



## Challenges and adaptive strategies in pig breeding from the aspect of heat stress and heat tolerance

István Nagy<sup>1</sup>, György Kövér<sup>2</sup>, Zsolt Gerencsér<sup>1\*</sup>, Gabriella Szász<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kaposvár University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40;

<sup>2</sup>Kaposvár University, Faculty of Economic Science, H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40;

<sup>3</sup>Vat Balance Kft, H-1145 Budapest, Róna str. 215

**ABSTRACT** - Authors summarized the results of the last three decades' relevant literature examining the temperature effects on the various growth, reproductive and carcass traits in pigs. The ideal period of temperature measurement and the different methodologies characterizing temperature effects were summarized. The aspects of genotype environment interaction for the measured traits under hot and temperate conditions were also presented. Finally the possibilities of direct genetic selection for heat tolerance and its possible selection criteria traits were also discussed.

**Keywords:** robust pig, heat stress, heat tolerance, genotype environment interaction

### INTRODUCTION

Quantitative genetic methods have been applied by animal breeders for decades in order to improve certain traits. The realisation of this effort is visible through the obtained genetic trends of the selected traits. By determining the genetic parameters (heritability, genetic correlation coefficients) the most suitable methods (e.g. self performance test, progeny test) also become obvious making possible maximising the genetic gain. As pointed out by *Merks et al.* (2012) the definition of the overall breeding objective or breeding goal is an essential step in any breeding program. The traits included in the breeding goals should be specific, measurable, attainable, realistic and timely (*Merks et al.*, 2012). Until recently some of the most frequent selection criteria traits of the pig breeding sector were litter size (*Hanenberg et al.* 2001.; *Krupa and Wolf*, 2013; *Nagyné-Kiszlinger et al.*, 2013), average daily gain, lean meat percentage (*Ibanez-Escriche et al.*, 2011; *Nagyné-Kiszlinger et al.*, 2011; *Gjerlaug-Enger et al.*, 2012) and dressing out percentage (*Ciobanu et al.*, 2011), respectively. Recently robustness of pigs gained importance (*Knapp*, 2005), as the pig sector is increasingly being effected by hot climate. The consequence of robustness is that pigs can adapt to different stressors without stress (*Merks et al.*, 2012). The different stressors can cause leg weakness, nutritional deficit dur-

\*CORRESPONDING AUTHOR

Kaposvár University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences

✉ H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40., ☎ +36-82-505-800

E-mail: gerencser.zsolt@ke.hu

ing lactation, various diseases and lowered reproductive performance (*Dourmad et al., 2010; Merks et al., 2012; Hermesch et al., 2015*). In pigs ambient temperature one of the most important stressors as they have very limited ability for thermo regulation through perspiration. Therefore extreme temperature results in increased production difficulties and increased animal losses (*Black et al., 1993*). As noted by *Hayes et al. (2013)* global warming is likely to lead to hotter climates than in the recent past. Fortunately robustness can be implemented as a breeding objective trait just like production traits, although it requires substantial investment in data and technology (*Knapp, 2005*). The importance of taking the temperature effects into account when evaluating performance is inevitable. However, the relevant literature is not uniform describing how temperature measurement should be recorded and utilized. Therefore the objective of this review paper was to summarize the relevant literature in order to demonstrate how to take into account the temperature's influence on the pigs' performances and how to quantify the effects of the increased temperature on the pigs' performance. Besides, further objectives of this study were to describe the genetic differences among the various pig lines concerning heat tolerance and to show the potential selection criteria traits that could be utilized in the breeding programs making pigs more robust from the aspect of heat tolerance.

## **MEASURING THE EFFECT OF HIGH TEMPERATURE ON THE REPRODUCTIVE, GROWTH AND CARCASS TRAITS OF THE PIGS**

### **Data source**

In pig breeding the possible effects of high temperature can only be quantified after obtaining reliable temperature measurements. According to the relevant literature no temperature measurements were taken in any pig farm directly but in all studies the necessary temperature data were obtained from the nearest meteorological station. The R package "WeatherData" (*Narasimhan, 2014*) is worth mentioning as a collective device for such data. The distance between the meteorology stations and the pig farms showed high variability (3 to 209 km) (*Bloemhof et al., 2008, 2013; Zumbach et al., 2008a; Auvigne et al., 2010; Lewis and Bunter, 2010, 2011; Iida and Koketsu, 2014; Knecht et al., 2015; Fragomeni et al., 2016; Wegner et al., 2016*). Nevertheless, in most cases the nearest weather station was located within 70 km from the farms. Besides, *Freitas et al. (2006)* reported high correlation (0.9) between on farm weather data and weather station data 300 km away from the farms. It can thus be concluded

that in the above mentioned studies the precision of the weather data was satisfactory from the aspect of evaluating heat stress and heat tolerance.

### Time and method of measurement

Another issue is that temperature can be measured continuously and the effects of this variable on the various traits has to be determined. From the different strategies the most simple one is to record and utilize the daily maximum temperature at a given day for example at the day of the insemination (Bloemhof *et al.*, 2008), or at the last day of the fattening period (Lewis and Bunter, 2010). However, several authors utilized temperature records for a given period both for reproductive (Bloemhof *et al.*, 2013: 7 and 12 days before and after the successful insemination) and for carcass traits (Zumbach *et al.*, 2008b: last 10 weeks of the fattening; Fragomeni *et al.*, 2016: last 30-70 days of the fattening). According to Wegner *et al.* (2016) temperature measurements were taken during several days around insemination and farrowing. Afterwards, these measurements were used separately in order to determine the most influential day. Wegner *et al.* (2016) found that the greatest negative effect occurred 4 days prior to breeding. Fragomeni *et al.* (2016) and Zumbach *et al.* (2008a) used another strategy which made possible to aggregate all temperature measurements of a period into one number. According to Fragomeni *et al.* (2016) temperature humidity index (THI) was calculated for each day using the formula:

$$THI = (1.8 \times t + 32) - [0.55 - (0.0055 \times rh)] \times (1.8 \times t - 26),$$

where  $t$  = the observed maximum temperature in degrees Celsius,  $rh$  = the observed minimum humidity on a 0 to 100 scale.

Then the heat load (HL) was calculated using the formula:

$$HL = \text{maximum}(0, THI - THI_T),$$

where THI = temperature humidity index for a given day,  $THI_T$  = a threshold THI value (generally from 60 to 77) which can be interpreted as the maximum range of the thermal neutral zone. After HL was determined for every day mean HL within 30-70 day before slaughter was calculated taking into account the cumulative effects of heat stress (Fragomeni *et al.*, 2016). Zumbach *et al.* (2008a) also calculated heat load but in their case after calculating weekly heat

load (as the mean THI exceeding threshold) the total heat load was the sum of the heat loads over the last “n” weeks of life.

## Evaluation method

The temperature effect on the various traits can be quantified using either linear regression (Bloemhof *et al.*, 2008; Iida and Koketsu, 2014; Wegner *et al.*, 2016) or plateau-linear regression (Bloemhof *et al.*, 2008, 2013; Zumbach *et al.*, 2008a; Lewis and Bunter, 2010; Fragomeni *et al.*, 2016). In both types of analyses prior to the regression the data has to be corrected for other influential factors such as parity, service sire, herd-year etc. Generally a GLM procedure can be applied (e.g. Bloemhof *et al.*, 2008; Lewis and Bunter, 2010) taking into account all the influential factors calculating the corrected phenotypes of the examined traits. Then the effect of temperature can be determined by regressing the corrected phenotypes on the temperature values. An important point is that pigs are exposed to heat stress when temperature exceeds the upper critical temperature (UCT) of the thermo-neutral zone (Bloemhof *et al.*, 2008). According to Black *et al.* (1993) the zones of comfort for the lactating sow and for the piglets are between 12 and 22 °C and between 30 and 37 °C, respectively. According to the plateau-linear model the increasing temperature has no effect on the pigs' performance until the temperature does not exceed the UCT value. On the contrary, if the temperature is higher than the UCT value then a decrease can be observed which can be quantified by the regression coefficient.

## Effects of temperature

In Table 1 the temperature effect on several performance traits are summarized.

It can be seen that in some studies (Table 1) no UCT value could be determined (Bloemhof *et al.*, 2008; Iida and Koketsu, 2014). This means that certain pig lines were not sensitive for heat stress and they showed no or only limited performance decrease even at high temperatures (Table 1). Based on Bloemhof *et al.* (2008) the Topigs I-line was originated from purebred Large White sow line. According to the reports of this study the nucleus farms were operated for more than 15 years in Spain. So probably the well performing families in hot environments were selected. On the other hand some breeds could also show substantial decrease of performances based on the linear regression. Iida and Koketsu (2014) examined the performances of gilts and sows serviced during the hot and humid season between June and September. Based

on the results the exceeding preservice temperature resulted a larger decrease in the sows compared to gilts. Stress during postservice was less pronounced ( $-0.014$  piglet / °C and  $-0.093$  piglet / °C) for the gilts and for the sows, respectively. *Wegner et al.* (2016) noted that number of piglets born alive was the most sensitive reproductive trait affected by heat stress. Both *Wegner et al.* (2016) and *Iida and Koketsu* (2014) emphasized the necessity of improvements in isolation and cooling systems (starting from the preservice periods) in order to sustain the high productivity of gilts and sows limiting the negative consequences of heat stress.

**Table 1**

The effect of temperature on the reproductive, growth and carcass traits of the pigs

Author	Breed/Line	Traits	UCT °C	Effect
<i>Bloemhof et al., 2008</i>	Topigs	FR	19.2	-1% / °C
	D-line	NBA	19.6	-0.05 piglet / °C
		TNB	19.6	-0.13 piglet / °C
<i>Bloemhof et al., 2008</i>	Topigs	FR	-	-
	I-line	NBA	-	-0.01 piglet / °C
		TNB	-	-0.02 piglet / °C
<i>Bloemhof et al., 2013</i>	Topigs	FR	20.9	-1 % / °C
	D-line	TNB		
<i>Zumbach et al., 2008a</i>	Du x (LW x LR)	BWSL	20	-0.05 piglet / °C
				-6 kg (stress vs. no stress)
<i>Lewis and Bunter, 2010</i>	LR	ADGL	25.5	-0.38 kg / °C
	LW		32.5	+0.82 kg / °C
		BF	30.6	-0.028 mm / °C
<i>Iida and Koketsu, 2014</i>	-	TNB	-	-0.05 piglet / °C -0.14 piglet / °C
<i>Fragomeni et al., 2016</i>	Du	BW	-	-2 kg / 10 HL +3 kg / 12 HL
		HCW		-7 kg / 12 HL
<i>Wegner et al., 2016</i>	LR x LW	LS	-	-0.03 piglet / °C

LR: Landrace; LW: Large White; Du: Duroc; FR: farrowing rate; NBA: number of piglets born alive; TNB: total number of born piglets; BWSL: body weight at slaughter; ADGL: lifetime average daily gain; HCW: hot carcass weight; LS: litter size; UCT: upper critical temperature; HL: heat load

In several studies (*Bloemhof et al., 2008, 2013; Lewis and Bunter, 2010; see in Table 1*) the deterioration of the pigs' performance became substantial after the temperature exceeded the UCT value. There are various reasons explaining the existence of UCT temperatures but one of the most evident is the origin of

the used breed or line. *Bloemhof et al.* (2008) reported that the Topigs D-line was originated from purebred Dutch Yorkshire sow line. In the Netherlands experiencing a heat stress is unlikely. Therefore it is not surprising that the Topigs D line was not performing well during heat stress. From Table 1 it is well recognisable that the UCT values are highly different among the different traits. Related to reproductive traits the UCT values were around 20 °C while UCT values were much higher for growth traits (Table 1). According to *Lewis and Bunter*, (2010) the two sow lines differed from each other in heat tolerance. The same tendency was observed for average daily gain and backfat. The positive change in backfat is surprising however, as noted by *Gentry et al.* (2002) fat levels can increase during times of heat stress as deposition of protein moves from proteins to lipids.

The study of *Zumbach et al.* (2008a) and *Fragomeni et al.* (2016) differed from other studies as the effect of temperature was not measured on the original temperature scale but on a heat load scale constructed from temperature humidity index. The value of the threshold THI, the length of the evaluated period and the different examined regions all influenced the results. The body weight before slaughter gave discordant results in the different regions, although the magnitude of the changes was not substantial. Using the coefficient of determination the best data fitting was obtained with a 74 THI threshold and 30 day long evaluating period (until slaughter) (*Fragomeni et al.*, 2016). Not quite in line with the previous study *Zumbach et al.* (2008a) observed the highest coefficient of determinations when the evaluation monitored the last 10 weeks before slaughter.

## GENOTYPE ENVIRONMENT INTERACTION

*Bloemhof et al.* (2008) noted that although the Topigs D-line had a higher reproductive performance than the I-line under normal (temperate) conditions, the I-line sows became superior when the temperature raised higher than 25 °C. This phenomenon was a clear indication of genotype environment interaction (*Bloemhof et al.*, 2008). In pig breeding substantial difference between the environment of the performance test and that of the production is often encountered. The reason for these different environments is that during the station test the most important objective is to determine the maximum performance of the animals which needs optimal conditions. On the contrary in the course of farm production the available environment is often substantially worse than optimal, with a variety of challenges (diseases, feeding and man-

agement related issues and climate). As noted by *Zumbach et al.* (2008b) nucleus farms had 25% more space available for animals and operated free of numerous disease challenges compared with their commercial counterparts. Therefore in the nucleus farms accounting for genotype by environment interaction is very important (*Mathur, 2018*).

The observed differences between the performance tests and production depend on the genes influencing the traits measured in the two environments. When the trait equivalents are controlled by the same genes then the ranking of the breeding animals obtained in an optimal environment will not change in farm conditions. On the contrary when the genetic architecture in different environments is not the same then the ranking of the breeding animals will be different for the test and farm conditions, respectively (*Nagy et al., 2003*). Genotype environment interaction can be determined in various ways. If the number of different environments is limited to two then the genotype environment interaction can be considered as the genetic correlation between the same traits measured in the different environments (*Falconer, 1952*). If the estimated genetic correlation coefficient is high ( $>0.8$ ) then the ranking of the breeding animals will be independent from the different environmental conditions (*Bidanel and Ducos, 1995, 1996*). On the contrary the estimated genetic correlation between these trait equivalents is not high ( $<0.8$ ) then the result suggests that genotype environment interaction affects the measurements and re-ranking would be observed between the different environments. If the genetic correlation between the performance in two environment is lower than 0.4-0.6, then creating separate lines becomes necessary (*Mulder and Bijma, 2006*).

Studies analysing the genetic environmental interaction from climate aspects could be sorted to two types. In the first type the location was the same and the different seasons were considered as the different environments (*Zumbach et al., 2008b; Lewis and Bunter, 2011; Bunz et al., 2019*). In the second type the temperate and hot climate was studied at different countries (*Loyau et al., 2017; Godinho et al., 2019*). The estimated genetic correlations for production, carcass and for the reproductive traits between different environments are presented in Tables 2-3.

The various studies analyzing growth, carcass and reproductive traits gave diverse results (Tables 2-3). Most estimates were high enough ( $>0.6$ ) and not indicating substantial genotype environment interaction. However *Zumbach et al.* (2008b) and *Loyau et al.* (2017) reported quite low genetic correlation ( $<0.50$ ) between hot and temperate environments for growth and carcass traits. *Bunz et al.* (2019) observed that when the temperature is high prior and

post mating in one environment and low prior and post mating in the other environment then the genetic environment interaction is apparent (Table 3). Farrowing rate in these two environments were clearly separate traits which must be included in breeding program independently. It also has to be noted that when *Godinho et al.* (2019) examined the genetic correlation between purebreds (measured in temperate climate) and crossbreds (measured tropical climate) the observed genetic correlations were much lower for all examined traits (0.22-0.25) compared to the estimates given in Table 2.

**Table 2**

Estimated genetic correlations between different environments for the growth and carcass traits

Author	Breed/Line	Traits	$r_g$
<i>Zumbach et al.</i> , 2008a	Du x (LW x LR)	CW <sub>HS</sub> - CW <sub>NHS</sub>	0.42
<i>Lewis and Bunter</i> , 2011	LR	BF <sub>SUMMER</sub> - BF <sub>AUTUMN</sub>	0.93
		BF <sub>SUMMER</sub> - BF <sub>WINTER</sub>	0.88
	LW	BF <sub>SUMMER</sub> - BF <sub>SPRING</sub>	0.91
		BF <sub>AUTUMN</sub> - BF <sub>WINTER</sub>	0.96
		BF <sub>AUTUMN</sub> - BF <sub>SPRING</sub>	0.95
		BF <sub>WINTER</sub> - BF <sub>SPRING</sub>	0.85
		ADG <sub>SUMMER</sub> - ADG <sub>AUTUMN</sub>	0.90
		ADG <sub>SUMMER</sub> - ADG <sub>WINTER</sub>	0.89
		ADG <sub>SUMMER</sub> - ADG <sub>SPRING</sub>	0.85
		ADG <sub>AUTUMN</sub> - ADG <sub>WINTER</sub>	1.04
ADG <sub>AUTUMN</sub> - ADG <sub>SPRING</sub>	0.89		
ADG <sub>WINTER</sub> - ADG <sub>SPRING</sub>	0.99		
<i>Godinho et al.</i> , 2019	Sire line	ADG <sub>TROP</sub> - ADG <sub>TEMP</sub>	0.64
		LD <sub>TROP</sub> - LD <sub>TEMP</sub>	0.97
		PD <sub>TROP</sub> - PD <sub>TEMP</sub>	0.73
		BF <sub>TROP</sub> - BF <sub>TEMP</sub>	0.98
		MD <sub>TROP</sub> - MD <sub>TEMP</sub>	0.75
<i>Loyau et al.</i> , 2017	LW x CR	ADG <sub>TROP</sub> - ADG <sub>TEMP</sub>	0.60
		BF <sub>TROP</sub> - BF <sub>TEMP</sub>	0.31
		DFI <sub>TROP</sub> - DFI <sub>TEMP</sub>	0.29
		BW <sub>TROP</sub> - BW <sub>TEMP</sub>	0.63

LR: Landrace; LW: Large White; Du: Duroc; CR: Créole; CW<sub>HS</sub>: carcass weight during heat stress; ; CW<sub>NHS</sub>: carcass weight during non-heat stress; BF: backfat; ADG: average daily gain; LD: lipid deposition; PD: protein deposition; MD: muscle depth; TROP: tropical environment; TEMP: temperate environment; DFI: average daily feed intake; BW: body weight

This result signals that selection of purebred pigs in the nucleus farms has to be based on the joint evaluation of the purebred and crossbred progeny data (*Wei and van der Werf*, 1994; *Nagyné-Kiszlinger et al.*, 2011, 2013). Concerning the climatic effects, *Zumbach et al.* (2008b) concluded that selection under temperate conditions could lead to increased sensitivity to heat stress. This



conclusion was in accordance with the findings of *Falconer* (1990). Therefore selection in heat-stress-affected areas should also evaluate performance under heat stress conditions to reduce losses due to heat stress (*Zumbach et al.*, 2008b). *Godinho et al.* (2019) however noted that the current datasets collected by pig breeding programs make it difficult to obtain accurate estimates of genetic correlations between pig performance in temperate and tropical climates.

**Table 3**

Estimated genetic correlations between different environments for the reproductive traits

Author	Breed/Line	Traits	$r_g$
<i>Lewis and Bunter</i> , 2011	LR	TBSUMMER - TBAUTUMN	1.17
	LW	TBSUMMER - TBWINTER	0.79
		TBSUMMER - TBSPRING	0.80
		TBAUTUMN - TBWINTER	0.86
		TBAUTUMN - TBSPRING	0.65
		TBWINTER - TBSPRING	0.85
		NBASUMMER - NBAUTUMN	0.90
		NBASUMMER - NBAWINTER	0.86
		NBASUMMER - NBA SPRING	0.76
		NBAUTUMN - NBAWINTER	0.72
		NBAUTUMN - NBA SPRING	0.70
		NBAWINTER - NBA SPRING	0.89
		PBWSUMMER - PBWAUTUMN	0.85
		PBWSUMMER - PBW WINTER	0.93
		PBWSUMMER - PBW SPRING	0.85
		PBWAUTUMN - PBW WINTER	1.08
	PBWAUTUMN - PBW SPRING	0.80	
	PBW WINTER - PBW SPRING	0.85	
<i>Bunz et al.</i> , 2019	Sire line	FR <sub>1</sub> - FR <sub>3</sub>	0.82
		FR <sub>1</sub> - FR <sub>4</sub>	0.85
		FR <sub>1</sub> - FR <sub>5</sub>	-0.10
		FR <sub>3</sub> - FR <sub>4</sub>	0.98
		FR <sub>3</sub> - FR <sub>5</sub>	0.79
		FR <sub>4</sub> - FR <sub>5</sub>	0.89

LR: Landrace; LW: Large White; Du: Duroc; TB: total piglet born; NBA: number of piglets born alive; PBW: piglet weight at birth; FR: farrowing rate; 1: high temperature prior and post mating; 3: high temperature prior and medium temperature post mating; 4: meadium temperature prior and post mating; 5: low temperature prior and post mating

## POSSIBILITIES FOR DIRECT SELECTION ON HEAT RESISTANCE

The definition of a heat tolerant animal is not obvious. As mentioned by *Carabano et al.* (2019) from the animal breeding aspect it means maintaining the productive and reproductive levels under hot conditions. *Carabano et al.*

(2019) suggested several criteria traits in order to identify heat tolerant animals such as body temperature, respiration rate or heart rate. Body temperature and rectal temperature of pigs and production of lactating sows were analyzed by *Gourdine et al.* (2017). Although the rectal and cutaneous temperature showed moderate heritabilities (0.34-0.35), the estimated genetic correlation coefficients were not significantly different from zero between these traits and the production traits (average daily feed intake, litter body weight gain, change of the sow's body weight during lactation). *Bloemhof et al.* (2012) defined heat load index as the deviation of the maximum temperature on the day of insemination from 19.3 °C, when maximum temperature at insemination day was higher than 19.3 °C. Otherwise the heat load index was set to 0. Heat load index was then defined as relative change in farrowing rate per unit change in heat load index. It was estimated through the slope of random regression line considering farrowing rate as the dependent variable and the heat load as the independent variable. For Topigs Dutch line and International lines and for crossbred pigs at 29.3 °C (i.e. heat load index of 10) the heritability estimates for heat tolerance were low (0.04-0.05). Nevertheless, *Bloemhof et al.* (2012) concluded that genetic variation for heat tolerance existed and there were possibilities for genetic improvement. It is important that selection candidates have tested relatives both in temperate and in hot conditions (*Bloemhof et al.*, 2012).

## CONCLUSIONS

In the light of the recent climate change, developing heat tolerant animals is gaining importance. Based on the literature genetic improvement for heat tolerance is possible using different strategies. One of the alternatives is using the concept of genotype environment interaction collecting measurements from the progenies of the breeding candidates kept under hot and temperate conditions. Thus selection will improve traits which are generally used in the pig breeding programs. The other possibility is to define traits directly related to heat tolerance. Pig breeding programmes can be extended with these traits increasing heat tolerance.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The research was supported by the EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 project.

