

Trumpos žinios apie doktorantą

Ramūnas Jokubka gimė 1974 m. Kaune. Baigė Juozo Urbšio vidurinę mokyklą (1992). Nuo 1993 m. Lietuvos veterinarijos akademijos (LVA) Gyvulininkystės technologijos fakulteto studentas. Aukštojo mokslo diplomas įgytas 1998 m. 1998-2000 m. LVA Gyvulininkystės fakulteto Gyvulių veisimo ir genetikos katedros magistrantas, nuo 2000 m. - magistras. 2000-2001 m. - jaunesnysis mokslinis bendradarbis Gyvulių veisimo ir genetikos katedroje. Nuo 2001 m. Gyvulių veisimo ir genetikos katedros doktorantas.

LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA

Ramūnas Jokubka

KIAULIŲ GENETINIŲ ŽYMENŲ ĮTAKA PRODUKTYVUMO SAVYBĖMS

Daktaro disertacijos santrauka
Biomedicinos mokslai, zootechnika (13B)

Maketavo: R. Trainienė

Už teksto turinį ir redagavimą atsakingas autorius

Spausdino LVA spaudos ir leidybos skyrius
Tilžės g. 18, LT-47181 Kaunas.
Tiražas 50. 1,62 sp. l. Užs. Nr. 31 d. 2005.

Kaunas, 2005

Darbas atliktas 2001-2005 metais Lietuvos veterinarijos akademijoje.

Mokslinio darbo vadovė:

doc. dr. Ilona Miceikienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B).

Zootechnikos mokslo krypties disertacijos gynimo taryba

Pirmininkė:

dr. Violeta Juškienė (Lietuvos veterinarijos akademijos Gyvulininkystės institutas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B).

Nariai:

prof. habil. dr. Aniolas Sruoga (Vilniaus universiteto Ekologijos institutas, biomedicinos mokslai, biologija – 01B);

e. prof. p. dr. Antanas Sederevičius (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B);

prof. habil. dr. Romas Gružas (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B);

doc. dr. Vida Juozaitienė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B).

Oponentai:

prof. habil. dr. Ramutis Klimas (Šiaulių universitetas, biomedicinos mokslai, zootechnika – 13B);

e. prof. p. dr. Jūratė Šiugždaitė (Lietuvos veterinarijos akademija, biomedicinos mokslai, veterinarinė medicina – 12B).

Disertacija bus ginama viešame Zootechnikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2005 m. spalio 7 d. 13 val. Lietuvos veterinarijos akademijos I auditorijoje.

Adresas: Tilžės g. 18, 47181 Kaunas, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2005 m. rugsėjo 7 d. pagal patvirtintą adresų sąrašą. Disertaciją galima peržiūrėti Lietuvos veterinarijos akademijos bibliotekoje.

2. For increasing the rate of genetic progress in Lithuanian White pigs and commercial lines in growth rate and carcass composition, it is recommended to involve MC4R gene in selection programs through marker assisted selection.
3. It is recommended to characterize the Lithuanian White breed with recently developed molecular tools for the most promising genetic markers (i.e. for growth and carcass composition, meat quality, reproduction traits and health) and to develop selection and economic models in order to evaluate the benefits and costs associated with each promising gene or genetic marker before substantial funds are invested in their implementation.

of breeding values on the basis of estimations of genetic parameters for the entire Lithuanian White population instead of single measurements in our study reduces the bias in the recorded performance traits. However, since the potential effect of a candidate gene variant on the performance trait is included in the estimated breeding value for the animals already, a post-hoc comparison of candidate variants underestimates the candidate gene effect (Israel and Weller 1998). Therefore, the significant results obtained for the population of Lithuanian White allow a recommendation for the integration of the MC4R genotype into selection programs for increasing growth rate and reducing fatness of this breed.

CONCLUSIONS

1. The evaluated level of prevalence rate of the MHS gene in the total Lithuanian White population was low ($q=0.044$). Analysis of association between the MHS gene and performance traits showed that animals with genotype NN have superiority against carriers. The results of association for lean meat percentage and backfat traits between genotypes suggest the existence of a gene or genes other than the MHS gene, which have influence on leanest for the Lithuanian White population.
2. The investigated melanocortin 4 receptor (MC4R) gene showed high polymorphism ($p=0.59$) useful for association analysis in the Lithuanian White breed. Estimated the differences between the breeds regarding gene frequency, suggests that differences in gene frequency may explain some of the phenotypic variation in several of the traits that differentiate the breeds with different selection.
3. An association analysis showed that the MC4R gene has pleiotropic effect: the marker has 3.2 % for test daily gain, 2.6 % for feed conversion ratio, 3 % for backfat thickness and 5 % of phenotypic variation for lean meat.
4. The use of breeding values instead of single measurements in the study reduces the bias in the recorded performance traits, which makes a direct approach to the testing and explanation of the quantitative part of the trait and QTL with marker in the Lithuanian White breed more suitable.

PROPOSALS

1. In order to avoid economic losses in the Lithuanian White population as well as animals' welfare in maternal population and their crosses in commercial swine breeding, the use of the MHS gene in breeding programs is not recommended. If MHS carrier females were evaluated and considered to be advantageous against the normal genotype, it would be important to mate animals to produce normal offspring. The use of terminal sire lines with genotypes Nn and nn (e.g. Pietrain breed) for mating with NN females only in order to reduce economic losses from meat production quality is recommended.

LITHUANIAN VETERINARY ACADEMY

Ramūnas Jokubka

ASSOCIATION OF PIG GENETIC MARKERS WITH PERFORMANCE TRAITS

Summary of doctoral thesis
Biomedical sciences, zootechny (13B)

Kaunas, 2005

The research was carried out in the Lithuanian Veterinary Academy in 2001-2005.

Research supervisor:

Assoc. Prof. Dr. Ilona Miceikienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny – 13B).

Chairman of Zootechny council:

Dr. Violeta Juškienė (Institute of Animal Science of Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny – 13B).

Members:

Prof. Dr. habil. Aniolas Sruoga (Institute of Ecology of Vilnius University, biomedical sciences, biology – 01B);

Prof. at Incumbent, Dr. Antanas Sederevičius (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12B);

Prof. Dr. habil. Romas Gružas (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny – 13B);

Assoc. Prof. Dr. Vida Juozaitienė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, zootechny – 13B).

Opponents:

Prof. Dr. habil. Ramutis Klimas (University of Šiauliai, biomedical sciences, zootechny – 13B);

Prof. at Incumbent Dr. Jūratė Šiugždaitė (Lithuanian Veterinary Academy, biomedical sciences, veterinary medicine – 12B);

The defence of doctoral dissertation will take place on 7th of October, 2005 at 1 pm LT in Lithuanian Veterinary Academy in Ist auditorium.
Address: Tilžės 18, LT-47181 Kaunas, Lithuania.

The abstract of doctoral thesis was sent on 7th of September, 2005 according to confirmed address list. The doctoral thesis is available in the library of the Lithuanian Veterinary Academy.

thickness (Ramos *et al.* 2003). Houston *et al.* (2004) observed a significantly shifted allele frequency towards wild type in a line selected for high lean feed conversion, however no shift in allele frequency was observed in a line selected for high lean growth under restricted feeding regimen which was discussed as a possible masking effect of genetic drift. Daily weight gain at test was higher for the mutant pigs and thus confirms the positive effect of the Asp298Asn mutation on growth rate (Kim *et al.* 2000b, Hernandez-Sanchez *et al.* 2003, Houston *et al.* 2004). The direction of the reported allelic effects on other traits however, differed among the studies. Kim *et al.* (2000b) and Houston *et al.* (2004) found an increased backfat thickness being linked to the mutant allele, whereas Park *et al.* (2002) reported a non-significant opposite effect. By consideration of the population stratification in the material used by Kim *et al.* (2000b) and integration of additional data Hernandez – Sanchez *et al.* (2003) seemed not to confirm the decrease in backfat thickness in the homozygous mutant pigs, thus apparently reversing the results of the initial study. However, in this publication inadvertently a different code was used for the genotypes (e.g. “11” for homozygous mutant instead for wild type as used in Kim *et al.* [2000b]) so that the results finally confirm the first study (Haley, personal communication). In our study using breeding values for the traits a significant decrease of backfat thickness at 10th rib in the order Asp/Asp > Asp/Asn > Asn/Asn was observed. This decrease was accompanied by a significant increase of lean meat percentage and a non-significant trend towards an improved feed conversion ratio. The allelic effects of the porcine MC4R gene in Lithuanian White are consistent with previous studies in general, except for fat deposition. This may be due to the different feeding conditions (restricted [this study] versus ad-libitum [Kim *et al.* 2000b]). Under restricted feeding conditions, the mutant Asn298 allele seems to shift energy utilization towards increased muscle weight gain and decreased fatness. Kim *et al.* (2004) demonstrated a functional effect of the Asp298Asn mutation leading to a decreased cAMP production in 293 cells. They conclude that the Asp 298 residual is directly involved in MC4R signaling to adenylyl cyclase. However, no differences in ligand binding were observed between both variants. Wikberg *et al.* (2000) concluded that leptin signaling can be alternatively mediated via a MC4R – independent path since MC4R deficient mice do still respond to leptin. Barb *et al.* (2004) also conclude from their results in pigs that the action of leptin on feed intake may be mediated by a regulatory mechanism circumventing the melanocortin 4 receptor. Their data do not support the idea that the Asp298Asn mutation in MC4R leads to a loss of function. The existence of alternative signaling cascades may thus be an explanation for the contradictory effects obtained for the functional polymorphism of MC4R in different pig lines. Park *et al.* (2002) detected two suggestive QTL for fatness traits flanking the position of MC4R on chromosome 1. This supports the hypothesis that gene interactions may modify the observed direction of the linkage between MC4R variants and performance traits. The use

