

VETERINARSKI FAKULTET
SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

Dominika Fajdić

Martina Vdović

GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA ESTROGENOG
RECEPTORA U KRMAČA

Zagreb, 2012.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za stočarstvo pod vodstvom doc. dr. sc. Anamarije Ekert Kabalin i Svena Menčika, dr. med. vet., u sklopu znanstveno-istraživačkog projekta Ministarstva znanosti, obrazovanja i sporta Republike Hrvatske „Patobiologija prenatalnih, perinatalnih i postnatalnih gubitaka u uzgoju svinja“ (broj 053-0532265-2238, voditeljice doc. dr. sc. Anamarije Ekert Kabalin) i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2011./2012.

Sadržaj

| | |
|---------------------|----|
| Uvod | 1 |
| Hipoteza | 3 |
| Materijali i metode | 3 |
| Rezultati | 6 |
| Rasprava | 8 |
| Zaključci | 10 |
| Zahvala | 11 |
| Literatura | 12 |
| Sažetak | 15 |
| Summary | 16 |

UVOD

Svinjogojstvo je od davnina vrlo važna grana poljoprivredne proizvodnje u Hrvatskoj, sudjelujući s 12 do 14 % u njejoj ukupnoj vrijednosti ili s oko 33 - 35 % u ukupnoj vrijednosti stočarske proizvodnje (DZS, 2004.). Dvije su najznačajnije skupine čimbenika koji izravno utječu na ekonomičnost svinjogojske proizvodnje, a to su: reproduktivna i proizvodna sposobnost krmača te točna sposobnost jedinki (WÄHNER i BRÜSSOW, 2009.). Biološki gledano, uzgoj i proizvodnja svinja imaju prednosti u odnosu na uzgoj ostalih domaćih životinja, s obzirom da prvo potomstvo daju već u dobi od 11-12 mjeseci, imaju najkraći reproduktivni ciklus (150 dana) te u prosječno 2.2 legla godišnje daju 20-25 potomaka, što ih čini najplodnijim domaćim životinjama (UREMOVIĆ i UREMOVIĆ, 1997.).

Odabirom svinja s obzirom na veličinu legla, broj živorođene, othranjene i odbijene prasadi, kao i duljine razdoblja od prasenja do ponovne oplodnje te brojem ovulacija možemo utjecati na povećanje plodnosti kod krmača. Fenotipsko očitovanje reproduktivnog, kvantitativnog svojstva - veličine legla, rezultat je interakcije velikog broja gena i okolišnih čimbenika, što ga čini kompleksnim. Ovisi o broju ovulacija, čimbenicima nužnim za oplodnju i održavanje graviditeta, kvaliteti sperme, implantaciji, placenti, preživljavanju fetusa (embrionalna i fetalna smrtnost) te broju živorođene prasadi. Pritom brojni geni u genomu krmače, nerasta i fetusa pridonose svojstvu. Navedena kompleksnost je razlog niske nasljednosti reproduktivnih svojstava (LAWLOR i LYNCH, 2007.; DISTL, 2007.; VALLET i sur., 2010.).

Plodnost se primarno mjeri brojem živorođene prasadi. Cilj je dobiti 11-12 prasadi u leglu krmače, odnosno 9-10 kod nazimica (GORDON, 1997.). Poznata je činjenica da postoje razlike u veličini legla među pasminama, no prema rezultatima istraživanja utvrđeno je da postoje i značajne razlike unutar pojedinih pasmina. Veličina legla je nisko nasljedno svojstvo i ovisi prvenstveno o genotipu krmače (DISTL, 2007.). GORDON (1997.) navodi da je kineska pasmina Meishan jedna od najplodnijih pasmina u svijetu te daje 3-4 odojka više nego prosječna visokoproizvodna, mesna europska pasmina. U intenzivnoj svinjogojskoj proizvodnji vrlo se ekonomičnim pokazao uzgoj i proizvodnja hibridnih jedinki, koje očituju učinak heterozisa te veće proizvodnosti. Među takve hibride ubraja se i nizozemski hibrid Topigs, koji se odlikuje visokim proizvodnim sposobnostima: reproduktivnim sposobnostima krmača te dobrom konverzijom hrane i prirastom tovljenika (ANONYMUS, 2012.).