## REFERENCES

- Auvigne V., Leneveu P., Jehannin C., Peltoniemi O., Sallé E. (2010). Seasonal infertility in sows: A five year field study to analyze the relative roles of heat stress and photoperiod. *Theriogenology*, 74(1), 60-66. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2009.12.019](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.019)
- Bidanel J.P., Ducos A. (1995). Corrélations Génétiques entre les caractères mesurés dans les stations publiques et en élevage dans les races porcines Large White et Landrace Français. *Journées Rech. Porcine en France*, 27, 143-148.
- Bidanel J.P., Ducos A. (1996). Genetic correlations between test station and on-farm performance traits in Large White and French Landrace pig breeds. *Livest. Prod. Sci.*, 45(1), 55-62. DOI: [10.1016/0301-6226\(95\)00079-8](https://doi.org/10.1016/0301-6226(95)00079-8)
- Black J.L., Mullan B.P., Lorschy M.L., Giles L.R. (1993). Lactation in the sow during heat stress. *Livest. Prod. Sci.*, 35(1-2), 153-170. DOI: [10.1016/0301-6226\(93\)90188-n](https://doi.org/10.1016/0301-6226(93)90188-n)
- Bloemhof S., van der Waaij E.H., Merks J.W.M., Knol E.F. (2008). Sow line differences in heat stress tolerance expressed in reproductive performance traits. *J. Anim. Sci.*, 86(12), 3330-3337. DOI: [10.2527/jas.2008-0862](https://doi.org/10.2527/jas.2008-0862)
- Bloemhof S., Kause A., Knol, E.F., Van Arendonk J.A.M., Misztal, I. (2012). Heat stress effects on farrowing rate in sows: Genetic parameters estimation using within-line and crossbred models. *J. Anim. Sci.*, 90(7), 2109-2119. DOI: [10.2527/jas.2011-4650](https://doi.org/10.2527/jas.2011-4650)
- Bloemhof S., Mathur P.K., Knol E.F., van der Waaij E.H. (2013). Effect of daily environmental temperature on farrowing rate and total born in dam line sows. *J. Anim. Sci.*, 91(6), 2667-2679. DOI: [10.2527/jas.2012-5902](https://doi.org/10.2527/jas.2012-5902)
- Bunz A.M.G., Bunter K.L., Morrison R., Luxford B.G., Hermesch S. (2019). Genotype by temperature grouping interaction for farrowing rate at first insemination. *Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet.*, 23, 155-158.
- Carabano M.J., Ramón M., Menéndez-Buxadera A., Molina A., Díaz C. (2019). Selecting for heat tolerance. *Anim. Front.*, 9(1), 62-68. DOI: [10.1093/af/vfv033](https://doi.org/10.1093/af/vfv033)
- Ciobanu D.C., Lonergan S.M., Huff-Lonergan E. (2011). Genetics of meat and carcass traits. In: Rothschild, M.F., Ruvinsky, A. (Ed.): *The Genetics of the Pig*, 2nd Edition. CABI International, Wallingford, UK. 355-389.
- Dourmad J.Y., Canario L., Gilbert H., Merlot E., Quesnel H., Prunier A. (2010). Évolution des performances et de la robustesse des animaux en élevage porcin. *INRAE Prod. Anim.*, 23(1), 53-64. DOI: [10.20870/productions-animales.2010.23.1.3287](https://doi.org/10.20870/productions-animales.2010.23.1.3287)
- Falconer D.S. (1952). The problem of environment and selection. *The American Naturalist*, 86, 293-298.
- Falconer D.S. (1990). Selection in different environments: Effects on environmental sensitivity (reaction norm) and on mean performance. *Genet. Res.*, 56(1), 57-70. DOI: [10.1017/s0016672300028883](https://doi.org/10.1017/s0016672300028883)
- Freitas M.S., Misztal I., Bohmanova J., West J. (2006). Utility of on- and off-farm weather records for studies in genetics of heat tolerance. *Livest. Sci.*, 105(1-3), 223-228. DOI: [10.1016/j.livsci.2006.06.011](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2006.06.011)
- Fragomeni B.O., Lourenco D.A.L., Tsuruta S., Andonow S., Gray K., Huang Y., Misztal I. (2016). Modelling response to heat stress in pigs from nucleus and commercial farm in different locations in the United States. *J. Anim. Sci.*, 94(11), 4789-4798. DOI: [10.2527/jas.2016-0536](https://doi.org/10.2527/jas.2016-0536)
- Gentry J.G., McGlone J.J., Miller M.F., Blanton J. R. (2002). Diverse birth and rearing environment effects on pig growth and meat quality. *J. Anim. Sci.* 80(7), 1707-1715. DOI: [10.2527/2002.8071707x](https://doi.org/10.2527/2002.8071707x)
- Gjerlaug-Enger E., Kongsro J., Odegard J., Aass L., Vangen O. (2012). Genetic parameters between slaughter pig efficiency and growth rate of different body tissues estimated by computed tomography in live boars of Landrace and Duroc. *Animal*, 6(1), 9-18. DOI: [10.1017/s1751731111001455](https://doi.org/10.1017/s1751731111001455)

- Godinho R.M., Bergsma R., Silva F.F., Sevillano C.A., Knol E.F., Komen H., Guimares E.F., Lopes M.S., Bastiaans J.W.M. (2019). Genetics correlations between growth performance and carcass traits of purebred and crossbred pigs raised in tropical and temperate climates. *J. Anim. Sci.*, 97(9), 3648-3657. DOI: [10.1093/jas/skz229](https://doi.org/10.1093/jas/skz229)
- Gourdine J.L., Mandonnet N., Giorgi M., Renaudeau D. (2017). Genetic parameters for thermoregulation and production traits in lactating sows in tropical climate. *Animal*, 11(3), 365-374. DOI: [10.1017/s175173111600135x](https://doi.org/10.1017/s175173111600135x)
- Hanenberg E.H.T., Knol E.F., Merks J.W.W. (2001). Estimates of genetic parameters for reproduction traits at different parities in Dutch Landrace pigs. *Livest. Prod. Sci.*, 69(2), 179-186. DOI: [10.1016/s0301-6226\(00\)00258-x](https://doi.org/10.1016/s0301-6226(00)00258-x)
- Hayes B.J., Lewin H.A., Goddard M.E. (2013). The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends Genet.*, 29(4), 206-214. DOI: [10.1016/j.tig.2012.11.009](https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.11.009)
- Hermesch S., Li L., Doeschl-Wilson, Gilbert H. (2015). Selection for productivity and robustness traits in pigs. *Anim. Prod. Sci.*, 55(12), 1437-1447. DOI: [10.1071/an15275](https://doi.org/10.1071/an15275)
- Ibanez-Escriche N., Reixach J., Leonart N., Noguera J.L. (2011). Genetic evaluation combining purebred and crossbred data in a pig breeding scheme. *J. Anim. Sci.*, 89(12), 3881-3889. DOI: [10.2527/jas.2011-3959](https://doi.org/10.2527/jas.2011-3959)
- Iida R., Koketsu Y. (2014). Interactions between pre- or postservice climatic factors, parity, and weaning-to first mating interval for total number of pigs born of female pigs serviced during hot and humid or cold seasons. *J. Anim. Sci.*, 92(9), 4180-4188. DOI: [10.2527/jas.2014-7636](https://doi.org/10.2527/jas.2014-7636)
- Lewis C.R.G., Bunter K.L. (2010). Heat stress: the effects of temperature on production and reproduction traits. *AGBU Pig Genetics Workshop*, 87-95.
- Lewis C.R.G., Bunter K.L. (2011). Effect of seasonality and ambient temperature on genetic parameters for production and reproductive traits in pigs. *Anim. Prod. Sci.*, 51(7), 615-626. DOI: [10.1071/an10265](https://doi.org/10.1071/an10265)
- Loyau T., Rose R., Gilbert H., Renaudeau D., Giorgi M., Billon Y., Riquet J., Gourdine J.L. (2017). Climat tempéré vs tropical: étude des paramètres génétiques, des caractères de production et d'adaptation à la chaleur chez le porc en croissance. *Journées Recherche Porcine*. 49, 19-24.
- Knapp P.W. (2005). Breeding robust pigs. *Aust. J. Exp. Agr.*, 45(8), 763-773. DOI: [10.1071/ea05041](https://doi.org/10.1071/ea05041)
- Knecht D., Środoń S., Duziński K. (2015). The impact of season, parity and breed on selected reproductive performance parameters of sows. *Arch. Anim. Breed.*, 58(1), 49-56. DOI: [10.5194/aab-58-49-2015](https://doi.org/10.5194/aab-58-49-2015)
- Krupa E., Wolf J. (2013). Simultaneous estimation of genetic parameters for production and litter size traits in Czech Large White and Czech Landrace pigs. *Chech J. Anim. Sci.*, 58(9), 429-436. DOI: [10.17221/6943-cjas](https://doi.org/10.17221/6943-cjas)
- Mathur P. K. (2018). Genotype-environment interactions in pig breeding. In: *Proc. 11th WCGALP, Auckland, New Zealand*. 668.
- Merks J.W.M., Mathur P.K., Knol E.F. (2012). New phenotypes for new breeding goals in pigs. *Animal*, 6(4), 535-543. DOI: [10.1017/s1751731111002266](https://doi.org/10.1017/s1751731111002266)
- Mulder H.A., Bijma P. (2006). Benefits of cooperation between breeding programs in the presence of genotype by environment interaction. *J. Dairy Sci.*, 89(5), 1727-1739. DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(06\)72241-x](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(06)72241-x)
- Nagy I., Csató L., Farkas János, Radnóci L. (2003). Genotípus x környezet kölcsönhatás becslése hazai sertésfajtáink teljesítményvizsgálati eredményei alapján. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 52, 297-305.

- Nagyné-Kiszlinger H., Farkas J., Kövér Gy., Onika-Szvath Sz., Nagy I. (2011). Genetic Parameters of Growth Traits from a Joint Evaluation of Purebred and Crossbred Pigs. *ACS*, 76, 223-226.
- Nagyné-Kiszlinger H., Farkas J., Kövér Gy., Nagy I. (2013). Selection for reproduction traits in Hungarian pig breeding, in a two-way cross. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 31, 315-322.
- Narasimhan R. (2014). *weatherData: Get weather data from the web*. R package version 0.4.1. [Link](#)
- Wegner K., Lambertz C., Das G., Reiner G., Gaulty M. (2016). Effects of temperature and temperature-humidity index on the reproductive performance of sows during summer months under a temperature climate. *Anim. Sci. J.* 87(11), 1334-1339. DOI: [10.1111/asj.12569](#)
- Wei M., van der Werf J.H.J. (1994). Maximizing genetic response in crossbreds using both purebred and crossbred information. *Anim. Prod.*, 59(3), 401-413. DOI: [10.1017/s0003356100007923](#)
- Zumbach B., Misztal I., Tsuruta S., Sanchez J.P., Azain M., Herring W., Holl J., Long T., Culbertson M. (2008a). Genetic components of heat stress in finishing pigs: Development of a heat load function. *J. Anim. Sci.*, 86(9), 2082-2088. DOI: [10.2527/jas.2007-0523](#)
- Zumbach B., Misztal I., Tsuruta S., Sanchez J.P., Azain M., Herring W., Holl J., Long T., Culbertson M. (2008b). Genetic components of heat stress in finishing pigs: Parameter estimation. *J. Anim. Sci.*, 86, 2076-2081. DOI: [10.2527/jas.2007-0282](#)



## A genom összerakás elmélete és alkalmazása a gímszarvas genom projektben

Bana Ágnes Nóra \*

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar, Genetikai Tanszék, 1117, Budapest,  
Pázmány Péter sétány 1/C

### **ABSTRACT - Theory and application of genome assembly in red deer genome project**

**Author:** Ágnes Nóra Bana

**Affiliation:** Eötvös Loránd University, Faculty of Science, Department of Genetics, 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány. 1/C

The entire inheritance of living organisms is contained in its genomic DNA, the sequence of which can be determined by various DNA sequencing methods. Researchers have long used clone-based methods for this purpose, but today the first, second (next-generation sequencing, NGS) and third-generation sequencing procedures are preferred. With the most widespread next-generation sequencing methods, a mammal's entire DNA can be read within hours. The single read sequences (reads) are only a few hundred basepairs, but summing up their lengths, they could cover the whole genome several times. The reads are assembled to longer sequences by using bioinformatics programs. The goal is to regain the sequence of the original DNA. First, contiguous sequences can be created from matching and overlapping reads, they are called contigs and contigs become settled for scaffolds. The sequences in the scaffolds are incomplete, there remain gaps, which are undetermined segments in the sequence. The most important farm animals have at least scaffold-level online genome assemblies. The most complete genome assemblies are ordered according to the pseudochromosomes. In the construction of pseudochromosomes, scaffolds are mapped to the genetic map of the organism in question, which was determined by genetic markers of known DNA sequences. In double-reference-guided assembling, *de novo* scaffolds are mapped/probed to the known genome of a closely related species and to the genetic map of the living entity targeted. The scaffolds are assorted and ordered following the colinearities and synteny. This method is useful for completely new genomes. The annotation process describes the locations, structures, functions of the genes and other genomic structures along the reference genome resulted. The annotated reference genomes can be used in many ways, e.g. in animal breeding and husbandry, in the game management, in population genetics studies or in forensic cases/wildlife programs.

**Keywords:** Genomics, Next-generation sequencing, Double-reference-guided genome assembling

## BEVEZETÉS

A genom egy szervezet teljes örökítő információja, amelyet a DNS kódol (egyes vírusokban az RNS), a géneket és a nem kódoló szekvenciákat is magában foglalja. A genomika a genommal foglalkozó multidiszciplináris tudományág, amely a gének és a nem kódoló régiók kölcsönhatásait, a genomok szerkezetét, a gének elhelyezkedését vizsgálja és feltárja az egyes élőlények genomja közötti különbségeket. Az élőlények genomjában rejlő információk különböző

\*CORRESPONDING AUTHOR

Eötvös Loránd Tudományegyetem, Genetikai Tanszék

✉ 1117 Budapest, Pázmány Péter sétány 1/C., ☎ +36-1-372-2500/8073

E-mail: bana.a.nora@gmail.com

bioinformatika eszközök segítségével válnak értelmezhetővé a kutatók számára.

A DNS szekvenálás során meghatározzuk egy DNS molekula nukleotid sorrendjét. Az új generációs szekvenáló laborok nagy mennyiségű szekvencia adatokat produkálnak, amelyek feldolgozásával a bioinformatika foglalkozik. A bioinformatika tárgykörébe tartozik a szekvencia illesztés, a statisztikai analízis (gén hosszúság, CG arány), a genom annotáció (ORF, gén predikció, promóter analízis), szekvencia adatbázisok használata, szekvencia keresés, makromolekulák háromdimenziós modellezése és a fehérjék közötti kapcsolatok feltárása. A Next-generation sequencing (NGS, Új-generációs szekvenálás módszereknek köszönhetően napjainkban elegendő csupán nyolc munkaóra és körülbelül 1000-1500 USA \$ egy emlős teljes genomjának a szekvenálásához. A leolvasott és összerakott szekvenciákat a bioinformatikusok igyekeznek nemzetközileg elismert, online elérhető adatbázisokba feltölteni. Az egyik ilyen jelentős publikációs és szekvencia adatbázis az NCBI (National Center for Biotechnology Information), ahol a feltöltött genomok száma folyamatos növekedést mutat.

2018. január 23.-án a svájci Davos városában tartott találkozón a Világgazdasági Fórum több fontos genomikai intézettel lépett szövetségre. A konferencián megfogalmazták a negyedik ipari forradalmat megalapozó Föld Bio-Genome Project (EBP) célkitűzéseit, amely lényegében a világ minden eukarióta élőlényének (összes növény, állat és egysejtű szervezet) a teljes genom szekvenálása és egy fenntartható biogazdaság létrehozása. Ezek az intézkedések fontos szerepet játszhatnak mintegy 20000 veszélyeztetett faj megmentésében. A projekt előreláthatóan 10 évet és 4,7 milliárd dollárt fog igénybe venni (*Lewin és mtsai., 2018*).

Régen kimagasló eredménynek számított egy-egy gén teljes szekvenciájának leírása, manapság azonban az élőlények teljes genomjának ismertetésére úgynevezett WGS (Whole Genome Sequencing) projektek megvalósítására törekcsenek a kutatók világszerte. Napjainkban a genetikai modell állatokon kívül, több mezőgazdaságban kiemelkedő növény és állatfaj teljes genom szekvenciája is elkészült például házi sertés, szarvasmarha, juh, rizs, búza, kukorica stb.

Magyarországon a gímszarvas genomprogram keretében megvalósult Magyarország első igazi, nemzetközileg elismert genomprogramja, amelynek kapcsán létrehoztuk a világ első szarvas genom programját (CerEla1.0), amely kromoszómákba rendezve, valamint a centromeron pozíciókhoz orientálva készítettünk el (*Bana és mtsai., 2018*).

## TELJES REFERENCIA GENOM ÖSSZEÁLLÍTÁS MENETE

### *Laboratóriumi munka*

A bioinformatikai analíziseket szinte minden esetben megelőzi a laboratóriumi munka. A teljes genomi DNS kinyerése és a mintavételezés meg kell feleljen a humán etikai vonatkozásoknak, vagy az állat jóléti törvényeknek. A minták tárolása és a DNS izolálási protokoltól és a későbbi felhasználástól függ. Az izolálás eredményeképpen kapott DNS tisztaságát és mennyiségét nanodrop fotométeren ellenőrzik le. A gímszarvas genomprogram esetében a DNS mintát a Kaposvári Egyetem Vadgazdálkodási Tájékoztató Bőszenfai Szarvas farmján, természet közeli körülmények között élő, 7 éves, kapitális gímszarvasbika (fülszáma: Crot. N.o. 3016) 10 ml vére szolgáltatta, amelyet a mintavétel után EDTA pufferben tároltunk.

### *DNS könyvtárak*

A vírusok és baktériumok szekvenálása laboratóriumi, klón alapú módszerrel kezdődött el. A klón alapú, hierarchikus szekvenálás során a genomi DNS-t restriktációs enzimekkel vagy különböző mechanikai eljárásokkal véletlenszerűen apró, 40-150 kbp-os, átfedő darabokra tördelik szét. Ezek a darabok nagyon gyakran STS-eket (Sequence-Tagged Sites), az adott genomi pozícióra jellemző rövid, egyedi szekvencia részeket is tartalmaznak. A kis DNS fragmentumokat plazmid vektorba klónozzák be és a recipiens baktérium sejtekben, általában *Escherichia coli*-ban szaporítják fel. Ezt az eljárást nevezzük molekuláris klónozásnak, az így létrejött a faj teljes genomját tartalmazó BAC (Bacterial Artificial Chromosome) gyűjteményt pedig BAC könyvtáraknak hívják. Az egyedi BAC DNS darabokból további tördeléssel még kisebb (szub) fragmentumokat hoznak létre, és ezek újabb felszaporítással szubklón könyvtárakat konstruálnak. A fragmentumok első 500 bp-ját leolvassák (read szekvencia). A hosszabb szekvencia részeket, a contigokat és a szupercontigokat az átfedő DNS-régiók alapján elektronikus úton állítják össze például PHRAP szoftver segítségével (*de la Bastide és McCombie, 2007*). A contig szó összefüggő, ismert bázissorrendű, hosszabb nukleotid sorozatot jelöl. A *Haemophilus influenzae* baktérium teljes genomjának a feltárása „shotgun” eljárással ment végbe (*Fleischmann és mtsai., 1995*). Az egész genom véletlenszerű „shotgun” feldarabolása úgy történik, hogy a DNS-t átpasszírozzák egy vékony csövön és az így kapott 2-10 kbp -os a darabokat szekvenálják meg a végeiről indulva a közepe felé. Emiatt a leolvasott DNS darabkák többszörösen fedik le a teljes



genomot, ami a contigok közötti hézagok számának nagymértékű csökkenéséhez vezet. A contigok közötti részeket PCR segítségével határozzák meg. A WGS (Whole genome shotgun) contigok számítógépes összeszereléséhez (assembly készítés) legelőször TIGR Assembler számítógépes szoftvert alkalmaztak (Sutton és mtsai., 1995).

### ***Első, második és harmadik generációs szekvenálás***

Az 1970-es évek végén váltak elérhetővé az úgynevezett első generációs szekvenálási technikák. Ezen klasszikus módszerek közé sorolható a Sanger és Coulson nevével fémjelzett +/- szekvenálás amellyel, először olvasták le egy vírus, a phi X174 bakteriofág teljes genomját (Sanger és Coulson, 1975).

Hagyományos kémiai módszereket használ fel a Maxam- és Gilbert-féle kémiai hasítás (Maxam és Gilbert, 1977). Ilyenkor a DNS cukor-foszfát gerince mentén történik meg a specifikus hasítás (A+G, G, C+T, C bázisok után). Az eltérő méretű méretű DNS darabokat denaturáló poliakrilamid gélelektroforézissel választják el és autoradiográfiával detektálják. A végeredmény a „DNS fragmentek létrája”, amelyből leolvasható a szekvencia.

A legismertebb első generációs eljárás a Sanger-féle láncterminációs szekvenálás (Sanger és mtsai., 1977). Az egyszerűsített templát DNS-hez szekvenáló primereket hibridizálnak, majd DNS polimerázt, azonos mennyiségű négyféle dezoxinukleotid-trifoszfátot (dNTP) és négyféle fluoreszcens festékkel (fluorofórral) jelölt didezoxinukleotid-trifoszfát (ddNTP) molekulát kevernek a PCR reakció közegbe. A DNS polimerizáció alatt, vagy a komplexer dNTP vagy ddNTP épülhet be az új szálba, a nukleotidok koncentrációjának arányától függően. Amikor dNTP illesztődik be a szálba a szintézis tovább folytatódik, mert a dNTP 3' végén -H csoport található. Amikor ddNTP kerül be akkor a dNTP 3' végén lévő reaktív -OH csoport miatt a szintézis leáll. Ennek a folyamatnak a neve a láncterminációs reakció. Az új DNS szálak szétválasztására kapilláris gél elektroforézist használnak (Dovichi és Zhang, 2000). Az automata fluoreszcens szekvenálás nagy előnye, hogy a DNS amplifikálása PCR eljárással valósítható meg.

A második generációs vagy új generációs szekvenálási (next-generation sequencing, „NGS”) technológiáknál a DNS amplifikációja mindig valamilyen PCR reakcióval történik meg, és az utolsó (szekvenáló) PCR során leolvasott szekvenciákat, a readeket nagyteljesítményű számítógépek kezelik és dolgozzák fel. Az NGS-nél több millió szekvenálási reakció zajlik egyidőben, ami gyorsabbá és olcsóbbá teszi ezt az eljárást. Egy emlős teljes genom szekvenálása csupán pár órát vesz igénybe és napjainkban körülbelül 300.000 Ft-ba kerül.

A leolvasott readok hossza 50-700 nukleotid között van. Amennyiben csak a DNS fragmentumok egyik végét szekvenálják meg, úgy single end sequencingról beszélünk. Paired-end szekvenálásakor viszont a DNS szekvenciák mindkét végét meghatározzák. A szekvencia leolvasása nagyfelbontású CCD kamera segítségével történik. Az NGS technológiákról általában elmondható, hogy nagy átteresztőképességű (high-throughput, „HTP”) módszerek is egyben, hiszen több minta leolvasása párhuzamosan, egy időben zajlik le. A legismertebb második generációs szekvenálások közé tartoznak az Illumina (Solexa) sequencing, a SOLiD (Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection) sequencing, a Pyrosequencing (454) és az Ion Torrent sequencing. Az Illuminánál a DNS lánc épülése szintézissel zajlik és DNS szálak úgynevezett hídamplifikációval sokszorozódnak fel. Az eltört DNS szálak egy szilárd szekvenáló lemezhez rögzített oligonukleotidhoz kapcsolódnak hozzá, majd a polimerizáció során a DNS templátról átírt szálak a denaturációs szakasz után lehajlanak egy másik rögzített primerhez, azzal hibridizálnak és az elongációs folyamat révén duplikálódnak. A keletkező PCR termékek „klasterekbe” rendeződnek. A feldúsult DNS fragmentumok leolvasása szekvenáló primerek és eltérő színű fluoreszcens festékkel jelölt dNTP-kel történik meg. Amikor beépül egy nukleotid annak fluoreszcens villanását észleli és rögzíti a kamera. A paired-end szekvenálás egy specifikus típusa a mate pair párok létrehozása, amelynél a DNS-t először 2-5 Kbp nagyságú darabokra törik, végüket biotinilálják majd a DNS szálakat cirkularizálják és végül még kisebbre fragmentálják. Az új fragmentumok közül néhány tartalmazza mindkét biotinilált mate pair szegmenst. A továbbiakban a paired-end szekvenálásra jellemző metodika alapján járnak el (*Bentley és mtsai., 2008*). A gímszarvas genom program készítésekor 4 paired-end és 2 mate pair nyers read szekvencia könyvtárat hoztunk létre. A SOLiD és Pyroszekvenálás közös eleme, hogy az „emulziós” PCR reakció során a templátokat szilárdfázisú poliszitirén gyöngyökhöz kötik hozzá. A SOLiD eljárásnál a szekvenálás az oligonukleotid próbák ligálásával történik meg, míg a Pyroszekvenálásakor DNS szintézis segítségével. Ez utóbbinál dNTP-khez kötött pirofoszfát a nukleotid szálba épülésekor leválik és a szulfuriláz enzimhez kapcsolódik, amely ATP-t állít elő. Az ATP-ből pedig luciferin jelenlétében oxiluciferint jön létre és ez a reakció fényvillanással jár (kemilumineszcencia) (*Pevsner, 2015*). Az IonTorrent esetében a nukleotid DNS szálba épülése hidrogénion kilépéssel jár, amelyet félvezető chip-en sok, apró pH mérő érzékel, amit egy számítógéppel továbbít így kémiai jel alakul át digitális jellé (*Rusk, 2011*).

A harmadik generációs nanoporus szekvenálás valós időben (real-time) megy végbe, önálló DNS darabokon. Emiatt nincs szükség PCR amplifikálásra.

A DNS láncot elektroforézissel 1 nanométer átmérőjű membránpóruson húzzák át, ami bázisonként változtatja meg a membrán elektromos potenciálját. A változást mutató jelet nagy érzékenységgű detektor észleli és küldi tovább a szekvenátor készülékhez (*Niedringhaus és mtsai., 2011*).

A szekvenálás eredményeként a read szekvenciákat és a rájuk jellemző tulajdonságokat tartalmazó fastq kiterjesztésű fájlok jönnek létre. A leolvasott readek minőségét például a FastQC programmal ellenőrizhetjük le (*Andrews, 2010*). A szekvenáláskor leolvasott nukleotidok minőségi mutatója a Phred score, ami egy logaritmikus érték. Azt mutatja meg, hogy mekkora az esélye annak, hogy egy bázist helytelenül határoztuk meg. A trimming során a rossz minőségű readeket eldobjuk, mivel zavarhatják a genom analízis további lépéseit.

