

VPLYV POLYMORFIZMU GÉNOV *LEPR*, *MC5R* A *H-FABP* NA PRODUKČNÉ VLASTNOSTI OŠÍPANÝCH
THE EFFECT OF *LEPR*, *MC5R* AND *H-FABP* GENE POLYMORPHISM ON PIG PRODUCTION TRAITS

Anton Kováčik, Anna Trakovická, Jozef Bulla, Alica Rafayová, Zuzana Lieskovská

ABSTRAKT

The aim of this work was to analyze the productive traits of pigs in relation to polymorphism of *LEPR*(*HpaII*), *MC5R*(*Hsp92I*) and *H-FABP*(*HinfI*) genes. We used 102 young boars (50) and sows (52) from hybrid combination of Large White and Landrass breeds. Genotyping of pigs was performed by the PCR – RFLP method. We identified three genotypes AA(14), AB(32), BB(56) of the *LEPR*, HH(56), Hh(28), hh(18) of the *H-FABP*, but only two genotypes of *MC5R* (AA=88, AG=14). The effect of *LEPR* (*HpaII*) gene was statistically significant for average daily gain (AB=604.29 ± 24.23 g vs. AA=596.30 ± 28.16), and for back fat thickness (AA=10.77 ± 0.43 mm). The effect of *H-FABP* (*HinfI*) gene was statistically non-significant for average daily gain (hh=604.62 ± 14.94 vs. HH=597.72 ± 13.41), as well as for back fat thickness and lean meat. The effect of *MC5R* (*Hsp92I*) gene was statistically significant for back fat thickness (AA=10.52 ± 0.13 vs. AG=8.84 ± 0.23). Significant effect of sex on average daily gain was proved. We recommend to use these results for comparison with other hybrid combinations.

Key words: pig, *LEPR*, *MC5R*, *H-FABP*, production, PCR-RFLP

ÚVOD

Úlohou šľachtenia ošípaných je produkcia kvalitného chudého bravčového mäsa a zvyšovanie genetického potenciálu v ďalších ekonomicky významných znakoch ošípaných. V dôsledku dopytu spotrebiteľov po chudom mäse sa šľachtiteľské programy zameriavajú na redukciiu tuku, ktorá sa prejavuje úbytkom hrúbky chrbtovej slaniny a zvyšovaním podielu cenných mäsových častí v jatočnom tele. Z uvedeného dôvodu sme sa rozhodli zamerať na kandidátne gény s efektom na obsah intramuskulárneho tuku, medzi ktoré patria: *LEPR*, *MC5R* a *H-FABP*.

Pri štúdiu kandidátskych génov, u ktorých sa predpokladá možný vplyv na produkčné vlastnosti, bol odhalený výrazný účinok génu pre leptínový receptor (*LEPR*) na obsah tuku bravčového mäsa ošípaných. Vincent et al. (1997) pomocou väzbového mapovania mikrosatelitmi identifikovali *LEPR* gén ošípanej na šiestom chromozóme. V prípade *LEPR* génu ošípanej boli identifikované štyri typy polymorfizmov. Ako prvý bol popísaný polymorfizmus detekovaný reštrikčným enzýmom *HinfI* (Vincent et al., 1997). Ďalšie dva predstavujú intrónové substitúcie detekované reštrikčnými enzýmami *HpaII* a *RsaI* (Stratil et al., 1998) a napokon polymorfizmus identifikovaný metódou DGGE (Kopečný et al., 1997). Analýzou plemien Berkshire, Duroc, Hampshire a Landras Emmett et al. (2001) potvrdili polymorfizmus *LEPR* (*MboI*) s prevahou alely 2. Vyhodnotením vzťahu *LEPR* (*MboI*) génu k ukazovateľom kvality mäsa autori zistili preukazný vplyv na priemerné denné prírastky, na obsah IMF pri plemene Hampshire a na hrúbku chrbtovej slaniny plemena Landras (Emnett et al., 2001).

