



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie



Wydział
Biotechnologii
i Hodowli Zwierząt

mgr Katarzyna Woźniak

**ANALIZA STRUKTURALNA GENU *HK2*
W ASPEKCIE CECH UŻYTKOWYCH ŚWIŃ
ORAZ PARAMETRÓW JAKOŚCI
MIĘSA WIEPRZOWEGO**

*Rozprawa doktorska wykonana
w Katedrze Genetyki Zachodniopomorskiego
Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie*

*pod kierunkiem promotora
dr hab. inż. Arkadiusza Termana, prof. ZUT
z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu
Technologicznego w Szczecinie*

*oraz promotora pomocniczego
dr hab. inż. Katarzyny Ropki-Molik, prof. IZ
z Instytutu Zootechniki Państwowego
Instytutu Badawczego w Balicach*

Szczecin 2022

*Serdeczne podziękowania za okazaną pomoc,
cenne uwagi oraz ogromne wsparcie,
kieruję do Pana dr hab. inż. Arkadiusza Termana,
prof. ZUT*

*Pragnę podziękować również Pani
dr hab. inż. Katarzynie Ropce-Molik, prof. IZ
za cierpliwość, wyrozumiałość oraz za wszelką
pomoc okazaną mi w realizacji tej pracy*

*Pracownikom Katedry Genetyki dziękuję
za wsparcie, nieocenioną pomoc oraz miłą
i życzliwą atmosferę*

Spis treści

WYKAZ SKRÓTÓW

1.	Wstęp	9
2.	Przegląd literatury	10
2.1	Jakość mięsa	10
2.1.1.	Zawartość tłuszczu śródmięśniowego	11
2.1.2.	Wodochłonność mięsa.....	13
2.1.3.	Parametry barwy w systemie CIE	14
2.1.4.	Odczyn mięsa (pH).....	15
2.1.5.	Oznaczanie genotypu zwierząt w locus <i>RYR1</i>	17
2.2.	Glikoliza – kluczowy proces dla przemian w mięśniach <i>post mortem</i>	18
2.3.	Enzym heksokinaza.....	23
2.4.	Gen <i>HK2</i>	24
3.	Cel pracy	26
4.	Materiały i metody	27
4.1.	Materiał doświadczalny	27
4.2.	Izolacja genomowego DNA	31
4.3.	Metoda PCR-HRM	31
4.4.	Sekwencjonowanie metodą Sangera wybranych fragmentów genu <i>HK2</i>	37
4.5.	Określenie frekwencji zidentyfikowanych mutacji – PCR-RFLP, PCR-ACRS	39
4.6.	Analiza statystyczna	42
5.	Wyniki	43
5.1.	Analiza zmian wykrytych za pomocą metody PCR-HRM.....	43
5.2.	Identyfikacja wykrytych mutacji w genie <i>HK2</i>	47
5.3.	Częstotliwość występowania poszczególnych genotypów i alleli genu <i>HK2</i> w odniesieniu do badanych ras.....	50
5.3.1.	Polimorfizm g.68177052A>G.....	51
5.3.2.	Polimorfizm g.68167661C>T.....	51
5.4.	Analiza związku badanych polimorfizmów genu <i>HK2</i> z wybranymi cechami użytkowymi świń oraz parametrami jakości mięsa wieprzowego	52
5.4.1.	Polimorfizm g.68177052A>G.....	52
5.4.2.	Polimorfizm g.68167661C>T.....	53
6.	Dyskusja	64
7.	Podsumowanie i wnioski	71

8.	Streszczenie	72
9.	Abstract.....	74
10.	Suplement.....	76
11.	Spis tabel	84
12.	Spis rycin.....	86
13.	Bibliografia.....	88

WYKAZ SKRÓTÓW

ΦX174 DNA	- marker DNA
3'UTR	- niepodlegająca translacji część mRNA położona w kierunku 3' od sekwencji kodującej (ang. <i>3' untranslated region</i>)
5'UTR	- niepodlegająca translacji część mRNA położona w kierunku 5' od sekwencji kodującej (ang. <i>5' untranslated region</i>)
ACRS	- technika polegająca na tworzeniu sztucznych miejsc restrykcyjnych (ang. <i>amplification created restriction site</i>)
ADP	- adenzyno-5'-difosforan
ATP	- adenzyno-5'-trifosforan
ASE	- mięso kwaśne, delikatne oraz ciekące (ang. <i>acid, soft, exudative</i>)
BLAST	- baza bioinformatyczna (ang. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
CIE	- Międzynarodowa Komisja Oświetleniowa (fr. <i>Commission Internationale de l'Eclairage</i>)
CO ₂	- wzór sumaryczny dwutlenku węgla, tlenek węgla (IV)
Da	- jednostka masy cząsteczkowej równa jednej dwunastej masy atomu węgla 12 ($1,66 \cdot 10^{-24}$ g); w przybliżeniu dalton jest równy masie atomu wodoru
DFD	- mięso ciemne, twarde oraz suche (ang. <i>dark, firm, dry</i>)
DNA	- kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	- deoksynukleotydy (ang. <i>deoxynucleotide</i>)
EC	- przewodność elektryczna (ang. <i>electrical conductivity</i>)
F	- oligonukleotyd tworzący nić komplementarną do nici 3' - 5' (ang. <i>forward</i>)
G-6P	- glukoza-6-fosforan
GLM	- uogólniony model liniowy (ang. <i>General Linear Model</i>)
GP	- potencjał glikolityczny (ang. <i>glycolytic potential</i>)
H ⁺	- jon wodorowy (proton)

H ₂ O	- wzór sumaryczny wody
HK	- enzym heksokinaza
HK1	- enzym heksokinaza 1
HK2	- enzym heksokinaza 2
<i>HK2</i>	- gen kodujący heksokinazę 2
<i>HK2-201</i>	- wariant splicingowy genu <i>HK2</i>
<i>HK2-202</i>	- wariant splicingowy genu <i>HK2</i>
HK3	- enzym heksokinaza 3
HK4	- enzym heksokinaza 4
HWE	- równowaga Hardy'ego-Weinberga
<i>IGF2</i>	- gen insulinopodobnego czynnika wzrostowego drugiego (ang. <i>Insulin-like Growth Factor 2</i>)
IMF	- tłuszcz śródmięśniowy (ang. <i>Intramuscular Fat</i>)
kDa	- kilodalton, jednostka masy równa 1000 daltonów [Da].
LDH	- dehydrogenaza mleczanowa
<i>MC4R</i>	- gen receptora melanokortyny czwartej (ang. <i>Melanocortin 4 Receptor</i>)
MgCl ₂	- chlorek magnezu
N	- liczba osobników
n-3 PUFA	- długołańcuchowe wielonienasycone kwasy tłuszczowe z rodziny omega-3 (ang. <i>long chain polyunsaturated fatty acids</i>)
NAD ⁺	- forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADH	- forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NADPH	- forma zredukowana kationu fosforanowego dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego
NCBI	- bioinformatyczna baza danych (ang. <i>National Center for Biotechnology Information</i>)

pbz	- świnia rasy polska biała zwisłoucha
PCR	- reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>polymerase chain reaction</i>)
PCR-HRM	- proces polegający na denaturacja DNA z wysoką rozdzielczością (ang. <i>Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting</i>)
pH	- ilościowa skala kwasowości i zasadowości roztworów wodnych związków chemicznych (ang. <i>potential of hydrogen</i>)
pH45	- pH, którego pomiar został wykonany 45 minut po uboju
pH24	- pH, którego pomiar został wykonany 24 godziny po uboju
Pi	- HPO_4^{2-} , fosforan nieorganiczny
PIB	- Państwowy Instytut Badawczy
PPAR	- receptory aktywowane przez proliferatory peroksysomów, PPAR (ang. <i>peroxisome proliferator - activated receptor</i>)
PSE	- mięso jasne, miękkie oraz wodniste (ang. <i>pale, soft, exudative</i>)
pUC/ <i>MspI</i>	- marker DNA
pz	- para zasad (ang. <i>base pair</i>)
R	- oligonukleotyd tworzący nić komplementarną do nici biegnącej od 5' do 3' (ang. <i>reverse</i>)
RFLP	- polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (ang. <i>restriction fragments length polymorphism</i>)
RFN	- mięso odpowiedniej jakości (ang. <i>reddish-pink, firm, normal, non-exudative</i>)
<i>RN</i>	- gen kwaśnego mięsa
<i>RYR1</i>	- gen kodujący receptor RYR1 (ang. <i>Ryanodine Receptor 1</i>)
SKURTCh	- Stacja Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej
SNP	- polimorfizm pojedynczego nukleotydu (ang. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
Tm	- temperatura topnienia starterów (ang. <i>melting temperature</i>)

- UV - promieniowanie ultrafioletowe (ang. *ultraviolet light*)
- wbp - świnia rasy wielka biała polska
- WHC - wodochłonność (ang. *water-holding capacity*)

1. Wstęp

Mięso od najdawniejszych czasów stanowi podstawowy składnik pożywienia człowieka. Ciągłe zmieniający się styl życia społeczeństwa zaczął w istotny sposób wpływać na technologię produkcji mięsa wieprzowego. Świadomy konsument wie czego oczekuje od kupowanego produktu. Duża wiedza dotycząca potrzeb żywieniowych człowieka przyczyniła się do tego, że mięso nie służy wyłącznie zaspokojeniu potrzeb pokarmowych, ale stanowi również źródło składników odżywczych wpływających na poprawę zdrowia. Producenci mięsa powinni spełniać oczekiwania konsumentów dostarczając na rynek produkty, które są smaczne i zdrowe. Zapotrzebowanie społeczeństwa na mięso o wysokiej wartości ciągle wzrasta. Zjawisko to przyczyniło się do zwiększenia rangi badań dotyczących jego jakości i jego prozdrowotnych wartości. Najczęściej spożywanym rodzajem mięsa w Polsce jest mięso wieprzowe. W związku z tym, że wieprzowina jest najbardziej preferowanym przez konsumentów rodzajem mięsa zapewnienie jak najwyższej jej jakości stanowi jedno z największych wyzwań dla hodowców i producentów trzody chlewnej.

2. Przegląd literatury

2.1. Jakość mięsa

Definicja jakości powstała wieki temu, została ona wprowadzona przez Cyncerona (Marcus Tullius Cicero) już w starożytności. Wywodzi się z łacińskiego słowa *qualis*, które oznacza – „jaki” lub „jakiego charakteru” (Brzóska 2001). Platon określił to pojęcie jako: „pewien stopień doskonałości”. Natomiast w dokumentach Międzynarodowej Organizacji Normalizacyjnej (ISO, ang. *International Organization for Standardization*) można odnaleźć następujące wyjaśnienie: ogół cech i właściwości wyrobu lub usługi, które decydują o zdolności wyrobu lub usługi do zaspokajania stwierdzonych i przewidywanych potrzeb (ISO 8402); stopień, w jakim zbiór inherentnych cech spełnia wymagania (ISO 9001:2000).

Jakość mięsa wieprzowego charakteryzowana jest przez szereg parametrów fizykochemicznych i sensorycznych (Karpiesiuk i in. 2013), są to m.in.: wartość odżywcza (kaloryczność, zawartość związków mineralnych, witamin, białka, tłuszczu), bezpieczeństwo zdrowotne (obecność toksyn, pasożytów, bakterii chorobotwórczych, wirusów, leków, metali ciężkich), właściwości technologiczne i sensoryczne (wodochłonność, kwasowość - pH, barwa, zawartość tłuszczu i białka, zapach, kruchość, soczystość, smak) (Kajak i in. 2007). Pojęcie to nie jest proste do zdefiniowania, zależy od szeregu czynników zarówno genetycznych (rasa, płeć), fizjologicznych (wiek, kondycja, stan zdrowotny), jak i środowiskowych (żywienie, system utrzymania, transport, ubój i obróbka poubojowa oraz sposób i warunki przechowywania mięsa) (Prasow i in. 2018, Tyra i Mitka 2015, Grela i in. 2013). Jakość mięsa to cechy, które nierozłącznie decydują o przydatności mięsa do dalszego przetwarzania i przechowywania. Są one także związane z zaspokojeniem potrzeb współczesnych konsumentów (Rosenvold i Andersen 2003). Jakość obejmuje także takie kryteria jak: bezpieczeństwo zdrowotne oraz przydatność do dalszej obróbki. Z kolei dla konsumentów ważnymi składowymi pojęcia jakości są przede wszystkim: soczystość, kruchość, pożądany zapach i smak (Sienkiewicz i Lewandowska 2012). Skład tuszy i jakość wieprzowiny można odpowiednio modyfikować poprzez selekcję, odpowiednie żywienie, krzyżowanie ras i linii (Woźniak i in. 2017).

Jakość mięsa to zagadnienie nie tylko szczególnie istotne dla przemysłu mięsnego XXI wieku, ale także dla osób, które spożywają mięso - obie kwestie są ze sobą silnie i niezaprzeczalnie połączone. Producenci mięsa powinni konsekwentnie dostarczać konsumentom produkty mięsne, które są smaczne, zdrowe i co najważniejsze bezpieczne.

W większości krajów rozwiniętych zapotrzebowanie na wysokiej jakości mięso ciągle wzrasta. Poprawa jakości uzyskiwanego produktu jest niezwykle istotna nie tylko z punktu widzenia jego przydatności dla przemysłu i przetwórstwa, ale przede wszystkim z punktu widzenia coraz bardziej wymagających konsumentów. Dlatego też poprawa jakości wieprzowiny, która w procesie selekcji świń w kierunku zwiększenia mięsności, stała się sucha i twarda (pozbawiona tłuszczu śródmięśniowego), zapewniłaby stałą konsumpcję produktów mięsnych. W związku z tym, ważne jest poznanie i zrozumienie procesów oraz czynników, które mogą w istotny sposób wpływać na cechy jakości mięsa (Górska 2016, Joo i in. 2013).

W ostatnich latach przemysł rozwija się w kierunku poprawy jakości mięsa - stała się ona istotna dla wszystkich segmentów produkcji wieprzowiny (PIC 2020). Konsumentom potrzebują smacznych i zdrowych produktów lokalnego pochodzenia (Nevrkla i in. 2017). Zapotrzebowanie społeczeństwa na mięso o wysokiej wartości ciągle wzrasta. Jest to bardzo interesujące zagadnienie dla polskich hodowców i badaczy. Wieprzowina jest nadal najczęściej spożywanym rodzajem mięsa w Polsce. Szacuje się, że spożycie wieprzowiny w 2021 roku wyniosło ok. 40,5 kg/mieszkańca. Było to o 0,5 kg mniej niż w roku poprzednim. Konsumpcja wołowiny natomiast wyniosła 4 kg. Z kolei spożycie drobiu podobnie jak mięsa wieprzowego zmniejszyło się o 0,5 kg/mieszkańca i wyniosło 30,5 kg. Ogólne spożycie mięsa (razem z podrobami) spadło o jeden kilogram w porównaniu do 2020 roku i wyniosło 79 kg/mieszkańca Polski (Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – Państwowy Instytut Badawczy, marzec 2022).

Podstawowe cechy charakteryzujące jakość mięsa wieprzowego to: **zawartość tłuszczu śródmięśniowego [%]; wodochłonność mięsa; parametry barwy w systemie CIE L*a*b*** (intensywność barwy mięsa); **pH połowicy 45 minut po uboju; pH połowicy 24 godziny po uboju; pH szynki 45 minut po uboju oraz pH szynki 24 godziny po uboju.**

2.1.1. Zawartość tłuszczu śródmięśniowego

Zwiększenie świadomości społeczeństwa w kwestii jakości pożywienia, a także żywieniowych aspektów spożywanej wieprzowiny ma ogromny wpływ na wzrostu rangi badań dotyczących jej jakości. Wiele z nich wykazało, że cechą mającą pozytywny wpływ na jakość mięsa wieprzowego jest zawartość tłuszczu śródmięśniowego (IMF, ang. *Intramuscular Fat*) (Sienkiewicz i Lewandowska 2012).

IMF jest zlokalizowany wewnątrz włókien mięśniowych i w tkance łącznej pomiędzy pęczkami włókienek mięśniowych (Blicharski i in. 2006). Można go pozyskać z komórek tłuszczowych i komórek mięśniowych, jak również w mniejszym stopniu z tłuszczu swobodnego w postaci wolnych kwasów tłuszczowych zawartych w naczyniach krwionośnych, osoczu i cytoplazmie komórek mięśniowych. Tłuszcz śródmięśniowy składa się z: triglicerydów (70%), fosfolipidów (25%), estrów cholesterolu, cholesterolu i wolnych kwasów tłuszczowych (5%) (Shi-Zheng i Su-Mei 2009). Fosfolipidy są głównym składnikiem błon komórkowych, a ich wkład w zawartość IMF jest prawie stały i porównywalny w grupie podobnych mięśni, ale zmienny pomiędzy różnymi typami mięśni (Shi-Zheng i Su-Mei 2009). IMF jest dodatnio skorelowany z procentową zawartością czerwonych włókien mięśniowych (typ I) oraz ujemnie skorelowany z zawartością białych włókien mięśniowych (typ II) (Hwang i in. 2010). Jednakże, jak wykazano w badaniach przeprowadzonych na świniaach, wzrost zawartości IMF jest przede wszystkim spowodowany wzrostem zawartości trójglicerydów. Trójglicerydy to tłuszcze proste, które stanowią podstawowy składnik tkanki tłuszczowej i które organizm wykorzystuje jako źródło energii. Organizm magazynuje je także w formie tkanki tłuszczowej, tworząc w ten sposób rezerwę energetyczną na wypadek głodu czy zwiększonej aktywności fizycznej. Liczne badania potwierdziły, że włókna mięśniowe typu I (oksydacyjne) zawierają znacznie więcej trójglicerydów niż włókna mięśniowe typu II (glikolityczne) (Malenfant i in. 2001).

Poziom IMF w mięsie może wahać się w bardzo szerokim przedziale, a wpływa na niego wiele czynników takich jak: gatunek, rasa, wiek oraz rodzaj mięśnia (Reardon i in. 2010). Zawartość IMF jest szczególnie ważna dla konsumentów, ponieważ wpływa ona na jakość sensoryczną i kulinarną mięsa wieprzowego, m.in. na: barwę, kruchość, soczystość, smak i zapach oraz skład kwasów tłuszczowych (FA, ang. *Fatty Acids*), decydujących o jego cechach prozdrowotnych (Nguyen i in. 2004; Shi-Zheng i Su-Mei 2009).

Niestety wieprzowina uzyskiwana od wysokoprodukcyjnych ras i linii charakteryzuje się niskim poziomem IMF. Niski poziom IMF nie dotyczy wszystkich mięśni w obrębie tuszy, narażone są głównie mięśnie białe o charakterze glikolitycznym, w tym najcenniejszy w półtuszy wieprzowej – mięsień najdłuższy grzbietu (łac. *musculus longissimus dorsi*). Programy hodowlane dla trzody chlewnej ukierunkowane są na obniżenie poziomu tłuszczu w tuszy. Jednakże, powinno to odbywać się tylko w kierunku ograniczania tłuszczu okrywowego. Natomiast zawartość tłuszczu śródmięśniowego powinna być systematycznie podnoszona, ponieważ determinuje ona parametry jakości mięsa (Tyra i Mitka 2015). Przyjmuje się, że dla mięsa dobrej jakości zawartość IMF mieści się w przedziale 2 - 3,5 %

(Wood 2008). Poziom IMF poniżej 1 % natomiast uznawany jest za niedopuszczalny, grożący obniżeniem smaku, soczystości i kruchości mięsa, które po obróbce termicznej staje się suche i łykowane (Schwörer i in. 2000).

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat zawartość mięsa w tuszach wieprzowych uległa znacznemu zwiększeniu. Jednostronna selekcja prowadzona w kierunku podniesienia mięsności i obniżenia otłuszczenia tuszy wpłynęła negatywnie na poziom tłuszczu śródmięśniowego (znaczący jego spadek). Wysiłki hodowlane były motywowane potrzebami społecznymi, zwłaszcza w Polsce, gdzie celem hodowli była wysoka wydajność mięsna. Dziś polskie świnie mają cienką słoninę, niską zawartość IMF i niekorzystne parametry tekstury, co wpływa na gorszy smak i niską przydatność technologiczną uzyskiwanego produktu (Tyra i Żak 2013). Tradycyjne metody hodowli są drogie i czasochłonne, ponieważ opierają się na ocenie dorosłych świń. Dlatego identyfikacja i wprowadzenie do hodowli markerów genetycznych związanych z pożądanym fenotypem zwierzęcia umożliwia precyzyjną selekcję i przyspieszenie postępu hodowlanego (Piórkowska i in. 2018).

2.1.2. Wodochłonność mięsa

Kolejną cechą mającą duże znaczenie dla jakości mięsa świń jest zdolność do zatrzymywania wody (WHC ang. *water-holding capacity*). Opisano i porównano kilka metod pomiaru WHC mięsa (Joo 2018). Powszechnie stosowane metody pomiaru WHC opierają się na przyłożonym ciśnieniu (Grau i Hamm 1953) lub sile odśrodkowej (Wierbicki i Deatherage 1958), po czym następuje pomiar utraty wody. Wodochłonność mięsa określa się jako zdolność zatrzymywania wody. Woda w mięsie jest utrzymywana przez białka mięśniowe w przestrzeniach kapilarnych mięśnia. W celu określenia wodochłonności najczęściej wykorzystywana jest metoda opisana przez Graua-Hamma (Grau i Hamm 1953). WHC jest to zdolność utrzymania wody własnej przez mięso oraz również zdolność do wchłaniania wody dodanej podczas procesu technologicznego. Inaczej można ją określić jako stosunek zawartości wody luźnej do zawartości wody całkowitej (Barbera 2009).

W mięsie występują 3 rodzaje wody: związana, unieruchomiona oraz wolna. Największy udział w wodzie całkowitej, bo aż 80% stanowi woda unieruchomiona w miofibrylach i błonie komórkowej. Na pozostałą ilość składa się woda wolna, a jej przepływ z tkanki nie jest zahamowany. Stwierdzono, iż przydatność technologiczna mięsa jest tym większa, im większą część wody w nim stanowi woda związana (Honikel 2009).

WHC oraz stopień zatrzymywania wody przez mięso zależy od wielu czynników, m.in.: zawartości białka, stopnia rozwinięcia powierzchni kontaktu białka z wodą, charakteru białka, pH, a także od obecności soli i dodatków, które wiążą wodę.

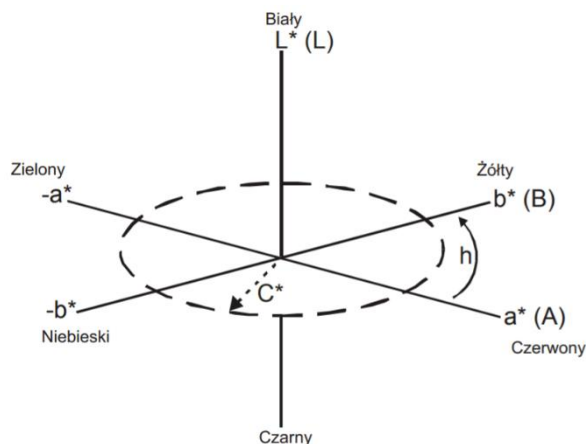
Zawartość wody luźnej określana jest poprzez wyznaczenie powierzchni nacieku, jaki daje poddana naciskowi próba mięsa. Przy oznaczeniach przyjęto, iż 1 cm² nacieku równa się 10 mg wody luźnej (Różycki i Tyra 2010). Wodochłonność ma wpływ na soczystość mięsa, a także jego właściwości lepko-sprężyste. Jest również powiązana z ubytkiem masy mięsa na skutek jego obróbki cieplnej (Ponce-Alquicira 2007).

2.1.3. Parametry barwy w systemie CIE

Barwa surowców i produktów mięsnych jest pierwszą cechą towarzyszącą ocenie ich jakości. Stanowi ona jeden z głównych czynników istotnie wpływających na wielkość sprzedaży danego produktu. Określana jest jako „jeden z najważniejszych wyróżników konsumenckiej oceny mięsa” (O’Neill i in. 2003, Jakubowska i in. 2004). Barwę można określić jako sumę wrażeń, wywołanych energią promienistą widzialnej części widma elektromagnetycznego (380-780 nm) przekazywanych przez siatkówkę oka ludzkiego do systemu nerwowego (Horubała 1966), może być klasyfikowana metodami sensorycznymi oraz aparaturowymi (Jakubowska i in. 2004).

Międzynarodowa Komisja Oświetleniowa (CIE, fr. *Commission Internationale de l’Eclairage*) już w 1931 roku po przeprowadzeniu szeregu badań ustaliła czułość spektralną jaką posiada większość ludzi tzw. normalnego standardowego obserwatora o kącie widzenia 2° (pole widzenia) i dla tego pola ustaliła bodźce odniesienia promieniowania monochromatycznego. Jednym z najczęściej stosowanych systemów w ocenie barwy mięsa jest CIE LAB (L*a*b*), który uwzględnia trzy psychofizyczne atrybuty barwy. Cechy (atrybuty) barwy to: odcień, nasycenie i jasność. Barwy achromatyczne (od bieli poprzez szarości do czerni) posiadają tylko jedną cechę – jasność. Pozostałe barwy nazwane chromatycznymi charakteryzują się wszystkimi trzema cechami (Gozdecka 2006). Oznaczenie barwy mięsa dokonuje się aparatem Minolta CR-310. Graficzną interpretację wyniku w systemie L*a*b* ilustruje rycina zamieszczona poniżej (Rycina 1). Wszystkie parametry mogą przyjmować wartości od 100 do –100. Parametr **L*** oznacza intensywność (jasność) danej barwy. Wartość ujemna parametru **b*** oznacza intensywność barwy niebieskiej, natomiast wartość dodatnia tego parametru oznacza intensywność barwy żółtej.

Podobna interpretacja odnosi się do parametru a^* gdzie wartość ujemna oznacza intensywność barwy zielonej, wartość dodatnia barwy czerwonej (Różycki i Tyra 2010, Gozdecka 2006).



Rycina 1. Schemat bryły barw CIE LAB ($L^*a^*b^*$), L^*C^*h . Źródło: Gozdecka 2006.

Przemysł mięsny próbuje zrealizować zadanie, które ma na celu zatrzymanie naturalnej barwy mięsa jak najdłużej. Kolor, który zachęca konsumentów do nabycia mięsa wieprzowego to barwa szaroróżowa, taką jego barwę konsument kojarzy z dobrą jakością, powstaje ona w efekcie utlenowania mioglobiny. Tłuszcz śródmięśniowy (jego ilość i forma) jednak w pewnym stopniu także wpływa na odbiór tej cechy sensorycznej. Z racji swojej budowy chemicznej oraz składu tłuszcz jest postrzegany jako ciało achromatyczne (pozbawione barwy). Producenci i hodowcy poszukują metod, które pozwalają na zachowanie barwy przez jak najdłuższy czas oraz przyczynią się do ograniczenia występowania odbarwień powierzchni mięsa, co w efekcie pozwoli na podniesienie atrakcyjności mięsa (Zalewska i in. 2012).

2.1.4. Odczyn mięsa (pH)

Odczyn mięsa (pH) to stopień kwasowości mięsa uzależniony od stężenia jonów wodorowych obecnych w fazie płynnej mięsa oraz od jego buforowości. Wyróżnia się 5 klas jakościowych mięsa wieprzowego, zależnych od powszechnie używanych wartości granicznych pH (Tabela 1).

Tabela 1. Klasy jakościowe mięsa według powszechnie uznanych wartości granicznych pH. Przybylski i in. 2012.

Typ mięsa	Wartości graniczne
PSE mięso jasne, miękkie oraz wodniste (ang. <i>pale, soft, exudative</i>)	pH1 < 6,0
Częściowo PSE mięso częściowo jasne, miękkie oraz wodniste (ang. <i>pale, soft, exudative</i>)	pH1 ≥ 6,0 i pH3 < 6,0
ASE mięso kwaśne, delikatne oraz ciekące (ang. <i>acid, soft, exudative</i>)	pH1 ≥ 6,0, pH3 ≥ 6,0 i pH24 < 5,5
Normalne (RFN) mięso odpowiedniej jakości, czerwonaworóżowe, twarde, normalne, niecieknące (ang. <i>reddish-pink, firm, normal, non-exudative</i>)	pH1 ≥ 6,0, pH3 ≥ 6,0 i pH24 ≥ 5,5
Częściowo DFD mięso częściowo ciemne, twarde oraz suche (ang. <i>dark, firm, dry</i>)	pH1 ≥ 6,0, pH3 ≥ 6,0 i pH24 ≥ 5,8

pH1 – pH mierzone po 45 min od uboju, pH3 – pH mierzone po 3 godz. od uboju, pH24 – mierzone 24 godz. od uboju

W dużym stopniu różnorodność cech jakości mięsa wieprzowego spowodowana jest intensywnością oraz obszarem przemian glikolitycznych i energetycznych *post mortem*, charakteryzujących się zakwaszeniem tkanki mięśniowej w okresie poubojowym i wskaźnikiem przemian energetycznych. Do podstawowych kryteriów diagnozujących podstawowe klasy jakości mięsa wieprzowego, tj. RFN (mięso o prawidłowych parametrach jakości – tzw. mięso normalne), PSE (jasne, miękkie, wodniste), DFD (ciemne, twarde, suche) i AM (tzw. mięso kwaśne), zalicza się odczyn pH w okresie od 35 min do 24-48 h *post mortem*, przewodność elektryczną (EC) w 2, 3 i 24 h po uboju, jak również wskaźnik informujący o rozpadzie energii (Koćwin-Podsiadła i in. 2009).

Oznaczenie kwasowości mięsa przeprowadzane jest w dwóch odstępach czasowych:

- 45 minut po uboju (pH45),
- w 24 godziny po uboju (pH24),

za pomocą urządzenia pomiarowego pHCPU-Star firmy Mathaus.

Urządzenie do pomiaru składa się ze szklanej elektrody pomiarowej. Pomiaru pH dokonuje się dla dwóch mięśni: w mięśniu najdłuższym grzbietu (połędwicy) oraz w mięśniu szynki. pH 45 minut po uboju w mięśniu najdłuższym grzbietu pomiar wykonywany jest między ostatnim kręgiem piersiowym i pierwszym kręgiem lędźwiowym po odsłonięciu warstwy tłuszczu podskórnego i dokonaniu nacięcia mięśnia na głębokość około 2 cm w głąb i całkowitym wbiciu elektrody szklanej w miejscu nacięcia. Wartość odczytywana jest po ustabilizowaniu pomiaru (po ok. 1 min od wbicia elektrody w mięsień) z dokładnością do 0,01. Pomiaru pH45 w mięśniu szynki dokonuje się w środkowej części odsłoniętej płaszczyzny mięśnia szynki. Podobne pomiary wykonywane są w 24 godziny po uboju. Co ważne, pomiar pH24 najdłuższego mięśnia grzbietu wykonywany jest w 3 miejscach: w centralnym punkcie powierzchni przecięcia mięśnia najdłuższego grzbietu pomiędzy ostatnim kręgiem piersiowym i pierwszym kręgiem lędźwiowym części lędźwiowej mięśnia, oraz w dwóch punktach oddalonych o około 2 cm od punktu centralnego (Różycki i Tyra 2010).

