

# Utjecaj polimorfizma MC4R gena u svinja na distribuciju SEUROP klasa

Marija ĐIKIĆ, Magdalena JUKIĆ, Danijel KAROLYI, Krešimir SALAJPAL

Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska, (e-mail: mdikic@agr.hr)

## Sažetak

Cilj rada je utvrditi utjecaj polimorfizma MC4R gena na svojstva kakvoće polovice i klasa prema SEUROP sustavu ocjene. Tovljenici (n=130) bili su križanci pasmina ♂P x (♂VJ x ♀ŠL), a utovljeni su po konvencionalnoj tehnologiji velikih farmi do prosječne žive mase 110,3±15,66 kg. Nakon klanja utvrđene su mase trupova, metodom "dvije točke" izmjerena je debljina slanine, promjer MLD, postotak mišićne mase i SEUROP trgovačke klase. Genomska DNA je izolirana iz uzoraka krvi (*venae jugularis*), te je potom izvršena genotipizacija na poziciji 1426 (G/A) nukleotidne sekvence MC4R gena koristeći PCR-RFLP TaqI test. U populaciji tovljenika utvrđene frekvencije genotipova AA, AG i GG su bile redom 0,09, 0,43 i 0,48 te su se značajno razlikovale (p<0,05) od očekivanog prosjeka prema Hardy Weinbergovom zakonu. Utjecaj polimorfizma MC4R gena utvrđen je kroz razlike između tovljenika genotipova AA, AG i GG za debljinu slanine (p<0,05) i različite distribucije klasa trupova ocijenjenih prema SEUROP sustavu.

Ključne riječi: MC4R-gen, svinja, polimorfizam, debljina slanine, klase SEUROP.

## Effect of MC4R polymorphism on carcass distribution in pigs according to SEUROP

### Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of MC4R polymorphism on carcass quality and distribution according to SEUROP classification. Commercial crossbred pigs (♂P x (♂VJ x ♀SL)) were used and fattened according to conventional farm practices in Croatia to 110.3±15.66 kg of live weight. After slaughter, carcass weight, backfat thickness, depth of *longissimus* muscle and meat percentage was estimated by "Two-point" method. Carcasses were classified according to SEUROP. Genomic DNA was extracted from blood samples (*venae jugularis*) and PCR-RFLP TaqI test was used to identify the SNP at the position 1426 (G/A) in the MC4R gene. The frequencies of MC4R genotypes AA, AG and GG were 0.09, 0.43 and 0.48, respectively, and were out of Hardy W. equilibrium (P<0.05). Significant effect of MC4R polymorphism on backfat thickness (P<0.05) and carcass distribution according to SEUROP class were observed.

Key words: MC4R-gene, pig, polymorphism, backfat thickness, SEUROP

## Uvod

Teorijske spoznaje i primjena populacijske, kvantitativne i molekularne genetike, a posljednjih godina genomike i proteomike u zemljama razvijenog svinjogojstva postaju interes svih sudionika (uzgajivača/selektionera, proizvođača rasplodnih i tovnih svinja, mesne industrije) u svrhu ostvarenja što veće ekonomske efikasnosti. U posljednje vrijeme određivanje i utvrđivanje genetičkih učinaka pojedinih kandidat gena, odnosno SNP-a (single nucleotide polymorphism) imaju važnost u selekciji svinja (marker - assisted selection) za ekonomski važna svojstva kao što su dnevni prirast, debljina slanine odnosno odnosi mišićnog i masnog tkiva, ali i sa zdravstvenog aspekta, te postaju predmet istraživanja u populacijama različitih vrsta životinja (Kim i sur. 2000 i 2004, Salajpal i sur., 2007 i 2009; Kovačik i sur., 2009).