efficiency. Leach *et al.* (1996) discussed that the advantage of feed efficiency for carriers compared with the stress negative pigs could be associated with the preferential deposition of lean rather than fat in carriers compared with stress negative pigs. However, in our study we cannot conclude that feed efficiency benefits for carrier pigs, because the LW pigs with genotype NN showed an advantage for backfat thickness and lean meat percentage against carriers. Interestingly, the carcass leanest for the LW animals was in the opposite to the results of most of the studies (e.g. Goodwin *et al.*, 1994; Christian and Rothschild 1981; Jensen and Barton-Gade 1985; Leach *et al.*, 1996), in which carrier and homozygous animals for allele n had less backfat thickness and higher lean meat percentage. Our results are based on estimated breeding values instead of single measurements, thus, the bias in statistics is reduced. However, the sample size in our study was not sufficient, only 10 carriers were observed, nevertheless, statistical inspection of the data shows that distributions are normal and t test statistic approaches p-value at significance level of 0.1. Backfat thickness and lean meat percentage traits showed maximum statistical power to detect association. Significant differences between genotypes for the traits were achieved by increasing sample size. If the power to detect significant results for the lean meat percentage and backfat thickness with increasing sample size was satisfying, the explanation for the contradictory effects would support the hypothesis (Burlot and Naveau 2003) that a major gene than MHS gene exists, and this gene has influence on the leanest. To sum it up, the presence of the MHS gene in the LW pigs is not associated with better body composition traits as well as feed efficiency; thus, utilization of these animals may lead to lower carcass quality.

Melanocortin 4 Receptor (MC4R) gene

Previous investigations on a single nucleotide polymorphism in the porcine gene leading to an Asp298Asn amino acid exchange revealed significant relationships to traits related to obesity, growth and feed intake, respectively (Kim *et al.* 2000b, Hernandez-Sanchez *et al.* 2003, Houston *et al.* 2004). In contrast to many other candidate genes (e.g. ESR – estrogen receptor, Rothschild *et al.* 1996) which more likely serve as markers for closely linked causal genetic variants than bearing the causal mutation itself, the MC4R receptor was demonstrated to act directly in the control of body weight and composition via mediating the effect of leptin (Wikberg *et al.* 2000, Kim *et al.* 2004). The distribution of allele and genotype frequencies for Asp298 and Asn298 in our sample did not deviate significantly from Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2=0.008$, $P=0.996$, 2 df) indicating that the locus is not under selection pressure. This result (wild type: 0.59 vs. mutant: 0.41) is in the same range as described for Large White derived lines (Kim *et al.* 2000a: 0.56 vs. 0.44). In contrast, the frequencies of this mutation were reported to be 0.96 vs. 0.04 and 0.90 vs. 0.10 in two Portuguese breeds which are characterized by a high backfat

Ivadas

Genetiškai pranašesnių individų nustatymui ir įvertinimui, vykdant tiek jų, tiek ir giminingų jiems gyvulių vertinimą pagal fenotipiškai svarbius požymius, tokius kaip augimo greitis, pašarų įsisavinimo efektyvumas, raumeningumas ir nugaros lašinių storis, ilgą laiką buvo taikomi įprastiniai kiekybiniai vertinimo metodai. Ši strategija yra paprasta ir labai efektyvi vertinant požymius, kurie pasižymi aukštu paveldimumu, pvz. mėsos kokybės rodikliai. Tačiau tradiciniai genetinio gerinimo būdai turi ir trūkumų, kaip antai, kiekvienas veisimo ciklas užtrunka ilgą laiko tarpą, pvz. kuilių ir paršavedžių subrendimo amžius, dienos, kai paršavedės ar kiaulaitės nėra paršingos ar laktuojančios. Be to, vykdant tradicinę selekciją, daugelis potencialių naudingų genų nėra nustatomi arba nėra efektyviai išnaudojami. Dar daugiau, intensyvūs pasikeitimai gamyboje, plataus masto sveikatingumo, produkcijos ir reprodukcijos standartizavimas bei didesni reikalavimai mėsos kokybei, reikalauja naujų galimybių, kurios padėtų identifikuoti ir atrinkti gyvulius, turinčius geriausius genus bei leistų vykdyti selekciją tik pagal tam tikrą genotipą. Atsižvelgiant į tai, paskutiniu dešimtmėčiu kiaulių genetikoje padidėjo susidomėjimas naujų molekulinį bei skaičiavimo metodų taikymu bei jų panaudojimu veislininkystėje.

Žemės ūkio gyvulių genomų tyrimai sudarė sąlygas žemės ūkio gyvulių genetinių žemėlapių sudarymui, o jų palyginimas leido atlikti genų, susijusių su kiekybinių požymių lokusais, paiešką. Gyvulių genomo genetiniai žemėlapiai buvo pritaikyti atliekant kelių lokusų sąsajų, lokusų ir genų, susijusių su kiaulių ekonomiškai naudingų požymių, tokių kaip augimas, mėsos kokybė, raumeningumas, reprodukcija ir sveikatingumas, genetinio kintamumo tyrimus. Išvardinti pagrindiniai rodikliai yra svarbūs kaip objektas, atliekant kiaulių genetinius tyrimus (Ellegren *ir kt.*, 1994; Archibald *ir kt.*, 1995; Rohrer *ir kt.*, 1994 and 1996).

Nežiūrint į tai, nustatytų kiekybinių požymių lokusų skaičius vis dar yra nedidelis, o nustatytų atskirų genų, kurie yra identifikuoti kaip atsakingi už kiekybinius požymius skaičius - dar mažesnis. Nustatyti pavieniai genai, susiję su kiekybinių požymių lokusais, įtraukiami į veisimo programas, derinant juos su įprastiniais fenotipiniais selekciniais metodais - atliekant gyvulių selekciją genetinių žymenų pagalba (MAS). Toks kombinuotas populiacijos selekcijos būdas daug efektyvesnis ir rezultatai pasiekiami per trumpesnę laiko tarpą.

Genetinių žymenų, kurie gali būti panaudoti selekciijoje, paieška yra pagrįsta dvejomis strategijomis: kiekybinių požymių lokuso kartografavimu ir potencialių genų įtakos nustatymu. Kiekybinių požymių lokusų paieška, atliekant pilną genomo skenografiją, yra apibūdinama kaip chromosomų segmentų, kuriuose yra lokalizuoti kandidatiniai genai, atsakingi už požymį, tyrimas, nenustatant konkretaus geno ar mutacijos. Kandidatinio geno tyrimo

būdas yra parankus, kadangi yra tiriami vienas ar keletas konkrečių genų, kurie, manoma, turi įtakos tiriamiems požymiams (Stratil ir Geldermann, 2004).

Darbo tikslas:

Ištirti MHS geno, sąlygojančio kiaulių stresinį sindromą, paplitimą Lietuvos baltųjų kiaulių populiacijoje bei įvertinti melanokortino 4 receptoriaus (MC4R) geno polimorfiškumą ir nustatyti šių genetinių žymenų ryšį su produktyvumo savybėmis.

Uždaviniai:

1. Nustatyti MHS geno paplitimą bei jo įtaką produktyvumo požymiams Lietuvos baltųjų kiaulių populiacijoje.
2. Ištirti MC4R geno polimorfizmą Lietuvos baltųjų kiaulių veislėje naudojant sumodeliuotus pradmenis pagal geno seką bei įvertinti geno dažnio skirtumą tarp populiacijų.
3. Ištirti MC4R geno įtaką augimo greičiui ir skerdenos sudėtinėms dalims Lietuvos baltųjų kiaulių veislėje.
4. Įvertinti išplėstą analizės tyrimų modelį ir metodą vertinant genetinių žymenų ryšį su produktyvumo savybėmis Lietuvos baltųjų kiaulių veislėje.

Darbo naujumas:

Atlikta kiaulių genetinių žymenų (MHS ir MC4R genų) bei jų ryšio su produktyvumo savybėmis analizė Lietuvos baltųjų kiaulių populiacijoje.

