

## 5.1 Uvod

Za ohranjanje populacije avtohtonih pasem prašičev je potrebno poiskati in izkoristiti prednosti pasme. Med pomembnejše prednosti pasme krškopoljski prašič uvrščamo kakovost mesa (Eiselt in Ferjan, 1972; Šalehar, 1994; Čandek-Potokar in sod., 2003), saj je toplotno obdelano meso mehko, sočno in aromatično, kar je posledica ugodnega deleža intramuskularne maščobe (Whittemore, 1993).

Dandanes je v prehrani ljudi pogosto poudarjena nujnost polnovrednega, uravnoveženega obroka. Predvsem moramo biti pazljivi pri vnosu maščob. Selekcija prašičev je usmerjena k večji mesnatosti. Zamaščenost je nezaželena tudi za rejce, saj dobi klavne trupe še vedno plačane na osnovi mesnatosti. Maščobno tkivo delimo na podkožno, intermuskularno (medmišično), intramuskularno (mišično) ter maščobo telesnih votlin. Podkožno maščobo, kamor spada tudi hrbtne slanina, zlahka ločimo od mesa z rezom. Predstavlja 60 do 70 % telesnega maščevja.

Sočnost in mehko meso daje intramuskularna maščoba (Whittemore, 1993). Priporočljiva vsebnost intramuskularnega maščobnega tkiva je 2.5 do 3.0 %, saj je meso z manjšim deležem pust, manj sočno in slabšega okusa. Ker je intramuskularna maščoba pozitivno korelirana z debelino hrbtne slanine, s selekcijo na hrbtne slanino zmanjšujemo vsebnost t.i. mišično maščobo, s tem pa tudi sočnost mesa. Hovenier in sod. (1993) navajajo srednje visoke ocene heritabilitet za debelino hrbtne slanine (0.61) in intramuskularno maščobo (0.51) ter fenotipske (0.52) in genetske korelacije (0.37) med lastnostma.

Pomembna ni le količina zaužitih maščob, temveč tudi sestava. Porabniku želimo ponuditi izdelek z majhnim deležem maščobe, ki naj bo primerne prehranske vrednosti, na kar vpliva maščobnokislinska sestava. Prašiči krškopoljske pasme so nagnjeni k zamaščenosti, ki pa jo lahko omejimo z ustreznim krmljenjem. Prednost te pasme je ugodna maščobno kislinska sestava maščob (Furman in sod., 2009), ki zagotavlja tako prehransko vreden kot tehnološko stabilen izdelek. To prednost bi veljalo izkoristiti za promocijo izdelkov prašičev avtohtone pasme, kar bi bilo lahko ključno pri ohranjanju populacije.

Analize za določanje maščobnokislinske sestave so drage, poleg tega jih lahko opravimo po zakolu. Pomoč molekularne genetike bi bistveno zmanjšala stroške selekcije, zato želimo najti gene oz. regije z velikim učinkom na vsebnost intramuskularne maščobe ter vplivom na sestavo maščob. Kandidatne gene z vplivom na zamaščenost iščemo na več načinov. Ker je debelost ena izmed najpogostejših tegob današnjega časa, so raziskave kandidatnih genov z vplivom na nalaganje maščob pri človeku zelo pogoste. Kandidatne regije kot rezultat teh študij lahko prenesemo tudi v populacije prašičev, saj si s prašiči delimo številne fiziološke in morfološke značilnosti metabolizma in nalaganja maščob. Tako so pred kratkim pri človeku našli gen imenovan *FTO* (angl. Fat Mass and Obesity), ki značilno vpliva na indeks telesne mase (BMI) in na debelost (Dina in sod., 2007; Frayling in sod., 2007). Povezavo med zamaščenostjo in genom *FTO* so pri prašičih pasme duroc potrdili Fontanesi in sod. (2009a,b).

Cilj tega prispevka je analizirati vpliv gena *FTO* na lastnosti zamaščenosti pasme krškopoljski prašič, ki smo jih izmerili po zakolu. Preverili smo tudi povezavo med *FTO* genom in maščobnokislinsko sestavo maščob.