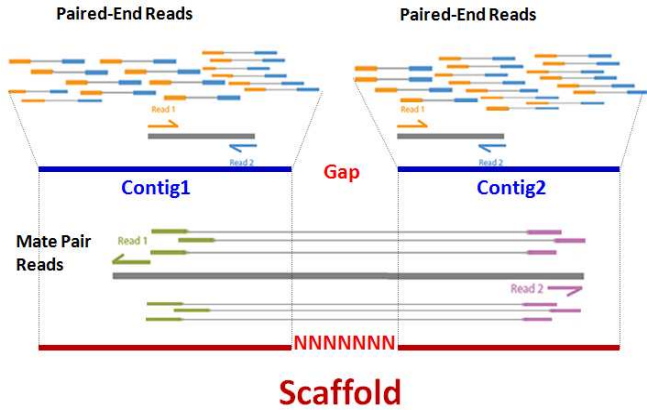
### ***Contig és Scaffold generálás***

A legtöbb új-generációs szekvenálás során kapott read méret 100-150 bp körüli, viszont a későbbi genom analízisekhez nélkülözhetetlen a hosszabb, összefüggő DNS szekvenciák elemzése. Amennyiben már ismert referencia genomú faj egyedéből származott a DNS minta, abban az esetben re-szekvenálásról beszélünk. A referencia genomot több szekvencia közös, összeilleszkedő részei alapján *in silico* generálták. A referencia genom mindig haploid genom, amely a jelentősebb bioinformatikai, genomikai portálokról elérhető és letölthető. A re-szekvenálásnál a readeket például bwa-mem programmal illeszthetjük fel a már létező referenciához (*Li, 2013*). Ilyenkor azonban csak a kisebb eltérések, például a mikroszatelliták (egymás után elhelyezkedő, 1-6 bázispár hosszúságú ismétlődésekből álló DNS szekvenciák), indelek (néhány bázispárnyi inszerciók vagy deléciók) és az SNP-ek (Single Nucleotide Polymorphism, vagyis egyetlen bázispárt érintő nukleotid-polimorfizmus) lokalizálásának van értelme. Ugyanis az illesztő programok nem veszik figyelembe a nagyobb genomi átrendeződéseket. Éppen ezért sem célszerű a referencia genom nélküli fajoknál sem, hogy a readeket egyszerűen csak egy rokon faj genomjához illesszük fel, hiszen nagyon sokszor még kromoszóma szám tekintetében sem egyezik meg a két faj egymással. A jó minőségű, nagy átlagos lefedettségű readek önmagukban is elegendők hosszabb összefüggő szekvenciák úgynevezett contigok „*de novo*” létrehozására. A DNS-szekvenálás lefedettsége (vagy mélysége) azoknak az egyedi readeknek a számát jelöli, amelyek egy adott nukleotidot tartalmaznak, és átfednek a rekonstruált szekvenciában.

Az assembler szoftverek egy része „mohó vagy greedy” algoritmus alapján működik. Az algoritmus minden lehetséges read páronkénti illesztést figyelembe vesz a szekvencia egyezés alapján. Ezután a két legjobb átfedő readet kiválasztja és összevonja (a művelet bioinformatikai elnevezése a „merge”). Ezt a lépést addig ismétli, amíg el nem fogynak a readek. Ez a megoldás rendkívül gyors, ámde a tévedéseit nem korrigálja. A többi illesztő program a De Bruijn gráf elvet használja, vagyis a readeket kisebb, „k” nukleotid hosszúságú részekre bontja (ezek lesznek a k-merek, amelyek a gráf csúcsait adják) és két csúcst akkor köt össze egy irányított éllel, ha az első csúcs utolsó k-1 betűje megegyezik a második csúcs első k-1 betűjével. Ezek a k-merek hosszabb szekvenciákká fűzik össze a readeket. Problémát okozhatnak az illesztő programok számára az ismétlődő DNS szakaszok, és a rossz helyre, illetve rossz orientációban elhelyezett readek. Néhány fontosabb assembler program: SPAdes, Ray, ABySS, Trinity, HGAP, Falcon, Canu, Hinge, Assemblathon, Racon, Celera WGA, Edna, Euler, MIRA, Newbler, SOAPdenovo, ALLPATHS-LG, Discover. A programok nevét a google keresőbe beírva részletes leírásokat találunk.

A gímszarvas genom program esetében az ALLPATHS-LG illesztő programot használtuk, amelyet Illumina szekvenálásból származó 100 bp-os vagy annál nagyobb hosszúságú readek kezelésére fejlesztettek ki (*Gnerre és mtsai., 2011*). Működési feltétele, hogy a szekvenálásból legalább két, páros read könyvtár álljon rendelkezésre, amelyekből az egyik Paired-end, a másik Mate pair legyen, és mindkét könyvtárra minimum 45-szörös átlagos lefedettség legyen jellemző. Eredményként megkapjuk az assemblyt (efasta és fasta kiterjesztéssel), illetve egy riport fájlt („ALLPATH report”), ami a legfontosabb statisztikákat írja le. A riportban az assembly minőségére vonatkozó információkat is láthatjuk, ilyen például az N50-es mérőszám contigokra vagy scaffoldokra vonatkoztatott értéke, ami egy súlyozott medián érték. Azt a scaffold hosszúságot adja meg, aminél hosszabb scaffoldok az összes assembly felét teszik ki.

Maga az assembly tehát állhat contigokból és scaffoldokból is. A contigok szinte nukleotid bázisokból felépülő hosszú szekvenciák, amelyek a readek átfedései révén jönnek létre. Azonban ahol a program nem talált átfedő readeket, ott az egymástól 2-5 Kbp távolságra található mate pair read párok tagjait hívja segítségül, amelyek szekvencia vázakká fűzik fel a contigokat. Az így összefűzött contigokból kialakuló szekvencia elemeket scaffoldoknak nevezzük. A contigok közötti ismeretlen bázisokat általában N-nel jelöljük, és gap régióknak nevezzük. A scaffoldok tehát mate pair read párokkal felfűzött, contigokból állnak (1. *ábra*).



### 1. ábra

A contig, scaffold, assembly *de novo* létrehozásának sematikus rajza.

Figure 1. Schematic drawing of the *de novo* creation of contig, scaffold, assembly.

### Genom annotáció

A szekvenált, contigokká és scaffoldokká összerakott és leolvasott DNS lánc hosszú nukleotidbázis betűsorozata önmagában nem informatív, ezért van szükség például a kódoló régiók megkeresésére és elnevezésére. A gének elnevezése a múltban empirikus módon történt, ami ahhoz vezetett, hogy egy gén többféle alternatív nevet is kaphatott. Emiatt a név nagyon sokszor nem specifikus, kivéve a humán géneket, ahol a HUGO (Human Genome Organisation) gene nomenclatura committee igyekezett egységesíteni a különböző elnevezéseket. Az annotált, kódoló régiók szekvenciái többnyire elérhetők olyan online genom adatbázisokból, mint például az NCBI, az Ensembl, Mouse Genome Informatics, FlyBase, és a WormBase. Ezekben az adatbázisokban minden szekvenciához tartozik egy egyedi azonosító szám, ami csupán egy entitást határoz meg, Minden adatbázisnak megvan a maga szekvencia azonosító formátuma, ami betűk és számok kombinációjából áll. A különböző adatbázisok gyakran átjárhatók, kereszthivatkozhatók egymással.

A gének azonosításakor, az annotálási eljárás során megkeresik a genomban a releváns DNS szekvenciákat és különböző biológiai információkat rendelnek hozzájuk. A folyamat három fő lépésre osztható:

1. A nem fehérje kódoló régiók azonosítása a genomban
2. Gén predikció, vagyis a lényeges genomikai elemek identifikációja
3. Biológiai információk csatolása ezen genomikai elemekhez (*Stein, 2001*).

A biológiai információ szempontjából megkülönböztetjük egymástól strukturális és funkcionális jellegű annotációt. Strukturális adatnak számít a kromoszómán való lokalizáció, a pontos génszerkezet, vagyis az exon-intron határok, UTR, promóter régiók megkeresése és a szabályozó régiók leírása. A funkcionális annotáció kapcsán meghatározzák az adott gének vagy DNS szakaszok biokémiai, különböző biológiai, regulációs, expressziós és interakciós tulajdonságait. A folyamatban egyaránt használhatnak kísérletes adatokat és számítógépes vizsgálatokat is.

Az automatikus annotációnál ezeket a lépéseket kizárólag számítógépes elemzéssel végzik el ellentétben az emberi szakértelemmel járó kézi annotációval. Ideális esetben ezeket a módszereket együttesen alkalmazzák. Az automatikus annotálásnál gyakran használnak genetikai homológiát kereső eszközöket, például a BLAST illesztőprogramcsomagot. Ilyenkor a különböző adatbázisokból és akár más fajokból is származó gén, cDNS, EST, RNA-seq, protein, mRNS szekvenciákat illesztik fel a teljes genomra, ezután a különböző szekvencia találatok átfedő részeiből klasztereket képeznek, majd meghatározzák ezek pontos genomi helyzetét. Mivel ezekben az esetekben valós kereső szekvenciák segítségével találják meg a kódoló részeket a genomban, ezért ezt a módszert bizonyíték alapú gén predikciónak nevezzük. Ezzel ellentétben az ab initio gén predikciónál nincs szükség külső kereső szekvenciákra, az annotáló program például a promóter régiókra, transzkripció starthelyekre, exon-intron határokra, poliadenilációs helyekre utaló speciális szekvencia jelek és jellemző statisztikus tulajdonságaik alapján jelöli ki ezek helyét az ismeretlen genomban. A legtöbb nemzetközi online genomikai adatbázis saját annotációs projektekkel és pipeline-nal rendelkezik, ilyen például DNS-elemek enciklopédia (ENCODE), Entrez Gene, Ensembl, GENCODE, Gén ontológiai konzorcium, GeneRIF, RefSeq, Uniprot. A gén predikciós eszközökből is elég sok áll rendelkezésre, amelyekből az adott genomnak megfelelőt érdemes kiválasztani, íme néhány program: FusionSeq, GAAP, GENSCAN, GENEID, GENEMARK, JIGSAW, Artemis, AUGUSTUS, EuGene, MAKER, MAKER2, OmicX, PseudoPipe, TAIR.

## Kromoszómába rendezés

Egy faj teljes genom szekvenálásából elsőként elkészült scaffold és contig DNS szekvenciák összesége vagyis a *de novo* assembly csak korlátozott mértékben használható genomikai analízisekre, mivel a gének működését befolyásoló elemek egymástól egészen nagy távolságokra helyezkedhetnek el a DNS láncon. A legmegbízhatóbb eredményeket a lehető leghosszabb úgynevezett szuper scaffold létrehozásával és vizsgálatával érhetjük el, ami nem más, mint a faj egy kromoszómájának teljes nukleotid sorrendje. Sok élőlény DNS szekvencia összerakása csupán a scaffold assembly szintig jut el, mert nem áll rendelkezésre megfelelő géntérkép. A géntérképek morgan vagy centimorgan egységben adják meg a gének vagy a markerek, azaz ismert DNS szekvenciák egymástól való távolságát és kromoszómális elhelyezkedését. 1 Morgan (M), annak a két pontnak/génnek a távolsága, amelyek között 1, a crossing-overek átlagos gyakorisága, 1 centimorgan (cM) távolság pedig 1% átlagos crossing-over gyakoriságnak felel meg. A genetikai térképeken 1 cM egy genetikai térképegységet jelent. Géntérkép hiányában, ha nagyobb szekvencia egységekre van szükség, megoldást jelenthet egy közel rokon faj teljes referencia genom szekvenciája. A tyúkidomú nyírfajd genom összeszerelésénél a generált scaffoldokat a csirke referencia 28 autoszómájára és Z kromoszómájára illesztették, hogy fel tudják tární a homológ gének közötti összefüggéseket (*Wang és mtsai.*, 2014). A géntérkép nélküli kromoszómákba rendezéshez szerencsés esetben is csak bonyolult citológiai eljárásokkal juthatunk (jelölt scaffoldok in situ hibridizálása kromoszóma preparátumhoz, multicolor in situ hibridizáció).

Amikor azonban nem elérhető valamely rokon faj genomja elméletileg átfedő BAC vagy shotgun klónokból fel lehet építeni egy teljes genomot, de a valóságban mindig szükség volt citológiai referenciákra, például sávozott kromoszóma preparátumokra és in situ hibridizálásokra, géntérképekre.

Szerencsésebb helyzetekben az adott faj rendelkezik saját géntérképpel, amelyek markereivel könnyen kihalászhatók és térképre illeszthetőek a marker szekvenciát tartalmazó *de novo* scaffoldok (*Shulaev és mtsai.*, 2011). Értelemszerűen ilyenkor minél sűrűbb géntérképre, és minél nagyobb scaffoldokra van szükség.

A gímszarvas esetében lehetőség nyílt a kettős referencia vezérelt genom összerakásra, mivel egyaránt rendelkezésre állt egy közel rokon faj, a szarvasmarha jól annotált referencia genomja és egy rekombináns gímszarvas géntérkép is. A *de novo* létrehozott scaffoldok szavatolták, hogy a gímszarvasra jellemző sajátos szekvencia részek megmaradjanak. E scaffoldok gímszarvas géntérképre és szarvasmarha genomra illesztése során pedig megkaptuk a

scaffoldok és a rajtuk elhelyezkedő fontos genetikai struktúrák (gének) egymás utáni sorrendjét. A közel rokon fajok közül azért a szarvasmarhát választottuk, mert jól annotált, és a szarvasmarha genom konzervatív régiói 92%-98% hasonlóságot mutatnak a gímszarvas cDNS-sel (*Gyurján és mtsai., 2007, Stéger és mtsai., 2010*). A gímszarvas géntérkép annyiban is különleges, hogy nem használhattak házasított gímszarvas fajtákat a létrehozására, helyette az ún. „interspecifikus back-cross” módszert alkalmazták, mivel a szarvasfélék közeli fajai keresztezhetőek egymással, és fertilis fajhibrideket hoznak létre. Ezt láthatjuk a milu (*Elaphurus davidianus*) és a gímszarvas (*Cervus elaphus*) interspecifikus keresztezésénél, ahol a Haldane szabállyal (Az emlős fajhibridek hímjei, XY, a „heterogamétás szex”, általában sterilek, a női egyedek XX, a „homogamétás szex” ugyanakkor fertiliznek) ellentétben nemcsak a nőivarú, hanem a hím és női ivadékok egyaránt termékenyek. Továbbá a genomjukban nagyszámú fajspecifikus genetikai variáció található, ami jellemezi az adott lókuszt. E markerek allélikus variációi jól kimutathatók DNS diagnosztikai eljárásokkal, ha az allélok hossza különbözik (például az elektroforetikus vándorlási sebesség alapján, azaz PAGE vizsgálattal) és felhasználhatók a rekombinációs gyakoriságok meghatározásához és a géntérképezéshez. A térképező populáció létrehozása két új-zélandi szarvasfarmon történt, ahol az F1 nemzedék milu és gímszarvas hibrid szarvasbikákat kereszteztek gímszarvas ünnel, amelynek eredményeképpen 351 back-cross utód született. A mesterséges megtermékenyítésből született (F2) szarvasborjak adták a térképező populációt a géntérkép elkészítéséhez. Meghatározták a DNS marker variációk között a rekombinációk gyakoriságait, ebből cM távolságokat számoltak és így tudták megszerkeszteni a gímszarvas autoszómák géntérképét. A rekombináns kromoszómák a meiózis profázisának I szakaszában jöhetnek létre oly módon, hogy a homológ kromoszómapár karjai között átkereszteződés (crossing-over) és kromoszómális szakasz csere történik („törés-újraegyesülés modell”). Így tehát új allélkombinációjú (R, rekombináns) kromoszómák keletkeznek a parentális (P) azaz nem rekombináns, eredeti allélkombinációt hordozó kromoszómák mellett. A rekombinációs gyakoriságot ( $r$ ) úgy kapjuk meg, hogy a rekombináns gaméták összességét osztjuk az összes gaméta számával, azaz  $r = R/P+R$ . A rekombinációs gyakoriság ( $r$ ) kimutatása irányított keresztezésekkel történhet, ahol az utódokból következtethetünk vissza a parentális és rekombináns gaméták gyakoriságára (tesztelő keresztezés, „teszt-cross” segítségével). A gének és markerek a genetikai távolságon kívül, egyéb tulajdonságaikban, például a sorrendjükben is összefüggést mutatnak a rekombinációs gyakoriságokon alapuló kapcsoltsági térképeken és a

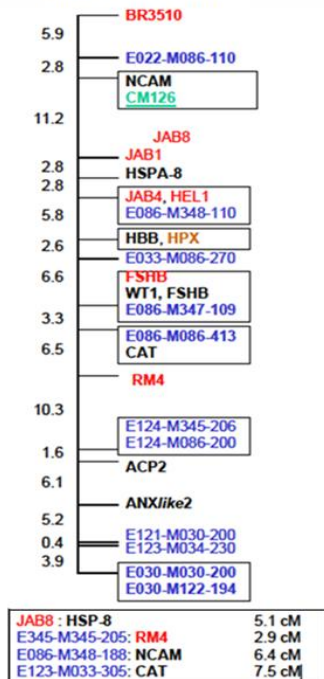


szekvenálás eredményeképpen összeállított fizikai térképeken, vagyis a géntérképi pontok és kromoszómán található lókuszok egymással megfeleltethetők, azonos sorrendben követik egymást. Ezt a jelenséget géntérkép és kromoszóma ko-linearitásának nevezzük. A gímszarvas géntérkép 621 marker pontja 34 kapcsoltsági csoportba rendeződik és 2532 cM hosszúságot ad (*Slate és mtsai., 2002a, 2. ábra*).

## Gímszarvas 1. kromoszóma

*C.e. Linkage group 1, 78,1 cM*

*Bta15, Oar15, Hsa11*



## 2. ábra

Gímszarvas 1. kapcsoltsági csoportja. *Slate és mtsai., 2002a. alapján*

*Figure 2. Red deer Linkage Group 1, based on Slate et al., 2002a.*

A fejlécben a szarvasmarha, a juh és az emberi megfelelő ortológ kromoszóma (számjelzés szerinti) olvasható le, továbbá a linkage group/kapcsoltsági csoport cM hossz értéke. A baloldalon lévő számok az egyes markerek közötti cM-ban megadott távolságok. A különböző színek a markerek típusait különítik el (kék-AFLP, piros-mikroszatellita, zöld-EST, fekete-RFLV/gén, barna-protein). Az alsó boxban feltüntetett markerekről csak azt tudni, hogy szomszédosak, vagyis nem lehet megmondani a pontos pozíciójukat a géntérképen, csupán az egyik szomszédos markertől való távolságukat adták meg.

*The header contains the appropriate orthologous chromosome (numerical) for cattle, sheep and human, and the cM length value for the linkage group (blue AFLP, red microsatellite, green EST, black RFLV/gene, brown protein). The markers in the bottom box only know that they are adjacent, that is, their exact position on the gene map is not known, only their distance from one of the neighboring markers is given.*

A gímszarvas genom összeállítása folyamán a szekvenancia tartalmuk alapján rangsoroltuk a scaffoldokat. A kromoszómába rendezéshez először a kapcsoltsági géntérkép markerpontjait illesztettük a *de novo* scaffoldokhoz, így kaptuk meg a DNS/marker szekvenciát tartalmazó mapmarker vagyis térképpont scaffoldokat (MMSc). Ezáltal a géntérképi pontok kiterjedt (scaffoldnyi) szekvenancia környezetbe kerültek. A következő lépésben a gímszarvas térkép pon-

tok megfelelőit (ortológjait) azonosítottuk a szarvasmarha teljes genom szekvenciában. Azaz az összehasonlító géntérképezési elvet használtunk a gímszarvas adatok felől szarvasmarha megfelelők felé. A géntérképre „feltűzött” gímszarvas DNS szekvenciákat (DNS markereket, térképpontokat) illeszteni lehetett a szarvasmarha teljes genom szekvenciájára. A gímszarvas géntérkép pontjai hosszú szakaszokon azonos sorrendben, ko-lineárisan helyezkedtek el a szarvasmarha genomban is, azaz kiterjedt szinténiákat, lokális kapcsoltságokat tapasztaltunk. A következő lépésben az összehasonlító géntérképezési elvet alkalmaztunk fordított irányban: a szarvasmarha felől a gímszarvas felé. A gímszarvas DNS szekvencia scaffoldokat a szarvasmarha genom azon térképközeihez, szegmenseihez illesztettük, amelyeket az ortológ gímszarvas és szarvasmarha marker szekvenciák (azaz térképpontok) egyaránt meghatároztak, mivel a gímszarvas referencia térképi pontok szekvenciája csaknem megegyezik a két fajban, továbbá ezen pontok sorrendje azonos a két fajban, valamint a térközök/térkép szegmensek hosszai is arányosak, valamint az egyes ortológ gének szekvenciái csaknem azonosak, ezért ezeket az ortológ szarvasmarha géneket használtuk a gímszarvas scaffoldok halászatra a továbbiakban, vagyis az összehasonlító géntérképezési elvet alkalmaztunk a szarvasmarha felől-gímszarvas felé. Az ilyen módon kihálászott scaffoldokat reference gene containing scaffolds-nak (RGSc) neveztük el. Ezután felillesztettük a nem referencia géneket, rRNS, tRNS, miRNS géneket tartalmazó scaffoldokat vagyis az úgynevezett inter reference genes scaffolds-okat (IRGSc). Majd legvégül a megmaradt helyeket feltöltöttük a kimaradt 1999 bp feletti scaffoldokkal (gap filling scaffolds). Minden egyes lépésnél a szarvasmarha genomra illesztett gímszarvas scaffoldokat azonos sorrendben áttöltöttük a gímszarvas géntérkép megfelelő térképi szegmenseibe. Hosszabb DNS szekvenciák illesztésénél a következő programokat ajánlatos használni: MegaBLAST, BWA (MEM), MUMmer, NUCmer, LASTZ.

### ***Centromeron pozíciók meghatározása***

Az eukarióta sejt sejtmagjában található DNS kromoszómákba rendeződik a sejt osztódási ciklusában. A kromoszómákon megfigyelhető elsődleges befűződés a centromeron helye, amely egy rövidebb (p kar) és egy hosszabb (q kar) részre osztja a kromoszómát. A centromeronhoz tapadnak az osztódási orsó húzófonalai, amelyek szétválasztják egymástól a testvér kromatidákat, ill. a kromoszómákat a mitózis illetve a meiózis anafázisa során. Hiánya összeegyeztethetetlen a sejt életével. A centromeron helyzete alapján különböző

morfológiájú kromoszómák jönnek létre. Amikor a centromeron a kromoszóma közepén található metacentrikus (M kromoszóma) kromoszómáról beszélünk. Amennyiben a kromoszóma valamelyik végéhez esik közel a centromeron a kromoszóma akrocentrikus (A kromoszóma). Az extrém végállású centromeronok helyzetét telocentrikusnak (T kromoszóma) nevezzük. A különböző kromoszóma-sávfestési eljárások beszámolnak az aktívan működő kromoszóma részéről és információval szolgálnak az egyes gének helyzetéről. A Giemsa festéssel például a lazább szerkezetű kromatinon (DNS és fehérje komplex) a folyamatosan átíródó gének régiói nem, vagy gyengén festődnek (R sávok). A tömörebb kromoszómális részek, amelyekre nem, vagy csak korlátozott mértékben jellemző a gén expresszió erősen festődő, sötét sávokat adnak a Giemsa festéssel. A centromeronok kompakt szerkezetűek, s emiatt a sötét szegmensként jelennek meg a kromoszómákon. A DNS szekvenciák orientálását nagyban elősegítik a kromoszóma festési eljárásokkal előállított citológiai képek, amelyek megmutatják, hogy akrocentrikus vagy metacentrikus kromoszómáról van-e szó.

