattle/meat quality/gene/ <i>CAST/LEP/SCD1/CAPN1/DGAT1</i> /
AU	HORVAT ALEKSIĆ, Anja
AA	DOVČ, Peter (supervisor)/ ŠKRLEP, Martin (co-supervisor)
PP	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Postgraduate Study of Biological and Biotechnical Sciences, Field: Genetics
PY	2016
TI	EFFECT OF POLYMORPHISMS AT SELECTED CANDIDATE GENES ON MEAT QUALITY TRAITS IN SLOVENIAN SIMMENTAL BULLS
DT	M. Sc. Thesis
NO	IX, 43 p., 12 tab., 13 fig., 69 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	<p>Progress in molecular genetics has revealed several possibilities to implement selection for meat quality. Rapid development of molecular genetics in recent decades led to the discovery of a significant number of potential associations between genetic polymorphisms and meat quality traits. In our study we estimated genotype frequencies for candidate genes <i>CAST</i>, <i>LEP</i>, <i>SCD1</i>, <i>DGAT1</i> and <i>CAPN1</i> and their association with beef quality traits. We analyzed meat samples from 116 Slovenian Simmental bulls involved in the offspring test. Meat quality traits were evaluated (color, tenderness, drip loss, pH ...) and genotyping was performed. The effect of genes on meat quality was statistically evaluated. All of the analyzed genes were in Hardy-Weinberg equilibrium, meaning that their distribution in the population was not affected by selection. The genotype KK at <i>DGAT1</i> locus was not present, while the frequency of the AA and KA genotypes were 94% and 6%, respectively. The frequencies of <i>LEP</i> genotypes were 62%, 35% and 3% for AA, AB and BB, respectively. The genotype frequencies in the case of <i>CAPN1</i> were similarly distributed, CC 6%, CT 36% and TT 58%. For <i>CAST</i> genotype frequencies were 22%, 36%, 42% for CC, CG and GG genotype, respectively. Genotype frequencies of <i>SCD1</i> gene were 32% AA, 46% AV and 22% VV. All the studied genes affected meat quality traits. <i>CAST</i> was associated with water content, <i>LEP</i> had impact on fatness, drip loss and meat color, <i>SCD1</i> and <i>DGAT1</i> influenced fat content, marbling and meat color, <i>CAPN1</i> affected the thickness of muscle. Based on our results we can confirm that investigated polymorphisms, especially those in <i>LEP</i> and <i>SCD1</i> genes could be implemented in selection schemes.</p>

## KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Okrajšave in simboli	IX
<b>1 UVOD</b>	<b>1</b>
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	<b>3</b>
2.1 KAKOVOST MESA	3
2.2 <i>CAST IN CAPN1</i>	5
2.3 <i>LEP</i>	6
2.4 <i>SCDI</i>	6
2.5 <i>DGAT1</i>	6
<b>3 MATERIAL IN METODE DELA</b>	<b>8</b>
3.1 STRUKTURA PODATKOV	8
3.2 VZORČENJE MESA	8
3.3 ANALIZE MESA	9
3.4 GENETSKE ANALIZE	13
3.4.1 Izolacija DNA	13
3.4.2 Genotipizacija DNA	13
3.5 STATISTIČNA OBDELAVA	15
<b>4 REZULTATI</b>	<b>18</b>
4.1 FREKVENCE GENOV	18
4.2 KLAVNE LASTNOSTI	20
4.3 KEMIČNA SESTAVA, VSEBNOST MIOGLOBINA IN pH	21
4.4 SPOSOBNOST ZA VEZAVO VODE	22
4.5 TRDOTA MESA	25
4.6 BARVA MESA	25
<b>5 RAZPRAVA</b>	<b>32</b>
<b>6 SKLEPI</b>	<b>35</b>

<b>7</b>	<b>POVZETEK (SUMMARY)</b>	<b>36</b>
7.1	POVZETEK	36
7.2	SUMMARY	37
<b>8</b>	<b>VIRI</b>	<b>39</b>
<b>ZAHVALA</b>		

## KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi in restrikcijski encimi .....	15
Preglednica 2: Verižna reakcija s polimerazo .....	15
Preglednica 3: Frekvence (število) genotipov in alelov <i>CAST</i> , <i>LEP</i> , <i>SCD1</i> , <i>CAPN1</i> in <i>DGAT1</i> .....	19
Preglednica 4: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na klavne lastnosti .....	20
Preglednica 5: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na kemično sestavo mesa .....	21
Preglednica 6: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na oblike mioglobina in pH .....	22
Preglednica 7: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na sposobnost za vezanje vode - izguba po kuhanju in shranjevanju v vakuumu .....	23
Preglednica 8: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na sposobnost za vezanje vode – izguba pri odtaljevanju in izceji EZ .....	24
Preglednica 9: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na strižno trdoto mesa po Warner–Bratzlerju .....	25
Preglednica 10: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na parametre barve L*, a*, b* na svežem mesu 1uro vsake 15 min .....	26
Preglednica 11: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na parametre barve L*, a*, b* merjeno na zorenem mesu 1uro vsake 15 min .....	30
Preglednica 12: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na barvo L*, a*, b* merjeno vsak dan v obdobju enega tedna.....	31

## KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Prerez klavnega trupa in razrez mišice (Škrlep in sod., 2013).....	8
Slika 2: Merjenje trdote/strižne sile mesa. (Škrlep in sod., 2013).....	10
Slika 3: Prikaz analiz mesa – barva, pH in izceja po EZ (Škrlep in sod., 2013).....	10
Slika 4: Priprava mesa in merjenje NIR spektrometrijo (Škrlep in sod., 2013).....	12
Slika 5: Shema poteka analiz mesa (Žabjek in sod., 2015).....	12
Slika 6: Primer genotipizacije <i>LEP</i> , <i>SCD1</i> , <i>CAPN1</i> in <i>CAST</i> . M je lestvica 1000 bp. ....	18
Slika 7: Primer genotipizacije <i>DGAT1</i> . M je lestvica od 100 do 1000 bp. ....	19
Slika 8: Vpliv gena <i>SCD1</i> na spreminjanje parametra barve L* na svežem mesu prvo uro po prerezu.....	27
Slika 9: Vpliv gena <i>SCD1</i> na spreminjanje parametra barve a* na svežem mesu prvo uro po prerezu.....	27
Slika 10: Vpliv gena <i>SCD1</i> na spreminjanje parametra barve b* na svežem mesu prvo uro po prerezu.....	28
Slika 11: Vpliv gena <i>DGAT1</i> na spreminjanje parametra barve L* na svežem mesu prvo uro po prerezu.....	28
Slika 12: Vpliv gena <i>DGAT1</i> na spreminjanje parametra barve a* na svežem mesu prvo uro po prerezu.....	29
Slika 13: Vpliv gena <i>DGAT1</i> na spreminjanje parametra barve b* na svežem mesu prvo uro po prerezu.....	29

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

BTA	kromosom pri govedu ( <i>Bos taurus</i> )
<i>CAPN1</i>	gen $\mu$ -kalpain
<i>CAST</i>	gen kalpastatin
<i>DGAT1</i>	gen diacilglicerol O-aciltransferazo 1
ID	identifikacijska številka
IMM	intramuskularna maščoba
LD	mišica <i>longissimus dorsi</i>
<i>LEP</i>	gen leptin
LS	lisasta pasma
lsmean	ocenjena srednja vrednost
Mb <sup>2+</sup>	deoksimioglobin
MMb <sup>3+</sup>	metmioglobin
MTP	masa toplih polovic
MUFA	enkrat nenasičene maščobne kisline
OMb <sup>2+</sup>	oksimioglobin
PCR	verižna reakcija s polimerazo
R <sup>2</sup>	determinacijski koeficient
<i>SCD1</i>	gen stearoil-koencim A desaturaza 1
see	standardna napaka ocene
WBSF	Warner-Bratzler strižna sila

## 1 UVOD

Potrošniki se vedno bolj zavedajo, da je kakovost mesa lahko različna, zato morajo predelovalci in predelovalci mesa paziti na številne dejavnike, da kakovost ohranjajo. Na kakovost mesa poleg okoljskih dejavnikov, med katere sodijo prehrana živali, način reje, ravnanje z živalmi pred in med zakolom ter kasneje z mesom, vplivajo tudi genetski dejavniki.

V Sloveniji je najbolj razširjena lisasta pasma (LS) goveda, ki predstavlja 31 % vse populacije goveda (Sadar in sod., 2015). Pasma je za naše rejce zanimiva, ker gre za kombiniran tip goveda, ki se uporablja tako za mleko kot za meso. V Sloveniji se je LS pojavila ob koncu 19. stoletja. Leta 1932 je bila ustanovljena Zveza selekcijskih društev, s čimer se je tudi začela selekcija živali LS. Najprej je selekcija potekala tako, da so odbirali boljše živali na podlagi količine mleka, plodnosti in količine mesa, kasneje pa s pomočjo izračunov plemenskih vrednosti na podlagi preizkusa potomcev. Čeprav je, kot že omenjeno, kakovost mesa pomembna tako za predelovalce kot za potrošnike, ni vključena v selekcijske programe. Razloge lahko pripisemo kompleksnosti lastnosti, zapleteni metodologiji določanja in nizkim heritabilitetam (Jenko in sod., 2013).

Napredek na področju molekularne genetike je odpril več možnosti za izvajanje selekcije na kakovost mesa. V zadnjih desetletjih je namreč ob hitrem razvoju molekularne genetike prišlo do odkritja precej potencialnih povezav med genetskimi polimorfizmi in lastnostmi kakovosti mesa (Ibeagha-Awemu in sod., 2008). Izmed mnogih odkritih so kandidatni geni *CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *DGAT1* povezani s fiziološkimi procesi, ki bi lahko neposredno vplivali na različne lastnosti kakovosti mesa. Pri določenih polimorfizmih omenjenih genov je bila povezava tudi že dokazana (Li in sod., 2013), vendar gre pri tem za druge pasme oz. tuje populacije goveda. Zato smo se odločili preveriti povezavo med genetskimi označevalci na naštetih kandidatnih genih in lastnostmi kakovosti mesa pri bikih iz slovenske populacije, vključenih v preizkus potomcev. Čeprav se selekcija na kakovost mesa pri nas ne izvaja, so živali podvržene določenim selekcijskim pritiskom, saj odbiranje poteka glede na proizvodne lastnosti, ena izmed njih je tudi mesnatost, selekcija nanjo pa bi lahko imela negativne učinke na kakovost mesa.

Z raziskavo želimo ugotoviti frekvence genotipov na preiskovanih genih v naši populaciji bikov LS in morebitne vplive selekcije (morebitno zmanjšanje frekvence določenih alelov). Kjer bo struktura podatkov to dopuščala, bomo preverili povezave (vplive) polimorfizmov na kandidatnih genih na parametre kakovosti mesa. Raziskava naj bi pojasnila povezave izbranih kandidatnih genetskih označevalcev z lastnostmi kakovosti

govejega mesa. Ugotovljene frekvence genotipov bodo prva tovrstna informacija za slovensko populacijo LS.

V raziskavi smo preverili hipoteze:

- frekvence genotipov na lokusih *CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *DGAT1* nakazujejo učinek selekcije;
- genetski označevalci *CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *DGAT1* vplivajo na lastnosti kakovosti mesa.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 KAKOVOST MESA

Lastnosti kakovosti mesa se delijo na senzorične (mehkoba, sočnost, aroma, okus ...), prehransko-fiziološke (hranilna vrednost, vsebnost mineralov, maščob oz. maščobnokislinska sestava ...), tehnološke (sposobnost veza vode, pH, barva, obstojnost) in higiensko-toksikološke (prisotnost patogenih mikroorganizmov, ostankov antibiotikov ...) lastnosti. Ker se okusi razlikujejo, je tudi ocena kakovosti pri izbiri in odločanju potrošnika za nakup dokaj subjektivna. Izmed lastnosti kakovosti mesa je ena najpomembnejših lastnosti barva mesa, ker je to prva lastnost mesa, ki jo potrošnik vidi in na podlagi katere se odloča za nakup. Odvisna je od vrste/pasme živali, starosti, spola, prehrane, stresa med transportom in ne nazadnje od tipa/vrste mišice. Pigment, ki je v prvi vrsti odgovoren za barvo mesa, je mioglobin (Mancini in Hunt, 2005). Gre za enoverižen globularen protein, njegova naloga pa je transport kisika. V mesu obstajajo tri glavne oblike mioglobina: deoksimioglobin ( $Mb^{2+}$ ), oksimioglobin ( $OMb^{2+}$ ) in metmioglobin ( $MMb^{3+}$ ). Vsaka od teh oblik mioglobina da mesu drugačno barvo. V pogojih, kjer je zelo malo kisika, govorimo o  $Mb^{2+}$ , kar je razlog za temno rdeče meso. Ko pa  $Mb^{2+}$  dodamo kisik, pride do oksigenacije in dobimo  $OMb^{2+}$ , kar se na mesu odraža v svetlo rdeči barvi, značilni za sveže meso. Če v mesu pride do oksidacije, govorimo o  $MMb^{3+}$ , ki da mesu sivorjavno barvo.  $Mb^{2+}$  in  $OMb^{2+}$  imata železo vezano v obliki  $Fe^{2+}$ ,  $MMb^{3+}$  pa v obliki  $Fe^{3+}$ .

Najpogostejsi postopki, ki se uporabljajo za merjenje barvne mesa, so vizualna ocena, spektrofotometrija in odbojna kolorimetrija. Najpogosteje se uporablja kolorimetrija, ki jo merimo s kromometrom, ki določi parametre barve na podlagi CIE  $L^*$   $a^*$   $b^*$  sistema. V tem barvnem prostoru nam  $L^*$  definira svetlost, višje vrednosti pomenijo svetlejšo, nižje pa temnejšo barvo;  $a^*$  označuje rdečo/zeleno barvo, večji je  $a^*$ , bolj je barva rdeča, manjši kot je  $a^*$ , bolj je zelena;  $b^*$  pa označuje modro/rumeno barvo (večji je  $b^*$ , bolj je barva rumena, manjši kot je  $b^*$ , bolj je modra). Svetlost se meri v območju od 0 do 100, barvni komponenti  $a^*$  in  $b^*$  pa v območju od -60 do +60 (Sharifzadeh in sod., 2014). Barva in tekstura mesa sta tesno povezani z lastnostmi mesa, kot so sposobnost zadrževanja vode, intramuskularna maščoba in vsebnost beljakovin.

Druga pomembna lastnost kakovosti mesa je intramuskularna maščoba (IMM), saj da mesu okus in sočnost. Nalaganje maščobe pri govedu poteka v različnih fazah rasti. Največ IMM se naloži v fazi pubertete, zato je količina IMM močno odvisna od starosti živali ob zakolu. Delež maščobe je odvisen tudi od pasme in spola živali. Pri isti starosti so pasme, ki pozno spolno dozorijo (lisasta, limuzin in šarole pasma), lažje kot hitro zrele pasme (angus in hereford) in zato tudi manj zamaščene (Wheeler in sod., 2005). Prav tako je pri moških

živalih pomembno, ali so kastrirane, ker raven moških spolnih hormonov pomembno vpliva na nalaganje maščob, njihov anabolični učinek pa na rast mišic. Kastrirane živali nalagajo več maščob, medtem ko imajo moške živali večji delež mesa (Warris, 2000). Količino IMM v mesu lahko opišemo tudi kot marmoriranost. Stopnja marmoriranosti je povezana tudi z intenzivnostjo okusa in arome. Nizka vsebnost IMM negativno vpliva na mehkobo in sočnost mesa. Visoka vsebnost IMM da dobre rezultate pri senzoričnem ocenjevanju, vendar mora maščoba presegati 2 % (Warris, 2004). Zaradi subjektivnega ocenjevanja stopnje marmoriranosti je povezano med genetskimi polimorfizmi in marmoriranostjo težje najti kot pa povezano z mehkobo mesa. V praksi to pomeni, da potrebujemo več ocen, da dobimo dovolj natančne podatke, ki jih nato uporabimo pri napovedi genskih učinkov (Hocquette in sod., 2007).

Trdota oz. mehkoba je prav tako pomemben parameter pri določanju kakovosti mesa. Mehkoba mesa je odvisna od mišice – različne mišice na klavnem trupu imajo različno mehkobo, kar je posledica različnih vsebnosti kolagena in IMM. Na mehkobo mesa vpliva tudi starost živali, starejše živali imajo trše, bolj žilavo meso kot mlade zaradi povečanja stopnje netopnega kolagena (Lepetit, 2007). Različna stopnja mehkobe je lahko tudi posledica različnih faz krčenja sarkomer ob nastopu mrtvaške okorelosti (lat. rigor mortis). Koohmaraie (1996) navaja, da je pri različnem mesu dolžina zorenja odvisna od vrste živali. Za maksimalen učinek zorenja mesa je govedino treba zoreti 10–14 dni, jagnjetino 7–10 dni in svinjino 4 dni. Ena izmed metod merjenja mehkobe v mesu je Warner-Bratzler strižna sila (WBSF). Metoda je bila razvita v začetku 30. let prejšnjega stoletja in temelji na sili, ki je potrebna, da prerežemo nek predmet na dva dela (Warris, 2004).

