

Genotipizacija polimorfizma estrogenog receptora u krmača

Vdović, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:861929>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
VETERINARSKI FAKULTET**

Martina Vdović

GENOTIPIZACIJA POLIMORFIZMA ESTROGENOG RECEPTORA U KRMAČA

Diplomski rad
Zagreb, 2020.

VETERINARSKI FAKULTET SVEUČILIŠTA U ZAGREBU
ZAVOD ZA UZGOJ ŽIVOTINJA I STOČARSKU PROIZVODNJU

Predstojnik Zavoda za uzgoj životinja i stočarsku proizvodnju: Doc. dr. sc. Sven Menčik

Mentori: Prof. dr. sc. Anamaria Ekert Kabalin

Doc. dr. sc. Sven Menčik

Članovi povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Prof. dr. sc. Velimir Sušić
2. Prof. dr. sc. Anamaria Ekert Kabalin
3. Doc. dr. sc. Sven Menčik
4. Izv. prof. dr. sc. Mario Ostović (zamjena)

ZAHVALA

Zahvaljujem mentorima, prof. dr. sc. Anamariji Ekert Kabalin na stručnom vodstvu i velikoj pomoći kod pisanja ovog rada i doc. dr. sc. Svenu Menčiku na strpljenju u laboratoriju i pomoći oko izrade praktičnog dijela istraživanja. Posebno zahvaljujem pokojnom prof. dr. sc. Igoru Štokoviću na potpori i ohrabrivanju tijekom prvog ozbiljnog susreta s radom u laboratoriju. Zahvaljujem prijateljici, kolegici i suradnici na radu, Dominiki Fajdić, dr. med. vet., na velikoj i nesebičnoj pomoći.

Također, zahvaljujem asistentici Aneti Piplici, dr. med. vet., i asistentu Ivanu Vlaheku, dr. med. vet., na pomoći i savjetima pri oblikovanju diplomskog rada.

Osobito zahvaljujem obitelji i prijateljici Ana-Mariji Čergar, dr. med. vet., na potpori i strpljenju tijekom studiranja.

SADRŽAJ

1.	Uvod.....	3
2.	Pregled dosadašnjih istraživanja.....	4
3.	Materijal i metode.....	6
4.	Rezultati.....	9
5.	Rasprava.....	11
6.	Zaključci.....	13
7.	Literatura.....	14
8.	Sažetak.....	16
9.	<i>Summary</i>	17
10.	Životopis.....	18

POPIS PRILOGA

SLIKE

- Slika 1.** Prikaz dobivenih duljina restrikcijskih odsječaka za ESR kod različitih genotipova svinja..... 9

TABLICE

- Tablica 1.** Sastav ukupne reakcijske smjese za umnažanje ciljnog odsječka ESR-a lančanom reakcijom polimerazom..... 7
- Tablica 2.** Uvjeti provođenja lančane reakcije polimerazom.....7
- Tablica 3.** Učestalost pojedinih genotipova krmača hibrida Topigs s obzirom na polimorfizam ESR-a te prosječne vrijednosti reproduktivnih pokazatelja u prva dva legla..... 10

1. UVOD

Svinjogojstvo je od davnina vrlo važna grana poljoprivredne proizvodnje u Hrvatskoj, sudjelujući s 12 do 14 % u njenoj 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.).

Razlike između samih genotipova životinja, uz interakciju okolišnih uvjeta, prehrane i zdravstvenog statusa, čimbenici su koji utječu na ispoljavanje fenotipa. Kontinuiranim upotunjavanjem genskih karata, boljim razumijevanjem ekspresije gena te pronalaženjem novih genskih markera (biljega) za ekonomski bitna proizvodna svojstva, značajno se doprinosi unaprjeđenju selekcijskih postupaka u uzgoju domaćih životinja. Kako navode UREMOVIĆ i sur. (2002.), krajem 20. stoljeća ustanovljeno je da je marker tzv. estrogen receptor (ESR) nositelj superiornosti za veličinu legla kod križanaca Meishan pasmine svinja s europskim pasminama. No tijekom zadnja dva desetljeća su pojedini istraživači utvrđivali povezanost estrogenog receptora s reprodukcijom svojstvima u različitim pasmina i križanaca te polučili različite rezultate.