A gímszarvas esetében készült ugyan citológiai kép a kromoszómákról, de a centromeronoknak a DNS szekvenciájához és a gének helyéhez való viszonya ez idáig feltáratlan volt. Amiben biztosak voltunk a kariogramok alapján, azaz, hogy a szarvasmarha és a gímszarvas -kromoszómák csaknem mindegyike akrocentrikus. A gímszarvas evolúciós vonalán azonban 7-9 millió évvel ezelőtt kialakult a  $2n=68$  kariotípusú ő, amely két akrocentrikus kromoszóma fúziójának (un. robertsoniális transzlokáció) köszönhetően egy metacentrikus kromoszómáért hozott létre az akrocentrikusok mellett a diploid sejtben. A gímszarvasban ez a metacentrikus 5. kromoszóma. A szarvasok Y kromoszómája ősiükhöz hasonlóan szubmetacentrikus maradt (*Fontana és Rubini, 1990*). A gímszarvas esetében tehát fogódzkodót jelentett a szarvasmarha és a szarvas úgynevezett „sávokra festett” kromoszómáiról készült mikroszkópi képek összehasonlítása, vagyis a gímszarvas versus szarvasmarha sávozott kromoszómák megfeleltetése. Szerencsés körülmény, hogy a gímszarvas metacentrikus (5.) kromoszóma két karja megfeleltethető a szarvasmarha két akrocentrikus (17., 19.) kromoszómájával. A szikaszarvas (amely a gímszarvas egy alfajának is tekinthető) és a szarvasmarha Giemsa festéssel nyert sávmintázatát vizsgáló, citogenetikai komparatív elemzések (*Bonnet és mtsai., 2001*) alapján a két faj teljes kromoszómális homológiát mutat. A szarvasmarhánál korábbi kromoszóma citológiai vizsgálatok jelezték a centromeron pozícióját. A későbbiekben festéssel és in situ DNS hibridizációk alapján meghatározták a centromeronok és a hozzájuk közel eső gének helyzetét (*Ma és*

*mtsai.*, 1996). E géneket már azonosítani tudtuk a szarvasmarha genom szekvenciában, ortológjait pedig gímszarvas genom szekvenciában, CerEla1.0-ban. A két faj ortológ génjeinek szinténiai és a citogenetikai felvételek (a sorba rendezett metafázisos kromoszómák sávmintázatai, (*Bonnet és mtsai.*, 2001) komparatív elemzésével sikerült meghatározni a centromeronok lehetséges helyzetét a géntérképi pontokhoz igazítva mind a 34 gímszarvas kapcsoltsági csoportban. A genetikai térképek segítségével készített pszeudo-kromoszómákon be tudtuk határolni a centromeronok helyét. A centromeronok segítségével megállapítottuk, hogy 6 szarvasmarha kromoszóma kettéhasításával megfeleltethető 12 gímszarvas kromoszóma. Közülök az egyik az akrocentrikus 19. gímszarvas kromoszóma, az 1. szarvasmarha kromoszóma disztális felével feleltethető meg, míg a proximális szakasszal a 31. gímszarvas kromoszóma. Tovább bonyolítja a helyzetet, hogy 19. szarvas kromoszóma őseben egy törés és egy transzlokáció (az alsó és a felső szegmens helyet cserélt) is lejátszódott az evolúció során. Feltártunk még egy paracentrikus inverziót is a 28. gímszarvas kromoszómában és két olyan esetet, amikor egy gímszarvas kromoszóma két szarvasmarha kromoszóma tandem illesztésével magyarázható, azaz minthatha az akrocentrikus gímszarvas kromoszómát kettétörnénk két akrocentrikus szarvasmarha kromoszómává. Az 5. gímszarvas kromoszóma metacentrikusságát citológiai és genomikai bizonyítékok egyaránt igazolták (*Bonnet és mtsai.*, 2001). A 15. gímszarvas akrocentrikus kromoszóma pedig a 28. és a 26. akrocentrikus szarvasmarha kromoszóma fúziójának (un. Robertsoniális fúzió) feleltethető meg (*Bonnet és mtsai.*, 2001).

## **A GENOM PROGRAMOK JELENTŐSÉGE AZ ÁLLATTARTÁSBAN ÉS AZ ÁLLATTENYÉSZTÉSBEN**

Az élőlények teljes genetikai információjának megismerése sokoldalú hasznosítási lehetőséget rejt magában. A genom projektek által megismerhetővé válnak az egyes fajok evolúciós, régészeti és populációgenetikai viszonyai (*Frank és mtsai.*, 2017). Az I típusú (magáért a kitüntetett tulajdonságért felelős gén) és a II típusú (a génhez köthető, azzal együtt öröklődő speciális DNS szakasz) markerek fejlesztését nagyban megkönnyítik a rendelkezésünkre álló teljes genom szekvenciák.

A modern vadgazdálkodásban fontos szerepet tölt be az egyedazonosítás, az apai és anyai vonalak nyomon követése, amely például a szarvasfélék esetében mikroszatellitákkal (*Zsolnai és mtsai.*, 2009, *Szabolcsi és mtsai.*, 2014), illetve mitokondriális markerekkel történik meg. A 10 gímszarvas autoszomális tetranukleotid mikroszatellita lokuszra épülő „parentage

controll kit”, a DeerPlex azonosító ereje 1 a 30 trillióban ( $10^{16}$  nagyságrend) (Szabolcsi és mtsai., 2014). A DeerPlex alkalmazása lehetővé teszi a forenzikus, bűnügyi, vadorzási, régészeti, természetvédelmi és vadgazdálkodási felhasználást is. A gazdaságilag fontos, mennyiségi és minőségi tulajdonságait meghatározó gének, genetikai struktúrák azonosítása is egyszerűbbé válik az elérhető teljes genomoknak köszönhetően. A DNS szintű markerek jól hasznosíthatók származás igazolására, ellenőrzése (tenyészbikák, versenylovak, kutya-tenyésztés).

Az állati termékek előállításánál a környezeti és takarmányozási tényezőkön kívül nagy szerepet kaphatnak a minőséget és mennyiséget befolyásoló, örökíthető, poligénes vagy csupán egyetlen génnel összefüggő genetikai adottságok. Az egyetlen gén által meghatározott tulajdonságok esetében nincs szükség a teljes genom szekvencia ismeretére a markerfejlesztéshez. Ilyenkor elegendő az adott lokuszhoz tartozó strukturális eltérések feltárása. A juhok ovulációs rátáját a 6. kromoszómán elhelyezkedő *FecB* vagy *bmpr-1b* (booroola) egyetlen gén pontmutációja (a kódoló 746-os pozícióban bekövetkezett adenin-guanin cseréje) befolyásolja, amely szuperovulációt, ezáltal nagyobb utódszámot eredményez (Souza és mtsai., 2001). A hústermelő-képesség kapcsán ismert a belga-kék és a piemonti szarvasmarhák culard jellegét (duplafarúság, túlzimoltság) okozó myostatin (MSTN) gén mutációja, amelyet a gén 3. exonjában bekövetkező 11 bázis kiesés (deléció és frameshift), vagy a guanin-adenin illetve cisztein-tirozin cseréje (pontmutáció) idéz elő (Kambadur és mtsai., 1997).

Az egygénes tulajdonságokkal ellentétben a poligénes, kvalitatív és kvantitatív jellegek esetében nagyon előnyös lehet a teljes genom szekvencia vizsgálata. A tej minőségét több komponens határozza meg. A tejfehérje összetétel, a tejmennyiséget és a jól örökíthetőséget mutató tejszírszázalékot többek között olyan nagyhatású gének befolyásolják, mint például a béta-laktoglobulin, kappa-kazein kódoló gének, *dgat1*, *opn*, és *abcg2*. Bioinformatikai módszerekkel lehetőség adódik ezen génekhez kapcsolódó egyponos nukleotid polimorfizmusok (SNP) feltárására és ezáltal irányított tenyésztéssel a tejhozam és minőség fokozására (Raschia és mtsai., 2018).

A gödöllői NAIK-Mezőgazdasági Biotechnológia Kutatóintézetben is folynak genomikai jellegű kutatások, amelyek új-generációs szekvenálási adatokat, teljes genom szekvenciákat használnak fel, illetve hoznak létre *de novo*. Itt hasonlították össze az őshonos mangalica fajták teljes genomját lefedő read szekvenciákat más sertés genomokkal. Ily módon sikerült a mangalica fajtajellegeket meghatározó specifikus szerkezeti különbségeket és SNP-eket azonosí-

tani. Az SNP adatbázisok nagyban segíthetik a mangalica hústermékek kvalitatív és kvantitatív PCR módszerekkel történő eredetigazolását (Molnár és mtsai., 2014). Szintén Gödöllőn zajlanak a magyarországi mézelő méh populáció (pannon méh) (*Apis mellifera carnica pannonica*) teljes genomját feltáró vizsgálatok, amelyeknek célja a varroa szenzitív higiénikus viselkedésért (VSH) felelős QTL régiókhoz kötött mikroszatellita markerek kifejlesztése. A *Varroa destructor* atka által terjesztett méhvírusok a lárvákat támadják meg. A VSH-t mutató méhek eltávolítják ezeket az atkával fertőzött lárvákat a lépsejtekből, ezáltal megelőzik a vírus tovább terjedését. A krajnai méh populáció csupán 2%-ban fordul elő ez a fajta viselkedés (Spötter és mtsai., 2016). A VSH-t meghatározó genetikai markerek detektálása és kifejlesztése hozzájárulhat a VSH-t mutató populációk fenntartásához és szaporításához.

Az 1998-ban induló gímszarvas genom projekt a gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Központ a Kaposvári Egyetem Állattenyésztési, a Bőszenfai Szarvasfarm, az ELTE Genetikai, és a SOTE 1. Belgy. Klinika MSc és PhD programjai összefogásával jött létre. A programtervet Orosz László dolgozta ki, az állattenyésztési és vadgazdálkodási hasznosítást Horn Péter, a klinikai irányt Lakatos Péter jegyezte. Ez Magyarország első emlős genom programja, amelynek keretében elkészült a világ első kromoszómákba rendezett szarvas referencia genomja, amely online is elérhető (Bana és mtsai., 2018; valamint az NCBI genom adattárában a MKHE00000000 azonosítószámmal megadva, [Link](#)). A gímszarvas teljes genom szekvencia ismerete számtalan lehetőséget rejt magában. Egy ezek közül a kapitális agancs genetikai hátterének feltárása, ami nem csupán vadgazdálkodási és vadászati szempontból lehet érdekes, hanem orvosbiológiai nézőpontból is. A gímszarvas agancs egyedülálló szerv, amely az éves agancs ciklus során lehullik, és újra épül, ezzel az élővilág legnagyobb mértékű csontnövekedését produkálja, miközben a gímszarvas bika fiziológiás oszteoporózist szenved el. A vázcsont ásványi anyag vesztését a nyári dőhőség alatt pótolja vissza az állat úgy, hogy őszre, a bőgés idejére jó kondícióba kerül, és tekintélyes agancsot rak fel, amely a váz csontozat 25-30%-val megegyező csonttömeget jelent. A csontfejlődésben szerepet játszó gének promóter régióinak vizsgálata során azt találta kutatócsoportunk, hogy bizonyos gének (például *COL1A1*) 1 és 5 kilobázispáros promóter régiójában több *runx2* transzkripciófaktor kötőhely található a gímszarvasban, mint az emberben vagy a szarvasmarhában, s talán emiatt is, ezek a gének aktívabban működnek a gímszarvasban (Stéger és mtsai., 2010). A teljes genom szekvenciák nagy előnye, hogy az élőlény összes genetikai információját helyes sorrendben tartalmazzák, ezáltal megkönnyítik a laboratóriumi munkát, a kutatás-fejlesztést és nem utolsósorban az állattenyésztést. Az online elérhető haszonállat

referencia genom adatbázisokból megtudhatjuk az adott genomra vonatkozó legfontosabb információkat és le is tölthetjük azokat

## 1. táblázat

Néhány fontosabb haszonállat teljes referencia genom adatai. (NCBI alapján; [Link](#))

Név	Fajta	Nem	Kromoszóma szám (n)	Szekvenálási technika	Legfrissebb verzió	Genom hossz	Fehérje kódoló
Házi macska ( <i>Felis catus</i> )	Abesszin	♀	18+X+MT	PacBio; 454 Titanium; Illumina; Sanger	Felis_catus_9.0 (2017)	2,52	19748
Kutya ( <i>Canis lupus familiaris</i> )	Boxer	♀	38+X+MT	Sanger	CanFam3.1 (2011)	2,41	20039
Szarvasmarha ( <i>Bos taurus</i> )	Hereford	♀	29+X+MT	PacBio; Illumina NextSeq 500/HiSeq/Gall	ARS-UCD1.2 (2018)	2,72	21039
Juh ( <i>Ovis aries</i> )	Rambouillet	♀	26+X+MT	HiSeq X Ten; PacBio RS II	Oar_rambouillet_v1.0 (2017)	2,87	21160
Ló ( <i>Equus caballus</i> )	Telivér	♀	31+X+MT	Sanger; Illumina HiSeq; PacBio	EquCab3.0 (2018)	2,51	21129
Sertés ( <i>Sus scrofa</i> )	Duroc	♀	18+X/Y+MT	PacBio	Sscrofa1.1 (2017)	2,5	2079
Nyúl ( <i>Oryctolagus</i> )	Thorbecke	♀	21+X+MT	ABI	OryCun2.0 (2009)	2,74	20547
Baromfi ( <i>Gallus gallus</i> )	Bankivatyúk (UCD001)	♀	33+W/Z+MT	Pacific Biosciences RSII	GRCg6a (2018)	1,07	17477
Ponty ( <i>Cyprinus</i> )	-	-	50+MT	-	common carp genome (2014)	1,71	49579
Méh ( <i>Apis mellifera</i> )	(DH4)	♂	16+MT	PacBio; 10X Chromium; Bionano	Amel_HAV3.1 (2018)	0,23	9935

Table 1. Complete reference genome data for some major livestock. based on NCBI; [Link](#)

## KÖVETKEZTETÉSEK

A genomika és a bioinformatika nagy hatást gyakorol az orvostudományra, a mezőgazdaságra és a környezetvédelemre egyaránt. Az élőlények teljes genetikai információjának a megismerése a genom szekvenálási módszereknek köszönhetően lehetségessé válik. A haszonállatok teljes referencia genomjának összeállításához szükséges módszertani ismeretek megkönnyítik a célnak megfelelő bioinformatikai programok kiválasztását és paraméterezését. A már régóta rendelkezésre álló és az újonnan összeállított, annotált referencia genomokban szintén bioinformatikai programok felhasználásával lehetőség nyílik az egyedi vagy a fajtára jellemző genetikai struktúrák azonosítására, a mennyiségi és minőségi tulajdonságokat meghatározó lokuszok megkeresésére, és

a különböző betegségekkel vagy éppen a velük szembeni rezisztenciával kapcsolatba hozható genomi részek megtalálására. Az ilyen módon megismert DNS markerek szekvenciáira primereket, azonosító kiteket lehet fejleszteni a laboratóriumi munka során. A markerekre kifejlesztett kiteket alkalmazhatják a bűnygyben, a természetvédelemben, a vadgazdálkodásban, az állattenyésztésben és az élelmiszeriparban is.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

## IRODALOM

- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Letöltve: [Link](#)
- Bana, N.Á., Nyíri, A., Nagy, J., Frank, K., Nagy, T., Stéger, V., Schiller, M., Lakatos, P., Sugár, L., Horn, P., Barta, E., Orosz, L. (2018). The red deer *Cervus elaphus* genome CerEla1.0: sequencing, annotation, genes, and chromosomes. *Mol. Genet. Genom.*, 293(3), 665-684. DOI: [10.1007/s00438-017-1412-3](#)
- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., *et al.* (2008). Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature*, 456, 53-59. DOI: [10.1038/nature07517](#)
- Bonnet, A., Thévenon, S., Claro, F., Gautier, M., Hayes, H. (2001). Cytogenetic comparison between Vietnamese sika deer and cattle: R-banded karyotypes and FISH mapping. *Chromosome Res* 9, 673-687. DOI: [10.1023/a:1012908508488](#)
- de la Bastide, M., McCombie, W.R. (2007). Assembling genomic DNA sequences with PHRAP. *Curr Protoc Bioinformatics.*, 17(1), 11.4.1-11.4.15. DOI: [10.1002/0471250953.bi1104s17](#)
- Dovichi, N.J., Zhang, J. (2000). How Capillary Electrophoresis Sequenced the Human Genome. *Angew Chem Int Ed Engl.*, 39(24), 4463-4468. DOI: [10.1002/1521-3773\(20001215\)39:24<4463::aid-anie4463>3.0.co;2-8](#)
- Fleischmann, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M, *et al.* (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*, 269(5223), 496-512. DOI: [10.1126/science.7542800](#)
- Fontana, F., Rubini, M. (1990). Chromosomal evolution in Cervidae. *Biosystems*, 24(2), 157-174. DOI: [10.1016/0303-2647\(90\)90008-o](#)
- Frank, K., Bleier, N., Tóth, B., Sugár, L., Horn, P., Barta, E., Orosz, L., Stéger, V. (2017). The presence of Balkan and Iberian red deer (*Cervus elaphus*) mitochondrial DNA lineages in the Carpathian Basin. *Mammal Biol.*, 86, 48-55. DOI: [10.1016/j.mambio.2017.04.005](#)
- Gnerre, S., MacCallum, I., Przybylski, D., Ribeiro, F.J., Burton, J.N., Walker, B.J., Sharpe, T., Hall, G., Shea, T.P., Sykes, S., Berlin, A.M., Aird, D., Costello, M., Daza, R., Williams, L., Nicol, R., Gnirke, A., Nusbaum, C., Lander, E.S., Jaffe, D.B. (2011). High-quality draft assemblies of mammalian genomes from massively parallel sequence data. *Proc Natl Acad Sci.*, 108(4), 1513-1518. DOI: [10.1073/pnas.1017351108](#)
- Gyurján, I., Molnár, A., Borsy, A., Stéger, V., Hackler, L., Zomborszky, Z., Papp, P., Duda, E., Deák, F., Lakatos, P., Puskás, L.G., Orosz, L. (2007). Gene expression dynamics in deer antler: mesenchymal



- differentiation toward chondrogenesis. *Mol Genet Genomics*, 277(3), 221–235. DOI: [10.1007/s00438-006-0190-0](https://doi.org/10.1007/s00438-006-0190-0)
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T.P., Bass, J.J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.*, 7(9), 910–915. DOI: [10.1101/gr.7.9.910](https://doi.org/10.1101/gr.7.9.910)
- Lewin, H.A., Robinson, G.E., Kress, W.J., Baker, W.J., Coddington, J., Crandall, K.A., Durbin, R., Edwards, S.V., Forest, F., Gilbert, M., Goldstein, M.M., Grigoriev, I.V., Hackett, K.J., Haussler, D., Jarvis, E.D., Johnson, W.E., Patrinos, A., Richards, S., Castilla-Rubio, J.C., van Sluys, M.A., Zhang, G. (2018). Earth BioGenome Project: Sequencing life for the future of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(17), 4325–4333. DOI: [10.1073/pnas.1720115115](https://doi.org/10.1073/pnas.1720115115)
- Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. [Link](#)
- Ma, R.Z., Beever, J.E., Da, Y., Green, C.A., Russ, I., Park, C., Heyen, D.W., Everts, R.E., Fisher, S.R., Overton, K.M., Teale, A.J., Kemp, S.J., Hines, H.C., Guérin, G., Lewin, H.A. (1996). A male linkage map of the cattle (*Bos taurus*) genome. *J Hered.*, 87(4), 261–271. DOI: [10.1093/oxfordjournals.jhered.a022999](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a022999)
- Maxam, A.M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci.*, 74(2), 560–4. DOI: [10.1073/pnas.74.2.560](https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560)
- Molnár, J., Nagy, T., Stéger, V., Tóth, G., Marincs, F., Barta, E. (2014). Genome sequencing and analysis of Mangalica, a fatty local pig of Hungary. *BMC Genomics*, 15(1), Article: 761. 1–12. DOI: [10.1186/1471-2164-15-761](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-761)
- Niedringhaus, T.P., Milanova, D., Kerby, M.B., Snyder, M.P., Barron, A.E. (2011). Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal. Chem.*, 83(12), 4327–4341. DOI: [10.1021/ac2010857](https://doi.org/10.1021/ac2010857)
- Pevsner, J. (2015). *Bioinformatics and functional genomics*. John Wiley & sons inc., UK. pp 1124.
- Raschia, M. A., Nani, J. P., Maizoon, D. O., Beribe, M. J., Amadio, A. F., és Poli, M. A. (2018). Single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with milk yield in Argentinean Holstein and Holstein x Jersey cows. *Journal of Animal Science and Technology*, 60(1), Article: 31. 1–10. DOI: [10.1186/s40781-018-0189-1](https://doi.org/10.1186/s40781-018-0189-1)
- Rusk, N. (2011). Torrents of sequence. *Nat. Methods*, 8(1), 44. DOI: [10.1038/nmeth.f.330](https://doi.org/10.1038/nmeth.f.330)
- Sanger, F., Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol.*, 94(3), 441–448. DOI: [10.1016/0022-2836\(75\)90213-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2)
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 74(12): 5463–5467. DOI: [10.1073/pnas.74.12.5463](https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463)
- Shulaev, V., Sargent, D., Crowhurst, R. *et al.* (2011). The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nat Genet.*, 43(2), 109–116. DOI: [10.1038/ng.740](https://doi.org/10.1038/ng.740)
- Slate, J., Van Stijn, T.C., Anderson, R.M., McEwan, K.M., Maqbool, N.J., Mathias, H.C., Bixley, M.J., Stevens, D.R., Molenaar, A.J., Beever, J.E., Galloway, S.M., Tate, M.L. (2002). A deer (subfamily Cervinae) genetic linkage map and the evolution of ruminant genomes. *Genetics*, 160(4), 1587–1597.
- Souza, C.J., MacDougall, C., MacDougall, C., Campbell, B.K., McNeilly, A.S., Baird, D.T. (2001). The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. *J Endocrinol.*, 169(2), R1–6. DOI: [10.1677/joe.0.169r001](https://doi.org/10.1677/joe.0.169r001)
- Spötter, A., Gupta, P., Mayer, M., Reinsch, N., Bienefeld, K. (2016). Genome-wide association study of a Varroa-specific defense behavior in honeybees (*Apis mellifera*). *Journal of Heredity*, 107(3), 220–227. DOI: [10.1093/jhered/esw005](https://doi.org/10.1093/jhered/esw005)
- Stéger, V., Molnár, A., Borsy, A., Gyurján, I., Szabolcsi, Z., Dancs, G., Molnár, J., Papp, P., Nagy, J., Puskás, L., Barta, E., Zomborszky, Z., Horn, P., Podani, J., Semsey, S., Lakatos, P., Orosz, L. (2010). Antler development and coupled osteoporosis in the skeleton of red deer *Cervus elaphus*: expression dynamics for regulatory and effector genes. *Mol Genet Genomics*, 284(4), 273–287. DOI: [10.1007/s00438-010-0565-0](https://doi.org/10.1007/s00438-010-0565-0)

- Stein, L. (2001). Genome annotation: from sequence to biology. *Nat. Rev. Genet.*, 2(7), 493–503. DOI: [10.1038/35080529](https://doi.org/10.1038/35080529)
- Sutton, G.G., White, O., Adams, M.D., and Kerlavage, A.R. (1995). TIGR Assembler: A new tool for assembling large shotgun sequencing projects. *Genome Sci. Technol.*, 1(1), 9-19. DOI: [10.1089/gst.1995.1.9](https://doi.org/10.1089/gst.1995.1.9)
- Szabolcsi, Z., Egyed, B., Zenke, P., Padar, Z., Borsy, A., Steger, V., Pasztor, E., Csanyi, S., Buzas, Z., Orosz, L., (2014). Constructing STR multiplexes for individual identification of Hungarian red deer. *J. Forensic Sci.*, 59(4), 1090-1099. DOI: [10.1111/1556-4029.12403](https://doi.org/10.1111/1556-4029.12403)
- Wang, B., Ekblom, R., Bunikis, I., Siitari, H., Höglund, J. (2014). Whole genome sequencing of the black grouse (*Tetrao tetrix*): reference guided assembly suggests faster-Z and MHC evolution. *BMC genomics*, 15(1), Article: 180. 1-13. DOI: [10.1186/1471-2164-15-180](https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-180)
- Zsolnai, A., Lehoczky, I., Gyurmán, A., Nagy, J., Sugár, L., Anton, I., Horn, P., Magyary, I. (2009). Development of eight-plex microsatellite PCR for parentage control in deer. *Arch. Tierz.*, 52(2), 143-149. DOI: [10.5194/aab-52-143-2009](https://doi.org/10.5194/aab-52-143-2009)



## Feed efficiency, nutrient sensing and feeding stimulation in aquaculture: a review

Csaba Hancz \*

Kaposvár University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, H-7400 Kaposvár, Guba S. 40.

**ABSTRACT** - Ameliorating of feed efficiency always was and will remain the key element of aquaculture in which minimalizing losses during feed intake play an important role. Decreasing feed losses important not only from the economic point of view but also from an environmental standpoint. Feeding stimulants are often used additives in complete aquaculture feeds. Better knowledge of the food-sensing of cultured species is essential in the development of adequate feeding stimulants. The present paper aims to overview the nutrient-sensing of aquatic animals and the use of the wide variety of feeding attractants and stimulants.