2.1.5. Oznaczanie genotypu zwierząt w locus *RYRI*

U świń mutacja w genie *RYRI* jest szczególnie znana i badana w aspekcie jej związku z cechami produkcyjnymi. Sam gen *RYRI* został uznany za gen główny, a mutacje w jego obrębie są powszechnie wykorzystywane w selekcji świń w wielu krajach. Gen *RYRI* zbudowany jest z 28080 par zasad i został zmapowany w chromosomie 6p11-6q21. Potocznie nazywany jest również „genem podatności świń na stres”. Ma ona duży wpływ na cechy użytkowe trzody chlewnej. Zmiana sekwencji aminokwasowej tego genu w pozycji 614 przyczynia się do zamiany powstającego białka z argininy na cysteinę (p.Arg614- Cys; c.1843C>T; rs118192172). Mutacja ta jest głównym czynnikiem genetycznym warunkującym występowanie hipertermii złośliwej (ang. *malignant hyperthermia*). Obecność mutacji w genie *RYRI* warunkuje także zmniejszenie odporności zwierząt na czynniki stresowe (Ropka-Molik i in. 2017). Następstwem miopatii stresowych są również bardzo niekorzystne zmiany fizykochemiczne mięsa obniżające jego jakość technologiczną. Obserwuje się mięso typu PSE, czyli – blade, miękkie i wodniste (Janik i in. 2006, Kapelański i in. 1999).

Obecność niekorzystnego wariantu genu *RYRI* w populacji trzody chlewnej wielu krajów jest przyczyną znacznych strat w produkcji wieprzowiny. Jednocześnie jednak gen ten ma dodatni wpływ na niektóre cechy związane z użytkowością mięsą, jak zawartość mięsa w tuszy i powierzchnia oka połędwicy. Oznaczanie genotypu *RYRI* prowadzi się w oparciu o metodę PCR-RFLP (Różycki i Tyra 2010).

2.2. Glikoliza – kluczowy proces dla przemian w mięśniach *post mortem*

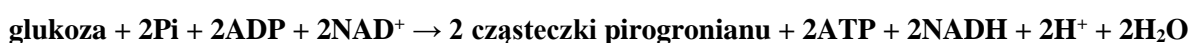
Definicja jakości mięsa mówi o tym, że jest to zespół wszystkich istotnych dla surowca mięsnego cech, decydujących o jego wartości użytkowej oraz cech precyzujących jego wartość odżywczą dla konsumenta. Oddzielnymi kryteriami jakości mięsa są wskaźniki określające bezpieczeństwo zdrowotne (Tyra i Mitka 2015).

Dla współczesnego konsumenta jednak, spośród licznych parametrów charakteryzujących mięso, najważniejsze są: barwa, kruchość, soczystość oraz smak i zapach. Na wymienione cechy wpływa szereg różnych czynników. Jednym z nich, który w znaczący sposób może wpływać na jakość mięsa są przemiany węglowodanów (Sienkiewicz i Lewandowska 2012). Pierwsze informacje dotyczące glikogenu, które zostały ogłoszone przez Bernarda w roku 1857 można przyjąć umownie za początek badań metabolizmu węglowodanów. Odkrycie metabolizmu glukozy, nastąpiło jednak dopiero w latach trzydziestych minionego stulecia (Dżugaj 2004). Glukoza metabolizowana do pirogronianu w procesie glikolizy jest głównym substratem energetycznym większości tkanek.

Wykazano również, iż poziom tłuszczów jest regulowany poprzez metabolizm glukozy, tym samym jest on nierozdzielnie związany ze szlakiem glikolitycznym. Warunkowanie tych cech może być kontrolowane przez różne geny. Z tego powodu niezbędna jest analiza genów kodujących enzymy biorące udział w procesie glikolizy i proteolizy, m.in. genów kandydujących dla tych cech (Lin 2009).

Glikoliza nazywana również szlakiem Embdena-Meyerhofa-Parnasa to szereg reakcji biochemicznych podczas, których jedna cząsteczka glukozy jest przekształcana w dwie cząsteczki pirogronianu.

Sumaryczna reakcja glikolizy przedstawia się w następujący sposób:



gdzie:

Pi - HPO_4^{2-} fosforan nieorganiczny;

ADP - adenozyno-5'-difosforan

NAD⁺ - forma utleniona dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego;

ATP - adenozyno-5'-trifosforan;

NADH - forma zredukowana dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego;

H⁺ - jon wodorowy (proton);

H₂O - wzór sumaryczny wody;

Tkanki, które zużywają tlen (aerobowe) metabolizują pirogronian do acetylo-CoA. Ten z kolei może wejść do cyklu kwasu cytrynowego i ulec całkowitemu utlenianiu do CO₂ i H₂O, połączonego z tworzeniem ATP w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Glikoliza może również zachodzić w warunkach beztlenowych (anaerobowych), ale wtedy końcowym produktem jest mleczan (Murray i in. 2006). Pirogronian jest punktem łączącym metabolizm węglowodanów (Nelson i Cox 2005). Proces glikolizy jest szeroko rozpowszechniony wśród organizmów żywych należących do wszystkich trzech typów, tj.: bakterie (łac. *Bacteria*), archeony (łac. *Archaea*), jądrowce (łac. *Eucarya*). Badania wykazały, że u eukariotów ten szlak metaboliczny występuje niemal we wszystkich komórkach i zachodzi w cytoplazmie podstawowej (Dżugaj 2004).

W komórkach poszczególnych tkanek np. takich jak mięśnie i wątroba znaleziono różne izoenzymy glikolizy, które katalizują te same reakcje. Badania wykazały również, że glikoliza jest precyzyjnie regulowana. Choć większość reakcji glikolitycznych jest odwracalna, to jednak trzy z nich są wyraźnie egzoergiczne i z tego powodu muszą być uważane za reakcje fizjologicznie nieodwracalne. Są to reakcje katalizowane przez: heksokinazę, fosfofruktokinazę i kinazę pirogronianową (Rycina 2). Reakcje te stanowią zasadnicze miejsca regulacji glikolizy (Murray i in. 2006, Dżugaj 2004). Pierwszy etap glikolizy katalizowany jest przez enzym heksokinazę (EC 2.7.1.1), która fosforyluje glukozę do glukozo-6-fosforanu. Jest to proces fizjologicznie nieodwracalny. Glukozo-6-fosforan utworzony w pierwszym etapie glikolizy może ulec różnym reakcjom w zależności od typu komórki oraz warunków fizjologicznych, w których proces zachodzi (Rycina 3) (Wilson 2003).

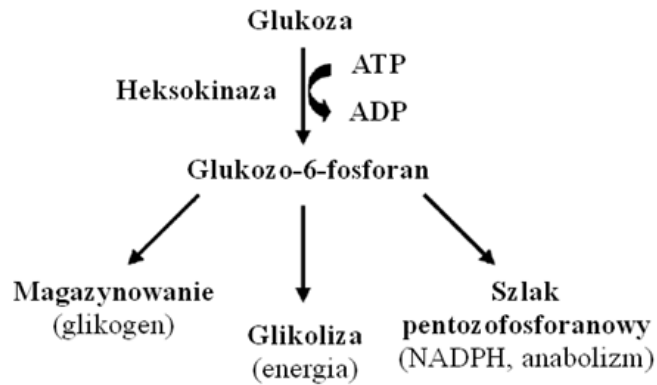
Podczas procesu tenderyzacji mięśnie przekształcane są w mięso, w wyniku procesu glikolizy, który rozpoczyna się bezpośrednio po uboju. Tempo i zakres spadku pH są skorelowane z jakością mięsa (Scheffler i Gerrard 2007; Ryu i Kim 2005; Hamilton i in. 2003). Potencjał glikolityczny (GP) jest miarą wszystkich związków obecnych w mięśniach, które mogą być przekształcane w mleczan, parametr ten jest wiarygodnym i szybkim predyktorem jakości wieprzowiny (Fontanesi i in. 2008; Miller i in. 2000).

Heksokinaza (HK) jest ważnym enzymem ograniczającym szybkość, który katalizuje reakcję degradacji glikogenu poprzez glikolizę, a tym samym wpływa na jakość wieprzowiny (Shen i in. 2015). Po uboju trójfosforan adenozyne (ATP), który podtrzymuje pośmiertne skurcze mięśni, jest dostarczany głównie przez rozkład fosfokreatyny i rozkład glikogenu do mleczanu (Henckel i in. 2002). W pierwszej kolejności rozkłada się fosfokreatyna, a po zużyciu 70% zawartości fosfokreatyny glikoliza spełnia z kolei zapotrzebowanie na ATP i towarzyszy jej nagromadzenie mleczanu i ciepła (Bendall 1951).

Kluczowymi enzymami glikolizy beztlenowej są heksokinaza, fosfofruktokinaza i kinazapirogronianowa. Ponadto, dehydrogenaza mleczanowa (LDH) katalizuje przemianę między pirogronianem i mleczanem biorącą udział w pośmiertnej glikolizie mięśni, a także pełni główną funkcję w metabolizmie beztlenowym mięśni. Enzymy glikolityczne występują w mięśniach w postaci rozpuszczalnej i związanej, różniące się właściwościami kinetycznymi, zwiększone wiązanie enzymów glikolitycznych służy do przyspieszenia przepływu glikolitycznego (Parra i in. 1995).



Rycina 2. Schemat reakcji glikolizy. Źródło: Murray i in. 2006 z modyfikacją własną.



Rycina 3. Fosforylacja katalizowana przez heksokinazę – pierwszy etap metabolizmu glukozy.
Źródło: Wilson 2003.

Fracja HK2 w mięśniach jest związana z zewnętrzną błoną mitochondrialną i ten związany enzym wykazuje kilkakrotnie podwyższoną aktywność katalityczną w porównaniu z rozpuszczalną postacią wolną (Parra i in. 1995). Aktywność związanej LDH nie jest hamowana przez wysokie stężenie pirogronianu (Li i in. 2017).

W mięśniach szkieletowych HK2 jest dominującą izoformą heksokinaz. Podobnie jak w glikolizie, w glikogenezie glukoza jest fosforylowana do glukozy-6-fosforanu w reakcji katalizowanej przez enzym heksokinazę w mięśniach. Glukozy-6-fosforan jest izomeryzowany do glukozy-1-fosforanu przez fosfoglukomutazę. Glukozy-1-fosforan uczestniczy w dalszych przemianach, które prowadzą do powstania glikogenu. Glikogen stanowi najważniejszą formę magazynowania węglowodanów w organizmie ssaków, obecną głównie w wątrobie i mięśniach. W mięśniach glikogen stanowi przede wszystkim gotowe źródło paliwa metabolicznego wykorzystywanego przez komórki (Murray i in. 2006).

Zawartość glikogenu w mięśniach może mieć wpływ na poziom i szybkość przebiegu glikolizy (Bee i in. 2007). Po wykrwawieniu, gdy mięśnie nie mają dostępu do tlenu niezbędnego do metabolizmu oksydacyjnego, można zaobserwować proces glikolizy beztlenowej, jest to bardzo istotna droga metaboliczna w okresie *post mortem*. Proces ten powoduje nagromadzenie się mleczanu w tkance mięśniowej (Pösö i Puolanne 2005; Bowker i in. 2000). Akumulacja mleczanu powoduje szybki spadek pH mięśni we wczesnym okresie pośmiertnym, kluczowy dla procesu maturacji i dojrzewania mięsa (Ryu i in. 2005). Taka właśnie szybka poubojowa glikoliza i gwałtowny spadek pH powoduje, że mięso ma jasną barwę, niekorzystną konsystencję i duży wyciek.

Wykazano, że przy bardzo dużym spadku pH (środowisko bardzo kwaśne) i podwyższonej temperaturze może nawet dojść do denaturacji wybranych białek i znacznego obniżenia jakości uzyskiwanego mięsa. pH jest zatem jednym z głównych czynników warunkujących barwę mięsa oraz zdolność wiązania wody, a co za tym idzie regulującym procesy oksydo-redukcyjne. Zmiany w zawartości metabolitów w mięśniach, w szczególności glikogenu i mleczanu, mogą tłumaczyć różnice w parametrach jakości mięsa (Ryu i Kim 2006).

U świń jak dotąd potwierdzono istotny związek genu *RN* (gen kwaśnego mięsa) warunkującego ilość glikogenu w mięśniach z jakością mięsa wieprzowego. Gen ten powoduje pojawienie się mięsa kwaśnego (ASE). Mięso z tą wadą cechuje się szybkim spadkiem wartości pH po uboju przez co staje się kwaśne, posiada wysoką zawartość glikogenu oraz jest miękkie i wodniste. Zjawisko to jest charakterystyczne dla rasy hampshire i jej mieszańców. Jednocześnie warto zauważyć, iż u mieszańców z 50-procentowym udziałem genów rasy hampshire (ze strony ojcowskiej), nosicieli genu *RN⁻* zaobserwowano istotnie wyższe dzienne przyrosty oraz większą masę wybranych mięśni (Enfält i in. 1997). Podczas innych analiz zauważono również statystycznie istotne różnice w długości tuszy na korzyść nosicieli genu *RN⁻*. Przeprowadzone badania potwierdzają, że proces glikolizy i jego regulacja istotnie wpływają na jakość mięsa u świń.

Drugi genem, który w szczególny sposób przyczynia się do wpływu na odczyn wieprzowiny jest gen *RYR1* (ang. *Ryanodine Receptor 1*). Jedna z mutacji (C1843T) zidentyfikowana w tym genie okazała się mutacją funkcjonalną silnie zintegrowaną z poubojowymi wadami mięsa wieprzowego (Fujii i in. 1991). Przyczyną wymienionej mutacji jest substytucja aminokwasu argininy na cysteinę. Lokalizacja Arg w N-końcowej części domeny kanału wapniowego, pojawienie się w jej miejscu cysteiny przyczynia się do przekształcenia receptora Ca^{2+} z 86 kDa na 99 kDa (Mickelson i in. 1992). Rezultatem tej zamiany jest otwarcie się kanału wapniowego bez możliwości jego ponownego zamknięcia, w wyniku tego zjawisko następuje niekontrolowane uwolnienie się Ca^{2+} do cytozolu. Do przemieszczania się Ca^{2+} do cytozolu nie jest niezbędna energia, natomiast przemieszczanie się jonów wapniowych w przeciwnym kierunku musi być wspomagane dodatkowym nakładem energii w formie ATP. Gdy kanał taki pozostaje niedomknięty przez dłuższy czas energia zostaje wyczerpana do dalszych procesów zostaje wykorzystany zapas glikogenu. W procesie glikogenolizy beztlenowej w mięśniach kumulowany jest kwas mlekowy, następuje wzrost przewodności elektrycznej, obniżenie pH oraz podwyższenie temperatury (Szczepankiewicz i Lechniak 2005; Gronek i in. 1998).

Mutacja w locus genu *RYRI*, w formie heterozygotycznej, przyczynia się jednocześnie do wzrostu mięsności – zawartości mięsa w tuszy, ale ma również negatywny wpływ na jego jakość (w formie homozygotycznej) (Cobanovic i in. 2019; Ropka-Molik i in. 2017).

2.3. Enzym heksokinaza

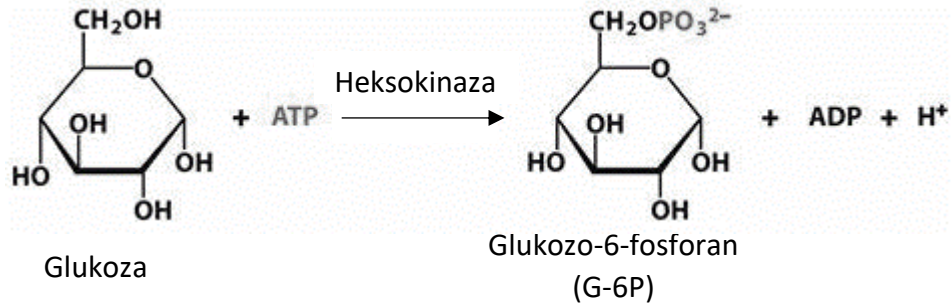
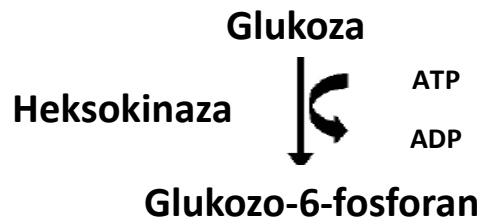
W tkankach ssaków heksokinaza występuje w czterech formach izoenzymatycznych oznaczanych jako heksokinaza 1 (HK1), heksokinaza 2 (HK2), heksokinaza 3 (HK3) i heksokinaza 4 (HK4, inaczej glukokinaza) (Tan i Miyamoto 2015; Wilson 2003). Każda izoforma tego enzymu zlokalizowana jest w innych tkankach i tak: HK1 jest dominującym izoenzymem w mózgu oraz erytrocytach, HK2 znajduje się głównie w tkankach mięśniowych, tkankach wrażliwych na insulinę oraz komórkach nowotworowych, HK3 zlokalizowana jest m.in. w wątrobie, płucach oraz nerkach (Sebastian i in. 2001), a HK4 znajduje się przede wszystkim w komórkach wysp trzustkowych i hepatocytach.

W odróżnieniu od pozostałych dwóch izoenzymów, izoenzymy HK1 oraz HK2, za pomocą hydrofobowej α -helisy, związane są z błoną mitochondrialną a poprzez oddziaływanie z kanałem VDAC odgrywają istotną rolę w hamowaniu apoptozy zachodzącej ścieżką mitochondrialną (Shoshan-Barmatz i in. 2009). Aktywność pozostałych dwóch izoenzymów ograniczona jest do specyficznych tkanek.

Wszystkie cztery izoenzymy są przystosowane do przeprowadzenia reakcji fosforylacji glukozy w różnych typach komórek (Konieczna i in. 2015; Shen i in. 2015; Steinke i in. 2006; Aleshin i in. 1998; Cardenas i in. 1998). HK2 zbudowana jest z dwóch domen: domeny N-końcowej, która posiada właściwości regulatorowe oraz domeny C-końcowej, która posiada właściwości katalityczne.

Heksokinaza katalizuje pierwszą reakcję szlaku glikolizy, polega ona na fosforylacji glukozy do glukozy-6-fosforanu, tym samym włącza glukozę do szlaku glikolitycznego (Mathupala i in. 1997). Jest to proces fizjologicznie nieodwracalny (Rycina 4).

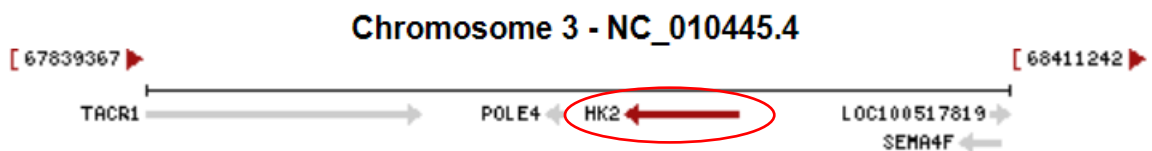
Wykazano, że heksokinaza 2 jest wiodącym enzymem glikolitycznym w tkankach wrażliwych na insulinę, tj.: mięśnie szkieletowe, serce oraz tkanka tłuszczowa (Heikkinen i in. 2000). Stwierdzono również, że zmiany w funkcji HK2 mogą przyczynić się do bezpośredniego wpływu na cechy związane z mięśniami szkieletowymi i tłuszczem (Woźniak 2017, Wilson 2003). Enzym ten kodowany jest przez gen *HK2* (NCBI, Gene ID: 494561).



Rycina 4. Schemat reakcji fosforylacji katalizowanej przez enzym heksokinazę.
 Źródło: Murray i in. 2006 z modyfikacją własną.

2.4. Gen *HK2*

Gen *HK2* (NCBI, Gene ID: 494561) został zmapowany w chromosomie 3 u świń (Rycina 5). *HK2* jest zbudowany z: regionu 5'UTR, 18 egzonów, 17 intronów oraz regionu 3'UTR.

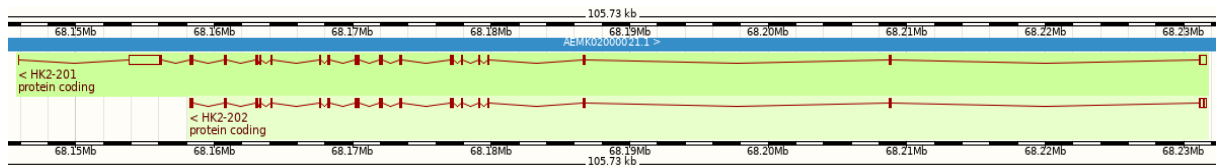


<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/494561>

Rycina 5. Lokalizacja genu *HK2* u *Sus scrofa domestica* w chromosomie 3.

Źródło: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Gen posiada dwa warianty splicingowe (ENSSSCG00000008261): *HK2-202* oraz *HK2-201* (Rycina 6). Wariant *HK2-202* (ENSSSCG00055013579.1) zbudowany jest z 19 eksonów, 917 aminokwasów, jego długość to 5382 pz. Natomiast *HK2-201* (ENSSSCT00055026857.1) zbudowany jest z 17 eksonów, 839 aminokwasów, a jego długość to 2884 pz.



Rycina 6. Warianty splicingowe genu *HK2*. Źródło: <https://www.ensembl.org>

Transkrypcja genu *HK2* może być regulowana insuliną, a mianowicie wykazano, że insulina podnosi ekspresję tego genu (Tan i Miyamoto 2015, Jun i in. 2006, Jun i in. 2012).

3. Cel pracy

Celem niniejszych badań była detekcja polimorfizmów w genie kodującym heksokinazę 2 (*HK2*) u świni domowej (łac. *Sus scrofa domestica*) oraz ustalenie potencjalnych zależności pomiędzy genotypami analizowanych fragmentów genu a cechami użytkowymi świń (tucznymi i rzeźnymi) oraz wybranymi parametrami jakości mięsa.

Tak postawiony cel pozwolił zweryfikować następującą hipotezę badawczą:

W sekwencji genu kodującego heksokinazę 2 występują zamiany polimorficzne, które w istotny sposób mogą wpłynąć na cechy fenotypowe badanych osobników.

4. Materiały i metody

4.1. Materiał doświadczalny

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano materiał pobrany od 722 loszek *Sus scrofa domestica* należących do trzech ras. Materiał badawczy stanowiły fragmenty tkanki mięśnia najdłuższego grzbietu (łac. *musculus longissimus dorsi*). Wśród ras przeznaczonych do badań występowały dwie rasy hodowlane, najczęściej utrzymywane w Polsce linie mateczne: wielka biała polska (wbp) i polska biała zwisłoucha (pbz) oraz jedna rasa zachowawcza: puławska (Tabela 2).

Tabela 2. Liczebność osobników poszczególnych ras przeznaczonych do badań.

Lp.	Rasa	Liczba osobników [n]
1	wielka biała polska (wbp)	197
2	polska biała zwisłoucha (pbz)	303
3	puławska	222

Hodowla zwierząt prowadzona była w Stacji Kontroli Użytkowości Trzody Chlewnej (SKURTCh) zlokalizowanej w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Chorzelowie. Wszystkie osobniki objęte doświadczeniem były utrzymywane w jednakowych warunkach odchowu i żywienia - zgodnie z metodyką stacyjną. Procedura ta, ma na celu zapewnienie jednakowych warunków chowu świń przeznaczonych do badań, co pozwala na eliminację wpływu efektu środowiska na otrzymane parametry jakości mięsa oraz wyniki użytkowości tucznej i rzeźnej.

Proces odchowu świń prowadzony był dwuetapowo (Tabela 3). Po osiągnięciu przez zwierzę masy około 30 kg rozpoczynał się tucz właściwy. Pasza, którą spożywały zwierzęta charakteryzowała się wysoką energetycznością oraz dużą zawartością aminokwasów egzogennych, właściwości te przyczyniły się do efektywnego przyrostu masy mięśniowej świń. Drugim etapem chowu był tucz końcowy, który rozpoczynał się po uzyskaniu przez zwierzę masy ciała 80 kg. Od tego momentu osobniki przeznaczone do badań żywiono paszą o niższej zawartości białka, aminokwasów egzogennych oraz niższej wartości energetycznej (Tabela 4).

Działania te uniemożliwiły nadmierne otłuszczanie się zwierząt, charakterystyczne dla tego etapu wzrostu. Osobniki kierowane były do uboju po osiągnięciu masy ok. 100 kg (± 0.5 kg). Wówczas również ważono je po raz ostatnio w celu wyznaczenia ich dokładnej masy końcowej.

Tabela 3. Skład poszczególnych pasz. Mieszanki pochodzą z firmy paszowej komercyjnej, skład procentowy komponentów jest tajemnicą firmy.

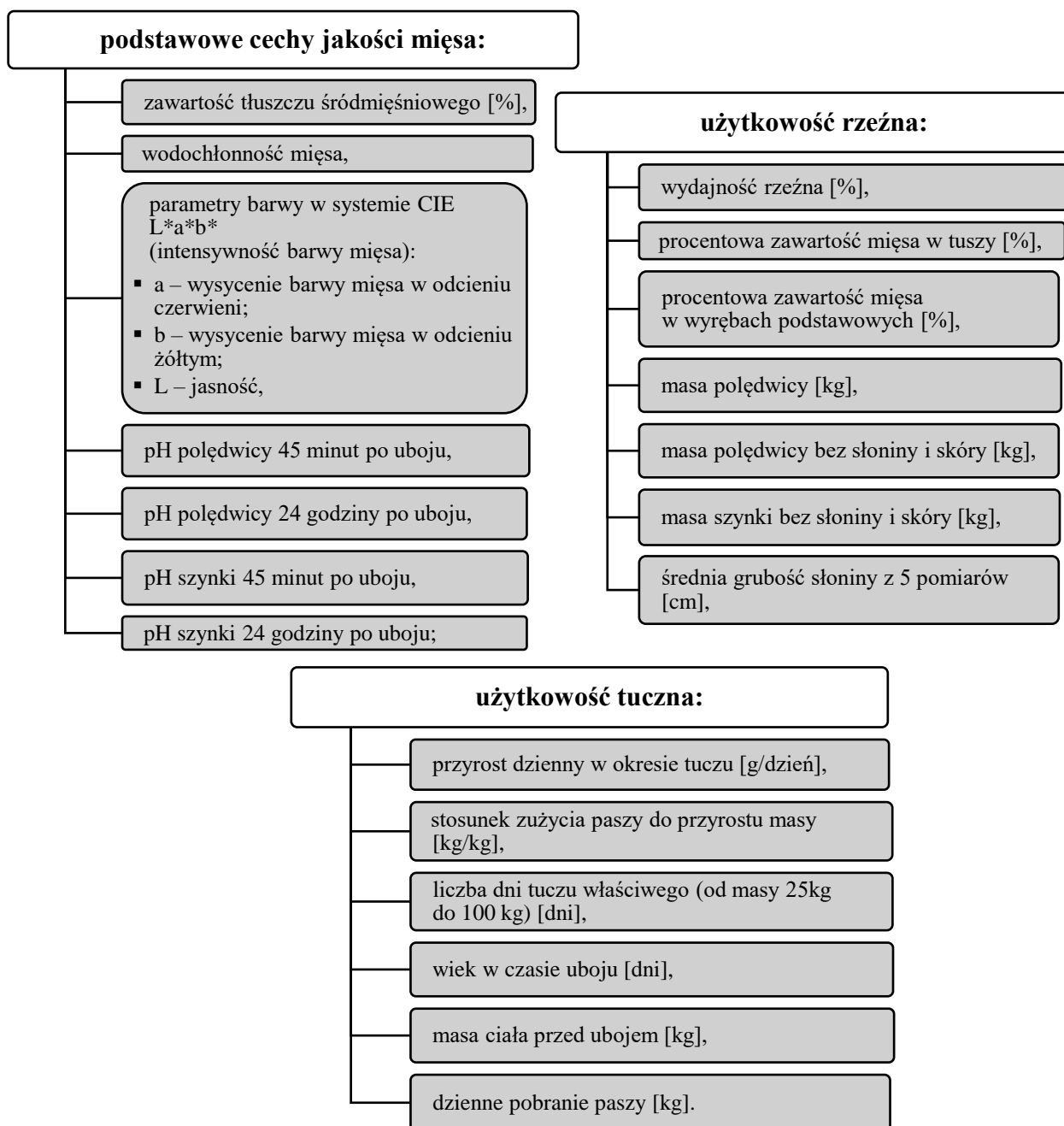
Nazwa paszy	Skład
Mieszanka I (30 – 80 kg)	Jęczmień, pszenica, otręby pszenne, śruta poekstrakcyjna sojowa, wywar gorzelniany zbożowy, węglan wapnia, śruta poekstrakcyjna słonecznikowa (bez łuski), oleje i tłuszcze roślinne, tłuszcz zwierzęcy (drób, wieprzowina), chlorek sodu.
Mieszanka II (80 – 100 kg)	Jęczmień, pszenica, otręby pszenne, kukurydza, śruta poekstrakcyjna sojowa, makuch z nasion rzepaku, makuch z nasion słonecznika, węglan wapnia, tłuszcz zwierzęcy (drób, wieprzowina), chlorek sodu, dwuwęglan sodu.

Tabela 4. Parametry pokarmowe paszy, którą były karmione zwierzęta.

Składniki	Jednostka	Mieszanka I	Mieszanka II
Energia metaboliczna min.	kcal/kg	3223,28	3104,02
Energia metaboliczna min.	MJ/kg	13,50	13,00
Białko ogólne min – max	%	17 – 19	16 – 18
Białko strawne min.	%	13,90	12,80
Tłuszcz surowy orient.	%	3 – 7	2 – 6
Kwas Linolowy min.	%	1,50	1,00
Laktoza min.	%	0,00	0,00
Włókno surowe min – max	%	2,5 – 4,5	3,0 – 5,0
Aminokwasy:			
Lizyna orient.	%	1,04	0,85
Lizyna przyswajalna min.	%	0,82	0,68
Metionina orient.	%	0,32	0,26
Metionina przyswajalna min.	%	0,29	0,23

Metionina + Cystyna orient.	%	0,64	0,52
Metionina + Cystyna przyswajalna min.	%	0,53	0,45
Tryptofan orient.	%	0,21	0,17
Tryptofan przyswajalny min.	%	0,16	0,14
Treonina orient.	%	0,67	0,53
Treonina przyswajalna min.	%	0,55	0,48
Makroelementy:			
Wapń min – max	%	0,7 – 0,9	0,8 – 1,0
Fosfor całkowity orient.	%	0,60	0,65
Fosfor dostępny min.	%	0,35	0,35
Sód min – max	%	0,15 – 0,20	0,15 – 0,20
Sól max	%	0,35	0,35
Mikroelementy:			
Mangan	mg/kg	25	
Cynk	mg/kg	70	
Żelazo	mg/kg	60	
Miedź	mg/kg	20	
Jod	mg/kg	0,4	
Selen	mg/kg	0,15	
Kobalt	mg/kg	0,100	
Witamina A	j. m.	6000	
Witamina D3	j. m.	1500	
Witamina E	mg/kg	25	
Witamina K	mg/kg	1	
Witamina B1	mg/kg	1	
Witamina B2	mg/kg	3	
Witamina B6	mg/kg	3	
Witamina B12	mg/kg	0,015	
Kwas Pantotenowy (Wit. B5)	mg/kg	10	
Niacyna (Wit. B3)	mg/kg	15	
Kwas Foliowy	mg/kg	0,5	
Biotyna	mg/kg	0,05	
Cholina	mg/kg	3	

Ubój wykonano poprzez wykrwawienie świń w następstwie przecięcia tętnic szyjnych a także żyły jarzmowej w pozycji horyzontalnej, po wcześniejszym ogłuszeniu prądem. W dalszym etapie zwierzęta poddano testowi kontrolnemu według procedury SKURTCh (Tyra i Żak, 2012). Po 24-godzinnym wychłodzeniu, prawe półtusze zostały dzielone na części wg przyjętych wzorców, co umożliwiło ustalenie składu tuszy oraz parametrów jakości mięsa. Analiza asocjacji zidentyfikowanych polimorfizmów w genie *HK2* obejmowała następujące cechy (Rycina 7):



Rycina 7. Cechy charakteryzujące istotne aspekty hodowlane świń.