Stoga je cilj ovog istraživanja analizirati genotipski polimorfizam estrogenog receptora u krvi krmača hibrida Topigs, kao i reproduktivna svojstva (ukupan broj oprasenih, broj živooprasenih i mrtvooprasenih odojaka) svakog genotipa u prva dva legla.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA

Na ekonomičnost svinjogojske proizvodnje u najznačajnijoj mjeri utječu reproduktivna i proizvodna sposobnost krmača te točna sposobnost jedinki (WÄHNER i BRÜSSOW, 2009.). 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. Ono ovisi o broju ovulacija, čimbenicima nužnim za oplodnju i održavanje graviditeta, kvaliteti sperme, implantaciji, placenti, preživljavanju fetusa (embrionalna i fetalna smrtnost), 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.). Kako navodi GORDON (1997.), kineska pasmina Meishan jedna je 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. Kako navodi GORDON (1997.), 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 legla utječemo i indirektno selekcijom 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.).

Krajem 20. stoljeća započela su intenzivnija istraživanja povezanosti estrogenog receptora (ESR) sa svojstvima veličina legla u različitim križanaca Meishan pasmine svinja s europskim pasminama UREMOVIĆ i sur. (2002.) . 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 (ROTSCHILD i sur., 1996.; SHORT i sur., 1997.; DROGEMULLER, 2001.; ZHEN-FANG i sur. 2006.). Kako navode ZHEN-FANG i sur. (2006.), zaključci o povezanosti ESR-a i reproduktivnih pokazatelja u različitim pasmina svinja su 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.

3. MATERIJAL 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 vacutainer epruvetama s EDTA kao antikoagulansom (BD Vacutainer K2 plus E) 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 ciljani odsječak gena za estrogeni receptor (ESR, engl. *estrogen receptor gene*) lančanom reakcijom polimeraze (PCR, engl. *polimerase chain reaction*), koristeći uređaj 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 SHORT-a i sur. (1997.). Za umnažanje ciljne sekvence korištene su sintetizirane početnice slijedećeg redoslijeda nukleotida: 5'-CCTGTTTTTACAGTGA CTTTTTACAGAG-3' kod prednje (ESRF) i 5'-CACTTCGAGGGTCAGTCCAATTAG-3' kod stražnje početnice (ESRR), proizvođača Sigma Aldrich (prema radu ROTHSCILD-a i sur., 1996. i SHORT-a i sur., 1997.). Volumen ukupne reakcijske smjese za umnažanje ciljnog odsječaka 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 μ L	1x
MgCl ₂	1.5 μ L	1.5 mM
DNTPmix	2.5 μ L	200 nM
prednja specifična početnica (ESRF)	2.5 μ L	500 nM
stražnja specifična početnica (ESRR)	2.5 μ L	500 nM
<i>Tag</i> -polimeraza	0.2 μ L	1U/reakciji
deionizirana H ₂ O	7.3 μ L	
uzorak DNA	2.5 μ L	
ukupni volumen reakcijske smjese	25 μ L	

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		

U cilju utvrđivanja polimorfizma ciljnog odsječka ESR-a u uzorcima, dobiveni PCR-produkti podvrgnuti su djelovanju restriksijske endonukleaze *PvuII*, koja sječe na mjestu 5'-CAG/CTG-3' (Promega, SAD), kako bi se utvrdile duljine dobivenih restriksijskih odsječaka (RFLP, engl. *restricton fragment lenght polimorfism*). U epruvetici je 10 μ L PCR produkta

digestirano s 1U restrikcijskog enzima *PvuII* (koncentracije 8-12 U/ μ L) te 2 μ L 10x pufera specifičnog za *PvuII* (Promega, SAD), 0.2 μ L acetiliranog BSA (koncentracije 10 μ g/ μ L) i deionizirane vode do 20 μ L 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 μ L 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. Po završenoj polimerizaciji (30 min), izvađeni su češljevi te je gel sa kadicom uronjen u sustav za horizontalnu elektroforezu (BIO-RAD, PowerPac™ HC-Cleaver Scientific Ltd MSmini, UK) napunjen sa 1x TAE pufera 2 - 3 mm iznad agaroznog gela. U prvu jažicu nanesen je molekularni biljeg (6 μ L) poznatih molekularnih masa veličine 25 parova baza (Promega 25 bp DNA Step Ladder), a u preostale jažice po 6 μ L smjese PCR produkta (uzorka) s 2 μ L 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 fotografirani transluminatorom pod UV svjetlom uređajem MiniBisPro® (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel), a slike gela obrađene programom GelQuant Express Version 3.1. (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel).