**Keywords:** feeding, feed efficiency, food sensing, attractants, stimulants

### INTRODUCTION

Global aquaculture production showed impressive growth in the last decades. According to FAO statistics it reached 110.2 million tons in 2016 that included 80.0 million tons of food fish and 30.1 million tons of aquatic plants. Based on the assumption of higher demand and technological improvements, total world fish production (capture plus aquaculture, excluding aquatic plants) is expected to continue to expand over the course of the projection period to reach 201 million tons in 2030. The major growth in production is expected to originate from aquaculture, which is projected to reach 109 million tons in 2030. Capture fisheries production (inland and marine) is stagnating around 90 million tons since 2011 while farm-raised fish and shrimp will account for nearly two-thirds of seafood consumption worldwide by 2030 (FAO, 2018). Since sustainability continues to be a concern, development in aquaculture must adopt a holistic philosophy such it appears in the ecosystem approach to aquaculture (EAA) that may play an important role in the future “blue growth” (Brugère *et al.*, 2018).

Innumerable studies aimed to give information about the feed utilization were carried on for fish and other cultured species in the last decades because of the simple fact that feed and feeding comprise determining part of production costs in aquaculture. There are numerous ways of achieving a better feed efficiency, a key element of the impressive growth of aquaculture achieved in

\*CORRESPONDING AUTHOR

Kaposvár University

✉ H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40., ☎ +36-82-505-800

E-mail: hancz.csaba@ke.hu

the last decades. Extensive development of compound feeds based on more sophisticated knowledge of nutrient requirements of more and more aquaculture species (*Webster and Lim, 2002*) certainly played an important role in this process as well as detailed and accurate theoretical models of fish metabolism (*Braaten, 1979; Smith, 1980; Kaushik and de Olivia-Teles, 1985; Tytler and Calow, 1985; Kaushik, 1986; Johnston and Dunn, 1987; Dietz et al., 2013; Jobling, 1998; Clarke and Johnston, 1999; Bureau et al., 2002; Stadtlander et al., 2013*). The great majority of the literature on feed efficiency discusses traditionally the simplest indicators, that is feed conversion ratio (FCR) or its inverse, feed efficiency ratio (FER) calculated as the simple ratio of input and output or vice versa, where the feed is the input and the output is the weight gain. Better digestibility of nutrients means lower FCR so a determination of apparent digestibility coefficient (ADC) makes part of nowadays' feeding studies (*Grisdale-Helland et al., 2013; Heinitz et al., 2015*). Although the determination of ADC doesn't have a generally used, standardized method till now, it has many advantages over measuring correctly the metabolizable energy of nutrients of fish foods or industrial feeds (*Lovell, 1989*). Based on these theoretical grounds, continuously tested in the practice, very intense development of the feed industry has emerged. Up-to-date complete feeds have to satisfy all physiological requirements of the targeted age-group of the cultured species and also the special demands of the technology version applied. To meet these goal feed additives are used in feed formulation from the beginnings of the modern aquaculture industry. According to *Tacon (1987)* feed additives are substances which are added in trace amounts to a diet or feed ingredient with the following purposes: 1) to preserve its nutritional characteristics prior to feeding (antioxidants and mold inhibitors), 2) to facilitate ingredient dispersion or feed pelleting (emulsifiers, stabilizers, and binders), 3) to foster growth (growth promoters, including antibiotics and hormones), 4) to facilitate feed ingestion and consumer acceptance of the product (feeding stimulants and food colorants), or 5) to supply essential nutrients in purified form (vitamins, minerals, amino acids, cholesterol, and phospholipids). Although some criticism may be justified about the logic of the above classification, it summarizes quite well the feed additives and their purposes. The choice of feed additives has changed a lot in the last decades as accompanying the goal of long-term profitability, environmental, economic and social sustainability started to gain more and more emphasis. Natural feed additives proved to be efficient, reducing the need for medicated treatments, decrease metabolic waste production and improve fillet quality (*Gonçalves and Santos, 2017*). Pre- and probiotics became routinely used as well as special feed additives like exogenous enzymes

(Hardy, 2000; Cerezuola et al., 2011; Kazerani and Shahsavani, 2011; Ganguly et al., 2013; Carnevali et al., 2017) or phytic acid (Liu et al., 2017). Application of phytochemicals that can affect fish health, growth and feed utilization is also spreading as extensive use of antibiotics has encouraged the evolution of resistant bacteria (Chakraborty and Hancz, 2011; Chakraborty et al., 2013). *Encarnaçãõ* (2016) gives an up-to-date summary of feed additives and introduces a new category of feeds called functional feeds for compound aquaculture feeds made with additives for ameliorating the animals' performance and improving intestinal health, stress, and disease resistance.

The goal of the present paper was to overview the nutrient-sensing of aquatic animals and the use of feeding attractants and stimulants, a somewhat neglected group of feed additives.

## FEED EFFICIENCY, FOOD INTAKE, AND NUTRIENT SENSING

### Feed efficiency

For optimizing feed efficiency qualitative and quantitative nutrient requirements of the producing organisms have to be met parallelly. However developing the most economically producible feed that satisfies the nutritional requirements of a given age-group of the cultured species continues to be among the primary goals of the aquaculture industry, other aspects of decreasing feeding costs – related to certain details of feeding technology – also are important.

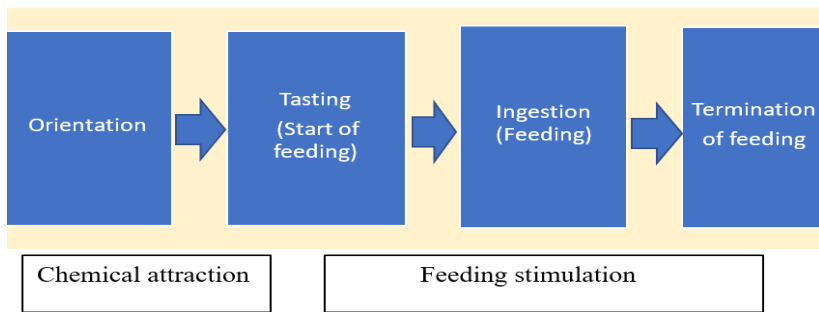
Minimizing feeding loss, which from a broader point of view contains the indigestible part as well as all metabolic losses, is crucial but we must not forget the simple fact that one, not a negligible fraction of the offered feed is uneaten. Uneaten part of the feed is varying a lot but can be estimated at about 10% on average (Craig, 2009). Experimental determination of the not ingested feed can be tried with the help of some indicator as it was done by Park et al. (2019) using the added 17 B-estradiol in feed for American eel in recirculating aquaculture system (RAS) where uneaten part of feed ranged between 7-13%. The feed that is not consumed within a reasonable time represents an economic loss and also deteriorate water quality, so feed ration, feeding method, and water stability of the feed have to be considered. Commercial feed pellets have to remain intact in water until being consumed which is especially important for slow feeding aquaculture species such as shrimp (Lovell, 1991). Use of binders as feed additives to ensure water stability is a basic practice for a long time (Tacon, 1987) but does not solve all problems of feed loss. Find appropriate feeding frequency is the most efficient way in decreasing not only

this direct loss but also in lowering FCR so published feeding rate tables are available for most commonly cultured species (Craig, 2009). Nowadays a great variety of automatic feeders are obtainable for programmed feed delivery in cages, raceways, ponds, and RAS operations, to ensure optimal feeding. Information about the actual feed loss and so optimizing the feeding regime can greatly be facilitated by using monitoring systems in the future, like the one experimented by Parra *et al.* (2018) who describe a sophisticated sensory system for adjusting the feed supply. Adequate feeding schedule, aiming to minimize feed losses is the base of every technological version applied in aquaculture, however, developing it needs many-sided problem-solving. Problems start with the precise determination of feed intake. Houlihan *et al.* (2001) edited a whole book of 415 pages discussing in 14 chapters the different aspects of food intake in fish from feed composition to management of feeding. Knowledge of factors influencing the ingestion of feed certainly can lead to improved growth performance and feed utilization by decreasing the amount of waste per unit of fish produced. Difficulties related to determining the exact amount of consumed feed is treated, among many others, by Lovell (1991), Jobling (1998) and Sayer (1998). The palatability of feed is remaining a key question in aquaculture which is discussed among others by Glencross *et al.* (2007) who point out that fish must be given the opportunity to refuse feed, in experiments aiming to determine ADC. This aspect is especially important in a much broader aspect since the use of alternatives of fish meal (FM) and fish oil (FO), having unfavorable organoleptic and/or antinutritive properties, became a general practice. Although the number of alternative protein sources of animal origin is also increasing (Pucher *et al.*, 2006; Wei *et al.*, 2015; NOAA/USDA, 2011; Magalhães *et al.*, 2017) the plant origin group predominated by soybean products remain pivotal. Alternatives of soybean are also heavily investigated nowadays (Hien *et al.*, 2016; Teuling *et al.*, 2017) and this trend certainly will continue in the future.

### **Chemoreception and food sensing**

Neuro-hormonal control of chemoreception of teleost fish is well studied (Vahl, 1979; Hara, 1992; Hara, 1994; Michel, 2006; Volkoff, 2016; Conde-Sieira and Soengas, 2017; Delgado *et al.*, 2017; Morais, 2017; Rønnestad *et al.*, 2017) which cannot be declared about lower taxa involved in aquaculture (Lindstedt, 1971). In farming two concepts of chemosensory aspects of food and their potential effects on feeding behavior have to be taken into account: chemical attraction and feeding stimulation. Both affect aquaculture productivity but in different ways.

The basic steps of feeding behavior are illustrated in Figure 1.



**Figure 1.** Basic steps of feeding behavior (Modified after Lindstedt, 1971)

Attractants in feed lead to faster feeding and a reduction in feed wastage, improving water quality and eventually reducing feeding costs. Feeding stimulants affect satiation and therefore modulate the total amount of ingested food. Multiple sensorial stimuli are involved in feeding but evidence suggests that tasting plays a more important role than olfaction in the feeding behavior of fish (Morais, 2017). Fish use olfaction and gustation to distinguish between similar types of food and evolved multiple sets of feeding behaviors (Jones, 1992; Valentinčič, 2005). Olfaction and gustation detect overlapping sets of somewhat common metabolic products from which amino acids are the most important. Crustaceans use antennular chemoreception to identify food (Derby 2000; Derby et al., 2001) locating it from a distance in which amino acids and nucleotides are two major sets of molecules that they use. While olfaction is organized to adaptively integrate information associated with a wide range of chemical stimuli for various functions (reproduction, migration, schooling) gustation is specialized for sensitivity and localization of food source (Derby and Sorensen, 2008). There is a paucity in studies like made by Kasumyan and Tinkova (2013) who examined the taste attractiveness of different hydrobionts for three different fish species or by Olsén and Lundh, (2016) who tested the reception of agar pellets prepared with extracts of mussel meat, koi carp feed and a commercial cyprinid bait on crucian carp. However, some excellent behavioral studies were made for intensively produced species testing various, broadly applied feeding stimulants as betaine and taurine (Carlberg et al., 2015; Lim et al., 2016 (a, b). Miyasaki and Harada (2002) carried out a sophisticated estimation of feeding stimulation activity of sugars and nucleic acid-related compounds on four fish and one mollusk species. *Alves*

*et al.* (2020) investigated the attractiveness and palatability of liquid protein hydrolysates for Nile tilapia. Five experimental diets were formulated containing 5% inclusion of fishmeal (FPE; positive control), 5% inclusion of liquid protein hydrolysate of porcine mucosa (PHM), 5% inclusion of liquid protein hydrolysate of poultry (PHF), 5% inclusion of liquid fish oil (OPE) and a diet without fishmeal (negative control). The same amount of pellets was offered and the following feeding behaviors were evaluated with the aid of three-minute footages per feeding. All diets presented negative palatability indexes in comparison to FPE.

The attraction of fish has major importance also in angling, a worldwide popular hobby sustaining an enormous and very lucrative industry offering, among others, a great variety of baits and bait flavorings. For example, a firm (*Cathedralbaits.com*) offers more than sixty varieties of flavorings from lemon to tuna for common carp baits that are all of plant or animal origin. This seems to be an exaggerated number, notwithstanding the common carp is a highly adaptive omnivorous fish and might be attracted by many feeding stimuli. However, as it will be seen later, the number of scientifically tested feed aroma materials of natural origin is significantly less.

## FEEDING STIMULANTS

Knowledge of the feeding behavior of the fish or shrimp is essential in maximizing the ingestion of the offered feed. The diet presented must have a suitable appearance in size, shape, color, texture, density (buoyancy) and attractiveness (smell or taste) for eliciting an optimal feeding response. Of course, the relative importance of these traits depends on whether the given fish or shrimp species is mainly a visual or a chemosensory feeder, as *Tacon* (1987) summarizes the basic principles about feeding stimulants. Maximal intake of the offered feed is generally of major importance in all kinds of aquaculture practice, however, in special cases, the use of feed attractants and diet palatability are particularly critical. Lower palatability of high plant-based diets already was mentioned but medicated feed formulation is also an area where the use of attractants is essential (*Toften and Jobling, 1997*) as well as the weaning of fish larvae from a living to a non-living diet. Smoltification depression of salmon is also an example of special cases (*Clarke et al., 1994; Toften et al., 2003*).

Potential and already routinely applied attractants and stimulants cannot be classified into distinct groups according to olfaction and gustation because these subsequent phases of feeding behavior and their role differs by species.



Classification of feeding stimulants, differentiating natural and artificial origin, used by *Tacon* (1987) seemed to be acceptable, although it has to be stressed that in the great majority of studies discussed here materials of both classes were jointly tested. (References in *Tacon* (1987) will not be discussed here).

### Feeding stimulants from natural ingredient sources

Feed ingredients with specific attractant properties for shrimp and marine fish are squid meal, mussel flesh, shrimp meal and waste, clam flesh, marine polychaete worms, certain terrestrial oligochaete worms, marine fish oils, fish meal, fish solubles, fish protein hydrolysates, and soybean protein hydrolysates (*Tacon*, 1987). As it was already mentioned the replacement of dietary fish meal with plant protein is a long-lasting trend in aquaculture that certainly will be continued as FM resources are limited. Consequently, lower feed intake and reduced growth caused by reducing the dietary FM level remains a problem to cope with. Some decades ago, it was a professional commonplace that FM contains an unknown growth factor (UGF) which is acting on fish *Andrews and Page* (1974) and also on poultry *Bjørnstad et al.* (1974); *Opstvedt and Gjesfossen* (1975). Since that time lots of “unknowns” of this factor became “knowns”. *Takakuwa et al.* (2019) found that feeding stimulatory effect of jack mackerel muscle extract on greater amberjack depended mainly on inosine monophosphate (IMP) while inosine, adenosine monophosphate (AMP), adenosine diphosphate (ADP), and adenosine triphosphate (ATP) less affected relative feed intake (RFI). *Senzui et al.* (2020) studied the mRNA expression response of neuropeptide Y (NPY), an orexigenic hormone to the detection of a fish meal soluble fraction (FMS), including smell and/or taste of FM, through the sensory organs (olfaction and gustation) in yellowtail *Seriola quinqueradiata* and found that smell and/or taste of FM might regulate brain NPY mRNA expression in the short term. Products made of fish flesh and fish processing by-products with putative attractant effect are frequently used feed additives. *Oliveira and Cyrino* (2004) tested six levels of fish silage and soluble fish protein together with Fisharon™, a feeding stimulant containing 12% of cod liver oil and 87% of corn oil on largemouth bass fed on plant protein-based feed. They found no significant effect of these stimulants on the main performance traits, moreover, not any interpretable trend of the attractant dosages was observed. *Hirt-Chabbert et al.* (2011) found that incorporations of yeast-based and marine-based feedings stimulants into a pelleted diet had a beneficial effect on the overall performance of European glass eels and elvers. Moreover, in glass eels, 60 g kg<sup>-1</sup> marine-based stimulant promoted the maturation of the digestive

function during the weaning process but had no effects on growth performance in elvers. The use of feed ingredients made of invertebrates has also a long history and their stimulant effect was evaluated many times. *Kader et al.* (2010) investigated the effects of fish soluble (FS), krill meal (KM), squid meal (SM) and crystalline amino acids (CAA) mixed to feeds in which 60% FM protein was substituted by soybean protein. It was concluded that that supplementation of FS, KM, and SM is as effective as CAA to maintain amino acid balance and can act as attractants in high soybean protein concentrate (SPC) based diets for maintaining normal feeding behavior, growth performance, health and welfare of juvenile red sea bream. Attractant effect of krill meal incorporated in different feeds for pacific white shrimp was evaluated by *Sanchez et al.* (2005) who found that attraction depended on the ratio of krill meal and also on the type of other protein sources in the feeds. *Chatzifotis et al.* (2009) investigated the effect of dietary additives on growth and feed efficiency of sea bream (*Sparus aurata*) fry fed a fishmeal-based diet. The additives (protorsan - (Sopropeche®), hydrolyzed fish protein, squid meal, krill meal, and betaine + inosine-5'-monophosphate) were added to the diets at the expense of fishmeal. (Protorsan is a bacterial protein concentrate generated as a byproduct of the production of L-glutamic acid.) Significant differences in final body weight and SGR rate were detected only between the protorsan and control groups and the squid additive group, in favor of the squid meal, while no significant differences were observed in FCR. *Kim and Cho* (2019) tested the effects of 5% of replacement in the control diet (Con) 55% anchovy meal content by jack mackerel, sardine, Pollack, squid, and shrimp meals referred to as the JM, SM, PM, SQM and SHM diets, respectively on the growth, feed utilization, condition factor (CF) and whole-body composition of rockfish. They found that the greatest weight gain, amount of feed supply and CF of rockfish were obtained in the JM diet, followed by the SM, PM, SQM, SHM and Con diets, in order, while feed efficiency, protein efficiency ratio and protein retention was not affected by the experimental diets, as well as proximate composition of the whole body of fish, except for ash content. *Toften et al.* (2003) found that squid extract is a feeding stimulant for salmonids, and added to feed at 5 g kg<sup>-1</sup> improves the performance of salmon in the parr-smolt transformation period. Squid extract was also tested by *Xue et al.* (2004) on gibel carp and was expected to enhance the palatability and feeding rate of diets with or without meat and bone meal but its effect was not found significant. Sea clam (ocean quahog *Arctica islandica*) processing by-products and betaine were tested as feeding stimulants on sunshine bass fed on fishmeal and soy-based diets. It

was found that the addition of betaine did not improve diet acceptance or intake. However, the inclusion of sea clam by-products, particularly dried clam fines, improved the intake of the reduced fish meal formulation appear to be effective feeding stimulants in soy-based feeds for juvenile sunshine bass (Barry *et al.*, 2016).

Algae, especially microalgae, *inter alia*, are commercially viable raw material sources for aquaculture (Slaski and Franklin, 2011) containing valuable nutrients and also bioactive compounds (Holdt and Kraan, 2011). However, their feeding stimulant effects were little studied and only on invertebrate species. Angell *et al.* (2012) carried out a very thorough study on the feeding preferences and the nutritional value of tropical algae for the abalone *Haliotis asinine*. According to their findings, preference based on nutrition is not a paradigm for all abalone but the overriding factors influencing the feeding preferences are the physical and chemical defenses of algae, both of which can be diminished through the use of carrageenan bound diets. Moreover, mixed algal diets may only reach an optimal amino acid profile if methionine and by histidine is supplemented in diet formulation. Palatability of diets improved by incorporating feeding stimulants from marine plants was investigated on sea urchin *T. gratilla* by Dworjanyan *et al.* (2007) who found that total protein or energy in the plants did not account for preference. When three artificial diets were made by incorporating dried *Ecklonia radiata*, *Sargassum linearifolium* and *Ulva lactuca* at 5% sea urchins ate more than twice as much the artificial diet containing *S. linearifolium* compared to the control diet containing no algae in a choice feeding experiment. In a no-choice feeding experiment, they consumed significantly more of the *Ecklonia* and the *Sargassum* diets than the control diet despite each of the diets containing approximately the same protein and energy levels. Eventually, it was concluded that the small amounts of palatable seaweed added to the artificial diets act as feeding stimulants, increasing the acceptability of artificial diets, boosting the protein and energy consumption, and significantly increasing the growth of sea urchin.

### **Purified or synthetic substances as feeding stimulants**

Widespread application of feeding stimulants belonging to this category is based on a vast number of studies that clarified the basics of olfaction and gustation of aquatic (and non-aquatic) animals, aspects soundly discussed by Morais (2017). Although feeding stimulants for herbivorous and carnivorous fish are generally different (Adams and Johnsen, 1986) amino acids (AAs) play a key role in food sensing in both groups. Carr *et al.* (1996) determined the main

components in extracts of tissues of 10 species of marine fishes and 20 species of mollusks and crustaceans concluding that two of the major tissue components (Gly and Ala) in these groups are also the two most frequently cited feeding stimulants in 35 teleost species. Mollusks and crustaceans contain high concentrations of five of the most frequently cited stimulants in carnivorous fish (Gly, Ala, Pro, Arg, and betaine). On the other hand, for the herbivorous *Tilapia zillii*, the major stimulatory AAs (Glu, Asp, Ser, Lys, and Ala) are also particularly abundant in romaine lettuce, a plant which they normally consume (Adams *et al.*, 1988).

Mackie and Mitchell (1983) tested the effects of feeding stimulants on juvenile European eels, *Anguilla anguilla* and found that mixtures of L-amino acids were stimulatory, while neither the corresponding D-amino acids nor the non-amino acid components were effective. Synergistic effects were also observed both between L-amino acids and between L-amino acids and non-amino acid constituents. Takeda *et al.* (1984) compared the feeding stimulant effect of a synthetic extract, based on the composition of the marine worm *Perinereis brevicirrus* with, AAs, nucleotides and other compounds (including taurine, betaine, maltose among others) for juvenile eel, *Angilla japonica*. Fish showed a marked preference for a diet flavored with the synthetic extract over an unflavored diet and the extract showed that the fraction of the amino acid was most stimulatory, followed by the "other compounds", while the nucleotides fraction including adenosine-5' -monophosphate was inactive or repellent. The active constituent in the amino acid fraction was identified as the fraction glycine, alanine, proline plus histidine whose activity was found to be comparable to that of the complete synthetic extract. A similar methodology was used by Takaoka *et al.* (1995) who studied feeding stimulants for the tiger puffer *Takifugu rubripes* testing synthetic extract of clam *Tapes japonicus*. The amino acid fraction showed remarkably higher feeding stimulant activity than those of nucleotide and other chemical fractions in the extract. Among 18 chemicals in the amino acid fraction, L-serine, L-aspartic acid, glycine, and L-alanine showed slightly higher activity than deionized water, but lower than the amino acid fraction. The mixture of the above four amino acids plus betaine showed a markedly higher feeding stimulant activity than that of the synthetic extract, indicating the synergistic effect. The positive supplement level of the four amino acids plus betaine was found to be that corresponding to 100 g of clam muscle per 100 g of casein diet. L-arginine is considered efficacious when used as a flavoring compound in animal nutrition in general (EFSA, 2018). Chen *et al.* (2016) investigated the effects of dietary arginine levels on growth performance, body composition, serum biochemical indices and resistance ability

against ammonia-nitrogen stress in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). The results suggested that dietary arginine level at 2.81% could optimize the anti-ammonia-nitrogen stress ability of juvenile fish, while performance traits were also at 3.23% arginine level that seemed to depress the growth performance and also their tolerance to the ammonia-nitrogen stress. Supplementation of feeds with AAs is of the primary importance of shrimp and fish feeds that was surveyed by Nunes *et al.* (2014) from point of view of nutrient requirements. The major conclusion of this review is that the appropriate supplementation of crystalline AAs in feeds for fish and shrimp gives an opportunity to reduce formulation costs, a concern that certainly has precedence over attractiveness. Several different types of substances, besides free AAs, have been recognized as attractive to fish including quaternary amines such as betaine (glycine betaine, trimethylglycine). Application of betaine in aquaculture feeds has a long history and vast literature. Mackie and Mitchell (1982) found that the feeding stimulant requirement of the Dover sole was very specific and only betaine and dimethylthetin proved to be effective. Yeşilayer and Kaymak (2020) investigated the effect of partial replacement of dietary fish meal by soybean meal with betaine attractant supplementation on juvenile rainbow trout and concluded that 1% betaine supplementation with dietary incorporation of soybean meal at 25% level positively influenced growth performance, feed utilization and fatty acid profiles of rainbow trout juveniles. The last two studies mentioned above are indicating that that the prosperous era of betaine commencing in the eighties of the last century is continuing until these days. This era also would be named after FinnStim, a trademarked product consisting of 97% betaine supplemented with 3% protein hydrolysate. A quick Google Scholar search resulted in more than 150 scores on FinnStim that may give an idea about the vastness of the related literature, which, obviously, cannot be overviewed here. Some studies were aimed to find alternatives for betaine as for example that of Zou *et al.* (2017) who evaluated the effects of four feeding stimulants on feed intake (FI), growth performance, body composition, serum biochemical parameters, digestive enzyme activities and appetite-related gene expression for juvenile genetically improved farmed tilapia tilapia. Five experimental high plant-based diets (with 0, 0.4 g kg<sup>-1</sup> dimethyl-β-propiothetin (DMPT), 0.6 g kg<sup>-1</sup> dimethylthetin (DMT), 1.8 g kg<sup>-1</sup> tryptophan (Trp) and 6 g kg<sup>-1</sup> betaine (Bet), respectively supplemented) were fed to juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis sp.*). The results showed that FI was significantly increased by Trp and DMT. The highest specific growth rate (SGR) and protein efficiency ratio (PER) was observed for fish fed Bet diet, followed by DMT. The

neuropeptide Y (NPY) mRNA expression in the brain was significantly improved by Trp, and ghrelin mRNA expression in the stomach was significantly increased by DMT. It is concluded that the supplementation of Trp or DMT could act as an effective feeding that might be associated with the relatively higher orexigenic (NPY or ghrelin) gene expression. Supplementation of Bet could improve SGR, PER and reduce feed conversion ratio (FCR). Betaine has been the most effective substance by far, for all the species studied and especially for soleids but at too high a cost, so *Reig et al.* (2003) evaluated by an ethological methodology the use of a bivalve commercial flavor as an alternative to betaine in sole diets and found that it may be considered a viable alternative to betaine.