Najpomembnejša tehnološka lastnost mesa je sposobnost vezave vode, ki je pomembna predvsem pri nadaljnji obdelavi mesa. Izmerimo jo lahko v treh različnih fazah: izguba pri svežem mesu, izguba po zamrzovanju oz. taljenju mesa in po termični obdelavi (kuhanje, pečenje) (Lawries in Ledward, 2006). Slaba sposobnost za vezavo vode se pri svežem mesu kaže v izgubi mase in neprivlačnem videzu mesa, med termično obdelavo pa tako meso izgubi veliko vode, zato je suho, trdo in neokusno. Sposobnost vezave vode je odvisna od zmogljivosti beljakovin, da vodo vežejo, in celične strukture mišic, da vodo ujame in zadrži. Med proteini so v ta proces najbolj vključeni miofibrilni proteini, njihova sposobnost vezave pa je odvisna od vrednosti pH, ionske moči in stopnje oksidacije (Huff-Lonergan in Lonergan, 2005). Na sposobnost vezave vode vplivajo tudi postopki pred zakolom in takoj po zakolu. Dolgotrajen stres živali pred zakolom ima za posledico temno, čvrsto in suho meso (TČS), medtem ko v primeru hitrega padca vrednosti pH in neustreznega hlajenja klavnega trupa po zakolu dobimo bledo, mehko in vodeno meso (Koohmaraie, 1996).

Parametri kakovosti mesa, kot so vrednost p, barva, sposobnost za vezavo vode, vsebnost IMM in trdota, so odvisni od poteka posebnih fizioloških procesov, kot je metabolizem maščob, beljakovin in ogljikovih hidratov v mišičnih celicah, ki so pod neposrednim nadzorom genov. Izmed mnogih odkritih so kandidatni geni *CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *DGAT1* povezani s fiziološkimi procesi, ki bi lahko neposredno vplivali na različne lastnosti kakovosti mesa. Pri določenih polimorfizmih omenjenih genov je bila povezava tudi že dokazana (Li in sod., 2013).

## 2.2 *CAST IN CAPN1*

Kalpastatin je fiziološki inhibitor kalpaina (od kalcija odvisna proteinaza), ki je vključen tako v proces metabolizma miofibrilarnih proteinov in vivo kot tudi v posmrtnе proteolitične procese in s tem mehčanje mesa (Goll in sod., 2003). Vplival naj bi tudi na raven izražanja genov, ki kodirajo strukturne ali regulatorne proteine. V družini kalpainskih proteaz je  $\mu$ -kalpain (*CAPN1*) odgovoren za razgradnjo miofibrilarnih proteinov, medtem ko kalpastatin (*CAST*) inhibira  $\mu$ -kalpain in m-kalpain (*CAPN2*) in s tem uravnava posmrtno proteolizo (Calvo in sod., 2014). Encim  $\mu$ -kalpain je nevtralna, s kalcijem aktivirana nelizosomalna znotrajcelična cisteinska proteinaza. Kalpaini sesalcev vključujejo želodčno specifične in mišično specifične encime. Ti encimi so sestavljeni iz heterodimerov z različno velikimi katalitičnimi podenotami, povezanimi z malimi regulatornimi podenotami (GeneCards, 2015). Sistem mišičnih kalpainov je pomemben pri metabolizmu mišičnih proteinov in vzpostavljanju ravnotežja med rastjo in razgradnjo (Goll in sod., 2003), medtem ko je dejavnost kalpainov po zakolu eden od glavnih dejavnikov miofibrilarne trdote mesa (Koochmariae, 1994; Corva in sod., 2007) in spremenjanja barve (Pinto in sod., 2011).

*CAST* je gen za kalpastatin, nahaja se na BTA7 in ima pri govedu odkritih že veliko polimorfizmov. Najpogosteje se omenjajo SNP2870, ki se nahaja na 3' neprevedeni regiji (untranslated region) in je sestavljen iz nukleotidne substitucije C v T (Casas in sod., 2006), drugi, ki se nahaja na eksonu 3, je označevalec C/G (Schenkel in sod., 2006), tretji pa se nahaja na eksonu 12, ki je enak kot pri človeku. Pri slednjem so ugotovili, da gre za zamenjavo G/C na položaju 1460 v eksonu. Juszczuk-Kuiak in sod. (2004) so z računalniško analizo mutacije prikazali, da gre za zamenjavo serina in treonina na 20. položaju aminokislinskega zaporedja proteina *CAST*. Omenjeni označevalec gena *CAST* ima vpliv na izgube pri kuhanju, barvo (Juszczuk-Kubiak in sod., 2004) in trdoto mesa (Juszczuk-Kubiak in sod., 2004; Corva in sod., 2007).

*CAPN1* je gen za  $\mu$ -kalpain in se nahaja na BTA29. Pri tem genu je bilo pri govedu odkritih že več kot 100 različnih polimorfizmov (SNP). Med njimi izstopajo štirje

polimorfizmi, dva nesinonimna (G316A in V530I) in dva v intronu (C4685T in C4751T), ki imajo pomembne učinke na trdoto mesa. C4685T se nahaja v 14. intronu, gre pa za zamenjavo T/C na položaju 4685 (Smith in sod., 2000).

### 2.3 *LEP*

Leptin je peptidni hormon. Sintetizira in izloča se iz belih maščobnih celic in opravlja pomembno vlogo pri uravnavanju telesne teže, proizvodnji mleka, zauživanju krme, delovanju imunskega sistema in razmnoževanju (Block in sod., 2001). Leptin se veže na receptorje, v glavnem locirane na nevropeptidih-Y-nevronov, ki se pojavljajo tudi v hipotalamu in imajo ključno vlogo pri integraciji vnosa hrane s statusom telesne energije. Ko se žival začne zamaščevati, se izloči več leptina, kar ima za posledico zmanjšanje vnosa krme in povečanje porabe energije (Wayne in sod., 1995). Pri kravah molznicah povečanje mlečnosti spremljata bolj negativna energetska bilanca v zgodnjem obdobju laktacije in slabša plodnost. Koncentracija hormona leptina je visoka v pozni brejosti in se zniža na najnižjo točko ob porodu. To nakazuje uravnavanje porabe energije s pomočjo leptina (Liefers in sod., 2005).

Gen za leptin (*LEP*) se nahaja na BTA4 in ima visoko stopnjo ohranjenosti zaporedja (podobnosti) pri različnih vrstah. Zaporedje gena *LEP* vsebuje več kot 15.000 baznih parov, sestavlja pa ga trije eksoni, ki so ločeni z dvema intronoma (Stone in sod., 1996). V intronu 2 je bil najden označevalec Sau3AI, substitucija citozina s timinom, posledica pa je sprememba aminokisline arginin v cistein na 2059. položaju proteina (Moravčikova in sod., 2012). Leptin je kodiran z enim prepisom približno 4,5 kbp, primarno izraženim v adipoznem (maščobnem) tkivu. Za polimorfizme na genu *LEP* so dokazali vpliv na marmoriranost mesa (Li in sod., 2013), preko apetita vpliva tudi na maso živali (Nkrumah in sod., 2005), količino mleka (Liefers in sod., 2002) in delež maščob v mleku (Javanmard in sod., 2010). Potencial leptina je velik, saj bi lahko preko njega uravnavali več lastnosti hkrati, od plodnostnih do količine ter kakovosti mleka in mesa.

### 2.4 *SCD1*

Stearoil-koencim A desaturaza 1 je encim, ki sodeluje pri biosintezi maščobnih kislin, predvsem pri sintezi oleinske kisline (GeneCards, 2015), pri desaturaciji nasičenih maščobnih kislin v enkrat nenasičene maščobne kisline (MUFA) (Li in sod., 2013). Poleg omenjenega ima pomembno vlogo tudi pri uravnavanju oksidacije maščobnih kislin, sodeloval pa naj bi tudi pri nekaterih vidikih energetske homeostaze, kot so lipogeneza, lipidna oksidacija in termogeneza (Flowers in Ntambi, 2008). Ta encim je prisoten v številnih tkivih, kot sta maščobno in jetrno, njegovo izražanje pa nadzirajo inzulin, jetrni X

receptor (LXR), vezavni proteini za sterolni regulatorni element (SREBP-1c), leptin in receptorji, aktivirani s peroksisomskimi proliferatorji (PPAR) (Paton in Ntambi, 2008).

*SCD1* je gen za stearoil-koencim A desaturazo 1 in se nahaja na BTA26. V eksonu 5 se nahaja označevalec, ki kodira različni aminokislini, alanin ali valin (A293V). Označevalec na genu *SCD1* je povezan z maščobnokislinsko sestavo mleka (Mashhadi in sod., 2013) in mesa (Smith in sod., 2009). Taniguchi in sod. (2004) so ugotovili, da lahko valin spremeni katalitično dejavnost encima v primerjavi z alaninom; ugotovili so, da je bil pri japonskem črnem govedu alel A (alanin) pogosteje povezan z višjo vsebnostjo MUFA v klavnem trupu.

## 2.5 *DGAT1*

*DGAT1* je gen za encim diacilglicerol O-aciltransferazo 1, ki katalizira končni korak v sintezi triacilglicerola, kjer za substrat uporabi diacilglicerol in acil CoA (GeneCards, 2015; Winter in sod., 2002). Nahaja se na BTA14. Dinukleotidni označevalec na eksonu 8 povzroči spremembo v aminokislinskem zaporedju proteina iz lizina (K) v alanin (A) na položaju 232 (K232A) (Winter in sod., 2002). Študije kažejo na povezavo med genom *DGAT1* in metabolizmom intramuskularne maščobe v mesu (Thaller in sod., 2003; Yuan in sod., 2013) in količino maščobe v mleku (Winter in sod., 2002). Pri alelu K pa je bil dokazan vpliv na vsebnost intramuskularne maščobe v dolgi hrbtni mišici goveda (Kong in sod., 2007) in na debelino podkožne maščobe (Curi in sod., 2011). Problem pri genu *DGAT1* je ravno v odsotnosti alela K v nekaterih populacijah (Karolyi in sod., 2012).

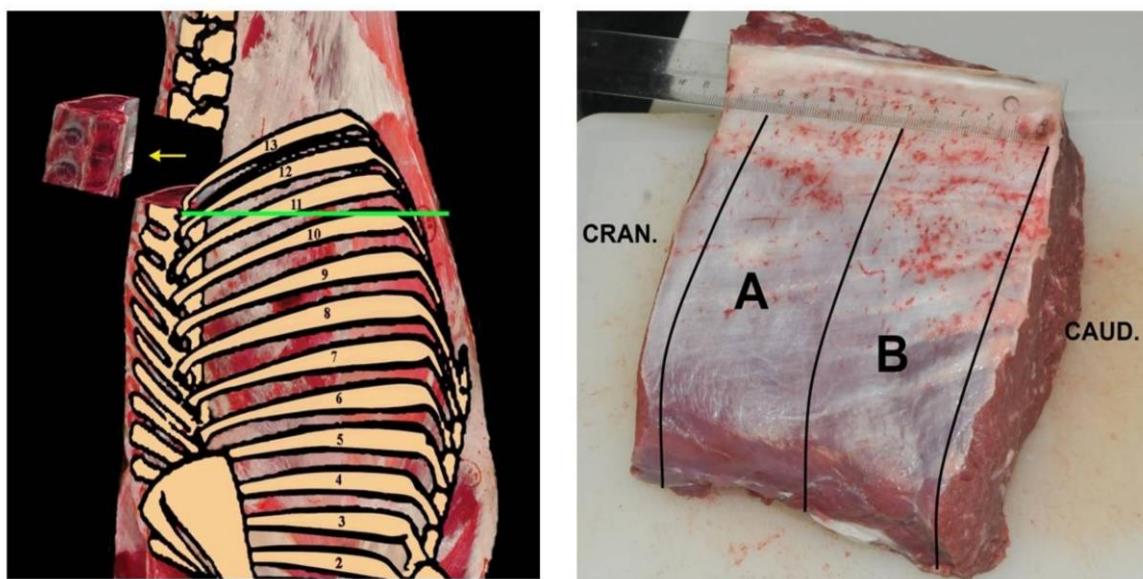
### 3 MATERIAL IN METODE DELA

#### 3.1 STRUKTURA PODATKOV

Analize smo izvedli na 116 vzorcih bikov iz preizkusa potomcev LS s preverjenim in potrjenim poreklom. Živali so bile potomci bikov v preizkušu, ki se uporablja za osemenjevanje, pri čemer je bilo vključenih od dva do pet potomcev po posameznem biku. Biki so bili vzrejeni v enakih razmerah reje v hlevih ŽIPO Lenart (ŽIPO živinoreja poljedelstvo Lenart, d. o. o.) v obdobju od leta 2010 do 2014. V zakol so šli v različno velikih skupinah, od 1 do 5 živali hkrati, med letoma 2011 in 2015. Povprečna starost bikov ob zakolu je bila  $541 \pm 34$  dni (od 447 do 629 dni). Povprečna masa toplih polovic (MTP) je bila  $410 \pm 35$  kg (od 319 do 518 kg).

#### 3.2 VZORČENJE MESA

Z identifikacijsko številko smo v klavnici pridobili podatke o MTP, mesnatosti in zamaščenosti po klasifikaciji EUROP. Na klavni liniji smo 2 dni po zakolu bikov klavni trup prerezali za zadnjim rebrom (slika 1). Za nadaljnje laboratorijske meritve smo v kavdalni smeri od omenjenega reza odvzeli približno 15 cm vzorec mišice longissimus dorsi (LD) skupaj s pripadajočimi kostmi in ostalimi tkivi. Na digitalnih fotografijah prereza smo ocenili marmoriranost LD na skali od 1 do 10, s programom LUCIA.NET 1.16.5 software (Laboratory Imaging, s. r. o.) pa določili debelino in površino mišice in pripadajočega maščobnega tkiva po metodiki, opisani v Škrlep in sod. (2013).



Slika 1: Prerez klavnega trupa in razrez mišice (Škrlep in sod., 2013)

Figure 1: Cross-section of a carcass and cutting muscles (Škrlep et al., 2013)

### 3.3 ANALIZE MESA

Vzorec mišice LD smo v laboratoriju izkostili in očistili površinske maščobe in vezivnega tkiva (slika 1). Mišico smo razdelili na dva enaka dela ( $2 \times 5 \text{ cm}$ ), od katerih smo na enem opravili meritve takoj, drugega pa smo stehtali in vakuumsko zapakirali ter ga na hladilniški temperaturi hrаниli dva tedna (slika 5). Pri vsakokratnih analizah (tako na sveži mišici kot po 2-tedenskem shranjevanju) smo  $5 \text{ cm}$  odsek mišice zopet razdelili na dva enaka dela ( $2 \times 2,5 \text{ cm}$ ), enega smo vakuumsko zapakirali in shranili v zamrzovalnik ter kasneje na njem opravili naslednje meritve:

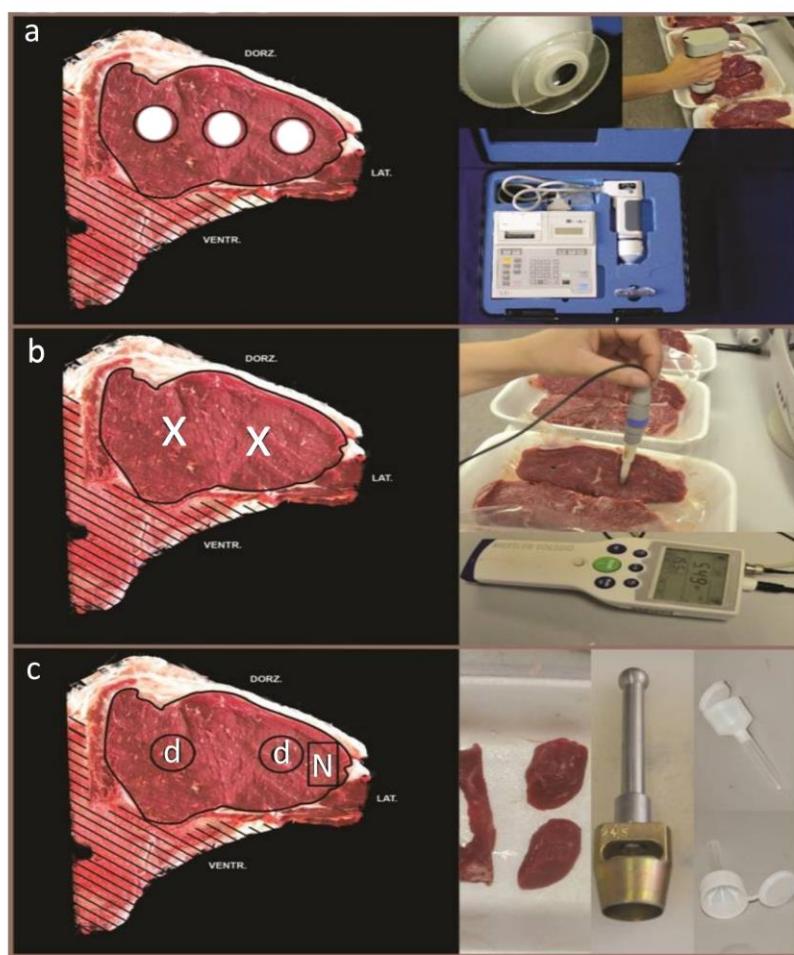
- izguba po odtaljevanju (čez noč smo vzorec odtalili v hladilniku, ga na grobo osušili s papirnato brisačo, stehtali in izračunali razliko v masi pred odtaljevanjem in po njem (Škrlep in sod., 2013));
- izguba mase pri kuhanju (v vzorec smo vstavili sondno termometra in ga dali v visok steklen kozarec. Te kozarce smo prestavili v vodno kopel in vzorce kuhalili, dokler temperatura mesa ni dosegla  $71^\circ\text{C}$ . Nato smo meso grobo osušili s papirnato brisačo, stehtali in izračunali razliko v masi pred in po kuhanju (Škrlep in sod., 2013));
- meritve strižne sile/trdote kuhanega mesa (slika 2). Po prej omenjenem postopku skuhane vzorce smo pokrili s polipropilensko folijo in jih čez noč ohladili v hladilniku. Nato smo s cilindričnih nožem (premer  $24,5 \text{ mm}$ ) izrezali tri vzorce v smeri poteka mišičnih vlaken in jih pustili pri sobni temperaturi eno uro. Strižno silo smo izmerili s pomočjo analizatorja tekture (TA Plus Texture Analyser, Ametek Lloyd Instruments Ltd), opremljenega s  $3 \text{ mm}$  debelim topim kovinskим rezilom z zarezo pod kotom  $60^\circ$  in obremenitveno celico z močjo  $500 \text{ N}$ . Hitrost rezila smo nastavili na  $3,33 \text{ mm/s}$  ( $20 \text{ cm/min}$ ), rezali pa smo pravokotno na potek mišičnih vlaken. Kot rezultat smo upoštevali največjo silo, izmerjeno med rezanjem.