Gén *MC5R* je kandidátny gén s efektom na obsah tuku v bravčovom mäse. Kim et al. (2000) mapovaním lokalizovali *MC5R* gén na šiestom chromozóme ošípanej, patrí do skupiny melanokortikotropných. Nukleotidová substitúcia A303G vedie k aminokyselinovej zámene Ala za Thr v 109. pozícii. Uvedený typ polymorfizmu pomocou reštrikčného enzýmu *BsaHI* s naštiepenými polymorfnými fragmentmi A (238 bp) a G (179 bp a 59 bp) ako prvý detekovali Kim et al. (2000). Polymorfizmus génu bol potvrdený v práci Emmett et al. (2001). Druhý typ

polymorfizmu *MC5R* génu, spôsobený substitúciou *C841T*, bol zistený alelovo špecifickou PCR, ktorou sa detekujú dve alely C a T. Prítomnosť alely C charakterizuje fragment veľkosti 128 bp, alelu T 118 bp fragment (Kim et al., 2000).

Gén *H-FABP* bol lokalizovaný na šiestom chromozóme ošípanej. Pomocou metódy PCR-RFLP (*HaeIII*, *HinfI*, *MspI*) boli odhalené tri polymorfizmy (Gerbens et al., 1997). Skupinu FABP tvoria malé vnútrobunkové proteíny zabezpečujúce transport mastných kyselín (MK) z cytoplazmatickej membrány k miestu β -oxidácie a syntézy fosfolipidov (Veerkamp, Maatman, 1995).

Uplatnenie spomínaných kandidátnych génov priamo v selekčných programoch predstavuje možnú cestu dosiahnutia zníženia hrúbky chrbtovej slaniny bez redukcie vnútro svalového tuku. Cieľom práce bolo analyzovať genetickú variabilitu vybraných produkčných ukazovateľov ošípaných na základe genotypov *H-FABP(HinfI)*, *LEPR (HpaII)* a *MC5R (Hsp92I)* pomocou metódy PCR-RFLP.

MATERIÁL A METODIKA

V experimente bol použitý biologický materiál od 102 jedincov, 50 kancov a 52 prasničiek hybridnej kombinácie Biela ušľachtilá a Landras. Zvieratá boli kŕmené štandardnou kŕmnou zmesou. Ako biologický materiál bola požívaná krv. DNA sme izolovali pomocou komerčného kitu NucleoSpin blood od firmy Macherey-Nagel. Na amplifikáciu cieľových úsekov sme použili špecifické oligonukleotidové primery:

LEPR

FOR: 5' GGA AGG CAT TTG TTT CAG CAG TAA 3'

REV: 5' CAA GTC CTC TTT CAT CCA GCA CTG 3' (Stratil et al., 1998):

MC5R

FOR: 5' TGA GCC TCT TGG AGA ACA TC 3'

REV: 5' GCC ACC AAG GAG ATG CAG 3' (Kim, 2000)

H-FABP

FOR: 5' GGA CCC AAG ATG CCT ACG CCG 3'

REV: 5' CTG CAT CTT TGA CCA AGA GG 3' (Gerbens et al. 1997)

Genotypovanie ošípaných bolo uskutočňované pomocou metódy PCR – RFLP. Reakčná zmes obsahovala:

LEPR: 5 pmol primeru FOR a REV, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1.0 U *Taq* DNA polymerázy (Promega, Netherland - NL), PCR reakčné médium (200 mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl) a 50 ng DNA.

H-FABP: 10 pmol primeru FOR a REV, 1.7 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 1.25 U *Taq* DNA polymerázy (Promega, NL), PCR reakčné médium (10mM Tris-HCl, 50mM KCl and 0.1% Triton X-100) a 50 ng DNA.

MC5R: 10 pmol primeru FOR a REV, 1.25U *Taq* DNA polymerázy (Promega, NL), 2.0 mM MgCl₂, 200 mM dNTP mix a 50 ng DNA.

