

Autentifikacija mesa crne slavonske svinje analizom DNK

Gvozdanović, Kristina; Margeta, vladimir; Kušec, Goran; Djurkin Kušec, Ivona; Džijan, S.; Salajpal, K.; Margeta, P.

Source / Izvornik: **53. hrvatski i 13. međunarodni simpozij agronoma, 2018, 445 - 449**

Conference paper / Rad u zborniku

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:105692>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-06**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical
Sciences Osijek - Repository of the Faculty of
Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



Autentifikacija mesa crne slavonske svinje analizom DNK

Kristina Gvozdanović¹, Vladimir Margeta¹, Goran Kušec¹, Ivona Djurkin Kušec¹,
Snježana Džijan², Krešimir Salajpal³, Polona Margeta¹

¹Poljoprivredni fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Kralja Petra Svačića 1d, Osijek,
Hrvatska (kgvozdanovic@pfos.hr)

²Medicinski fakultet Sveučilišta J.J. Strossmayera u Osijeku, Cara Hadrijana 10/E, Osijek,
Hrvatska

³Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Svetošimunska 25, Zagreb, Hrvatska

Sažetak

Istraživanje je provedeno na 50 svinja od kojih je bilo 30 svinja crne slavonske pasmine te po 10 svinja PIC i Topigs. Cilj istraživanja bio je ispitati uspješnost mikrosatelitnih markera u postupku autentifikacije mesa crne slavonske pasmine svinja. U istraživanju je korišten set od 5 mikrosatelitnih markera izabranih prema preporuci ISAG-FAO (SO005, Sw2410, sw240, SO090 i Sw1067). Iz rezultata istraživanja može se zaključiti da je set od 5 mikrosatelitna markera učinkoviti alat za provođenje postupka autentifikacije proizvoda dobivenih od crne slavonske svinje (šunka, pršut) dok je identifikacija u kobasičarskim proizvodima moguća uz kombinaciju s nekim drugim markerom specifičnim za pasminu (*MCIR*).

Ključne riječi: autentifikacija, crna slavonska svinja, mikrosateliti, tradicionalni proizvodi

Uvod

Uredba br. 178/2002 europskog parlamenta i vijeća o utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane, definira sljedivost kao “mogućnost ulaženja u trag hrani, hrani za životinje, životinji za proizvodnju hrane ili tvari koja je namijenjena ugrađivanju ili se očekuje da će se ugraditi u hranu ili hranu za životinje, kroz sve faze proizvodnje, prerade i distribucije“. Zadaća svih zemalja članica Europske unije je uvesti neki od sustava sljedivosti prehrambenih proizvoda koji mogu biti konvencionalni (Schwagele, 2005.) ili genetski čiji je temelj u DNK analizi životinja i njihovih proizvoda (Goffaux, 2005.). Fontanessi (2009.) navodi prednosti genetskog sustava utvrđivanja sljedivosti u odnosu na tradicionalni sustav, a to su mala količina potrebnog uzorka za provođenje analize, jednostavna izolacija DNK te jedinstvena DNK svake životinje i pasmine. Osim toga, na ovaj način je moguće provesti autentifikaciju na više razina što uključuje identifikaciju pasmine ili vrste. Ukoliko je proizvod zaštićen oznakom izvornosti od veće je važnosti identifikacija na razini vrste s obzirom na to da se na taj način može utvrditi da li je došlo do patvorenja proizvoda (Russo i sur., 2007.) dok je identifikacija pasmine važna zbog mogućnosti utvrđivanja izvornosti i zemljopisnog podrijetla (Sardina i sur., 2015.). Iako postoji veliki broj markerskih sustava koje je moguće implementirati u provođenje autentifikacije, mikrosateliti i dalje predstavljaju zlatni standard. Primjerice, analizom pomoću SNP čipova dolazi do izostavljanja onih SNP-ovi s frekvencijom alela manjom od 5%, a ujedno je u visoka cijena koštanja genotipiziranja (Garner i sur., 2016.). Temelj za provođenje postupka autentifikacije je mogućnost identifikacije različitih vrsta domaćih životinja u mesnim prerađevinama (Ballin, 2010.). Crna slavonska svinja je autohtona pasmina svinja u Republici Hrvatskoj. S obzirom na utvrđenu visoku kvalitetu njezinog mesa te postupak zaštite koji je u tijeku, važno je razviti sustav koji će omogućiti i zaštitu proizvoda dobivenih