Poleg meritve strižne trdote kuhanega mesa smo isto meritev opravili še pri surovem mesu po že prej opisanem postopku.



Slika 2: Merjenje trdote/strižne sile mesa (Škrlep in sod., 2013)

Figure 2: Measurement of tenderness/shear force of meat (Škrlep et al., 2013)



Slika 3: Prikaz analiz mesa – barva, pH in izceja po EZ (Škrlep in sod., 2013)

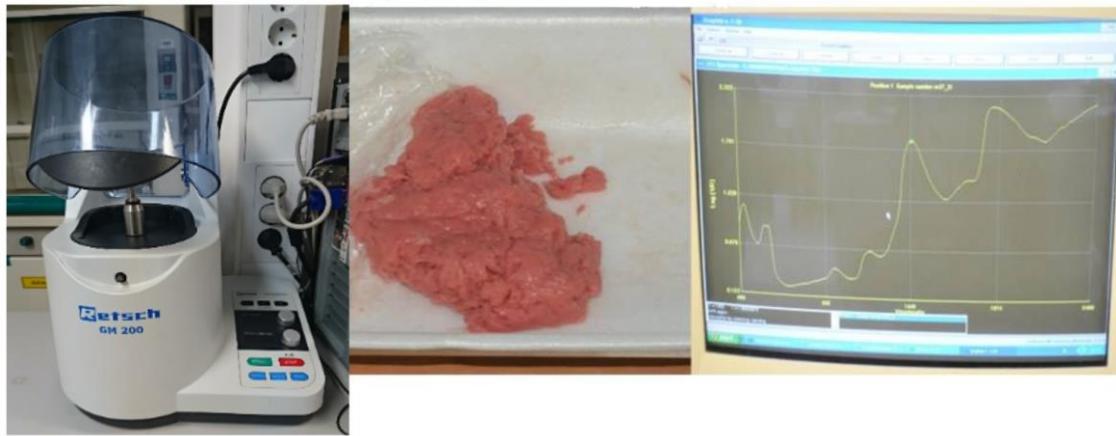
Figure 3: Presentation of meat analyses – color, pH and EZ driploss (Škrlep et al., 2013)

Na drugem delu vzorca mišice LD smo najprej na svežem rezu izmerili parametre barve L\*, a\* in b\* s spektrokolorimetrom Minolta chroma meter CR-300 (Minolta Co. Ltd), meritev pa smo ponavljali vsake 15 minut eno uro. Meritve so bile izvedene v treh ponovitvah (slika 3a).

Naslednja meritev je bila vrednost pH s pomočjo pH-metra MP120 (Mettler-Toledo GmbH), opremljenega z vbodno elektrodo. Vrednost pH smo zmerili v dveh ponovitvah in nato izračunali povprečje meritev (slika 3b).

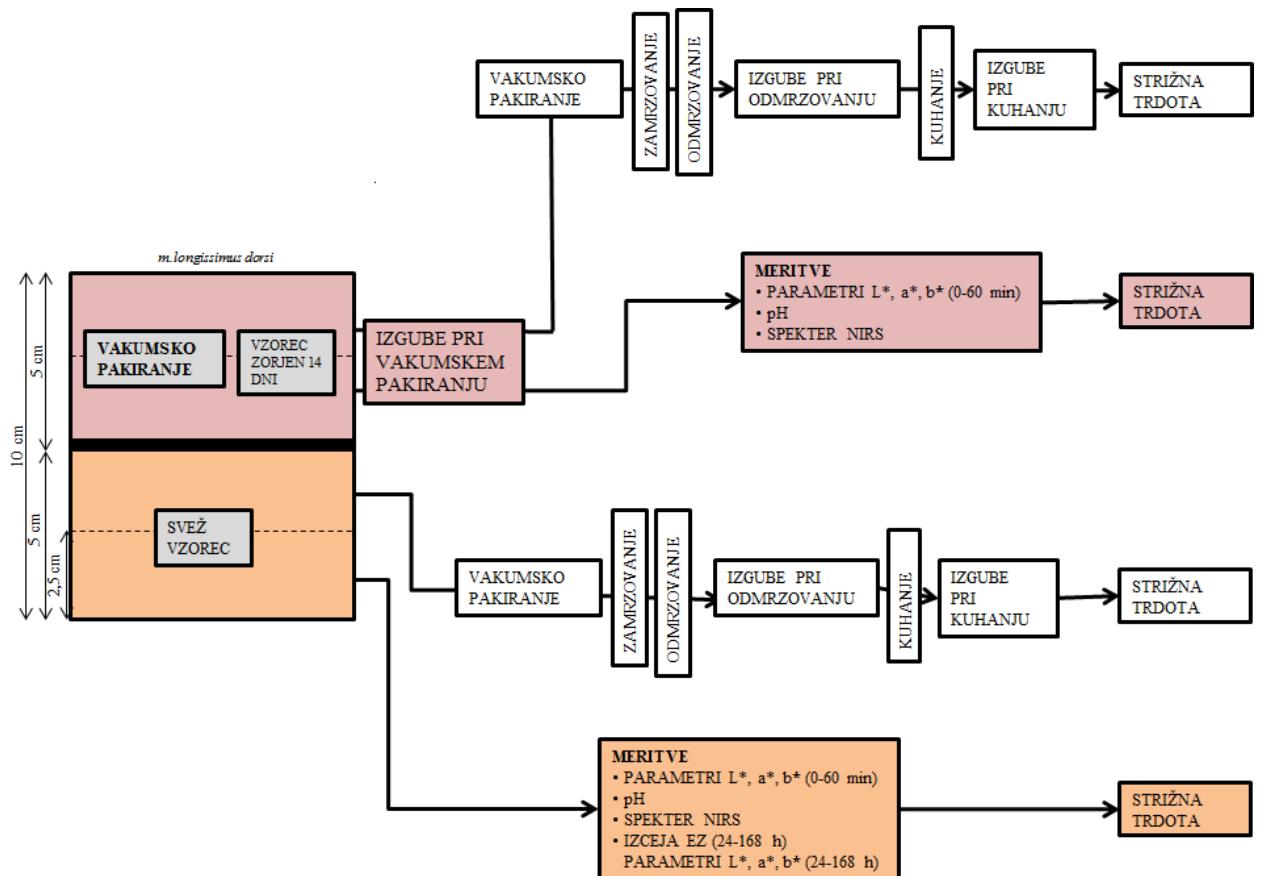
Poleg že omenjenih lastnosti, ki opisujejo sposobnost mesa za zadrževanje vode, smo ocenjevali še izgubo mesnega soka po metodi EZ (Christensen, 2003). Iz vzorca mišice smo s cilindričnih nožem premera 24,5 mm izrezali dva vzorca in ju shranili v posebne lijakaste posodice (slika 3c), ki so sestavljene iz dveh delov. V zgornji del smo dali stehtane vzorce, mesni sok, ki se izcedi, pa se je zbiral v spodnjem delu v epruveti podobni posodici. Po 24 h shranjevanja v hladilniku smo vzorce vzeli iz posodice, jih grobo osušili s papirnato brisačo in stehtali. Postopek smo ponavljali v dnevnih razmikih v obdobju enega tedna. Iz razlike med začetno in končno maso smo izračunali izgubo mesnega soka.

Za določanje kemične sestave smo vzorce zmleli v laboratorijskem mlinu Grindomix GM 200 (Retsch GmbH) pri 10.000 obratih/min 10 s. Na mletih vzorcih smo s pomočjo za to namenjenih posodic s stekleno steno posneli spekter NIR s pomočjo aparata NIR System model 6500 Spectrometer (NIR System Inc) na območju valovnih dolžin od 400 do 2500 nm. Iz spektralnih podatkov smo nato s pomočjo enačb, razvitih na Kmetijskem inštitutu Slovenije (Prevolnik in sod., 2005, 2010), napovedali kemično sestavo mesa (vsebnost intramuskularne maščobe, beljakovin, vode in razmerja beljakovine/voda). Iz absorbanc pri določenih valovnih dolžinah smo določili oksidativno stabilnost mišičnega pigmenta, in sicer smo izračunali vsebnost posameznih oksidacijskih oblik mioglobin (oksi-, deoksi- in met-mioglobin) po enačbi Kubelka-Munk, opisani v Osawa (1995). Omenjene meritve mišičnega pigmenta smo izvedli na mletih vzorcih. Izgubo po metodi EZ in spektrometrijo NIR smo delali samo na svežih vzorcih.



Slika 4: Priprava mesa in merjenje spektrometrije NIR (Škrlep in sod., 2013)

Figure 4: Preparation of meat and measuring the NIR spectrometry (Škrlep et al., 2013)



Slika 5: Shema poteka analiz mesa (Žabjek in sod., 2015)

Figure 5: Diagram of meat analyses (Žabjek et al., 2015)

### 3.4 GENETSKE ANALIZE

#### 3.4.1 Izolacija DNA

Izolacija DNA iz vzorcev tkiva je potekala s pomočjo kita QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Vzorec mesa v velikosti 5 x 5 mm smo dali v sterilno mikro epruveto ter mu dodali 180 µl ATL pufra in 20 µl proteinaze K. Mikro epruvete smo nato pretresli s pomočjo vibracijskega mešalnika (Lab dancer, IKA) in jih čez noč inkubirali v vodni kopeli na 56 °C. Naslednji dan smo vzeli mikro epruvete iz kopeli in jih na hitro scentrifugirali, pri čemer smo vsebino skoncentrirali na dnu epruvete (kapljice iz pokrovčka in sten padejo na dno). V mikro epruvete smo nato dodali 200 µl AL pufra, jih zmešali s pomočjo vibracijskega mešalnika in 10 min inkubirali v vodni kopeli na 70 °C. Po inkubaciji smo mikro epruvete ponovno hitro scentrifugirali in jim dodali še 200 µl etanola (96 %), vsebino zmešali z vibracijskim mešalnikom in jih še enkrat hitro scentrifugirali. Nato smo vsebino iz mikro epruvete previdno prelili v kolone (ang. *mini spin column*) in jih centrifugirali na 8000 rpm 1 min. Po centrifugiranju smo kolone prestavili v čiste 2 ml zbiralne epruvete, jim dodali 500 µl AW1 pufra in jih zopet centrifugirali na 8000 rpm 1 min. Po centrifugiranju smo kolone zopet prestavili v čiste 2 ml zbiralne epruvete, jim dodali še 500 µl AW2 in centrifugirali pri 14000 rpm 3 min. Na koncu smo v kolone dodali še 100 µl AE pufta in pustili stati na sobni temperaturi 10 min. Kolone smo prestavili v nove sterilne mikro epruvete in jih centrifugirali 1 min na 8000 rpm.

#### 3.4.2 Genotipizacija DNA

Za vsak vzorec smo naredili po 4 verižne reakcije s polimerazo (PCR) za *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *CAST*. Sestava reakcijske zmesi za PCR je navedena spodaj, v preglednici 1 pa so navedeni začetni oligonukleotidi, restrikcijski encimi in pogoji restrikcije (temperatura in čas inkubacije). Verižne reakcije s polimerazo smo naredili s SureCycler 8800 Thermal Cycler (Agilent Technologies), uporabljeni programi pa so opisani v preglednici 2.

Za vse verižne reakcije s polimerazo smo uporabili enako sestavo reakcijske zmesi. PCR reakcijska zmes za 20 µl reakcijo (*LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *CAST*) je sestavljena iz:

- 10 µl DreamTaq green PCR master mix (2x),
- 0,8 µl vsakega začetnega oligonukleotida (2 x 0,8 µl) (preglednica 1),
- 4 µl izolirane genomske DNA,
- 4,4 µl bidestilirane vode.

Za restriktijsko reakcijo smo zmešali:

- 2,0 µl pripadajočega pufra (preglednica 1),
- 0,3 µl restriktijskega encima (preglednica 1),
- 15 µl produkta PCR,
- 2,7 µl bdestilirane vode.

Agarozni gel (2 %):

- 180 µl 0,5x TBE pufer,
- 3,6 g agaroze,
- 2 µl EtBr (0,5 µl/ml).

Po obdelavi z restriktijskim encimom smo produkte PCR ločevali na 2 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom. Po končani elektroforezi smo gel dali v transiluminator (Syngene Gene Genius), ga fotografirali in nato iz slik (npr. slika 6) odčitali rezultate.

Reakcijska zmes PCR za 20 µl reakcijo (*DGAT1*) pa je sestavljena iz:

- 10 µl DreamTaq green PCR master mix (2x),
- 0,4 µl začetnega oligonukleotida 1 in 4 (preglednica 1),
- 1,6 µl začetnega oligonukleotida 2 in 3 (preglednica 1),
- 4 µl izolirane genomske DNA,
- 2 µl bdestilirane vode.

Za *DGAT1* smo uporabili postopek PCR s štirimi začetnimi oligonukleotidi (ARMS-PCR povzeto po Steinberg in sod., 2009). Produkte PCR smo prav tako ločevali s pomočjo gelske elektroforeze na 2 % agaroznem gelu z dodanim etidijevim bromidom in rezultate odčitali pod transiluminatorjem (slika 7).

Preglednica 1: Začetni oligonukleotidi in restrikcijski encimi  
Table 1: Primer sequences and restrictions enzymes

Gen	Začetni oligonukleotidi *	Restrikcijski encim **	Vir
<i>LEP</i>	5'-tgg agt ggc ttg tta ttt tct tct-3'; 5'-gtc ccc gct tct ggc tac cta act-3';	<i>Bsp143I (Sau3AI)</i> 10x Buffer <i>Bsp143I</i> ( <i>Sau3AI</i> ) (37 °C, čez noč)	Moravčíková in sod., 2012; Othman in sod., 2011
<i>SCD1</i>	5'-ccc att cgc tct tgt tct gt-3'; 5'-cgt ggt ctt gct gtc gac t-3';	<i>NcoI</i> Tango buffer (37 °C, čez noč)	Taghizadeh in sod., 2014
<i>CAPN1</i>	5'-ttc agg cca atc tcc ccg acg-3'; 5'-gat gtt gaa ctc cac cag gcc cag-3';	<i>FokI (BseGI (BtsCI))</i> Tango buffer (55 °C, čez noč)	Othman in sod., 2011
<i>CAST</i>	5'-tgg ggc cca atg acg cca tcg atg-3'; 5'-ggg gga gca gca ctt ctg atc acc-3';	<i>AluI</i> Tango buffer (37 °C, čez noč)	Juszczuk-Kubiak in sod., 2004
<i>DGAT1</i>	5'-gtc aac ctc tgg tgc cga gag-3' (1); 5'-agc tcc ccc gtt ggc cgc-3' (2); 5'-tcg tag ctt tgg cag gta aga a-3' (3); 5'-cac ctg gag ctg ggt gag gaa-3' (4);	/	Steinberg in sod., 2009

\*Proizvajalec začetnih oligonukleotidov je Sigma–Aldrich.

\*\*Proizvajalec restrikcijskih encimov in pripadajočih pufrov je Thermo Scientific.