Melanokortin-4 receptor (MC4R) gen nosi informaciju za sintezu melanokortin-4 receptora, jednog od 5 melanokortinskih membranskih receptora u središnjem živčanom sustavu (SŽS), područjima odgovornim za kontrolu unosa hrane i regulaciju energetske ravnoteže. Stoga MC4R gen je vrlo zanimljiv kao kandidat gen za svojstva unosa hrane, dnevnog prirasta, a posredno i mesnatosti kod domaćih životinja (Houston i sur., 2004). U svinja MC4R gen smješten je na prvom kromosomu (SSC1, q22-q27). Mutaciju unutar navedenog gena na poziciji 1426 nukleotidne sekvence karakterizira G → A supstitucija unutar Taq I restrikcijskog mjesta. Za ovu mutaciju utvrđeno je da ima značajnog utjecaja na svojstva dnevnog unosa hrane, dnevnog prirasta i kakvoću trupova kod svinja, ali i da taj utjecaj u značajnoj mjeri ovisi o uzgoju i/ili liniji svinja (Park i sur., 2002; Houston i sur., 2004; Stachowiak i sur., 2005). Nadalje rezultati dosadašnjih istraživanja sugeriraju da učinak ove mutacije na navedena svojstva ovisi o fazi tova/završnoj masi (Ovilo i sur., 2006; Salajpal i sur., 2009) te da je posebno zanimljiv u populacijama gdje se kao terminalni očevi koriste nerastovi pasmine Pietren, pasmine poznate po nešto sporijem rastu, ali sa visokim udjelom mišićnog tkiva u trupu (Van den Maagdenberg i sur., 2007). Budući da se podaci o kakvoći svinjskih polovica na liniji klanja koriste za određivanje prodajne cijene zaklanih svinja cilj je ovoga rada utvrditi utjecaj polimorfizma MC4R gena na svojstva kakvoće polovica i distribuciju klasa prema SEUROP sustavu ocjene u komercijalnih tovljenika.

## Materijal i metode

Istraživanje je provedeno na populaciji tovnih svinja (n=130) tropasminskih križanaca pasmina Pietren, Švedski Landras i Veliki Jorkšir (♂P x (♂VJ x ♀ŠL)). Tovljenici su proizvedeni konvencionalnom tehnologijom tova (prosječna početna masa prasadi 25 kg - 110 kg završna masa tovljenika) uz *ad libitum* napajanje vodom i ishranom smjesama ST<sub>1</sub> sa 17% SP i 13 MJME te ST<sub>2</sub> sa 15% SP i 12.5 MJME. Nakon tova u mesnoj industriji PIK Vrbovec za svakog tovljenika utvrđena je klaonička masa i masa toplih trupova. Prema pravilniku o kakvoći svinjskih trupova i polovica (Narodne novine, 2/2009) metodom dvije točke ("DT") izmjerena je debljina leđne slanine, promjera *Musculus longissimus dorsi* (MLD), te je utvrđen postotak mišićnog tkiva u trupu i ocijenjene trgovačke klase prema SEUROP sustavu. Uzorci krvi uzeti su iz jugularne vene pojedinačno od tovljenika za genomsku analizu. Korišten je standardni vacutainer sustav i epruvete 3 ml ("Venoject EDTA" (K3) Terumo Europe NV Belgium). Izolacija genomske DNA izvršena je iz uzoraka pune krvi (leukociti) po modificiranoj metodi Sambroock i sur. (1989). Polymerase chain reaction (PCR) i Restricted fragment length polimerasae (RFLP-Taq I) test korišteni su za identifikaciju SNP na poziciji 1426 (G/A) MC4R gena, prema protokolu Stachowich i sur. (2005). Statistička obrada podataka obavljena je programom SAS (1999). Utvrđene su frekvencije genotipova (AA, AG i GG) i alela (A i G), a hi-kvadrat ( $\chi^2$ ) testom analizirano je odstupanje frekvencija genotipova od Hardy - Weinbergovog zakona ravnoteže frekvencija u populaciji (Hamilton, 2009). Metoda ANOVA i Tukey - test korišteni su za analizu svojstava kakvoće trupova genotipova AA, AG i GG tovljenika.