od mesa crne slavonske svinje (Margeta, 2016.). Upravo razvojem pouzdanih sustava autentifikacije omogućiti će se zaštitu proizvoda dobivenih od autohtonih pasmina te onemogućiti patvorenje takvih proizvoda manje vrijednim sirovinama.

Materijal i metode

Eksperimentalne životinje

Istraživanje je provedeno na 50 svinja crne slavonske pasmine, 10 PIC hibrida te 10 topigs svinja. Uzorci krvi su prikupljeni na području 5 slavonskih županija zbog smanjivanja mogućnosti pojave srodstva između crnih slavonskih svinja. Uzorci krvi uzeti su ubodom igle u vratnu venu (*vena jugularis*) u količini od 3 ml te pohranjeni na -20°C .

Izolacija DNK i genotipizacija mikrosatelitnih lokusa

Ukupna DNK izolirana je iz uzoraka krvi korištenjem Thermo Scientific Gene Jet Genomic DNA Purification Kita. Uspješnost izolacije provjerena je elektroforezom na 1,0 % agaroznom gelu. Prema ISAG-FAO preporuci za genescan analizu korišten je set sljedećih mikrosatelitnih lokusa: S0005, Sw241, sw240, S0090 i Sw106 (Tablica 1.). PCR reakcija provedena je u ukupnom volumenu od 20 μl koji je sadržavao 50 ng genomske DNA, 100 μM deoksinukleotidnu mješavinu (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1.5 nM MgCl_2 , 0.5 μM od obje oligonukleotidne početnice, 0.5 U DNA Taq polimeraze (Fermentas), 1 x PCR buffer (10 mM Tris, pH 8,3, 50 mM KCl, Fermentas) i bidestilirane vode do ukupnog volumena od 20 μl . Nakon provedene PCR reakcije, uzorci su pohranjeni na -20°C te poslani u Macrogen na genescan analizu.

Statistička obrada podataka

Frekvencija alela, broj alela, promatrana i očekivana heterozigotnost te Wrightova F_{is} statistika prema Weiru i Cockerhamu izračunate su pomoću GENETIX 4.05.2 software paketa te programskog paketa GenAIEx (Belkhir i sur., 2004.; Peakall i Smouse, 2012.). Test odstupanja od Hardy-Weinbergove ravnoteže izračunat je pomoću GENEPOP 3.4 (Rousset, 2008). Filogenetska analiza je napravljena pomoću dendextend paketa (Galili, 2015.) te ape paketa (Paradis i sur., 2004.) u programu R 3.4.0. (www.r-project.org/).

Tablica 1. Set od 5 mikrosatelitnih markera korištenih pri autentifikaciji

Mikrosateliti	Kromosom	Sekvenca početnice (5' -> 3')	Temperatura	Veličina fragmenta
S0005	5	F-TCCTTCCCTCCTGGTAACTA GCACTTCCTGATTCTGGGTA	55°C	203 - 267
Sw2410	8	A-ATTTGCCCCCAAGGTATTTTC CAGGGTGTGGAGGGTAGAAG	50°C	90 - 131
sw240	2	H-AGAAATTAGTGCCTCAAATTGG AAACCATTAAGTCCCTAGCAA	55°C	92 - 124
S0090	12	F-CCAAGACTGCCTTGTAGGTGAATA GCTATCAAGTATTGTACCATTAGG	55°C	227 - 249
Sw1067	6	A-TGCTGGCCAGTGACTCTG CCGGGGGATTAACAAAAAG	55°C	136 - 176