Pojedina istraživanja su pokazala da se veličina legla može povećati parenjem u optimalno vrijeme te da zavisi o broju parenja, odnosno umjetnog osjemenjivanja unutar estrusa. Uz

genetsku osnovu, ne smije se zanemariti učinak vanjskih – okolišnih čimbenika pri ispoljavanju svojstva, hranidbe i zdravstvenog statusa krmače. GORDON (1997.a) navodi da veličina legla zavisi o godišnjem dobu parenja, pri čemu su utvrdili da krmače parene ljeti prosječno imaju jednog odojka manje. Plodnost do određene mjere možemo povećati i primjenom pojedinih uzgojnih metoda: križanjem pasmina i linija, čime postizemo učinak heterozisa (npr. uvođenjem kineskih plodnih pasmina povećava se veličina legla). Na povećanje veličine legla možemo utjecati i neizravno putem selekcije na temelju duljine trupa. Veća duljina trupa podrazumijeva dulje maternične rogove, što osigurava bolju implantaciju i veće preživljavanje embrija odnosno fetusa. Također je uočena i pozitivna korelacija između duljine trupa i broja sisa (pasmine s 12 do 14 sisa su plodnije), a time i mogućnosti othrane odojaka (UREMOVIĆ i sur., 2002.; JIANG i TROY, 2010.)

Molekularna genetika ima veliku važnost u popravljaju proizvodnih svojstava u svinjogojstvu. Molekularni markeri predstavljaju razliku u DNK sekvenci koja omogućava označavanje specifičnog mjesta na kromosomu koje se dalje prati kroz generacije životinja pomoću laboratorijskog testa (KRALIK i sur., 2007.). Genetski markeri se nasljeđuju s genima drugih svojstava koji se nalaze u blizini te praćenjem njihovog nasljeđivanja možemo predvidjeti nasljeđivanje tih svojstava. U uzgoju svinja genetske markere koristimo kod kombiniranja gena različitih pasmina, u selekciji jedinki komercijalnih linija s obzirom na pojedina poželjna svojstva te u nadgledanju podrijetla, koeficijenta uzgoja u srodstvu i učinka heterozisa (KRALIK, 2007.). Identifikacija gena koji determiniraju kvantitativna svojstva moguća je pomoću fizičkog lociranja gena na kromosomu, što nazivamo lokusom kvantitativnih svojstava (QTL – engl. *Quantitative Trait Locus*) te mapiranja određenih major gena ili traženja biljega (markera) (KRALIK i sur., 2007.). Prednost selekcije uporabom genetskih markera očituje se kod svojstava koje je izravno teško odrediti, kao što su veličina legla i kakvoća mesa u mladim životinja. Primjenom metoda molekularne genetike i utvrđivanjem pojedinih genskih markera, može se već kod vrlo mladih jedinki oba spola procijeniti kakva se veličina legla ili kakvoća polovica može očekivati (KUŠEC, 2007.).

UREMOVIĆ i sur. (2002.) navode da je krajem 20. stoljeća ustanovljeno da je marker tzv. estrogen receptor (ESR) nositelj superiornosti za veličinu legla kod križanaca Meishan pasmine svinja s europskim pasminama. Nakon toga su uslijedila istraživanja u kojima se nastojalo utvrditi mogu li se uz pojedini genotip estrogenog receptora (AA, AB, BB) vezati kvantitativni reprodukcijski pokazatelji (ROTHSCHILD i sur., 1996.; SHORT i sur., 1997.; DROGERMULLER i sur., 2001.; ZHEN-FANG i sur. 2006.). ZHEN-FANG i sur. (2006.)

navode da su zaključci o povezanosti ESR-a i reproduktivnih pokazatelja u različitim pasmina svinja nekonzistentni, dok su HOROGH i sur. (2005.) dali prikaz rezultata 13 znanstvenih radova, od kojih je u dva navedeno da krmače homozigoti BB imaju veća legla, u tri da su veća legla u AA homozigota, u jednom radu je zaključeno da su najveća legla kod AB genotipa, dok u sedam radova nije utvrđena povezanost između ESR-a i veličine legla.

U ovom istraživanju, zbog izrazite važnosti proizvodnih svojstava u selekciji krmača, a s ciljem unaprijeđenja svinjogojske proizvodnje, analizirat će se genotipski polimorfizam estrogenog receptora u krvi krmača hibrida Topigs i njihove reproduktivne pokazatelje u prva dva legla.

HIPOTEZA

Postoji mogućnost utvrđivanja polimorfizma estrogenog receptora (ESR) kod krmača hibrida Topigs primjenom metode utvrđivanja duljine restrikcijskih odsječaka nakon digestije enzimom *PvuII*.

Postoji razlika u reproduktivnim svojstvima Topigs krmača (ukupan broj oprasenih, broj živooprasenih i mrtvooprasenih odojaka) s obzirom na prisutnost polimorfizma *PvuII* za genotipe ESR.