Preglednica 2: Verižna reakcija s polimerazo

Table 2: Polymerase chain reaction

Gen	1. korak	2. korak			3. korak	4. korak
		Število ciklov				
<i>DGAT1</i>	94 °C, 5 min	30 ciklov			72 °C, 5 min	4 °C
		94 °C, 30 s	65 °C, 30 s	72 °C, 30 s		
<i>LEP</i>	94 °C, 5 min	30 ciklov			72 °C, 7 min	4 °C
		94 °C, 30 s	55 °C, 20 s	72 °C, 30 s		
<i>SCD1</i>	94 °C, 5 min	30 ciklov			72 °C, 5 min	4 °C
		94 °C, 30 s	59 °C, 30 s	72 °C, 30 s		
<i>CAPN1</i>	94 °C, 5 min	30 ciklov			72 °C, 5 min	4 °C
		94 °C, 1 min	62 °C, 2 min	72 °C, 2 min		
<i>CAST</i>	94 °C, 5 min	30 ciklov			72 °C, 5 min	4 °C
		94 °C, 30 s	59 °C, 30 s	72 °C, 30 s		

### 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA

Podatke smo statistično obdelali s statističnim programskim paketom SAS/STAT (2011). Najprej smo izračunali frekvenco genotipov in alelov s postopkom FREQ. Hardy-Weinbergovo ravnotežje smo preverili s programom PLINK 1.9 (Chang in sod., 2015).

Nato smo pri obdelavi podatkov uporabili statistični model in postopek GLM (model 1). Ta model smo uporabili za lastnosti: debelina maščobe nad LD, površina maščobe nad LD, marmoriranost, kemična sestava mesa (IMM, beljakovine, voda in razmerje med beljakovinami in vodo), oblika mioglobina, pH, trdota mesa in sposobnost vezave vode (izguba soka zorenega mesa po kuhanju in po odtaljevanju ter izguba po 2 tednih v vakuumu). Za izgubo soka pri svežem mesu po kuhanju in po odtaljevanju smo modelu dodali še starost živali ob zakolu, pri debelini mišice LD in površini mišice LD pa smo v model dodali MTP (model 2). Za izgubo mesnega soka, merjenega vsak dan v obdobju enega tedna, in barvo mesa smo uporabili model s postopkom MIXED, kjer smo poleg genov opazovali tudi vpliv mesta merjenja in časovno obdobje (model 3).

$$y_{ijklmn} = \mu + C_i + K_j + L_k + S_l + D_m + e_{ijklmn} \quad (1)$$

$$y_{ijklmn} = \mu + C_i + K_j + L_k + S_l + D_m + b(\bar{x}_{ijklm} - \bar{x}) + e_{ijklmn} \quad (2)$$

$$y_{ijklmno} = \mu + C_i + K_j + L_k + S_l + D_m + M_n + T_o + MT_{no} + v_{ijklm} + e_{ijklmno} \quad (3)$$

$y_{ijklmno}$  = lastnosti kakovosti mesa (debelina mišice LD, debelina maščobe nad LD, površina mišice LD, površina maščobe nad LD, marmoriranost, kemična sestava mesa (IMM, beljakovine, voda in razmerje med beljakovinami in vodo), oblike mioglobina, pH, trdota mesa, sposobnost vezave vode in barva mesa)

$\mu$  = srednja vrednost

$C_i$  = vpliv gena *CAST* (i = CC, CG, GG)

$K_j$  = vpliv gena *CAPN1* (j = TT, CT, CC)

$L_k$  = vpliv gena *LEP* (k = AA, AB, BB)

$S_l$  = vpliv gena *SCD1* (l = AA, AV, VV)

$D_m$  = vpliv gena *DGAT1* (m = AA, AK)

$b$  = linearni regresijski koeficient

$x_{ijklm}$  = neodvisna spremenljivka (starost ob zakolu ali MTP)

$\bar{x}$  = konstanta (povprečje neodvisne spremenljivke)

$M_n$  = mesto meritve oz. ponovitev meritve ( $n = 1, 2, 3$ )

$T_o$  = čas ( $o = 0, 15, 30, 45$  in  $60$  min oz. pri tedenskem merjenju je dan od  $0$  do  $7$  dni)

$MT_{no}$  = interakcija med ponovitvijo in časom

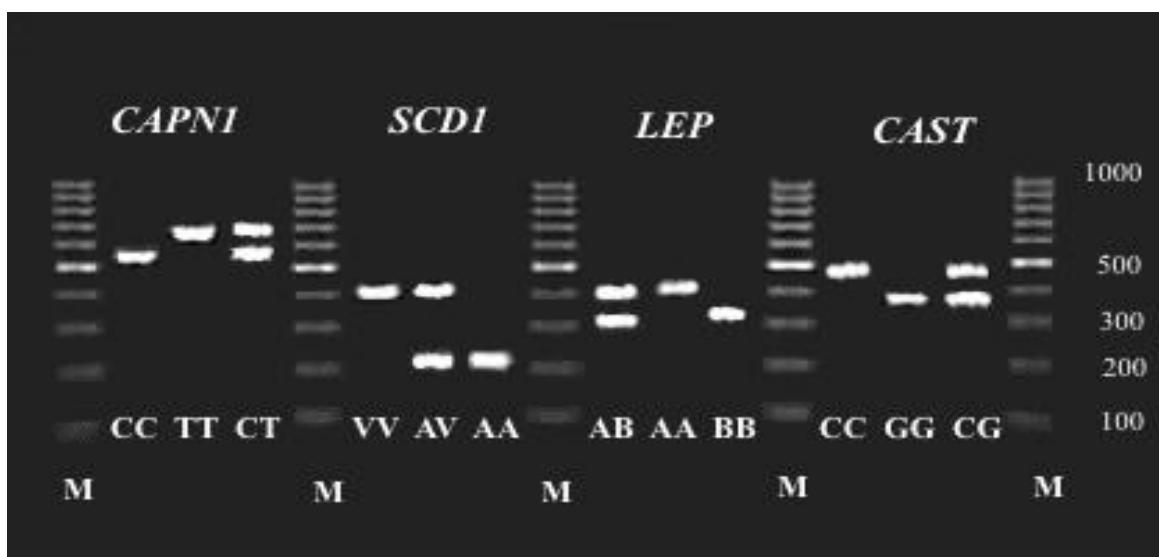
$v_{ijklm}$  = naključni vpliv vzorca oz. žival (število živali = 116)

$e_{ijklmn}, e_{ijklmno}$  = naključna napaka

## 4 REZULTATI

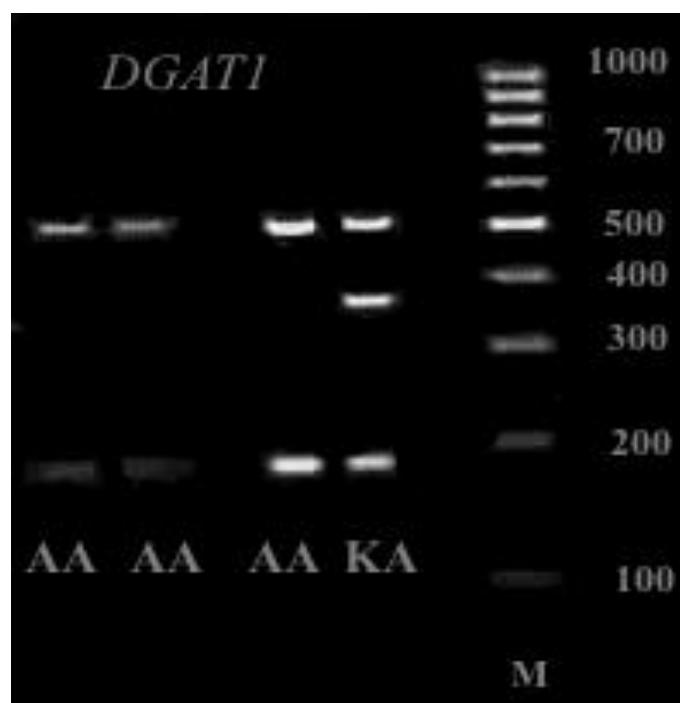
### 4.1 FREKVENCE GENOV

Genotipi na genu *CAST* so CC (fragment 474 bp), CG (fragmenta 324 in 474 bp) in GG (fragment 324 bp). Pri *LEP* so genotipi AA (fragment 390 bp), AB (fragmenta 390 in 303 bp) in BB (fragment 303 bp). *SCDI* ima genotipe AA (fragment 200 bp), AV (fragmenta 200 in 400 bp) in VV (fragment 400 bp). Genotipi pri *CAPN1* so CC (fragment 530 bp), CT (fragmenta 670 in 530 bp) in TT (fragment 670 bp) (slika 6). Pri *DGAT1* smo dobili samo dva genotipa, in sicer AA (181 bp) in KA (369 in 181 bp) (slika 7). Nato smo izračunali frekvence genotipov in alel (preglednica 3) pri posameznem genskem označevalcu. Ugotovili smo, da je pri *DGAT1* kar 94 % preiskovanih živali homozigotov AA in samo 6 % heterozigotov KA, medtem ko homozigotov KK v vzorčeni populaciji bikov sploh ni. Pri testiranju Hardy-Weinbergovega zakona smo ugotovili, da so vsi genetski označevalci v Hardy-Weinbergovem ravnotežju ( $p > 0,05$ ).



Slika 6: Primer genotipizacije *LEP*, *SCDI*, *CAPN1* in *CAST*. M je lestvica 1000 bp

Figure 6: Example of genotyping *LEP*, *SCDI*, *CAPN1* and *CAST*. M is DNA ladder 1000 bp



Slika 7: Primer genotipizacije DGAT1. M je lestvica od 100 do 1000 bp

Figure 7: Example of genotyping DGAT1. M is DNA ladder 1000 bp

Preglednica 3: Frekvence (število) genotipov in alelov *CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *DGAT1*  
Table 3: Genotype and allele frequencies (number) of *CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* and *DGAT1*

Gen	Genotip Frekvence (Število)			Alel Frekvence		HWE <i>p</i>
	CC	CG	GG	C	G	
<i>CAST</i>	0,22 (25)	0,42 (49)	0,36 (42)	0,43	0,57	0,1104
<i>CAPN1</i>	CC 0,06 (7)	CT 0,36 (42)	TT 0,58 (67)	C 0,24	T 0,76	0,9022
<i>SCD1</i>	AA 0,32 (37)	AV 0,46 (53)	VV 0,22 (26)	A 0,55	V 0,45	0,4028
<i>LEP</i>	AA 0,62 (72)	AB 0,35 (41)	BB 0,03 (3)	A 0,80	B 0,20	0,3228
<i>DGAT1</i>	AA 0,94 (109)	KA 0,06 (7)	KK 0,00 (0)	A 0,97	K 0,03	0,5445

HWE – Hardy-Weinbergovo ravnotežje.

## 4.2 KLAVNE LASTNOSTI

Pri klavnih lastnostih smo ugotovili, da na površino mišice ne vpliva noben gen (preglednica 4), pri debelini mišice pa se je nakazal vpliv pri genih *SCD1* ( $p = 0,0665$ ) in *DGAT1* ( $p = 0,0746$ ). Pri debelini maščobe smo ugotovili težno gena *SCD1* ( $p = 0,0965$ ). *LEP* vpliva na površino maščobe ( $p = 0,0291$ ), pri čemer je imel genotip BB 33 % večjo površino kot genotip AB in 25 % večjo kot genotip AA. Pri genu *DGAT1* smo ugotovili, da se nakazujejo razlike pri površini maščobe ( $p = 0,0712$ ), pri marmoriranosti pa gena *CAST* ( $p = 0,0936$ ) in vpliv gena *SCD1* ( $p = 0,0005$ ). Genotip AA je imel več kot 20 % manjšo marmoriranost kot genotipa AV in VV.

Preglednica 4: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na klavne lastnosti  
Table 4: Least square means and standard errors for effect of genes on carcass traits

Lastnosti	Debelina mišice LD <sup>2</sup> (cm)	Debelina maščobe nad LD (cm)	Površina mišice LD <sup>2</sup> (cm <sup>2</sup> )	Površina maščobe nad LD (cm <sup>2</sup> )	Marmoriranost
N	116	116	116	116	116
R <sup>2</sup> (%)	28,4	5,6	39,2	12,1	20,2
<i>CAST</i>	CC CG GG	7,78 ± 0,24 8,06 ± 0,22 7,87 ± 0,22	0,71 ± 0,11 0,75 ± 0,10 0,72 ± 0,10	105,1 ± 0,8 106,1 ± 2,6 104,4 ± 2,5	18,1 ± 1,7 19,7 ± 1,5 18,5 ± 1,5
	<i>p</i>	0,2160	0,8302	0,6245	0,0936
<i>CAPN1</i>	CC CT TT	7,55 ± 0,32 8,01 ± 0,21 8,16 ± 0,20	0,73 ± 0,14 0,72 ± 0,10 0,72 ± 0,09	105,7 ± 3,7 104,3 ± 2,5 105,6 ± 2,4	18,4 ± 2,2 19,1 ± 1,5 18,8 ± 1,4
	<i>p</i>	0,0782	0,9940	0,7164	0,4064
<i>LEP</i>	AA AB BB	7,70 ± 0,16 7,92 ± 0,18 8,09 ± 0,45	0,70 ± 0,07 0,64 ± 0,08 0,84 ± 0,20	102,1 ± 1,8 103,6 ± 2,1 110,0 ± 5,2	17,4 <sup>a</sup> ± 1,1 15,7 <sup>a</sup> ± 1,3 23,2 <sup>b</sup> ± 3,1
	<i>p</i>	0,2272	0,4969	0,2035	0,0291
<i>SCD1</i>	AA AV VV	8,09 ± 0,22 7,72 ± 0,24 7,90 ± 0,23	0,63 ± 0,10 0,77 ± 0,11 0,78 ± 0,11	104,9 ± 2,5 103,9 ± 2,7 106,8 ± 2,7	17,9 ± 1,5 19,0 ± 1,6 19,4 ± 1,6
	<i>p</i>	0,0665	0,0965	0,3156	0,0005
<i>DGAT1</i>	AA AK	8,16 ± 0,17 7,65 ± 0,31	0,68 ± 0,08 0,77 ± 0,14	106,3 ± 1,9 104,1 ± 3,6	17,0 ± 1,2 20,6 ± 2,2
	<i>p</i>	0,0746	0,4907	0,4899	0,0712
MTP		< 0,0001	/	< 0,0001	/

<sup>2</sup> – model 2; vrednosti, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3 KEMIČNA SESTAVA, VSEBNOST MIOGLOBINA IN pH VREDNOST

Pri kemični sestavi mesa smo ugotovili, da na IMM ne vpliva noben od preiskovanih genov. *LEP* je vplival na delež beljakovin ( $p = 0,0324$ ) in razmerje med beljakovinami in vodo ( $p = 0,0343$ ). Genotip AA je imel za 1 % manj beljakovin kot genotipa AB in BB. Gen *CAST* vpliva na delež vode ( $p = 0,0387$ ). Meso živali genotipa GG je imelo značilno manjši delež vode kot meso genotipa CC. Pri oblikah mioglobina (preglednica 6) smo ugotovili vpliv samo pri  $\text{MMb}^{3+}$ . Nanj je vplival gen *LEP* ( $p = 0,0466$ ), kjer je imel genotip AA največjo vsebnost  $\text{MMb}^{3+}$  (38,18 %), genotip AB pa najmanjšo (37,79 %). Na pH ni vplival noben gen.