*Li and Gatlin* (2006) gave a sound overview of the roles of nucleotides and metabolites in fish diets. It was stressed that possible involvement in diet palatability, fish feeding behavior and biosynthesis of non-essential amino acids, exogenous nucleotides have shown promise most recently as dietary supplements to enhance immunity and disease resistance of fish produced in aquaculture. However, there are numerous gaps in existing knowledge about exogenous nucleotide application to fish including various aspects of digestion, absorption, metabolism, and influences on various physiological responses especially the expression of immunogenes and modulation of immunoglobulin production. *Ringø et al.* (2012) in their thorough review don't even mention feeding stimulation in relation to nucleotides. *Lim et al.* (2016b) evaluated the potential of betaine, taurine, inosine (INO), inosine 5'-monophosphate disodium (IMP·Na<sub>2</sub>), and guanosine 5'-monophosphate disodium (GMP·Na<sub>2</sub>) as a feeding stimulant for juvenile marble goby (*Oxyeleotris marmoratus*) through behavioural assays using agar gel pellets. The pure agar gel pellet was totally rejected by the fish (0 % ingestion rate). Of all the chemical substances tested at 0.1 M concentration, the ingestion rates of both INO and IMP·Na<sub>2</sub> were the highest (both 100 %) and were significantly higher than those of the other chemical substances tested. However, INO was identified as the most potent feeding stimulant as it could function perfectly (100 %) even at the lower concentrations tested (0.01 and 0.001 M). Taurine was not a feeding stimulant, and betaine was neither a feeding stimulant nor feed enhancer for the juvenile *O. marmoratus*. *Xia et al.* (2019) studied the influence of different proportions of 5'-inosine monophosphate (IMP) and 5'-guanosine monophosphate (GMP) on growth, feed digestibility and activity of digestive enzymes of turbot *Scophthalmus maximus*. Weight gain and daily feed intake were significantly higher in fish fed with IMP or GMP, in comparison with fish fed with neither IMP nor

GMP. The growth of 0.05% IMP + 0.05% GMP group was the best, and the intestinal digestive function was improved. The addition of IMP and GMP to fish diets significantly increased the apparent feed digestibility of dry matter and protein, as well as intestinal protease activity. The optimal level of dietary IMP was 1 g/kg, which is in line with most of the growth performance and feed digestibility.

The most important studies on feeding stimulants are summarized in Table 1.

## CONCLUSIONS

Improving feed efficiency is an evergreen topic in aquaculture research and practice. Balanced complete feeds are available for more and more cultured species satisfying requirements in different developmental phases. Completing feeds also include supplementation with feed additives from which feeding stimulants are must-have.

Better knowledge of food sensing of aquatic animals helps to find the appropriate attractants and stimulants for increasing feed's palatability. Better palatability means more efficient feed intake. Diminishing feed losses is pivotal both from an economic and environmental protection point of view.

Traditional feeding stimulants are the natural ingredients that have an attractive effect and improve the palatability of feeds. The use of fish processing by-products, squid meal, mussel flesh, shrimp meal and waste, clam flesh, etc. is a viable option in developing palatable feeds economically.

Purified or synthetic substances as feeding stimulants were developed on the basis of intense research for identifying the compounds responsible for the attractive effects of the above-mentioned ingredients of natural origin. Use of crystalline AAs is an everyday practice in feed manufacturing to ensure the adequate biological value of the protein content however special mixtures of selected AAs can serve as an effective attractant.

Betain is keeping its important role among feeding stimulants even if the era of FinnStim seems to be ended. Using of nucleotoids in aquaculture feeds is a very promising possibility however their stimulant function is questionable.

**Table 1**  
The most important studies on feeding stimulants

Feeding stimulant (FS)	Species	Notable findings	References
<b>FS from natural ingredient sources</b>			
Fish muscle extract	<i>Seriola dumerili</i>	Attractiveness depended mainly on inosine monophosphate content.	Takakuwa et al. (2019)
Fish meal soluble fraction	<i>Seriola quinqueradiata</i>	FM might regulate brain (NPY), an orexigenic hormone expression.	Senzai et al. (2020)
Yeast-based and marine-based FS	<i>Anguilla anguilla</i>	Both FS had a beneficial effect on the overall performance.	Hirt-Chabbert et al. (2011)
Fish soluble (FS), krill meal (KM), squid meal (SM), crystalline amino acids (CAA)	<i>Pagrus major</i>	Supplementation of FS, KM, and SM is as effective as CAA on feeding behavior and growth performance.	Kader et al. (2010)
Hydrolyzed fish protein, squid meal, krill meal, and betaine + inosine-5'-monophosphate, protorsan (Sopropeche®)	<i>Sparus aurata</i>	Final body weight and SGR rate were bigger: one protorsan than on control and on squid additive than on squid meal.	Chatzifotis et al. (2009)
Squid extract	<i>Salmo salar L.</i>	5 g/kg improves the performance in the parr-smolt transformation. Its effect was not found significant.	Toften et al. (2003) Xue et al. (2004)
<b>Purified or synthetic substances</b>			
Amino acids	<i>Tilapia zillii</i> , <i>Anguilla anguilla</i> , <i>Anguilla japonica</i> , <i>Toxifugu rubripes</i> , <i>shrimp species</i>	Improved feed intake and performance.	Adams and Johnsen (1986), Mackie and Mitchell (1983), Takeda et al. (1984), Takeda et al. (1994), Nunes et al. (2014)
Betaine	<i>Solea solea</i> , <i>Oncorhynchus mykiss</i> , ( <i>Oreochromis sp.</i> )	Improved feed intake, growth performance and feed utilization.	Mackie and Mitchell (1982), Yesilayer and Kaymak (2020), Zou et al. (2017)
FinnStim	<i>(Oncorhynchus tshawytscha)</i>	1% in feed stimulated the growth and reduced plasma Na concentration.	Clark et al. (1994)
Bivalve commercial flavor	<i>Solea solea</i>	0.5% applied externally on feed improved the feed intake.	Reig et al. (2003)



## ACKNOWLEDGEMENTS

The work is supported by the EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 project. The project is co-financed by the European Union and the European Social Fund.

## REFERENCES

- Adams, M. A. and Johnsen, P. B. (1986). A solid matrix bioassay for determining chemical feeding stimulants. *The Progressive Fish-Culturist*, 48(2), 147–149. DOI: [10.1577/1548-8640\(1986\)48<147:asmbfd>2.0.co;2](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1986)48<147:asmbfd>2.0.co;2)
- Adams, M. A., Johnsen, P. B. and Zhou, H-Q. (1988). Chemical enhancement of feeding for the herbivorous fish *Tilapia zillii*. *Aquaculture*, 72(1-2), 95–107. DOI: [10.1016/0044-8486\(88\)90150-0](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90150-0)
- Alves, D. R. S., Oliveira, S. R., Luczinski, T. G., Boscolo, W. R., Bittencourt, F., Signor, A., and Detsch, D. T. (2020). Attractability and palatability of liquid protein hydrolysates for Nile tilapia juveniles. *Aquac. Res.*, 51(4), 1681–1688. DOI: [10.1111/are.14514](https://doi.org/10.1111/are.14514)
- Andrews, J. W. and Page, J. W. (1974). Growth Factors in the Fish Meal Component of Catfish Diets. *The Journal of Nutrition*, 104(8), 1091–1096. DOI: [10.1093/jn/104.8.1091](https://doi.org/10.1093/jn/104.8.1091)
- Angell A.R., Pirozzi I., de Nys R., Paul N.A. (2012). Feeding preferences and the nutritional value of tropical algae for the abalone *Haliotis asinina*. *PLoS ONE*. 7(6), e38857. DOI: [10.1371/journal.pone.0038857](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038857)
- Barry, K. J., McClure, R. L. and Trushenski, J. T. (2017). Sea clam-derived feeding stimulants enhance acceptability and intake of reduced fish meal, soy-based sunshine bass feeds. *N Am J Aquac.*, 79(1), 115–122. DOI: [10.1080/15222055.2016.1243600](https://doi.org/10.1080/15222055.2016.1243600)
- Bjørnstad, J., Opstvedt, J. and Lunde, G. (1974). Unidentified growth factors in fish meal: Experiments with organic arsenic compounds in broiler diets. *Br. Poult. Sci.*, 15(5), 481–487. DOI: [10.1080/00071667408416136](https://doi.org/10.1080/00071667408416136)
- Braaten, B.R. (1979). Bioenergetics – a review on methodology. *Finfish Nutrition and Fishfeed Technology*, Ed. Halver and Tiews, Berlin. Vol II. 461–504.
- Brugère, C., Aguilar-Manjarrez, J., Beveridge, M. C. M. and Soto, D. (2019). The ecosystem approach to aquaculture 10 years on - a critical review and consideration of its future role in blue growth. *Rev Aquac.*, 11, 493–514. DOI: [10.1111/raq.12242](https://doi.org/10.1111/raq.12242)
- Bureau, D.P., Kaushik, S.J. and Cho, C.Y. (2002). Bioenergetics. In: *Fish Nutrition 3rd ed.* ed by J.E. Halver and R.W. Hardy. Academic Press San Diego. USA. pp: 1-59.
- Carlberg, H., Cheng, K., Lundh, T. and Brännäs, E. (2015). Using self-selection to evaluate the acceptance of a new diet formulation by farmed fish. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 171, 226–232. DOI: [10.1016/j.applanim.2015.08.016](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2015.08.016)
- Carnevali, O., Maradonna, F. and Gioacchini, G. (2017). Integrated control of fish metabolism, wellbeing and reproduction: The role of probiotic. *Aquaculture* 472, 144–155. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2016.03.037](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.03.037)
- Carr, W. E. S., Netherton, III, J. C., Gleeson, R. A. and Derby, C. D. (1996). Stimulants of feeding behavior in fish: Analyses of tissues of diverse marine organisms. *The Biological Bulletin*, 190(2), 149–160. DOI: [10.2307/1542535](https://doi.org/10.2307/1542535)
- Cathedralbaits.com [Link](#)
- Cerezuela, R., Meseguer, J. and Angeles E. (2011). Current knowledge in synbiotic use for fish aquaculture. *A Review. J. Aquac. Res. Dev.*, s1, 1-7. DOI: [10.4172/2155-9546.s1-008](https://doi.org/10.4172/2155-9546.s1-008)

- Chakraborty, S.B. and Hancz, Cs. (2011). Application of phytochemicals as immunostimulant, antipathogenic and antistress agents in finfish culture. *Rev Aquac.*, 3(3), 103–119. DOI: [10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x](https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2011.01048.x)
- Chakraborty, S.B., Horn, P. and Hancz, C. (2014). Application of phytochemicals as growth-promoters and endocrine modulators in fish culture. *Rev Aquac.*, 6(1) 1–19. DOI: [10.1111/raq.12021](https://doi.org/10.1111/raq.12021)
- Chatzifotis, S., Arias, M.V., Papadakis, I.E. and Divanach, P. (2009). Evaluation of feed stimulants in diets for sea bream (*Sparus aurata*). *Isr J Aquac.*, 61(4), 315–321.
- Chen, Q., Zhao, H., Huang, Y., Cao, J., Wang, G., Sun, Y. and Li, Y. (2016). Effects of dietary arginine levels on growth performance, body composition, serum biochemical indices and resistance ability against ammonia-nitrogen stress in juvenile yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). *Anim Nutr.*, 2(3), 204–210. DOI: [10.1016/j.aninu.2016.07.001](https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.07.001)
- Clarke, A. and Johnson, N.M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J. Anim. Ecol.* 68(5), 893–905. DOI: [10.1046/j.1365-2656.1999.00337.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1999.00337.x)
- Clarke, W. C., Virtanen, E., Blackburn, J. and Higgs, D. A. (1994). Effects of a dietary betaine/amino acid additive on growth and seawater adaptation in yearling chinook salmon. *Aquaculture*, 121(1-3), 137–145. DOI: [10.1016/0044-8486\(94\)90015-9](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90015-9)
- Conde-Sieira, M. and Soengas, J.L. (2017). Nutrient sensing systems in fish: impact on food intake regulation and energy homeostasis. *Front. Neurosci.*, 10, Article 603. 1-21. DOI: [10.3389/fnins.2016.00603](https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00603)
- Craig, S. (2009). Understanding fish nutrition, feeds and feeding. Virginia Cooperative Extension, Publication 420-256. [Link](#)
- Delgado, M.J., Cerdá-Reverter, J.M. and Soengas, J.L. (2017). Hypothalamic integration of metabolic, endocrine, and circadian signals in fish: involvement in the control of food intake. *Front. Neurosci.*, 11, Article 354. 1-29. DOI: [10.3389/fnins.2017.00354](https://doi.org/10.3389/fnins.2017.00354)
- Derby, C. D. (2000). Learning from spiny lobsters about chemosensory coding of mixtures. *Physiol. Behav.*, 69(1-2), 203–209. DOI: [10.1016/s0031-9384\(00\)00202-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(00)00202-x)
- Derby, C. D. and Sorensen, P. W. (2008). Neural Processing, Perception, and Behavioral Responses to Natural Chemical Stimuli by Fish and Crustaceans. *J. Chem. Ecol.*, 34(7), 898–914. DOI: [10.1007/s10886-008-9489-0](https://doi.org/10.1007/s10886-008-9489-0)
- Derby, C. D., Steullet, P., Horner, A. J. and Cate, H. S. (2001). The sensory basis to feeding behavior in the Caribbean spiny lobster *Panulirus argus*. *Mar. Freshw. Res* 52(8), 1339–1350. DOI: [10.1071/mf01099](https://doi.org/10.1071/mf01099)
- Dietz, C., Stiller, K.T., Griese, M., Schilz and C., Susenbeth, A. (2013). Influence of salinity on energy metabolism in juvenile turbot, *Psetta maxima* (L.). *Aquac Nutr.*, 19(1), 135–150. DOI: [10.1111/anu.12034](https://doi.org/10.1111/anu.12034)
- Dworjany, S. A., Pirozzi, I. and Liu, W. (2007). The effect of the addition of algae feeding stimulants to artificial diets for the sea urchin *Tripneustes gratilla*. *Aquaculture*, 273(4), 624–633. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2007.08.023](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.08.023)
- Encarnaç o, P. (2016). Functional feed additives in aquaculture feeds. pp. 217–237. In *Aquafeed Formulation*. Biomin Singapore Pte Ltd, Singapore
- EFSA (2018). Opinion on the safety and efficacy of L-arginine produced by fermentation with *Escherichia coli* NITE BP-02186 for all animal species. *EFSA Journal* 16(5):5276, 1-21. DOI: [10.2903/j.efsa.2018.5276](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5276)
- FAO (2018). The State of World Fisheries and Aquaculture. [Link](#)
- Ganguly, S., Dora, K., Sarkar, S., and Chowdhury, S. (2013). Supplementation of prebiotics in fish feed: a review. *Rev Fish Biol Fisheries*, 23(2), 195–199. DOI: [10.1007/s11160-012-9291-5](https://doi.org/10.1007/s11160-012-9291-5)

- Glencross, B.D., Booth, M. and Allan G.L. (2007). A feed is only as good as its ingredients - a review of ingredient evaluation strategies for aquaculture feeds. *Aquac Nutr.*, 13(1). 17–34. DOI: [10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2007.00450.x)
- Gonçalves, R. and Santos, G. (2017). Feed Additives for Profitable, Sustainable Aquaculture. BIOMIN Holding GmbH, Getzersdorf, Austria. pp 20. [Link](#)
- Grisdale-Helland, B., Takle, H. and Helland, S. J. (2013). Aerobic exercise increases the utilization efficiency of energy and protein for growth in Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture*, 406-407, 43–51. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2013.05.002](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.05.002)
- Hara, T. J. (1994). The diversity of chemical stimulation in fish olfaction and gustation. *Rev Fish Biol Fisheries*, 4(1), 1–35. DOI: [10.1007/bf00043259](https://doi.org/10.1007/bf00043259)
- Hara, T.J. (1992). (ed.) Fish chemoreception. Springer, Dordrecht. DOI: [10.1007/978-94-011-2332-7](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2332-7)
- Hardy, R.W. (2000). New developments in aquatic feed ingredients, and potential of enzyme supplements. In: Cruz-Suarez et al (eds.) *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola* 19-22 Noviembre 2000. Mérida Yucatán Mexico. 216-226.
- Heinitz, M. C., Lemme, A. and Schulz, C. (2015). Measurement of digestibility in agastric fish based on stripping method - apparent nutrient, energy and amino acid digestibilities of common feed ingredients for carp diets (*Cyprinus carpio*). *Aquac Nutr.*, 22(5), 1065–1078. DOI: [10.1111/anu.12324](https://doi.org/10.1111/anu.12324)
- Helland, S.J., Grisdale-Helland, B. and Nerland, S. (1996). A simple method for the measurement of daily feed intake of groups of fish in tanks. *Aquaculture*, 139(1-2), 157–163. DOI: [10.1016/0044-8486\(95\)01145-5](https://doi.org/10.1016/0044-8486(95)01145-5)
- Hien, T. T. T., Phu, T. M., Tu, T. L. C., Tien, N. V., Duc, P. M. and Bengtson, D. A. (2016). Effects of replacing fish meal with soya protein concentrate on growth, feed efficiency and digestibility in diets for snakehead, *Channa striata*. *Aquac. Res.*, 48(6), 3174–3181. DOI: [10.1111/are.13147](https://doi.org/10.1111/are.13147)
- Hirt-Chabbert, J. A., Skalli, A., Young, O. A. and Gisbert, E. (2011). Effects of feeding stimulants on the feed consumption, growth and survival at glass eel and elver stages in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquac Nutr.*, 18(2), 152–166. DOI: [10.1111/j.1365-2095.2011.00883.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2011.00883.x)
- Holdt, S.L. and Kraan, S. (2011). Bioactive Compounds in Seaweed: Functional Food Applications and Legislation. *J Appl Phycol*, 23(3), 543-597. DOI: [10.1007/s10811-010-9632-5](https://doi.org/10.1007/s10811-010-9632-5)
- Hossain, M. S., Koshio, S. and Kestemont, P. (2019). Recent advances of nucleotide nutrition research in aquaculture: a review. *Rev Aquac.*, 12(2), 1028-1053. DOI: [10.1111/raq.12370](https://doi.org/10.1111/raq.12370)
- Houlihan, D., Bouiard, T. and Jobling, M., eds. *Food Intake in Fish*. (2001). Iowa State University Press. Blackwell Science Ltd. pp. 418.
- Jobling, M. (1998). Feeding and nutrition in intensive fish farming. In *Biology of farmed fish*. Black and Pickering (eds.) Sheffield Academic Press. 1998. ISBN 1-85075-877-8
- Johnston, I.A. and Dunn, J. (1987) Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Symp Soc Exp Biol*, 41, 67-93.
- Jones, K.A. (1992). Food search behaviour in fish and the use of chemical lures in commercial and sports fishing. *Fish Chemoreception*, 288–320. DOI: [10.1007/978-94-011-2332-7\\_14](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2332-7_14)
- Kader, M. A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S. and Bulbul, M. (2010). Supplemental effects of some crude ingredients in improving nutritive values of low fishmeal diets for red sea bream, *Pagrus major*. *Aquaculture*, 308(3-4), 136–144. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2010.07.037](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.07.037)
- Kasumyan, A. O. and Tinkova, T. V. (2013). Taste attractiveness of different hydrobionts for roach *Rutilus rutilus*, bitterling *Rhodeus sericeus* amarus, and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Ichthyol.* 53(7), 499-508. DOI: [10.1134/s0032945213040024](https://doi.org/10.1134/s0032945213040024)
- Kaushik, S. J. (1986). Environmental effects on feed utilization. *Fish Physiol Biochem.*, 2(1-4), 131–140. DOI: [10.1007/bf02264081](https://doi.org/10.1007/bf02264081)

- Kaushik, S. J. and de Oliva Teles, A. (1985). Effect of digestible energy on nitrogen and energy balance in rainbow trout. *Aquaculture*, 50(1-2), 89–101. DOI: [10.1016/0044-8486\(85\)90155-3](https://doi.org/10.1016/0044-8486(85)90155-3)
- Kazerani, H.R. and Shahsavani, D. (2011). The effect of supplementation of feed with exogenous enzymes on the growth of common carp. *Iran. J. Vet. Res.*, 12(2), 127-132.
- Kim, H. S. and Cho, S.H. (2019). Dietary inclusion effect of feed ingredients showing high feeding attractiveness to rockfish (*Sebastes schlegelii* Hilgendorf 1880) on the growth performance, feed utilization, condition factor and whole body composition of fish (II). *Comp. Biochem. Physiol. Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 231, 66-76. DOI: [10.1016/j.cbpa.2019.01.011](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.01.011)
- Kronveit, R.I., Bendiksen, E.A. and Aunsmo, A. (2014). Field monitoring of feed digestibility in Atlantic salmon farming using crude fiber as an inert marker. *Aquaculture*, 426-427, 249-255. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2014.02.015](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.02.015)
- Li, P. and Gatlin, D.M. (2006). Nucleotide nutrition in fish: Current knowledge and future applications. *Aquaculture*, 251(2-4):141-152. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2005.01.009](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.01.009)
- Lim, L.-S., Chor, W.-K., Tuzan, A.D., Shapawi, R. and Kawamura, G. (2016a). Betaine is a feed enhancer for juvenile grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*) as determined behaviourally. *J. Appl. Anim. Res.*, 44(1), 415-418. DOI: [10.1080/09712119.2015.1091329](https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1091329)
- Lim, L.-S., Lai, S.-K. J., Yong, A. S.-K., Shapawi, R. and Kawamura, G. (2016b). Evaluation on the potential of betaine, taurine, nucleotide and nucleoside as feeding stimulant for juvenile marble goby *marmoratus* through behavioural assays. *Int Aquat Res.*, 8(2), 161–167. DOI: [10.1007/s40071-016-0131-4](https://doi.org/10.1007/s40071-016-0131-4)
- Lindstedt, K.J. (1971). Chemical control of feeding behavior. *Comp. Biochem. Physiol.*, Vol. 39A: 553-581.
- Liu, L.W., Liang, X.-F., Li, J., Yuan, X.C., Fang, J.G. (2017). Effects of supplemental phytic acid on the apparent digestibility and utilization of dietary amino acids and minerals in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquac Nutr.*, 24(2), 850-857. DOI: [10.1111/anu.12614](https://doi.org/10.1111/anu.12614)
- Lovell R. T. (1989). *Nutrition and feeding of fish*. Van Nostrand Reinhold; New York. pp. 260.
- Lovell, R.T. (1991). *Nutrition of aquaculture species*. *J. Anim. Sci.*, 69, 4193-4200.
- Mackie, A.M. and Mitchell, A. I. (1983). Studies on the chemical nature of feeding stimulants for the juvenile European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *J. Fish Biol.*, 22(4), 425-430. DOI: [10.1111/j.1095-8649.1983.tb04764.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1983.tb04764.x)
- Mackie, A.M. and Mitchell, A.I. (1982). Further studies on the chemical control of feeding behaviour in the Dover Sole, *Solea solea*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 73(1), 89–93. DOI: [10.1016/0300-9629\(82\)90097-4](https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90097-4)
- Magalhães, R., Sánchez-López, A., Leal, R.S., Oliva-Teles, A. and Peres, H. (2017). Black soldier fly (*Hermetia illucens*) pre-pupae meal as a fish meal replacement in diets for European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 476, 79-85. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2017.04.021](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.04.021)
- Michel, W. C. (2006). Chemoreception. in *The Physiology of Fishes*. ed. by David H. Evans, James B. Claiborne, Suzanne Currie, 3rd ed., CRC Press Taylor & Francis, pp. 471 – 497.
- Miyasaki T. and Harada, K. (2002). Feeding attractants and stimulants for aquatic animals. *Fish Sci.*, 68(sup2), 1406–1409. DOI: [10.2331/fishsci.68.sup2\\_1406](https://doi.org/10.2331/fishsci.68.sup2_1406)
- Morais S. (2017). The physiology of taste in fish: potential implications for feeding stimulation and gut chemical sensing. *Rev. Fish. Sci. Aquac.*, 25(2), 133-149. DOI: [10.1080/23308249.2016.1249279](https://doi.org/10.1080/23308249.2016.1249279)
- NOAA/USDA (2011). NOAA Technical Memorandum NMFS F/SPO-124. The Future of Aquafeeds. [Link](#)
- Nunes, A. J. P., Sá, M. V. C., Browdy, C. L. and Vazquez-Anon, M. (2014). Practical supplementation of shrimp and fish feeds with crystalline amino acids. *Aquaculture*, 431, 20–27. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2014.04.003](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2014.04.003)