Tabuľka 1 Teplotný a časový profil PCR reakcie

Teplotný a časový profil	<i>LEPR</i>		<i>H-FABP</i>		<i>MC5R</i>	
	teplota	čas	teplota	čas	teplota	čas
štart	95 °C	2 min	94 °C	3 min	94 °C	2 min
denaturácia	94 °C	1 min	94 °C	1 min	94 °C	0,5 min
annealing	55 °C	1 min	57 °C	1 min	56 °C	1 min
polymerizácia	72 °C	2 min	72 °C	1 min	72 °C	0,5 min
elongácia	72 °C	10 min	72 °C	10 min	72 °C	10 min
ochladenie	4 °C		4 °C		4 °C	
počet cyklov	30		33		30	

Na reštrikčnú analýzu sme použili špecifické endonukleázy štiepiace PCR produkty. Pri *LEPR* géne sme použili *HpaII* (Promega, NL), pri *H-FABP* *HinfI* (Promega, NL) a pri *MC5R* *Hsp92I* (Promega, NL).

Identifikácia a analýzy izolovanej DNA, PCR produktov a produktov štiepenia sme realizovali elektroforetickou separáciou v agarózovom géle. Koncentrácia agarózového gélu bola zvolená podľa očakávanej veľkosti fragmentov (*H-FABP* 3%, *LEPR* 1,5% a *MC5R* 3%). Gél obsahoval interkalačné činidlo ethidium bromide (0.5 µg/ml). Elektroforetická separácia prebiehala v 1 x TBE roztoku pri 80-120 V po dobu 30-90 minút. Ako markery sme použili DNA Ladder 100-1000 bp a DNA Ladder 50-500 bp, (Promega, NL). Naštiepené PCR produkty sme detekovali pod UV transiluminátorom.

Priemerný denný prírastok (ADG, g) bol meraný pri hmotnosti od 30kg do 90-100 kg. Meranie hrúbky chrbtovej slaniny (BFT, mm) a podielu chudého mäsa (LM, %) bolo vykonané podľa štandardnej metodiky STN 466164.

Štatistické analýzy jednotlivých génov boli uskutočnené lineárnym modelom GLM s fixnými a variabilnými efektmi pomocou programu SAS (2000).

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{Sex}_h + \text{LEPR}_i + \text{MC5R}_j + \text{H-FABP}_k + e_{ijkl}$$

- Y_{ijkl} - hodnotený ukazovateľ (priemerný denný prírastok, hrúbka chrbtovej slaniny, cenné mäsité časti)
 μ - priemer populácie
 LEPR_i - efekt genotypu *LEPR* gén ($i = \text{AA, AB, BB}$)
 MC5R_j - efekt genotypu *MC5R* gén ($j = \text{AA, AG}$)
 H-FABP_k - efekt genotypu *H-FABP* gén ($k = \text{HH, Hh, hh}$)
 Sex_h - efekt pohlavia
 e_{ijkl} - náhodná chyba

VÝSLEDKY A DISKUSIA

V skupine 102 ošípaných sme identifikovali tri genotypy AA(14), AB(32) a BB(56) pre *LEPR*, HH(56), Hh(28) a hh(18) pre *H-FABP* gén, ale len dve genotypové kombinácie pre gén *MC5R* (AA-88, AG-14). Génové a genotypové frekvencie sú uvedené v tabuľke 2. Boli potvrdené rozdiely vo frekvencii alel oboch lokusov. Pre gén *LEPR* bola potvrdená vyššia frekvencia výskytu alely B (0.7058) oproti alele A (0.2942). Nižšie rozdiely frekvencií výskytu boli zistené u *H-FABP* ($H = 0.6862$, $h = 0.3137$). V hodnotenej populácii bola zistená nízka úroveň polymorfности (PIC = 0.0320) v lokuse *MC5R*, z dôvodu malého počtu heterozygotov AG (13.75%).