Preglednica 5: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na kemično sestavo mesa  
Table 5: Effect of genes on chemical composition of meat

Lastnosti		IMM, %	Beljakovine, %	Voda, %	Razmerje beljakovine voda
N	100	100	100	100	100
$R^2(\%)$	9,2	13,7	9,9	13,0	
<i>CAST</i>	CC	$2,0 \pm 0,4$	$22,22 \pm 0,2$	<b><math>74,6^b \pm 0,4</math></b>	$3,43 \pm 0,03$
	CG	$2,6 \pm 0,4$	$22,16 \pm 0,2$	<b><math>74,2^{ab} \pm 0,3</math></b>	$3,43 \pm 0,03$
	GG	$2,7 \pm 0,4$	$22,16 \pm 0,2$	<b><math>73,9^a \pm 0,3</math></b>	$3,42 \pm 0,02$
	<i>p</i>	0,1212	0,7440	<b>0,0387</b>	0,9235
<i>CAPN1</i>	CC	$2,2 \pm 0,7$	$22,18 \pm 0,3$	$74,3 \pm 0,5$	$3,43 \pm 0,04$
	CT	$2,5 \pm 0,4$	$22,25 \pm 0,2$	$74,1 \pm 0,3$	$3,40 \pm 0,02$
	TT	$2,6 \pm 0,4$	$22,16 \pm 0,2$	$74,2 \pm 0,3$	$3,41 \pm 0,02$
	<i>p</i>	0,8238	0,7033	0,9392	0,5622
<i>LEP</i>	AA	$2,7 \pm 0,3$	<b><math>21,88^a \pm 0,2</math></b>	$74,2 \pm 0,3$	<b><math>3,46^a \pm 0,02</math></b>
	AB	$2,5 \pm 0,3$	<b><math>22,10^b \pm 0,2</math></b>	$74,2 \pm 0,3$	<b><math>3,43^b \pm 0,02</math></b>
	BB	$2,1 \pm 0,8$	<b><math>22,61^b \pm 0,4</math></b>	$74,2 \pm 0,6$	<b><math>3,37^b \pm 0,05</math></b>
	<i>p</i>	0,5116	<b>0,0324</b>	0,9903	<b>0,0343</b>
<i>SCDI</i>	AA	$2,3 \pm 0,4$	$22,35 \pm 0,2$	$74,1 \pm 0,3$	$3,40 \pm 0,02$
	AV	$2,6 \pm 0,4$	$22,08 \pm 0,2$	$74,4 \pm 0,3$	$3,43 \pm 0,02$
	VV	$2,4 \pm 0,4$	$22,16 \pm 0,2$	$74,1 \pm 0,4$	$3,42 \pm 0,03$
	<i>p</i>	0,7228	0,1412	0,4219	0,2119
<i>DGAT1</i>	AA	$2,8 \pm 0,3$	$22,09 \pm 0,2$	$74,0 \pm 0,3$	$3,43 \pm 0,02$
	AK	$2,1 \pm 0,6$	$22,30 \pm 0,3$	$74,4 \pm 0,5$	$3,40 \pm 0,03$
	<i>p</i>	0,2325	0,3879	0,2690	0,2708

Vrednosti, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

Preglednica 6: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na oblike mioglobina in pH  
 Table 6: Least square means and standard errors for effect of genes on myoglobin oxidative forms and pH

Lastnosti	Oblike mioglobina			pH – 48 ur po zakolu	pH – po zorenju (14 dni)
	Mb <sup>2+</sup> (%)	OMb <sup>2+</sup> (%)	MMb <sup>3+</sup> (%)		
N	116	116	116	114	114
R <sup>2</sup> (%)	5,2	8,1	8,7	2,0	3,8
<i>CAST</i>	CC	46,17 ± 0,45	16,13 ± 0,48	38,06 ± 0,26	5,51 ± 0,03
	CG	46,01 ± 0,41	16,57 ± 0,44	37,89 ± 0,24	5,50 ± 0,03
	GG	46,06 ± 0,40	16,58 ± 0,42	37,89 ± 0,23	5,49 ± 0,03
	p	0,8813	0,3603	0,5682	0,6963
<i>CAPN1</i>	CC	46,01 ± 0,59	16,60 ± 0,63	37,94 ± 0,34	5,51 ± 0,05
	CT	46,20 ± 0,39	16,19 ± 0,42	38,00 ± 0,23	5,50 ± 0,03
	TT	46,03 ± 0,38	16,50 ± 0,40	37,87 ± 0,22	5,49 ± 0,03
	p	0,7580	0,4952	0,7851	0,7609
<i>LEP</i>	AA	45,78 ± 0,30	16,55 ± 0,32	<b>38,18<sup>a</sup> ± 0,17</b>	5,50 ± 0,02
	AB	45,58 ± 0,33	17,00 ± 0,35	<b>37,79<sup>b</sup> ± 0,91</b>	5,49 ± 0,03
	BB	46,88 ± 0,82	15,74 ± 0,87	<b>37,84<sup>ab</sup> ± 0,47</b>	5,52 ± 0,06
	p	0,2533	0,1551	<b>0,0466</b>	0,7510
<i>SCD1</i>	AA	45,88 ± 0,40	16,66 ± 0,43	37,80 ± 0,23	5,49 ± 0,03
	AV	46,03 ± 0,43	16,54 ± 0,46	37,89 ± 0,25	5,51 ± 0,03
	VV	46,33 ± 0,43	16,08 ± 0,46	38,13 ± 0,25	5,51 ± 0,03
	p	0,4064	0,2419	0,2325	0,6530
<i>DGAT1</i>	AA	45,89 ± 0,31	16,58 ± 0,33	37,84 ± 0,18	5,51 ± 0,02
	AK	46,27 ± 0,58	16,28 ± 0,61	38,04 ± 0,33	5,49 ± 0,04
	p	0,4767	0,5927	0,4904	0,7011
					0,4398

Vrednosti, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4 SPOSOBNOST ZA VEZAVO VODE

Pri genu *LEP* smo ugotovili, da nakazuje vpliv na sposobnosti za vezavo vode ( $p = 0,0663$ ) pri izgubi po odtaljevanju zorenega mesa (preglednica 7) in pri izgubi EZ (preglednica 8). Ostali geni niso imeli vpliva na meritve za sposobnost vezave vode.

Preglednica 7: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na sposobnost za vezanje vode – izguba po kuhanju in shranjevanju v vakuumski embalaži

Table 7: Least square means and standard errors for effect of genes on water holding capacity – after cooking and storing in vacuum package

Lastnosti		Izguba		
		Po kuhanju, svež (%) <sup>2</sup>	Po kuhanju, zoren 2 tedna (%)	Po 2 tednih v vakuumski embalaži (%)
N		116	115	113
R <sup>2</sup> (%)		6,8	6,8	7,8
<i>CAST</i>	CC	29,67 ± 1,86	38,27 ± 2,72	3,56 ± 0,60
	CG	30,79 ± 1,69	37,19 ± 2,45	3,36 ± 0,54
	GG	30,80 ± 1,63	35,49 ± 2,38	3,41 ± 0,53
	p	0,6551	0,3580	0,9049
<i>CAPN1</i>	CC	30,00 ± 2,41	38,43 ± 3,51	4,07 ± 0,77
	CT	30,53 ± 1,60	36,03 ± 2,35	2,91 ± 0,52
	TT	30,73 ± 1,55	36,49 ± 2,27	3,34 ± 0,50
	p	0,9363	0,7494	0,1941
<i>LEP</i>	AA	29,50 ± 1,23	35,17 ± 1,79	3,93 ± 0,40
	AB	30,15 ± 1,37	33,87 ± 1,99	3,87 ± 0,44
	BB	31,61 ± 3,36	41,90 ± 4,89	2,52 ± 1,08
	p	0,6892	0,2267	0,3948
<i>SCDI</i>	AA	30,59 ± 1,67	36,86 ± 2,41	3,70 ± 0,53
	AV	30,93 ± 1,76	37,99 ± 2,58	3,45 ± 0,57
	VV	29,75 ± 1,77	36,10 ± 2,58	3,18 ± 0,57
	p	0,6571	0,5805	0,5286
<i>DGAT1</i>	AA	31,98 ± 1,27	34,76 ± 1,85	3,22 ± 0,41
	AK	28,87 ± 2,36	39,20 ± 3,44	3,65 ± 0,76
	p	0,1526	0,1605	0,5385
Starost		0,0753	/	/

<sup>2</sup> – model 2; vrednosti, označene z različnimi črkami, se med seboj statistično značilno razlikujejo ( $p < 0,05$ ).

Preglednica 8: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na sposobnost za vezanje vode – izguba pri odtaljevanju in izceji EZ

Table 8: Least square means and standard errors for effect of genes on water holding capacity – thawing loss and EZ drip loss method

Lastnosti	Izguba			
	Odtaljevanje, svež (%) <sup>2</sup>	Odtaljevanje, zoren 2 tedna (%)	Izceja EZ (%) <sup>3</sup>	
N	110	103	888	
R <sup>2</sup> (%)	13,0	6,7	/	
<i>CAST</i>	CC CG GG	7,73 ± 0,93 6,61 ± 0,85 6,65 ± 0,82	5,05 ± 0,52 5,06 ± 0,47 5,31 ± 0,45	3,25 ± 0,40 3,07 ± 0,36 2,83 ± 0,35
	<i>p</i>	0,2150	0,7221	0,3463
<i>CAPN1</i>	CC CT TT	6,49 ± 1,28 7,47 ± 0,81 7,02 ± 0,79	4,77 ± 0,69 5,34 ± 0,44 5,31 ± 0,43	3,51 ± 0,52 2,82 ± 0,34 2,81 ± 0,33
	<i>p</i>	0,5775	0,6779	0,3093
<i>LEP</i>	AA AB BB	6,45 ± 0,63 7,42 ± 0,70 7,11 ± 1,68	5,26 ± 0,34 5,90 ± 0,38 4,26 ± 0,93	3,43 ± 0,26 2,94 ± 0,30 2,77 ± 0,71
	<i>p</i>	0,2386	0,0663	0,0854
<i>SCDI</i>	AA AV VV	7,26 ± 0,83 7,38 ± 0,89 6,34 ± 0,89	5,33 ± 0,46 4,99 ± 0,49 5,10 ± 0,49	3,16 ± 0,35 3,03 ± 0,38 2,95 ± 0,38
	<i>p</i>	0,2561	0,6371	0,7690
<i>DGAT1</i>	AA AK	7,03 ± 0,66 6,96 ± 1,20	4,98 ± 0,36 5,30 ± 0,65	2,85 ± 0,27 3,24 ± 0,50
	<i>p</i>	0,9456	0,6000	0,3923
Starost		0,0355	/	/
Čas		/	/	<0,0001
Mesto meritve		/	/	0,3585
Čas*mesto meritve		/	/	0,6076

<sup>2</sup> – model 2; <sup>3</sup> – model 3

#### 4.5 TRDOTA MESA

Pri trdoti mesa smo ugotovili, da noben od preiskovanih genov ne vpliva na trdoto mesa (preglednica 9).

Preglednica 9: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na strižno trdoto mesa po Warner-Bratzlerju

Table 9: Least square means and standard errors for effect of genes on Warner-Bratzler shear force

Lastnosti	Strižna trdotna mesa po Warner-Bratzlerju (N)				
	Kuhan, svež vzorec (N)	Kuhan, 2 tedna zoren vzorec (N)	Surov, svež vzorec (N)	Surov, 2 tedna zoren vzorec (N)	
N	100	100	96	94	
R <sup>2</sup> (%)	7,3	6,9	6,9	5,0	
<i>CAST</i>	CC CG GG	216,4 ± 20,4 192,7 ± 18,5 192,5 ± 17,9	149,6 ± 15,1 146,3 ± 13,7 152,5 ± 13,1	64,4 ± 4,7 61,7 ± 4,3 62,0 ± 4,1	60,5 ± 4,4 57,6 ± 4,0 58,6 ± 4,0
	p	0,2028	0,8057	0,6986	0,6389
<i>CAPN1</i>	CC CT TT	174,0 ± 26,4 213,6 ± 17,6 213,9 ± 17,0	135,6 ± 22,3 161,8 ± 12,8 152,0 ± 12,2	65,5 ± 6,9 61,7 ± 4,0 60,9 ± 3,8	57,55 ± 7,15 59,75 ± 3,74 59,35 ± 3,54
	p	0,2261	0,3546	0,7727	0,9410
<i>LEP</i>	AA AB BB	209,8 ± 13,5 206,4 ± 15,0 185,3 ± 37,0	139,8 ± 10,7 145,3 ± 11,2 163,2 ± 25,8	66,4 ± 3,3 60,9 ± 3,4 60,9 ± 8,0	59,91 ± 3,25 62,26 ± 3,39 54,48 ± 7,47
	p	0,7617	0,5442	0,1338	0,4589
<i>SCD1</i>	AA AV VV	203,9 ± 18,1 193,6 ± 19,4 204,0 ± 19,4	144,4 ± 13,0 145,5 ± 14,1 158,5 ± 15,1	62,9 ± 4,0 63,8 ± 4,4 61,5 ± 4,7	57,38 ± 3,80 59,52 ± 4,21 59,75 ± 4,49
	p	0,6508	0,3879	0,7689	0,7151
<i>DGAT1</i>	AA AK	189,2 ± 13,9 211,8 ± 25,9	142,5 ± 10,7 156,4 ± 19,2	64,4 ± 3,3 61,0 ± 5,9	59,61 ± 3,26 58,16 ± 5,56
	p	0,3402	0,4413	0,5417	0,7775

#### 4.6 BARVA MESA

Ugotovili smo, da geni *CAST*, *CAPN1* in *LEP* na barvo mesa nimajo vpliva. Vpliv pa imata *SCD1* in *DGAT1*. *SCD1* značilno vpliva na barvni parameter a\* ( $p = 0,0006$ ) in b\* ( $p = 0,0132$ ) ter nakazuje vpliv na barvni parameter L\* ( $p = 0,0511$ ) pri barvi, merjeni na svežem vzorcu eno uro v intervalih po 15 min (preglednica 10). Oba parametra sta imela najvišje vrednosti pri genotipu AA, a\* je bil najnižji pri genotipu AV, b\* pa pri genotipu VV. Pri genu *DGAT1* smo ugotovili, da nakazuje vpliv na barvni parameter a\* ( $p = 0,0871$ ), vpliva pa na barvni parameter b\* ( $p = 0,0318$ ) pri barvi, merjeni na svežem vzorcu. Pri vseh teh meritvah pri genu *DGAT1* so bile vrednosti pri genotipu AK večje kot pri genotipu AA. Pri barvi, merjeni na zorenem vzorcu eno uro v intervalih po 15 min (preglednica 11), in pri barvi, merjeni vsak dan v obdobju enega tedna (preglednica 12), ni bilo razlik.

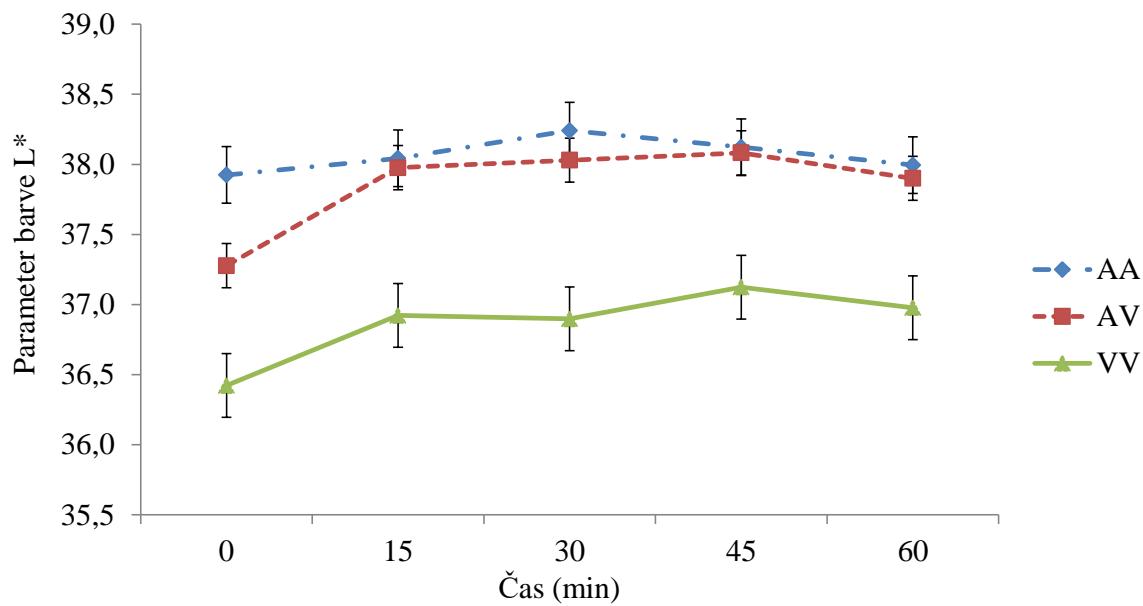
Preglednica 10: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na parametre barve L\*, a\*, b\* na svežem mesu 1 uro vsakih 15 min

Table 10: Least square means and standard errors for effect of genes on L\* a\* b\* color parameters measured on fresh meat for 1 hour every 15 min

Lastnosti		L* <sup>3</sup>	a* <sup>3</sup>	b* <sup>3</sup>
N		1500	1500	1500
<i>CAST</i>	CC	37,80 ± 0,68	20,01 ± 0,52	6,88 ± 0,35
	CG	38,30 ± 0,62	19,62 ± 0,47	6,75 ± 0,31
	GG	38,35 ± 0,59	20,38 ± 0,45	7,01 ± 0,30
<i>p</i>		0,4844	0,0637	0,4804
<i>CAPN1</i>	CC	38,64 ± 1,01	20,21 ± 0,37	6,98 ± 0,25
	CT	37,97 ± 0,58	19,97 ± 0,38	6,75 ± 0,26
	TT	37,84 ± 0,55	19,84 ± 0,89	6,92 ± 0,59
<i>p</i>		0,6895	0,7960	0,6725
<i>LEP</i>	AA	37,75 ± 0,48	20,79 ± 0,44	7,27 ± 0,30
	AB	37,91 ± 0,50	19,96 ± 0,48	6,88 ± 0,32
	BB	38,79 ± 1,16	19,27 ± 0,52	6,49 ± 0,35
<i>p</i>		0,5954	0,6844	0,5189
<i>SCD1</i>	AA	38,59 ± 0,58	20,13 ± 0,76	7,07 ± 0,51
	AV	38,44 ± 0,64	19,86 ± 0,44	6,85 ± 0,29
	VV	37,43 ± 0,68	20,03 ± 0,42	6,73 ± 0,28
<i>p</i>		0,0511	0,0006	0,0132
<i>DGAT1</i>	AA	38,06 ± 0,48	19,48 ± 0,37	6,44 ± 0,24
	AK	38,24 ± 0,86	20,53 ± 0,66	7,32 ± 0,44
<i>p</i>		0,8267	0,0871	0,0318
Čas		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Mesto meritve		< 0,0001	0,1209	0,3537
Čas*mesto meritve		0,5421	0,1480	0,0190