## Rezultati i diskusija

Analiza genetske strukture istraživane populacije tovljenika na osnovu MC4R kandidat gena pokazuje veće frekvencije genotipova odnosno broj tovljenika heterozigota AG i homozigota GG nego AA, a što je posljedica odnosa frekvencija alela A i G. Testiranje utvrđenih frekvencija genotipova pokazuju značajno odstupanje od Hardy - Weinbergova zakona ravnoteže frekvencija genotipova u populaciji  $p \leq 0,05$  (tablica 1).

Tablica 1. Broj jedinki i genetska struktura populacije svinja

Genotip	Broj životinja (130)		Frekvencija	
	n	%	Genotip	Alel
AA	12	9,23	0,09	0,31
AG	56	43,08	0,43	-
GG	62	47,69	0,48	0,69

Treba istaći, a i novija istraživanja pokazuju, da je moguće temeljem zakonitosti molekularne i populacijske genetike o promjenama frekvencija gena, u populaciji postići frekvencije genotipova tovljenika po izboru uzgajivača, a koji po svojstvima najbolje odgovaraju proizvodnom cilju (Amaral i sur., 2009; Hamilton, 2009; Hayes i sur., 2009).

Testiranjem rezultata iz tablice 2, između genotipova nisu utvrđene statistički značajne razlike niti za jedno svojstvo osim debljinu leđne slanine. Utvrđene razlike pokazuju tanju leđnu slaninu u tovljenika genotipa GG nego u AA i AG ( $p \leq 0,05$ ). Razlika između homozigota GG i heterozigota AG ukazuje na genetički učinak alela A za to svojstvo, a može se indirektno povezati i s povećanim dnevnim prirastima (Đikić i Jurić, 1996), a to se očituje i u nešto većim apsolutnim vrijednostima za klaoničke mase AA tovljenika iako razlike nisu statistički značajne. Ove činjenice na fenotipskoj razini utvrdili su Jurić i sur. (1993). Dobiveni rezultati sukladno su s literaturnim podacima (Salajpal i sur., 2007 i 2009; Jokubka i sur. 2006; Kim i sur., 2000; Liu i sur. 2009).

Tablica 2. Klaonička masa svinja i svojstva kakvoće trupa

Svojstvo		Genotip		
		AA	AG	GG
		$\bar{X} \pm SD$ n=12	$\bar{X} \pm SD$ n=56	$\bar{X} \pm SD$ n=62
Klaonička masa	kg	112,2±15,1	111,5±16,6	108,9±14,9
Masa (t) trupa	kg	90,2±16,4	87,1±14,2	85,5±11,7
Debljina slanine	mm	17,7±4,6 <sup>a</sup>	15,0±5,8 <sup>ab</sup>	13,5±4,1 <sup>b</sup>
Debljina MLD	mm	72,9±3,2	71,7±5,5	70,7±11,1
Mesnatost	%	54,8±2,5	55,4±8,5	57,7±3,3
Klasa		U	E	E

Debljina slanine kao jedna od mjera za procjenu udjela mišićnog tkiva u trupu (metodom "DT") dala je efekat manjeg udjela mišićnog tkiva odnosno lošiju trgovačku klasu (U) kod genotipova AA, dok je kod genotipova AG i GG utvrđen najveći udio klase E. Genetičke efekte pojedinih alelnih varijanti ne treba promatrati samo s biološkog aspekta kroz promjene svojstava nego i kroz ekonomsku vrijednost jer odnosi tkiva u trupu svinja imaju utjecaj na efikasnost svinjogojске proizvodnje u nekoj zemlji (Đikić i sur. 1994, 2001, 2003 i 2005), uz pretpostavku da postoji sustav vrednovanja na osnovi udjela mišićnog tkiva i klasa mesnatosti trupova.