Praktinis pritaikymas:

Atliktas Lietuvos baltųjų kiaulių veislės produktyvumo savybių genetinės įtakos vertinimas tiesiogiai paaiškinantis požymio kiekybinius aspektus ir kiekybinio požymio lokuso ryšį su genetiniu žymeniu, naudojant gyvulių veislines vertes. Gauta informacija bei suformuota strategija genetiniams ryšiams nustatyti gali būti pritaikyta Lietuvos baltųjų kiaulių veislės tolesnei genetiniai charakteristikai.

Naudojant veislines vertes vietoje tiesioginio fenotipinio požymio įvertinimo, sumažėja tiriamo genetinio faktoriaus, įtakojančio vertinamus požymius, paklaida, dėl to gauti rezultatai parodo tikslesnę genetinio žymens, susijusio su kiekybiniu požymio lokusu, įtaką Lietuvos baltųjų kiaulių veislėje. Tai suteikia gyvulių veislininkystės specialistams patikimesnę informaciją bei galimybę geriau pasirinkti tam tikrą selekcijos kriterijų.

Tyrimų metodai

Tiriamasis darbas atliktas Lietuvos veterinarijos akademijoje, Gyvūnų veisimo ir genetikos katedros K. Janušausko gyvūnų genetikos laboratorijoje 2001-2005 metais.

Discussion

MHS gene frequency

Reports on the purebred progeny test conducted and were published by O'Brien, (1993); Houde *et al.* (1993); Mayer *et al.* (1993); Schellander *et al.* (1994); Hardge and Gregor (1995) and Dvorak *et al.* (1997). It was found an overall gene frequency of 0.07 across eight pure breeds and that the MHS gene within breeds ranged from 0.00 for the Chester White breed to 0.43 for the Poland China breed (Goodwin, 1994). In our study, the reason of lower prevalence of MHS in LW-B1 pigs than in LW-M1 is that the LW was improved by introducing Swedish and Finish Yorkshire in 1977 (Šveistys and Razmaitė 1987, Džiaugys *et al.* 1994) with low MHS gene frequency. These results may be related to the incidence of PSS and PSE in these breeds, which are widely used in breeding programmes. However, Swedish Yorkshire animals imported in 1998 were stress resistant with genotype NN (n=23). No difference in MHS gene frequency between Swedish Yorkshire and LW-B1 was observed ($p > 0.05$). Only two individuals (1.3%) were found to be affected among the 704 LW individuals tested.

MHS gene effect on quantitative traits

Performance trait means and best linear unbiased estimates of mean differences between the stress resistant homozygote and heterozygote animals in our study showed that test daily gain (TDG) and lifetime daily gain (LDG) was significantly higher in animals with genotype NN. Goodwin *et al.* (1994) estimated differences between 1298 NN and 181 Nn MHS genotypes in numerous performance and carcass traits and showed that the observed NN animals had superior ($p < 0.05$) average daily gain (ADG) over carriers. Christian and Rothschild (1981) found similar average daily gain. Jensen and Barton-Gade (1985) evaluated growth and carcass traits in Danish Landrace pigs of all MHS genotypes and found that normal pigs had higher average daily gain (ADG) ($p < 0.05$) than Nn or nn pigs. The results are also in agreement with Bastos *et al.* (2001) in that the presence of the *n* allele correlates with carcass traits. However, the results were contrary to those of Simpson and Webb (1989), Sather *et al.*, (1991), Pommier *et al.* (1992), Zhang *et al.* (1992), Leach *et al.* (1996) and Favero (1997) who observed a faster growth of the pigs with the presence of the *n* allele than of those without this allele. The genotype difference in feed efficiency was also observed that the animals with genotype NN consumed less feed compared with nn genotype. The results are in agreement with those of Christian and Rothschild (1981) and Jensen and Barton-Gade (1985) who found higher feed consumption in normal pigs compared with pigs having genotype Nn or nn. The results are contrary to the studies of Leach *et al.* (1996) and McPhee *et al.* (1994) who reported a feed efficiency advantage for carriers over the negative pigs. However, Eikelenboom *et al.* (1980) and Jensen and Barton-Gade (1985) did not observe any effect of the MHS gene on feed

on test daily gain with 3.2 %, backfat thickness with approximately 4 % and lean meat percentage with approximately 5 % of the total phenotypic variation. For multiple testing (among three genotypes), Bonferroni's test was applied to obtain statistically significant differences between three genotypes and to avoid false positive results (Type I error). *p* value indicates the probability of getting a mean difference between the genotypes as high as it is observed by chance. The genotypic means and means of the population as well as the deviation from the means from different MC4R genotypes for the analyzed performance traits are shown in Table 5 and Table 6.

The results after Bonferroni's correction indicate that homozygote animals with genotype Asn/Asn differed significantly from heterozygotes Asp/Asn and gained approximately 50 gram a day. The efficiency of feed consumption was also higher in animals with genotype Asn/Asn and they consumed 0.28 ± 0.096 kg less feed than heterozygotes. Approximately, 4 cm² in loin muscle area, 3 mm in loin muscle thickness and 2.7 lean meat percents differed significantly between two homozygote animals. MC4R genotype groups were also different in backfat thickness with fatter animals with Asp/Asp genotype measured in different points. However, only backfat thickness at 10th rib approached significance with 4.9 ± 1.8 less backfat deposition in animals with Asn/Asn genotype. Backfat thickness evaluated by using PIGLOG 105 (SSK Technology, Denmark) at the FAT-1 and FAT-2 points differed significantly between two homozygote animals, also producing approximately 2.3 and 2.4 mm less backfat of Asn/Asn genotype, respectively. Significant differences between heterozygotes and homozygote animals for the allele Asn of these traits were also observed.

MC4R genotype group comparison-wise analysis with estimated breeding values of the traits demonstrated deviation differences from overall population mean between two homozygote genotypes with increased weight gain of 22.3 ± 9.5 ($p=0.062$) for Asn/Asn for test daily gain trait. Genotypes Asp/Asn and Asn/Asn differed significantly ($p=0.046$) with 22.2 ± 9.1 more weight gain for Asn/Asn genotype. It was demonstrated that Asn/Asn homozygote pigs had 0.045 ± 0.03 kg higher feed conversion ratio than homozygote ones for allele Asp298 but the result was not significant. However, pigs with Asn/Asn genotype had 0.065 ± 0.03 kg higher feed efficiency than heterozygote pigs ($p=0.065$), indicating that mutant allele Asn has a property to increase feed conversion ratio in the population. Differences between two homozygotes revealed significance ($p=0.02$) with 0.9 ± 0.3 mm less backfat thickness at 10th rib in Asn/Asn genotype animals. Homozygotes for the allele Asn298 also differed significantly ($p=0.032$) from heterozygote animals, producing 0.8 ± 0.3 mm less fat deposition. Animals with genotype Asn/Asn produced 0.98 ± 0.3 ($p=0.007$) and 0.86 ± 0.3 ($p=0.013$) more lean meat percentage than homozygotes for allele Asp298 and heterozygote animals, respectively.

Kiaulių atranka pagal MHS geną

Kiaulių stresinį sindromą sąlygojantis genas (MHS) tirtas trijose Lietuvos baltųjų kiaulių tipuose (LB, LB-M1 ir LB-B1) bei Vokietijos landrasų ir Švedijos jorkšyrų kiaulių veislėse. Vokietijos landrasų ir Švedijos jorkšyrų veislių gyvuliai tyrimams atrinkti todėl, kad šios veislės buvo panaudotos kuriant LB-M1 ir LB-B1 tipus (Šveistys ir Razmaitė, 1987; Songailienė-Varkalienė, 1989; Džiaugys ir kt., 1994).

Kiaulių stresinis sindromas yra paveldimas, todėl galima prognozuoti, kaip jis bus perduodamas palikuonims. Poruojant tarpusavyje stresui atsparius (NN) paršavedę ir kuilį, jų palikuonys bus stresui atsparūs (NN). Jeigu vienas iš tėvų yra šio geno nešiotojas (Nn), tai palikuonių išsiskyrimas yra vienodas: 0,5 stresui atsparūs (NN) ir 0,5 šio geno nešiotojai (Nn). Kai abu tėvai yra Nn genotipo, tai palikuonys turės 0,25 stresui atsparių (NN), 0,50 geno nešiotųjų (Nn) ir 0,25 stresui jautrių (nn). Kai vienas iš tėvų yra stresui jautrus (nn), kitas nešiotojas (Nn), tai palikuonių pasiskirstymo santykis tarp geno nešiotųjų (Nn) ir stresui jautrių (nn) yra lygus 0,5. MHS paveldimumo informacija yra svarbi vykdant gyvulių paranką ir eliminuojant MHS geną iš populiacijos. Žinant MHS geno pasiskirstymą palikuonyse nėra būtina atlikti visų gyvulių genotipavimą. Lietuvos baltųjų kiaulių populiacijoje MHS eliminavimas iš populiacijos buvo atliekamas pagal gyvulių geneologinę informaciją, genotipuojant veislines paršavedes ir veislinius kuilius bei kiaulaites ir kuiliukus pakaitai.