Rezultati i rasprava

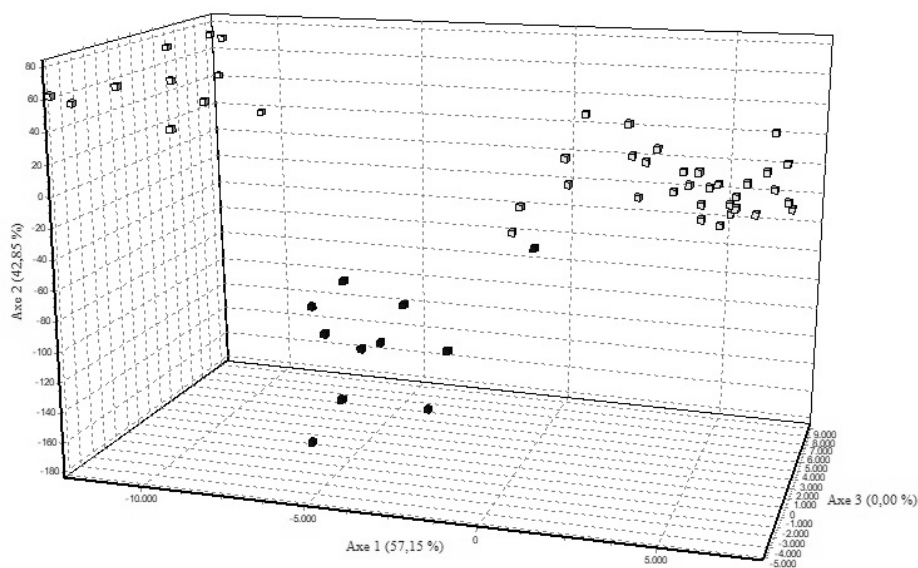
Ispitana je učinkovitost seta mikrosatelitskih markera za autentifikaciju crne slavonske svinja. Prema istraživanju Margete (2012.) mikrosateliti su se pokazali kao dobar markerski sustav za identifikaciju crne slavonske pasmine. Tablicom 2. su prikazani fiksacijski indeksi (F_{is} , F_{it} i F_{st}), očekivana i uočena heterozigotnost (H_{exp} , H_{obs}) te informacijski sadržaj polimorfizma (PIC) za 5 mikrosatelitna lokusa zbirno za sve pasmine svinja. Prosječna vrijednost odstupanja od Hardy Weinbergove ravnoteže unutar i između ispitivanih populacija (F_{it} , F_{st}) iznosile su 0,189 te 0,142. Prosječna vrijednost koeficijenta inbridinga (F_{is}) iznosila je 0,057 što ukazuje na to da se 5,7 % ukupne genetske varijabilnosti može objasniti razlikama između populacijama, dok je 94,3 % genetske varijabilnosti posljedica razlika između jedinki unutar populacije te između populacija. U istraživanju Bardić i sur. (2007.) prosječna vrijednost koeficijenta inbridinga za sve promatrane lokuse iznosila je 0,216 dok Druml i sur. (2012.) navode vrijednost od 0,01. Prosječna PIC vrijednosti je iznosila 0,780 što prema Bolsteinu i sur. (1980.) označava markere s visokim stupnjem informativnosti. Ukoliko se mikrosateliti koriste u genetskim istraživanjima, najmanji broj alela po lokusu mora biti 4 Barkeru (1994.). U istraživanjima prevedenima na crnoj slavonskoj pasmini svinja prosječan broj alela kretao se od 2,50 po lokusu (Bradić i sur., 2007.) do 5,61 (Margeta, 2012.). Šprem i sur. (2014.) su analizirali crnu slavonsku pasminu i turopoljsku svinju te zaključili da je broj alela po lokusu iznosio 9. Prosječan broj alela u našem istraživanju iznosio je 12,8 što je u skladu s preporukama. Prema istraživanju Drumla i sur. (2012.) koje je provedeno na 40 svinja crne slavonske pasmine, vrijednost očekivane heterozigotnosti je iznosila 0,64 dok je vrijednost uočene heterozigotnosti iznosila 0,59. Vrijednost očekivane heterozigotnosti u istraživanju Đikić i sur (2012.) iznosila je 0,72 dok Margeta (2012.) navodi vrijednost očekivane heterozigotnosti od 0,62 te uočene heterozigotnosti 0,57, što je niže nego rezultati našeg istraživanja. Prosječna vrijednosti očekivane heterozigotnosti iznosila je 0,763 dok je prosječna vrijednost uočene heterozigotnosti bila 0,811. Barker (1994.) navodi da bi prosječne vrijednosti heterozigotnost u populaciji trebale biti u granicama od 0,3 i 0,8.