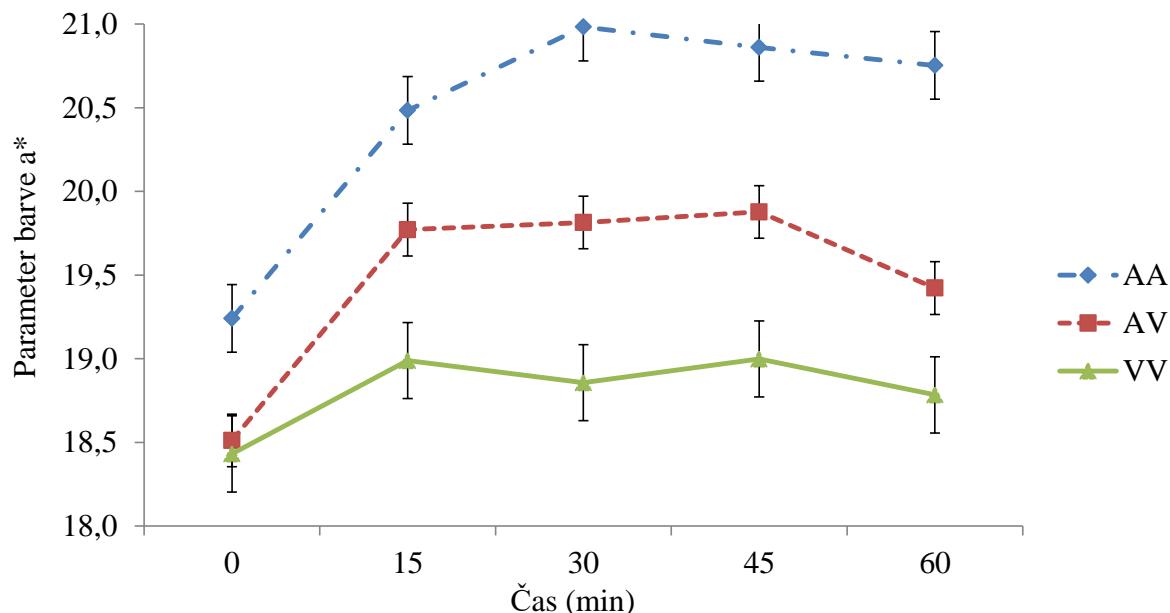
<sup>3</sup> – model 3

Slike 8, 9 in 10 prikazujejo barvne parametre L\*, a\* in b\* in njihovo spremenjanje v obdobju ene ure od prereza mesa (čas 0 min je sveži rez) pri genu *SDC1*. Najvišje vrednosti pri vseh treh parametrih barve so pri genotipu AA, najnižje pa pri VV. Pri barvnem parametru L\* (slika 8) je pri genotipi AV in VV opazen trend spremenjanja barve v časovnem obdobju, medtem ko se pri genotipu AA skoraj ne spreminja. Pri barvnih parametrih a\* (slika 9) in b\* (slika 10) je pri vseh treh genotipi enak trend, genotip AA ima vso časovno obdobje najvišje vrednosti, VV pa najnižje. Podobno je pri genu *DGAT1*, le da imamo tu prisotna samo dva genotipa. Vrednosti pri L\* (slika 11) naraščajo prve pol ure, nato pa padajo. Pri barvnih parametrih a\* (slika 12) in b\* (slika 13) vrednosti hitro naraščajo prvih 15 min, nato pa vedno počasneje.



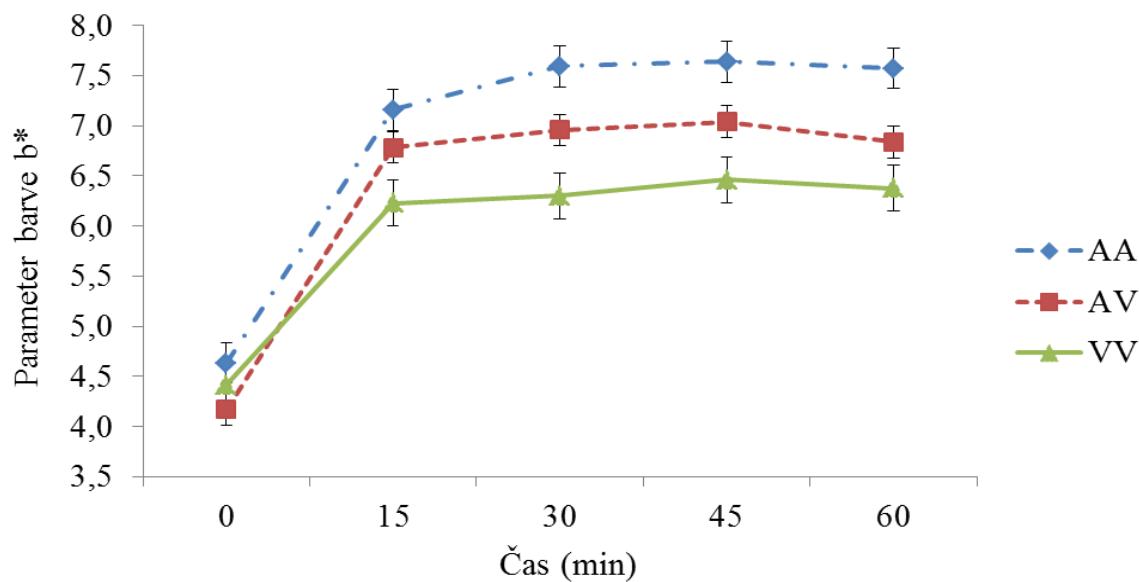
Slika 8: Vpliv gena *SCD1* na spremjanje parametra barve  $L^*$  na svežem mesu prvo uro po prerezu

Figure 8: Effect of gene *SCD1* on change  $L^*$  color parameter measured on fresh meat for the first hour after the cut



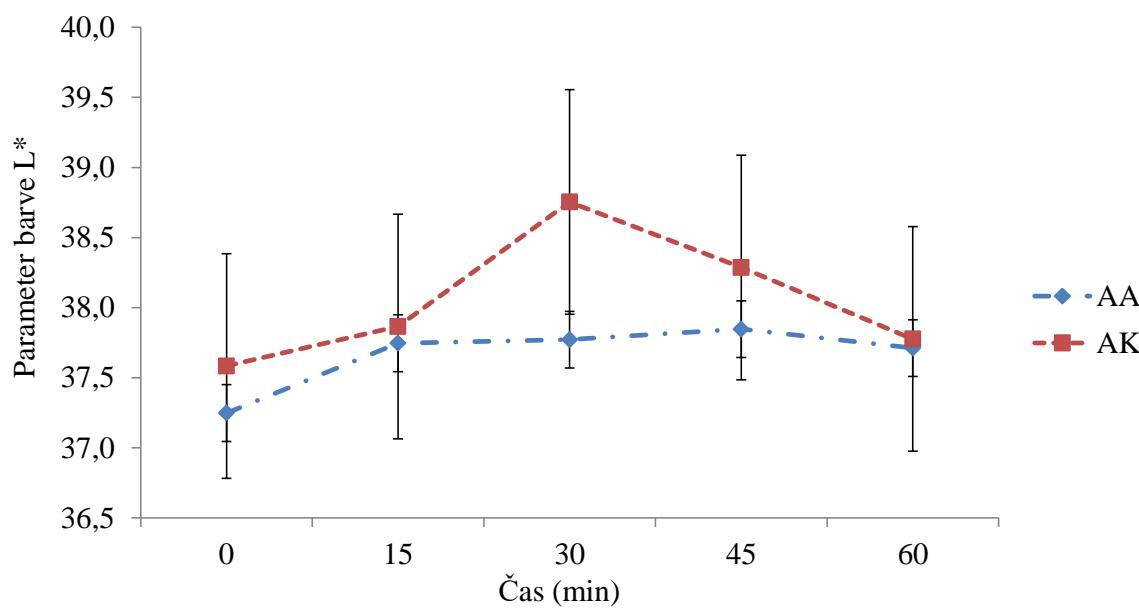
Slika 9: Vpliv gena *SCD1* na spremjanje parametra barve  $a^*$  na svežem mesu prvo uro po prerezu

Figure 9: Effect of gene *SCD1* on change  $a^*$  color parameter measured on fresh meat for the first hour after the cut



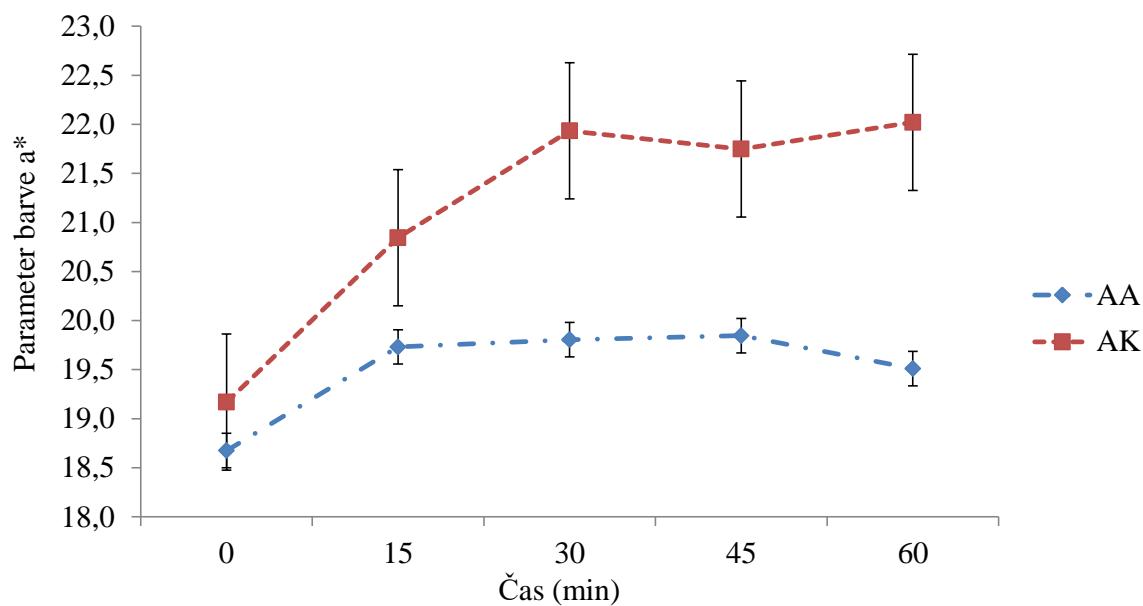
Slika 10: Vpliv gena *SCD1* na spremjanje parametra barve  $b^*$  na svežem mesu prvo uro po prerezu

Figure 10: Effect of gene *SCD1* on change  $b^*$  color parameter measured on fresh meat for the first hour after the cut



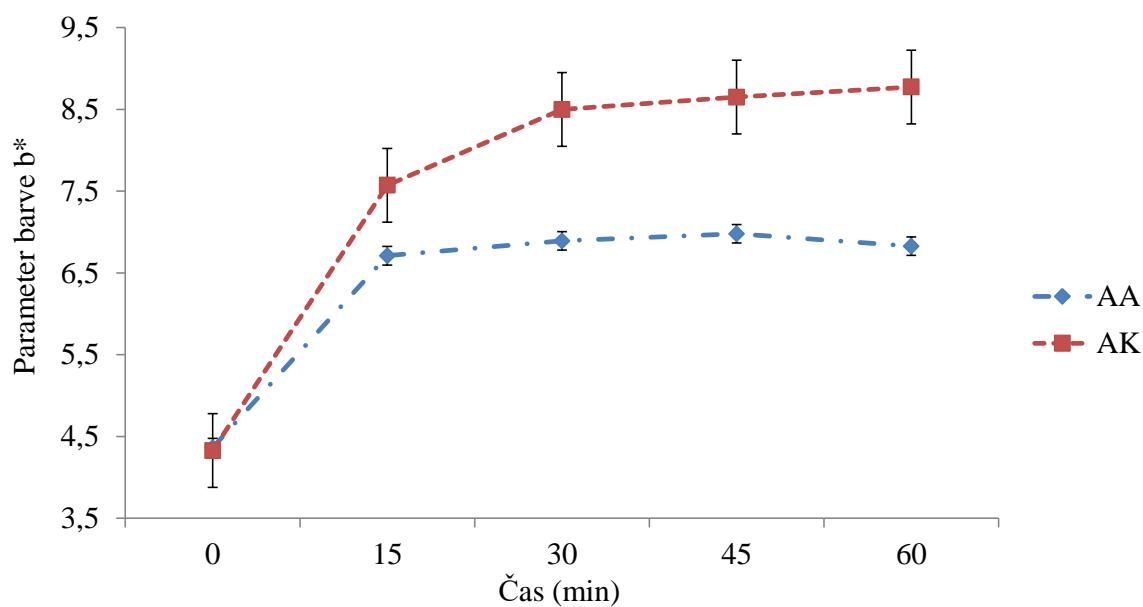
Slika 11: Vpliv gena *DGAT1* na spremjanje parametra barve  $L^*$  na svežem mesu prvo uro po prerezu

Figure 11: Effect of gene *DGAT1* on change  $L^*$  color parameter measured on fresh meat for the first hour after the cut



Slika 12: Vpliv gena *DGAT1* na spremenjanje parametra barve  $a^*$  na svežem mesu prvo uro po prerezu

Figure 12: Effect of gene *DGAT1* on change  $a^*$  color parameter measured on fresh meat for the first hour after the cut



Slika 13: Vpliv gena *DGAT1* na spremenjanje parametra barve  $b^*$  na svežem mesu prvo uro po prerezu

Figure 13: Effect of gene *DGAT1* on change  $b^*$  color parameter measured on fresh meat for the first hour after the cut

Preglednica 11: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na parametre barve L\*, a\*, b\* merjeno na zorenem mesu 1 uro vsakih 15 min

Table 11: Least square means and standard errors for effect of genes on L\* a\* b\* color parameters measured on matured meat for 1 hour every 15 min

Lastnosti		L* <sup>3</sup>	a* <sup>3</sup>	b* <sup>3</sup>
N		1500	1500	1500
<i>CAST</i>	CC	39,75 ± 0,77	22,35 ± 0,62	8,41 ± 0,38
	CG	40,53 ± 0,70	22,05 ± 0,57	8,57 ± 0,34
	GG	40,50 ± 0,66	22,58 ± 0,54	8,84 ± 0,33
<i>p</i>		0,2931	0,3930	0,2743
<i>CAPN1</i>	CC	40,28 ± 1,13	22,48 ± 0,92	8,84 ± 0,56
	CT	40,26 ± 0,65	22,13 ± 0,53	8,43 ± 0,32
	TT	40,24 ± 0,62	22,37 ± 0,50	8,55 ± 0,31
<i>p</i>		0,9991	0,7499	0,6833
<i>LEP</i>	AA	39,91 ± 0,55	22,64 ± 0,44	8,81 ± 0,27
	AB	40,18 ± 0,57	22,12 ± 0,46	8,52 ± 0,28
	BB	40,69 ± 1,31	22,22 ± 1,06	8,50 ± 0,65
<i>p</i>		0,7006	0,3576	0,3886
<i>SCD1</i>	AA	40,52 ± 0,66	22,60 ± 0,53	8,79 ± 0,32
	AV	40,45 ± 0,72	22,27 ± 0,58	8,65 ± 0,35
	VV	39,81 ± 0,77	22,10 ± 0,62	8,38 ± 0,38
<i>p</i>		0,4013	0,5529	0,3674
<i>DGAT1</i>	AA	40,44 ± 0,54	22,22 ± 0,44	8,61 ± 0,27
	AK	40,08 ± 0,97	22,44 ± 0,79	8,61 ± 0,48
<i>p</i>		0,6870	0,7640	0,9913
Čas		<0,0001	<0,0001	<0,0001
Mesto meritve		<0,0001	0,0003	<0,0001
Čas*mesto meritve		0,9722	0,2450	0,0999

<sup>3</sup> – model 3

Preglednica 12: Ocene srednjih vrednosti in standardne napake za vpliv genov na barvo L\*, a\*, b\*, merjeno vsak dan v obdobju enega tedna

Table 12: Least square means and standard errors for effect of genes on L\* a\* b\* color parameters measured every day in period of one week

Lastnosti		L* <sup>3</sup>	a* <sup>3</sup>	b* <sup>3</sup>
N		1133	1133	1133
<i>CAST</i>	CC	40,24 ± 0,68	23,35 ± 0,90	10,81 ± 0,41
	CG	40,90 ± 0,61	22,99 ± 0,82	10,95 ± 0,37
	GG	40,70 ± 0,59	23,27 ± 0,78	10,86 ± 0,35
	p	0,3659	0,8111	0,8792
<i>CAPN1</i>	CC	40,59 ± 1,00	22,86 ± 1,33	10,77 ± 0,60
	CT	40,64 ± 0,57	23,62 ± 0,77	11,03 ± 0,34
	TT	40,62 ± 0,55	23,14 ± 0,73	10,82 ± 0,33
	p	0,7544	0,1528	0,1052
<i>LEP</i>	AA	40,79 ± 0,48	24,13 ± 0,64	11,32 ± 0,29
	AB	40,93 ± 0,50	23,34 ± 0,67	10,91 ± 0,30
	BB	40,12 ± 1,15	22,15 ± 1,54	10,39 ± 0,69
	p	0,3570	0,2531	0,4814
<i>SCDI</i>	AA	41,01 ± 0,58	23,76 ± 0,77	11,02 ± 0,35
	AV	40,57 ± 0,63	22,79 ± 0,84	10,71 ± 0,38
	VV	40,27 ± 0,68	23,06 ± 0,90	10,89 ± 0,41
	p	0,9976	0,5758	0,6099
<i>DGAT1</i>	AA	40,95 ± 0,48	22,33 ± 0,64	10,41 ± 0,29
	AK	40,28 ± 0,85	24,08 ± 1,14	11,34 ± 0,51
	p	0,3971	0,0995	0,0530
Čas		< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Mesto meritve		0,5734	0,0177	0,1588
Čas*mesto meritve		0,9633	0,8945	0,4241

<sup>3</sup> – model 3

## 5 RAZPRAVA

Za izboljšanje kakovosti mesa so se v preteklosti večinoma uporabljali okoljski dejavniki. Proizvajalci (rejci, predelovalci ...) so izboljševali prehrano, razmere za revo živali, ravnanje z živalmi med revo in tik pred zakolom ter postopke z mesom po zakolu živali. Medtem ko so bile narejene razne študije kakovosti mesa pri različnih pasmah, pri nas še ni bilo veliko raziskanega na področju vplivov posameznih genov znotraj pasem. Po izračunu frekvenc naših preiskovanih genov smo ugotovili, da so vsi preiskovani genetski označevalci v Hardy-Weinbergovem ravnotežju. V naši preiskovani populaciji smo pri genu *CAST* opazili frekvenco alela C 0,40 in alela G 0,60, ravno obraten rezultat, C 0,60 in G 0,40, so dobili Juszczuk-Kubiak in sod. (2004) v raziskavah, izvedenih na poljski populaciji lisaste, šarole, poljski frizijski in poljski rdeči pasmi, medtem ko so ugotovili, da je frekvenca drugačna pri rdečem angusu (C = 0,93, G = 0,07), pri pasmah limuzin in hereford pa je bila frekvenca alela C 0,75 in pri G 0,25.