Tabuľka 2 Genotypy a frekvencie alel kandidátnych génov v populácii ošípaných (N=102)

Gén	Genotyp			Alela		χ^2 - test	H_e	PIC
	AA	AB	BB	A	B			
<i>LEPR</i>	14	32	56	0.2942	0.7058	6.0948 ⁺⁺	0.4153	0.3249
	AA	AG	GG	A	G			
<i>MC5R</i>	88	14	-	0.9313	0.0687	0.5537 [*]	0.1303	0.0320
	HH	Hh	hh	H	h			
<i>H-FABP</i>	56	28	18	0.6862	0.3137	13.4034 ⁺⁺⁺	0.4392	0.3323

P>0.05⁺, P>0.01⁺⁺, P>0.001⁺⁺⁺

Hodnotenie vzťahov individuálnych genotypov markerových génov s fenotypovými prejavmi produkcie mäsa sú uvedené v tabuľke 3, 4. Na základe vybraných produkčných ukazovateľoch, bol zistený najvyšší priemerný denný prírastok (ADG) pre gén *LEPR* pri heterozygotoch AB (604.29 ± 24.23). Pre tento gén bol zistený v ukazovateli priemerný denný prírastok signifikantný rozdiel medzi heterozygotným genotypom AB (604.29 ± 24.23) oproti genotypu AA (596.30 ± 28.16). Pri homozygotnom genotype AA (*LEPR*), bola štatisticky významne potvrdená najvyššia hrúbka chrbtovej slaniny (BFT = 10.77 ± 0.43) a najnižší podiel cenných mäsitých častí (LM = 57.64 ± 1.18). Pre BFT genotyp BB vykazoval najnižšiu hodnotu oproti genotypom AB a AA (AA > AB > BB). V ukazovateli cenné mäsité časti (LM) ošípané s genotypom BB (*LEPR*) vykazujú vyšší podiel (BB > AB > AA).

Na základe *H-FABP* génu, majú rozdiely medzi jednotlivými genotypmi podobnú tendenciu pre ukazovatele hrúbka chrbtovej BFT a podiel cenných mäsitých častí LM (HH > Hh > hh), ako pri géne *LEPR*. Priemerný denný prírastok ADG bol najvyšší pri genotype hh (604.62 ± 14.94).

Na základe génu *MC5R* bol zistený signifikantný rozdiel medzi jednotlivými genotypmi v ukazovateli BFT (AA=10.52 ± 0.13, AG=8.84 ± 0.23).

Hodnotená populácia nevykazovala rovnovážny stav, jednalo sa o selektovanú populáciu. Na ukazovateľ priemerný denný prírastok (ADG) bol zistený štatisticky významný vplyv pohlavia. Na hrúbku chrbtovej slaniny sme vplyv pohlavia nezistili. Pri všetkých hodnotených génoch sme zistili efekt genotypu, pri *LEPR* a *H-FABP* na najnižšej úrovni preukázateľnosti. Pri *MC5R* bola signifikantnosť vyššia, ale tento výsledok môže byť ovplyvnený malou variabilitou v lokuse.

Emnett et al. (2001) zistili vplyv *LEPR* (*MboI*) génu na priemerný denný prírastok (ADG). Výsledky našej analýzy potvrdili vplyv *LEPR* génu ku prírastkom. V prípade hrúbky chrbtovej slaniny (BFT) zistili preukázateľný vplyv génu *LEPR*. Toto zistenie korešponduje s výsledkami autorov Óvilo et al. (2002), ale nekorešponduje s výsledkami Mindeková a Trakovická (2006). Emnett et al. (2001) pri plemene Landras potvrdili vplyv *LEPR* (*MboI*) génu na hrúbku chrbtovej slaniny. Autori Óvilo et al. (2000), Urban a Mikolášová (2002a) nezistili preukázateľný vplyv *H-FABP* génu na ukazovateľ hrúbka chrbtovej slaniny. Gerbens et al. (1999) predpokladajú ovplyvňovanie hrúbky chrbtovej slaniny génmi, ktoré sú vo väzbe s *H-FABP*. Naše výsledky korešpondujú s výsledkami Mindeková a Trakovická (2006), Emnett et al. (2001). Na základe zistených výsledkov je zrejmé, že BFT index je spojený tiež s inými kandidátnymi génmi ošípaných, napr. *RYRI*, *MYC*, *LEP*, *GHI* (Urban et al., 2002b) a *MC4R* (Kováčik et al., 2009).