Osobniki, od których uzyskano materiał wykorzystany do badań były wolne od mutacji C1843T w genie receptora rianodiny (*RYR1*).

Różnice w liczbie zwierząt występujące w grupach analizy asocjacji polimorfizmów w genie *HK2* z cechami tucznymi, rzeźnymi i jakością mięsa spowodowane są brakiem niektórych danych z oceny stacyjnej dla poszczególnych świń.

Oceny jakości mięsa dokonano na podstawie następujących wskaźników: barwy mięsa (aparat Minolta CR-310), pH45 i pH24 (aparat pomiarowy Mathaus), wodochłonność (zgodnie z metodyką Graua-Hamma) oraz zawartość tłuszczu śródmięśniowego (metodą Soxhleta).

4.2. Izolacja genomowego DNA

Wykorzystywane do badań genomowe DNA zostało wyizolowane z tkanki mięśnia najdłuższego grzbietu przy użyciu zestawów firmy A&A Biotechnology (Polska): Sherlock AX oraz Genomic Mini. Izolacji dokonano postępując zgodnie z protokołami załączonymi przez producentów.

Jakość uzyskanego DNA została oznaczona metodą spektrofotometryczną z wykorzystaniem aparatu NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, USA). Procedura ta pozwoliła na wyznaczenie czystości uzyskanego DNA przez analizę współczynnika A260/A280 oraz na określenie stężenia wykorzystywanego w badaniu kwasu nukleinowego. Określano stosunek absorbancji próbek przy długości fal: 260 nm oraz 280 nm. Współczynnik A260/A280 dla wszystkich próbek poddanych badaniu znajdował się w przedziale 1,6 – 2,0, w związku z tym wszystkie próbki uznano za wystarczająco czyste do przeprowadzenia kolejnych etapów doświadczenia. Uzyskane DNA zostało rozcieńczone w buforze TE (Genomic Mini, A&A Biotechnology, Polska) tak, aby jego końcowe stężenie wynosiło 100–200 ng/μl. Do momentu wykonywania dalszych analiz materiał przechowywano w temperaturze -20°C.

4.3. Metoda PCR-HRM

PCR-HRM (ang. *Polymerase Chain Reaction-High Resolution Melting*) to innowacyjna metoda umożliwiająca wykrywanie zmian mutacyjnych w amplikonie PCR. Technika ta polega na monitorowaniu zachowania wcześniej zamplifikowanych fragmentów DNA w trakcie procesu denaturacji. Porównanie profili topnienia poszczególnych fragmentów kwasów nukleinowych pozwala na selekcję fragmentów wykazujących różnice w przebiegu denaturacji, co odzwierciedla zmiany w sekwencji DNA (Reed i in. 2007).

Metoda jest wykorzystywana do przeprowadzania badań przesiewowych, umożliwia także wykrywanie mutacji typu insercja/delecja oraz mutacji punktowych typu SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). Proces przebiega w dwóch etapach - w pierwszym, badaną próbę poddaje się amplifikacji podczas reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) w obecności fluorescencyjnego barwnika interkalującego, który wbudowuje się w dwuniciową cząsteczkę DNA i powoduje emisję fluorescencji. W drugim etapie produkty reakcji PCR ulegają topnieniu w procesie denaturacji termicznej. Próbkę o wzorze krzywej topnienia odbiegającą od pozostałych zostają wytypowane do sekwencjonowania metodą Sangera jako potencjalnie posiadające zmiany polimorficzne (Żebrowska i in. 2011).

Wykorzystując powyższą metodę analizie poddano 18 fragmentów genu *HK2* obejmujących eksony 1 do 18. Startery do reakcji PCR-HRM zaprojektowano przy użyciu programu Primer3 v. 4.0.0 na podstawie dostępnej w bazie Ensembl sekwencji genu *HK2* (ENSSSCG00000008261). Sekwencje nukleotydowe użytych starterów, temperatury ich przyłączania oraz długości otrzymanych produktów PCR zamieszczono w Tabeli 5. Startery użyte do badań zostały zsyntetyzowane przez firmę Genomed (Polska).

Na początku doświadczenia startery przeznaczone do przeprowadzenia reakcji PCR-PCR-HRM zostały poddane analizie specyficzności uzyskiwanego produktu PCR z użyciem polimerazy AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems, Polska). Reakcja przebiegała w termocyklerze firmy Biometra (Niemcy). Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiał się następująco (Tabela 5):

Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR z użyciem polimerazy 360 AmpliTaq.

Odczynnik	Objętość przypadająca na 10 µl reakcji	Stężenie końcowe
Woda dejonizowana	5,052	–
Bufor 360 AmpliTaq 10x	1	1x
360 GC Enhancer	0,5	N/A
Polimeraza 360 AmpliTaq 5 U/µl	0,048	0,24 U/µl
dNTP 10 mM	0,8	0,8 mM
MgCl₂ 25 mM	0,8	2 mM
Mieszanina starterów 10 mM	0,3	0,3 mM
DNA 100–200 ng/µl	1,5	15–30 ng/µl

Warunki w jakich przeprowadzono reakcję podano w Tabeli 6.

Tabela 6. Profil termiczny reakcji PCR z użyciem polimerazy 360 AmpliTaq.

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94	600	1
Denaturacja właściwa	95	30	
Przyłączanie starterów	55	45	35
Wydłużanie nici DNA	72	45	
Wydłużanie końcowe	72	420	1
Zakończenie reakcji	4	∞	1

Zamplifikowane produkty poddano rozdzielni elektroforetycznej w 3% żelu agarozowym (Agarose Biotechnology Grade, BioShop, Kanada) z dodatkiem bromku etydyny (Sigma, USA) w obecności markera DNA pUC/MspI (A&A Biotechnology, Polska) w celu określenia ich wielkości. Na przygotowany żel agarozowy nanoszono mieszaninę: 5 µl produktu PCR i 1 µl buforu obciążającego (A&A Biotechnology, Polska). Do wizualizacji żelu posłużono się Transilluminatorem Essential V4 firmy Uvitec Cambridge (Wielka Brytania). O uzyskaniu specyficznego produktu świadczyły prążki znajdujące się na przewidywanej wysokości.

Kolejnym etapem doświadczenia było przeprowadzenie reakcji PCR-HRM, do której zastosowano zestaw KAPA™ HRM FAST PCR Kit (Kapa Biosystems, USA). Składnikami reakcji PCR-HRM były:

- 5 µl 2x KAPA HRM FAST Master Mix;
- 1 µl MgCl₂;
- 0,6 µl genomowego DNA (100–200 ng);
- 0,5 µl mieszaniny starterów F+R (10 µM);
- wszystkie powyższe składniki dopełniono sterylną, dejonizowaną wodą do objętości 10 µl.

Dla każdej pary zaprojektowanych starterów (Tabela 8) przeprowadzono analizę PCR-HRM wykorzystującą DNA pochodzące od wszystkich trzech badanych ras (razem 48 próbek DNA – po 16 z rasy). Badanie przeprowadzono przy użyciu aparatu QuantStudio 7

Flex (Applied Biosystems, USA). Profil termiczny reakcji przedstawiał się następująco (Tabela 7):

Tabela 7. Profil termiczny reakcji PCR-HRM KAPA™ HRM FAST PCR Kit.

Proces	Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Aktywacja polimerazy	Denaturacja wstępna	95	600	1
PCR (amplifikacja)	Denaturacja	95	15	40
	Hybrydyzacja	55	60	
HRM (krzywa topnienia)	Denaturacja	95	10	1
	Hybrydyzacja	55	60	
	Elongacja	95	15	
	Hybrydyzacja	55	15	

Tabela 8. Startery zastosowane do przeprowadzenia reakcji PCR-HRM i sekwencjonowania oraz długości otrzymanych amplikonów.

Fragment genu <i>HK2</i>	Sekwencje starterów wykorzystywane do reakcji PCR-HRM	Temperatura topnienia (T_m) [°C]	Wielkość produkt PCR [pz]	Sekwencje starterów wykorzystywane do sekwencjonowania	Temperatura topnienia (T_m) [°C]	Wielkość produkt PCR [pz]
ekson 1	F1: CCACATTGTTGCACGAACT R1: CCCGTGTTTGCTTACCTTCT	59	532	-	-	-
ekson 2	F2: TCCAGGTCGCTTCTTCTCAT R2: CCCTGAAGTCACCCATGTCT	60	262	-	-	-
ekson 3	F3: TCACCTTGCTTTTCCCAAC R3: CAAGCCTTAGTCAGGGTCTCC	60	305	-	-	-
ekson 4	F4: CAGCAAGTTCCCTTCTGAGC R4: CCAGCCCAAAGAATAAAGCA	60	259	-	-	-
ekson 5	F5: TGTGCACAGTGTGGTCTGAA R5: TCTGAAGACCCCAAAGGATG	60	228	-	-	-
ekson 6	F6: TTGCTCTTTCTCTTCATCGTCA R6: CTCTCCCTTCCCAATCCACT	60	231	-	-	-
ekson 7	F7: GGTGCAGCCCTAAAAAGACA R7: AGCACAAACATTCCCGTAACC	59	434	F1seq: GGTGCAGCCCTAAAAAGACA R1seq: AGCACAAACATTCCCGTAACC	59	434
ekson 8	F8: CCACAAGGAAGGTGTGAGGT R8: CATGCTGGGTGAGATCCTTT	60	348	-	-	-
ekson 9	F9: CCACACTGAGTGGACACCTG R9: CCAGAAAGTCAAGCCCTCTG	60	336	-	-	-

ekson 10	F10: GAACGAGTAGGGAGAGGGTGT R10: CACTAAGGCAAAGGGAGTCG	59	521	F2seq: GAACGAGTAGGGAGAGGGTGT R2seq: CACTAAGGCAAAGGGAGTCG	59	521
ekson 11	F11: CGTTAGGTGGAGCTCATGGT R11: CCTTGGACTGCCGTACAGAT	60	393	F3seq: CGTTAGGTGGAGCTCATGGT R3seq: CCTTGGACTGCCGTACAGAT	60	393
ekson 12	F12: GGTGGCTAGGAGGGTCAGG R12: AGTCCTTCCCCATGACTGGT	59	335	F4seq: GGTGGCTAGGAGGGTCAGG R4seq: AGTCCTTCCCCATGACTGGT	59	335
ekson 13	F13: GTTGCGAAACAGGTGTAGAA R13: ATTCCTGAATCCCCGGTTG	60	409	-	-	-
ekson 14	F14: GGCCTCTGAGGAAGTGACAT R14: TCTGTTTCTCCACCCATCC	60	287	-	-	-
ekson 15	F15: GGATGGGTGGGAGAAACAGA R15: CAAGAGAATGGGTGTGCTGG	59	350	-	-	-
ekson 16	F16: CTACACCAGAGCCACAGCAA R16: GTACCAACCGACCTCTGCAT	60	439	-	-	-
ekson 17	F17: GCCCTGAACTGAGTTTGAGAA R17: CTCCAAGCTGGGTGGTGA	60	545	F5seq: GCCCTGAACTGAGTTTGAGAA R5seq: CTCCAAGCTGGGTGGTGA	60	545
ekson 18	F18: CATGGTACTTCTCACCCCTCTCC R18: TGCAAGGAGGAGGTCTGTCT	60	760	F6seq: CATGGTACTTCTCACCCCTCTCC R6seq: TGCAAGGAGGAGGTCTGTCT	60	760

4.4. Sekwencjonowanie metodą Sangera wybranych fragmentów genu *HK2*

W wyniku otrzymanych za pomocą metody PCR-HRM danych wytypowano próbki różniące się krzywymi topnienia, które mogą świadczyć o występowaniu zmian w sekwencji nukleotydowej. Próby te poddano sekwencjonowaniu. Proces ten składał się z następujących etapów:

- 1) Amplifikacja PCR fragmentów genu *HK2* (eksonów: 7, 10, 11, 12, 17 oraz 18) zidentyfikowanych podczas reakcji PCR-HRM. Do amplifikacji poszczególnych fragmentów genu użyto starterów flankujących fragmenty genu przedstawione w Tabeli 3. Do uzyskania powyższych amplikonów wykorzystano polimerazę AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems, Polska). Skład oraz przebieg reakcji przedstawiono w Tabeli 4 oraz Tabeli 5.
- 2) Oczyszczanie produktów reakcji PCR metodą enzymatyczną przy pomocy zestawu Enzymatic Post-PCR immediate Cleanup (EPPiC, A&A Biotechnology, Polska), która składa się z dwóch enzymów hydrolizujących efektywnie nukleotydy oraz startery, które nie zostały wykorzystane podczas reakcji PCR.

Skład mieszaniny służącej do oczyszczania produktów PCR:

- 5 µl mieszaniny poreakcyjnej PCR
- 1,5 µl mieszaniny EPPiC.

Czas inkubacji mieszaniny w 37 °C wyniósł 15 min. Następnie dezaktywowano enzymy przez okres 15 minut w temperaturze 70°C. W efekcie otrzymano oczyszczony produkt PCR, wykorzystano jako matrycę do dalszych etapów.

- 3) Oczyszczone amplikony wykorzystano jako matryce do przeprowadzenia PCR do reakcji sekwencjonowania (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit; Thermo Fisher Scientific; Applied Biosystems). Skład mieszaniny oraz profil termiczny reakcji PCR „sekwencyjnego” przedstawiał się następująco (Tabela 9, Tabela 10):

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR sekwencyjnego

Odczynnik	Objętość przypadająca na 10 µl reakcji
Master Mix	0,125
Bufor Big Dye	0,937
BDX	2,0
Starter F lub R (10 pmol)	2,0
Woda dejonizowana	3,438
Produkt PCR po oczyszczaniu EPPiC	1,50

Warunki reakcji PCR sekwencyjnego (Tabela 10):

Tabela 10. Profil termiczny reakcji PCR „sekwencyjnego”

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	10min	25
Denaturacja właściwa	96	10s	
Przyłączanie starterów	55	5s	
Wydłużanie nici DNA	60	4 min	
Wydłużanie końcowe	brak		
Zakończenie reakcji	4		

- 4) Otrzymane produkty PCR poddano oczyszczaniu z wykorzystaniem zestawu BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, Polska). Skład mieszaniny służącej do oczyszczania przedstawiono w Tabeli 11:

Tabela 11. Skład mieszaniny BigDye® XTerminator™ Purification Kit

Odczynnik	Objętość przypadająca na 55 µl reakcji
SAM Solution	45
BigDye® XTerminator™	10

Składniki te dodano do 10 µl mieszaniny poreakcyjnej znajdującej się na 96-dołkowej płytce. Próby zworteksowano, zwirowano i odseparowano od mieszaniny BigDye® XTerminator™ Purification Kit.

Sekwencjonowanie próbek metodą Sanger'a zostało przeprowadzone z wykorzystaniem aparatu 3500 Genetic Analyzer XL (Applied Biosystems, USA). Uzyskane wyniki poddano analizie w programie Genetic Analyzer Software (Applied Biosystems, USA) oraz w programie FinchTV (Geospiza).

4.5. Określenie frekwencji zidentyfikowanych mutacji – PCR-RFLP, PCR-ACRS

W analizowanych fragmentach genu *HK2* wykazano obecność 15 mutacji. Dla dwóch zidentyfikowanych polimorfizmów, zmian typu SNP znajdujących się: w regionie splicingowym eksonu 7 (g.68177052A>G) oraz w eksonie 12 (g.68167661C>T) opracowano odpowiednią metodę molekularną (odpowiednio PCR-RFLP oraz PCR-ACRS) pozwalającą na oznaczenie frekwencji wybranych mutacji na większej grupie zwierząt. Polimorfizmy te mogą mieć potencjalny wpływ na poziom ekspresji badanego genu a tym samym na badane cechy fenotypowe świń.

Amplifikację badanych fragmentów genu *HK2* (Tabela 12) przeprowadzono w termocyklerze firmy Biometra przy wykorzystaniu polimerazy AmpliTaq® 360 DNA Polymerase (Applied Biosystems, Polska) według metodyki opisanej w punkcie 4.3. oraz KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix (2x) – PCR Touchdown (Kapa Biosystems, USA) (Tabela 13, Tabela 14).

Tabela 12. Sekwencje starterów wykorzystanych do namnożenia badanych fragmentów genu *HK2*.

Fragment genu <i>HK2</i>	Miejsce zmiany polimorficznej	Sekwencja starterów, wielkość produktu PCR (PCR, [pz])
ekson 7	g.68177052A>G	F1, R1, 434 pz
ekson 12	g.68167661C>T	F:TTGCTGATTCCTCGAGTACATGCGC R:AGGAGTGGTTCAGAATCAGTACAGCC 153 pz

Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR z użyciem polimerazy KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix (2x).

Odczynnik	Objętość przypadająca na 10 µl reakcji
Woda dejonizowana	4,5
2x KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix	5
Mieszanina starterów 10 mM	0,5

+ 1 µl DNA (100–200 ng/µl)

Tabela 14. Profil termiczny reakcji PCR z użyciem polimerazy KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix (2x).

Etap	Temperatura [°C]	Czas [s]	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95	180	1
Denaturacja właściwa	98	20	
Przyłączanie starterów*	60 - 65	15	30
Wydłużanie nici DNA	72	30	
Wydłużanie końcowe	72	300	1
Zakończenie reakcji	4	∞	1

*PCR typu touch down

Otrzymane produkty PCR poddano trawieniu restrykcyjnemu. Przygotowano mieszaninę reakcyjną, którą dodano do poszczególnych próbek, skład mieszaniny reakcyjnej na jedną próbę przedstawiono poniżej.

- 10 µl produktu PCR,
- 0,2 µl odpowiedniego enzymu restrykcyjnego,
- 2,2 µl buforu,
- 7,6 µl sterylnej, dejonizowanej wody;

Następnie inkubowano mieszaninę reakcyjną w temperaturze i czasie odpowiednimi dla danego enzymu restrykcyjnego (Tabela 15). W kolejnej części doświadczenia przeprowadzono analizę długości fragmentów restrykcyjnych poprzez elektroforezę w żelu agarozowym.

Enzymy restrykcyjne (firmy Thermo Fisher Scientific, USA) dla badanych zmian polimorficznych zostały wytypowane wykorzystując program Nebcutter v.2.0. Endonukleazy, długości fragmentów otrzymane po trawieniu enzymatycznym oraz fragmenty sekwencji DNA identyfikowane przez dany enzym przedstawiono poniżej (Tabela 15, Rycina 8, Rycina 9):

Tabela 15. Warunki reakcji PCR-RFLP oraz PCR-ACRS dla zidentyfikowanych polimorfizmów.

Fragment genu <i>HK2</i>	Miejsce zmiany polimorficznej	Enzym	Temperatura oraz czas trawienia restrykcyjnego	Wielkość fragmentów po trawieniu restrykcyjnym [pz]
ekson 7	g.68177052A>G	<i>TasI</i>	65 °C, 1h	TT: 282, 152 CC: 434 TC: 434, 282, 152
ekson 12	g.68167661C>T	<i>BstUI</i>	37 °C, 16h	GG: 128, 25 AA: 153 GA: 153, 128, 25

5'... ↓**A A T T** ...3'
3'... **T T A A**↑...5'

Rycina 8. Sekwencja rozpoznawana przez enzym *TasI*.

5'... **C G**↓**C G**...3'
3'... **G C**↑**G C**...5'

Rycina 9. Sekwencja rozpoznawana przez enzym *BstUI*

Produkty PCR po trawieniu restryktazami poddano rozdzielaniu elektroforetycznemu w 4,5 % żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (Sigma, USA), w obecności markera DNA Φ X174 DNA/*HinfI* (Fermentas, Litwa). Do wizualizacji żelu posłużono się Transilluminatorem Essential V4 firmy Uvitec Cambridge (Wielka Brytania).

4.6. Analiza statystyczna

Wybrane wartości liczbowe dotyczące cech mięsa, które uzyskano z kontroli stacyjnej świń powiązано ze zidentyfikowanymi wariantami polimorficznymi genu *HK2* odpowiadającym danemu zwierzęciu. Analizę statystyczną wyników wykonano za pomocą programu SAS v. 8. 02, z zastosowaniem procedury GLM (ang. *General Linear Model*).

Model w najbardziej rozbudowanej formie miał postać:

$$Y_{ijkl} = \mu + g_j + f_j + h_k + (fh)_{jk} + \alpha(x_{ijk}) + e_{ijkl}$$

gdzie:

Y_{ijkl} – mierzona cecha produkcyjna;

μ – średnia danej cechy;

g_j – stały efekt i – tego roku uboju;

f_j – stały efekt j -tej grupy genotypowej genu *HK2*;

h_k – stały efekt k -tej rasy;

$(fh)_{jk}$ – interakcja pomiędzy f_k genotypową grupą i rasą uwzględniana w modelu (gdy była istotna);

$\alpha(x_{ijk})$ – kowariancja na masę półtuszy uwzględniana dla wszystkich cech rzeźnych;

e_{ijkl} – błąd losowy.

Niepełna liczba osobników w testach dla danych ras była spowodowana brakiem dostępności kompletu danych z kontroli stacyjnej dla każdej badanej świni. Jednostki te zostały odpowiednio oznaczone w dalszym opracowaniu wyników.

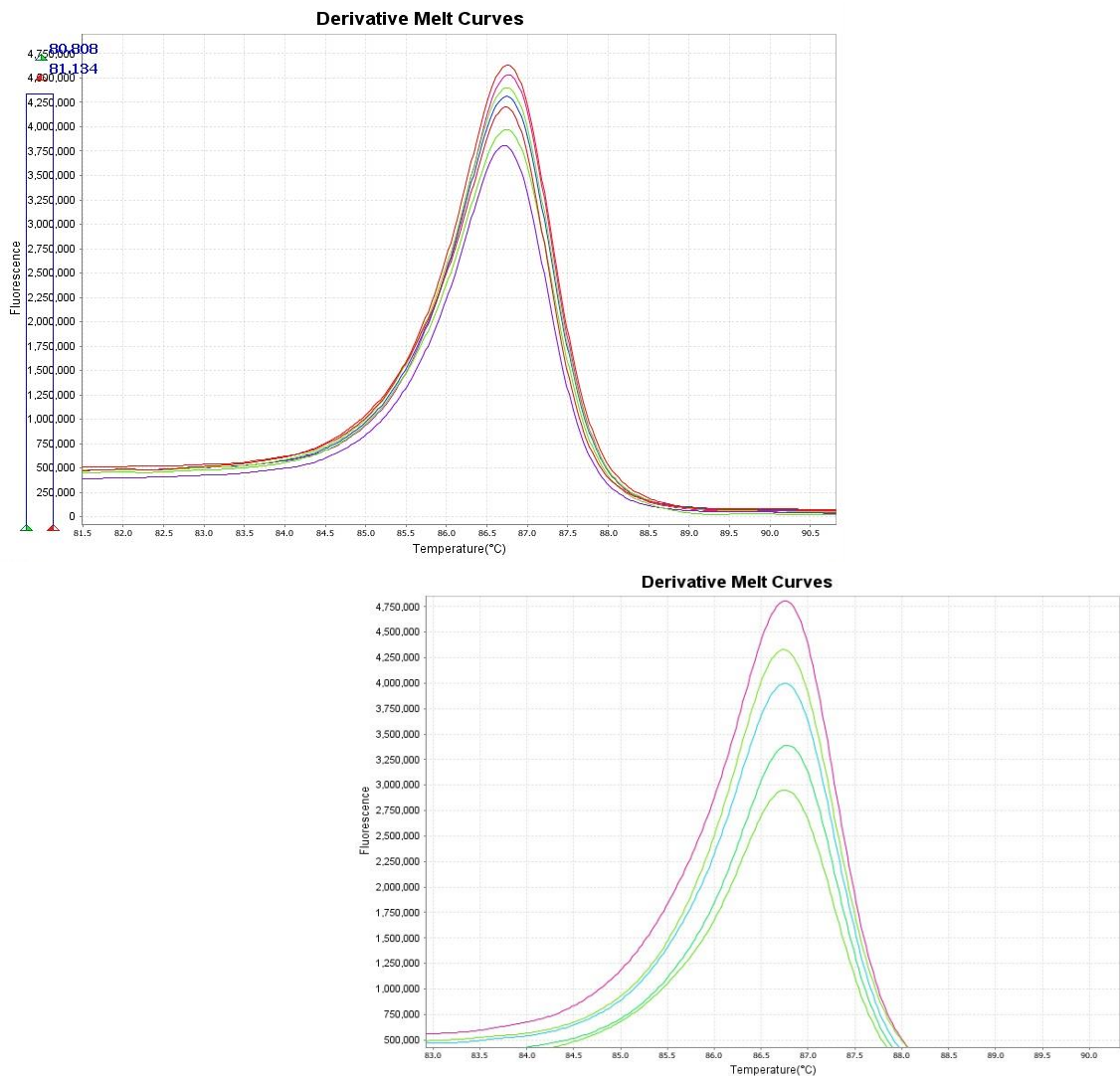
Stan równowagi Hardy Weinberga pomiędzy genotypami obliczono przy wykorzystaniu oprogramowania Court Lab – HW calculator (Michael H. Court (2005-2008)).

5. Wyniki

5.1. Analiza zmian wykrytych za pomocą metody PCR-HRM

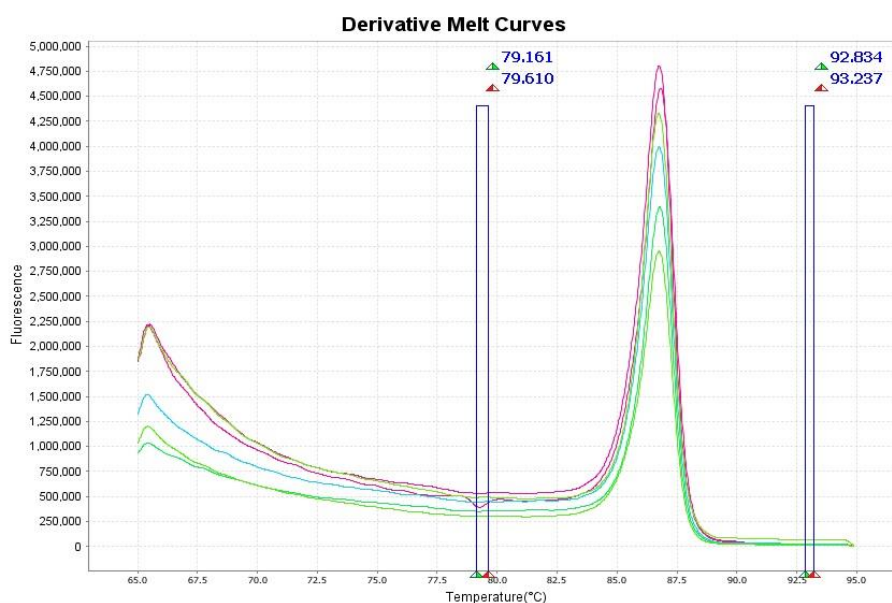
Wykryte polimorfizmy zidentyfikowano na podstawie występowania różnicy temperatur krzywych topnienia pomiędzy badanymi próbkami. Rozpoznano 15 zmian mutacyjnych w obrębie badanych fragmentów genu *HK2*. Przedstawione poniżej ryciny, obrazują wyniki poszukiwania polimorfizmów w poszczególnych regionach genu *HK2* z wykorzystaniem metody PCR-HRM (Rycina 10 - 16)

Dla eksonów: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 13, 14, 15 oraz 16 nie zaobserwowano różnicy w kształcie krzywych topnienia pomiędzy próbkami. Na podstawie tego wyniku można stwierdzić, że w rejonach tych nie występują żadne zmiany polimorficzne (Rycina 10).

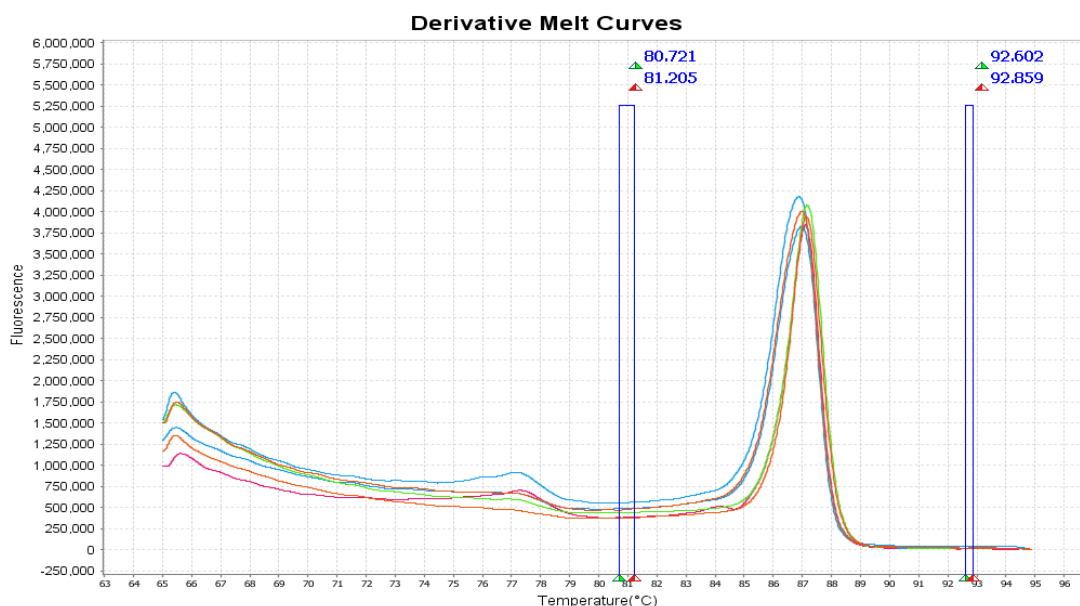


Rycina 10. Przykładowe wyniki analizy PCR-HRM dla genu *HK2*, na podstawie których nie zidentyfikowano występowania mutacji.