Prema rezultatima tablice 3 utvrđen je utjecaj MC4R gena na udjel mišićnog tkiva u trupu odnosno na trgovačke klase. Klasama S i E ocijenjeno je 60,8% trupova genotipa AG i 85,5% GG, dok su AA genotipovi bili klase E 66,7% i U 33,3%.

Tablica 3. Raspodjela i mesnatost trupova MC4R genotipova prema SEUROP sustavu

S EUROP sustav		AA			AG			GG		
Kl	M%	N=12		M%	N=56		M%	N=62		M%
		n	%		n	%		n	%	
S	>60			$\bar{X} \pm SD$			$\bar{X} \pm SD$			$\bar{X} \pm SD$
E	55-60	8	66,7	56,1±0,84	25	44,7	57,1±1,38	40	64,5	57,5±1,28
U	50-55	4	33,3	52,8±0,61	18	32,1	54,1±1,37	7	11,3	53,3±1,65
R	45-50				4	7,1	48,9±2,02	2	3,2	48,6±0,12
O	40-45									
P	<45									

N=broj svinja određenog genotipa, n i% = broj i postotak svinja određenog genotipa u klasi. M%=postotak mišićnog tkiva u trupu, metoda "DT".

Unutar genotipova AG visok je postotak nižih klasa U i R. Dobiveni rezultati nameću potrebu dorade Plana i programa uzgoja svinja u RH (Jurić i sur. 1997), kao i uputa za testiranje (Uremović i sur. 2000) ili čak izrade novih dokumenta uz primjenu novih spoznaja iz područja genomike/proteomika, jer za budućnost treba razmišljati sada, premda je u Hrvatskoj u selekciji svinja, posebno na svojstvo mesnatosti ostvaren napredak (Hrvatski stočarski centar, 1997-2010).

### Zaključak

U populaciji tovljenika utvrđene frekvencije genotipova AA, AG i GG kandidat gena MC4R značajno su različite u odnosu na H-W zakon ravnoteže frekvencija genotipova u populaciji. Utvrđen je utjecaj MC4R kandidat gena na svojstvo debljine leđne slanine, a posljedično tome i na SEUROK klase s različitim postotkom mišićnog tkiva u trupu, pa je to rezultiralo različitim distribucijama trgovačkih klasa između skupina tovljenika genotipova AA, AG i GG.