MATERIJALI I METODE

U istraživanju su korišteni uzorci pune krvi, kao i reproduktivni podaci 30 krmača hibrida Topigs, prikupljenih sa svinjogojske farme nedaleko Zagreba. Sve krmače držane su u istovjetnim okolišnim i automatski kontroliranim mikroklimatskim uvjetima te hranjene komercijalnom mješavinom. Prikupljeni reproduktivni pokazatelji obuhvaćali su: ukupni broj oprasenih, živooprasenih i mrtvooprasenih odojaka u prvom i drugom leglu. Uzorci pune krvi bili su pohranjeni u epruvetama s EDTA kao antikoagulansom (BD Vacutainer K2 plus E, Belliver Industrial Estate, Plymouth, UK) na +4°C, u laboratoriju Zavoda za stočarstvo Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Za izolaciju DNK iz pune krvi korišten je komercijalni kit DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, GmbH D-40724 Hilden, Njemačka). Sama metoda izolacije provedena je prema propisanom protokolu proizvođača, korištenjem sterilnog pribora i u fizički odvojenom prostoru, kako bi mogućnost kontaminacije uzoraka bila svedena na najmanju moguću mjeru.

Nakon izolacije DNK iz pune krvi, umnožen je ciljni odsječak gena za estrogini receptor (ESR, engl. *estrogen receptor gene*) lančanom reakcijom polimeraze (PCR, engl. *polimerase chain reaction*), pomoću uređaja za termocikliranje Mastercycler® personal 5332 (Eppendorf AG, Hamburg, Njemačka). Metoda za umnažanje odsječaka gena za ESR, dugog 120 parova baza, prilagođena je prema istraživanju opisanom u radu SHORTA i sur. (1997.). Za umnažanje ciljne sekvence korištene su sintetizirane početnice slijedećeg redosljeda nukleotida: 5'-CCTGTTTTTACAGTGACTTTTACAGAG-3' kod prednje (ESRF) i 5'-CACTTCGAGGGTCAGTCCAATTAG-3' kod stražnje početnice (ESRR), proizvođača Sigma Aldrich (prema radu ROTHSCILDA i sur., 1996. i SHORTA i sur., 1997.). Volumen ukupne reakcijske smjese za umnažanje ciljnog odsječka gena lančanom reakcijom polimeraze iznosio je 25 µL, prema sastavu prikazanom u tablici 1.

Tablica 1: Sastav ukupne reakcijske smjese za umnažanje ciljnog odsječka ESR-a lančanom reakcijom polimerazom.

| Sastojak | Volumen | Konačna koncentracija |
|--------------------------------------|---------|-----------------------|
| PCR pufer | 5 µL | 1x |
| MgCl ₂ | 1.5 µL | 1.5 mM |
| dNTPmix | 2.5 µL | 200 nM |
| prednja specifična početnica (ESRF) | 2.5 µL | 500 nM |
| stražnja specifična početnica (ESRR) | 2.5 µL | 500 nM |
| Tag-polimeraza | 0.2 µL | 1U/reakciji |
| deionizirana H ₂ O | 7.3 µL | |
| uzorak DNA | 2.5 µL | |
| ukupni volumen reakcijske smjese | 25 µL | |

Tijekom jednog postupka istovremeno je provedeno umnažanje za 15 uzoraka i 1 negativnu kontrolu. Negativna kontrola je, umjesto uzorka, sadržavala jednaku količinu vode. Uvjeti provođenja lančane reakcije polimeraze prikazani su u tablici 2.

Tablica 2: Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom.

| | Temperatura | Vrijeme | Broj ciklusa |
|--|-------------|---------|--------------|
| Aktivacija <i>Tag</i> -polimeraze i početna denaturacija | 94°C | 4 min. | 1 |
| Denaturacija kalupa | 94°C | 1 min. | 31 |
| Prihvatanje početnica | 57°C | 1 min. | |
| Produljenje lanaca | 72°C | 1 min. | |
| Završno produljenje | 72°C | 8 min. | 1 |
| Hlađenje | 4°C | | |

Za utvrđivanje polimorfizma ciljnog odsječka ESR-a u uzorcima, dobiveni PCR-produkti podvrgnuti su djelovanju restrikcijske endonukleaze *PvuII*, koja sječe DNA na mjestu 5'-CAG/CTG-3' (Promega, SAD), kako bi se utvrdile duljine dobivenih restrikcijskih odsječaka (RFLP, engl. *restriction fragment length polymorphism*). U epruvetici je 10 µL PCR produkta digestirano s 1U restrikcijskog enzima *PvuII* (koncentracije 8-12 U/µL) te 2 µL 10x pufera specifičnog za *PvuII* (Promega, SAD), 0.2 µL acetiliranog BSA (koncentracije 10 µg/µL) i deionizirane vode do 20 µL smjese za digestiju. Navedena smjesa inkubirana je u vodenoj kupelji (VK1EN, Inko, Hrvatska) na 37°C, tijekom dva sata te su produkti restrikcije podvrgnuti elektroforezi u 3%-tnom agaroznom gelu.