## 5.2 Material in metode

Zbrali smo podatke o 63 živalih, in sicer iz dveh poskusov, ki smo jih izvajali v Pedagoško raziskovalnem centru za živinorejo Logatec. V prvi skupini živali je bilo 22 svinjk in 18 kastratov. Potek poskusa prve skupine je podrobneje opisan prispevku Planinc in sod. (2009). V drugi skupini živali smo uhlevili 17 svinjk in 6 kastratov pasme krškopoljski prašič. Uhlevitev in oskrba živali sta podrobneje opisana v prispevku Zupan in sod. (2009).

### 5.2.1 Meritve

Na liniji klanja smo klavne trupe stehali in zapisali maso toplih polovic ter na toplih polovicah izmerili meritev M in meritev S, tako po dvotočkovni kot tudi HGP4 metodi (Kovač in sod., 2005). Na hladnih polovicah smo izmerili debelino slanine na vihru, sredini hrbta in tri meritve na križu, in sicer na začetku, sredini ter koncu križa.

Vzorci za določanje maščobnokislinske sestave smo vzeli 24 ur po zakolu za zadnjim rebrom. Vzorce smo vakuumsko zapakirali in jih shranili na  $-21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Po homogenizaciji vzorcev smo določili maščobnokislinsko sestavo. Metilne estre smo določali po Park in Goins (1994). Vsebnost mišične maščobe smo določali po Weibullu in Stoldt (AOAC, 1997).

### 5.2.2 Genske analize

Po zakolu smo odvzeli vzorce za genske analize in jih shranili na  $-21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Genske analize izvajamo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Dedni material smo iz tkiva uhljev izolirali s kitom za izolacijo DNeasy kit (Qiagen, Hilden, Nemčija). Z verižno polimerizacijo smo pomnožili odsek kromosoma dolžine 397 baznih parov, v katerem se nahaja mutacija. Kasneje smo produktu pomnoževanja dodali restriksijski encim *TaiI* (Fermentas, Litva). Encim razreže gen na določenem mestu, ki ga prepozna po zaporedju nukleotidov. Če mesta ne prepozna, ga ne reže. Rezultati restrikcije so tipični odseki DNA. Produkta restrikcije ločimo z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu, kjer različno dolgi odseki gena potujejo z različno hitrostjo, kar omogoča določitev genotipa. Genotipe označujemo z oznakami: GG, GT in TT.

### 5.2.3 Statistična analiza

Vpliv polimorfizma v genu *FTO* na vsebnost intramuskularne maščobe, meritev S po HGP4 metodi ( $S_{HGP4}$ ), debelino hrbtne slanine, merjeno na hrbtu ter maščobnokislinsko sestavo smo analizirali z modelom [5.1], kjer  $y_{ijkl}$  predstavlja analizirano lastnost. V model smo poleg vpliva *FTO* gena ( $F_i$ ) vključili še dva sistematska vpliva z nivoji: spol ( $S_j$ ) in skupino ( $G_k$ ). Spreminjanje mase toplih polovic ( $x_{ijkl}$ ) smo ponazorili z linearno regresijo, ugnезdno znotraj skupine. Srednjo vrednost predstavlja  $\mu$ ,  $e_{ijkl}$  pa nepojasnjeni ostanek. Vpliv skupine ( $G_k$ ) hkrati zajema vpliv krme in vpliv sezone.

$$y_{ijkl} = \mu + F_i + S_j + G_k + b_k(x_{ijkl} - \bar{x}) + e_{ijkl} \quad [5.1]$$

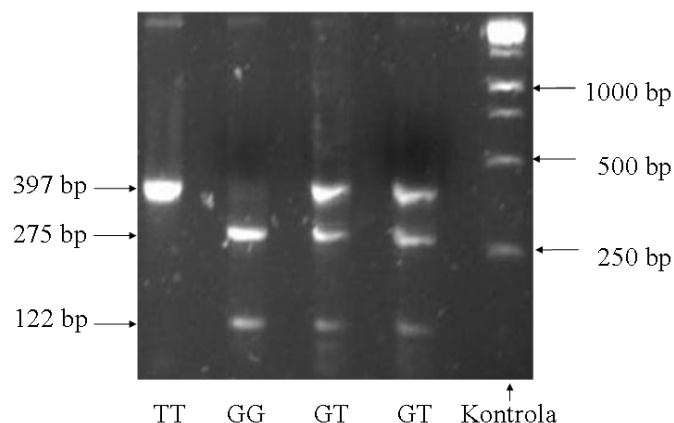
$$y_{ijk} = \mu + F_i + S_j + b(x_{ijk} - \bar{x}) + e_{ijk} \quad [5.2]$$