Pri vplivu označevalca na genu *CAST* na kakovost mesa smo ugotovili težnjo vpliva na marmoriranost. Genotipa GG in CG sta imela bolj marmorirano meso. Pri genotipu CC smo ugotovili, da je imel večji delež vode v mesu in večjo razliko v trdoti med kuhanim nezorenim in zorenim mesom, kar je glede na fiziološko funkcijo kalpastatina (inhibitor proteolitičnega encima kalpaina) tudi pričakovati. Podobno kot v našem primeru tudi Juszczuk-Kubiak in sod. (2004) poročajo o značilnem vplivu tega označevalca na *CAST* na barvo mesa in navajajo, da je meso pri genotipu CG imelo več kot dvakrat manjše vrednosti pri komponenti b\* kot CC in GG, hkrati pa je imel dvakrat večje izgube pri kuhanju kot CC in trikrat večje kot GG.

Pri opazovanem označevalcu na genu *CAPN1* smo ugotovili frekvenco alela C 0,24 in alela T 0,76. V nasprotju z nami Gabor in sod. (2011) pri slovaškem pincgavskem govedu navajajo bolj izenačene frekvence alelov (C 0,53, T pa 0,47). Juszczuk-Kubiak in sod. (2004a) pa poročajo o frekvenci za več pasem pri poljski populaciji. Pri pasmi šarole in limuzin so ugotovili podobne frekvence alelov kot naša študija (C = 0,30 oz. 0,35 in T = 0,70 oz. 0,65), pri LS je bila frekvenca alela C 0,55 in T 0,45; pri pasmi hereford pa alela C 0,61 in T 0,39. Pri črno-beli pasmi je bila frekvenca alelov ravno obratna kot pri naši LS (C = 0,73 in T = 0,27), pri rdeči poljski pasmi je bila frekvenca C 0,83 in T 0,17.

Pri označevalcu na genu *CAPN1* smo ugotovili, da nakazuje vpliv le na debelino mišice. Prav tako kot mi so tudi Cheong in sod. (2008) ugotovili, da *CAPN1* nima vpliva na maso trupa in marmoriranost.

V primeru genskega označevalca na genu *LEP* je bila frekvenca alela A 0,80, B pa 0,20. Podoben rezultat so dobili Cardoso in sod. (2011) pri pasmi girolando (A = 0,87, B = 0,13), Nobari in sod. (2010) pri iranski sistani pasmi (*Bos indicus*) (A = 0,88, B = 0,12) in rjavi pasmi (A = 0,82, B = 0,18) ter Moravčikova in sod. (2012) pri slovaški LS (A = 0,88, B = 0,17), medtem ko so pri slovaškem pincgavcu ugotovili malo večji delež alela B (A = 0,69, B = 0,31). Javanmard in sod. (2010) poročajo o frekvenkah za iransko črno-belo pasmo (A = 0,95, B = 0,05), kjer so ugotovili, da genotipa BB ni.

V naši raziskavi smo ugotovili, da označevalec na genu *LEP* vpliva na površino maščobe. Pri obeh lastnostih je imel genotip BB najvišje vrednosti, vendar je bilo nosilcev omenjenega alela le 3 %, zato moramo to upoštevati pri napovedih in biti previdni pri podajanju zaključkov. Ugotovili smo tudi vpliv na delež beljakovin v mesu, razmerje med beljakovinami in vodo ter na MMb<sup>3+</sup>. Pri MMb<sup>3+</sup> so bile razlike sicer majhne, vendar je imel genotip BB najmanjše vrednosti, kar pomeni da je bilo meso manj rjavo in s tem lepše barve. Opazili smo tudi težnjo vpliva na sposobnost vezave vode, in sicer na izgube po odtaljevanju zorenega mesa in pri izceji po metodi EZ. Največje izgube mase pri obeh lastnostih so bile pri genotipu AA, najmanjše pa pri BB. Liefers in sod. (2002), Javanmard in sod. (2010), Nobari in sod. (2010) so ugotovili, da živali z genotipom BB pojedo več krme in dajo več mleka. Glede na dobljene rezultate in ugotovitve drugih avtorjev kaže, da je alel B tisti, ki je povezan z večjo konzumacijo (večjim apetitom), kar se kaže v večji telesni masi, večji omišičenosti, večji zamaščenosti in tudi v večji proizvodnji mleka. V prihodnje bi bilo zanimivo poiskati več živali z genotipom BB, s čimer bi lahko potrdili smiselnost selekcije živali na alel B, saj nakazuje pozitiven vpliv na količino in kakovost tako mesa kot tudi mleka.

Preiskovani označevalec na *SCD1* je imel v našem primeru precej izenačeno frekvenco alelov (A 0,55 in V 0,45). Literaturni podatki za omenjeni označevalec kažejo precej raznoliko sliko. Pri iranski holštajn so ugotovili frekvenco alela A 0,76 in alela V 0,26 (Mashhadi in sod., 2013), pri kanadski jersey je prevladoval alel A (0,81) (Kgwatalala in sod., 2009), pri češki LS pa so bile frekvence enake kot pri nas (A 0,55 in V 0,45) (Barton in sod., 2010).

Naša študija je pokazala težnjo vpliva označevalca na *SCD1* na debelino mišice in maščobe ter značilen vpliv na marmoriranost, pri čemer je bila debelina maščobe pri genotipu VV večja kot pri AA, skladno s tem pa je bila povečana tudi marmoriranost (2,5 pri VV, 2,4 pri AV in 1,9 pri AA). Ugotovili smo tudi vpliv tega genskega označevalca na barvni komponenti a\* in b\*, od vseh preiskovanih genov je ravno ta imel največji vpliv na barvo. Pri vseh barvnih komponentah je bila najvišja vrednost izmerjena pri AA in najmanjša pri VV. Matsuhashi in sod. (2011) in Taniguchi in sod. (2004) niso ugotovili

nobenega vpliva tega označevalca na lastnosti kakovosti mesa, razen na vsebnost MUFA, kjer je alel A povezan z višjimi vsebnostmi. Statistično značilen vpliv na maščobnokislinsko sestavo so ugotovili tudi Barton in sod. (2010) pri češki LS in Orrù in sod. (2011) pri italijanski LS. Glede na to, da smo ugotovili vpliv *SCD1* na količino maščob in barvo mesa, drugi avtorji pa na različne stopnje nasičenosti maščob, lahko predpostavljamo, da gre za podoben mehanizem, saj sta količina maščob in stopnja nasičenosti v pozitivni korelaciji s stopnjo oksidacije, ta pa je povezana s spremembami v barvi. Avilés in sod. (2015) pa so ugotovili statistično značilen vpliv na trdoto mesa po zorenju pri pasmi limuzin.

Pri označevalcu na *DGAT1* smo ugotovili, da je v preiskovanem vzorcu bikov prisoten zelo majhen delež alela K (0,03). Medtem ko genotipa KK nismo našli, je bilo živali z genotipom KA le 6 %. Enako so ugotovili Karolyi in sod. (2012) pri LS pasmi na Hrvaškem. Ripoli in sod. (2006) pa pri hereford navajajo 100 % delež alela A, pri šarole 0,85, pri črno-beli 0,94, aberdeen angus 0,91 in pri jersey 0,65. Po drugi strani pri poljski črno-beli pasmi Nowacka-Woszuk in sod. (2008) poročajo o skoraj izenačenih frekvencah alelov (A 0,46 in K 0,54), prav tako Kaupe in sod. (2007) pri nemški črno-beli pasmi (A = 0,55 in K = 0,45).

Ugotovili smo, da *DGAT1* nakazuje vpliv na barvni parameter a\* in vpliva na b\*, večje vrednosti pa smo dobili pri genotipu KA. Nakazuje se tudi vpliv *DGAT1* na debelino mišice in površino maščobe nad LD. Aviles in sod. (2013) ter Gill in sod. (2009) so ugotovili statistično značilen vpliv *DGAT1* na debelino hrbtne maščobe. Li in sod. (2013) poročajo o statistično značilnem vplivu *DGAT1* na IMM, medtem ko Avilés in sod. (2013) trdijo ravno obratno. Pri tem genu je potrebna previdnost pri napovedovanju vpliva na kakovosti mesa (enako kot pri *LEP*), saj imamo zelo nizko frekvenco alela K. V prihodnje bi bilo zanimivo pogledati tudi druge pasme, da ugotovimo, ali ima katera v populaciji genotip KK.

## 6 SKLEPI

Iz analize rezultatov vpliva izbranih kandidatnih genov na kakovost mesa smo ugotovili:

- Vsi preiskovani geni (*CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *DGAT1*) so v Hardy-Weinbergovem ravnotežju;
- Preiskovani označevalec na *LEP* ima samo 3 % genotipa BB, pri *DGAT1* pa samo 3 % alela K;
- Preiskovani označevalec na *CAST* nakazuje vpliv na marmoriranost in delež vode v mesu;
- Preiskovani označevalec na *CAPN1* nakazuje vpliv na debelino mišice LD;
- Preiskovani označevalec na *LEP* vpliva na površino maščobe, delež beljakovin v mesu, razmerje med beljakovinami in vodo ter na MMb<sup>3+</sup>. Nakazuje tudi vpliv na izgube po odtaljevanju zorenega mesa in pri izceji po metodi EZ;
- Preiskovani označevalec na *SCD1* nakazuje vpliv na debelino mišice in maščobe ter na barvni parameter L\* in ima značilen vpliv na marmoriranost in barvna parametra a\* in b\*;
- Preiskovani označevalec na *DGAT1* nakazuje vpliv na debelino mišice, površino maščobe nad LD in barvi parameter a\* ter značilno vpliva na b\*;
- Na vrednost pH v mesu ni vplival noben od preiskovanih polimorfizmov;
- Najmočnejše vplive smo ugotovili pri genu *SCD1*;
- Na površino mišice LD, IMM, oblike mioglobina (razen MMb<sup>3+</sup>), pH, izgube mase (po kuhanju svežega ali zorenega mesa, po 2 tednih v vakuumu in po odtaljevanju), trdoto in barvo, merjeno na zorenem vzorcu, ni vplival noben preiskovani označevalec.

## 7 POVZETEK (SUMMARY)

### 7.1 POVZETEK

V Sloveniji je najbolj razširjena pasma goveda LS, ki je rejcem zanimiva, ker gre za kombinirano pasmo, ki je primerna tako za meso kot tudi za mleko. Živali so v preteklosti odbirali na podlagi zunanjih lastnosti (količina mleka, plodnost, količina mesa ...), kasneje pa na podlagi plemenskih vrednosti, izračunanih na podlagi preizkusa potomcev. Pridelovalci in predelovalci se vedno bolj zavedajo, da ni pomembna samo količina mesa, ampak tudi kakovost.

Za potrošnike je predvsem pomembna barva mesa, ki je prva lastnost mesa, ki prepriča ljudi, da ga kupijo. Poleg barve mesa pa je pomembna tudi količina intramuskularne maščobe (IMM), ki vpliva na sočnost, mehkobo in aroma mesa. Poleg teh parametrov kakovosti mesa sta pomembni lastnosti (predvsem z vidika primernosti za predelavo) še vrednost pH in sposobnost za vezavo vode. Vsi omenjeni parametri so odvisni od poteka posebnih fizioloških procesov (metabolizem maščob, beljakovin in ogljikovih hidratov v mišičnih celicah), ki so pod neposrednim nadzorom genov. Izmed mnogih odkritih so kandidatni geni *CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *DGAT1* povezani s fiziološkimi procesi, ki bi lahko neposredno vplivali na različne lastnosti kakovosti mesa.

Z raziskavo smo želeli ugotoviti frekvence genotipov na preiskovanih genih v naši populaciji bikov LP in morebitne vplive selekcije (morebitno zmanjšanje frekvence določenih alelov) ter preveriti vplive polimorfizmov na kandidatnih genih na parametre kakovosti mesa. Analizo smo opravili na mesu 116 bikov iz preizkusa potomcev. Na mesu smo merili barvo, sposobnost za vezanje vode, pH in trdoto ter ocenjevali kemično sestavo. Nato smo naredili genotipizacijo za vseh 5 genov (*CAST*, *LEP*, *SCD1*, *CAPN1* in *DGAT1*) in statistično ovrednotili njihov vpliv na parametre kakovosti mesa.

Ugotovili smo, da so vsi analizirani geni v Hardy-Weinbergovem ravnotežju, kar pomeni, da na njihovo razporeditev v populaciji niso vplivali dejavniki selekcije. Pri genu *DGAT1* genotipa KK nismo našli, medtem ko je bila frekvenca genotipov AA 94 % in KA le 6 %. Pri *LEP* je bila frekvenca genotipov AA 62 %, AB 35 % in BB le 3 %. Pri *CAPN1* so bile frekvence podobno razporejene kot pri *LEP*, CC 6 %, CT 36 % in TT 58 %. Frekvence pri *CAST* so CC 22 %, CG 42 % in GG 36 %. Gen *SCD1* je imel normalno porazdeljene frekvence (AA 32 %, AV 46 % in VV 22 %). Pri vseh proučevanih genih smo našli vplive na kakovost mesa. *CAST* ima vpliv na delež vode v mesu, *LEP* vpliva na zamaščenost, delež beljakovin, izgubo mesnega soka in barvo mesa, *SCD1* in *DGAT1* vplivata na količino maščobe in barvo mesa, *SCD1* tudi na marmoriranost, *CAPN1* na debelino mišice.

V prihodnje bi bilo zanimivo podrobneje preiskati tudi gena *LEP* in *DGAT1* zaradi malih deležev določenih alelov (pri *LEP* alel B in pri *DGAT1* alel K).

## 7.2 SUMMARY

In Slovenia, the Simmental breed represents the most common breed of cattle. Being a dual purpose breed, suitable for both milk and meat production, it suits the interests of many Slovenian farmers. In the breed selection was based solely on exterieur traits (quantity of milk, fertility, the quantity of meat, ...), but lately also on its breeding value, calculated on the basis of the examination of offspring. Besides quantity, breeders and processors of meat are increasingly aware of the importance of meat quality.

Color is of high importance, as it is a factor, on which the consumers decide to purchase the meat. Intramuscular fat content is another important factor, determining juiciness, tenderness and aroma of meat. In addition pH and water binding capacity determine the suitability for processing. All above-mentioned meat quality parameters are dependent on the course of the specific physiological processes (the metabolism of fats, proteins and carbohydrates in muscle cells), which are under the direct control of genes. Among the many candidate genes identified are *CAST*, *CAPN1*, *LEP*, *SCD1*, and *DGAT1* associated with physiological processes that could directly affect the various properties of meat quality.

The aim of the present study was to determine the frequency of genotypes of the investigated genes in the Sloveniana population of Simmental bulls and identify potential impacts of selection (i.e. possible reduction in the frequency of certain alleles) and to examine the effects of polymorphisms in candidate genes in meat quality parameters. The analysis was performed on the meat of 116 bulls included in the progeny test. On the samples of meat, meat colour parameters, water holding capacity, chemical composition, tenderness and pH was measured. The genotyping of genetic markers on five candidate genes (*CAST*, *LEP*, *SCD1*, *DGAT1* and *CAPN1*) was performed and the association to the available meat quality traits statistically evaluated.