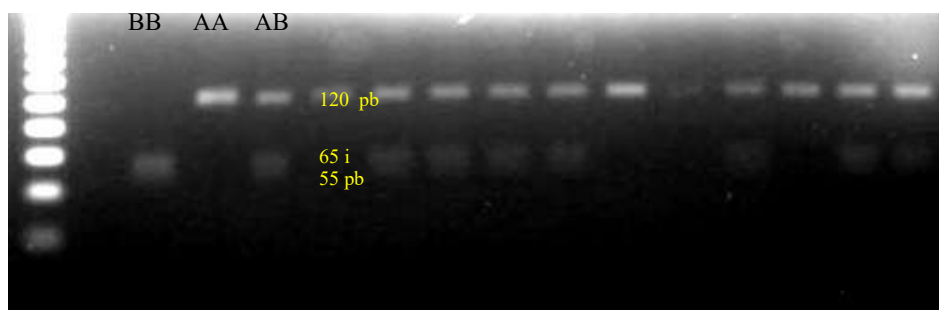
Podaci o reproduktivnim pokazateljima (broj ukupno oprasenih, živooprasenih i mrtvooprasenih odojaka) tijekom prva dva legla prikupljeni su iz proizvodnih kartona krmača.

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).

4. 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)

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.

5. RASPRAVA

Primjenom metode utvrđivanja duljine restrikcijskih odsječaka ciljnog dijela gena za estrogene receptore pomoću enzima *PvuII* uspješno sam odredila genotipove 30 krmača hibrida Topigs. Pritom je u mom 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 ROTHSCHILD-a 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 HOROGH-a 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 jedinke AB. DROGEMULLER 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).

Kako DROGEMULLER i sur. (2001.) navode, ESR je 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 (ROTHSCHILD 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 (ROTHSCHILD 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 oprasanih, ali i mrtvooprasanih odojaka, zbog čega je broj živooprasanih 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 ROTHSCHILD-u 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 jedinke 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.; DROGEMULLER 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 ZHEN-FANG 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.

6. ZAKLJUČCI

1. Metoda utvrđivanja duljine restrikcijskih odsječaka nakon digestije enzimom *PvuII* primjenjiva je za genotipizaciju polimorfizma ciljnog odsječka estrogenog receptora kod krmača hibrida Topigs.
2. Uspješno je genotipizirano svih 30 krmača, pri čemu je bilo 15 AA homozigota, 13 AB heterozigota i 2 homozigota BB.
3. 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 utvrđeno kod BB homozigota, a živooprasenih kod krmača genotipa AA.

7. LITERATURA

1. 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.
2. ANONYMUS (2012): <http://www.thepigsite.com/focus/topigs/3926/topigs-this-is-topigs> [pristupano 08.01.2012.]
3. DISTL, O. (2007): Mechanisms of regulation of litter size in pigs on the genome level. *Reprod. Domest. Anim.* 42 (Suppl 2),10-16.
4. DROGEMULLER C., H. HAMANN, O. DISTL (2001): Candidate gene markers for litter size in different German pigs lines. *J. Anim. Sci.* 79, 2565-2570.
5. DZS - Državni zavod za statistiku (2004): <http://www.dzs.hr/> [pristupano 15.01.2012.]
6. GORDON, I. (1997): Controlled reproduction in farm animals: series volume 3 - Controlled reproduction in pigs. Cab International UK.
7. GORDON, I. (1997a): Increasing litter size in pigs. *U: Gordon, I. (urednik): Controlled reproduction in farm animals series volume 3 - Controlled reproduction in pigs.* Cab International UK, 164-171.
8. 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.
9. JIANG, Z., L. TROY OTT (2010): *Reproductive Genomics in Domestic Animals.* Wiley-Blackwell. NY.
10. KRALIK, G. (2007): Nasljeđivanje i selekcija svinja. *U: Kralik, G., G. Kušec, D. Kralik, V. Margeta (urednici): Svinjogojstvo biološki i zootehnički principi.* Grafika, Osijek, 147-157.
11. KRALIK, G., G. KUŠEC, D. KRALIK, V. MARGETA (2007): *Svinjogojstvo biološki i zootehnički principi.* Grafika, Osijek.
12. KUŠEC, G., (2007): *Genomika svinja. U: Kralik, G.,G. Kušec, D. Kralik, V. Margeta (urednici) : Svinjogojstvo biološki i zootehnički principi.* Grafika, Osijek.
13. LAWLOR P. G., P. B. LYNCH (2007): A review of factors influencing litter size in Irish sows. *Ir. Vet. J.* 60 (6), 359-366.
14. NOGUERA, L., L. VARONA, L. GÓMEZ-RAYA, A. SÀNCHEZ, D. BABOT, J. ESTANY, L. A. MESSER M. ROTHSCHILD, M. PÈREZ-ENCISO (2003): Estrogen