Analizo vpliva gena na meritev S po HGP4 metodi ( $S_{HGP4}$ ), debelino hrbtno slanine, merjeno na vihru ter slanine merjene na križu smo opravili z modelom [5.2], saj smo po predhodnih analizah ugotovili, da ni razlik v lastnostih med skupinami in zato tega vpliva nismo vključili v izbrani model.

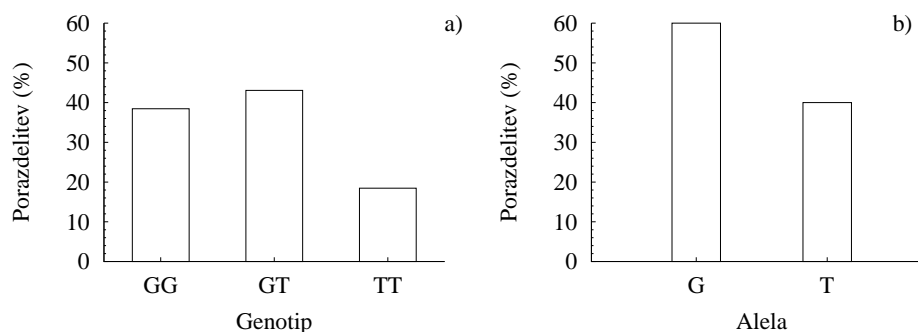
Razvoj modela in analizo vplivov na lastnosti zamaščenosti in maščobnokislinsko sestavo smo opravili s proceduro GLM (SAS Inst. Inc., 2001). Razlike med razredi posameznih vplivov smo ocenili z ustreznimi ocenljivimi funkcijami in testirali statistično značilnost razlik z multiplim testom sredin po Scheffeju. Vse izračune smo opravili s statističnim paketom SAS.

### 5.3 Rezultati z diskusijo

Uspešnost pomnoževanja in restrikcije odseka gena smo preverili na gelu (slika 1). Za pomoč pri določanju velikosti odseka smo uporabljali velikostni standard 1000 bp. V primeru, da je bil na mestu 276 nukleotid z oznako T (timin), je odsek ostal nerazcepljen, medtem ko je v primeru nukleotida G (gvanin) encim odsek razrezal na dva dela, dolga 275 in 122 baznih parov. Prašiči so, podobno kot ljudje, diploidni organizmi, kar pomeni, da potomec eno alelo podeduje po materi, drugo po očetu. Na gelu prikazujemo rezultate štirih osebkov (slika 1). Prvi osebek je imel na obeh kromosomih alelo T, drugi pa alelo G. Ko ima osebek na obeh homolognih kromosomih različni aleli, je heterozigot in na gelu vidimo vse tri dolžine (oznaka GT).



Slika 1: Restriksijska analiza polimorfnege mesta v genu za *FTO* na gelu



Slika 2: Delež genotipov (a) in alel (b) pri pasmi krškopoljski prašič

V poskusu je bilo največ heterozigotov, delež je znašal 43.1 % (slika 2a). Drugi najpogostejši so bili prašiči z alelo G na obeh kromosomih (38.46 %), manj kot petina živali pa ima obliko *FTO* gena TT (18.46 %). Rezultati se razlikujejo od Fontanesi in sod. (2009a,b), kjer je bil delež heterozigotov pri pasmi duroc primerljiv z deležem v naši populaciji (43.2 %), vendar je bil delež GG osebkov manjši (18.8 %) kot delež TT (38.0 %). Razmerje med alelami G:T je bilo 3:2 (slika 2b). Pasma krškopoljski prašič je glede na pogostost T alele (40 %) različna od večine ostalih pasem, saj so pri analiziranih populacijah zabeležili večjo pogostost alele T (Fontanesi in sod., 2009a,b), v primerjavi z alelo G. Analizirali so italijanske populacije prašičev: large white, duroc, landrace ter belgijsko landrace, hampshire, pietrain in meishan. Izmed vseh teh populacij je bil delež T alele povsod večji od 58.7 %, razen pri pasmi meishan, pri kateri alele T niso našli in je bila zastopana le alela G.