Tabuľka 3 Determinačný koeficient a hladiny preukázanosti kandidátnych génov

Meat parameters*	R ²	Sex	LEPR	MC5R	H-FABP
ADG (g)	0.68	0.001⁺⁺	0.087	0.931	0.072
BFT (mm)	0.49	0.276	0.014⁺	0.001⁺⁺	0.045⁺
LM (%)	0.41	0.542	0.052	0.207	0.092

*ADG = priemerný denný prírastok (g), BFT = hrúbka chrbtovej slaniny (mm), LM = cenné mäsité časti (%)

P ≥ 0.05, ⁺ P ≤ 0.05, ⁺⁺ P ≤ 0.01, ⁺⁺⁺ P ≤ 0.001

R² - determinačný koeficient

Tabuľka 4 Vplyv kandidátskych génov na produkčné ukazovatele ošípaných

Gén	Genotypy		
	AA (14)	AB (32)	BB (56)
LEPR (<i>HpaII</i>)			
ADG (g)	596.30 ^a ± 28.16	604.29 ^a ± 24.23	600.09 ± 30.97
BFT (mm)	10.77^a ± 0.43	10.02^{ab} ± 0.53	8.98^b ± 0.53
LM (%)	57.64 ^{ab} ± 1.18	58.91 ^a ± 1.75	59.98 ^b ± 2.25
MC5R (<i>Hsp92I</i>)	AA (88)	AG (14)	GG
ADG (g)	600.20 ± 52.46	601.25 ± 75.58	-
BFT (mm)	10.52 ± 0.13^A	8.84 ± 0.23	-
LM (%)	58.15 ± 2.91	59.65 ± 4.32	-
H-FABP (<i>HinfI</i>)	HH (56)	Hh (28)	hh (18)
ADG (g)	597.72 ± 13.41	598.46 ± 29.25	604.62 ± 14.94
BFT (mm)	9.28 ± 0.22^a	9.27 ± 0.36^a	8.77 ± 0.98
LM (%)	59.17 ± 2.38	59.47 ± 1.98	60.54 ± 0.56

*ADG = priemerný denný prírastok (g), BFT = hrúbka chrbtovej slaniny (mm), LM = cenné mäsité časti (%)

** ^a = P ≤ 0.05, ^A P = ≤ 0.01, ^A = P ≤ 0.001

ZÁVER

Na základe uskutočnených analýz genotypov *LEPR*, *MC5R* a *H-FABP* sme pozorovali asociácie k vybraným kvalitatívnym a kvantitatívnym ukazovateľom ošípaných (BFT, LM, ADG). Ukazovateľ BFT index (hrúbka chrbtovej slaniny) bol pozorovaný na dolnej hranici preukázanosti pre gény *LEPR* a *H-FABP*, pričom pri *MC5R* bol tento vzťah silnejší. Testovaná populácia nebola rovnovážna (PIC 0,0320-0,3323), čo môže byť z dôvodu nižšieho počtu zvierat v experimente. Tieto výsledky odporúčame použiť pre porovnanie s ďalšími hybridnými kombináciami ošípaných.