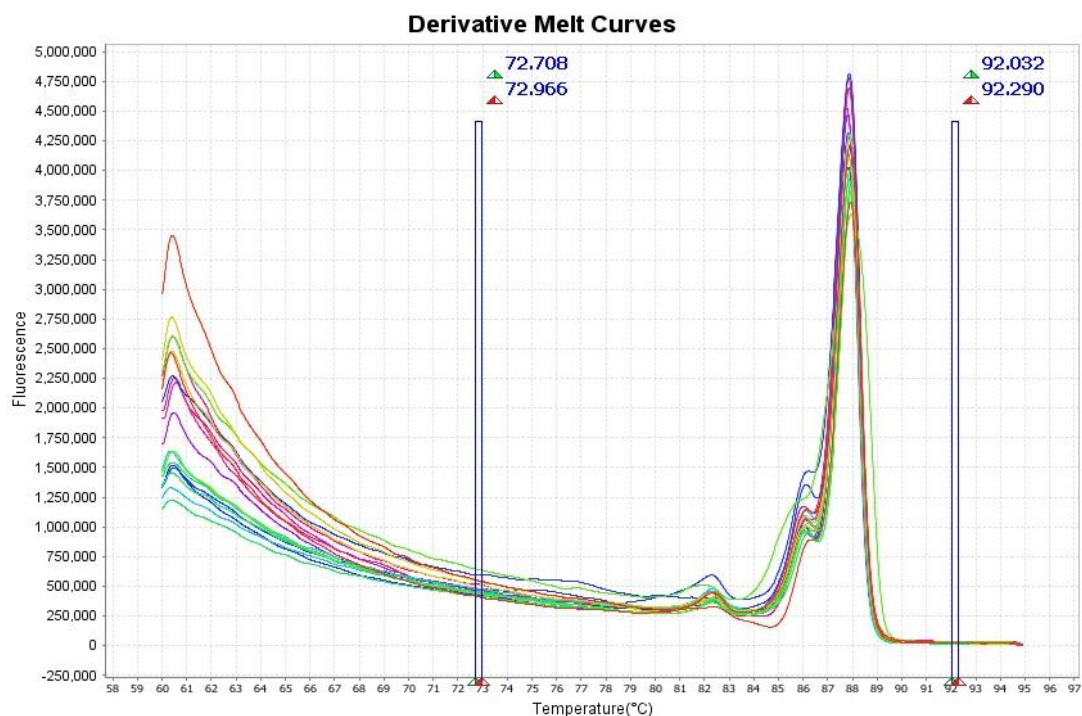
W przypadku eksonu: 7, 10, 11, 12, 17 oraz 18 zaobserwowano przesunięcie krzywych względem osi temperatury topnienia, co może świadczyć o potencjalnym występowaniu mutacji w rejonie genomu, w którym zostało przeprowadzone badanie (Rycina 11, 12, 13, 14, 15, 16). Spośród tych próbek wybrano kilka, które następnie zostały poddane reakcji sekwencjonowania metodą Sangera w celu potwierdzenia wyników reakcji PCR-HRM oraz zidentyfikowania mutacji.



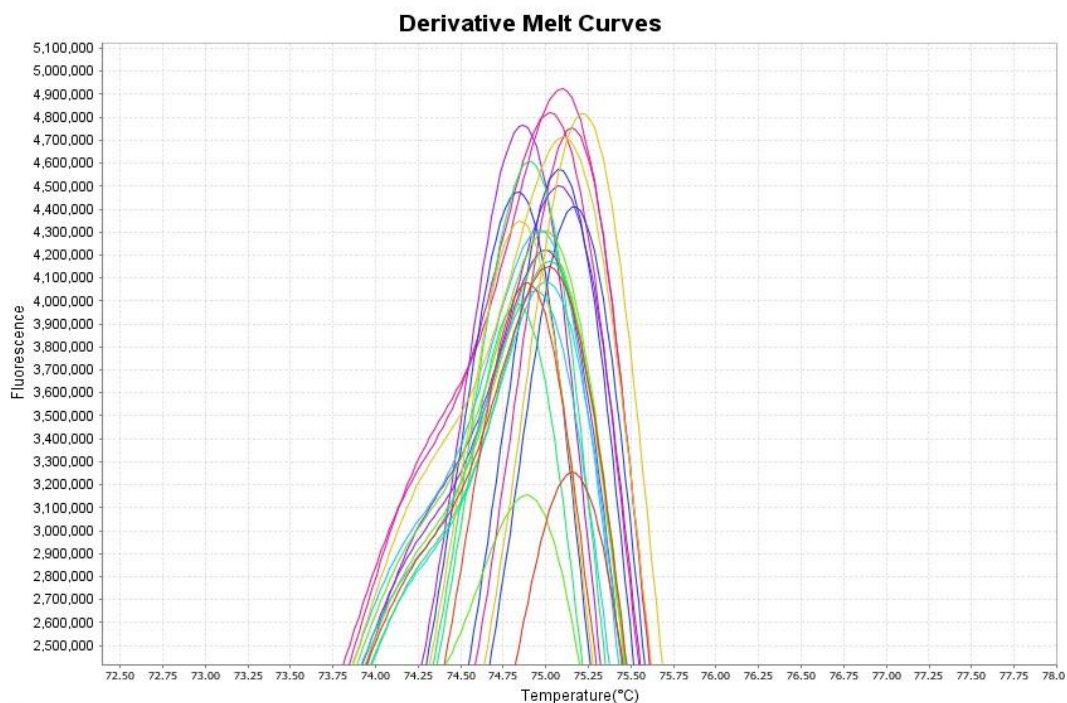
Rycina 11. Wyniki analizy PCR-HRM dla eksonu 7 genu *HK2*. Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę te poddano reakcji sekwencjonowania.



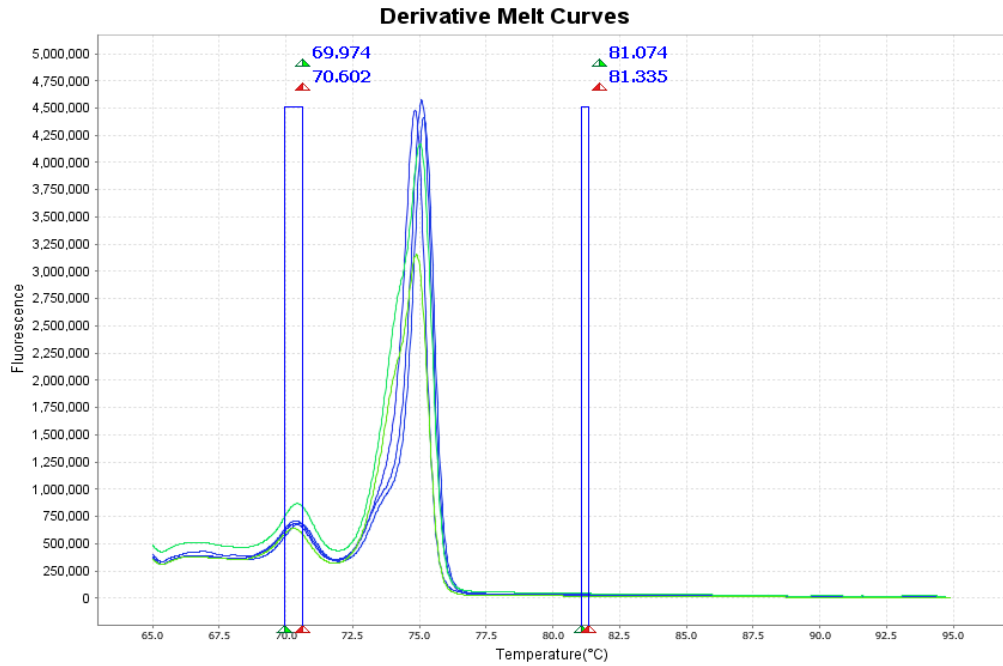
Rycina 12. Wyniki analizy PCR-HRM dla eksonu 10 genu *HK2*. Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę te poddano reakcji sekwencjonowania.



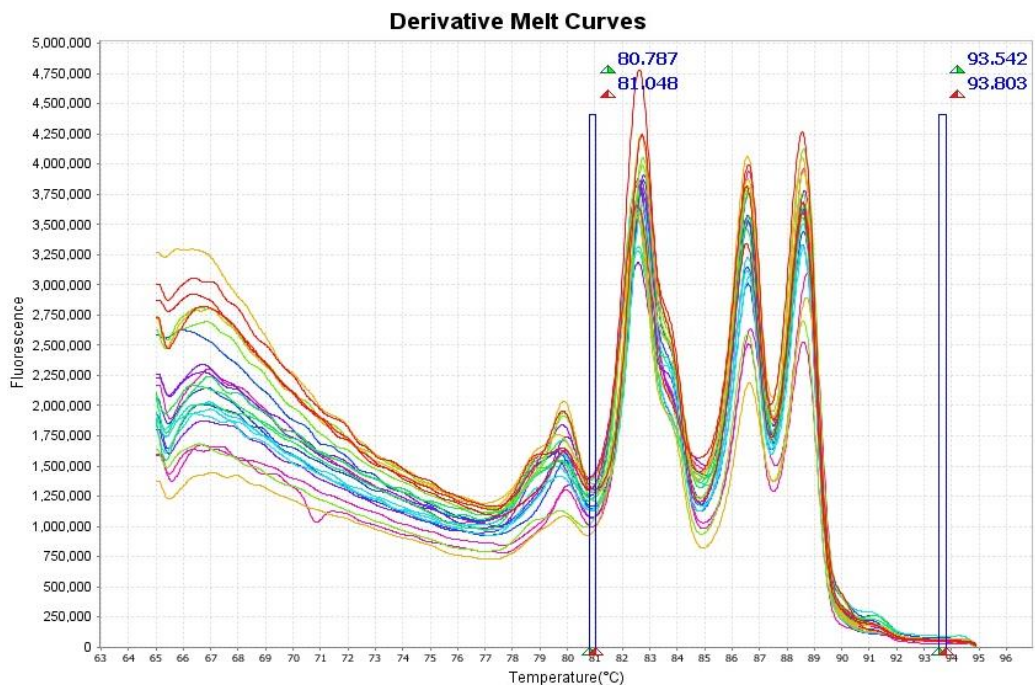
Rycina 13. Wyniki analizy PCR-HRM dla eksonu 11 genu *HK2*. Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę te poddano reakcji sekwencjonowania.



Rycina 14. Wyniki analizy PCR-HRM dla eksonu 12 genu *HK2*. Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę te poddano reakcji sekwencjonowania.



Rycina 15. Wyniki analizy PCR-HRM dla eksonu 17 genu *HK2*. Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę tę poddano reakcji sekwencjonowania.



Rycina 16. Wyniki analizy PCR-HRM dla eksonu 18 genu *HK2*. Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę tę poddano reakcji sekwencjonowania.

5.2. Identyfikacja wykrytych mutacji w genie *HK2*

Ciąg sekwencji nukleotydowych próbek wytypowanych za pomocą metody PCR-HRM poddano porównaniu pomiędzy sobą oraz z sekwencją referencyjną z wykorzystaniem programów BLAST (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*) oraz FinchTV (Geospiza) (Suplement). W wyniku tej analizy w obrębie intronów i eksonów genu *heksokinazy 2* zidentyfikowano 12 polimorfizmów typu SNP oraz 3 polimorfizmu typu insercja-delecja (Rycina 18, Tabela 16, Tabela 17, Tabela 18):

1) mutacje w regionach kodujących:

Tabela 16. Zidentyfikowane mutacje *HK2* znajdujące się w regionach kodujących.

Lokalizacja mutacji	Nazwa mutacji	rs	Rodzaj mutacji
ekson 7	ENSSSCT00000009047.3:c.705T>C NC_010445.4:g.68177221A>G	rs329315422	mutacja synonimiczna
<u>ekson 7</u>	<u>ENSSSCT00000009047.3:c.874T>C</u> <u>NC_010445.4:g.68177052A>G</u>	<u>rs324980355</u>	<u>mutacja</u> <u>w regionie</u> <u>splicingowym</u>
ekson 10	ENSSSCT00000009047.3:c.1341C>T NC_010445.4:g.68170400G>A	(ss3021042923) rs790524189	mutacja synonimiczna
ekson 10	ENSSSCT00000009047.3:c.1374G>A NC_010445.4:g.68170367C>T	(ss3021042922) rs320600732	mutacja synonimiczna
ekson 11	ENSSSCT00000009047.3:c.1599T>C NC_010445.4:g.68168346A>G	rs343242985	mutacja synonimiczna
ekson 11	ENSSSCT00000009047.3:c.1704T>C NC_010445.4:g.68168241A>G	rs332684428	mutacja synonimiczna
ekson 12	ENSSSCT00000009047.3:c.1752T>C NC_010445.4:g.68167680A>G	rs340837898	mutacja synonimiczna
<u>ekson 12</u>	<u>ENSSSCT00000009047.3:c.1771G>A</u> <u>NC_010445.4:g.68167661C>T</u>	<u>rs331710987</u>	<u>mutacja</u> <u>niesynonimiczna</u>
ekson 17	ENSSSCT00000009047.3:c.2547G>T NC_010445.4:g.68158274C>A	(ss3021042919) rs329503226	mutacja synonimiczna

2) mutacje w regionach intronowych:

Tabela 17. Zidentyfikowane mutacje *HK2* znajdujące się w regionach intronowych.

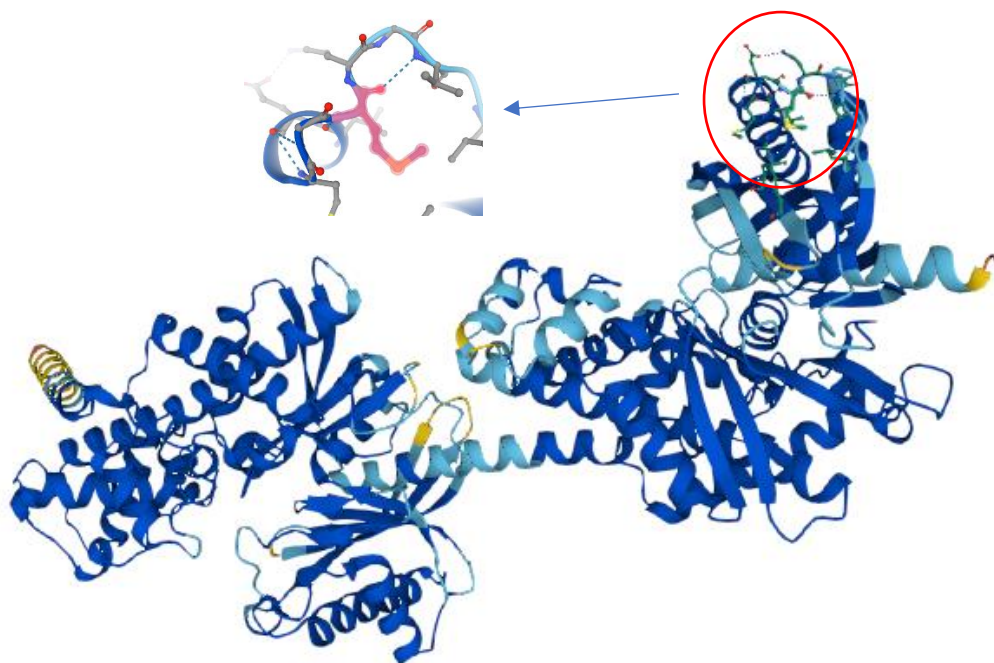
Lokalizacja mutacji	Nazwa mutacji	rs	Rodzaj mutacji
intron 6	ENSSSCT00000009047.3:c.692-13del NC_010445.4:g.68177251del	rs788819152	delecja nukleotydu
intron 7	ENSSSCT00000009047.3:c.875+66C>A NC_010445.4:g.68176985G>T	rs329985479	SNP
intron 11	ENSSSCT00000009047.3:c.1719+17_1719+20del NC_010445.4:g.68168211_68168214del	rs1110131036	delecja nukleotydu

3) mutacje w regionie 3'UTR:

Tabela 18. Zidentyfikowane mutacje *HK2* znajdujące się w regionie 3'UTR.

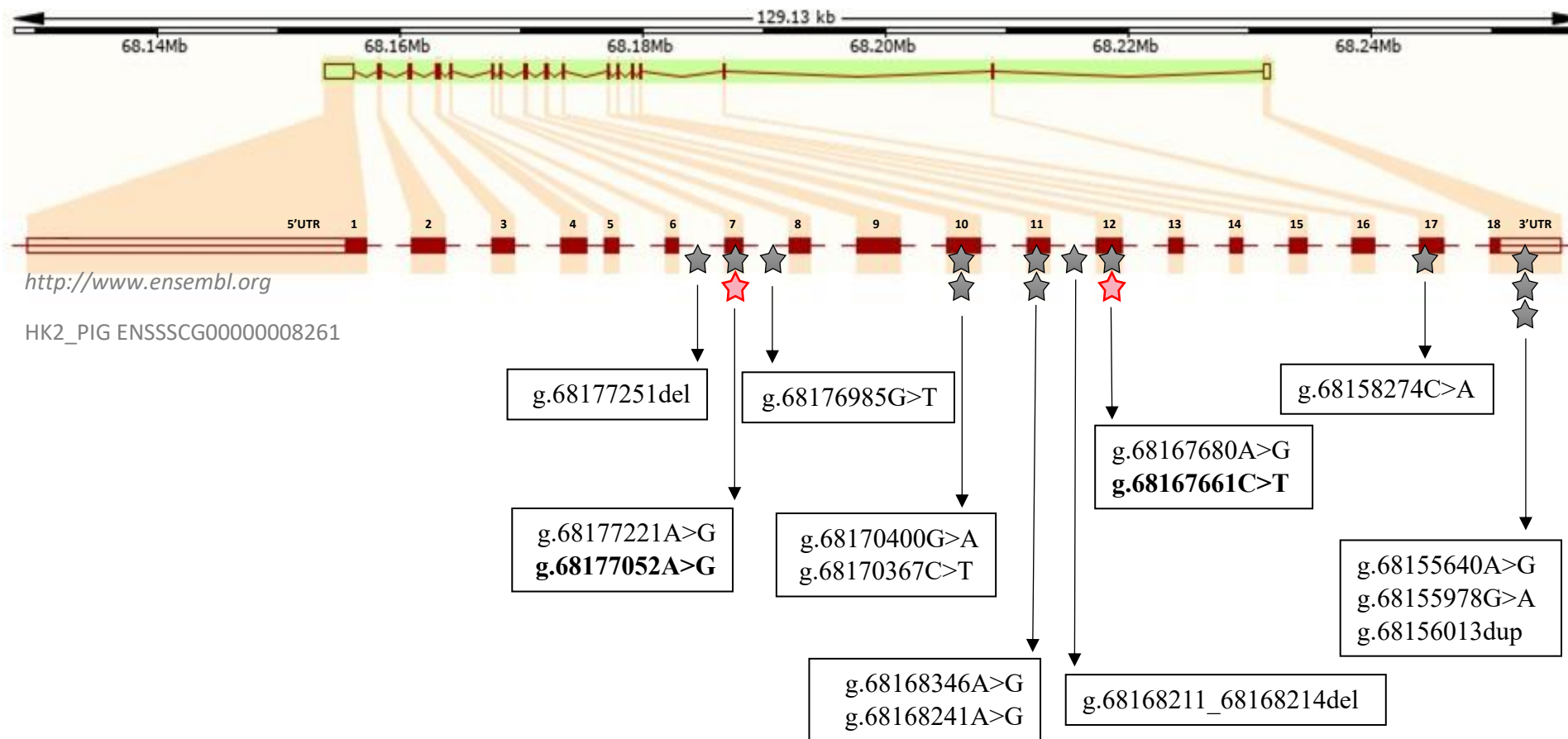
Lokalizacja mutacji	Nazwa mutacji	rs	Rodzaj mutacji
region 3'UTR	ENSSSCT00000009047.3:c.*375T>C NC_010445.4:g.68155640A>G	rs335938295	SNP
region 3'UTR	ENSSSCT00000009047.3:c.*37C>T NC_010445.4:g.68155978G>A	rs333537168	SNP
region 3'UTR	ENSSSCT00000009047.3:c.*6dup NC_010445.4:g.68156013dup	rs786716417	insercja nukleotydu

Dwie zmiany zidentyfikowane podczas analizy strukturalnej genu *HK2* wytypowane do dalszych badań ze względu na ich potencjalną funkcję. Jedną z nich to zmianą będącą mutacją synonimiczną znajdującą się w regionie splicingowym eksonu 7 (g.68177052A>G) mogącą mieć wpływ na proces transkrypcji i tym samym na ekspresję genu *HK2*. Drugą natomiast jest zmianą niesynonimiczną zlokalizowaną w eksonie 12 (g.68167661C>T) powodującą zmianę aminokwasów Walinę/Metioninę w sekwencji powstającego białka (Rycina 17).



Rycina 17. Rycina obrazująca lokalizację mutacji g.68167661C>T w białku *HK2*.

Źródło: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q1W674>



★ zidentyfikowane mutacje ciche lub zmiany typu in/del
 ☆ zidentyfikowane mutacje wytypowane do oznaczenia na większym materiale

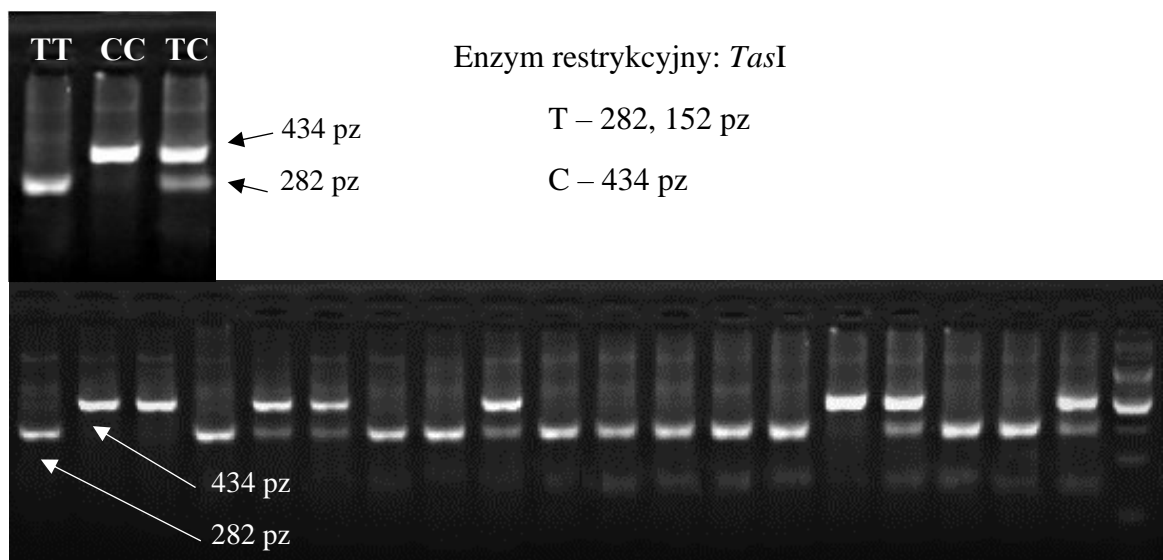
Rycina 18. Graficzny schemat przedstawiający lokalizację zidentyfikowanych polimorfizmów w genie *HK2*.

5.3. Częstość występowania poszczególnych genotypów i alleli genu *HK2* w odniesieniu do badanych ras

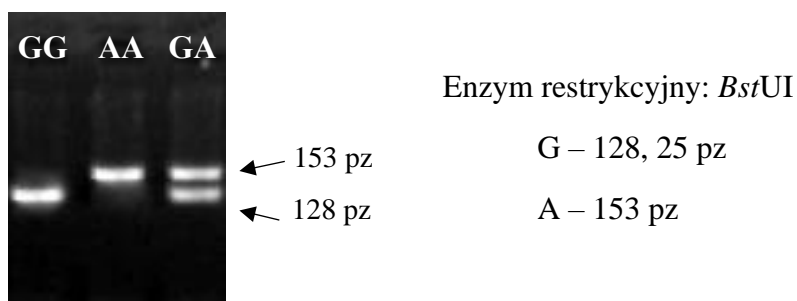
Poprzez zastosowanie metody PCR-RFLP oraz metody PCR-ACRS określono częstość występowania zamian polimorficznych dla dwóch zmian SNP spośród wszystkich zidentyfikowanych:

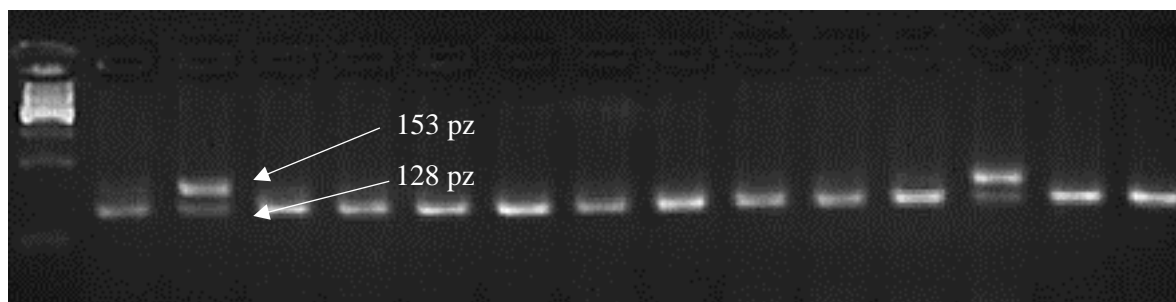
- zmiany znajdującej w regionie splicingowym eksonu 7 (g.68177052A>G) (Rycina 19)
- oraz zmiany znajdującej się w eksonie 12 (g.68167661C>T) (Rycina 20).

Analiza ta pozwoliła na identyfikację trzech genotypów dla każdej badanej mutacji.



Rycina 19. Obraz elektroforetyczny polimorfizmu g.68177052A>G. Wynik otrzymany po rozdziale elektroforetycznym amplikonów PCR w 4,5% żelu agarozowym, z dodatkiem bromku etydyny i poddane wizualizacji w świetle UV po wcześniejszym zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *TasI*.





Rycina 20. Obraz elektroforetyczny polimorfizmu g.68167661C>T. Wynik otrzymany po rozdzieleniu elektroforetycznym ampliconów PCR w 4,5% żelu agarozowym, z dodatkiem bromku etydyny i poddane wizualizacji w świetle UV po wcześniejszym zastosowaniu enzymu restrykcyjnego *Bst*UI.

5.3.1. Polimorfizm g.68177052A>G

W przypadku analizy polimorfizmu g.68177052A>G biorąc pod uwagę wszystkie poddane badaniu rasy łącznie (wbp, pbz, puławska) najczęściej występującym genotypem, był genotyp homozygotyczny TT (79%). Heterozygoty TC stanowiły 18% całej badanej populacji. Podobną frekwencję zaobserwowano w przypadku rasy pbz (genotyp TT – 83%, genotyp TC – 16%). Natomiast wśród osobników rasy wbp zidentyfikowano tylko osobniki o dwóch genotypach: TT oraz TC. Wykazano również, że rasy pbz oraz puławska znajdowały się w stanie równowagi Hardy-Weinberga. Najczęściej występujący allel to allel T (Tabela 19).

Tabela 19. Frekwencje genotypów oraz alleli polimorfizmu g.68177052A>G (*HK2/TasI*) w odniesieniu dla wszystkich badanych ras.

	HK2 g.68177052A>G					
	Genotypy			Allele		HWE (p-value)
	TT	TC	CC	T	C	
wbp	0,95 (187)	0,05 (9)	-	0,97	0,03	0,02
pbz	0,83 (252)	0,16 (49)	0,01 (1)	0,92	0,08	0,39
PULAWSKA	0,57 (127)	0,34 (75)	0,09 (19)	0,74	0,26	0,11
SUMA	0,79 (566)	0,18 (133)	0,03 (20)	0,88	0,12	

W nawiasach przedstawiono liczebności sztuk w poszczególnych grupach; wbp – wielka biała polska, pbz – polska biała zwisłoucha, HWE – równowaga Hardy Weinberga.

5.3.2. Polimorfizm g.68167661C>T

Zaprojektowany test oparty na metodzie PCR-RFLP pozwolił na identyfikację poszczególnych wariantów polimorfizmu g.68167661C>T.

Genotyp homozygotyczny GG (frekwencja: 0,64) występował dwa razy częściej niż genotyp heterozygotyczny GA (frekwencja: 0,32) u wszystkich ras łącznie. Częstość genotypów w przypadku ras: wbp oraz pbz były bardzo zbliżone, podobnie jak w całej populacji najczęściej występował genotyp GG, a dla rasy wbp nie zanotowano występowania genotypu homozygotycznego AA. Najczęstszym występowaniem genotypu homozygotycznego AA charakteryzowała się rasa puławska (11%), rozkład pozostałych genotypów GG oraz GA był bardzo zbliżony i wynosił odpowiednio 47 oraz 42%. W przebadanej populacji świń, u wszystkich ras łącznie allel G (frekwencja: 0,8) był znacznie częstszy niż allel A (frekwencja: 0,20). Populacja reprezentująca rasę wbp nie znajdowała się w stanie równowagi Hardy'ego-Weinberga (Tabela 20).

Tabela 20. Frekwencja genotypów oraz alleli polimorfizmu g.68167661C>T (*HK2/BstUI*) w odniesieniu dla wszystkich badanych ras.

	HK2 g.68167661C>T					
	Genotypy			Allele		HWE (p-value)
	GG	GA	AA	G	A	
wbp	0,72 (142)	0,28 (54)	-	0,86	0,14	0,03
pbz	0,71 (215)	0,27 (81)	0,02 (7)	0,85	0,15	0,85
PUŁAWSKA	0,47 (103)	0,42 (94)	0,11 (24)	0,68	0,32	0,71
SUMA	0,64 (460)	0,32 (229)	0,04 (31)	0,80	0,20	

W nawiasach przedstawiono liczebności sztuk w poszczególnych grupach; wbp – wielka biała polska, pbz – polska biała zwisłoucha, HWE – równowaga Hardy Weinberga.

5.4. Analiza związku badanych polimorfizmów genu *HK2* z wybranymi cechami użytkowymi świń oraz parametrami jakości mięsa wieprzowego

5.4.1. Polimorfizm g.68177052A>G

W obrębie tego polimorfizmu u osobników rasy wbp zidentyfikowano dwa genotypy: homozygotyczny TT oraz heterozygotyczny TC.

a) cechy jakości mięsa wieprzowego

U osobników rasy puławska zaobserwowano istotny wpływ ($p \leq 0,05$) badanego polimorfizmu na **wodochłonność mięsa wieprzowego**.

Osobniki homozygotyczne TT charakteryzowały się najniższą wartością wodochłonności (29,81) odpowiednio wyższą wartość posiadały osobniki homozygotyczne CC (31,78), najwyższą wartość wodochłonności równą 32,37 posiadały świnię o genotypie TC (Tabela 24).

b) cechy rzeźne

Analizowany polimorfizm istotnie wpływał na **średnią grubość słoniny z pięciu pomiarów** u rasy pbz ($p \leq 0,05$), u rasy puławskiej ($p \leq 0,05$) oraz u osobników wszystkich ras analizowanych łącznie ($p \leq 0,01$). U świń rasy pbz najmniejszą grubością słoniny charakteryzowały się osobniki heterozygotyczne TC (1,26 cm), natomiast u świń rasy puławskiej najmniejszą grubość słoniny można było zaobserwować u osobników homozygotycznych TT (1,58 cm). We wszystkich przypadkach największą wartością średniej grubości słoniny charakteryzowały się osobniki homozygotyczne CC (Tabela 25).

Wykazano również istotny związek badanego polimorfizmu u rasy pbz na takie cechy jak: **procent mięsa w tuszy** ($p \leq 0,05$) oraz **procentowa zawartość mięsa w wyrębach podstawowych** ($p \leq 0,05$). Najwyższą wartością wymienionych cech charakteryzowały się osobniki o genotypie heterozygotycznym TC, wartość ta dla procentowej ilości mięsa w tuszy wynosiła: 62,64 %, natomiast procentowa zawartość mięsa w wyrębach podstawowych wynosiła: 24,13%. Najniższymi wartościami charakteryzowały się osobniki z genotypem homozygotycznym CC (Tabela 25).

c) cechy tuczne

W badaniach uzyskano istotny ($p \leq 0,01$) wpływ polimorfizmu u rasy puławskiej na **przyrost dzienny w teście, zużycie paszy na kilogram przyrostu oraz liczbę dni tuczu właściwego**. Zwierzęta homozygotyczne TT charakteryzowały się najwyższym przyrostem dziennym w teście, który wynosił 831,09 g/dzień. Najniższy był on dla świń homozygotycznych CC (755,50 g/dzień). Najwyższą wartością zużycia paszy na kg przyrostu oraz liczbą dni tuczu właściwego charakteryzowały się osobniki homozygotyczne CC. Wszystkie trzy cechy znalazły odzwierciedlenie przy analizie całej populacji (Tabela 26).