Gel je pripremljen otapanjem 1.5 g agaroze u 50 mL 1xTAE pufera i zagrijavanjem u mikrovalnoj pećnici do vrenja, nakon čega je uslijedilo postupno hlađenje i dodavanje 2 µL etidijevog bromida koncentracije 10 mg/mL (Sigma – Aldrich, Bioreagent for Molecular Biology) u digestoru, zbog njegove kancerogenosti. Ohlađena otopina ulivena je u kalup te su postavljeni češljevi za jažice. Nakon završene polimerizacije (30 min), izvađeni su češljevi, a gel sa kadicom je uronjen u sustav za horizontalnu elektroforezu (BIO-RAD, PowerPacTM HC-Cleaver Scientific Ltd Msmi, UK) napunjen sa 1x TAE pufera 2 – 3 mm iznad agaroznog gela. U prvu jažicu nanesen je molekularni biljeg (6 µL) poznatih molekularnih masa veličine 25 parova baza (Promega 25 bp DNA Step Ladder), a u preostale jažice po 6

μL smjese PCR produkta (uzorka) s 2 μL pufera (LB, eng. *loading buffer*). Elektroforeza je provedena na sobnoj temperaturi, u trajanju od 60 minuta, pri naponu od 90 V. Po završenoj elektroforezi gelovi su promatrani i fotografirani transluminatorom pod UV svjetlom uređajem MiniBisPro® (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel), a slike gela su obrađene programom GelQuant Express Version 3.1. (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

Podaci o reproduktivnim pokazateljima (broj ukupno oprasenih, živooprasenih i mrtvooprasenih odojaka) tijekom prva dva legla prikupljeni su iz proizvodnih kartona krmača.

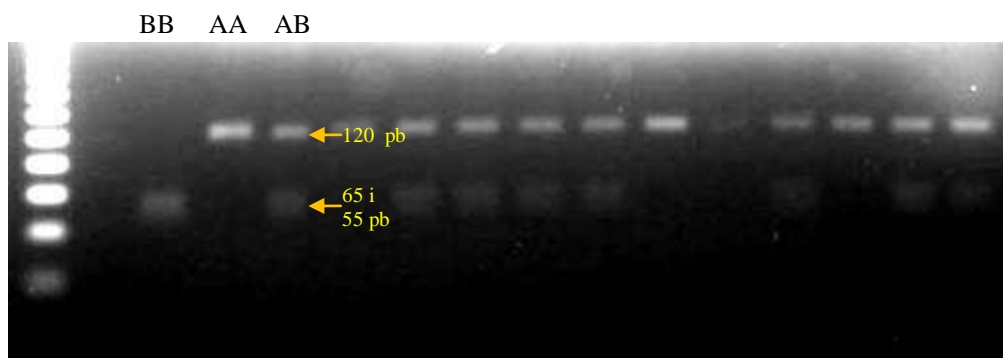
Dobiveni podaci obrađeni su statističkim referentnim programom Statistica v.9 (StatSoft Inc.) uobičajenim postupcima deskriptivne statistike. Normalnost raspodjele provjerena je Kolmogorov-Smirnovim testom. Rezultati su prikazani aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom, izuzev broja mrtvooprasenih po skupinama za koje je dana centralna vrijednost – medijan te najmanja i najveća utvrđena vrijednost, s obzirom da nisu slijedili normalnu raspodjelu. Značajnost razlika reproduktivnih pokazatelja između pojedinih genotipova provjerena je analizom varijance (jednosmjerna ANOVA za analizu razlika između broja ukupno i živooprasenih odojaka, te neparametrijska Kruskal-Wallisova analiza za usporedbu broja mrtvooprasenih po skupinama).

REZULTATI

Elektroforezom restrikcijskih odsječaka umnoženog ciljnog dijela estrogenog receptora dobiveni su odsječci različite duljine. Polimorfizam gena za ESR nastaje uslijed postojanja restrikcijskog mjesta za enzim *PvuII*. Umnoženi ciljni odsječak gena za ESR na koji nije djelovala *PvuII*, bio je vidljiv kao odsječak veličine 120 parova baza, dok je rezultat djelovanja navedenog restrikcijskog enzima bila pojava 2 odsječka duljine 65 i 55 parova baza.

Homozigotne jedinke genotipa AA karakterizirali su odsječci duljine 120 pb, a homozigotne jedinke genotipa BB dva odsječka duljine 65 i 55 pb. Kod heterozigotnih jedinki genotipa AB bila su vidljiva sva tri odsječka (duljine 120, 65 i 55 pb). Na slici 1 prikazana je razlika u

duljini restrikcijskih odsječaka kod pojedinih genotipova svinja dobivena nakon elektroforeze u agaroznom gelu.



Slika 1: Prikaz dobivenih duljina restrikcijskih odsječaka za ESR kod različitih genotipova svinja.