Gyvulių parinkimas

MHS geno diagnostikai buvo atrinkta 475 grynaveislių Lietuvos baltųjų, 153 - LB-M1, 76 - LB-B1 bei 144 grynaveislių Vokietijos landrasų ir 23 Švedijos jorkšyrų veislių veisliniai gyvuliai. MC4R geno įtakos tyrimams iš 16539 LB kiaulių populiacijos buvo atrinkta 207 gyvuliai, kurie įvertinti kiaulių kontrolinio penėjimo stotyje ir veislynuose. Eksperimentinė gyvulių grupė buvo sudaryta iš giminingų gyvulių, kurių įvertinti kuiliai sudarė apie trečdalį visų LB populiacijos vertinamų kuilių.

Duomenų analizė

Pagal patvirtintą Valstybinės kiaulių veislininkystės stoties Lietuvos baltųjų kiaulių veislės vertinimo modelį genetinis multivariacinis gyvulių vertinimas atliktas apjungus palikuonių duomenis, gautus iš Valstybinės kiaulių kontrolinio penėjimo stoties ir veislynų. Požymiai, pagal kuriuos yra atliekamas LB kiaulių veislės genetinis gerinimas, yra šie: paros priesvoris stotyje, g (TDG), pašarų įsisavinimas, kg/kg (FCR), nugaros lašinių storis, mm (BF), paros priesvoris veislyne, g (LDG), raumeningumas, % (Meat %). Požymių veislinės vertės buvo įvertintos PEST (Groeneveld, 2001) ir VCE (Groeneveld, 1998) statistiniais paketais pagal žemiau pateiktą statistinį modelį ($n=16539$):

$$Y_{ijk} = \mu + b_o + ysh_i + sex_j + litter_l + animal_k + e_{ijk},$$

kur:

Y_{ijk} = įvertintas požymis (TDG, FCR, BF, LDG, Meat %),

μ = požymio vidurkis populiacijoje,

ysh_i = požymio atsitiktinis i-asis jungtinis metų, sezono ir ūkio efektas,

įvertintas ūkyje ir fiksuotas jungtinis metų ir sezono efektas, nustatytas kontrolinio penėjimo stotyje,

sex_j - fiksuotas j-osios lyties efektas,

$litter_l$ = atsitiktinis l-osios vados efektas,

$animal_k$ = adityvinis-genetinis k-tojo gyvulio efektas (visiems požymiams),

b_o = gyvo svorio regresija vertinta nugaros lašinių storiui,

e_{ijk} = likutinė paklaida.

MHS ir MC4R žymenų įtakai kiekybiniais požymiams nustatyti naudota vienfaktorinė dispersinė analizė (ANOVA). Tiriamųjų kintamųjų dispersijos (σ) tarp genotipų grupių nustatytos Livyno testu. Esant grupių nehomogeniškumui, duomenų analizei taikyta ir neparametrinė ANOVA – Kruskalo-Voliso (Kruskal-Wallis) ranginis kriterijus. p reikšmės paskaičiuotos asimptotiniu aproksimaciniu metodu. Dviejų genotipų grupių vidurkių skirtumų palyginimui taikytas nepriklausomų imčių Stjudento t kriterijus, o atliekant daugkartinius genotipų imčių vidurkių lyginimus buvo taikytas daugkartinis aposteriorinis (*post hoc*) Bonferonio kriterijus. Skaičiavimai atlikti naudojant SPSS 12. Taikytų statistinių kriterijų galingumo analizė atlikta STATISTICA 6 programa. Paskaičiuotas nuokrypis nuo Hardy-Weinberg'o pusiausvyros dėsnio ir pagal 2×2 atsitiktinio grupavimo testą įvertintas geno dažnio skirtumas tarp veislių. Tikrinant statistines hipotezes, pasirinktas reikšmingumo lygmuo (α) buvo 0,05.

Rezultatai

Genetiniai parametrai

Veislės individų vertinimo pagal kiekvieną požymį, tokių kaip paros priesvoris stotyje, pašarų sąnaudos 1 kg priesvoriui, nugaros lašinių storis ties 10-tu šonkauliu, paros priesvoris veislyne ir raumeningumo procentas, rezultatai pateikti 1 lentelėje, nurodant kiekvieno požymio paveldėjimo koeficientą (paryškinta, diagonalė) ir kiekvieno požymio genetinius skirtumus (virš diagonalės). Požymių paveldėjimo koeficientai atitinka Didžiosios Baltosios kiaulių veislės paveldėjimo koeficientus (Groeneveld ir kt., 1996, Nakavisut ir kt., 2003), tačiau raumeningumo procentas ir nugaros lašinių storis yra mažesni negu kitų kiaulių veislių (Peskovicova ir kt., 2002). Tai gali būti paaiškinta

aproximately 40 animals with genotype Nn to detect significant differences (α 0.05) between genotypes for backfat thickness and lean meat percentage.

MC4R gene in the population

The genotype frequencies in all tested animals were counted after digestion of the PCR products with *TaqI* restriction enzyme and separation of the DNA fragments on the agarose gel. There was a polymorphism at the position 298 in the melanocortin 4 receptor gene, where changes from G to A in the DNA sequence result into a substitution of an amino acid from Asp to Asn. The G/A polymorphism is recognized by the *TaqI* restriction enzyme. In wild type (G nucleotide or Asp 298 residual) the enzyme cuts the PCR product into 407-bp and 76-bp fragments), while in the mutant type (A nucleotide or Asn 298 residual) there is absence of the *TaqI* cleavage site, resulting into one single 483-bp fragment (Figure 1). The allele frequencies were 0.59 for the wild type Asp298 and 0.41 for the mutant type Asn298, respectively (Table 4). The LW population showed no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($\chi^2 = 0.008$, with 2 df, p -value = 0.996). Allele frequencies of the MC4R gene and genetic differences between the populations by using χ^2 contingency test showed no significant deviation (chi-square test 0.314 with 1 df, $p=0.575$) from the Large White population presented in Kim research (Kim *et al.*, 2000b). However, alleles Asp298 and Asn298 showed highly significant deviation from the Landrace breed ($\chi^2=35.6$, 1df, $p \leq 0.001$), two synthetic pig lines C ($\chi^2=331.6$, 1df, $p \leq 0.001$) and D ($\chi^2=57.36$, 1df, $p \leq 0.001$) and the Meishan breed ($\chi^2=434.86$, 1df, $p \leq 0.001$). Highly significant differences were observed between LW population and two Portuguese pig breeds: Alentejano breed ($\chi^2=200.4$, 1df, $p \leq 0.001$) and Bisaro breed ($\chi^2=182.3$, 1df, $p \leq 0.001$). The differences between allele frequencies were also observed comparing LW and two Romania Red Mangalitsa and Baznu pig breeds. Observed significant differences from LW were $\chi^2=12.42$ with df 1, $p \leq 0.001$ and $\chi^2=7.07$, with df 1, $p \leq 0.001$, respectively. The χ^2 contingency test used to estimate the differences between the breeds regarding gene frequency suggests that differences in gene frequency explained some of the phenotypic variation in several of the traits that differentiate the breeds.

MC4R gene association analysis

The LW animals were tested to be free from the MHS, thus, excluding the effect of this locus on the investigated traits. The results obtained by using single measurements of the traits showed that the effect of the MC4R gene had a significant effect on the loin muscle area with 11.7 %; loin muscle thickness with 5.2%; lean meat percentage with 7.4 %; backfat at 10th rib with 6.8 %; FAT-1 with 6.6 %; FAT-2 with 6.5 %; test daily gain with 6.4 %; feed conversion ratio with 8.1 % total phenotypic variations, but a non-significant effect for the other traits. Single marker analysis with the estimated breeding values revealed no significant association of MC4R gene with feed conversion ratio and lifetime daily gain, however, we found a statistically significant effect

Results

Genetic parameters

The results of the individual breed analysis of each trait and genetic differences between growth rate traits - test daily gain, feed conversion ratio, lifetime daily gain and carcass composition, backfat thickness at 10th rib and lean meat percentage are presented in Table 1. Test daily gain (TDG) is highly heritable, compared to the lifetime daily gain (ADG). Feed conversion ratio (FCR) and lean meat percentage are both moderately heritable. Backfat depth at the 10th rib (BF) showed low heritability. Important correlations exist for growth and carcass traits. There are adverse relationships between growth (TDG, LDG and FCR) and carcass (BF and Meat %) traits. A desirable relationship exists between BF and FCR and Meat%. However, a negative relationship has been observed between LDG, BF, and an undesirable relationship was observed between TDG and BF.