- Oliveira, A. M. B. de M. S. de and Cyrino, J. E. P. (2004). Attractants in plant protein-based diets for the carnivorous largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Sci Agric.*, 61(3), 326–331. DOI: [10.1590/s0103-90162004000300015](https://doi.org/10.1590/s0103-90162004000300015)
- Olsén, K. H. and Lundh, T. (2016). Feeding stimulants in an omnivorous species, crucian carp *Carassius carassius* (Linnaeus 1758). *Aquac. Rep.*, 4, 66–73. DOI: [10.1016/j.aqrep.2016.06.005](https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2016.06.005)
- Opstvedt, J. and Gjefsen, T. (1975). Unidentified growth factors in fish meal: effects of low levels of fish meal in diets for breeder broiler hens. *Poult. Sci.*, 54(6), 2054–2065. DOI: [10.3382/ps.0542054](https://doi.org/10.3382/ps.0542054)
- Papatryphon, E. and Soares, J. H. (2001). Optimizing the levels of feeding stimulants for use in high-fish meal and plant feedstuff-based diets for striped bass, *Morone saxatilis*. *Aquaculture*, 202(3-4), 279–288. DOI: [10.1016/s0044-8486\(01\)00778-5](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(01)00778-5)
- Park, Y., Alayafi, A., Bennett, J. L., Malloy, D., Smith, P. M., Ross, N. W., Gagnon, G. A. and Donaldson, A. A. (2019). Modeling the fate of dietary 17 $\beta$ -estradiol and its metabolites in an American eel (*Anguilla rostrata*) recirculating aquaculture system. *Aquac Eng.*, 86, 101995, 1-8. DOI: [10.1016/j.aquaeng.2019.101995](https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2019.101995)
- Parra, L., García, L., Sendra, S. and Lloret, J. (2018). The use of sensors for monitoring the feeding process and adjusting the feed supply velocity in fish farms. *J. Sensors*, 2018, 1–14. DOI: [10.1155/2018/1060987](https://doi.org/10.1155/2018/1060987)
- Pucher, J., Ngoc, T.N., ThiHanYen, T., Mayrhofer, R., El-Matbouli, M., Focken, U. (2014) Earthworm meals fishmeal replacement in plant based feeds for common carp in semi-intensive aquaculture in rural Northern Vietnam. *Turkish J. Fish. Aquat. Sci.*, 14, 557-565.
- Reig, L., Ginovart, M. and Flos, R. (2003). Modification of the feeding behaviour of sole (*Solea solea*) through the addition of a commercial flavour as an alternative to betaine. *Aquat. Living Resour.*, 16(4), 370–379. DOI: [10.1016/s0990-7440\(03\)00062-7](https://doi.org/10.1016/s0990-7440(03)00062-7)
- Ringø, E., Olsen, R.E., Vecino, J.L.G., Wadsworth, S. and Song, S.K. (2012). Use of immunostimulants and nucleotides in aquaculture: a review. *J Marine Sci Res Development* 2(1), 1000104, 1-22. DOI: [10.4172/2155-9910.1000104](https://doi.org/10.4172/2155-9910.1000104)
- Rønnestadt, I., Gomes A.S., Murashita K., Angotzi R., Jönsson E. and Volkoff H. (2017). Appetite-controlling endocrine systems in teleosts. *Front. Endocrinol.*, 8, article73, 1-24. DOI: [10.3389/fendo.2017.00073](https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00073)
- Sanchez, D. R., Fox, J. M., Lawrence, A. L., Castille, F. L. and Dunsford, B. (2007). A Methodology for Evaluation of Dietary Feeding Stimulants for the Pacific White Shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J World Aquac Soc.*, 36(1), 14–23. DOI: [10.1111/j.1749-7345.2005.tb00126.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2005.tb00126.x)
- Sayer, M.D.J. (1998). Manipulating fish behavior. in *Biology of farmed fish*. Black and Pickering (eds.) Sheffield Academic Press. 1998. ISBN 1-85075-877-8
- Senzui, A., Masumoto, T. and Fukada, H. (2019). Neuropeptide Y expression in response to sensory organ-detected fish meal soluble components and orally fed fish meal-based diet in yellowtail *Seriola quinqueradiata*. *Aquaculture*, 514, 734512. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.734512](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734512)
- Slaski, R. J. and Franklin, P. T. (2011). A review of the status of the use and potential to use micro and macroalgae as commercially viable raw material sources for aquaculture diets. Report commissioned by SARF, pp. 94. [Link](#)
- Smith, L.S. (1980). Digestion in teleost fish. Aquaculture development and coordination programme. Fish feed technology. FAO [Link](#)
- Stadtlander, T., Khalil, W.K., Levavi-Sivan, B., Kerem, Z., Dweik, H., Qutob, M., Abu-Lafi, S., Focken, U. and Becker, Z. (2013). Effects of saponin fractions from fenugreek and the soap bark tree in the diet on performance of Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Planta Med.*, 79(13), SL-64. DOI: [10.1055/s-0033-1351889](https://doi.org/10.1055/s-0033-1351889)

- Tacon, A.G.J., (1987). The nutrition and feeding of farmed fish and shrimp - A training manual. FAO, Brasilia, Brazil. [Link](#)
- Takakuwa, F., Masumoto, T, Toshiro and Haruhisa, F. (2019). Identification of feeding stimulants for greater amberjack *Seriola dumerili* in muscle tissue of jack mackerel *Trachurus japonicus*. *Fish Sci.*, 85(2), 387-395. DOI: [10.1007/s12562-018-01285-w](https://doi.org/10.1007/s12562-018-01285-w)
- Takaoka, O., Takii, K., Nakamura, M., Kumai, H. and Takeda, M. (1995). Identification of feeding stimulants for tiger puffer. *Fish Sci.*, 61(5), 833-836. DOI: [10.2331/fishsci.61.833](https://doi.org/10.2331/fishsci.61.833)
- Takeda, M., Takii, K. and Matsui, K. (1984). Identification of feeding stimulants for juvenile eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 50(4), 645–651. DOI: [10.2331/suisan.50.645](https://doi.org/10.2331/suisan.50.645)
- Teuling, E., Wierenga, P. A., Schrama, J. W. and Gruppen, H. (2017). Comparison of protein extracts from various unicellular green sources. *J. Agric. Food Chem.*, 65(36), 7989–8002. DOI: [10.1021/acs.jafc.7b01788](https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01788)
- Toften, H. and Jobling, M. (1997). Feed intake and growth of Atlantic salmon, *Salmo salar* L., fed diets supplemented with oxytetracycline and squid extract. *Aquac Nutr.* 3(3), 145-151. DOI: [10.1046/j.1365-2095.1997.00081.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2095.1997.00081.x)
- Toften, H., Arnesen, A. M. and Jobling, M. (2003). Feed intake, growth and ionoregulation in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts in relation to dietary addition of a feeding stimulant and time of seawater transfer. *Aquaculture*, 217(1-4), 647–662. DOI: [10.1016/s0044-8486\(02\)00404-0](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(02)00404-0)
- Tytler, P. and Calow, P. (1985). In "Fish energetic: New Perspectives". Croom Helm, London.
- Vahl, O. (1979). An hypothesis on the control of food intake in fish. *Aquaculture*, 17(3), 221–229. DOI: [10.1016/0044-8486\(79\)90125-x](https://doi.org/10.1016/0044-8486(79)90125-x)
- Valentičič, T. (2005). Taste and olfactory stimuli and behavior in fishes, pp. 65–85, in G. von der Emde, J. Mogdans, and B. G. Kapoor (eds.). *Senses of Fish*. Narosa, New Delhi.
- Volkoff H. (2016). The neuroendocrine regulation of food intake in fish: A review of current knowledge. *Front. Neurosci.*, 10, article540. 1-31. DOI: [10.3389/fnins.2016.00540](https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00540)
- Webster, C.D. and Lim, C. (eds.) (2002). *Nutrition and fish health*. Food Products Press. New York-London-Oxford pp. 365.
- Wei, Y., Liang, M., Mu, Y., Zheng, K. and Xu, H. (2015). The effect of ultrafiltered fish protein hydrolysate level on growth performance, protein digestibility and mRNA expression of PepT1 in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*L.). *Aquac Nutr.*, 22(5), 1006–1017. DOI: [10.1111/anu.12319](https://doi.org/10.1111/anu.12319)
- Xia, S., Zhao, W., Li, M., Zhang, D., Nan, L., Qian, H., L., Guo, C., Yang and Xuyun, G. (2019). Influence of 5'-inosine monophosphate and 5'-guanosine monophosphate on growth, feed digestibility and activity of digestive enzymes in turbot *Scophthalmus maximus*. *Aquac Nutr.*, 26(1), 165-173. DOI: [10.1111/anu.12978](https://doi.org/10.1111/anu.12978)
- Xue, M., Xie, S. and Cui, Y. (2004). Effect of a feeding stimulant on feeding adaptation of gibel carp *Carassius auratus gibelio* (Bloch), fed diets with replacement of fish meal by meat and bone meal. *Aquac. Res.*, 35(5), 473–482. DOI: [10.1111/j.1365-2109.2004.01041.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01041.x)
- Yeşilayer, N. and Kaymak, I.E. (2020). Effect of partial replacement of dietary fish meal by soybean meal with betaine attractant supplementation on growth performance and fatty acid profiles of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. 51(4), 1533-1541. DOI: [10.1111/are.14501](https://doi.org/10.1111/are.14501)
- Zou, Q., Huang, Y., Cao, J., Zhao, H., Wang, G., Li, Y. and Pan, Q. (2017). Effects of four feeding stimulants in high plant-based diets on feed intake, growth performance, serum biochemical parameters, digestive enzyme activities and appetite-related genes expression of juvenile GIFT tilapia (*Oreochromis* sp.). *Aquaculture Nutrition*, 23(5), 1076–1085. DOI: [10.1111/anu.12475](https://doi.org/10.1111/anu.12475)



## Az inulin szerepe és jelentősége a gazdasági haszonállatok takarmányozásában

Tóth Szandra<sup>1\*</sup>, Kovács Melinda<sup>1,2</sup>, Fébel Hedvig<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Kaposvári Egyetem, 7400 Kaposvár, Guba S. 40.

<sup>2</sup>MTA-KE Mikotoxinok az Élelmiszerláncban Kutatócsoport, 7400 Kaposvár, Guba S. 40.

<sup>3</sup>NAIK Állattenyésztési, Takarmányozási és Húsipari Kutatóintézet, 2053 Herceghalom, Gesztenyés 1.

### **ABSTRACT – The role and significance of inulin in the feeding of farm animals**

**Author:** Szandra Tóth<sup>1</sup>, Melinda Kovács<sup>1,2</sup>, Hedvig Fébel<sup>3</sup>

**Affiliation:** <sup>1</sup>Kaposvár University; <sup>2</sup>MTA-KE Mycotoxins in the Food Chain Research Group, 7400 Kaposvár, Guba S. str. 40., Hungary; <sup>3</sup>NAIK Research Institute for Animal Breeding, Nutrition and Meat Science, 2053 Herceghalom, Gesztenyés str. 1.

Restrictions on the use of antibiotics in Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council have increased the need for preventive measures in animal nutrition. The positive dietary effects of inulin have been documented since the early 1900s. This compound is a carbohydrate which has prebiotics effect. On its role in animal nutrition, about the performance-enhancing properties, today's literature gives different results. The aim of our summary work is to acquaint the structure of inulin, its effect on the body and its practical use with out the need for completeness. The mostly effects of inulin is the ability to change the composition of the hind gut microbiome. Increased microbial fermentation increases the volatile fatty acid concentration and decreases the intestinal pH, which inhibits the growth of pathogens in the digestive tract. It affects the intestinal morphology, the body's immune system, and its clinical chemical parameters. The measurable changes depend on the structure of inulin, the species, age, health and nutritional status of the animal. Observations in piglets have shown a reduction in feed efficiency and nitrogen metabolism at certain doses. In the light of scientific results, the practical role of inulin as a dietary supplement to improve health is well established, but the precise study of upper limits and the structure of efficiently functioning fructan is still a challenge for science.

**Keywords:** prebiotics, inulin, intestinal microflora, immunology

## BEVEZETÉS

Az állattenyésztés elsődleges célja az egészséges élelmiszer előállítás az emberiség számára úgy, hogy figyelembe vegye az állatok jóllétét és a környezet védelmét (*Gaggia és mtsai*, 2010). Az 1831/2003/EK európai parlamenti és tanácsi rendeletben a Tudományos Operatív Bizottság betiltotta az antibiotikumokhozamfokozó céllal történő felhasználását a takarmányokban. A döntés után intenzív kutatás indult az antibiotikum kiváltására szolgáló, egészségmegőrző, betegség megelőző hatással bíró készítményekkel kapcsolatban az élelmiszer- és a takarmányiparban egyaránt. A rendelet óriási

\*CORRESPONDING AUTHOR

Kaposvári Egyetem, Agrár - és Környezettudományi Kar  
✉ 7400 Kaposvár, Toponári út 118. ☎ +36 30 477 0795  
E-mail: toth.szandra@ke.hu

nyomást gyakorolt az állattartó gazdaságokra, és egyik fő következménye a terápiás antibiotikumok használatának növekedése lett (Casewell és mtsai, 2013). Ez a trend arra ösztönözte a kutatókat, hogy új, biztonságosabb alternatívát keressenek az állatok egészségének megóvása érdekében (Verdonk és mtsai, 2005; Verstegen és Williams, 2002). A bél mikroflórája és a szervezet egészsége közti összefüggés már Ilja Mecsnikov 19. századi kutatómunkájából ismert és azóta is számos értekezés jelent meg, amely segít jobban megismerni ezt a szervezeten belüli összetett rendszert. A probiotikum szót mai értelmében vett kifejezésként először R. B. Parker használta (Parker, 1974). A legújabb kutatási eredmények szerint, a bélnyálkahártya felszínén élő bélflóra az alábbi élettani funkciókban nélkülözhetetlen: táplálék emésztése, a táplálóanyagok felszívódása, patogénekkal szembeni küzdelem, méregtelenítés, immunrendszer működése, enzimek, vitaminok és neurotranszmitterek termelése, endokrin rendszerre kifejtett hatás, gyulladásozó folyamatok mérséklése (Loveren és mtsai, 2012; Hill és mtsai, 2014; Perlmutter, 2017). Habár a bél mikrobióta komplex rendszer és a gazdaszervezet számára hasznos tulajdonsággal bíró baktériumok szabályozása nem tisztázott, a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* törzsek képesek védelmet nyújtani az emésztőszervi fertőzésekkel szemben (Gaggia és mtsai, 2010). A prebiotikumok olyan nem emészthető adalékanyagok, amelyek jótékonyan befolyásolják a gazdaszervezet egészségét azáltal, hogy szelektíven stimulálják bizonyos vastagbélben található baktériumok szaporodását és aktivitását (Gibson és Roberfroid, 1995). Ott szolgáltatnak energiát a baktériumok számára, ahol a glükóz, mint energiaforrás már nincs jelen (Adebola és mtsai, 2014). A legismertebb prebiotikumok a nem keményítő eredetű növényi szénhidrátok és oligoszacharidok, amelyek különféle molekuláris struktúrában használatosak atáplálkozásban, illetve az állatok takarmányozásában. Ennek a legtöbbet kutatott csoportjai a fruktooligoszacharidok (FOS, oligofruktózés inulin), galaktooligoszacharidok (GOS), transzgalakto-oligoszacharidok (TOS) és a laktulóz (Gaggia és mtsai, 2010).

Jelen cikk segít megismerni az inulin, mint prebiotikus tulajdonsággal rendelkező fruktán hatásmechanizmusát és szerepét a humán táplálkozásban és a gazdasági állatok takarmányozásában.

## AZ INULIN ELŐFORDULÁSA, SZERKEZETI FELÉPÍTÉSE

Az inulin különböző lánchosszúságú, (2,1) lineáris kötésű fruktánok gyűjtőneve, amely több mint 36 000 növényfajban megtalálható, mint spárga, póréhagyma, vöröshagyma, banán, búza, fokhagyma, cikória és articsóka



(Metzler-Zebeli és mtsai, 2017). A vegyületnek a növényekben energiatároló funkciója van és általában a gyökérben vagy a rizómákban halmozódik fel. Azok a növények, amelyek inulint raktároznak, általában nem, vagy kisebb arányban tartalmaznak keményítőt. Nevét az örménygyökér (*Inulahelenium*) latin nemzetségneve után kapta. Az inulin típusú fruktánok  $\beta$  (1 $\leftarrow$ 2) kötéssel kapcsolódó fruktozil és fruktóz monomerekből álló lineáris vegyületek (Gibson és Roberfroid, 2008). A kereskedelmi forgalomban kapható inulint vagy a cikória növény gyökeréből nyerik, vagy szacharózból szintetikus úton állítják elő (Niness, 1999). A cikória (*Cichoriumintybus*) gyökere 15-20% inulint és 5-10% egyéb oligofruktózt tartalmaz. A fruktánok jellemzésére 2 mértékegység szolgál. Egyik a DP (Degree of Polymerization) ami a vegyületben szereplő fruktán monomerek hosszúságának tartományát mutatja meg. A DP<sub>av</sub> (Average Degree of Polymerization) pedig azt, hogy a fruktán átlagosan milyen hosszúságú monomereket tartalmaz (Gibson és Roberfroid, 2008). A lánchosszúság alapján megkülönböztetünk relatív rövid (2-4), közepes (5-10) és relatív nagy (11-60) lánchosszúságú fruktánokat. A nomenklatura nem teljesen egyezik a tudományban. Vogt és mtsai. (2015) az inulin típusú vegyületek nevezéktanának változásáról így nyilatkoztak: eleinte a szacharózból származtatott DP 3-5 hosszúságú anyagot nevezték FOS-nak (Fruktooligoszaccharid), majd a DP 3-10 tartományba eső inulin vegyületeket OF-nek, azaz oligofruktóznak. Később ezeket egymás szinonímájaként használták és esetleg a „rövid/hosszú láncú” előtaggal pontosították a leírást. Az inulin elnevezést általában a DP>10 hosszúságú vegyületekre használják, holott a nevezéktan szerint minden  $\beta$  (2-1) típusú fruktán, lánchosszúságtól függetlenül, ebbe a csoportba tartozik. DP<10 értékkel rendelkező fruktánok jól oldódnak, gyorsan fermentálhatóak és szelektív interakcióra képesek a bél mikroflórával (Van Loo, 2007). Az ennél hosszabb láncú fruktánok lassabban, a későbbi bélszakaszokban fermentálódnak, ami így kisebb mértékben hat a bélflóra összetételére. Ez a tulajdonság nagyon fontos meghatározója lehet egy kísérletben kapott eredmény értékelésének, ugyanis már McKellar és mtsai. (1993) rávilágítottak arra, hogy a *Lactobacillus* többnyire a bélrendszer proximális részén, míg a *Bifidobaktérium* a vastagbélben kolonizálódnak eredményesebben. A cikória-kivonatból készült inulin 30-50%-ban DP<10 hosszúságú fruktánokat tartalmaz. A fennmaradó rész a hosszabb láncú alkotóké. Belval 1927-ben már leírta az inulin kinyerésének metodikáját. Az eljárás hasonlatos a cukorgyártás folyamatához. A cikóriát a cukorrépához hasonlóan szeletelik, majd mossák. A mosást követően az inulintmelegvizet diffúziós eljárással nyerik ki. Ennek eredményeként DP 2-60 lánchosszúságú oligofruktóz nyerhető (DP<sub>av</sub> =10-12). A nagy tisztaságú inulin

gyártásához a rövid láncú molekulákat eltávolítják, így DP<sub>av</sub> érték 25-re emelkedik, amiben a monomerek hossza 11 és 60 között változik (DP=11-60) (Niness, 1999). A hosszú láncnak köszönhetően nehezebben oldódik, mint az egyéb oligofruktózok. Tejjel vagy vízzel mikrokristályokat alkot, amely előnyös az élelmiszeripar számára, bizonyos termékek (töltelékek, tejtermékek, dresszings) kedvező állagának eléréséhez. Niness (1999) értekezésében beszámol az inulin élelmiszeriparban betöltött szerepéről, mely szerint a hozzáadott rosttartalom növeléséhez széles körben használt anyag, ugyanis más rostokkal ellentétben nincs mellékíze, nem befolyásolja a viszkozitást.

## AZ INULIN SZERVEZETRE GYAKOROLT HATÁSA

### Az inulin hatásmechanizmusa a bél mikrobiom szabályozásában

Az elmúlt évtizedben nőtt az olyan étrendi összetevők iránti igény, mint a pre- és probiotikumok, amelyek képesek a bélmikroflóra stabilitását javítani. A prebiotikumok emészthetetlen étrendi alkotók, amelyek tápanyagul szolgálnak a probiotikumok növekedéséhez a szervezetben (Huebner és mtsai, 2007). Az emlősökben a fő táplálékforrástól függően változik a bélben található mikrobiom összetétele és mennyisége is. A növényevők mikrobiomjának száma jelentősebb, összetétele változatosabb, míg a ragadozóké kevésbé összetett és jelentős (Gaggia és mtsai, 2010). Ezen felül természetesen befolyásoló tényező az életkor és az általános egészségügyi állapot, környezeti patogén terhelés mértéke is. Mivel ez a mikrobiális populáció nagyon összetett és akár több száz fajt tartalmazhat, általában két csoportra osztja a szakirodalom, a pontos meghatározás helyett. Elkülöníthetők az emésztést, gazdaszervezet egészségét kedvezően befolyásoló alkotók és a patogének. Előbbi esetében 2 fő nemzetségre fókuszálnak a kutatások, a *Lactobacillus*okra és a *Bifidobacterium*okra. A *Lactobacillus* nemzetség széles és heterogén taxonómiai egység, amely több száz különböző tejsavtermelő baktériumfajból áll (Gaggia és mtsai, 2010). A *Bifidobacterium* nagyszámú előfordulása a gazdaszervezet jó egészségére utal. Segítenek a bélrendszer megfelelő mikrobióta egyensúlyának fenntartásában azzal, hogy csökkentik a kórokozók megtelepedésének esélyeit (Gaggia és mtsai, 2010). Ahogyan azt Halas és mtsai. (2009) is megfogalmazták, az inulin hatására bekövetkező bakteriális szaporodás gátolja az enterotoxikus *Escherichia coli* felszaporodását, és így csökkenti a hasmenés kockázatát. Niness (1999) szerint az inulin legismertebb táplálékanyagokra vonatkozó hatása az a stimuláns aktivitás, amit a bélben a *Bifidobacterium*ra fejt ki. Az 1990-es években számtalan humánkísérlet bizo-

nyitotta 5-20 g/nap inulin-kiegészítés jótékony hatását a *Bifidobacterium* szaporodására (Niness, 1999). Az inulin típusú fruktánok ellenállnak a hidrolizáló enzimeknek a vékonybélben és könnyen fermentálhatóak a szacharolitikus baktériumok számára (Metzler-Zebeli és mtsai, 2017). McKellar és mtsai. 1993-ban *in vitro* vizsgálták különféle *Bifidobacterium* törzsek szaporodási képességét inulinnal ( $DP \geq 15$ ) dúsított közegben és úgy találták, hogy a *B. thermophilum*, *B. minimum* és *B. cuniculi* törzsek növekedésének kedvezett a fruktán-kiegészítés. Adebola és mtsai. (2014) szintén *in vitro* környezetben mérték az inulin, mint prebiotikum hatását *Lactobacillus* törzsekre. A *L. acidophilus* NCFM számát kis mértékben növelte 0,5-2,5%-os inulin-kiegészítés. Huebner és mtsai. (2017) *in vitro* vizsgálatai során az inulin táptalaj nagymértékben ( $P < 0,05$ ) segítette a *Lactobacillus paracasei* szaporodását, míg csökkentette az *E. coli*-ét, azonban a *Bifidobacterium bifidum* esetében az inulin gyenge táptalajnak bizonyult. Verdonk és Leeuwen (2004) ileumkanüllel ellátott borjakban végzett vizsgálatban követték nyomon az inulin útját az emésztőtraktusban. Méréseik szerint az inulin típusú fruktánok 70%-a emésztetlenül kerül a vastagbélbe, azonban a bélsár nem tartalmazza ezeket az anyagokat. Ez a megfigyelés egyetértésben van Bosscher és mtsai. (2006) állításával, miszerint az emlősök nem emésztik az inulint és oligofruktózt, így érintetlenül érik el a vastagbelet, ahol a mikrobióta, különösen az endogén tejsavtermelő baktériumok, a *Bifidobacterium* és a *Lactobacillus* fermentálják azt. Ezzel szemben Branner és mtsai. (2004) valamint Böhmer és mtsai. (2005) malacokon végzett vizsgálataik során úgy tapasztalták, hogy a béltartalom a jejunumban és az ileumban ugyan még tartalmaz inulint, azonban a vakbél- és vastagbél-tartalom már nem. Bár a fermentációs tevékenység pontos helyében nem, de abban egyetértenek a kutatások, hogy az inulin hatással van a vastagbél és bélsár baktériumtartalmára. Van Loo és mtsai. (2006) fisztulázott lovakon figyelték meg 2% inulin-kiegészítés vakbél-fermentációt stimuláló hatását. A szelektív fermentáció és ezzel együtt a bifidogén hatás a *Bifidobacterium* béta-fruktozidáz enzimének köszönhetően jön létre (Król, 2011). Ez az enzim bontja le az inulinban és az oligofruktózban a  $\beta(2-1)$ glikozid kötések. A *Bifidobacterium* fermentációs termékei a rövid szénláncú illózsírsavak (short chain fatty acids, SCFA), amelyek hatására csökken a béltartalom pH-ja, ami így gátolja a patogén baktériumok szaporodását (Van Loo 2007; Król 2011; Adebola és mtsai, 2014). Ezt alátámasztja SooBo 2005-ben sertéseken végzett tanulmánya is, ahol megállapította, hogy a fokozott bakteriális tevékenységnek köszönhetően nő az illózsírsavak mennyisége. Adebola és mtsai. (2014) szerint az így fellépő pH csökkenés a kulcsmechanizmus a patogének visszaszorításában, azonban meg kell említeni azt is, hogy a prebiotikumok bizonyos

koncentráció fölött képesek 5 alá csökkenteni a vastagbél tartalom pH-ját, ami már gátolja a probiotikumok szaporodását. Ez magyarázatot adhat *Metzler-Zebeli és mtsai.* (2017) állítására, miszerint az inulin-kiegészítés nagyobb adagja csökkentette a *Bifidobacterium* és az *Enterobacterium* számát a vastagbélben. *Adebola és mtsai.* (2014) szerint egyes prebiotikumok képesek a *Lactobacillus* megvédeni az epesavak károsító hatásaitól, ezzel is kedvezve azok szaporodásának. Ez szintén fontos megállapítás a tekintetben, hogy megértsük mennyire összetett folyamat a bél mikrobiom összetételének szabályozása.