U tablici 3 prikazana je učestalost pojedinih genotipova ESR-a kod 30 krmača hibrida Topigs, kao i prosječne vrijednosti reproduktivnih pokazatelja (ukupnog broja oprasenih, broja živooprasenih i mrtvooprasenih odojaka) u prva dva legla.

Tablica 3: Učestalost pojedinih genotipova krmača hibrida Topigs s obzirom na polimorfizam ESR-a te prosječne vrijednosti reproduktivnih pokazatelja u prva dva legla.

| Genotip krmača | Broj krmača određenog genotipa (n) | Udio krmača određenog genotipa (%) | Prosječne vrijednosti reproduktivnih pokazatelja | | |
|----------------|------------------------------------|------------------------------------|--|----------------------------|-----------------------------|
| | | | broj ukupno oprasenih odojaka | broj živooprasenih odojaka | broj mrtvooprasenih odojaka |
| | | | arit.sred. ± SD | arit.sred. ± SD | medijan (min-max) |
| AA | 15 | 50 | 12.63 ± 2.36 | 11.83 ± 2.23 | 0.5 (0-4) |
| AB | 13 | 43.33 | 12.19 ± 2.48 | 11.35 ± 2.77 | 1 (0-4) |
| BB | 2 | 6.67 | 14.25 ± 2.74 | 11.25 ± 1.06 | 3 (0-6) |

*unutar pojedinih stupaca (za promatrana reproduktivna svojstva) nisu utvrđene statistički značajne razlike na razini $p < 0.05$

Kao što je vidljivo iz tablice 3, najveći je udio krmača s genotipom AA (50%), a najmanje homozigota BB (6.67%). Pri tome je i najveći broj ukupno oprasenih (14.25), ali i mrtvooprasenih (me = 3) bio kod homozigota BB, dok je broj živooprasenih u toj skupini bio

najmanji (11.25). Krmače homozigoti AA imale su prosječno 12.63 ukupno oprasenih odojaka u leglu, no najviše živooprasenih (11.83) te najmanje mrtvooprasenih ($me = 0.5$ odojka). Kod heterozigotnih krmača (AB) zabilježen je najmanji broj ukupno oprasenih (12.19), od čega je bilo 11.35 živooprasena i prosječno 1 mrtvoopraseni odojak po leglu. Navedene razlike među skupinama pritom nisu bile statistički značajne.

RASPRAVA

Primjenom metode utvrđivanja duljine restrikcijskih odsječaka ciljnog dijela gena za estrogenu receptor pomoću enzima *PvuII* uspješno smo odredile genotipove 30 krmača hibrida Topigs. Pritom je u našem uzorku jedinki najučestaliji genotip bio AA homozigot (50 %), dok je najmanje jedinki imalo BB genotip (2 %). Slično su utvrdili i ZHEN-FANG i sur. (2006.) (77.4% AA i 2.4% BB homozigota) te NOGUERA i sur. (2003.) (81.5% AA i 1% BB homozigota) kod krmača pasmine Landras, dok je u istraživanju ROTHSCILDA i sur. (1996.) udio BB homozigota bio nešto veći, no isto najmanje učestao u skupini krmača velikog jorkšira (41.2% AA i 22.6% BB homozigota), kao i u radu HOROGHA i sur. (2005.) koji su utvrdili da je zastupljenost homozigota AA bila 31.4%, a homozigota BB 20.8%, dok su preostali udio činile heterozigotne jedinice AB. DROGERMULLER i sur. (2001.) u svom istraživanju čak nisu niti utvrdili postojanje alela B u populaciji njemačkog landrasa i duroka (jedinke u promatranim populacijama bile su 100% AA homozigoti), dok su u sintetskoj liniji duroka i velikog jorkšira utvrdili samo zastupljenost alela B (0.1), no jedino kod heterozigotnih jedinki AB (nije bilo BB homozigota za ESR).

DROGERMULLER i sur. (2001.) navode da je ESR potencijalni kandidat gen za veličinu legla zbog svoje integrirajuće uloge u nekoliko reproduktivnih fizioloških puteva, pri čemu singnifikantni porast sinteze estrogena u krmače prije uspostave suprasnosti inicira važni utjecaj ESR-a na embrionalnu smrtnost. Nekolicina istraživanja pokazala su da je alel B više odgovoran za povećanje broja živorođene i ukupno rođene prasadi (ROTHSCILD i sur., 1996.; SHORT i sur., 1997.). Krmače nositeljice ESR-*PvuII* alela B pasmine Meishan rodile su 1.25-1.50 prašćića više po leglu od krmača koje nisu nosile alel B (ROTHSCILD i sur., 1996.; SHORT i sur., 1997.). Međutim, neki rezultati istraživanja odstupaju od navedene teze. Prema rezultatima meta-analize (ALFONSO, 2005.) 15 objavljenih radova koji su istraživali