Analysis of the MHS gene in the population

The stress susceptible allele of the MHS gene was found in all studied populations (Table 2). The frequency of the stress susceptible allele in LW pigs was 0.014, in LW-M1 0.144 and in LW-B1 0.033, respectively. The frequency of a MHS recessive allele in the total sample was 0.044. The highest frequency of MHS gene carriers was found in LW-M1 (36%) and lowest in LW (2.7%). Seven percent of LW-B1 animals were found to be heterozygous as well. In the total sample the frequency of heterozygous MHS gene carriers was 0.082, homozygous non-carriers 0.915 and the frequency of homozygous stress affected animals was 0.003, respectively. All breeds as well as the total population showed no significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Among the 144 German Landrace animals genotyped, the stress susceptible allele was detected at the frequency of 0.17. A frequency of homozygous stress resistant genotype was 0.649, of heterozygote 0.278 and of homozygous recessive genotype was 0.028, respectively.

MHS gene association analysis

F statistic results showed that the overall effect between MHS genotypes had a significant effect on test daily gain (3.5 %); feed conversion ratio (3.7 %) and lifetime daily gain (2.3 %), but a non-significant effect on the backfat at the 10th rib and lean meat percentage. The mean values for the two genotypes were analyzed on assumption of equality of variances for both genotype groups and normality distribution for all traits. Stress resistant (NN) pigs had a higher test daily gain: 28.98 ± 10.13 ($p < 0.01$) and lifetime daily gain: 10.15 ± 4.37 ($p < 0.05$) as well as better feed consumption: -0.01 ± 0.034 ($p < 0.01$), in comparison with carrier (Nn) pigs (Table 3). The non-significant differences between the MHS genotypes for backfat thickness and lean meat percentage might be attributed to smaller sample size of Nn genotype. Therefore, we performed power calculation for sample size. Power of ≥ 80 % can be achieved with the sample size of

skirtingais vertinimo metodais, atliekamais veislinėse fermose ir Valstybinėje kiaulių veislininkystės stotyje.

1 lentelė. Požymių paveldėjimo koeficientai ± SE (paryškinta, diagonalė) ir genetinės koreliacijos ± SE (virš diagonalės) tarp požymių, nustatytos VCE programa (Groeneveld, 1998), n = 16 539.

Table 1. Heritability coefficients ± SE (bold, diagonal) of the traits and genetic correlations ± SE (above diagonal) between the traits estimated with VCE (Groeneveld, 1998) for the entire data set of performance records (n = 16 539).

Požymis (Trait)	TDG	FCR	BF	LDG	Meat %
TDG	0,583 ± 0,024	-0,693 ± 0,018	0,148 ± 0,044	0,302 ± 0,077	0,098 ± 0,052
FCR		0,305 ± 0,018	0,078 ± 0,038	-0,288 ± 0,085	-0,172 ± 0,026
BF			0,163 ± 0,012	-0,147 ± 0,041	-0,810 ± 0,046
LDG				0,110 ± 0,007	0,210 ± 0,012
Meat %					0,292 ± 0,012

TDG: paros priesvoris stotyje, g (test daily gain in g/day); FCR: pašarų sąnaudos, kg/kg (feed conversion ratio in kg/kg); BF: nugaros lašinių storis ties 10-tu šonkauliu, mm (backfat at 10th rib in mm); LDG: paros priesvoris veislyne, g (lifetime daily gain in g/day); Meat %: raumeningumas (lean meat percentage).

Pagal lentelėje pateiktus rezultatus, augimo požymis – paros priesvoris stotyje (TDG) turi aukštą paveldėjimo koeficientą (0,583) lyginant su paros priesvoriu veislyne (LDG) (0,110). Pašarų sąnaudos (FCR) ir raumeningumo procentui nustatytas vidutinis paveldėjimo koeficientas, atitinkamai 0,305 ir 0,292. Riebalų atsidėjimas, matuotas ties 10-tu šonkauliu, parodė žemą paveldėjimo koeficientą. Svarbi genetinė koreliacija buvo nustatyta tarp augimo ir skerdenų sudėtinių dalių. Taip pat buvo nustatytas neigiamas koreliacinis ryšys tarp augimo (TDG, LDG ir FCR) ir skerdenų sudėtinių dalių (BF ir Meat %) požymių, pageidaujamas ryšys tarp BF ir FCR ir Meat % požymių, o taip pat neigiamas ryšys tarp LDG ir BF bei nepageidaujamas ryšys tarp TDG ir BF.

Genų analizė populiacijoje

MHS genas

LB kiaulių veislėje buvo nustatytas MHS geno genotipų dažnių pasiskirstymas tirtų gyvulių tarpe (2 lentelė). Nustatyta, kad LB kiaulių veislėje kiaulių stresinį sindromą sukeliančio geno dažnis buvo 0,014, LB-M1 – 0,144 ir

LB-B1 – 0,033. Bendras recesyvaus alelio dažnis 0,044. Dažniausiai kiaulių stresinį sindromą sukeliančio geno alelis aptiktas heterozigotinėje formoje. Didžiausias MHS geno nešiotojų dažnis nustatytas LB-M1 (36 %) ir mažiausias - LB (2,7 %). LB-B1 kiaulių tipas turėjo 7 % šio geno nešiotojų. Tiriant gyvulius nustatyta, kad heterozigotų dažnis buvo 0,082, homozigotų normalių – 0,915 ir homozigotų stresui jautrių – 0,003. Įvertinus galimą genotipų pasiskirstymo laipsnį pagal Hardy-Weinberg'o dėsnį, visose tirtose veislėse nustatyta šio geno pusiausvyra. LB-M1 tipo, sukurto ilyjeus Vokietijos landrasų kraujo, gyvuliai turi ne tik dažnesnį heterozigotinį, bet ir stresui jautrų genotipą, ir, tiek pagal genotipą, tiek pagal recesyvaus alelio dažnį, yra panašesni į Lietuvoje veisiamus Vokietijos landrasus negu į grynaveislį Lietuvos baltųjų kiaulių tipą.

2 lentelė. Kiaulių stresinio sindromo genotipų pasiskirstymas (n=704) bei recesyvaus alelio n dažnis Lietuvos baltųjų kiaulių veislėje bei jos tipuose.

Table 2. Distribution of the pigs (n=704) according to MHS genotype and stress susceptible allele frequency in Lithuanian White populations.

Veislė (Breed)	n	Genotipas (Genotype)			Stresui jautraus alelio dažnis (Stress susceptible allele frequency)
		NN	Nn	nn	
LB	475	462	13	-	0,014
LB-M1	153	111	40	2	0,144
LB-B1	76	71	5	-	0,033
Suma (Total)	704	644	58	2	0,044
Vokietijos landrasai (German Landrace)	144	100	40	4	0,167
Švedijos jorkšyrai (Swedish Yourkshyre)	23	23	-	-	0

Paiškinimas: NN – stresui atsparūs gyvuliai (stress resistant animals); Nn – streso geno nešiotojai (stress gene carriers); nn – stresui jautraus genotipo gyvuliai (stress susceptible animals).

MHS geno ryšys su produktyvumo savybėmis

Geno, sukeliančio kiaulių stresinį sindromą, įtaka kiaulių produktyvumui buvo paskaičiuota ir įvertinta pagal gyvulių veislines vertes. Ištirta 230 gyvulių, iš kurių 220 kiaulių nustatytas stresui nejautrus genotipas NN ir 10 gyvulių - heterozigotinis genotipas. Stresui jautrus (nn) genotipas nebuvo nustatytas. Pagal

tested), LW-M1 (153), LW-B1 (76), German Landrace (144) and Swedish Yorkshire (23). German Landrace and Swedish Yorkshire animals were genotyped, as these breeds had influence on the formation of the LW-M1 and LW-B1 breeds as well as on a total LW population (Šveistys and Razmaite 1987, Songailienė-Varkalienė 1989, Džiaugys *et al.* 1994). Elimination of animals in which the MHS gene was detected from the breeding programme was performed according to the pedigree information scheme (Šveistys, 1982).

Sampling of Animals

Two hundred thirty animals were available for an association analysis. There were 220 homozygote stress resistant pigs and 10 heterozygote pigs with estimated breeding values for the performance traits for each animal separately. The data set used for the MC4R association study comprised 207 randomly chosen fattening pigs from the 16,539 LW. Among the genotyped pigs, records for animals were obtained from the State Pig Test Station and on-farm tests. The experimental group of markers consisted of full- and half-siblings.