Analizirali smo vpliv gena *FTO* na lastnosti zamaščenosti (tabela 1). Večino p-vrednosti zavzema vrednosti okoli 0.4, kar pomeni, da so razlike med sredinami razredov premajhne,

Tabela 1: Vpliv gena *FTO* na lastnosti zamaščenosti

Lastnost (mm)	Genotipi			p-vrednost
	GG	GT	TT	
Meritev $S_{DM5}$	39.0±1.2	38.2±1.1	36.0±1.7	0.3425
Meritev $S_{HGP4}$	34.5±1.1	34.5±1.1	34.0±1.6	0.9604
DHS merjena na križu				
na začetku	46.4±1.3	45.1±1.2	43.1±1.9	0.3384
na sredini	37.3±1.3	36.2±1.2	34.7±1.8	0.4903
na koncu	47.3±1.3	46.9±1.2	44.5±1.6	0.4320
DHS merjena na hrbtu	35.0±1.3	33.5±1.3	33.8±1.8	0.6647
DHS merjena na vihru	61.1±1.7	61.5±1.6	55.3±2.4	0.0883

Tabela 2: Vpliv gena *FTO* na maščobnokislinsko sestavo intramuskularne maščobe v *M. longissimus dorsi*

Lastnost	Genotipi			p-vrednost
	GG	GT	TT	
Intramuskularna maščoba	3.30±0.25	3.81±0.25	3.49±0.35	0.3018
Maščobne kisline (%)				
Nasičene	36.39±0.26	36.20±0.25	35.93±0.36	0.5473
Enkrat nenasičene	50.27±0.45	50.89±0.45	51.22±0.36	0.3757
Večkrat nenasičene	13.32±0.44	12.91±0.44	12.84±0.62	0.7149
Večkrat nenasičene (%)				
n-3	1.13±0.04	1.15±0.04	1.05±0.05	0.3126
n-6	12.10±0.41	11.66±0.41	11.69±0.58	0.6887
n-6/n-3	11.88±0.38	11.15±0.38	12.18±0.53	0.1963
Indeks				
Večkrat nenasič./nasičene	0.37±0.01	0.36±0.01	0.36±0.02	0.8669
Aterogenosti	0.44±0.01	0.45±0.01	0.43±0.01	0.4681

da bi lahko trdili, da *FTO* gen značilno vpliva na lastnosti zamaščenosti pri pasmi krškopoljski prašič. Vpliv se kaže na debelino hrbtne slanine, merjene na vihru. Rezultati niso potrdili ugotovitev od Fontanesi in sod. (2009a,b), kjer so analizirali vpliva gena *FTO* pri pasmi duroc in ugotovili, da so bili prašiči z alelo T bolj zamaščeni. Eden od možnih vzrokov za nasprotje rezultatov je struktura živali po očetih v našem poskusu. Zaradi majhnosti populacije nismo mogli v poskus zajeti nesorodnih živali, saj je stopnja sorodstva v populaciji pasme krškopoljski prašič velika. V poskus smo zajeli veliko število potomcev po posameznih očetih, kar vpliva na frekvenco alel v populaciji.

Ugotovili smo, da pri živalih pasme krškopoljski prašič, ki smo jih zajeli v poskus, ni bilo razlik med genotipi gena *FTO* v intramuskularni maščobi (tabela 2). P-vrednost je znašala 0.3018, kar pomeni, da ni razlik v intramuskularni maščobi med genotipi gena *FTO*. Rezultati analize niso potrdili ugotovitev od Fontanesi in sod. (2009a,b), ki so dokazali povezavo med genom in vsebnostjo intramuskularne maščobe pri pasmi duroc. Večjo vsebnost intramuskularne maščobe so imeli prašiči genotipa TT.