We have found that all the analyzed genetic polymorphisms were in Hardy-Weinberg equilibrium, which means that their distribution in the population are not influenced by factors of selection. In gene *DGAT1* genotype KK not found, while the frequency of the genotypes AA was 94% and KA only 6%. At *LEP* the frequency of genotypes were 62% for AA, 35% for AB and only 3% for BB. In *CAPN1* frequencies were similarly arranged as in *LEP* (CC 6%, 36% CT and 58% TT). Frequencies at *CAST* were 22% for CC, 42% for CG 36% for GG. *SCD1* gene had normally distributed frequency (32% for AA, 46%

for AV and VV for 22%). For all studied genetic markers, associations with meat quality traits were discovered. Polymorphism on *CAST* affected water content in the meat, *LEP* impacted fatness, water holding capacity and meat color. *SCD1* and *DGAT1* affected the marbling and meat color, while *CAPN1* affected the thickness of muscle. In future, it would be interesting to further investigate especially the genes *DGAT1* and *LEP*, due to small proportions of certain alleles (an allele B at *LEP* and *DGAT1* K allele) and strong associations to several important meat quality traits discovered in the present research.

## 8 VIRI

- Avilés C., Polvillo O., Peña F., Juárez M., Martínez A.L., Molina A. 2013. Associations between *DGAT1*, *FABP4*, *LEP*, *RORC*, and *SCD1* gene polymorphisms and fat deposition in Spanish commercial beef. *Journal Of Animal Science*, 91, 10: 4571-4577
- Avilés C., Peña F., Polvillo O., Barahona M., Campo M.M., Sañudo C., Juárez M., Horcada A., Alcalde M.J., Molina A. 2015. Association between functional candidate genes and organoleptic meat traits in intensively-fed beef. *Meat Science*, 107: 33-38
- Barton L., Kott T., Bures D., Rehák D., Zahrádková R., Kottová B. 2010. The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Science*, 85, 1: 15-20
- Calvo J.H., Iguácel L.P., Kirinus J.K., Serrano M., Ripoll G., Casasús I., Joy M., Pérez-Velasco L., Sarto P., Albertí P., Blanco M. 2014. A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (*CAST*) gene associated with beef tenderness. *Meat Science*, 96: 775-782
- Cardoso S.R., Queiroz L.B., Goulart V.A., Mourão G.B., Benedetti E., Goulart L.R. 2011. Productive performance of the dairy cattle Girolando breed mediated by the fat-related genes *DGAT1* and *LEP* and their polymorphisms. *Research in Veterinary Science*, 91, 3: 107-112
- Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase C.C., Johnson D.D., Smith T.P. 2006. Effects of calpastatin and micro-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *Journal of Animal Science*, 84, 3: 520-525
- Chang C.C., Chow C.C., Tellier L.C., Vattikuti S., Purcell S.M., Lee J.J. 2015. Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets. *GigaScience*, 4:7, DOI 10.1186/s13742-015-0047-8  
<https://www.cog-genomics.org/software/stats> (10.jun.2016)
- Cheong H.S., Yoon D.H., Park B.L., Kim L.H., Bae J.S., Namgoong S., Lee H.W., Han C.S., Kim J.O., Cheong I.C., Shin H.D. 2008. A single nucleotide polymorphism in *CAPN1* associated with marbling score in Korean cattle. *BMC Genetics*, 9: 33
- Christensen L.B. 2003. Drip loss sampling in porcine m. longissimus dorsi. *Meat Science*, 63: 249-256
- Corva P., Soria L., Schor A., Villarreal E., Pérez Cenci M., Motter M., Mezzadra C., Melucci L., Miquel C., Paván E., Depetris G., Santini F., Naón J.G. 2007. Association of *CAPN1* and *CAST* gene polymorphisms with meat tenderness in *Bos taurus* beef cattle from Argentina. *Genetics and Molecular Biology*, 30, 4: 1064-1069

- Curi R.A., Chardulo L.A.L., Arrigon M.D.B., Silveira A.C., de Oliveira H.N. 2011. Associations between *LEP*, *DGAT1* and *FABP4* gene polymorphisms and carcass and meat traits in Nelore and crossbred beef cattle. *Livestock Science*, 135: 244-250
- Flowers M.T., Ntambi J.M. 2008 Role of stearoyl-coenzyme A desaturase in regulating lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 19: 248-256
- Gábor M., Trakovická A., Miluchová M. 2011. Genotyping single nucleotide polymorphism C4685T in 14. intron of bovine *CAPN1* gene by rapid tetra-primer ARMS-PCR method. *Animal Science and Biotechnologies*, 44, 1: 209-212
- GeneCards. 2015. The Human Gene Database. Almedaj, LifeMap Sciences, Inc. <http://www.genecards.org> (10. sep. 2015)
- Gill J.L., Bishop S.C., McCorquodale C., Williams J.L., Wiener P. 2009. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genetics Selection Evolution*, 41: 36
- Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. 2003. The Calpain system. *Physiological Reviews*, 83, 3: 731-801
- Hocquette J.F., Lehnert S., Barendse W., Cassar-Malek I., Picard B. 2007. Recent advances in cattle functional genomics and their application to beef quality. *Animal*, 1, 1: 159-173
- Huff-Lonergan E., Lonergan S.M. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*, 71, 1: 194-204
- Ibeagha-Awemu E.M., Kgwatalala P., Zhao X. 2008. A critical analysis of production-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*, 19, 9: 591-617
- Javanmard A., Khaledi K., Asadzadeh N., Solimanifarjam A.R. 2010. Detection of polymorphisms in the bovine leptin (*lep*) gene: association of a single nucleotide polymorphism with breeding value of milk traits in iranian holstein cattle. *Journal of Molecular Genetics*, 2, 1: 10-14
- Jenko J., Babnik D., Čandek-Potokar M., Glad J., Janžekovič M., Jeretina J., Logar B., Perpar T., Podgoršek P., Prevolnik Povše M., Sadar M., Smolinger J., Verbič J., Virk T., Žabjek A. 2013. Lisasto govedo v Sloveniji. V: Zbornik 30. kongresa Evropske zveze rejcev goveda lisaste pasme, Ptuj, 17.-21. september 2013. Podgoršek P. (ur.). Ptuj, KGZS Zavod Ptuj: 12-31
- Juszczuk-Kubiak E., Rosochacki S.J., Wicinska K., Szreder T., Sakowski T. 2004<sup>a</sup>. A novel RFLP/AluI polymorphism of the bovine calpastatin (*CAST*) gene and its association with selected traits of beef. *Animal Science Papers and Reports*, 22, 2: 195-204

- Juszczuk-Kubiak E., Sakowski T., Flisikowski K., Wicinska K., Oprzadek J., Rosochacki S.J. 2004<sup>b</sup>. Bovine  $\mu$ -calpain (*CAPN1*) gene: new SNP within intron 14. *Journal of Applied Genetics*, 45, 4: 457-460
- Karolyi D., Čubrić-Čurik V., Salajpal K., Đikić M. 2012. The effect of sex and *DGAT1* gene polymorphism on fat deposition traits in simmental beef cattle. *Acta Veterinaria (Beograd)*, 62, 1: 91-100
- Kaupe B., Brandt H., Prinzenberg E.M., Erhardt G. 2007. Joint analysis of the influence of *CYP11B1* and *DGAT1* genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. *Journal of Animal Science*, 85: 11-21
- Kgwatalala P.M., Ibeagha-Awemu E.M., Mustafa A. F., Zhao X. 2009. Stearoyl-CoA desaturase 1 genotype and stage of lactation influences milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. *Animal Genetics*, 5: 609-615
- Kong H.S., Oh J.D., Lee J.H., Yoon D.H., Choi Y.H., Cho B.W., Lee H.K., Jeon G.J. 2007. Association of sequence variations in *DGAT1* gene with economic traits in hanwoo (Korea Cattle). *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20, 6: 817-820
- Kooohmaraie M. 1994. Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Science*, 36, 1-2: 93-104
- Kooohmaraie M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening tenderization processes of meat. *Meat Science*, 43: 193-201
- Lawries R.A., Ledward D.A. 2006. Lawrie's meat science. 7<sup>th</sup> ed. Cambridge, Woodhead Publishing: 464 str.
- Lepetit J. 2007. A theoretical approach of the relationship between collagen content, cross-links and meat tenderness. *Meat Science*, 76: 147-159
- Li X., Ekerljung M., Lundström K., Lundén A. 2013. Association of polymorphisms at *DGAT1*, leptin, *SCD1*, *CAPN1* and *CAST* genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat Science*, 94, 2: 153-158
- Liefers S.C., Pas M.F.W., Veerkamp R.F., Van der Lende T. 2002. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, 85: 1663-1638
- Liefers S.C., Veerkamp R.F., Pas M.F.W., Chilliard Y., Van der Lende T. 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 29, 1: 227-238
- Mancini R.A., Hunt M. C. 2005. Current research in meat color. *Meat Science*, 71, 1: 100-121

- Mashhadi M.H., Torshizi M.E., Ahani S., Sobhanirad S., Bahari R. 2013. Polymorphism of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 (*SCD1*) gene in Iranian holstein dairy cattle. Research Opinions In Animal & Veterinary Sciences, 3, 10: 363-365
- Matsuhashi T., Maruyama S., Uemoto Y., Kobayashi N., Mannen H., Abe T., Sakaguchi S., Kobayashi E. 2011. Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. Journal of Animal Science, 89: 12-22
- Moravčíková N., Trakovická A., Hazuchová E., Bujko J., Kasarda R. 2012. Associations between polymorphism in the leptin gene and milk production traits in pinzgau and Slovak Spotted cattle. Acta agriculturae Slovenica, 99, 3: 259-263
- Nkrumah J.D., Li C., Yu J., Hansen C., Keisler D.H., Moore S.S. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. Journal of Animal Science, 83, 1: 20-28
- Nobari K., Ghazanfari S., Reza Nassiry M., Tahmoorespur M., Jorjani E. 2010. Relationship between leptin gene polymorphism with economical traits in Iranian Sistani and Brown Swiss cows. Journal of Animal and Veterinary Advances, 9, 22: 2807-2810
- Nowacka-Woszuk J., Noskowiak A., Strabel T., Jankowski T., Świtoński M. 2008. An effect of the *DGAT1* gene polymorphism on breeding value of Polish Holstein-Friesian sires. Animal Science Papers and Reports, 26: 17-23
- Orrù L., Cifuni G.F., Piasentier E., Corazzin M., Bovolenta S., Moioli B. 2011. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the *LEP* and *SCD1* genes on the fatty acid profile of muscle fat in Simmental bulls. Meat Science, 87, 4: 344-348
- Osawa M. 1995. The measurement of meat pigments by fibre-optic reflectance spectrophotometry using the Kubelka-Munk equation. Meat Science, 40, 1: 63-77
- Othman O.E., Zayedb F.A., El Gaweadb A.A., El-Rahmana M.R.A. 2011. Genetic polymorphism of two genes associated with carcass trait in Egyptian buffaloes. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology, 9: 15-20
- Paton C.M., Ntambi J.M. 2009. Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism, 297: 28-37
- Piasentier E., Bovolenta S., Moioli B., Orrù L., Valusso R., Corazzin M. 2009. Fatty acid composition and sensory properties of Italian Simmental beef as affected by gene frequency of Montbéliarde origin, 83: 543-550
- Pinto L.F.B., Ferraz J.B.S., Pedrosa V.B., Eler J.P., Meirelles F.V., Bonin M.N., Rezende F.M., Carvalho M.E., Cucco D.C., Silva R.C.G. 2011. Single nucleotide polymorphisms

- in *CAPN1* and leptin genes associated with meat color and tenderness in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 10, 3: 2057-2064
- Prevolnik M., Čandek-Potokar M., Škorjanc D., Velikonja-Bolta Š., Škrlep M., Žnidaršič T., Babnik D. 2005. Predicting intramuscular fat content in pork and beef by near infrared spectroscopy. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 13: 77-85
- Prevolnik M., Škrlep M., Škorjanc D., Čandek-Potokar M. 2010. Application of near infrared spectroscopy to predict chemical composition of meat and meat products. *Tehnologija mesa*, 51, 2: 133-142
- Ripoli M.V., Corva P., Giovambattista G. 2006. Analysis of a polymorphism in the *DGAT1* gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. *Research in Veterinary Science*, 80, 3: 287-290
- Sadar M., Jenko J., Jeretina J., Logar B., Perpar T., Podgoršek P. 2015. Rezultati kontrole prireje mleka in mesa Slovenija 2014. Sadar M. (ur.). Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 93 str.
- SAS/STAT. 2011. The system for Windows Release 9.3. Cary, SAS Institute inc. (statistični program)
- Schenkel F.S., Miller S.P., Moore S.S., Nkrumah J.D., Li C., Yu, J., Mandell I.B., Wilton J.W., William J.L. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83: 2009-2020
- Schenkel F.S., Miller S.P., Jiang Z., Mandell I.B., Ye X., Li H., Wilton J.W. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 84: 291-299
- Sharifzadeha S., Clemmensen L.H., Borggaard C., Stoier S., Ersboll B.K. 2014. Supervised feature selection for linear and non-linear regression of L\* a\* b\* color from multispectral images of meat. *Engineering Applications of Artificial Intelligence*, 27: 211-227
- Smith T.P., Casas E., Rexroad C.E., Kappes S.M., Keele J.W. 2000. Bovine *CAPN1* maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Journal of Animal Science*, 78: 2589-2594
- Smith S.B., Gill C.A., Lunt D.K., Brook M.A. 2009. Regulation of fat and fatty acid composition in beef cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22, 9: 1225-1233
- Steinberg R.S., Pereira L., Lacorte G.A., Peixoto M.G., Verneque R.S., Teodoro R.L., Machado M.A., Fonseca C.G., Carvalho M.R. 2009. Technical note: A new and cost-effective method for detection of the bovine acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 K232A polymorphism in cattle. *Journal of Dairy Science*, 92, 2: 773-776

Stone R.T., Kappes S.M., Beattie C.W. 1996 The bovine homology of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian Genome*, 7: 399-400

Škrlep M., Čandek-Potokar M., Šegula B., Žabjek A., Horvat A., Batorek Lukač N., Prevolnik Povše M., Repič M., Janžekovič M. 2013. Merjenje lastnosti kakovosti mesa pri govedu. Ljubljana, Kmetijski inštitut Slovenije: 20 str.

Taghizadeh K., Beigi Nasiri M.T., Fayazi J., Bujarpoor M. 2014 Investigation of (Stearoyl-CoA Desaturase 1) *SCD1* gene polymorphism in Khuzestan buffalo population using PCR-RFLP method. *Iranian Journal of Applied Animal Science*, 4, 2: 425-428

Thaller G., Kühn C., Winter A., Ewald G., Bellmann O., Wegner J., Zühlke H., Fries R. 2003. *DGAT1*, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, 34: 354-357

Taniguchi M., Utsugi T., Oyama K., Mannen H., Kobayashi M., Tanabe Y., Ogino A., Tsuji S. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 15: 142-148

Wayne J., Kuenzel W.J., Fraley G. S. 1995. Neuropeptid Y: It's in the neural regulation of reproductive function and feed intake in mammalian species. *Poultry Avian Biology Reviews*, 6: 185–209

Wheeler T.L., Cundiff L.V., Shackleford S.D., Koohmaraie M. 2005. Characterization of biological types of cattle (Cycle VII): carcass, yield and longissimus palatability traits. *Journal of Animal Science*, 83:196-207

Winter A., Krämer W., Werner F.A., Kollers S., Kata S., Durstewitz G., Buitkamp J., Womack J.E., Thaller G., Fries R. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 14: 9300-9305

Yuan Z., Li J., Li J., Gao X., Gao H., Xu S. 2013. Effects of *DGAT1* gene on meat and carcass fatness quality in Chinese commercial cattle. *Molecular Biology Reports*, 40, 2: 1947-1954

Žabjek A., Horvat Aleksić A., Škrlep M., Šegula B., Prevolnik Povše M., Janžekovič M., Repič M., Čandek-Potokar M. 2015. Kakovost mesa slovenskih bikov lisaste pasme vključenih v test rastnih in klavnih lastnosti. V: *Zbornik 24. Mednarodnega posvetovanja o prehrani domačih živali Zadravčevi-Erjavčevi dnevi 2015*, Radenci, 12.–13. november 2015. Čeh T., Kapun S. (ur.). Murska Sobota, KGZS Zavod MS: 217-223

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem:

- ❖ Mentorju prof. dr. Petru Dovču in somentorju doc. dr. Martinu Škrlepu za njune spodbudne besede, popravke in pomoč pri izdelavi magistrske naloge,
- ❖ članom komisije za oceno in zagovor magistrske naloge: prof. dr. Mileni Kovač, prof. dr. Simonu Horvatu in izr. prof. dr. Marjeti Čandek Potokar za pripombe in pomoč pri pripravi magistrske naloge,
- ❖ Špeli Mlinar za lektoriranje magistrske naloge,
- ❖ sodelavcem, sorodnikom in prijateljem za podporo, spodbudo, nasvete...