Data analysis

The multivariate animal model for genetic evaluation of LW pigs combined data from progeny testing stations and breeding farms. The following traits were analyzed: test daily gain (TDG), feed conversion ratio (FCR), backfat at the 10th rib (BF), lifetime daily gain (LDG), lean meat percentage (Meat %). The breeding values were estimated using the software packages PEST (Groeneveld 2001) and VCE (Groeneveld 1998) applying the following model (see page 3) for the entire data set of 16,539 pigs. The effect of bi-allelic marker polymorphism on the quantitative performance traits was analyzed with one-way ANOVA approach by using two data types: single measurements of traits for MC4R gene and breeding values estimated from the entire data set for genotyped animals for MHS and MC4R genes. The homogeneity of the variances was evaluated with the Levene test. To account inhomogeneous variances, a non-parametric Kruskal-Wallis rank-sum test was used to analyze the effect of the genotype on performance parameters. *p*-values were obtained by using an asymptotic approximation method. T test procedure was used to compare means for two groups of genotypes and post hoc pairwise comparisons between genotypes were performed by using Bonferroni adjustment. All statistical tests were carried out using SPSS (Statistical Package for Social Sciences) package version 12.0 for Windows. The power calculation for sample size was tested by using STATISTICA 6 package. The χ^2 test was used to compare the observed allele and genotype frequencies with Hardy-Weinberg equilibrium assumption. The comparison of allele frequencies between the LW and other breeds/lines was evaluated by a 2×2 contingency table. Differences were considered to be significant if *p*-value <0.05.

there has been increase in the interest to apply a wide range of new molecular genetic tools and computational technologies in pig genetics.

In this study we focused on investigation of two genetic markers in Lithuanian White pig population. Therefore, **the aim** of this study was to evaluate the prevalence of MHS gene in Lithuanian White pig population and investigate polymorphism of melanocortin 4 receptor (MC4R), and also to evaluate the association of pig genetic markers (MHS and MC4R) with performance traits. This work was initiated with **the following tasks**:

1. To evaluate the level of prevalence rate and association between MHS gene and performance traits in Lithuanian White pig population.
2. To investigate the polymorphism of the melanocortin 4 receptor gene (MC4R) in Lithuanian White pig breed by using designed primers based on the gene sequence and to characterize the differences among breeds.
3. To investigate the effect of MC4R gene on growth rate and carcass traits in the Lithuanian White pig breed.
4. To evaluate the extended study design and the method of analysis for genetic association studies on performance traits of the Lithuanian White pig breed.

The novelty of the study:

The study presents evaluation of pig genetic markers (MHS and MC4R) associated with performance traits in the Lithuanian White pig breed.

Practical importance:

The study presents a direct approach the testing and explanation of the quantitative part of the trait and QTL with marker based on estimated breeding values in the Lithuanian White population. Information about the strategies for association analysis and improvement can be applied for further characterization of the Lithuanian White population.

The use of breeding values instead of single measurements reduces the bias in the recorded performance traits, therefore, the results obtained by using the marker for the Lithuanian White population gives animal breeders the opportunities for realization of a short-term goal in their selection criteria.

Materials and methods

Malignant hyperthermia syndrome gene

Malignant hyperthermia syndrome (MHS) gene screening and polymorphism evaluation was based on the data collected from three types of populations (LW, LW-M1 and LW-B1). Animals were selected from the main herds and insemination stations of Lithuania. For the MHS gene testing, 871 pigs were sampled from the breeding farms and insemination stations: LW (475 animals

F-statistikos rezultatus nustatyta, kad MHS genas turėjo statistiškai reikšmingą įtaką priešvoriui per parą stotyje (3,5 %), pašarų sąnaudoms 1 kg svorio priaugti (3,7 %) ir priešvoriui per parą veislyne (2,3 %), tačiau nugaros lašinių storiui, matuotam ties 10 šonkauliu, ir raumeningumo procentui, įvertintam PIGLOG 105 (SSK Technology, Danija) aparatu, nustatyta statistiškai nereikšminga labai maža požymių variacija. Bendras populiacijos vidurkis ir kiekvieno genotipo nukrypimas nuo populiacijos vidurkio bei reikšmių skirtumai tarp dviejų genotipų pateikti 3 lentelėje. Reikšmės analizuotos įvertinus, kad dviejų genotipų dispersijos nesiskiria ir požymių pasiskirstymas yra normalus.

Nustatyta, kad stresui nejautrios kiaulės (NN) stotyje priaugo $28,98 \pm 10,13$ ($p < 0,01$) ir veislyne $10,15 \pm 4,37$ ($p < 0,05$) daugiau bei pasižymėjo mažesnėmis pašarų sąnaudomis $-0,01 \pm 0,034$ ($p < 0,01$), lyginant su šio geno nešiotojais. Šie gyvuliai taip pat turėjo plonesnį nugaros lašinių sluoksnį, tačiau skirtumas nebuvo statistiškai reikšmingas ($p > 0,05$). Raumeningumo procentui tarp genotipų taip pat nepastebėtas reikšmingas skirtumas ($p > 0,05$). Nereikšmingas skirtumas tarp genotipų, vertinant nugaros lašinių storį ir raumeningumo procentą, gali būti paaiškintas mažu heterozigotų (Nn) gyvulių skaičiumi. Taikytų statistinės analizės kriterijų galingumas, vertinant šiuos požymius, taip pat buvo žemas ≈ 30 %. Norint nustatyti reikšmingus skirtumus tarp dviejų genotipų, galingumas turi būti žymiai didesnis (≥ 80 %). Atlikus galingumo skaičiavimus, kai požymių pasiskirstymas normalus, nustatyta, kad, esant tokiai pačiai požymių tendencijai, reikšmingi skirtumai ($\alpha 0,05$) tarp genotipų grupių būtų, jeigu heterozigotų skaičius siektų apie 40.

3 lentelė. Populiacijos vidurkiai ir MHS genotipų vidurkių ($\pm$ SE) nukrypimas nuo bendro populiacijos vidurkio tirtiems požymiams.

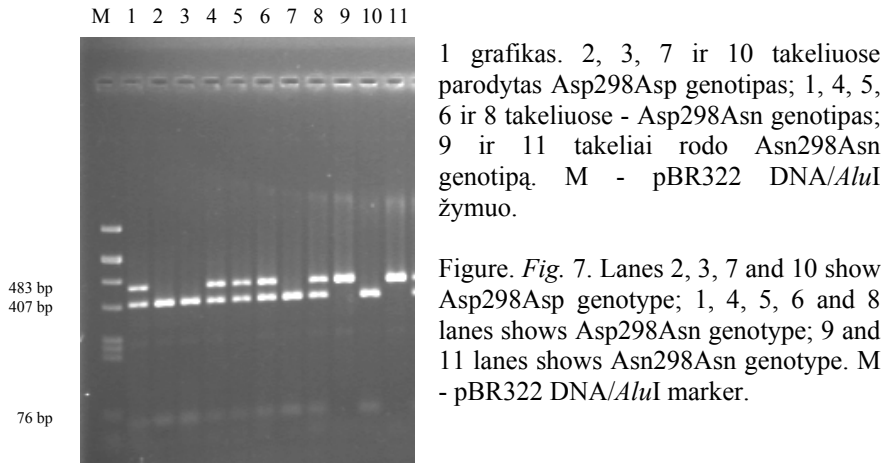
Table 3. Population means and deviation of MHS genotype means ($\pm$ SE) for the analyzed traits (estimated breeding values).

Požymis (Trait)	μ_{pop}	MHS genotipo nukrypimas (deviation of genotype)		t	p
		NN	Nn		
TDG (g)	729,1	4,51 $\pm$ 2,10	-24,47 $\pm$ 11,68	2,86	0,005
FCR (kg/kg)	3,55	-0,017 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,03	2,96	0,003
BF (mm)	22,5	-0,06 $\pm$ 0,09	0,60 $\pm$ 0,29	1,50	0,136
LDG (g)	464,7	0,01 $\pm$ 0,93	-10,14 $\pm$ 2,08	2,32	0,021
Meat (%)	53,2	0,09 $\pm$ 0,09	-0,56 $\pm$ 0,27	1,51	0,132

Paaiškinimas: TDG: paros priešvoris stotyje, g (test daily gain in g/day); FCR: pašarų sąnaudos, kg/kg (feed conversion ratio in kg/kg); BF: nugaros lašinių storis, mm (backfat at 10th rib in mm); LDG: paros priešvoris veislyne, g (lifetime daily gain in g/day); Meat %: raumeningumas (lean meat percentage).

MC4R genas

Vertinant genotipų variantų pasiskirstymo dažnį, atlikus PGR *TaqI* genotipavimą (1 grafikas), nustatyta, kad Asp298Asp homozigoto laukinio tipo dažnis LB veislėje yra 0,343, homozigoto mutantinio tipo Asn298Asn dažnis – 0,169, o heterozigoto Asp298Asn dažnis – 0,488. Laukinio Asp298 alelio dažnis – 0,59, o mutantinio alelio Asn298 dažnis – 0,41 (4 lentelė). Ketvirtoje lentelėje taip pat pateikti ir kitų autorių šio geno variantų dažnių tyrimai įvairiose kiaulių veislėse.