Maščobnokislinsko sestavo smo določali intramuskularni maščobi v *M. longissimus dorsi* (tabela 2) in podkožni maščobi (tabela 3). Določali smo delež nasičenih, enkrat nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin. V prehrani človeka je težnja po zmanjšanju deleža nasičenih maščobnih kislin, saj imajo negativen vpliv na organizem. Velik vpliv na maščobnokislinsko sestavo ima sestava krme prašičev, kar je opisano v prispevku Žemva in sod. (2009). Za prehrano človeka pa je pomembno tudi ugodno razmerje med n-6/n-3. Zaželeno je, da bi bilo manjše od 4:1 (Scollan in sod., 2006).

Tabela 3: Vpliv gena *FTO* na maščobnokislinsko sestavo podkožnega maščobnega tkiva na hrbtu

Lastnost	Genotipi			p-vrednost
	GG	GT	TT	
Maščobne kisline (%)				
Nasičene	38.92±0.34	38.80±0.34	38.44±0.48	0.7112
Enkrat nenasičene	48.11±0.33	48.03±0.33	48.44±0.46	0.7586
Večkrat nenasičene	12.98±0.18	13.17±0.18	13.12±0.26	0.6015
Večkrat nenasičene (%)				
n-3	1.14±0.02	1.16±0.02	1.14±0.03	0.8506
n-6	11.71±0.17	11.90±0.17	11.86±0.24	0.6865
n-6/n-3	13.51±0.27	13.87±0.37	13.54±0.38	0.5643
Indeks				
Večkrat nenasič./nasičene	0.34±0.01	0.35±0.01	0.35±0.01	0.6015
Aterogenosti	0.47±0.01	0.47±0.01	0.46±0.01	0.7081

Gen *FTO* pri pasmi krškopoljski prašič ne vpliva na delež nasičenih, enkrat nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin v *M. longissimus dorsi* ter na razmerje med n-6/n-3. Tudi v indeksu aterogenosti, ki kaže na pogostost obolenja srca in ožilja, ni bilo razlik med genotipi za gen *FTO* (0.4681). Srednja vrednost vseh treh genotipov znaša pod 0.5, kar je ugodno in ima pozitivne učinke na zdravje ljudi.

Rezultati analize so pokazali, da tudi na maščobnokislinsko sestavo podkožne maščobe (tabela 3) gen *FTO* v populaciji pasme krškopoljski prašič ne vpliva. Razlik med posameznimi genotipi za *FTO* gen ni bilo v deležu nasičenih, enkrat nenasičenih in večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Sredine razredov so primerljive tudi za razmerje med večkrat nenasičenimi in nasičenimi maščobnimi kislinami ter za indeks aterogenosti.

#### 5.4 Zaključki

Kakovost prehranskih izdelkov je ključnega pomena za zdravje človeka. Znanje o potrebah hranilnih snovi je zelo napredovalo, kar daje smernice pridelovalcem hrane in tako tudi živilnorejcem. Porabnikom želimo ponuditi izdelke z nizkim deležem maščobe, ob tem pa želimo zagotoviti tudi senzorično kakovost izdelka. Pomembna je tudi sestava maščob. Porabniku želimo ponuditi izdelke z manjšim tveganjem za obolenja srca in ožilja.

V populaciji pasme krškopoljski prašič nismo potrdili povezave med genom *FTO* in vsebnostjo intramuskularne maščobe. Prav tako nismo našli razlik med genotipi v maščobnokislinski sestavi maščob. Trend razlik se kaže med genotipi za *FTO* gen le pri debelini slanine, merjene na vihu. Eden od možnih vzrokov, da nismo uspeli potrditi vpliva gena *FTO*, je struktura živali po poreklu. Za optimalno analizo vpliva gena bi potrebovali nesorodne živali. V populaciji pasme krškopoljski prašič je to praktično nemogoče, saj je stopnja

sorodstva eden izmed ključnih problemov majhnih populacij. Kljub temu strmimo k nadaljnemu raziskovanju genetskih vplivov na manjšo zamaščenost živali, ob enakem deležu intramuskularne maščobe, kar je bistvena prednost naše avtohtone pasme.