5.4.2. Polimorfizm g.68167661C>T

W obrębie tego polimorfizmu u osobników rasy wbp zidentyfikowano dwa genotypy: homozygotyczny GG oraz heterozygotyczny GA.

a) cechy jakości mięsa wieprzowego

W przypadku polimorfizmu g.68167661C>T zaobserwowano jego istotny wpływ ($p \leq 0,05$) na cechę **wodochłonności mięsa** u rasy puławskiej. U tych osobników wystąpił podobny rozkład, jak w przypadku polimorfizmu g.68177052A>G. Najniższą wartością charakteryzowały się osobniki homozygotyczne GG (29,46) natomiast świnie o genotypie homozygotycznym AA oraz heterozygotycznym GA charakteryzowały się odpowiednio wyższymi wartościami: 32,16 i 32,22 (Tabela 27).

b) cechy rzeźne

Analiza asocjacji pomiędzy tą zmianą polimorficzną w genie *HK2* a cechami rzeźnymi wykazała istotną różnicę dla **średniej grubości słoniny z pięciu pomiarów** ($p \leq 0,01$) u wszystkich badanych zwierząt. Świnie homozygotyczne AA charakteryzowały się największą grubością słoniny: 1,62 cm. Natomiast osobniki homozygotyczne GG oraz heterozygotyczne GA opisywała ta sama grubość słoniny i wynosiła: 1,46 cm (Tabela 28).

c) cechy tuczne

Analiza statystyczna dla polimorfizmu g.68167661C>T potwierdziła jego istotny ($p \leq 0,01$) związek z następującymi cechami tucznymi: **przyrost dzienny w teście**, **zużycie paszy na kilogram przyrostu** oraz **liczba dni tuczu właściwego** u świń rasy puławska. Zwierzęta o genotypie heterozygotycznym GA charakteryzowały się największym dziennym przyrostem w teście. Natomiast homozygoty AA charakteryzowały się najwyższym zużyciem paszy na kilogram przyrostu oraz najdłuższą liczbą dni tuczu właściwego. Podobna zależność powyższych dwóch cech znalazła odzwierciedlenie przy analizie całej populacji, ale w tym przypadku wartość istotności wyniosła $p \leq 0,05$ (Tabela 29).

Tabela 21. Średnie wartości badanych cech oraz wpływ efektu rasy, roku uboju oraz polimorfizmu g.68177052A>G i g.68167661C>T na cechy jakości mięsa wieprzowego.

Cechy jakości mięsa wieprzowego	N	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności	Istotność GLM			
					Rasa	Dzień uboju	g.68177052A>G	g.68167661C>T
Zawartość tłuszczu śródmięśniowego (%)	457	1,27	0,32	25,38	***	***		
Wodochłonność mięsa	709	33,90	7,32	21,60	**	**		
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr L – jasność,	710	54,54	2,87	5,25	***	***		
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr a – wysycenie barwy mięsa w odcieniu czerwieni	710	16,43	1,33	8,08	**	***		
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr b – wysycenie barwy mięsa w odcieniu żółtym	710	2,86	1,21	42,26		***		
Pomiar odczynu połędwicy 45 min po uboju	722	6,24	0,18	2,83		***		
Pomiar odczynu połędwicy 24 godz. po uboju	720	5,60	0,10	1,78	*	***		
Pomiar odczynu szynki 45 min po uboju	711	6,23	0,16	2,61		***		
Pomiar odczynu szynki 24 godz. po uboju	709	5,60	0,11	1,94		***		

Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (**p<0,001; **p<0,01; *p<0,05)

Tabela 22. Średnie wartości badanych cech oraz wpływ efektu rasy, roku uboju oraz polimorfizmu g.68177052A>G i g.68167661C>T na cechy rzeźne.

Cechy rzeźne	N	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności	Istotność GLM			
					Rasa	Dzień uboju	g.68177052A>G	g.68167661C>T
Wydajność rzeźna (%)	722	76,12	2,50	3,29		***		
Masa polędwicy (kg)	722	7,28	0,88	12,07	*	***		
Masa polędwicy bez skóry i słoniny (kg)	721	5,72	0,70	12,30	***	***		
Masa szynki zadniej bez słoniny i skóry (kg)	722	9,13	0,64	6,96	***			
Średnia grubość słoniny z 5 pomiarów (cm)	722	1,40	0,40	28,53	***	***	*	
Powierzchnia oka polędwicy po planimetrowaniu obrysu (cm ²)	722	53,00	5,64	10,65	**	***		
Procent mięsa w tuszy (%)	722	61,11	3,29	5,39	***			
Procentowa zawartość mięsa w wyrębach podstawowych (%)	722	23,49	1,55	6,57	***			

Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (***)p≤0,001; **p≤0,01; *p≤0,05)

Tabela 23. Średnie wartości badanych cech oraz wpływ efektu rasy, roku uboju oraz polimorfizmu g.68177052A>G i g.68167661C>T na cechy tuczne.

Cechy tuczne	N	Średnia	Odchylenie standardowe	Współczynnik zmienności	Istotność GLM			
					Rasa	Dzień uboju	g.68177052A>G	g.68167661C>T
Przyrost dzienny w teście	722	884,55	115,90	13,10	***	***	**	
Masa ciała przed ubojem (kg)	722	601,57	72,38	12,03	***	***		
Zużycie paszy na kg przyrostu (kg/kg)	722	2,76	0,24	8,60	***	***	***	*
Dzienne pobranie paszy (kg)	722	2,43	0,29	12,11	***	***		
Liczba dni od urodzenia do uboju	722	169,40	20,44	12,06	***	***		
Liczba dni tuczu właściwego	722	81,24	10,23	12,59	***	***	**	*

Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (***p≤0,001; **p≤0,01; *p≤0,05)

Tabela 24. Wpływ polimorfizmu g.68177052A>G w genie *HK2* na cechy jakości świń różnych ras.

Cechy jakości	Genotyp	wbp	pbz	PUŁAWSKA	SUMA	Istotność GLM		
						Rasa	Dzień uboju	g.68177052A>G
Zawartość tłuszczu śródmięśniowego (%)	TT	1,27±0,18	1,12±0,24	1,36±0,42	1,25±0,28	***	***	
	TC	1,37±0,11	1,06±0,19	1,44±0,46	1,28±0,43			
	CC	---	---	1,30±0,43	1,20±0,43			
Wodochłonność mięsa	TT	34,97±8,05	32,52±7,19	29,81±6,36 ^b	31,27±7,44	**	**	
	TC	32,76±9,51	32,42±5,68	32,37±7,71 ^a	32,48±7,08			
	CC	---	37,85±0,00	31,78±5,32 ^{ab}	33,01±5,31			
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr L – jasność,	TT	54,68±2,73	52,90±2,94	54,70±2,88	52,49±2,88	***	***	
	TC	53,66±2,40	53,57±2,09	54,53±3,29	52,63±2,96			
	CC	---	53,41±0,00	54,27±1,88	52,19±1,87			
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr a – wysycenie barwy mięsa w odcieniu czerwieni	TT	16,36±1,50	16,97±1,37	16,24±1,11	17,08±1,37	**	***	
	TC	16,58±1,40	16,64±1,15	16,29±1,05	16,97±1,14			
	CC	---	17,87±0,00	16,53±1,33	17,38±1,30			
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr b – wysycenie barwy mięsa w odcieniu żółtym	TT	2,63±1,14	3,80±1,37	2,82±1,11	3,69±1,25		***	
	TC	2,88±0,55	3,80±0,97	2,99±1,10	3,79±1,02			
	CC	---	4,84±0,00	2,62±0,70	3,57±0,74			
Pomiar odczynu polędwicy 45 min po uboju	TT	6,29±0,19	6,33±0,19	6,27±1,14	6,33±0,18		***	
	TC	6,26±0,17	6,32±0,16	6,29±0,15	6,34±0,16			
	CC	---	6,33±0,00	6,29±0,16	6,35±0,15			
Pomiar odczynu polędwicy 24 godz. po uboju	TT	5,58±0,12	5,60±0,10	5,59±0,09	5,59±0,18	*	***	
	TC	5,54±0,09	5,59±0,08	5,60±0,08	5,59±0,08			
	CC	---	5,64±0,00	5,62±0,07	5,61±0,07			
Pomiar odczynu szynki 45 min po uboju	TT	6,28±0,17	6,30±0,17	6,23±0,12	6,30±0,18		***	
	TC	6,29±0,15	6,28±0,17	6,25±0,14	6,31±0,15			
	CC	---	6,22±0,00	6,23±0,11	6,30±0,11			
Pomiar odczynu szynki 24 godz. po uboju	TT	5,58±0,11	5,58±0,10	5,59±0,14	5,58±0,10		***	
	TC	5,60±0,14	5,56±0,09	5,59±0,08	5,57±0,09			
	CC	---	5,56±0,00	5,60±0,07	5,58±0,07			

Wartości oznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie pomiędzy sobą (A, B = $p \leq 0,01$; a, b = $p \leq 0,05$). Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (*** $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; * $p \leq 0,05$). wbp – wielka biała polska, pbz – polska biała zwistoucha.

Tabela 25. Wpływ polimorfizmu g.68177052A>G w genie *HK2* na cechy rzeźne świń różnych ras.

Cechy rzeźne	Genotyp	wbp	pbz	PUŁAWSKA	SUMA	Istotność GLM		
						Rasa	Dzień uboju	g.68177052A>G
Wydajność rzeźna (%)	TT	76,74±2,69	76,23±2,31	75,29±2,45	76,04±2,52		***	
	TC	76,85±2,01	76,27±2,44	75,39±2,57	76,14±2,49			
	CC	---	76,10±0,00	75,56±1,95	76,29±1,95			
Masa polędwicy (kg)	TT	7,43±0,93	7,36±0,77	6,87±0,91	7,25±0,90	*	***	
	TC	7,27±0,98	7,30±0,83	6,89±0,74	7,22±0,80			
	CC	---	6,53±0,00	7,07±0,52	7,39±0,52			
Masa polędwicy bez skóry i słoniny (kg)	TT	5,89±0,70	5,83±0,62	5,29±0,67	5,74±0,70	***	***	
	TC	5,67±0,51	5,89±0,67	5,26±0,62	5,72±0,67			
	CC	---	5,25±0,00	5,24±0,33	5,67±0,32			
Masa szynki zadniej bez słoniny i skóry (kg)	TT	9,35±0,56	9,16±0,60	8,86±0,65	9,12±0,62	***		
	TC	9,09±0,58	9,35±0,50	8,75±0,68	9,12±0,66			
	CC	---	9,37±0,00	8,71±0,73	8,95±0,74			
Średnia grubość słoniny z 5 pomiarów (cm)	TT	1,33±0,32	1,37±0,34 ^a	1,58±0,42 ^b	1,46±0,37 ^B	***	***	*
	TC	1,37±0,32	1,26±0,25 ^b	1,68±0,44 ^{ab}	1,46±0,45 ^{AB}			
	CC	---	1,42±0,00 ^{ab}	1,83±0,54 ^a	1,69±0,53 ^A			
Powierzchnia oka polędwicy po planimetryowaniu obrysu (cm ²)	TT	53,23±5,44	54,15±5,61	52,02±5,85	53,25±5,64	**	***	
	TC	50,45±6,42	54,76±5,25	51,74±5,92	53,03±5,79			
	CC	---	52,90±0,00	51,70±4,70	52,61±4,67			
Procent mięsa w tuszy (%)	TT	61,65±3,19	61,54±3,09 ^b	59,68±3,28	61,12±3,23	***		
	TC	59,72±4,13	62,64±2,78 ^a	59,18±3,27	61,14±3,56			
	CC	---	60,62±0,00 ^{ab}	59,15±2,56	60,28±2,51			
Procentowa zawartość mięsa w wyrębach podstawowych (%)	TT	24,01±1,21	23,72±1,41 ^b	22,57±1,63	23,49±1,49	***		
	TC	23,25±1,23	24,13±1,22 ^a	22,37±1,74	23,48±1,66			
	CC	---	23,35±0,00 ^{ab}	22,35±1,46	23,16±1,47			

Wartości oznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie pomiędzy sobą (A, B = $p \leq 0,01$; a, b = $p \leq 0,05$). Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (***) $p \leq 0,001$; **) $p \leq 0,01$; *) $p \leq 0,05$). wbp – wielka biała polska, pbz – polska biała zwisłoucha.

Tabela 26. Wpływ polimorfizmu g.68177052A>G w genie *HK2* na cechy tuczne świń różnych ras.

Cechy tuczne	Genotyp	wbp	pbz	PUŁAWSKA	SUMA	Istotność GLM		
						Rasa	Dzień uboju	g.68177052A>G
Przyrost dzienny w teście	TT	914,97±93,92	935,09±120,21	831,09±88,53 ^A	895,75±112,61 ^A	***	***	**
	TC	895,11±144,23	914,12±135,49	827,98±87,59 ^{AB}	886,70±119,32 ^{AB}			
	CC	---	923,20±0,00	755,50±70,24 ^B	821,64±81,69 ^B			
Masa ciała przed ubojem (kg)	TT	623,25±57,53	627,14±74,85	567,72±60,64	602,30±70,94	***	***	
	TC	592,58±66,84	615,64±84,33	565,54±56,02	595,01±75,07			
	CC	---	633,32±0,00	542,35±44,15	575,09±52,48			
Zużycie paszy na kg przyrostu (kg/kg)	TT	2,69±0,17	2,74±0,20	2,81±0,25 ^B	2,76±0,22 ^B	***	***	***
	TC	2,72±0,30	2,75±0,30	2,82±0,25 ^{AB}	2,78±0,28 ^{AB}			
	CC	---	2,84±0,00	3,02±0,24 ^A	2,98±0,24 ^A			
Dzienne pobranie paszy (kg)	TT	2,46±0,24	2,55±0,34	2,34±0,28	2,46±0,30	***	***	
	TC	2,42±0,26	2,50±0,34	2,32±0,20	2,44±0,27			
	CC	---	2,59±0,00	2,27±0,20	2,40±0,21			
Liczba dni od urodzenia do uboju	TT	162,47±16,51	162,39±21,11	176,74±18,57	169,21±20,10	***	***	
	TC	172,77±21,49	164,37±20,83	177,49±17,36	171,06±20,92			
	CC	---	160,34±0,00	182,40±16,88	175,15±18,13			
Liczba dni tuczu właściwego	TT	77,64±9,15	77,46±10,15	84,20±8,52 ^B	80,31±9,92 ^B	***	***	**
	TC	80,83±10,27	79,31±11,52	84,54±8,58 ^{AB}	81,42±10,39 ^{AB}			
	CC	---	76,65±0,00	90,99±10,12 ^A	86,84±10,59 ^A			

Wartości oznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie pomiędzy sobą (A, B = $p \leq 0,01$; a, b = $p \leq 0,05$). Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (***) $p \leq 0,001$; **) $p \leq 0,01$; *) $p \leq 0,05$). wbp – wielka biała polska, pbz – polska biała zwisłoucha.

Tabela 27. Wpływ polimorfizmu g.68167661C>T w genie *HK2* na cechy jakości świń różnych ras.

Cechy jakości	Genotyp	wbp	pbz	PUŁAWSKA	SUMA	Istotność GLM		
						Rasa	Dzień uboju	g.68167661C>T
Zawartość tłuszczu śródmięśniowego (%)	GG	1,27±0,19	1,15±0,25	1,36±0,43	1,25±0,29	***	***	
	GA	1,29±0,14	1,11±0,02	1,41±0,44	1,27±0,35			
	AA	---	1,17±0,13	1,36±0,43	1,26±0,41			
Wodochłonność mięsa	GG	35,92±7,66	32,36±7,01	29,46±6,51 ^b	31,49±7,35	**	**	
	GA	31,17±8,22	33,02±6,45	32,22±7,30 ^a	31,40±7,35			
	AA	---	32,63±10,58	32,16±5,15 ^{ab}	32,76±6,55			
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr L – jasność,	GG	54,95±2,76	52,95±3,01	54,66±3,05	52,58±2,95	***	***	
	GA	53,54±2,17	53,34±2,21	54,52±2,94	52,31±2,70			
	AA	---	51,64±3,10	55,04±2,53	52,48±2,66			
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr a – wysycenie barwy mięsa w odcieniu czerwieni	GG	16,24±1,45	16,92±1,37	16,27±1,15	17,02±1,36	**	***	
	GA	16,84±1,46	16,81±1,24	16,25±1,02	17,15±1,28			
	AA	---	17,70±1,06	16,37±1,26	17,35±1,23			
Wartość pomiaru barwy mięsa – parametr b – wysycenie barwy mięsa w odcieniu żółtym	GG	2,55±1,15	3,86±1,40	2,83±1,14	3,70±1,28		***	
	GA	2,93±1,04	3,66±1,07	2,88±1,05	3,74±1,05			
	AA	---	3,37±0,96	2,89±0,93	3,65±0,98			
Pomiar odczynu połówicy 45 min po uboju	GG	6,31±0,18	6,33±0,19	6,27±0,14	6,34±0,18		***	
	GA	6,20±0,21	6,34±0,17	6,29±0,15	6,32±0,17			
	AA	---	6,21±0,19	6,27±0,15	6,30±0,15			
Pomiar odczynu połówicy 24 godz. po uboju	GG	5,59±0,11	5,60±0,10	5,59±0,09	5,59±0,10	*	***	
	GA	5,54±0,13	5,60±0,09	5,60±0,08	5,58±0,10			
	AA	---	5,57±0,04	5,62±0,07	5,60±0,07			
Pomiar odczynu szynki 45 min po uboju	GG	6,27±0,17	6,30±0,17	6,23±0,12	6,30±0,16		***	
	GA	6,31±0,17	6,28±0,17	6,25±0,14	6,31±0,16			
	AA	---	6,31±0,19	6,22±0,10	6,30±0,13			
Pomiar odczynu szynki 24 godz. po uboju	GG	5,58±0,09	5,58±0,11	5,59±0,15	5,58±0,11		***	
	GA	5,59±0,15	5,57±0,09	5,58±0,08	5,57±0,11			
	AA	---	5,55±0,04	5,60±0,06	5,58±0,06			

Wartości oznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie pomiędzy sobą (A, B = $p \leq 0,01$; a, b = $p \leq 0,05$). Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (***) $p \leq 0,001$; **) $p \leq 0,01$; *) $p \leq 0,05$). wbp – wielka biała polska, pbz – polska biała zwisłoucha.

Tabela 28. Wpływ polimorfizmu g.68167661C>T w genie *HK2* na cechy rzeźne świń różnych ras.

Cechy rzeźne	Genotyp	wbp	pbz	PUŁAWSKA	SUMA	Istotność GLM		
						Rasa	Dzień uboju	g.68167661C>T
Wydajność rzeźna (%)	GG	76,80±2,75	76,28±2,34	75,28±2,20	76,09±2,50		***	
	GA	76,54±2,38	76,13±2,32	75,38±2,62	76,00±2,49			
	AA	---	75,87±1,65	75,48±2,69	76,09±2,66			
Masa polędwicy (kg)	GG	7,43±0,89	7,35±0,77	6,82±0,88	7,24±0,88	*	***	
	GA	7,38±1,02	7,35±0,81	6,96±0,80	7,27±0,89			
	AA	---	7,12±0,95	7,03±0,56	7,31±0,71			
Masa polędwicy bez skóry i słoniny (kg)	GG	5,90±0,70	5,83±0,63	5,26±0,64	5,73±0,70	***	***	
	GA	5,78±0,68	5,89±0,65	5,31±0,65	5,74±0,70			
	AA	---	5,60±0,63	5,25±0,47	5,65±0,58			
Masa szynki zadniej bez słoniny i skóry (kg)	GG	9,40±0,55	9,17±0,61	8,86±0,64	9,13±0,62	***		
	GA	9,14±0,58	9,25±0,53	8,78±0,68	9,08±0,63			
	AA	---	9,27±0,54	8,73±0,76	9,00±0,79			
Średnia grubość słoniny z 5 pomiarów (cm)	GG	1,32±0,32	1,37±0,34	1,59±0,44	1,46±0,38 ^B	***	***	
	GA	1,37±0,32	1,30±0,28	1,64±0,42	1,46±0,41 ^{AB}			
	AA	---	1,36±0,22	1,79±0,53	1,62±0,51 ^A			
Powierzchnia oka polędwicy po planimetrowaniu obrysu (cm ²)	GG	53,12±5,44	54,38±5,68	51,76±5,88	53,26±5,72	**	***	
	GA	52,98±5,60	53,89±5,25	52,16±5,91	53,07±5,60			
	AA	---	53,27±4,01	52,21±4,75	52,97±4,61			
Procent mięsa w tuszy (%)	GG	61,87±3,11	61,61±3,05	59,55±3,35	61,17±3,23	***		
	GA	60,49±3,31	62,10±3,11	59,51±3,24	61,02±3,41			
	AA	---	61,24±2,43	59,32±2,73	60,49±2,70			
Procentowa zawartość mięsa w wyrebach podstawowych (%)	GG	24,10±1,15	23,75±1,43	22,52±1,61	23,51±1,51	***		
	GA	23,55±1,35	23,93±1,21	22,49±1,70	23,44±1,54			
	AA	---	23,61±1,40	22,42±1,64	23,25±1,79			

Wartości oznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie pomiędzy sobą (A, B = $p \leq 0,01$; a, b = $p \leq 0,05$). Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (***) $p \leq 0,001$; **) $p \leq 0,01$; *) $p \leq 0,05$). wbp – wielka biała polska, pbz – polska biała zwisłoucha.

Tabela 29. Wpływ polimorfizmu g.68167661C>T w genie *HK2* na cechy tuczne świń różnych ras.

Cechy tuczne	Genotyp	wbp	pbz	PUŁAWSKA	SUMA	Istotność GLM		
						Rasa	Dzień uboju	g.68167661C>T
Przyrost dzienny w teście	GG	919,03±93,59	934,79±123,94	827,46±85,81 ^{AB}	895,56±115,58	***	***	
	GA	896,88±101,82	920,67±121,10	834,16±88,32 ^A	890,09±111,15			
	AA	---	944,01±85,78	775,58±92,22 ^B	852,83±108,70			
Masa ciała przed ubojem (kg)	GG	624,06±60,61	626,42±75,78	567,08±55,24	601,78±72,03	***	***	
	GA	614,57±49,38	620,83±77,16	566,63±61,58	598,55±70,50			
	AA	---	639,15±82,00	550,96±55,85	589,80±70,21			
Zużycie paszy na kg przyrostu (kg/kg)	GG	2,69±0,17	2,74±0,20	2,83±0,26 ^{AB}	2,77±0,22 ^{ab}	***	***	*
	GA	2,71±0,20	2,76±0,27	2,80±0,23 ^B	2,76±0,25 ^b			
	AA	---	2,61±0,18	2,97±0,26 ^A	2,86±0,30 ^a			
Dzienne pobranie paszy (kg)	GG	2,46±0,23	2,56±0,35	2,34±0,29	2,47±0,31	***	***	
	GA	2,42±0,25	2,52±0,30	2,32±0,19	2,44±0,26			
	AA	---	2,47±0,31	2,28±0,21	2,40±0,24			
Liczba dni od urodzenia do uboju	GG	162,15±16,61	162,57±21,28	176,59±17,18	169,27±20,09	***	***	
	GA	165,55±16,75	163,15±20,16	177,66±18,82	170,26±20,30			
	AA	---	161,37±23,28	180,51±18,58	172,45±20,57			
Liczba dni tuczu właściwego	GG	77,16±8,29	77,52±10,29	84,49±8,28 ^{AB}	80,31±9,81 ^b	***	***	*
	GA	79,95±10,86	78,53±10,64	84,02±8,66 ^B	81,00±10,36 ^{ab}			
	AA	---	77,24±9,03	89,26±10,76 ^A	84,35±11,21 ^a			

Wartości oznaczone tymi samymi literami różnią się istotnie pomiędzy sobą (A, B = $p \leq 0,01$; a, b = $p \leq 0,05$). Dane przedstawiono w postaci średnich LSM±S.E. (***) $p \leq 0,001$; **) $p \leq 0,01$; *) $p \leq 0,05$). wbp – wielka biała polska, pbz – polska biała zwisłoucha.

6. Dyskusja

Za pomocą technik biologii molekularnej wykorzystanych do powyższych analiz oznaczono polimorfizmy zlokalizowane w eksonie 7 oraz w eksonie 12 genu *HK2*. Metody te okazały się skuteczne w identyfikacji oraz genotypowaniu na szerszą skalę wariantów genu *HK2*. Przedstawione badania dotyczą zagadnień nowatorskich. Określenie zależności pomiędzy poszczególnymi genotypami *HK2*, a cechami jakości mięsa w wybranych tkankach może w przyszłości umożliwić selekcję zwierząt o preferowanym wariacie genetycznym, których mięso charakteryzować się będzie korzystniejszymi parametrami jakości mięsa. Jest to priorytetowe zagadnienie dla hodowców i producentów trzody chlewnej.

Obecnie coraz większą wagę przywiązuje się do cech związanych z jakością mięsa i jego właściwościami technologicznymi, tak istotnymi w przemyśle przetwórczym. Zmiany spowodowane nowymi oczekiwaniami i wymaganiami konsumentów wymuszają coraz wyższy standard jakościowy mięsa, a co za tym idzie nowe spojrzenie na problem doskonalenia genetycznego trzody chlewnej. Parametry jakości mięsa, takie jak: barwa, wodochłonność i kwasowość (pH) oraz zawartość tłuszczu śródmięśniowego, powinny być coraz szerzej brane pod uwagę w pracach selekcyjno-hodowlanych w naszym kraju. Duże znaczenie wieprzowiny w diecie człowieka, a także jej nadprodukcja w obecnych czasach wymusza, aby produkt ten charakteryzował się jak najlepszymi parametrami jakościowymi.

Genetyczne podłoże cech użytkowych (tucznych i rzeźnych) oraz parametrów jakości mięsa świń wciąż jest przedmiotem intensywnych badań, przede wszystkim ze względu na zaangażowanie w te złożone procesy wielu genów. Zmieniający się styl życia wpływa na nawyki żywieniowe wszystkich grup społecznych. Świadomy konsument dokładnie wie, czego oczekuje od kupowanego produktu. Rosnąca świadomość konsumentów przekłada się na producentów, którzy zmuszeni są sprzedawać tuczniaki o określonym składzie tkankowym. W związku z tym prowadzone są działania, aby dobrej jakości surowiec i uzyskane w przetwórstwie zdrowe, smaczne wyroby trafiały w oczekiwania konsumentów i realizowały rosnący popyt na wieprzowinę. Powyższe ustalenia wskazują na znaczenie dalszych badań w celu znalezienia przyczyn zmienności zawartości m.in.: glikogenu oraz kwasu mlekowego w tkance mięśniowej. Okazało się, że zainteresowanie genami kodującymi enzymy uczestniczące w procesie glikolizy jest uzasadnione. Jednym z takich enzymów jest heksokinaza 2, która w szlaku glikolitycznym katalizuje konwersję glukozy do glukozo-6-fosforanu, a w dalszym etapie produkt całego procesu może zostać zredukowany do mleczanu w warunkach beztlenowych.

Okazuje się również, że enzym kodowany przez gen *HK2* ma znaczenie w zależnej od glukozy represji szeregu genów, w tym uczestniczących w glukoneogenezie czy wykorzystywaniu alternatywnych źródeł węgla (Rødkaer i Faergeman 2014; Rolland i in. 2002). Odgrywa kluczową rolę w zależnej od glukozy represji genów kodujących białka uczestniczące w oddychaniu tlenowym (Rodrigues i in. 2006). A jak pokazują ostatnie badania delekcja genu *HK2* w komórkach drożdży generuje szeroki zakres zmian metabolicznych skutkujący m.in. obniżeniem ogólnych możliwości biosyntetycznych komórki, ale jednocześnie lepszą proteostazą i zwiększonym potencjałem reprodukcyjnym komórek (Maślanka i Zadrąg-Tęcza 2021; Maślanka i Zadrąg-Tęcza 2020).

Fazarinc i in. 2020 potwierdzili, iż gen *HK2* oraz gen *GYS1*, który koduje syntazę glikogenu są obiecującymi genami kandydującymi dla cech związanych z metabolizmem mięśni szkieletowych. Ich analizy wykazały, że poziomy mRNA tych dwóch enzymów -*HK2*, *GYS1*, kodowanych przez powyższe geny, były znacznie wyższe w mięśniach typu glikolitycznego, niż w mięśniach typu oksydacyjnego u świń (Shen i in. 2015). Zaobserwowano również pozytywna korelacja między ekspresją genów *HK2* oraz *MyHC I*. Dotychczas wzrost ekspresji enzymów zaangażowanych w metabolizm węglowodanowy odnotowano jedynie w wolnokurczliwych, starzejących się ludzkich włóknach mięśniowych typu I (Murgia i in. 2017).

Badacze w swoich pracach niejednokrotnie wykazywali istotny wpływ kwasów tłuszczowych n-3 PUFA (ang. *long chain polyunsaturated fatty acids*) w diecie na metabolizm energetyczny w mięśniach szkieletowych, częściowo poprzez oddziaływanie na PPAR (ang. *peroxisome proliferator - activated receptor*) (Le i in. 2012). W obecnym badaniu ontologii genów o zróżnicowanej ekspresji zaobserwowano, że żywienie świń dietą wzbogaconą w siemię lniane znacząco wpływa na proces metabolizmu glukozy. Zarówno *HK2*, jak i *PGC-1 α* znajdowały się na liście 10 genów z podwyższoną aktywnością, co sugeruje, że istotna zmiana metabolizmu glukozy może być wywołana w mięśniach szkieletowych przez karmienie świń dietą wzbogaconą w siemię lniane. Ekspresję *HK2* indukowano 2,4-krotnie w 30 dniu życia zwierząt i utrzymywała się ona na podwyższonym poziomie również w późniejszych punktach czasowych (Wei i in. 2016, Shen i in. 2014). Wyniki dostarczają również nowych dowodów na to, że zmiany ekspresji *PTPNI*, *HK2* i *PGC-1 α* mogą przyczyniać się do regulacji wrażliwości na insulinę przez n-3 PUFA (Wei i in. 2016)

Wykazanie zmienności w obrębie analizowanego genu kodującego heksokinazę 2 pozwoli poznać przyczyny międzyrasowych różnic w kontekście występowania określonych parametrów jakości mięsa świń, jak również poszerzyć wiedzę dotyczącą ich genetycznych mechanizmów. Jak dotąd, gen *HK2* nie był szeroko badany pod kątem identyfikacji pojedynczych mutacji oraz ich asocjacji z cechami fenotypowymi lub produkcyjnymi świń. Zgodnie z danymi zawartymi w bazie Ensembl (stan na dzień 14.02.2022, Sscrofa11.1; GCA_000003025.6), do genu *HK2* przyporządkowano 5837 polimorfizmy, z których większość identyfikowano wysokoprzepustowymi metodami sekwencjonowania genomów. W bazie zareportowano 63 polimorfizmy zlokalizowane w regionie 5' UTR, 10 polimorfizmów w regionie 3'UTR, 10 polimorfizmów zmiany sensu, 72 zmiany synonimiczne, 29 polimorfizmy w regionach splicingowych, 485 w regionach downstream i 182 w regionach upstream oraz zdecydowana większość, bo aż 5653 to warianty intronowe. W literaturze brakuje opracowań dotyczących poszczególnych mutacji oraz ich detekcji dokładnymi metodami genetyki molekularnej. W ramach własnych badań, z puli zidentyfikowanych zmian polimorficznych wytypowano te o potencjalnie największym wpływie na funkcję powstającego białka HK2 i wykonano analizę ich asocjacji z cechami produkcyjnymi trzody chlewnej różnych ras.