povezanost ESR-*PvuII* polimorfizma i veličine legla u krmača, veličina legla bila je značajno manja u grupama krmača AA homozigota u usporedbi s AB heterozigotnim jedinkama te BB homozigotima, prema modelu fiksiranih učinaka, dok su prema modelu randomizirajućih učinaka rezultati bili slični, iako ta razlika između krmača genotipova AA i AB nije bila signifikantna. Prema našim rezultatima krmače genotipa BB također su imale najveći broj ukupno oprasenih, ali i mrtvooprasenih odojaka, zbog čega je broj živooprasenih kod njih bio najmanji. Dobiveni rezultat bismo komentirale s određenom rezervom, jer su samo dvije krmače bile BB homozigoti. U istraživanju koje su proveli ZHEN-FANG i sur. (2006.) te ROTHSCHILD i sur. (1996.), najveći broj ukupnooprasenih i živooprasenih odojaka imale su krmače BB homozigoti, djelomice slično kao u našem radu. Prema ROTHSCHILDU i sur. (1996.), procjena učinka ESR-a u Meishan pasmine je povećanje prvog legla za 2.3 odojka kod homozigota BB. SHORT i sur. (1997.) su procijenili da učinak jednog B alela u animalnom modelu varira među populacijama, no da jединke s dva B alela (BB) imaju 0.6 do 2 odojka više u leglu. Suprotno tome, NOGUERA i sur. (2002.) su u svome radu zabilježili da su homozigoti AA imali veći broj ukupno i živooprasenih odojaka od heterozigota AB. Prema njihovom tumačenju, postoji mogućnost da su rezultati odstupali zbog veličine istraživane populacije, ali i mišljenja da korelacija između B alela i povećanja legla postoji samo kod hibridnih linija kao što je Meishan, koje su već visoko selektirane na plodnost.

Iako su pojedini istraživači pronašli razlike između ESR-genotipova u veličini legla kod različitih pasmina, linija i uzgoja (ROTHSCHILD i sur., 1996.; SHORT i sur., 1997.; DROGERMULLER, 2001.; NOGUERA i sur., 2002.; ZHEN-FANG i sur., 2006.), razlike dobivene u našem istraživanju nisu bile značajne.

Iz rasprave je vidljivo da su kod pojedinih čistih pasmina svinja istraživanja polimorfizma ESR-a su već dugotrajna te se u pojedinim uzgojima u svijetu koriste prilikom detaljnije karakterizacije jedinki i utvrđivanja njihove uzgojne vrijednosti. Imajući u vidu sve veću zastupljenost hibrida Topigs u svinjogojskoj proizvodnji u Hrvatskoj, prikupljeni podaci su također dragocjeni, jer su pokazali da je metoda primjenjiva i kod njih.

U suglasju s navodima ALFONSA (2005.) te ZHENG-FANGA i sur. (2006.), rezultati genotipizacije životinja za estrogene receptore ne bi se trebali izravno primjenjivati u uzgojnim programima, već bi se prvo trebala utvrditi povezanost između ESR-a i reproduktivnih pokazatelja u određenom uzgoju, jer genetska pozadina može biti različita u određenoj populaciji, a time i učinak gena.

ZAKLJUČCI:

Metoda utvrđivanja duljine restrikcijskih odsječaka nakon digestije enzimom *PvuII* primjenjiva je za genotipizaciju polimorfizma ciljnog odsječka estrogenog receptora kod krmača hibrida Topigs.

Uspješno je genotipizirano svih 30 krmača, pri čemu je bilo 15 AA homozigota, 13 AB heterozigota i 2 homozigota BB.

Iako su utvrđene razlike prosječnih vrijednosti reproduktivnih pokazatelja između pojedinih genotipova, one nisu bile značajne. Pri tome je najveći broj ukupno oprasenih i mrtvooprasenih odojaka utvrđen kod BB homozigota, a živooprasenih kod krmača genotipa AA.

ZAHVALA

Martina i Dominika bi, prije svega, htjele zahvaliti jedna drugoj na dobroj suradnji i velikom prijateljstvu. Zahvaljujemo Zavodu za stočarstvo i predstojniku Zavoda doc. dr. sc. Igoru Štokoviću što nam je omogućio korištenje laboratorija. Posebna zahvala mentorima doc. dr. sc. Anamariji Ekert Kabalin na stručnom vodstvu i velikoj pomoći kod pisanja ovog rada i Svenu Menčiku, dr. med. vet. na strpljenju u laboratoriju i pomoći oko izrade praktičnog dijela rada.