- receptor polymorphism in Landrace pigs and its association with litter size performance. *Livest. Prod. Sci.* 82, 53–59.
15. ROTHSCILD, 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.
 16. SHORT, T. H., M. F. ROTHSCILD, O. I. SOUTHWOOD, D. G. MCLAREN, A. DE VRIES, H. VAN DER STEEN, G. R. ECKARD, C. K. TUGGE, J. HELM, D. A. VASKKE, 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.
 17. UREMOVIĆ, M., Z. UREMOVIĆ (1997): *Svinjogojstvo*, Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Kratis d.o.o., Zagreb.
 18. UREMOVIĆ, Z., M. UREMOVIĆ, V. PAVIĆ, B. MIOČ, S. MUŽIC, Z. JANJEČIĆ (2002): *Stočarstvo*. Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Kratis d.o.o., Zagreb.
 19. VALLET, J., D. J. NONNEMAN, L. A. KUEHN (2010): Quantitative genomics of female reproduction. *U: Jiang, Z., L. Troy Ott (urednici): Reproductive Genomics in Domestic Animals.* Wiley-Blackwell. NY, 23-24.
 20. WÄHNER, M., K. P. BRÜSSOW (2009): Biological potential of fecundity of sows. *Biotechnol. Anim. Husb.* 25 (5-6), 523-533.
 21. ZHEN-FANG, L. DE-WU, W. QUING-LAI, Z. HAI-YU, C. YAO-SHEN (2006): Study on the association between estrogen receptor gene (ESR) and reproduction traits in Landrace pigs. *Acta Genet. Sin.* 33 (8), 711-716.

8. SAŽETAK

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 reproduksijskih pokazatelja između pojedinih genotipova, u našem istraživanju one nisu bile značajne.

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

9. SUMMARY

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

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 19.11.1986. godine u Zagrebu, gdje sam završila Osnovnu školu Augusta Šenoje te maturirala u XI. gimnaziji. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu upisala sam 2005./2006.godine.

Koautorica sam na studentskom radu „Genotipizacija polimorfizma estrogenog receptora u krmača“ s kolegicom Dominikom Fajdić, kojem je dodijeljena Rektorova nagrada u akademskoj godini 2011./2012., a izrađen je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Anamarije Ekert Kabalin i doc. dr. sc. Svena Menčika. Iste godine osvojila sam nagradu „*One health award for interprofessional team work presentation in the field of comparative pathology medicine: Incidence and types of pathological changes in spleen of splenectomised dogs in Croatia*“, u suradnji s kolegicom Dominikom Fajdić, pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Marka Hohštetera i suradnika.

Godine 2013. odradila sam staž u Veterinarskoj stanici grada Zagreba, Heinzelova 68.

Od 2008. do 2017. sudjelovala sam u radu i organizaciji međunarodnih izložbi pasa u organizaciji Hrvatskog kinološkog saveza. Nadalje, od 2008. do 2019. sam sustavno sudjelovala u radu i organizaciji domaćih i međunarodnih klizačkih natjecanja i manifestacija u sklopu Hrvatskog klizačkog saveza.

Od 2020. godine zaposlena sam u Merck Sharp & Dohme d.o.o.