W analizowanej populacji polimorfizm g.68177052A>G w istotny sposób wpłynął na średnią grubość słoniny u osobników należących do rasy polska biała zwisłoucha ($p \leq 0,05$), rasy puławskiej ($p \leq 0,05$), a także dla osobników wszystkich ras badanych łącznie ($p \leq 0,01$). U świń rasy pbz osobniki heterozygotyczne TC charakteryzowały się mniejszą grubością słoniny (spadek o 0,11 cm w stosunku do świń TT), natomiast u świń rasy puławskiej najmniejszą grubość słoniny można było zaobserwować u osobników homozygotycznych TT, wynosiła ona: 1,58 cm. We wszystkich przypadkach największą wartością średniej grubości słoniny charakteryzowały się osobniki homozygotyczne CC. Dodatkowo, osobniki o genotypie TT posiadały najmniejszy procent mięsa w tuszy oraz procentową zawartość mięsa w wyrębach podstawowych ($p < 0,05$). Jej wartość wynosiła 23,72% i była mniejsza o 0,41% od osobników o genotypie TC. Polimorfizm g.68177052A>G wpłynął istotnie również na cechy tuczne oraz jakości mięsa wieprzowego badanych osobników. Najwyższy przyrost dzienny w okresie tuczu ($p \leq 0,01$) zaobserwowano u osobników o genotypie homozygotycznym TT, wynosił on 895,75. Najniższą wartością natomiast charakteryzowały się osobniki o genotypie homozygotycznym CC (niższą, aż o 74,11). Świnie o genotypie homozygotycznym TT charakteryzowały się również o 0,22 kg/kg mniejszym zużyciem paszy na kg przyrostu ($p \leq 0,01$) w stosunku do świń o genotypie homozygotycznym CC.

Opisywana zmiana wpłynęła również istotnie na długość tuczu właściwego u badanej populacji świń ($p \leq 0,01$). Porównując osobniki homozygotyczne TT z homozygotycznymi CC zaobserwowano, iż dla osobników z genotypem TT był on krótszy aż o 6,53 dni. Parametry mówiące o cechach jakości świń świadczą, iż mięso charakteryzowało się dobrą jakością (RFN), było to mięso: o odpowiedniej jakości, czerwonaworóżowe, twarde, normalne, niecieknące. Pomiar pH mieściły się w wartościach granicznych ($pH1 \geq 6,0$, $pH3 \geq 6,0$ i $pH24 \geq 5,5$).

Uzyskane wyniki w istotny sposób obrazują, że osobniki homozygotyczne TT mimo iż posiadają niższą zawartość mięsa w tuszy, to charakteryzują się one większym przyrostem dziennym, zużywają mniejszą ilość paszy na kilogram przyrostu masy oraz ich tucz jest istotnie krótszy. Jest to bardzo ważny element hodowli świń. Cechy te decydują o ekonomice produkcji trzody chlewnej na fermie. Wysokie parametry w zakresie cech tucznych świń takiej jak: szybkość wzrostu oraz spożycie paszy mają wpływ na skrócenie tuczu, co powoduje spadek kosztów. Jest to bardzo ważny aspekt podczas prowadzenia hodowli świń (Grosse-Kleimann i in. 2021, Tyra i in. 2019).

Dla kolejnego analizowanego polimorfizmu $g.68167661C>T$ analiza asocjacji pomiędzy tą zmianą polimorficzną a cechami rzeźnymi wykazała istotną różnicę dla średniej grubości słoniny z pięciu pomiarów u wszystkich badanych zwierząt ($p \leq 0,01$). Świnie homozygotyczne AA charakteryzowały się największą grubością słoniny: 1,62 cm. Natomiast osobniki homozygotyczne GG oraz heterozygotyczne GA charakteryzowały się tą samą grubością słoniny, która wynosiła: 1,46 cm. Dodatkowo osobniki o genotypie heterozygotycznym GA posiadały najniższą wydajność rzeźną. Natomiast świnie o genotypie homozygotycznym GG charakteryzowały się najwyższą zawartością mięsa w tuszy.

Badania prowadzone przez Główne Laboratorium Genetyki i Hodowli Świń w Wuhan, Chiny (ang. *Key Laboratory of Swine Genetics and Breeding*) (Jun i in. 2006) wykazały, że polimorfizm G981A zlokalizowany w genie *HK2* również ma istotny wpływ na średnią grubość słoniny u świń rasy wielka biała x meishan. W populacji mieszańców stwierdzono istotną różnicę pomiędzy genotypami heterozygotycznym AB i homozygotycznym BB. Genotyp homozygotyczny BB charakteryzował się wyższą wartością parametru grubość słoniny, a różnica ta między genotypami wynosiła 0,273 cm ($p < 0,05$) (Jun i in. 2006). Zaobserwowano również znaczące powiązania polimorfizmu G981A z wysokością oka połędwicy. Świnie o genotypie homozygotycznym AA charakteryzowały się większą wysokością o 0,416 cm.

Natomiast średnia grubość słoniny u osobników z genotypem homozygotycznym AA była mniejsza o 0,027 cm od grubości słoniny u osobników o genotypie homozygotycznym BB (Jun i in. 2012). Badania przeprowadzone przez Jun i in. (2012) przedstawiły także różnicę pomiędzy genotypem AA i BB odnoszącą się do cechy marmurkowatości wieprzowiny u powyższych ras.

Ponadto w badaniach własnych wykazano, że polimorfizm g.68167661C>T u przebadanej populacji charakteryzował się istotnym wpływem na cechy tuczne. Osobniki o genotypie homozygotycznym GA rasy puławska charakteryzowały się najwyższym przyrostem dziennym w teście ($p \leq 0,01$), który wynosił 834,16. Natomiast przyrost dzienny osobników tej samej rasy o genotypie homozygotycznym AA był niższy o 58,58. Kolejnym istotnym parametrem zaobserwowanym podczas prowadzonych analiz okazała się liczba dni tuczu właściwego ($p \leq 0,05$). Najkrótszym czasem tuczu charakteryzowały się osobniki o genotypie homozygotycznym GG, wynosił on 80,31 dni, w przeciwieństwie do osobników o genotypie homozygotycznym AA, których okres tuczu był dłuższy aż o 4,04 dnia i wnosił 84,35 dni. Polimorfizm g.68167661C>T w istotny sposób wpłynął na zużycie paszy na kg przyrostu ($p \leq 0,05$), był on najbardziej korzystny dla osobników o genotypie heterozygotycznym GA i wynosił 2,76 kg/kg. Z kolei osobniki o genotypie homozygotycznym AA zużywały największą ilość paszy na kilogram przyrostu, zużycie to wynosiło 2,86 kg/kg. Mięso świń charakteryzowało się dobrą jakością (RFN), było to mięso: odpowiedniej jakości, czerwonaworóżowe, twarde, normalne, niecieknące. Pomiar pH mięsicy się w wartościach granicznych ($\text{pH1} \geq 6,0$, $\text{pH3} \geq 6,0$ i $\text{pH24} \geq 5,5$).

Osiągnięte wyniki w badaniach własnych wskazują na to, że osobniki o genotypie heterozygotycznym GA charakteryzują się najbardziej korzystnymi parametrami tucznymi. Natomiast utrzymanie w produkcji osobników o genotypie homozygotycznym AA okazało się najmniej ekonomiczne dla hodowców. Za powyższym zjawiskiem przemawiają takie cechy jak: najmniejszy przyrost, najszybsze wykorzystanie paszy na kg przyrostu a jednocześnie najdłuższy okres tuczu. Hodowla świń o takich parametrach staje się nieopłacalna.

W Polsce i na świecie prowadzonych jest wiele badań, które mają na celu identyfikację genów funkcjonalnych oraz ich mutacji, które w bardzo istotny sposób mogą wpływać na cechy użytkowe populacji świń. Duże firmy hodowlane już od dekad starają się wprowadzić do swych hodowli grupę markerów genetycznych, które ułatwią produkcję zwierząt o pożądanym cechach. Aktualnie najczęściej spotykanym zjawiskiem jest włączanie selekcji w określonym kierunku, by pula genów wybranego stada charakteryzowała się obecnością wariantów o pozytywnym wpływie na wysokość wybranej cechy ilościowej.

Główne markery związane z mięsnością oraz jakością tuszy stosowane w zachodnich firmach komercyjnych to m.in.: gen *IGF2* (gen insulinopodobnego czynnika wzrostowego drugiego) oraz gen *MC4R* (gen receptora melanokortyny czwartej).

Opisując gen *IGF2* badacze zaobserwowali, iż mutacją przyczynową w tym genie jest zmianą pojedynczego nukleotydu w intronie trzecim genu. Efektem mutacji g.3072G>A najprawdopodobniej jest zmiana poziomu ekspresji mRNA w mięśniach (Van Laere i in. 2003). Współczesne badania wskazały również istotny wpływ zmiany na cechy mięsności i otluszczenia w populacji świń. Każde z badań przyczyniają się do potwierdzenia tezy, iż mutacja g.3072G>A genu *IGF2* posiada istotny wpływ na cechy rzeźne, głównie mięsność (grubość słoniny i zawartość mięsa w tuszy (%)) oraz masę szynki (Burgos i in. 2011, Fontanesi i in. 2010, Świtoński i in. 2010, Oczkiewicz i in. 2009, Estellé i in. 2005). Wszystkie eksperymenty zgodnie wykazały znaczący pozytywny wpływ allelu A na cechy tuszy. Kwestią wymagającą dalszych badań jest wpływ mutacji g.3072G>A na cechy jakości mięsa i cechy rozplodowe, ponieważ przeprowadzone dotąd badania dają niejednoznaczne wyniki (Gozalo-Marcilla i in. 2021, Oczkiewicz i in. 2012). Naukowcy donoszą, iż polimorfizm ten może mieć również istotne znaczenie w aspekcie selekcji cech pod kątem zawartości tłuszczu śródmięśniowego. Oczkiewicz i in. 2012, Aslan i in. 2012, oraz Burgos i in. 2011 wskazują, że uzyskane przez nich wyniki mogą świadczyć iż gen *IGF2* może wpływać na zawartość IMF u świń. Interakcje zachodzące pomiędzy różnymi polimorfizmami są ważne dla całościowego zrozumienia aspektów molekularnych dzięki którym różne warianty genu *IGF2* mogą wpływać na tkankę mięśniową (Oczkiewicz in. 2012).

Z kolei gen *MC4R* kodujący transbłonowy receptor białka G, odgrywający ważną rolę w kontrolowaniu homeostazy energetycznej został uznany przez badaczy za marker wzrostu, mięsności oraz pobierania pasz. Mutacja zmiany sensu c.1426G>A zlokalizowana w wysoce konserwatywnym regionie genu *MC4R* została wyraźnie powiązana z głębokością słoniny, spożyciem paszy i tempem wzrostu w różnych liniach świń (Piórkowska i in. 2010, Kim i in. 2000). Przeprowadzono badanie asocjacyjne tych genotypów z kilkoma cechami wydajności i jakości w ramach statystycznego modelu zwierzęcego. Wyniki potwierdziły wpływ mutacji zmiany sensu na cechy wzrostu i odkładania tłuszczu oraz potwierdziły nowy wpływ na skład tuszy (masa polędwicy i łopatki) oraz cechy związane z jakością tłuszczu i mięsa. Wyniki te sugerują, że gen *MC4R* może być celem w hodowli wspomaganą markerami w celu selekcji świń o dobrej jakości mięsa, może wpływać na bilans energetyczny i być cennym markerem selekcyjnym w programach hodowlanych u świń (Davoli i in. 2012, Óvilo i in. 2006).

Przedstawione wyniki dostarczają informacji o przydatności genów, jako markerów do selekcji wspomaganiej hodowli zwierząt. Pożądany przez hodowców genotyp zmienia się w zależności od zainteresowań i potrzeb. Decyzje selekcyjne podejmowane są w zależności od systemu produkcyjnego oraz wymagań klientów.

Przedstawione geny mają istotne znaczenie w aspekcie cech użytkowych świń. Polimorfizmy genu *HK2* podobnie, jak genów *IGF2* oraz *MC4R* wpływa na cechy rzeźne oraz cechy jakości mięsa. Można przypuszczać, iż gdyby poszerzyć badania dotyczące genu *HK2* o inne rasy świń oraz zwiększyć liczę osobników to w przyszłości mogłoby to umożliwić selekcję zwierząt o preferowanym wariacie genetycznym, których mięso będzie charakteryzować się korzystniejszymi parametrami. Jest to priorytetowe zagadnienie dla hodowców oraz producentów trzody chlewnej. Gen heksokinazy 2 jest istotnym kandydatem do miana markera genetycznego odpowiedzialnego za ekonomicznie istotne cechy zwierząt. Niezbędne są jednak dalsze badania, które będą podstawą zrozumienia molekularnego podłoża ich związku z fenotypem.

Analiza asocjacji genów kandydujących jest ogromnym osiągnięciem i zmierza w kierunku rozpoznania genetycznych podstaw cech produkcyjnych. W przeciwieństwie do innych metod genetycznych (np. wykrywanie QTL) jest możliwie łatwiej i skuteczniej wprowadzić je w przeróżne programy hodowlane. Przy pomocy takiej wiedzy możliwe jest opracowanie nowej koncepcji selekcji wspomaganiej genami w celu modyfikacji cech mięsa i tłuszczu wieprzowego. W tym celu warianty alleli o korzystnym wpływie na cechy ekonomiczne muszą być wcześniej przetestowane w różnych populacjach świń i systemach produkcyjnych. Badania o takim zasięgu są niezbędne, aby potwierdzić wcześniej stwierdzone efekty i porównać wpływ genów na różne cechy. W przyszłości pomoże to na uwzględnienie uzyskanych wyników w celu ich praktycznego wykorzystania w hodowli selektywnej. W przyszłości warto rozszerzyć powyższe badania o większe stado. Wiedza o potencjalnym wpływie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów wybranych genów na cechy użytkowe świń oraz parametry jakości mięsa wieprzowego mogą okazać się bardzo cenne przy selekcji zwierząt o preferowanym wariacie genetycznym, których mięso będzie się charakteryzować pożądanymi cechami. Selekcja genomowa wpływa korzystnie na postęp hodowlany cech funkcjonalnych.

Zidentyfikowane polimorfizmy w genie *HK2* przyczyniają się do tego, że gen *HK2* podobnie jak przytoczone tutaj geny *IGF2* oraz *MC4R* może być genem kandydującym do miana markera genetycznego.

7. Podsumowanie i wnioski

Wyniki uzyskane podczas wykonywanych badań pozwalają na sformułowanie stwierdzeń i wniosków:

- 1) Wykazano występowanie licznych miejsc polimorficznych w genie *HK2* u świń ras wielka biała polska, polska biała zwisłoucha oraz puławska.
- 2) Testami pozwalającymi na analizę miejsc polimorficznych wykrytych w genie *HK2* są: PCR-RFLP oraz ACRS-PCR. W przyszłości opracowane metody detekcji polimorfizmów genu *HK2* mogą stanowić szybki i tani test diagnostyczny pod kątem opracowanych markerów.
- 3) Wybrane zidentyfikowane polimorfizmy wykazują istotną asocjację z badanymi cechami tucznymi, rzeźnymi oraz jakością mięsa u świń różnych ras.
- 4) Statystycznie istotny ($p \leq 0,01$) związek między rozkładem genotypów w regionie splicingowym eksonu 7 (g.68177052A>G) w aspekcie cech użytkowych świń świadczy o tym, że gen *HK2* jest genem kandydującym odpowiedzialnym za cechy tuczne u trzody chlewnej: większe przyrosty dzienne, zużycie mniejszej ilości paszy na kilogram przyrostu masy oraz istotnie krótszy tucz.
- 5) Statystycznie istotny ($p \leq 0,05$) związek między rozkładem genotypów w eksonie 7 (g.68177052A>G) w aspekcie cech użytkowych świń świadczy o tym, że gen *HK2* jest genem kandydującym do genu odpowiedzialnego za zawartość mięsa w tuszy.
- 6) Statystycznie istotny ($p \leq 0,01$) związek między rozkładem genotypów w eksonie 12 (g.68167661C>T) w aspekcie cech użytkowych świń świadczy o tym, że gen *HK2* jest genem kandydującym do genu odpowiedzialnego za średnią grubość słoniny z pięciu pomiarów.

8. Streszczenie

W dzisiejszych czasach prowadzone są intensywne badania, których celem jest poprawa jakości mięsa wieprzowego. Jakość mięsa to zespół cech decydujących o jego wartości użytkowej oraz cech precyzujących jego wartość odżywczą dla konsumenta. Jednak, dla współczesnego konsumenta spośród licznych parametrów charakteryzujących mięso, najważniejsze są: barwa, kruchość, soczystość oraz smak i zapach czyli parametry organoleptyczne. Przyczyny powyższego zjawiska posiadają wieloczynnikowy charakter i obejmują zarówno aspekty środowiskowe, jak i genetyczne. Ich poznanie pod kątem asocjacji z jakością mięsa wieprzowego może w przyszłości umożliwić selekcję zwierząt o preferowanym wariacie genetycznym, których mięso charakteryzować się będzie korzystniejszymi parametrami jakości mięsa. Jest to priorytetowe zagadnienie dla hodowców i producentów trzody chlewnej. W tym kontekście analiza wariantów polimorficznych genu *HK2* w aspekcie cech użytkowych świń i parametrów jakości mięsa wieprzowego można uznać za uzasadnione z powodu biologicznej roli w regulacji procesu glikolizy, a także z uwagi na charakter molekularny mechanizmu, wskazującego na zmienność kodowanych białek.

Cel pracy. Celem niniejszej pracy była detekcja polimorfizmów w genie kodującym heksokinazę 2 (*HK2*) u świni domowej (łac. *Sus scrofa domestica*) oraz ustalenie potencjalnych zależności pomiędzy genotypami analizowanych fragmentów genu a cechami użytkowymi świń (tucznymi i rzeźnymi) oraz wybranymi parametrami jakości mięsa.

Materiały i metody. Badaniami objęto 722 osobników 3 ras świń: polska biała zwisłoucha, wielka biała polska i puławska. Zwierzęta utrzymywano w Stacjach Kontroli Użytkowości Rzeźnej Trzody Chlewnej (SKURTCh) Instytutu Zootechniki PIB w Balicach. Warunki utrzymania wszystkich osobników były takie same. Genomowe DNA wyizolowano z tkanki mięśnia najdłuższego grzbietu przy użyciu zestawów firmy A&A Biotechnology (Polska): Sherlock AX oraz Genomic Mini. W pierwszym etapie badań eksony w genie *HK2* zostały poddane analizie za pomocą metody PCR-HRM. Wytypowane za pomocą tej techniki fragmenty amplifikacji PCR, a otrzymane produkty zsekwencjonowano metodą Sanger. W analizowanych fragmentach genu *HK2* wykazano obecność 15 mutacji. Dla dwóch zidentyfikowanych polimorfizmów, zmian typu SNP znajdujących się: w regionie splicingowym eksonu 7 (g.68177052A>G) oraz w eksonie 12 (g.68167661C>T) opracowano odpowiednią metodę molekularną (odpowiednio PCR-RFLP oraz PCR-ACRS) pozwalającą na oznaczenie frekwencji wybranych mutacji na większej grupie zwierząt. Analiza statystyczna przeprowadzona została przy użyciu pakietu SAS/STAT.

Wyniki. Uzyskane frekwencje wariantów polimorficznych analizowanego genu pokazują, iż występuje zmienność w obrębie genu *HK2*. Zidentyfikowane polimorfizmy wykazują istotną asocjację z wybranymi cechami tucznymi, rzeźnymi oraz jakością mięsa u świń różnych ras.

Wnioski. Gen *HK2* może kandydować do miana genu markera genetycznego wybranych cech tucznych.

9. Abstract

Nowadays, intensive research is conducted to improve the quality of pork. The quality of meat is a set of features that determine its utility value and features that determine its nutritional value for a consumer. However, for a modern consumer, among the numerous parameters that characterise meat, the most important are: colour, tenderness, juiciness, as well as taste and smell, i.e. organoleptic parameters. The reasons for the above phenomenon are multi-faceted and include both environmental and genetic aspects. Understanding them in terms of association with the quality of pork may, in the future, enable the selection of animals with a preferred genetic variant, whose meat will be characterised by more favourable meat quality parameters. This is a priority issue for pig farmers and producers. In this context, the analysis of polymorphic variants of the *HK2* gene in terms of the performance characteristics of pigs and pork quality parameters can be considered justified due to the biological role in the regulation of the glycolysis process, as well as due to the molecular nature of the mechanism indicating the variability of the encoded proteins.

The aim of this dissertation. The aim of this study was to detect polymorphisms in the gene encoding hexokinase 2 (*HK2*) in domestic pig (*Sus scrofa domestica*) and to determine the potential relationships between the genotypes of the analysed gene fragments and the performance characteristics of pigs (fattening and slaughter) and selected parameters of meat quality.

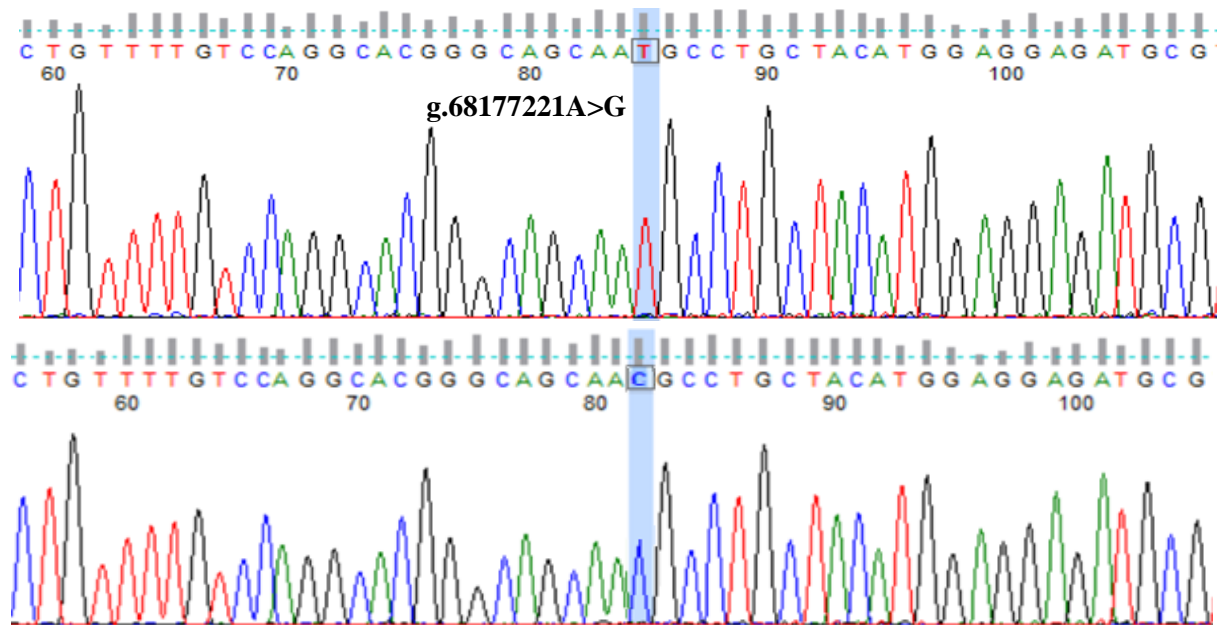
Materials and methods. The research covered 722 pigs of 3 breeds: Polish Landrace, Polish Large White and native breed Puławska. The animals were kept at Pig Tests Stations (National Research Institute of Animal Production) in Balice, Poland. Feeding and housing conditions were consistent for all animals. Genomic DNA was isolated from *longissimus dorsi* muscle with the use of A&A Biotechnology (Poland) sets: Sherlock AX and Genomic Mini. In the first phase of the research, exons in the gene *HK2* had to go through PCR-HRM method. Fragments of PCR amplification selected by this technique, and the obtained products were sequenced using the Sanger method. 15 mutations were found in the analysed *HK2* gene fragments. For two identified polymorphisms, SNP type located in the splicing region of exon 7 (g.68177052A> G) and in exon 12 (g.68167661C> T), an appropriate molecular method was developed (PCR-RFLP and PCR-ACRS, respectively) allowing to determine the frequency of selected mutations on a larger group of animals. Statistical analysis was performed using the SAS / STAT software.

Results. The obtained frequencies of the polymorphic variants of the analysed gene show that there is variability within the *HK2* gene. The identified polymorphisms show a significant association with selected fattening and slaughter characteristics as well as meat quality in pigs of various breeds.

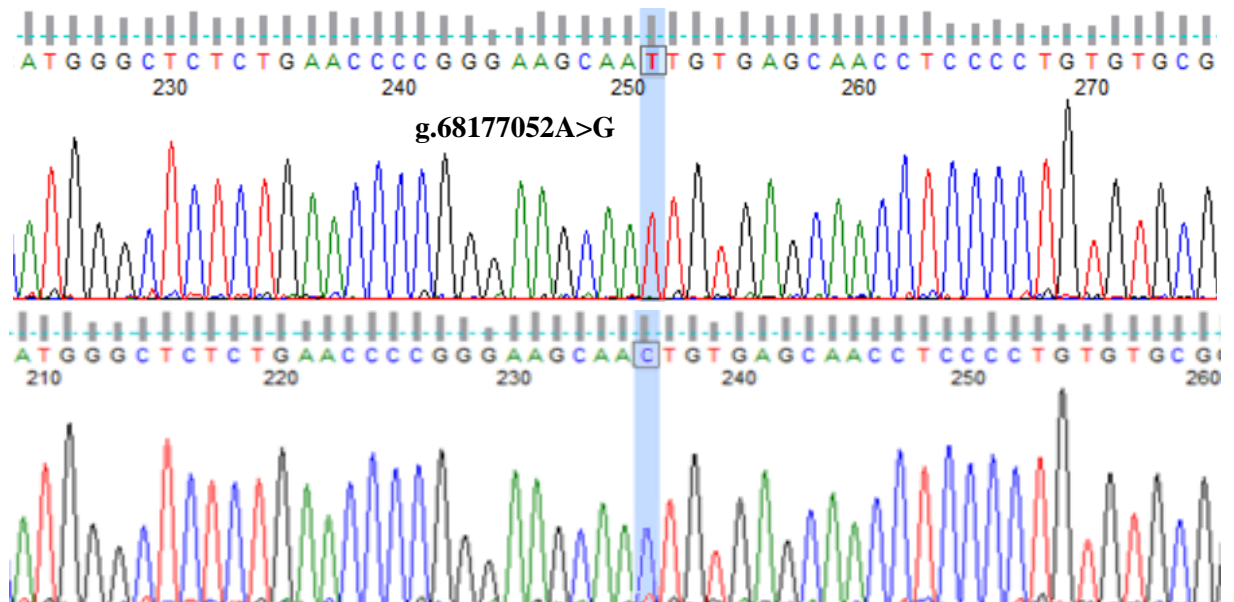
Conclusions. The *HK2* gene may be a candidate gene for a genetic marker gene of selected fattening traits.

10. Supplement

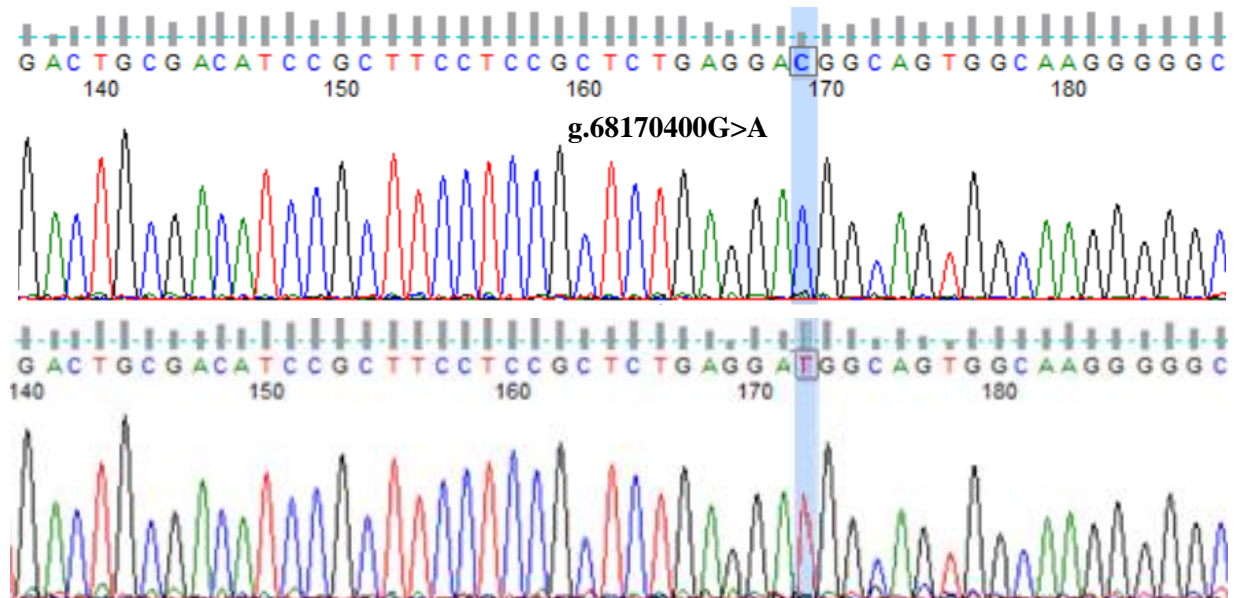
Zidentyfikowane mutacje, znajdujące się w regionach kodujących:



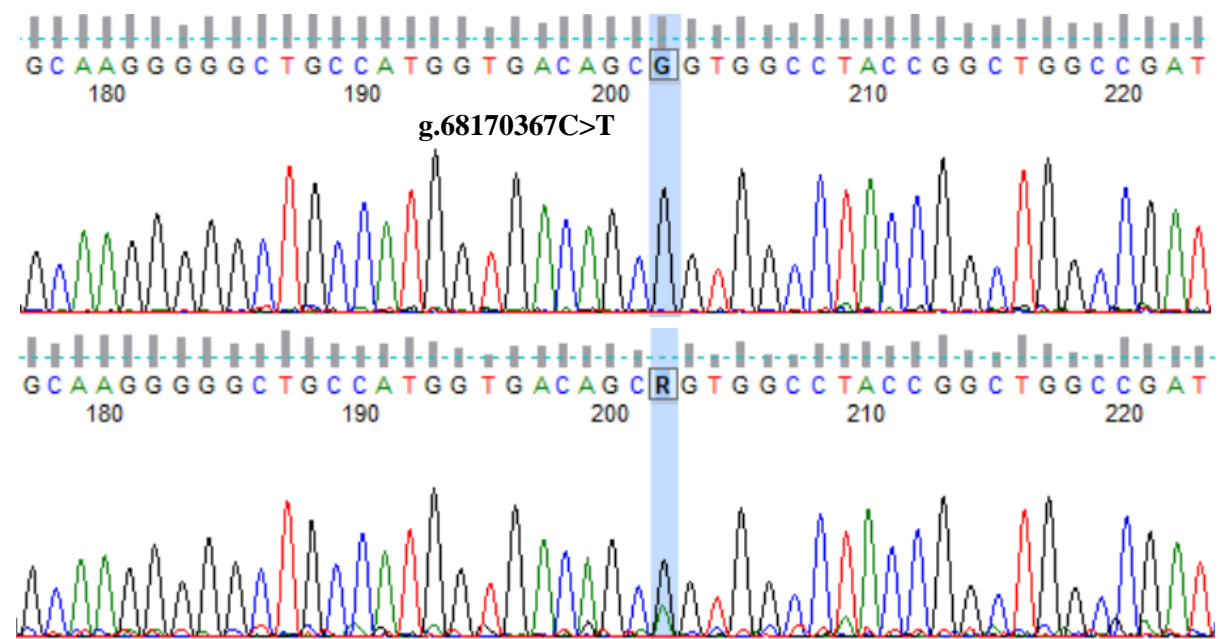
Fotografia 1. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 7 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68177221A>G.