LITERATURA :

- ALFONSO, L. (2005): Use of meta-analysis to combine candidate gene association studies: Application to study the relationship between ESRPvu II polymorphisam and sow. *Genet. Sel. Evol.* 37, 77-84.
- ANONYMUS (2012): <http://www.thepigsite.com/focus/topigs/3926/topigs-this-is-topigs> [pristupano 08.01.2012.]
- DISTL, O. (2007): Mechanisms of regulation of litter size in pigs on the genome level. *Reprod. Domes. Anim.* 42 (Suppl 2), 10-16.
- DROGEMULLER, C., H. HAMANN, O. DISTL (2001): Candidate gene markers for litter size in different German pigs lines. *J. Anim. Sci.* 79, 2565-2570.
- DZS - Državni zavod za statistiku (2004): <http://www.dzs.hr/> [pristupano 15.01.2012.]
- GORDON, I. (1997a): Increasing litter size in pigs. U: *Controlled reproduction in farm animals series volume 3 - Controlled reproduction in pigs.* (Gordon, I., Ed.). Cab International UK, 164-171.
- GORDON, I. (1997): *Controlled reproduction in farm animals: series volume 3- Controlled reproduction in pigs.* Cab International UK.
- HOROGH G., A. ZSOLNAI, I. KOMLOSI, A. NYRI, I. ANTON, L. FESUS (2005): Oestrogen receptor genotypes and litter size in Hungarian Large White pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 122, 56-61.
- JIANG, Z., L. TROY OTT (2010): *Reproductive Genomics in Domestic Animals.* Wiley-Blackwell. NY.
- KRALIK, G. (2007): Nasljeđivanje i selekcija svinja. U: *Svinjogojstvo biološki i zootehnički principi.* (Kralik, G., G. Kušec, D. Kralik, V. Margeta, Eds.). Grafika, Osijek. pp. 147-157.

- KRALIK, G., G. KUŠEC, D. KRALIK, V. MARGETA (2007): Svinjogojstvo biološki i zootehnički principi. Grafika, Osijek.
- KUŠEC, G., (2007): Genomika svinja. U: Svinjogojstvo biološki i zootehnički principi. (Kralik, G.,G. Kušec, D. Kralik, V. Margeta, Eds.). Grafika, Osijek. pp.219-258.
- LAWLOR P. G., P. B. LYNCH (2007): A review of factors influencing litter size in Irish sows. Irish Vet. J. 60, 359-366.
- NOGUERA, L., L. VARONA, L. GÓMEZ-RAYA, A. SÁNCHEZ, D. BABOT, J. ESTANY, L. A. MESSER, M. ROTHSCHILD, M. PÉREZ-ENCISO (2003): Estrogen receptor polymorphism in Landrace pigs and its association with litter size performance. Livest. Prod. Sci. 82, 53–59.
- ROTHSCHILD, M., C. JACOBSON, D. VASKE, C. TUGGLE, L. WANG, T. SHORT, G. ECKARDT, S. SASAKI, A. VINCENT, D. MCLAREN, O. SOUTHWOODS, H. VAN DER STEEN, A. MILEHAMII, G. PLASTOWII (1996): The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. Proceedings of the Nacional Academy Sciencesn of the USA 93, 201-205.
- SHORT, T. H., M. F. ROTHSCHILD, O. I. SOUTHWOOD, D. G. MCLAREN, A. de VRIES, H. van der STEEN, G. R. ECKARD, C. K. TUGGE, J. HELM, D. A. VASKE, A. J. MILEHAM, G. S. PLASTOW (1997): Effect of the Estrogen Receptor Locus on Reproduction and Production Traits in four Commercial Pig Lines. J. Anim. Sci. 75, 3138-3142.
- STATISTICA FOR WINDOWS, Version 9, Copyright © Statsoft Inc. 1984-2010, Tulsa, USA.
- UREMOVIĆ, M., Z. UREMOVIĆ (1997): Svinjogojstvo, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Kratis d.o.o., Zagreb.
- UREMOVIĆ, Z., M. UREMOVIĆ, V. PAVIĆ, B. MIOČ, S. MUŽIĆ, Z. JANJEČIĆ (2002): Stočarstvo. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Kratis d.o.o., Zagreb. pp.219-350.

VALLET, J., D. J. NONNEMAN, L. A. KUEHN (2010): Quantitative genomics of female reproduction. U: Reproductive Genomics in Domestic Animals. (Jiang, Z., L. Troy Ott, Eds.). Wiley-Blackwell, NY. pp. 23-24.

WÄHNER, M., K. P. BRÜSSOW (2009): Biological potential of fecundity of sows. *Biotech. Anim. Husbandry* 25, 523-533.

ZHEN-FANG, L. DE-WU, W. QING-LAI, Z. HAI-YU, C. YAO-SHEN (2006): Study on the association between estrogen receptor gene (ESR) and reproduction traits in Landrace pigs. *Acta genetica* 33, 711-716.