## 5.5 Viri

- AOAC 1997. Official method 991.36 fat (crude) in meat and meat product. V: Official method of analysis of AOAC International 16th. Cunniff P. (ur.), Washington, AOAC International. 39 str.
- Čandek-Potokar M., Žlender B., Kramar Z., Šegula B., Fazarinic G., Uršič M. 2003. Evaluation of Slovene local pig breed Krškopolje for carcass and meat quality. *Czech J. Anim. Sci.*, 3: 120–128.
- Dina C., Meyre D., Gallina S., Durand E., sod. 2007. Variation in FTO contributes to childhood obesity and severe adult obesity. *Nat. Genet.*, 39: 724–726.
- Eiselt E., Ferjan J. 1972. Proizvodne značilnosti krškopoljskega prašiča. V: Znanost in praksa v živinoreji, III. zbor prašičerejcev, Bled, 1972-05-8/11. Ljubljana, Bioteh. fakulteta, Odd. za zoot.: 855–863.
- Fontanesi L., Scotti E., Buttazzoni L., Dall'Olio S., Bagnato A., Fiego D.L., Davoli R., Russo V. 2009a. Confirmed association between a single nucleotide polymorphism in the FTO gene and obesity-related traits in heavy pigs. *Mol. Bio. Rep.*, online-pub.: 2009-8-1. <http://www.springerlink.com/content/64x1x774384mp263/fulltext.pdf> (2009-11-15).
- Fontanesi L., Scotti E., Buttazzoni L., Davoli R., Russo V. 2009b. The porcine fat mass and obesity associated FTO gene is associated with fat deposition in Italian Duroc pigs. *Anim. Genet.*, 40: 90–93.
- Frayling T., Timpson N., Weedon M., sod. 2007. A common variant in the FTO gene is associated with body mass index and predisposes to childhood and adult obesity. *Science*, 316: 889–894.
- Furman M., Levart A., Š. Malovrh, Kovač M. 2009. Nutritional quality of Krškopolje and commercial fattener pig meats in slovenia. V: Priorities for the European animal production in global market: Proceedings of the 17th International Symposium Animal Science Days, Padova, 2009-09-15/16. Milano, Edizioni Avenue Media: 219–221.
- Hovenier R., Kanis E., van Asseldonk T., Westerink N. 1993. Breeding for pig meat quality in halotane-negative populations - a review. *Pig News Info.*, 14: 17–25.
- Kovač M., Malovrh Š., Čop Sedminek D. 2005. Rejski program za prašiče SloHibrid. Ljubljana, Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije: 375 str.

- Park P.W., Goins R.E. 1994. In situ preparation of fatty acid methyl esters for analysis of fatty acid composition in foods. *J. Food Sci.*, 59: 1262–1266.
- Planinc M., Malovrh Š., Kovač M. 2009. Rast prašičev krškopoljske pasme. V: Spremljanje proizvodnosti prašičev, V. del. Kovač M., Malovrh Š. (ur.). Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota za prašičerejo, biometrijo in selekcijo: 101–108.
- SAS Inst. Inc. 2001. The SAS System for Windows, Release 8.02. Cary, NC.
- Scollan N.D., Hocquette J.F., Nurenberg K., Dannenberger D., Richardson R.I., Moloney A. 2006. Innovation in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Sci.*, 74: 17–33.
- Šalehar A. 1994. The Krškopolje pig. *Pig News Info.*, 15: 59N–61N.
- Whittemore C. 1993. The science and practice of pig production. Harlow, Longman Scientific and Technical: 661 str.
- Zupan M., Žemva M., Malovrh Š., Kovač M. 2009. Zauživanje otave pri prašičih krškopoljske pasme in hibrida 12. V: Spremljanje proizvodnosti prašičev, V. del. Kovač M., Malovrh Š. (ur.). Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota za prašičerejo, biometrijo in selekcijo: 91–100.
- Žemva M., Polak T., Vidakovič, Žlender B. 2009. Vpliv krmnih dodatkov in spola na sestavo maščobnega tkiva in vsebnost holesterola sušenih vratin prašičev. V: Spremljanje proizvodnosti prašičev, V. del. Kovač M., Malovrh Š. (ur.). Domžale, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota za prašičerejo, biometrijo in selekcijo: 125–136.