Tablica 2. Fiksacijski indeksi za analizirane mikrosatelitne lokuse

MS	Na	F_{is}	F_{it}	F_{st}	H_{exp}	H_{obs}	PIC
<i>S0005</i>	19	-0,0119	0,0278	0,0457	0,685	1,000	0,743
<i>SW241</i>	11	-0,0588	0,1330	0,1879	0,853	0,943	0,822
<i>SW240</i>	13	0,0844	0,2004	0,1262	0,826	0,967	0,865
<i>SO090</i>	12	0,1658	0,2918	0,1507	0,856	0,890	0,811
<i>SW106</i>	9	0,1057	0,2934	0,2034	0,594	0,654	0,657
<i>Ukupno</i>	65	0,2852	0,9466	0,7139	3,816	4,455	3,901
<i>Prosječno</i>	12,8	0,0570	0,1893	0,1428	0,7632	0,811	0,780

*Na= broj alela po lokusu; F_{is} = koeficijent inbridinga; F_{it} = odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže u istraživanim populacijama; F_{st} = odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže između populacija; H_{exp} = očekivana heterozigotnost; H_{obs} = uočena heterozigotnost; PIC= informacijski sadržaj polimorfizma

Faktorijalna analiza korespondencije (FCA) daje podatke o odnosima unutar i između populacija. Analizirani genotipovi vizualizirani su u 3D koordinatnom sustavu. Graf 1. ukazuje na rezultate faktorijalne analize korespondencije (FCA) koji su ukazali 57,15 % ukupne varijabilnosti na prvoj osi i 42,85 % ukupne varijabilnosti na drugoj osi. Grafom je jasno uočena udaljenost crne slavonske svinje od ostalih analiziranih pasmina svinja.



Graf 1. Faktorijalna analiza korespondencije za analizirane pasmine svinja

Zaključak

Mikrosateliti su se pokazali kao učinkovit markerski sustav za identifikaciju i autentifikaciju crne slavonske pasmine svinja. Iz rezultata istraživanja se jasno uočava razdvajanje istraživanih pasmina u tri genetska klastera. Autentifikacija proizvoda uz set od 5 mikrosatelitska markera može identificirati pasminu od koje su proizvedeni pojedini prehrambeni proizvodi dok identifikacija u kobasičarskim proizvodima nije moguća zbog toga što se takvi proizvodi proizvode od većeg broja životinja što za ovaj tip analize nije pogodno.

Napomena

Istraživanja neophodna za ovaj rad dio su projekta 3396 kojeg financira Hrvatska zaklada za znanost „Znanstveno brendiranje svinjskog mesa“.

Literatura

- Ballin N. Z. (2010). Authentication of meat and meat products. *Meat Science*. 86(3): 577-587.
- Barker J.S.F. (1994). A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. *Proc. 5th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Guelph, Canada 21:501–508.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Catch F. (2004). "Genetix 4.05. 2." University of Montpellier II, Laboratoire Génome et Populations, Montpellier, France.
- Bolstein D., White R.L., Skolnick M.H. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetic*. 32: 314–331.
- Bradić M., Uremović M., Uremović Z., Mioč B., Konjačić M., Luković Z., Safner, T. (2007). Mikrosatelitna analiza genetske raznolikosti Crne slavonske svinje. *Acta veterinaria*. 57(2-3): 209-215.
- Galili T. (2015). Dendextend: an R package for visualizing, adjusting and comparing trees of hierarchical clustering. *Bioinformatics*. btv428. Chicago.
- Druml T., Salajpal K., Dikić M., Urosevic M., Grilz-Seger G., Baumung R. (2012). Genetic diversity, population structure and subdivision of local Balkan pig breeds in Austria, Croatia, Serbia and Bosnia-Herzegovina and its practical value in conservation programs. *Genetics Selection Evolution*. 44(1): 5.
- Fontanesi L. (2009). Genetic authentication and traceability of food products of animal origin: new developments and perspectives. *Italian Journal of Animal Science*. 8(2): 9-18.