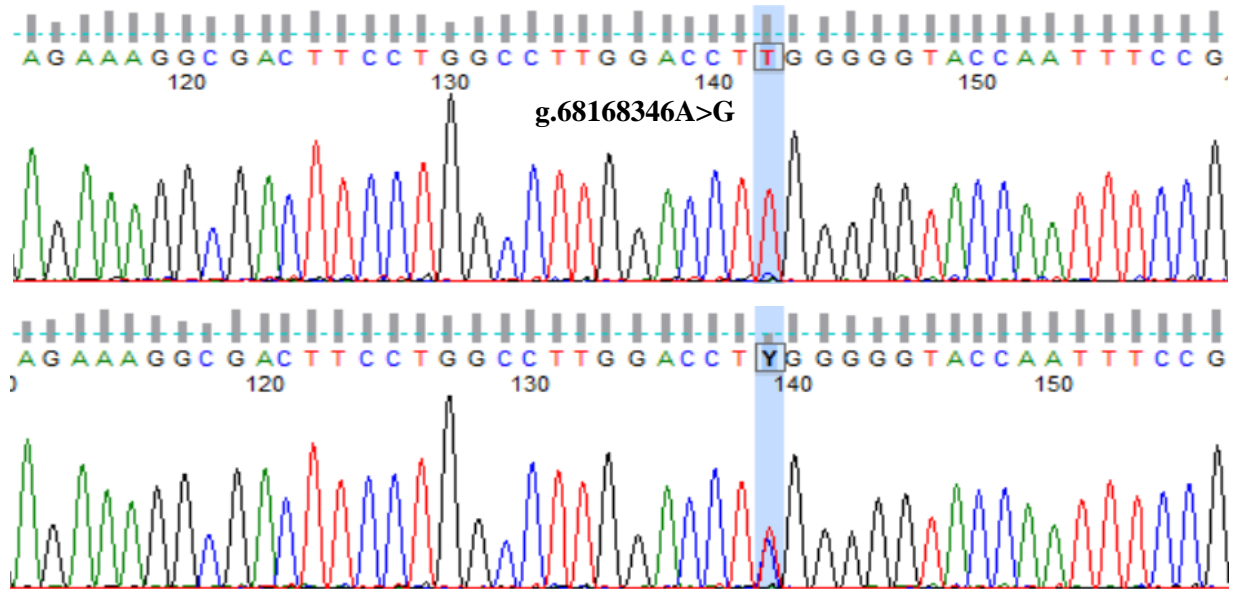
Fotografia 2. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 7 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68177052A>G.



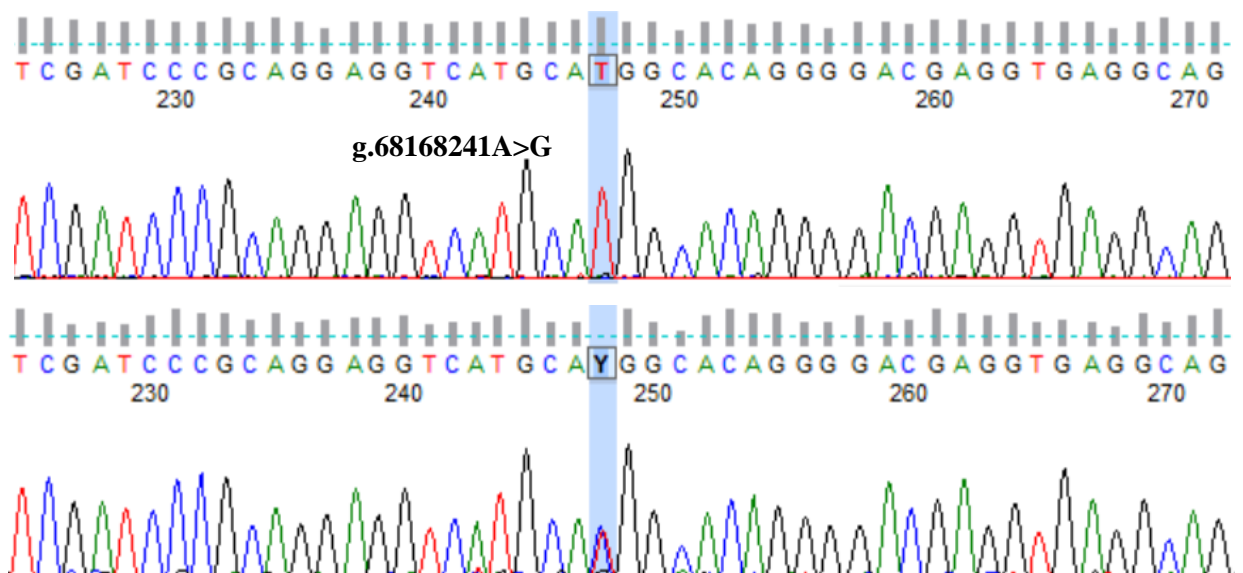
Fotografia 3. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 10 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68170400G>A.



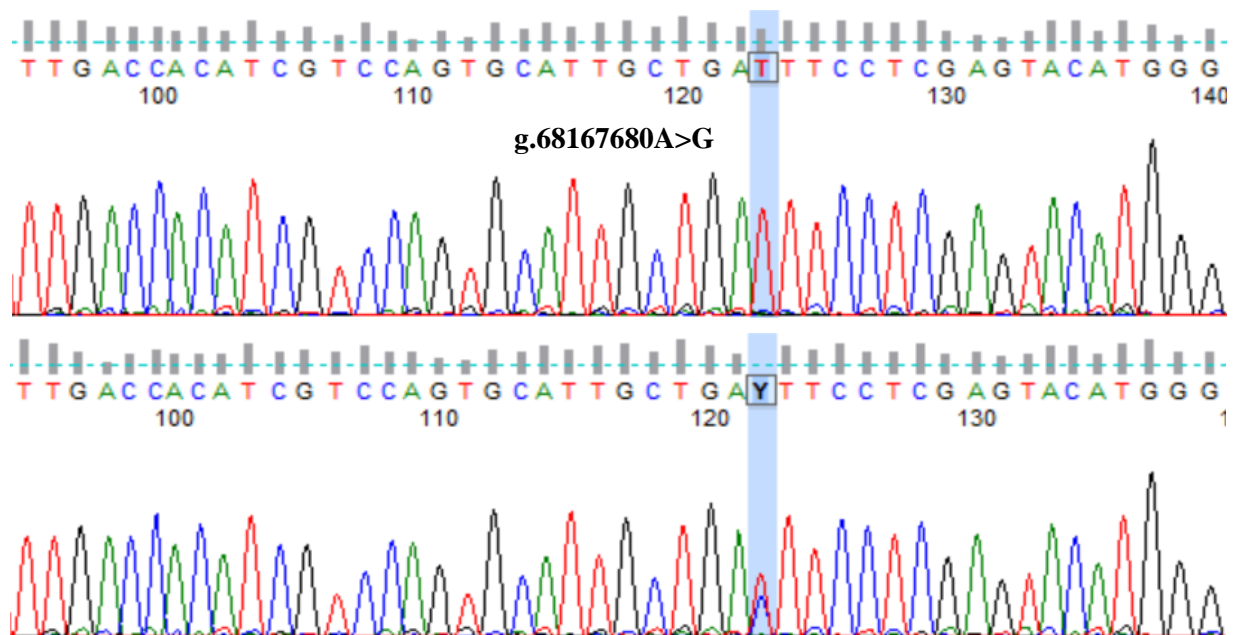
Fotografia 4. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 10 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68170367C>T.



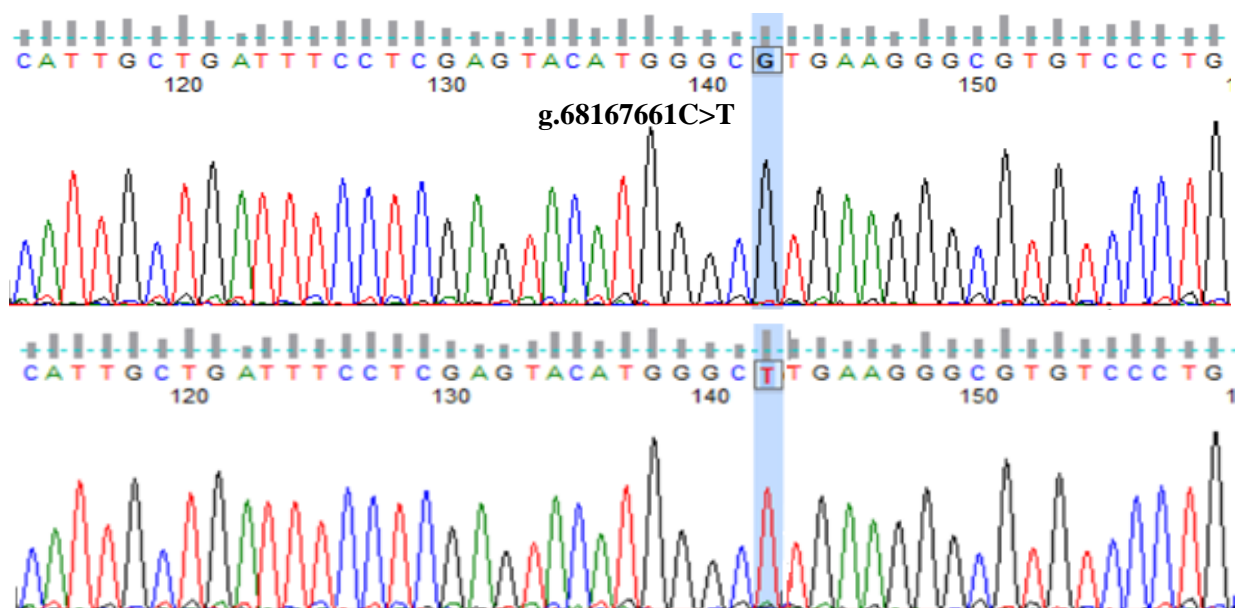
Fotografia 5. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 11 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68168346A>G.



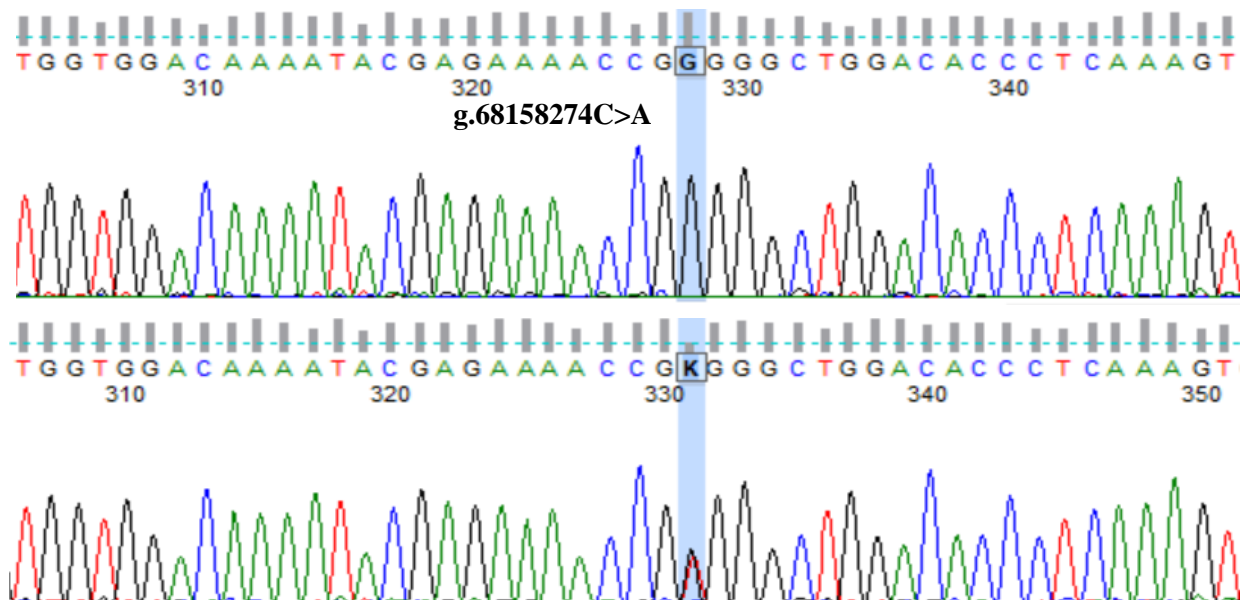
Fotografia 6. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 11 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68168241A>G.



Fotografia 7. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 12 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68167680A>G.

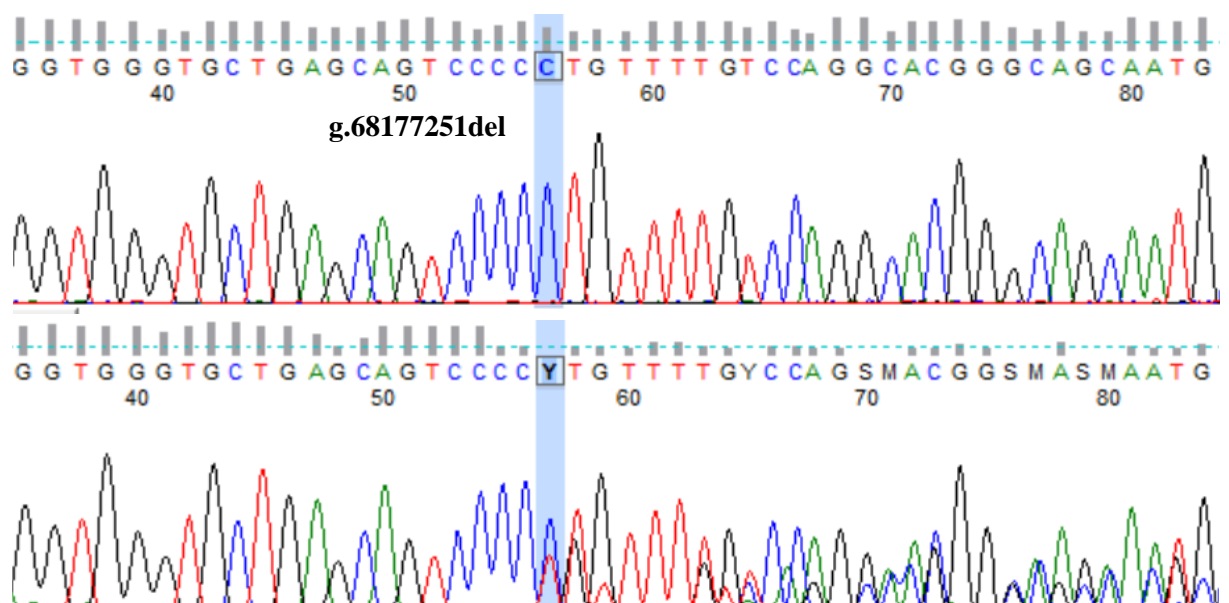


Fotografia 8. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 12 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68167661C>T.

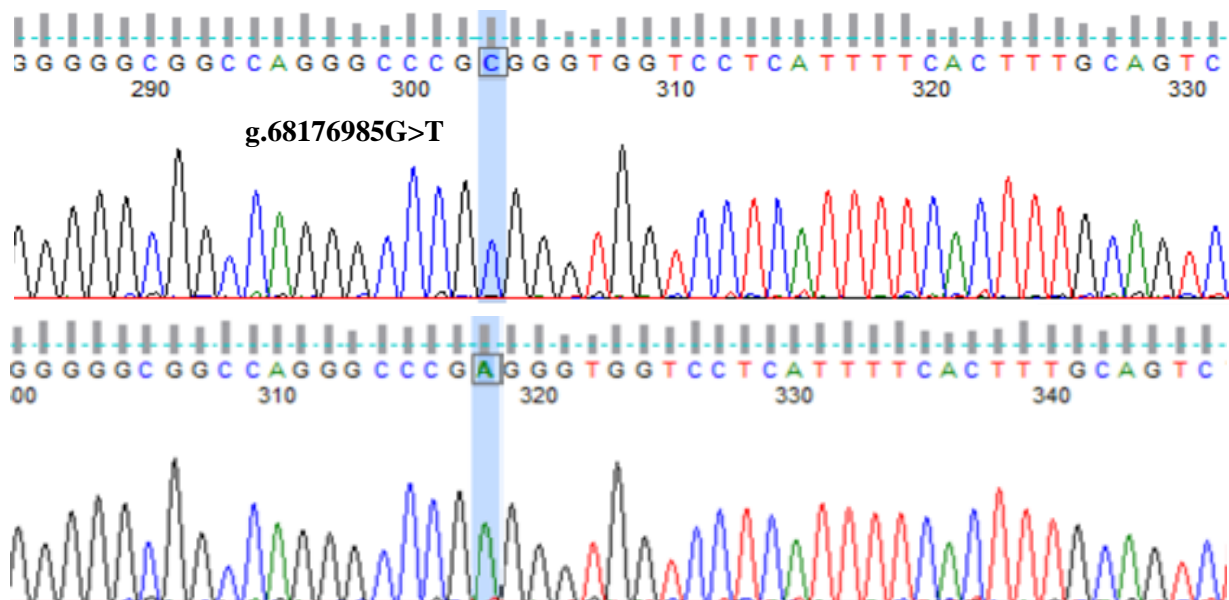


Fotografia 9. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 17 eksonu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68158274C>A.

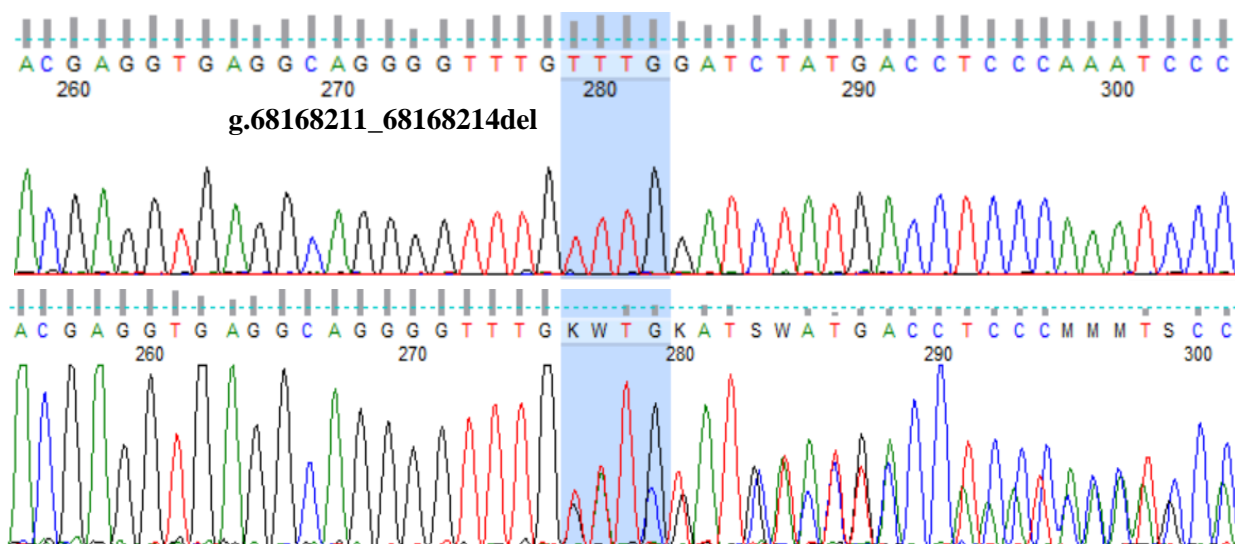
Mutacje w regionach intronowych:



Fotografia 10. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 6 intronu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68177251del.

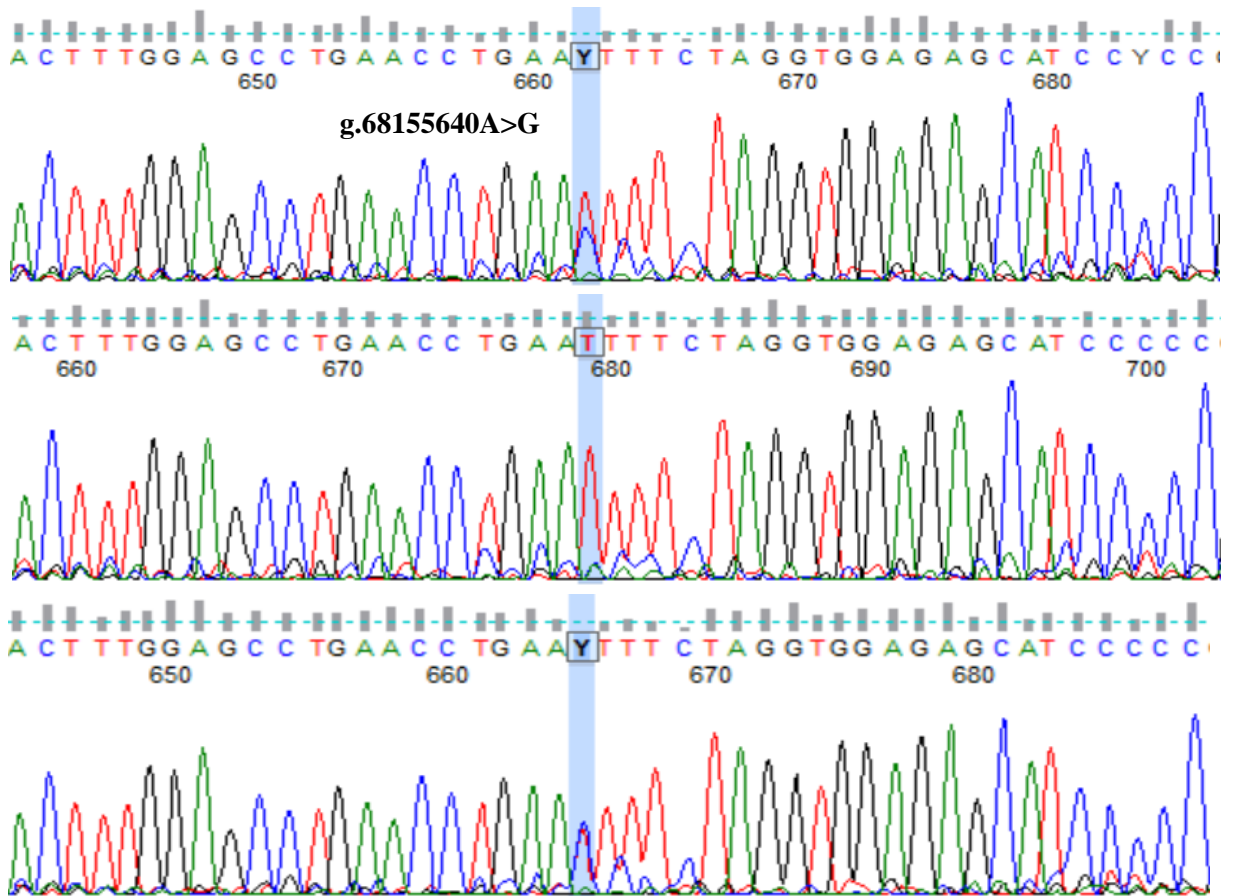


Fotografia 11. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 7 intronu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68176985G>T.

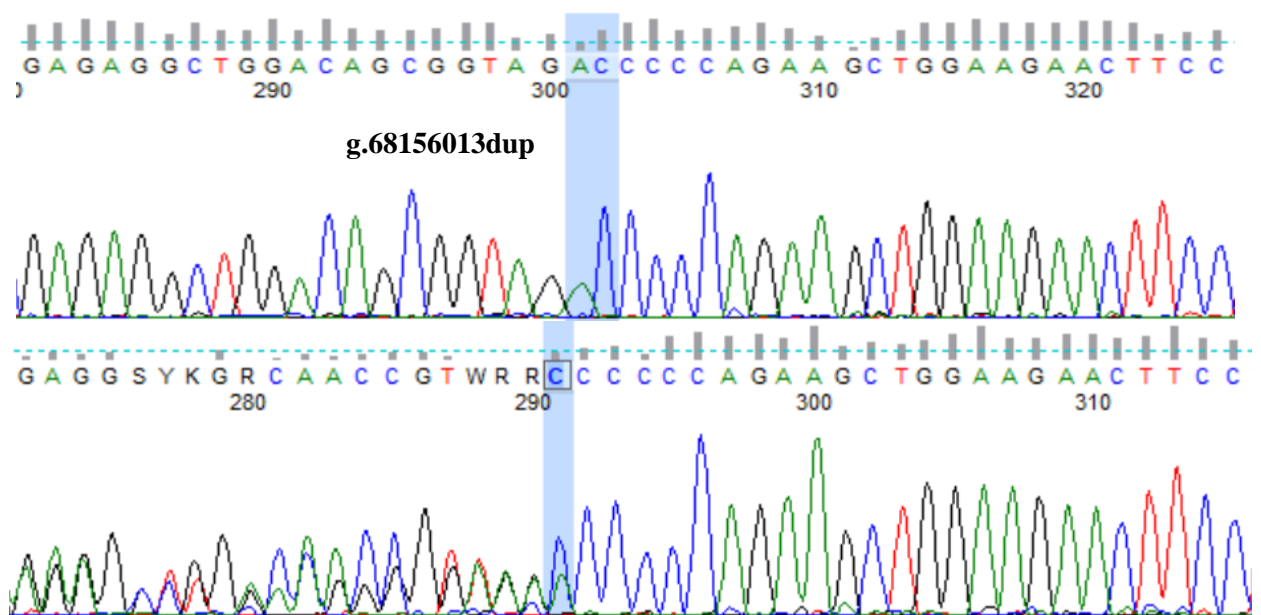


Fotografia 12. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu 11 intronu genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68168211_68168214del.

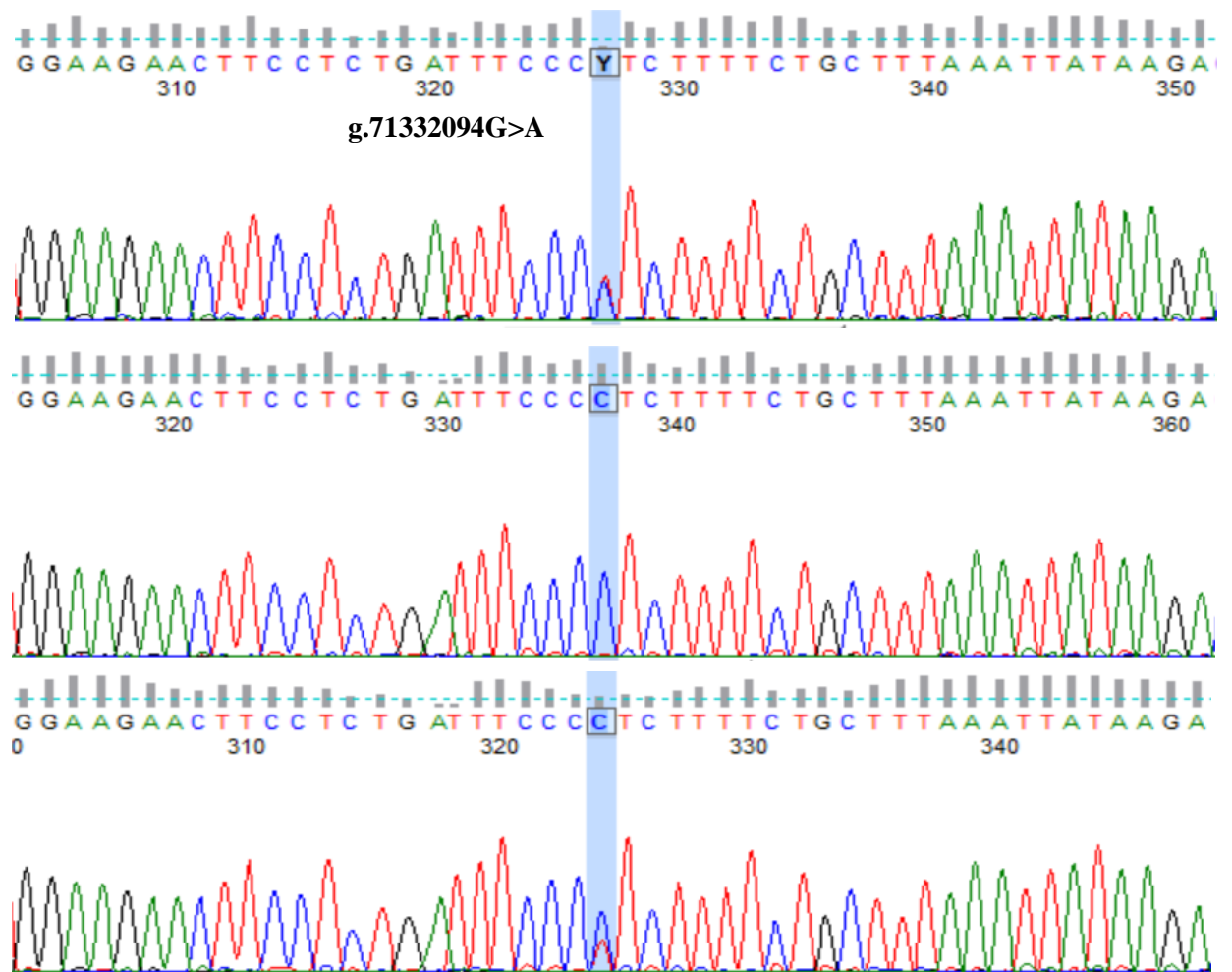
Mutacje w regionie 3'UTR:



Fotografia 13. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu regionu 3'UTR genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68155640A>G.



Fotografia 14. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu regionu 3'UTR genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.68156013dup.



Fotografia 15. Chromatogram uzyskany po sekwencjonowaniu regionu 3'UTR genu *HK2*. Na niebiesko zaznaczono miejsce wystąpienia zidentyfikowanej mutacji: g.71332094G>A.