LITERATÚRA

- EMNETT, R., MOELLER, S., IRWIN, K., ROTHSCILD, M. F., PLASTOW, G., GOODWIN, R., 2001. Association Studies With Leptin Receptor, Melanocortin-4 Receptor, Melanocortin-5 Receptor, and Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ , *Eastridge*, M. L., Bacon, W. L., Knipe, C. L., Meeker, D. L., Turner, T. B., and Zartman, D. L. In *Research and Reviews: Swine*. 2001, (OARDC Special Circular; 185), p. 57-63.
- GERBENS, F., RETTENBERGER, G., LENSTRA, J. A., VEERKAMP, J. H., TEPAS, M. F. W., 1997. Characterization, chroosomal localization, and genetic variatio of the porcine heart fatty aci-binding protein gene. In *Mammalian genome*. vol. 8, 1997, p. 328-332.
- KIM, K. S., MARKUND, S., ROTHSCILD, M. F., 2000. The porcine melanocortin 5-receptor (MC5R) gene: polymorphisms, linkage, and physical mapping. In *Animal Genetics*. vol. 31, 2000, p. 230-231.

- KOPEČNÝ, M., STRATIL, A., ČEPICA, S., 1997. Polymorphism at the porcine LEPR gene detected by PCR-DGGE. In *Animal Genetics*, 28, 1997, p. 461.
- KOVÁČIK, A., TRAKOVICKÁ, A., BULLA, J., BOBČEK, B., RAFAYOVÁ, A., 2009. Effects of genotypes LEPR and MC4R on pigs production. In *Scientific papers: Animal sciences and biotechnologies*. vol. 42 (2), 2009, p. 397-401.
- MINDEKOVÁ, S., TRAKOVICKÁ, A., STRAPÁKOVÁ, E., 2006. Effects of genotypes LEPR and H-FABP on pigs production. In *Acta fytotechnica et zootechnica – Special No.* 2006, p. 32-33.
- ÓVILO, C., OLIVER, M. A. et al., 2000. H-FABP gene association study for body composition in pigs. In *ISAG Conf. Abstract Book*. 2000, p. 47.
- STRATIL, A., KOPEČNÝ, M., MOSER, G., 1998. *HpaII* and *RsaI* PCR-RFLPs within an intron of the porcine leptin receptor gene (*LEPR*) and its linkage mapping. In *Anim. Genetics*. vol. 29, 1998, p. 398-413.
- STN 46 6164. 1997. Kontrola úžitkovosti a dedičnosti úžitkových vlastností ošípaných.
- URBAN, T., KUCIEL, J., MIKOLÁŠOVÁ, R., 2002b. Polymorphism of genes encoding for ryanodine receptor, growth hormone, leptin and MYC protooncogene protein and meat production in Duroc pigs. In *Czech J. Anim. Sci.* vol. 47, 2002, p. 411-417.
- URBAN, T., MIKOLÁŠOVÁ, R., 2002a. A study of associations of the H-FABP genotypes with fat and meat production of pigs. In *J. Appl. Genet.* vol. 43, 2002, p. 505-509.
- VEERKAMP, J. H., MAATMAN, R. G. H. J., 1995. Cytoplasmic fatty acid binding proteins: their structure and genes, In *Prog. Lipid Res.* vol. 34, 1995, p. 17-52.
- VINCENT, A. L., WANG, L., ROTHSCILD, M. F., 1997. Rapid communication: a restriction fragment length polymorphism in the porcine leptin receptor (*LEPR*) gene. In *J. Animal Science*. vol. 75, 1997, p. 2287.

Pod'akovanie

Táto práca vznikla za podpory projektov VEGA No. 1/0834/08 a VEGA No. 1/4440/07.

Kontaktná adresa:

Ing. Anton Kováčik, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KFŽ, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4288, E-mail: anton.kovacik@yahoo.com

doc. Ing. Anna Trakovická, CSc. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, KGPB, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4285, E-mail: anna.trakovicka@uniag.sk

prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc. Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP, KFŽ, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4582, E-mail: jozef.bulla@uniag.sk

Ing. Alica Rafayová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, KGPB, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4293, E-mail: alica.rafayova@gmail.com

Ing. Zuzana Lieskovská, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FAPZ, KGPB, Trieda Andreja Hlinku 2. Tel.: 037 641 4293, E-mail: z.lieskovska@gmail.com