### Literatura

- Amaral J.A., Megens H.D., Kerstnes H.D.H., Henven C.M.H., Dibbits B., Crooijmans P.M.A.R., den Dunnen T.J., Groenen A.M.M. (2009). Application of massive parallel sequencing to whole genome SNP discovery in the porcine genome. *BMC genomic* 10:374.
- Đikić M., Jurić I., Petričević A. (1994). Odnosi tkiva u polovicama svinja kao problem proizvodnje svinjskog mesa. *Znan., praksa, poljopr. i tehn.*, 24, 1: 59-66.
- Đikić M., Jurić I. (1996). Povezanost mase polovica i abdominalnog sala u različito selekcioniranih svinja. *Poljoprivredna znanstvena smotra* 61, 3-4: 193-202.
- Đikić M., Jurić I., Gašparović M. (2001). Konkurentnost kakvoće polovica tovnih svinja u obiteljskim gospodarstvima Hrvatske u odnosu na zemlje razvijenog svinjogojstva. *Agroecologia*, 1, 1: 45-54.
- Đikić M., Jurić I. (2003). Odnosi i raspodjela tkiva kod svinja kao čimbenici konkurentnosti na tržištu svinjskog mesa. *Agronomski glasnik*, 65, 1-2: 25-38.
- Đikić M., Salajpal K., Poljak F., Karolyi D., Trtolja I., Žerjavić D., Tkalec D., Jurić I. (2005). Kakvoća polovica križanaca svinja različitog podrijetla. *Zbornik radova: 40. znanstveni skup hrvatskih agronoma s međunarodnim sudjelovanjem. 15-18. veljače, 2005, Opatija, Hrvatska*, 563-564.
- Hamilton M. (2009). *Population genetics* Ed. Wiley - Blackweell W. Susexx UK 1-38.
- Hayes B.J., Daetwyler H.D., Bowman P., Moser G., Tier B., Crump R., Khatkar M., Raadsma H., Goddard M.E. (2009). Accuracy of genomic selection: Comparing theory and results. *Proc. Of Assoc. Advmt. Anim. Breed.*, 17: 352-355.
- Hrvatski stočarski centar - Svinjogojstvo - godišnje izvješće (1997-2010). Zagreb
- Houston R.D., Cameron N.D., Rance K.A. (2004). A melanocortin- 4 receptor (MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations. *Anim. Genet.*, 35:386-390.
- Jokubka R., Maak S., Kerziene S., Swalve H.H. (2006). Associated of a melanocortin - 4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithanian White pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 123: 17-22.
- Jurić I., Đikić M., Mioč B., Benčević K. (1993). Udio i odnosi mišićnog i masnog tkiva u polovicama različito selekcioniranih svinja i njihovih križanaca. *Polj. Znan. Smotra*, 58, 1: 67-74.
- Jurić I., Kralik G., Janeš M., Uremović M., Jurić I., Hrabak V., Dominiković Z. (1997). Plan i program uzgoja svinja u RH. *Izd. Hrv. Stoč. Centar, Zagreb*. 36.
- 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*, 11:131-5.
- Kim, K.S., Reecy, J.M., Hsu, W.H., Anderson, L.L., Rothschild, M.F. (2004). Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin- 4 receptor mutation in domestic pigs. *Domestic Animal Endocrinology*, 26:75-86.
- Kováčik A., Trackovicka A., Bulla J., Bobček B., Rafayova A. (2009). Effects of genotypes LEPR and MC4R on pigs. *Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*, 42, 2: 397-401.

- Liu H., Wanqiang T., Zan L., Wang H., Cui H. (2009). Association of MC4R gene variants with carcass and meat quality traits in Qinchuan cattle Afric. J. of Biotech. 8, 15: 3666-3671.
- Ovilo C., Fernandez A., Rodriguez M.C., Nieto M., Silio L. (2006). Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. Meat Sci., 73: 42-47.
- Park H.B., Carlborg S., Marklund S., Andersson L. (2002). Melanocortin L4 receptor (MC4R) genotypes have no major effect on fatnes in large Whitex Wild Boar intercross. Int. Soci. Anim. Genet. Anim. Genet., 33: 155-157.
- Pravilnik o kakvoći svinjskih trupova i polovica. Narodne novine 002/2009.
- Salajpal K., Đikić M., Karolyi D., Šurina J., Matković M., Liker B. (2007). Effect of MC4R polymorphism on physiological stress response in pigs. Agriculture, 13.1:46-50.
- Salajpal K., Đikić M., Karolyi D., Janječić Z., Jurić I., (2009). The effect of MC4R polymorphism on carcass compositions and meat quality traits in pigs slaughter at different live weights. It. J. of Anim. Sci., 8, supp. 3. 98-100.
- Sambroock J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory New York. 375.
- SAS. (1999). User's guide, version 8.1., SAS Inst., Inc., Cary, USA.
- Stachowiak M., Szydlowski M., Obarzanek - Fojt M., Switowski M., (2005). An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin - 4 receptor (MC4R) gene on production traits in Polish pig breeds doubtful. Int. Soc. For Anim. Genet. Anim. Genet. 37:55-57.
- Uremović M., Janeš M., Kralik G., Đikić M., Vitković A. (2000). Upute i pravilnici za provedbu programa uzgoja svinja. Izd. Hrvat. Stoč. Centar. Zagreb, 71.
- Van den Maagdenberg K., Stinckens A., Claeys E., Seynaeve M., Clinquart A., Georges M., Buys N., De Smet S. (2007). The Asp298Asn missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. Animal, 8:1089-1098.

sa2011\_0704