SAŽETAK

Dominika Fajdić i Martina Vdović

Genotipizacija polimorfizma estrgenog receptora u krmača

Svinjogojstvo je od davnina vrlo važna grana privrede u Hrvatskoj. Na ekonomičnost same proizvodnje utječu reproduktivna i proizvodna te točna sposobnost jedinki koja možemo unaprijediti selekcijom. U intenzivnoj svinjogojskoj proizvodnji teži se uzgoju i proizvodnji hibridnih linija, kao što je nizozemski hibrid Topigs, kojeg odlikuju visoka reproduktivna sposobnost, dobra konverzija hrane i prirast tovljenika.

Veličina legla je nisko nasljedno svojstvo i rezultat je interakcije velikog broja gena i okolišnih čimbenika. Selekcijom na temelju duljine trupa, križanjem pasmina i linija uz ispoljavanje heterozis efekta te kontrolom ostalih pogodovnih čimbenika (optimalno vrijeme parenja, hranidba, zdravstveni status) možemo izravno utjecati na povećanje veličine legla. Nasljedivost svojstva kao što je veličina legla, teško je odrediti izravno, stoga molekularna genetika ima veliki značaj u popravljaju proizvodnih svojstava primjenom genetskih markera. Estrogen receptor (ESR) nositelj je superiornosti za veličinu legla i utvrđena je njegova povezanost s reproduktivnim svojstvima u različitim pasmina i križanaca.

Cilj ovog istraživanja bio je analizirati genotipski polimorfizam ESR u 30 uzoraka krvi krmača hibrida Topigs, kao i reproduktivne pokazatelje svakog genotipa u prvom i drugom leglu. Nakon izolacije genomske DNK i umnažanja odsječaka ESR, dobiveni PCR produkti podvrgnuti su djelovanju restrikcijske endonukleaze *PvuII*, kako bi se utvrdio polimorfizam ciljnog odsječaka ESR. Produkti restrikcije podvrgnuti su elektroforezi u 3 %-tnom agaroznom gelu. Najučestaliji genotip bio je homozigot AA (odsječak veličine 120 parova baza), a najmanje homozigot BB (2 odsječaka sa 65 i 55 pb). Heterozigoti genotipa AB imali su 3 odsječaka sa 120, 65, 55 pb. Smatra se da je alel B više odgovoran za povećanje broja ukupnorodne i živorođene prasadi. U našem istraživanju najveći broj ukupno oprasenih, ali i mrtvooprasenih odojaka bio je kod krmača genotipa BB, uslijed čega je broj živooprasenih u njih bio najmanji. Najveći broj živooprasenih utvrđen je u homozigota AA. Iako su utvrđene razlike prosječnih vrijednosti reprodukcijjskih pokazatelja između pojedinih genotipova, u našem istraživanju one nisu bile značajne.

Ključne riječi: Topigs, veličina legla, estrogen receptor (ESR), DNK, PCR

SUMMARY

Dominika Fajdić and Martina Vdović

Genotyping of sows estrogen receptor polymorphism

Pig production has always been a very important branch of economy in Croatia. Reproductive and production traits that influence on production profitability partly can be improved with animal selection. In intensive pig production the aims are breeding and production of hybrid lines, such as the Dutch hybrid Topigs, which are characterized by high reproductive ability, good feed conversion and growth of pigs. Litter size, as a low-heritable trait, is the result of interaction of many genes and environmental factors. With selection based on the length of the body, crossing of breeds and lines with the expression of heterosis effect and control of other factors (such as the optimal time for mating, feeding, as well as health status) breeders can directly increase a litter size. Inheritance of some traits, such as litter size, is difficult to determine directly. That is why molecular genetics is important in improving producing performance using genetic markers. Estrogen receptor (ESR) is the holder of superiority for litter size. It has been determined that it is associated with reproductive traits in different breeds and crossbreeds.

The aim of this study was to analyze the genotypic polymorphism of ESR in 30 blood samples of sows of Topigs hybrid and reproductive performance of each genotype in the first and second litter. After DNA isolation and amplification of ESR sequence, the obtained PCR products were subjected to restriction with endonuclease *PvuII*, to determine the polymorphism of the target ESR segment. Restriction fragments were separated with gel-electrophoresis on 3% agarose gel. The most common genotype was the homozygote AA (segment size of 120 base pairs), and the homozygote BB (2 segments with 65 and 55 bp) was the least common. Heterozygous genotype AB had 3 segments of 120, 65 and 55 bp. It is believed that the B allele is more responsible for increasing the number of piglets born alive and total born piglets. In our study, the largest number of total born as well as stillborn piglets was in sows of genotype BB, what caused the lowest number of piglets born alive in the same group. The largest number of live born piglets was in homozygote AA. Although differences in average values of reproductive parameters between genotypes were found, they were not significant in our study.

Key words: Topigs, litter size, Estrogen receptor (ESR), DNA, PCR