- Garner H., Vaksman Z. (2016). Prognostic and diagnostic methods based on quantification of somatic microsatellite variability. U.S. Patent 20,160,040,254, issued February 11, 2016.
- Goffaux F., China B., Dams L., Clinquart A., Daube G. (2005). Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection. *Forensic science international*. 151(2):239-247.
- Đikić M., Šprem N., Salajpal K., Jurić J., Đikić D., Safner T., Čurik V. Č. (2012). Microsatellite characterisation of Croatian autochthonous pig breeds. In *Croatian Symposium on Agriculture* (47; 2012); *International Symposium on Agriculture* (7; 2012).
- Margeta V. (2012). Genetska analiza crne slavonske svinje. *Poljoprivreda*. 18(2): 69-70.
- Margeta P., Margeta V., Gvozdanović K., Galović D., Djurkin Kušec I., Kušec G. (2016). Microsatellite multiplex method for potential use in Black Slavonian pig breeding. *Acta argiculturae Slovenica*. 5:66-70.
- Paradis E., Claude J., Strimmer K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 20: 289–290.
- Peakall R., Smouse P.E., (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539.
- R Core Team (2013.): R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Russo V., Fontanesi L., Scotti E., Tazzoli M., Dall'Olio S., Davoli R. (2007). Analysis of melanocortin 1 receptor (MC1R) gene polymorphisms in some cattle breeds: their usefulness and application for breed traceability and authentication of Parmigiano Reggiano cheese. *Italian Journal of Animal Science*. 6(3):257-272.
- Rousset F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Mol. Ecol. Resources*. 8: 103-106.
- Sardina, M. T., Tortorici, L., Mastrangelo, S., Di Gerlando, R., Tolone, M., Portolano, B. (2015). Application of microsatellite markers as potential tools for traceability of Girgentana goat breed dairy products. *Food Research International*, 74, 115-122.
- Schwägele, F. (2005). Traceability from a European perspective. *Meat science*. 71(1):164-173.
- Šprem N., Salajpal K., Safner T., Đikić D., Jurić J., Čurik I., Čurik V. (2014). Genetic analysis of hybridization between domesticated endangered pig breeds and wild boar. *Livestock Science*. 162: 1-4.
- Uredba (ez) br. 178/2002 europskog parlamenta i vijeća, od 28. siječnja 2002. O utvrđivanju općih načela i uvjeta zakona o hrani, osnivanju Europske agencije za sigurnost hrane te utvrđivanju postupaka u područjima sigurnosti hrane

Authentication of Black Slavonian pig breed by DNA analysis

Abstract

The study was conducted on 50 pigs of which 30 Black Slavonian pig breeds and 10 PIC and 10 topigs pigs. The aim of the study was to examine the success of microsatellite markers in the process of authentication of meat from Black Slavonian pig breed. according to the ISAG-FAO a set of 5 microsatellite markers was selected (so005, sw241, sw240, so090 and sw106). After the PCR reaction, the samples were stored at 4 ° C and sent to MacroGen for genescan analysis. From the results of the research it can be concluded that the set of 5 microsatellite markers is an effective tool for authentication of products obtained from Black Slavonian pig breed (ham, prosciutto) while identification in sausage products is possible in combination with another marker specific to the breed (MC1R gene).

Key words: authentication, Black Slavonian pig breed, microsatellite, traditional products