Pagal Hardy-Weinberg'o dėsni nustatyta, kad LB populiacijoje alelių dažniai yra pusiausvyroje ($\chi^2 = 0,008$, 2 l.l., p reikšmė = 0,996). Pagal atsitiktinio dažnių pasiskirstymo testą nustatyta, kad LB populiacija nesiskyrė nuo DB veislės (chi-kvadrato testas 0,314 su 1 l.l., $p=0,575$), tačiau didelis skirtumas nustatytas tarp LB ir Landrasų kiaulių veislės ($\chi^2=35,6$, 11.l., $p\leq 0,001$), dviejų sintetinių kiaulių linijų C ($\chi^2=331,6$, 11.l., $p\leq 0,001$) ir D ($\chi^2=57,36$, 11.l., $p\leq 0,001$) bei Meishan kiaulių veislės ($\chi^2=434,86$, 11.l., $p\leq 0,001$). Taip pat nustatytas didelis LB skirtumas, lyginant su portugalų kiaulių veislėmis: Alentejano veislės ($\chi^2=200,4$, 11.l., $p\leq 0,001$) ir Bisaro veislės ($\chi^2=182,3$, 11.l., $p\leq 0,001$). Alelių skirtumai taip pat nustatyti, lyginant LB veislę ir dvi Rumunijos veisles: "Red" Mangalitsa ($\chi^2=12,42$ l.l. 1, $p\leq 0,001$) ir Baznu ($\chi^2=7,07$, l.l. 1, $p\leq 0,001$) kiaulių veisles. Atsitiktinio grupavimo testas naudojamas įvertinant genų dažnių skirtumus tarp veislių. Nustatyti genų dažnių skirtumai gali būti paaiškinti veislių fenotipiniais skirtumais, kurie lemia veislių savitumą bei skirtingą selekcijos kryptį.

3. Rekomenduojama atlikti Lietuvos baltųjų kiaulių veislės genetinę charakteristiką, naudojant nustatytus genetinius žymenis (pvz., susijusius su augimu ir skerdenų struktūra, mėsos kokybe, reprodukcijos požymiais bei sveikatingumu), taip pat suformuoti selekcijos ir ekonominis modelius, vertinant naudą ir išlaidas, susijusias su kiekvienu genu ar genetiniu žymeniu.

Disertacijos tema paskelbtų mokslo darbų sąrašas

List of publications

1. Jokubka R., Miceikienė I. Streso geno paplitimas tarp Lietuvos veislininkystės įmonėse veisiamų kuilių // Veterinarija ir zootechnika. ISSN 1392-2130. Kaunas, 2001, t.14 (36), p.67-72.
2. Jokubka R., Miceikienė I. Polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism screening for the Hal gene in four pig breeds // Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. 2001, Section B, Vol. 55, 237-241.
3. Razmaitė V., Miceikienė I., Jokubka R. Lietuvos baltųjų kiaulių atranka pagal jų atsparumą stresams // LGI mokslo darbai. Gyvulininkystė. ISSN 1392 – 6144. Vilnius, 2001, t.39, 28-33.
4. Jokubka R., Maak S., Kerziene S., Swalve H. H., Association of a melanocortin 4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs (priimtas spaudai į Journal of Animal Breeding and Genetics).

Introduction

Traditional quantitative methods have been applied on pig breeding recording data on a large number of animals based on phenotypic traits of interest, such as growth rate, feed efficiency, lean meat and backfat in order to identify and select genetically superior animals through their own performance and that of their relatives. This strategy is straightforward and highly efficient for highly heritable traits such as meat quality. However, the traditional process of genetic improvement has certain limitations, because each breeding cycle takes a long time, e.g. for the boars and sows the maturity age, the number of days when the sow or gilt is not either pregnant or lactating are important. Furthermore, many potentially useful genes are either not recognised along the traditional selection or are not used effectively. Rapid industrial changes, global standardization of the health, production and reproduction environments, and higher production demands for meat quality require an application of new possibilities for direct identification and selection of animals carrying the best genes and selected on a particular genotype. Therefore, over the last decade

homozigotai pasižymėjo $0,045 \pm 0,03$ kg didesniu pašarų įsisavinimu negu alelio Asp298 homozigotai, tačiau rezultatai nėra statistiškai reikšmingi ($p=0,385$). Kiaulės su genotipu Asn/Asn pasižymėjo $0,065 \pm 0,03$ kg geresniu pašarų pasisavinimu nei heterozigotai ($p=0,065$). Homozigotai pagal alelį Asn298 taip pat skyrėsi reikšmingai ($p=0,032$) nuo heterozigotų, pasižyminčių $0,8 \pm 0,3$ mm mažesniu riebalų atsidedimu. Gyvuliai su genotipu Asn/Asn buvo $0,98 \pm 0,3$ % ($p=0,007$) ir $0,86 \pm 0,3$ % ($p=0,013$) raumeningesni negu Asp298 homozigotai ir heterozigotai.

Išvados:

1. Lietuvos baltųjų kaulių populiacijoje nustatytas žemas MHS geno dažnis ($q=0,044$). Nustatytas MHS geno ryšys su produktyvumo savybėmis parodė, kad NN genotipo gyvuliai pasižymi geresnėmis produktyvumo savybėmis nei šio geno nešiotojai. Rezultatai, tiriant ryšį tarp genotipų ir raumeningumo procento bei nugaros lašinių storio, leidžia teigti, kad yra kitas genas ar genai nei MHS genas, kuris/kurie įtakoja Lietuvos baltųjų kaulių populiacijos raumeningumą bei nugaros lašinių storį.
2. Melanokortino 4 receptoriaus (MC4R) genas Lietuvos baltųjų kaulių veislėje yra polimorfiškas ($p=0,59$). Įvertintas geno dažnio skirtumas tarp kitų veislių leidžia teigti, kad yra fenotipiniai veislių skirtumai bei skirtinga kaulių veislių selekcija, kurios įtakoje atsirado skirtingi šio geno genotipų dažniai.
3. Nustatytas melanokortino 4 receptoriaus lokuso pleotropinis poveikis produktyvumo savybėms: paros priesvoriui (g) įtakoja 3,2 %, pašarų sąnaudoms (kg/kg) 2,6 %, nugaros lašinių storiui (mm) 3 %, raumeningumui (%) 5 %.
4. Kaulių veislinės vertės tikslinga naudoti nustatant genų žymenų įtaką produktyvumo savybėms bei siekiant paaiškinti požymio kiekybinę dalį ir kiekybinio požymio lokuso ryšį su genetiniu faktoriu.

Pasiūlymai:

1. Norint išvengti ekonominių nuostolių bei užtikrinti gyvulių gerovę Lietuvos baltųjų kaulių veislėje bei jos hibriduose, komercinėje kaulių veislininkystėje, MHS genas per motininę Lietuvos baltųjų kaulių veislę neturi būti platinamas. Gyvulius, turinčius šį geną, iš veislinio branduolio nedelsiant reikia eliminuoti. Komercinėje kaulininkystėje didelę veislinę vertę turinčioms paršavedėms, kurios yra MHS geno nešiotjos, reikia parinkti reproduktorius, neturinčius šio geno. Tėvinių linijų, kuriuose nustatyti Nn ir nn genotipai (pvz. pietrėnų veislė), gyvulius poruoti tik su NN genotipo paršavedėmis.
2. Didinant Lietuvos baltųjų kaulių ir komercinių linijų augimo tempą bei skerdenų sudedamųjų dalių genetinį progresą rekomenduojama MC4R geną įtraukti į selekcijos programas.

4 lentelė. MC4R geno genotipų ir alelių dažniai.

Table 4. Genotype and allele frequencies of the analyzed MC4R gene.

Veislė (Breed)	n	MC4R genotipai MC4R genotype (nt298)			alelio Asp dažnis Asp allele frequency	Literatūros šaltiniai Reference
		Asp/Asp	Asp/Asn	Asn/Asn		
LB	207	0,343	0,488	0,169	0,59	Mūsų tyrimai (Present study)
DB	303	0,350	0,439	0,211	0,57	Kim ir kt., 2000
Landrasai	399	0,554	0,398	0,048	0,75	
C linija	615	0	0,276	0,724	0,14	
D linija	403	0,134	0,452	0,414	0,36	
Meishan	124	0,161	0,540	0,298	0,43	Ciobanu ir kt., 2001
Mangalitsa	40	0,828	0,164	0,008	0,91	
Baznu	62	0,302	0,495	0,202	0,55	Ramos ir kt., 2003
Alentejano	266	0,922	0,077	0,002	0,96	
Bisaro	477	0,810	0,180	0,010	0,90	

* Genetinių ryšių analizė tarp populiacijų pateikta žemiau lentelės.