11. Spis tabel

Tabela 1. Klasy jakościowe mięsa według powszechnie uznanych wartości granicznych pH.	16
Tabela 2. Liczebność osobników poszczególnych ras przeznaczonych do badań.	27
Tabela 3. Skład poszczególnych pasz. Mieszanki pochodzą z firmy paszowej komercyjnej, skład procentowy komponentów jest tajemnicą firmy.	28
Tabela 4. Parametry pokarmowe paszy, którą były karmione zwierzęta.	28
Tabela 5. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR z użyciem polimerazy 360 AmpliTaq.	32
Tabela 6. Profil termiczny reakcji PCR z użyciem polimerazy 360 AmpliTaq.	33
Tabela 7. Profil termiczny reakcji PCR-HRM KAPA™ HRM FAST PCR Kit.	34
Tabela 8. Startery zastosowane do przeprowadzenia reakcji PCR-HRM i sekwencjonowania oraz długości otrzymanych amplikonów.	35
Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR sekwencyjnego.	38
Tabela 10. Profil termiczny reakcji PCR „sekwencyjnego”.	38
Tabela 11. Skład mieszaniny BigDye® X Terminator™ Purification Kit.	38
Tabela 12. Sekwencje starterów wykorzystanych do namnożenia badanych fragmentów genu <i>HK2</i>	39
Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR z użyciem polimerazy KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix (2x).	40
Tabela 14. Profil termiczny reakcji PCR z użyciem polimerazy KAPA HiFi™ HotStart ReadyMix (2x).	40
Tabela 15. Warunki reakcji PCR-RFLP oraz PCR-ACRS dla zidentyfikowanych polimorfizmów.	41
Tabela 16. Zidentyfikowane mutacje <i>HK2</i> znajdujące się w regionach kodujących.	47
Tabela 17. Zidentyfikowane mutacje <i>HK2</i> znajdujące się w regionach intronowych.	47
Tabela 18. Zidentyfikowane mutacje <i>HK2</i> znajdujące się w regionie 3'UTR.	48
Tabela 19. Frekwencje genotypów oraz alleli polimorfizmu g.68177052A>G (<i>HK2/TasI</i>) w odniesieniu dla wszystkich badanych ras.	51
Tabela 20. Frekwencja genotypów oraz alleli polimorfizmu g.68167661C>T (<i>HK2/BstUI</i>) w odniesieniu dla wszystkich badanych ras.	52
Tabela 21. Średnie wartości badanych cech oraz wpływ efektu rasy, roku uboju oraz polimorfizmu g.68177052A>G i g.68167661C>T na cechy jakości mięsa wieprzowego.	55

Tabela 22. Średnie wartości badanych cech oraz wpływ efektu rasy, roku uboju oraz polimorfizmu g.68177052A>G i g.68167661C>T na cechy rzeźne.	56
Tabela 23. Średnie wartości badanych cech oraz wpływ efektu rasy, roku uboju oraz polimorfizmu g.68177052A>G i g.68167661C>T na cechy tuczne.	57
Tabela 24. Wpływ polimorfizmu g.68177052A>G w genie <i>HK2</i> na cechy jakości świń różnych ras.	58
Tabela 25. Wpływ polimorfizmu g.68177052A>G w genie <i>HK2</i> na cechy rzeźne świń różnych ras.	59
Tabela 26. Wpływ polimorfizmu g.68177052A>G w genie <i>HK2</i> na cechy tuczne świń różnych ras.	60
Tabela 27. Wpływ polimorfizmu g.68167661C>T w genie <i>HK2</i> na cechy jakości świń różnych ras.	61
Tabela 28. Wpływ polimorfizmu g.68167661C>T w genie <i>HK2</i> na cechy rzeźne świń różnych ras.	62
Tabela 29. Wpływ polimorfizmu g.68167661C>T w genie <i>HK2</i> na cechy tuczne świń różnych ras.	63

12. Spis rycin

Rycina 1. Schemat bryły barw CIE LAB ($L^*a^*b^*$), L^*C^*h	15
Rycina 2. Schemat reakcji glikolizy.	20
Rycina 3. Fosforylacja katalizowana przez heksokinazę – pierwszy etap metabolizmu glukozy.	21
Rycina 4. Schemat reakcji fosforylacji katalizowanej przez enzym heksokinazę.	24
Rycina 5. Lokalizacja genu <i>HK2</i> u <i>Sus scrofa domestica</i> w chromosomie 3.	24
Rycina 6. Warianty splicingowe genu <i>HK2</i>	25
Rycina 7. Cechy charakteryzujące istotne aspekty hodowlane świń.	30
Rycina 8. Sekwencja rozpoznawana przez enzym <i>TasI</i>	41
Rycina 9. Sekwencja rozpoznawana przez enzym <i>BstUI</i>	41
Rycina 10. Przykładowe wyniki analizy HRM dla genu <i>HK2</i> , na podstawie których nie zidentyfikowano występowania mutacji.	43
Rycina 11. Wyniki analizy HRM dla eksonu 7 genu <i>HK2</i> . Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę tę poddano reakcji sekwencjonowania.	44
Rycina 12. Wyniki analizy HRM dla eksonu 10 genu <i>HK2</i> . Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę tę poddano reakcji sekwencjonowania.	44
Rycina 13. Wyniki analizy HRM dla eksonu 11 genu <i>HK2</i> . Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę tę poddano reakcji sekwencjonowania.	45
Rycina 14. Wyniki analizy HRM dla eksonu 12 genu <i>HK2</i> . Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę tę poddano reakcji sekwencjonowania.	45
Rycina 15. Wyniki analizy HRM dla eksonu 17 genu <i>HK2</i> . Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę tę poddano reakcji sekwencjonowania.	46
Rycina 16. Wyniki analizy HRM dla eksonu 18 genu <i>HK2</i> . Na kolorowo zaznaczono krzywe, które potencjalnie świadczą o występowaniu mutacji. Próbkę tę poddano reakcji sekwencjonowania.	46
Rycina 17. Rycina obrazująca lokalizację mutacji $g.68167661C>T$ w białku <i>HK2</i>	48

Rycina 18. Graficzny schemat przedstawiający lokalizację zidentyfikowanych polimorfizmów w genie <i>HK2</i>	49
Rycina 19. Obraz elektroforetyczny polimorfizmu g.68177052A>G. Wynik otrzymany po rozdzieleniu elektroforetycznym amplicjonów PCR w 4,5% żelu agarozowym, z dodatkiem bromku etydyny i poddane wizualizacji w świetle UV po wcześniejszym zastosowaniu enzymu restrykcyjnego <i>TasI</i>	50
Rycina 20. Obraz elektroforetyczny polimorfizmu g.68167661C>T. Wynik otrzymany po rozdzieleniu elektroforetycznym amplicjonów PCR w 4,5% żelu agarozowym, z dodatkiem bromku etydyny i poddane wizualizacji w świetle UV po wcześniejszym zastosowaniu enzymu restrykcyjnego <i>BstUI</i>	50

13. Bibliografia

1. **Aleshin A.E., Zeng C., Bourenkov G.P., Bartunik H.D., Fromm H.J., Hon-zatko R.B.** 1998. The mechanism of regulation of hexokinase: new insights from the crystal structure of recombinant human brain hex-okinase complexed with glucose and glucose-6-phosphate. *Structure*. 6(1): 39-50.
2. **Aslan O., Hamill R.M., Davey G., McBryan J., Mullen A.M., Gispert M., Sweeney T.** 2012. Variation in the IGF2 gene promoter region is associated with intramuscular fat content in porcine skeletal muscle. *Molecular Biology Reports*. 39(4): 4101-4110.
3. **Barbera S.** 2009. WHC trend, a Dynamic Parameter Based on the Filter Paper Press Method to Measure Water Holding Capacity in Meat. The 55th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Copenhagen, Denmark, 16-21 August 2009.
4. **Bee G., Anderson A.L., Lonergan S.M.** 2007. Rate and extend of pH decline affect proteolysis of cytoskeletal proteins and water-holding capacity in pork. *Meat Science*. 76(2): 359-365.
5. **Bendall J.R.** 1951. The shortening of rabbit muscles during rigor mortis: its relation to the breakdown of adenosine triphosphate and creatine phosphate and to muscular contraction. *The Journal of Physiology*. 114(1-2): 71-88.
6. **Blicharski T., Hammermeister A., Pierzchała M.** 2006. Zawartość tłuszczu śródmięśniowego w mięsie wieprzowym. *Gospodarka Mięsna*. 6 (58): 30-33.
7. **Blicharski T., Książek P., Pospiech E., Migdał W., Józwik A., Poławska E., Lisiak D., Hammermaister A., Warda A.** 2015. Aktualna wartość dietetyczna wieprzowiny, jej znaczenie w diecie i wpływ na zdrowie konsumentów. Opracowanie wyników badań laboratoryjnych. Praca zbiorowa, Polski Związek Hodowców i Producentów Trzody Chlewnej „POLSUS”.
8. **Bowker B.C., Grant A.L., Forrest J.C., Gerrard D.E.** 2000. Muscle metabolism and PSE pork. *Journal of Animal Science*. 79 (1): 1-8.
9. **Brzóska F.** 2001. Jakość mięsa wieprzowego. *Trzoda Chlewna*. 39 (8-9): 112–116.

10. **Burgos C., Galve A., Moreno C., Altarriba J., Reina R., García C., López-Buesa P.** 2011. The effects of two alleles of IGF2 on fat content in pig carcasses and pork. *Meat Science*. 90 (2): 309-313.
11. **Cardenas M.L., Cornish-Bowden A., Ureta T.** 1998. Evolution and regulatory role of the hexokinases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1401 (3): 242-264
12. **Cobanovic N., Stajkovic S., Grkovic N., Suvajdzic B., Vasilev D., Karabasil N.** 2019. Effects of RYR1 gene mutation on the health, welfare, carcass and meat quality in slaughter pigs. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 333: 1-8.
13. **Davoli R., Braglia S., Valastro V., Annarratone C., Comella M., Zambonelli P., Nisi I., Gallo M., Buttazzoni L., Russo V.** 2012. Analysis of MC4R polymorphism in Italian Large White and Italian Duroc pigs: association with carcass traits. *Meat Science*. 90 (4): 887-892.
14. **Dżugaj A.** 2004. Węglowodany i ich metabolizm. Uniwersytet Wrocławski, Instytut Genetyki i Mikrobiologii, www.fundacjarozwojunauki.pl, dostęp: styczeń 2021.
15. **Enfält A.C., Lundström K., Karlsson A., Hansson I.** 1997. Estimated frequency of the RN- allele in Swedish Hampshire pigs and comparison of glycolytic potential, carcass composition, and technological meat quality among Swedish Hampshire, Landrace, and Yorkshire pigs. *Journal of Animal Science*. 75 (11): 2924-2935.
16. **Estellé J., Mercadé A., Noguera J., Pérez-Enciso M., Óvilo C., Sánchez A., Folch J.** 2005. Effect of the porcine IGF2-intron3-G3072A substitution in an outbred Large White population and in Iberian x Landrace cross. *Journal of Animal Science*. 83 (12): 2723–2728
17. **Fazarinc G., Vrecl M., Poklukar K., Škrlep M., Batorek-Lukač N., Brankovič J., Tomažin U., Čandek-Potokar M.** 2020. Expression of Myosin Heavy Chain and Some Energy Metabolism-Related Genes in the Longissimus Dorsi Muscle of Krškopolje Pigs: Effect of the Production System. *Frontiers in Veterinary Science*. 7: 533936.

18. **Fontanesi L., Davoli R., Nanni Costa L., Beretti F., Scotti E., Tazzoli M., Tassone F., Colombo M., Buttazzoni L., Russo V.** 2008. Investigation of candidate genes for glycolytic potential of porcine skeletal muscle: Association with meat quality and production traits in Italian Large White pigs. *Meat Science*. 80 (3): 780-787.
19. **Fontanesi L., Speroni C., Buttazzoni L., Scotti E., Dall'olio S., Nanni Costa L., Davoli R., Russo V.** 2010. The insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene intron3-g.3072G>A polymorphism is not the only *Sus scrofa* chromosome 2p mutation affecting meat production and carcass traits in pigs: evidence from the effects of a cathepsin D (CTSD) gene polymorphism. *Journal of Animal Science*. 88 (7): 2235-2245.
20. **Forlemu N.Y., Waingeh V.F., Ouporov I.V., Lowe S.L., Thomasson K.A.** 2007. Theoretical study of interactions between muscle aldolase and F-actin: Insight into different species. *Biopolymers*. 85 (1): 60–71.
21. **Fujii J., Otsu K., Zorzato F., de Leon S., Khanna V.K., Weiler J.E., O'Brien P.J., MacLennan D.H.** 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253 (5018): 448-451.
22. **Grau R., Hamm R.** 1953. Eine einfache Methode zur Bestimmung der Wasserbindung im Muskel. *Die Naturwissenschaften* 40 (1): 29–30.
23. **Grela E.R., Pietrzak K., Sobolewska S., Witkowski P.** 2013. Effect of inulin and garlic supplementation in pig diets. *Annals of Animal Science*. 13 (1): 63–71.
24. **Gronek P., Słomski R., Kwiatkowska J.** 1998. Molekularne podłoże podwyższonej wrażliwości świń na czynniki stresowe. *Medycyna Weterynaryjna*. 54: 29-32.
25. **Gozalo-Marcilla M., Buntjer J., Johnsson M., Batista L., Diez F., Werner Ch.R., Chen Ch., Gorjanc G., Mellanby R.J., Hickey J.M., Ros-Freixedes R.** 2021. Genetic architecture and major genes for backfat thickness in pig lines of diverse genetic backgrounds. *Genetics Selection Evolution*. 53 (76): 1-14.
26. **Gozdecka G.** 2006. Zastosowanie obiektywnej metody kolorymetrycznej do oceny barwy mięsa. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*. 16 (2): 35-37.

27. **Górska M.** 2016. Tłuszcz śródmięśniowy (IMF) jako ważny składnik tkanki mięśniowej. *Polskie Mięso*. 19: 24-25.
28. **Grosse-Kleimann J., Wegner B., Spiekermeier I., Grosse Beilage E., Kemper N., Nienhoff H., Plate H., Meyer H., Gerhardy H., Kreienbrock L.** 2021. Health Monitoring of Fattening Pigs – Use of Production Data, Farm Characteristics and On-Farm Examination. *Porcine Health Management*. 7 (45): 1-13.
29. **Hamilton D.N., Miller K.D., Ellis M., McKeith F.K. Wilson E.R.** 2003. Relationships between longissimus glycolytic potential and swinegrowth performance, carcass traits, and pork quality. *Journal of Animal Science*. 81 (9): 2206-2212.
30. **Heikkinen S., Suppola S., Malkki M., Deeb S.S, Janne J. Laakso M.** 2000. Mouse hexokinase II gene: Structure, cDNA, promoter analysis, and expression pattern. *Mammalian Genome*. 11 (2): 91-96.
31. **Henckel P., Karlsson A., Jensen M.T., Oksbjerg N., Petersen J.S.** 2002. Metabolic conditions in porcine longissimus muscle immediately pre-slaughter and its influence on peri-and post mortem energy metabolism. *Meat Science*. 62 (2):145–55.
32. **Honikel K.O.** 2009. Moisture and water-holding capacity. *Handbook of Muscle Foods Analysis*. Nollet L. M. L., Toldra F. CRC Press.
33. **Horubała A.** 1966. Niektóre zagadnienia obiektywnej oceny barwy żywności. *Przemysł Spożywczy*. 20 (6): 3-11.
34. **Hwang Y.H., Kim G.D., Jeong J.Y., Hur S.J., Joo S.T.** 2010. The relationship between muscle fiber characteristics and meat quality traits of highly marbled Hanwoo (Korean native cattle) steers. *Meat Science*. 86 (2): 456–461.
35. **Instytut Ekonomiki Rolnictwa i Gospodarki Żywnościowej – Państwowy Instytut Badawczy.** 2022. Rynek rolny. 52-55.
36. **Jakubowska M., Gardzielewska J., Kortz J.** 2004. Formation of physicochemical properties of broiler chicken breast muscles depending on pH value measured 15 minutes after slaughter *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. 3 (1): 139-144.

37. **Janik A., Pieszka M., Migdał W.** 2006. Effect of RYR1 genotype on carcass and meat quality in Polish Landrace pigs. *Annals of Animal Science*. 1: 70-71.
38. **Joo S.T.** 2018. Determination of Water-holding Capacity of Porcine Musculature Based on Released Water Method Using Optimal Load. *Food Science of Animal Resources*. 38 (4): 823-828.
39. **Joo S.T., Kim G.D., Hwang Y.H., Ryu Y.C.** 2013. Control of fresh meat quality through manipulation of muscle fiber characteristics. *Meat Science*. 95 (4): 828-836.
40. **Jun W., Chang-Yan D., Yuan-Zhu X., Bo Z.** 2012. Association analysis of polymorphism in intron-10 of Porcine HK2 gene with meat quality and carcass traits. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11 (8): 1158-1161.
41. **Jun W., Chang-Yan D., Yuan-Zhu X., Bo Z., Huan-Chen C., Fenge L., Ming-Gang L., Rong Z., Si-Wen J.** 2006. Sequencing, polymorphism and expression profile analysis of porcine Hexokinase II (*HK2*) Gene. *Agricultural Sciences in China*. 5: 384-389.
42. **Kajak K., Przybylski W., Jaworska D., Rosiak E.** 2007. Charakterystyka jakości technologicznej, sensorycznej i trwałości mięsa wieprzowego o zróżnicowanej końcowej wartości pH. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 1 (50): 26-34.
43. **Kapelański W., Kurył J., Bocian M., Rak B.** 1999. The effect of RYR1 gene on meat quality traits in Polish Landrace, Pietrain and Złotniki Spotted pigs. *Advances in Agricultural Sciences*. 6 (2): 39-44.
44. **Karpiesiuk K., Kozera W., Bugnacka D., Falkowski J.** 2013. Wpływ warunków chowu tuczników na jakość mięsa i profil kwasów tłuszczowych w mięśni najdłuższym grzbiecie. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 3 (88): 39-50.
45. **Kim K.S., Larsen N., Short T., Plastow G., Rothschild M.F.** 2000. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome*. 11 (2): 131-135.

46. **Koćwin-Podsiadła M., Zybert A., Krzęcio E., Antosik K., Sieczkowska H.** 2009. Biochemiczne mechanizmy kontrolujące jakość wieprzowiny. Genomika bydła i świń – wybrane zagadnienia. Praca zbiorowa pod red. L. Zwierzchowskiego i M. Świtońskiego. Wyd. UP Poznań.
47. **Konieczna A., Lyżeń R., Węgrzyn G.** 2015. Powiązanie glikolizy z regulacją replikacji DNA w komórkach eukariotycznych. *Postępy Biochemii*. 61 (4): 444-460.
48. **Le N.H., Shin S., Tu T.H., Kim C-S., Kang J-H., Tsuyoshi G., Teruo K., Han S.N., Yu R.** 2012. Diet enriched with korean pine nut oil improves mitochondrial oxidative metabolism in skeletal muscle and brown adipose tissue in diet-induced obesity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60 (48): 11935-11941.
49. **Li Y., Yu C., Li J., Zhang L., Gao F., Zhou G.** 2017. Effects of dietary energy sources on early postmortem muscle metabolism of finishing pigs. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 30(12): 1764-1772.
50. **Lin L.** 2009. Genomic characterization and polymorphism analysis of genes involved in lipid- and energy metabolism in swine. PhD Thesis, Technische Universität München. 2-22.
51. **Malenfant P., Joannisse D.R., Thériault R., Goodpaster B.H., Kelley D.E., Simoneau J.A.** 2001. Fat content in individual muscle fibers of lean and obese subjects. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*. 25 (9): 1316–1321.
52. **Maślanka R., Zadrąg-Tęcza R.** 2020. Reproductive Potential of Yeast Cells Depends on Overall Action of Interconnected Changes in Central Carbon Metabolism, Cellular Biosynthetic Capacity, and Proteostasis. *International Journal of Molecular Sciences*. 21 (7313): 1-24.
53. **Maślanka R., Zadrąg-Tęcza R.** 2021. Wieloaspektowa rola glukozy i jej metabolizmu w regulacji parametrów fizjologicznych i potencjału reprodukcyjnego komórek na podstawie badań z użyciem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Postępy Biochemii*. 67 (1): 1-15.
54. **Mathupala S.P., Heese C., Pedersen P.L.** 1997. Glucose catabolism in cancer cells. The type II hexokinase promoter contains functionally active response elements for the tumor suppressor p53. *Journal of Biological Chemistry*. 272 (36): 22776-22780.

55. **Mickelson J.R., Knudson C.M., Kennedy C.F., Yang D.I., Litlerer L.A, Rempel W.E., Campbell K.P., Louis C.F.** 1992. Structural and functional correlates of a mutation in the malignant hyperthermia-susceptible pig ryanodine receptor. *FEBS Letters*. 301 (1): 49-52.
56. **Miller K.D., Ellis M., Bidner B., McKeith F.K., Wilson E.R.** 2000. Porcine Longissimus glycolytic potential level effects on growth performance, carcass, and meat quality characteristics. *Journal of Muscle Foods*. 11 (3): 169-181.
57. **Murgia M., Toniolo L., Nagaraj N., Ciciliot S., Vindigni V., Schiaffino S., Reggiani C, Mann M.** 2017. Single muscle fiber proteomics reveals fiber-type-specific features of human muscle aging. *Cell Reports*. 19 (11): 2396-2409.
58. **Murray R.K., Granner D.K., Rodwell V.W.** 2006. *Biochemia Harpera*. Warszawa, Wyd. Lek. PZWL, 185-204.
59. **Nelson D.L., Cox M.M.** 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York. 1152 p.
60. **Nevrkla P., Kapelański W., Václavková E., Hadaš Z., Cebulska A., Horký P.** 2017. Meat Quality and Fatty Acid Profile of Pork and Backfat from an Indigenous Breed and A Commercial Hybrid of Pigs. *Annals of Animal Science*. 4 (17): 1215-1227.
61. **Nguyen N.H., Macphee C.P., Wade C.M.** 2004. Genetic selection for efficient lean growth in pigs. *Pigs News Information*. 25: 149-163.
62. **Oczkowicz M., Tyra M., Ropka-Molik K., Mucha A., Żukowski K.** 2012. Effect of IGF2 intron3-g.3072G>A on intramuscular fat (IMF) content in pigs raised in Poland. *Livestock Science*. 149 (3): 301-304.
63. **Oczkowicz M., Tyra M., Walinowicz K., Różycki M., Rejduch B.** 2009. Known mutation (A3072G) in intron 3 of the IGF2 gene is associated with growth and carcass composition in Polish pig breeds. *Journal of Applied Genetics*. 50 (3): 257-259.
64. **O’Neill D.J., Lynch P.B., Troy D.J., Buckley D.J., Kerry J.P.** 2003. Effects of PSE on the quality of cooked hams. *Meat Science*. 64 (2): 113-118.

65. **Óvilo C., Fernández A., Rodríguez M.C., Nieto M., Silió L.** 2006. Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. *Meat Science*. 73 (1): 42-47.
66. **Parra J., Pette D.** 1995. Effects of low-frequency stimulation on soluble and structure-bound activities of hexokinase and phosphofructokinase in rat fast-twitch muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. 1251 (2): 154-160.
67. **PIC, USA.** 2020. Technical Update. Pork Meat Quality: Understanding Industry Measurements and Guidelines. www.pic.com/usa dostęp: Maj 2020.
68. **Piórkowska K., Tyra M., Rogoz M., Ropka-Molika K., Oczkowicz M., Różycki M.** 2010. Association of the melanocortin-4 receptor (MC4R) with feed intake, growth, fatness and carcass composition in pigs raised in Poland. *Meat Science*. 85 (2): 297-301.
69. **Piórkowska K., Żukowski K., Ropka-Molik K., Tyra M., Gurgul A.** 2018. A comprehensive transcriptome analysis of skeletal muscles in two Polish pig breeds differing in fat and meat quality traits. *Genetics and Molecular Biology*. 41 (1): 125-136.
70. **Ponce-Alquicira E.** 2007. Poultrymarination. *Handbook of Food Products Manufacturing*. Edited by Y.H. Hui, Copyright John Wiley & Sons California, 2007.
71. **Pösö A.R., Puolanne E.** 2005. Carbohydrate metabolism in meat animals. *Meat Science*. 70 (3): 423-434.
72. **Prasow M., Babicz M., Domaradzki P., Skalecki P., Litwińczuk A., Kaliniak A.** 2018. Wartość rzeźna i jakość mięsa świń ras lokalnych w Polsce. *Journal of Animal Science, Biology and Bioeconomy*. 36 (1): 5-17.
73. **Przybylski W., Jaworska D., Boruszewska K., Borejko M., Podsiadły W.** 2012. Jakość technologiczna i sensoryczna wadliwego mięsa wieprzowego. *ŻYWNOSĆ. Nauka. Technologia. Jakość*. 1 (80): 116 – 127.
74. **Reardon W., Mullen A.M., Sweeney T., Hamill R.M.** 2010. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Science*. 86 (2): 270-275.

75. **Rodrigues F., Ludovico P., Leão C.** 2006. Sugar Metabolism in Yeasts: an Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. W: Gabor P, Rosa C (red) The Yeast Handbook. Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer: Berlin: 101-121.
76. **Rolland F., Winderickx J., Thevelein J.M.** 2002. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. FEMS Yeast Research. 2: 183-201.
77. **Ropka-Molik K., Piórkowska K., Oczkowicz M., Szyndler-Nędza M., Blicharski T.** 2017. Występowanie niekorzystnego allelu genu RYR1 w populacji świń rasy puławskiej. Wiadomości Zootechniczne. 5 (4): 35–38.
78. **Rosenvold K., Andersen H.J.** 2003. Factors of significance for pork quality — a review. Meat Science. 64: 219–237.
79. **Różycki M., Tyra M.** 2010. Metodyka oceny wartości tucznej i rzeźnej świń przeprowadzana w stacjach kontroli użyteczności rzeźnej trzody chlewnej (SKURTCh). W: Stan hodowli i wyniki oceny świń. Wyd. IZ PIB. Kraków. XXVIII: 93–117.
80. **Ryu Y.C., Kim B.C.** 2006. Comparison of histochemical characteristics in various pork groups categorized by postmortem metabolic rate and pork quality. Journal of Animal Science. 84: 894–901.
81. **Ryu Y.C., Kim B.C.** 2005. The relationship between muscle fiber characteristics, postmortem metabolic rate, and meat quality of pig longissimus dorsi muscle. Meat Science. 71 (2): 351-357.
82. **Rødkaer S.V., Faergeman N.J.** 2014. Glucose- and nitrogen sensing and regulatory mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Research. 14 (5): 683-696.
83. **Scheffler T.L., Gerrard D.E.** 2007. Mechanisms controlling pork quality development: The biochemistry controlling postmortem energy metabolism. Meat Science. 77 (1): 7-16.
84. **Schwörer D., Hofer A., Lorenz D., Rebsamen A.** 2000. Selection progress of intramuscular fat in Swiss pig production. In Proceedings of the Joint Session of the EAAP Commissions on Pig Production. Animal Genetics and Animal Nutrition. Zurich. 69–72.

85. **Sebastian S., Edassery S., Wilson J.E.** 2001. The human gene for the type III isozyme of hexokinase: structure, basal promoter, and evolution. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 395 (1): 113-120.
86. **Shen L., Lei H., Zhang S., Li X., Li M., Jiang X., Zhu K., Zhu L.** 2014. The comparison of energy metabolism and meat quality among three pig breeds. *Animal Science Journal*. 85 (7): 770–779.
87. **Shen L.Y., Luo J., Lei H.G., Jiang Y.Z., Bai L., Li M.Z., Tang G.Q., Li X.W., Zhang S.H., Zhu L.** 2015. Effects of muscle fiber type on glycolytic potential and meat quality traits in different Tibetan pig muscles and their association with glycolysis-related gene expression. *Genetics and Molecular Research*. 14 (4): 14366-14378.
88. **Shi-Zheng G., Su-Mei Z.** 2009. Physiology, affecting factors and strategies for control of pig meat intramuscular fat. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*. 1(1): 59-74.
89. **Shoshan-Barmatz V., Zakar M., Rosenthal K., Abu-Hamad S.** 2009. Key regions of VDAC1 functioning in apoptosis induction and regulation by hexokinase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1787 (5): 421-430.
90. **Sienkiewicz J., Lewandowska D.** 2012. Czynniki wpływające na jakość mięsa wieprzowego. *Zeszyty Naukowe Ostrołęckiego Towarzystwa Naukowego*. 26: 261-272.
91. **Steinke D., Hoegg S., Brinkmann H., Meyer A.** 2006. Three rounds (1R/2R/3R) of genome duplications and the evolution of the glycolytic pathway in vertebrates. *BMC Biology*. 4: 1-16.
92. **Szczepankiewicz D., Lechniak D.** 2005. Gen receptora rianodiny (RyR1) – polimorfizm i związek z rozrodem świni domowej. *Medycyna Weterynaryjna*. 61 (3): 262-265.
93. **Świtoński M., Stachowiak M., Cieślak J., Bartz M., Grześ M.** 2010. Genetics of fat tissue accumulation in pigs: a comparative approach. *Journal of Applied Genetics*. 51 (2): 153-168.
94. **Tan V.P., Miyamoto S.** 2015. HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection. *Autophagy*. 11 (6): 963-964.

95. **Tyra M., Mitka I.** 2015. Rola tłuszczu śródmięśniowego (IMF) w kształtowaniu parametrów jakościowych (sensorycznych) mięsa. *Wiadomości Zootechniczne*. LIII. 4: 50-56.
96. **Tyra M., Mucha A., Eckert R., Małopolska M., Żak G.** 2019. Czynniki środowiskowe wpływające na dzienne spożycie i efektywność wykorzystania paszy u świń rosnących. *Wiadomości Zootechniczne*. 57 (2): 36-42.
97. **Tyra M., Żak G.** 2012. Analysis of the possibility of improving the indicators of pork quality through selection with particular consideration of intramuscular fat (IMF) content. *Annals of Animal Science*. 13 (1): 33-44.
98. **Tyra M., Żak G.** 2012. Analysis of relationships between fattening and slaughter performance of pigs and the level of intramuscular fat (IMF) in *longissimus lumborum muscle*. *Annals of Animal Science*. 12 (2): 169-178.
99. **Wei H., Zhou Y., Jiang S., Huang F., Peng J., Jiang S.** 2016. Transcriptional response of porcine skeletal muscle to feeding a linseed-enriched diet to growing pigs. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 7(6): 1-10.
100. **Wierbicki E., Deatherage F.E.** 1958. Water content of meats, determination of water-holding capacity of fresh meats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 6: 387-392.
101. **Wilson J.E.** 2003. Isozymes of mammalian hexokinase: Structure, subcellular localization and metabolic function. *Journal of Experimental Biology*. 206 (12): 2049-2057.
102. **Wood J.D., Enser M., Fisher A.V., Nute G.R., Sheard P.R., Richardson R.I., Hughes S.I., Whittington F.M.** 2008. Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*. 78 (4): 343-358.
103. **Woźniak K.** 2017. Możliwość wykorzystania polimorfizmu genu heksokinazy 2 jako markera jakości mięsa wieprzowego. *Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Żywność i żywienie*, 1:104-109.
104. **Woźniak K., Korpala A., Terman A.** 2017. Influence of glycolysis process on the formation of meat quality parameters. *Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis seria Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica*. 334 (42) 2: 201-208.

105. **Van Laere A.S., Nguyen M., Braunschweig M., Nezer C., Collette C., Moreau L., Archibald A.L., Haley C.S., Buys N., Tally M., Andersson G., Georges M., Andersson L.** 2003. A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature*. 425: 832-836.
106. **Zalewska M., Marcinkowska-Lesiak M., Półtorak A., Wyrwisz J., Zaremba R.** 2012. Wpływ sposobu pakowania na zachowanie barwy mięsa i przetworów z mięsa wieprzowego. *Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego*. 2: 125-130.