MC4R geno ryšys su produktyvumo savybėmis

Vertinant ir analizuojant MC4R geno įtaką, buvo naudojama vienfaktorinė dispersinė analizė (ANOVA). Norint įvertinti ANOVA tinkamumą geno įtakos nustatymo tikslu, buvo atliktas Livyno testas - įvertintas sibsų duomenų (duomenų sklaida) pasiskirstymo visuose genotipuose tolygumas. Nustatyta, kad tiriamų kintamųjų dispersijos genotipų grupėse nesiskiria ($p>0,05$), tačiau, analizuojant duomenų dispersijas, įvertintas veislinėms vertėms, nustatyta, kad nugaros lašinių storis ir raumeningumo procentas tarp genotipų grupių skyrėsi ($p<0,05$). Taip pat skyrėsi ir genotipų imčių didumas, dėl ko apskaičiuota p reikšmė gali būti didesnė nei tikroji. Dėl šios priežasties nepriklausomoms imtims analizuoti buvo taikytas ir Kruskal-Wallis ranginis kriterijus. Gyvuliai, genotipuoti pagal MC4R geną, neturėjo stresui jautraus genotipo ir nebuvo šio geno nešiotojais, todėl šis faktorius neturėjo jokios įtakos vertintiems požymiams.

Nustatyta MC4R geno statistiškai reikšminga įtaka nugaros raumens plotui (11,7 %), nugaros raumens storiui (5,2 %), raumeningumo procentui (7,4 %), nugaros lašinių storiui (6,8 %), FAT-1 (6,6 %), FAT-2 (6,5 %), priesvoriui per parą stotyje – (6,4 %), pašarų sąnaudoms 1 kg priesvoriui (8,1 %).

5 lentelė. MC4R genotipų vidurkiai $\pm$ SE ir jų skirtumai įvertintiems skerdenos rodikliams (skersta kontrolinio penėjimo stotyje).

Table 5. Genotypic means $\pm$ SE within MC4R genotypes for the analyzed carcass composition (dissected in the State Test Station).

Požymis (Trait)	MC4R genotipo nukrypimas (deviation of genotype) (nt298)			<i>p</i>
	Asp/Asp n=39 (58)	Asp/Asn n=55 (83)	Asn/Asn n=17 (32)	
Paros priesvoris stotyje, g (test daily gain)	734,2 $\pm$ 11,5	718,8 $\pm$ 8,6	768,9 $\pm$ 14,9	0,023
Pašarų sąnaudos kg/kg (feed conversion ratio)	3,24 $\pm$ 0,06	3,37 $\pm$ 0,05	3,09 $\pm$ 0,08	0,012
Bekono ilgis, cm (body length)	74,6 $\pm$ 0,4	75,1 $\pm$ 0,36	74,2 $\pm$ 0,7	0,8
Puselės ilgis, cm (carcass length)	94,1 $\pm$ 0,5	94,4 $\pm$ 0,4	93,3 $\pm$ 0,9	0,7
Ilg. nugaros raumens plotas, cm ² (Loin muscle area)	31,0 $\pm$ 0,5	31,4 $\pm$ 0,5	35,0 $\pm$ 0,9	0,003
Kumpio masė, kg (ham weight)	10,7 $\pm$ 0,1	10,7 $\pm$ 0,2	10,7 $\pm$ 0,1	0,95
Ilg. nugaros raum. storis, mm (loin muscle thickness)	(40,4 $\pm$ 0,6)	(42,9 $\pm$ 0,6)	(43,3 $\pm$ 1,1)	0,048
Raumeningumas, % (lean meat percentage)	(52,4 $\pm$ 0,5)	(52,8 $\pm$ 0,4)	(55,1 $\pm$ 0,6)	0,002
Nugaros lašinių storis 1, mm (Backfat thickness 1)	26,9 $\pm$ 0,9	26,9 $\pm$ 0,7	24,1 $\pm$ 1,2	0,24
Nugaros lašinių storis 2, mm (Backfat thickness 2)	21,0 $\pm$ 0,8	20,8 $\pm$ 0,7	18,7 $\pm$ 1,2	0,47
Nugaros lašinių storis 3, mm (Backfat thickness 3)	22,2 $\pm$ 0,8	21,9 $\pm$ 0,7	19,2 $\pm$ 0,9	0,15
Nugaros lašinių storis 4, mm (Backfat thickness 4)	19,5 $\pm$ 1,1	19,9 $\pm$ 0,9	15,0 $\pm$ 1,4	0,02
FAT-1	(17,9 $\pm$ 0,5)	(17,7 $\pm$ 0,4)	(15,3 $\pm$ 0,6)	0,005
FAT-2	(17,2 $\pm$ 0,4)	(17,2 $\pm$ 0,4)	(14,9 $\pm$ 0,7)	0,004

Paiškinimas: *p* reikšmės paskaičiuotos lyginant genotipų grupių imčių vidurkius taikant post hoc Bonferonio kriterių. *p*-values according to post hoc pairwise analysis (Bonferroni test) of the phenotypic variance.

Naudojant gyvulių veislinės vertes MC4R geno įtaka pašarų sąnaudoms ir priesvoriui veislyne įtaka nenustatyta, tačiau nustatyta statistiškai reikšminga

geno įtaka priesvoriui per parą stotyje – 3,2 %, nugaros lašinių storiui apie 4 % ir raumeningumui apie 5%. Atlikus genotipų imčių vidurkių lyginimus (5 lentelė), nustatyta, kad homozigotai gyvuliai su genotipu Asn/Asn statistiškai reikšmingai skyrėsi nuo heterozigotų Asp/Asn. Jie per parą stotyje priaugo 50 gramų daugiau ir 1 kg priesvorio pašarų sąnaudos buvo vidutiniškai 0,28 $\pm$ 0,096 kg mažesnės nei heterozigotų. Maždaug 4 cm² ilgiausio nugaros raumens plotas, 3 mm nugaros raumens storis ir 2,7 % raumeningumas skyrėsi tarp dviejų homozigotų. Nustatyta, kad Asp/Asp genotipo gyvuliai pasižymėjo storesniais lašiniiais, tačiau statistiškai reikšmingas skirtumas tarp genotipų nustatytas tik ties 10 šonkauliu, kur Asn/Asn genotipo gyvulių lašiniai buvo 4,9 $\pm$ 1,8 mm plonesni. Statistiškai reikšmingi skirtumai tarp dviejų homozigotų nustatyti įvertinant lašinių storį FAT-1 ir FAT-2 taškuose PIGLOG 105 (SSK Technology, Danija) aparatu. Asn/Asn genotipo gyvulių lašiniai atitinkamai šiuose taškuose buvo 2,3 ir 2,4 mm plonesni.

6 lentelė. Populiacijos vidurkiai ir MC4R genotipų vidurkių skirtumai bei nukrypimas nuo bendro populiacijos vidurkio (įvertintos veislinės vertės).

Table 6. Population means and deviation of means within MC4R genotypes for the analyzed traits (estimated breeding values).

Požymis (Trait)	μ_{pop}	MC4R genotipo nukrypimas (deviation of genotype) (nt298)			<i>p</i>
		Asp/Asp (n=71)	Asp/Asn (n=101)	Asn/Asn (n=35)	
TDG	729,1	-13,6 $\pm$ 5,8	-13,5 $\pm$ 4,8	8,7 $\pm$ 5,6	0,046
FCR	3,55	0,01 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02	-0,04 $\pm$ 0,02	0,065
BF	22,5	-0,1 $\pm$ 0,2	-0,2 $\pm$ 0,2	-1,0 $\pm$ 0,3	0,020
LDG	464,7	1,7 $\pm$ 1,5	0,3 $\pm$ 1,5	4,2 $\pm$ 2,0	0,445
Meat %	53,2	0,1 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,3	0,007

Paiškinimas: TDG: paros priesvoris stotyje, g (test daily gain in g/day); FCR: pašarų sąnaudos, kg/kg (feed conversion ratio in kg/kg); BF: nugaros lašinių storis ties 10-tu šonkauliu, mm (backfat at 10th rib in mm); LDG: paros priesvoris veislyne, g (lifetime daily gain in g/day); Meat %: raumeningumas (lean meat percentage). *p* reikšmės paskaičiuotos, lyginant genotipų grupių imčių vidurkius, taikant post hoc Bonferonio kriterių. *p* values according to post hoc pairwise analysis (Bonferroni test) of the phenotypic variance.

Remiantis požymių veislinėmis vertėmis, atlikta MC4R genotipų palyginamoji analizė (6 lentelė) parodė, kad Asn/Asn genotipą turinčių kiaulių priesvoris per parą stotyje buvo 22,3 $\pm$ 9,5 g (*p*=0,062) didesnis. Gyvuliai su genotipu Asp/Asn ir Asn/Asn taip pat skyrėsi statistiškai reikšmingai (*p*=0,046), esant 22,2 $\pm$ 9,1 g didesniai paros priesvoriui Asn/Asn genotipų tarpe. Asn/Asn