Csekély számú kutatás foglalkozik felnőtt kérődzők takarmányának inulin-kiegészítésével. Ennek oka lehet, hogy a bendőben élő hatalmas mennyiségű és fajgazdagságú baktériumtömeg teljes mértékben fermentálja a kiegészítésként adott inulint és egyéb fruktánokat. A prebiotikumoknak így nincs esélyük elérni a tápcsatorna hátsó szakaszaiba ahol pozitív hatásukat valóban kifejthetnék (*van Loo, 2007*). *Hall és Weimer* (2016) *in vitro* vizsgálata azt igazolta, hogy az inulin a bendőben más fruktánoknál lassabban bomlik le, a glükózhoz képest 20%-kal javítja a baktériumok N-felhasználását, növeli a bendőfolyadék ecetsavtartalmát és a biotömeggét. A mikrobiom zömét a *Bacteroides* és *Firmicutes* törzsekhez tartozó fajok adják, azok közül is legfőképpen a *Clostridium*ok és *Lactobacillus*ok vannak jelen. *Samanta és mtsai.* (2013) megfigyelték, hogy juhok és holstein tehének bendőjében prebiotikus-kiegészítés hatására csökkent az ammónia-termelő baktériumok száma és ezáltal kisebb lett az ammónianitrogén koncentrációja a bendőfolyadékban.

## Az immunmoduláció és az inulin-kiegészítés összefüggése

*Król* (2011) szerint a prebiotikumok potenciális gyakorlati lehetősége a betegségekkel szembeni nem specifikus immunválaszban rejlik. Az immunológiai vizsgálatok laborállatokon a legcélravezetőbbek, hiszen sokkal kontrolláltabb környezetben vizsgálhatóak, mint a gazdasági haszonállatok, így ebben a témában főleg rágcsálókön és kutyákon tapasztalt változásokat írják le (*Lomax és Calder, 2009*). A kétezres években számos kutatás foglalkozott az inulin típusú fruktánok közvetlen immunstimuláló hatásával (*Vogt és mtsai, 2015*). Az immunrendszerrel összefüggő hatás sok tényezőt foglal magában, az eredmények két fő csoportra oszthatók, a GALT-ban (gut associated limfoid tissue) és a szisztémás immunrendszerben bekövetkezett változásokra (*Lomax és Calder, 2009*). A GALT a bélnyálkahártyával társult nyirokrendszer, amely a bél szöveteiben a hám és nyálkaréteg alatt helyezkedik el. Az itt található M sejtek állítják elő és juttatják el az antigéneket a bél lumentől a peyerplakkokhoz ahol

az antigén a limfocitákkal találkozik és aktiválódik. Ezt követően ezek a limfociták a nyirokrendszeren keresztül eljutnak az egész szervezetbe és a bélcsatorna más részeibe is. *Vogt és mtsai.* (2015) szerint, az inulin direkt hatással van a fent említett élettani folyamatokra, ami így befolyásolja a gazdaszervezet egészségét. Itt kell megemlíteni, az inulin és a sejtmembrán lipidjei között felépő kapcsolatot is, amely dinamikusabbá teszi a membránt és megkönnyíti a receptorok kapcsolódását és a jelátvitelt (*Vogt és mtsai,* 2015). Ez összefüggésben állhat *Masanetz és mtsai.* (2011) megállapításával, miszerint nő a vastagbél PECAM1 (Platelet Endothel Cell Adhesion Molecule-1 = vérlemezkendőtel sejtadhéziós molekula) előfordulása. Ez a molekula az immunglobulin család tagja, amelynek segítségével a fehérvérsejt átjut az intercelluláris térbe. Az előző fejezetben tárgyalt SCFA és egyéb fermentációs termék koncentrációja inulin hatására emelkedik, amely gyorsan felszívódva közvetett hatást gyakorol az immunsejtekre azáltal, hogy aktivált G proteinekhez kapcsolódnak (*Vogt és mtsai,* 2015; *Huang és mtsai,* 2015). A veleszületett immunrendszert érintő vizsgálatok során *Lomax és Calder* (2009) azt tapasztalták, hogy a  $\beta$  2-1 fruktánok kedvezően hatnak a makrofágok számára és funkcionalitására. Rágcsálóknál megfigyelték, hogy inulin-kiegészítés esetén nőtt a peritoneális makrofágok fagocitózis aktivitása, ahogy a nyirokcsomók antigén szállító sejtjeik hisztokompatibilitási komplex (MHC) II molekula expressziója is, míg a „naturalkiller” sejtek citotoxicitása nem változott a kutyákkal és patkányokkal végzett tanulmányok szerint (*Lomax és Calder,* 2009). A kutatások zöme beszámolt a vérérum és a bélsár IgA valamint IL-10 és IFN- $\gamma$  koncentrációjának növekedéséről (*Vogt és mtsai,* 2015). *Huang és mtsai.* (2015) brojlercsirkék élettani paramétereit vizsgálták az első 3 élethétben. Az általuk mért értékek szerint a vakbél IgA, és a jejunumm RNS szintje fokozódott, miközben csökkent az interleukin-6 és interferon- $\gamma$ . Ezek az eredmények a kutatók szerint azt jelzik, hogy a tápok 5-10 g/kg inulinnal történő kiegészítése jótékony hatással lehet a brojlercsirke intesztinális immunfunkciójának fokozására fiatal korban. Ezzel szemben *Masanetz és mtsai.* (2011) szerint a prebiotikum hatására nő a gyulladáscsökkentő IL10 molekulák előfordulása, ami a patogének számának visszaszorításával együtt az immunaktivitás csökkenésének oka lehet. *Ito és mtsai.* (2011) szintén a vakbél IgA szintjének emelkedéséről számoltak be patkányoknak adott 60g/kg inulin-kiegészítés során. Malactápok 4%-os inulin-kiegészítése fokozták a duodenum mucin és mRNS termelését (*Tako és mtsai,* 2008). Az ellentmondó eredmények egyik oka, hogy az immunválasz nagymértékben függ az adott élőlény korától és fajtájától, egyéb paramétereitől. A másik lehetséges ok, hogy a fekális IgA koncentráció nem a legjobb mérőszáma az immunrendszer működésének. Attól függően, hogy a prebiotikum

a bélrendszer melyik szakaszában stimulálja a probiotikumok szaporodását, más-más eredményt kapunk az IgA koncentrációt illetően (*Lomax és Calder, 2009*).

### **Az emésztőrendszer morfológiájában, az anyagcserében és a teljesítményben tapasztalt változások**

A The National Animal Health Monitoring Service szerint az amerikai állattartó telepek 57,5%-a használt antibiotikum tartalmú tejpótlót 2007-ben (*USDA, 2010*). Ezek 49,5%-ában oxitettraciklin és neomicin kombinációját alkalmazták. Ugyanez a szám 2002-ben még csak 25,6% volt. Az antibiotikumok kiváltására több lehetőség is van, mint pl. az állati eredetű szárított vérplazma, prebiotikumok, probiotikumok, aszkorbinsav és élesztősejtfal-alkotók (*Kehoe és Carlson, 2015*). A fiatal állatokat érintő bélrendszeri fertőzések komoly problémát jelentenek mind egészségügyi szempontból, mind pedig az üzemi nyereségessége tekintetében. Ezen állatoknál az inulin és oligofruktóz a bélrendszerre gyakorolt kedvező hatása következtében pozitívan befolyásolja az egyes termelési paramétereket. A bélsár konzisztencia javulása jól látható jele az emésztőrendszer egészségének, amire alapozva csökkenthető az antibiotikumok használata is. A prebiotikumok a mikrobiom összetételén keresztül képesek befolyásolni az emésztési folyamatokat. A keletkezett fermentációs termékek hatnak az anyagcserére, az állatok vérképére, immunrendszerére, az emésztőrendszer morfológiájára és persze mindezen keresztül a haszonállatok esetében a termelési mutatókra. Az inulin-kiegészítésnek köszönhető a nagyobb illózsírsav-koncentráció jótékony hatást gyakorol az anyagcserére, táplálja a belsejteket, növeli az epithel sejtek számát a bélbolyhokban és növeli a bélbolyhok hosszát (*Gibson és Roberfroid, 1995*). *Verdonk és mtsai. (2005)* valamint *VanLoo (2007)* szerint sertésben az inulin-kiegészítés hatására a bélbolyhok meghosszabbodnak és ennek köszönhetően nő az abszorpciós kapacitás, ami a termelési eredmények javulásához vezet. *Brambillasca és mtsai. (2015)* ezzel szemben 3% inulin-kiegészítés során nem találtak változást az emésztőkészülék morfológiájában és működésében, sőt, a kiegészítés lágyította a bélsarat és rontotta az állatok takarmányértékesítését, nitrogénretencióját. *Metzler-Zebeli és mtsai. (2017)* szintén a takarmányértékesítés romlásáról számoltak be malacok inulin-kiegészítése kapcsán. Broilercsirkék esetében *Huang és mtsai. (2015)* 5 g kiegészítés esetén a takarmányfelvétel növekedését tapasztalták, míg *Verdonk és mtsai. (2005)* a takarmányértékesítés és súlygyarapodás javulásáról, a tápcsatorna hosszának növekedéséről számoltak be. Broilerek esetén csökkent a vér koleszterinszintje és a zsír depozíció mértéke,

míg tojótyúkrok esetén javult a Ca-anyagforgalom és a tojástermelés (*Verdonk és mtsai*, 2005). Tejpotló tápszerek inulin-kiegészítésnek hatására az itatásos borjak testtömeg-gyarapodása javul, akárcsak a bélsár konzisztenciája (*Kaufhold és mtsai* 2000; *Verdonk és Van Leeuwen*, 2004). Azokban a vizsgálataokban, ahol a bélsár állagában nem tapasztaltak változást az inulin-kiegészít és javára, ott teljesítményjavulásról sem számoltak be (*Masanetz és mtsai*, 2010, 2011; *Król* 2011; *Kara és mtsai*, 2012). Ennek oka lehet az állatok és környezetük patogén terheltségének alacsony mértéke, az állatok jó egészségügyi állapota. Ettől függetlenül, az idézett szerzők vizsgálataiban is jelentkezett élettani hatás, amely azt bizonyítja, hogy az inulin akkor is hat a szervezetre, ha az teljesítményjavulásban nem mutatkozik. *Król* (2011) vizsgálataiban 3 és 6 g/nap inulin-kiegészítés hatására csökkent a karbamid- és koleszterinszint, és nőtt a vér hemoglobin- és fehérvérsejt-koncentrációja. A nagyobb hemoglobin-tartalmat és hematokrit értéket *Masanetz és mtsai*. (2011) a borjak jobb vasforgalmával magyarázzák, ami a teljes teje alapozott borjúnevelésben kiemelkedő jelentőséggel bír. Vizsgálatukban beszámolnak a borjak trombocita és monocita koncentrációjának csökkenéséről. A sertésekben tapasztalt bél-morfológiát érintő változásokkal szemben *Masanetz és mtsai*. (2010) úgy találták, hogy itatásos borjak tejpotlójának 2% inulin-kiegészítésekor csökken az ileumban a bélbolyhok hossza, a mucint termelő kehelysejtek és a proliferatív sejtek száma.

## KÖVETKEZTETÉSEK

A felsorolt tudományos eredmények alapján elmondható, hogy az inulin, mint prebiotikus fruktán hatása a szervezet egészére mérhető. Az állat egészségi állapotát jelző pozitív változások nem minden esetben manifesztálódnak a teljesítmény növekedésében, de mindenképpen hozzájárulnak annak megfelelő és magas szinten tartásához. Az antibiotikumtól mentes, illetve annak csökkentését célul kitűző takarmányozási programok megfelelő alkotója lehet az inulin. A tudomány számára még sok lehetőséget kínál a különböző takarmányozási és tartási körülményeknek megfelelő optimális dózis, valamint a más takarmányalkotókkal való szinergens hatás feltérképezése.

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A publikáció elkészítését a EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

## IRODALOM

- Adebola, O. O., Corcoran, O., Morgan, W. A. (2014). Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of *Lactobacilli* probiotics. *J. Funct. Foods*, 10, 75-84. DOI: [10.1016/j.jff.2014.05.010](https://doi.org/10.1016/j.jff.2014.05.010)
- Belval, H. (1927). Industrie de l'inuline et du le' vulose. In: Dix Ans d'Efforts Scientifiques, Industriels et Coloniaux 1914–1924. Chimie et Industrie, Paris, France, 1068–1069.
- Brambillasca, S., Zunino, P., Cajarville, C. (2015). Addition of inulin, alfalfa and citrus pulp in diets for piglets: influence on nutritional and faecal parameters, intestinal organs, and colonic fermentation and bacterial populations. *Livest. Sci.*, 178, 243-250. DOI: [10.1016/j.livsci.2015.06.003](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.06.003)
- Branner, G.R., Böhmer, B.M., Erhardt, W., Henke, J., Roth-Maier, D.A. (2004). Investigation on the precaecal and faecal digestibility of lactulose and inulin and their influence on nutrient digestibility and microbial characteristics. *Arch. Anim. Nutr.*, 58(5), 353–366. DOI: [10.1080/00039420400005075](https://doi.org/10.1080/00039420400005075)
- Boscher, D., van Loo, J., Franck, A. (2006). Inulin and oligofructose as functional ingredients to improve bone mineralization. *Int. Dairy J.*, 16(9), 1092-1097. DOI: [10.1016/j.idairyj.2005.10.028](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.028)
- Böhmer, B.M., Branner, G.R., Roth-Maier, D.A. (2005). Precaecal and faecal digestibility of inulin (DP 10–12) or an inulin/*Enterococcus faecium* mix and effects on nutrient digestibility and microbial gut flora. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 89(11-12), 388–396. DOI: [10.1111/j.1439-0396.2005.00530.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2005.00530.x)
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and engineering consequences for humans and animal health. *J. Antimicrob. Chemother.*, 52(2), 159-161. DOI: [10.1093/jac/dkg313](https://doi.org/10.1093/jac/dkg313)
- Gaggia, F., Mattarelli, P., Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *Int. J. Food Microbiol.*, 141, S15-S28. DOI: [10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031)
- Gibson, C. R., Roberfroid, M. B. (1995). Dietary modulation of human colonic microflora: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.*, 125(6), 1401-1412. DOI: [10.1093/jn/125.6.1401](https://doi.org/10.1093/jn/125.6.1401)
- Gibson, G. R., Roberfroid, M. B. (2008). *Handbook of Prebiotics*. CRC Press.
- Halas, D., Hansen, C.F., Hampson, D.J., Mullan, B.P., Wilson, R.H., Pluske, J. R. (2009). Effect of dietary supplementation with inulin and/or benzoic acid on the incidence and severity of post-weaning diarrhoea in weaner pigs after experimental challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Arch. Anim. Nutr.*, 63(4), 267-280. DOI: [10.1080/17450390903020414](https://doi.org/10.1080/17450390903020414)
- Hall, M. B., Weimer, P. J. (2016). Divergent utilization patterns of grass fructan, inulin and other non fiber carbohydrates by ruminal microbes. *J. Dairy Sci.*, 99(1), 245-257. DOI: [10.3168/jds.2015-10417](https://doi.org/10.3168/jds.2015-10417)
- Hill, C., Guarner F., Reid, G., Gibson, R. G., Merenstein, J. D., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J., SIminen, S., Calder, P. C., Sanders, M. E. (2014). The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 11(8), 506-514. DOI: [10.1038/nrgastro.2014.66](https://doi.org/10.1038/nrgastro.2014.66)
- Huang, Q., Wei, Y., Wang, Y., Hu, T. (2015). Effect of dietary inulin supplements on growth performance and intestinal immunological parameters of broiler chickens. *Livest. Sci.*, 180, 172-176. DOI: [10.1016/j.livsci.2015.07.015](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2015.07.015)
- Huebner, J., Wehling, R. L., Hutkins, R. W. (2007). Functional activity of commercial prebiotics. *Int. Dairy J.*, 17(7), 770-775. DOI: [10.1016/j.idairyj.2006.10.006](https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2006.10.006)
- Ito, H., Wada, T., Ohguchi, M., Sugiyama, K., Kiriya, S., Morita, T. (2008). The degree of polymerization of inulin-like fructans affects cecal mucin and immunoglobulin A in rats. *J. Food Sci.*, 73(3), H36-H41. DOI: [10.1111/j.1750-3841.2008.00686.x](https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00686.x)



- Ito, H., Takemura, N., Sonoyama, K., Kawagishi, H., Topping, D. L., Conlon, M. A., Morita, T. (2011). Degree of polymerization of inulin-type fructans differentially affects number of lactic acid bacteria, intestinal immune functions, and immunoglobulin A secretion in the rat cecum. *J. Agric. Food Chem.*, 59(10), 5771-5778. DOI: [10.1021/jf200859z](https://doi.org/10.1021/jf200859z)
- Kara, C., Orman, A., Gencoglu, H., Kovanlikaya, A., Meral, Y., Cetin, I., Yibar A., Kasap S., Turkmen, I., Deniz, G. (2012). Effects of inulin supplementation on selected faecal characteristics and health of neonatal Saanen kids sucking milk from their dams. *Animal*, 6(12), 1947-1954. DOI: [10.1017/s1751731112000900](https://doi.org/10.1017/s1751731112000900)
- Kaufhold, J., Hammon, H.M., Blum, J. W. (2000). Fructo-oligosaccharide supplementation: effects on metabolic, endocrine and hematological traits in veal calves. *J. Vet. Med. Ser. A*, 47(1), 17-29. DOI: [10.1046/j.1439-0442.2000.00257.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00257.x)
- Kehoe, S. I., Carlson, D. B. (2015). Influence of nonmedicated additives as alternatives to antibiotics on calves growth and health. *Prof. Anim. Sci.*, 31(6), 516-522. DOI: [10.15232/pas.2015-01416](https://doi.org/10.15232/pas.2015-01416)
- Król, B. (2011). Effect of mannanoligosaccharides, inulin and yeast nucleotides added to calf milk replacers on rumen microflora, level of serum immune globulin and health condition of calves. *Electron. J. Pol. Agric. Univ.* 2.14.
- Lomax, A. R., Calder, P. C. (2009). Prebiotics, immune function, infection and inflammation: A review of the evidence. *Br. J. Nutr.*, 101(5), 633-658. DOI: [10.1017/s0007114508055608](https://doi.org/10.1017/s0007114508055608)
- Loveren H., Sanz Y., Salminen, S. (2012). Health claims in Europe: probiotics and prebiotics as case examples. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 3(1), 247-261. DOI: [10.1146/annurev-food-022811-101206](https://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101206)
- Masanetz, S., Wimmer, N., Plitzner, C., Limbeck, E., Preißinger, W., Pfaffl, M. W. (2010). Effects of inulin and lactulose on the intestinal morphology of calves. *Animal*, 4(5), 739-744. DOI: [10.1017/s1751731109991728](https://doi.org/10.1017/s1751731109991728)
- Masanetz, S., Preißinger, W., Meyer, H. H. D., Pfaffl, M. W. (2011). Effects of the prebiotics inulin and lactulose on intestinal immunology and hematology of preruminant calves. *Animal*, 5(7), 1099-1106. DOI: [10.1017/s1751731110002521](https://doi.org/10.1017/s1751731110002521)
- McKellar, R. C., Modler, H. W., Mullin, J. (1993). Characterization of growth and inulinase production by *Bifidobacterium* spp. on Fructooligosaccharides. *Bifidobacteria and Microflora*, 12(2), 75-86. DOI: [10.12938/bifidus1982.12.2\\_75](https://doi.org/10.12938/bifidus1982.12.2_75)
- Metzler-Zebeli, B. U., Trevisi, P., Prates, J. A. M., Tanghe, S., Bosi, P., Canibe, N., Montagne, L., Freire, J., Zebeli, Q. (2017). Assessing the effect of dietary inulin supplementation on gastrointestinal fermentation, digestibility and growth in pig: A meta-analysis. *Anim. Feed. Sci. Tech.*, 233, 120-132. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2017.05.010](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.010)
- Niness, K. R. (1999). Inulin and oligofructose: What are they? *J. Nutr.*, 129(7), 1402S-1406S. DOI: [10.1093/jn/129.7.1402s](https://doi.org/10.1093/jn/129.7.1402s)
- Parker, R. B. (1974). Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health*, 29, 4-8.
- Perlmutter, D. (2017). *Agyépitők: Hogyan gyógyítja és védi agyunkat az egészséges bélflóra-egy életen át.* Kossuth Kiadó, Budapest
- Samanta, A. K., Jayapal, N., Senani, S., Kolte, A. P., Sridhar, M. (2013). Prebiotic inulin: useful dietary adjuncts to manipulate the livestock gut microflora. *Braz. J. Microbiol.*, 44(1), 1-14. DOI: [10.1590/s1517-83822013005000023](https://doi.org/10.1590/s1517-83822013005000023)
- SooBo, S. (2005). Effects of prebiotics, probiotics and synbiotics in the diet of young pigs [dissertation]. Wageningen University, Wageningen, Netherlands.
- Tako, E., Glahn, R.P., Welch, R.M., Lei, X., Yasuda, K., Miller, D.D. (2008). Dietary inulin affects the expression of intestinal enterocyte iron transporters, receptors and storage protein and alters the microbiota in the pig intestine. *Br. J. Nutr.*, 99(3), 472-480. DOI: [10.1017/s0007114507825128](https://doi.org/10.1017/s0007114507825128)

- USDA (2010). HeiferCalf Health and Management Practices on US Dairy Operations, 2007. USDA: Animal and Plant Health Inspection Service: Vet. Serv., Center Epidemiol. Anim. Health, Fort Collins, USA.
- Van Loo, J., Bosscher, D., Janssens, G. P. (2006). Prebiotic inulin interacts with the caecal fermentation in the horse. Horse health nutrition: Third European Equine Health and Nutrition Congress, Faculty of Veterinary Medicine of Ghent University, Merelbeke, Belgium, 75-82.
- Van Loo, J. (2007). How chicory fructans contribute to zootechnical performance and well-being in livestock and companion animals. *J. Nutr.*, 137(11 Suppl), 2594S-2597S. DOI: [10.1093/jn/137.11.2594s](https://doi.org/10.1093/jn/137.11.2594s)
- Verdonk, J.M.A.J., Shim, S.B., van Leeuwen, P., Verstegen, M.W. A. (2005). Application of inulin-type fructans in animal feed and pet food. *Br. J. Nutr.*, 93(S1), S125-S138. DOI: [10.1079/bjn20041355](https://doi.org/10.1079/bjn20041355)
- Verdonk, J. M. A. J., van Leeuwen, P. (2004). The application of inulin-type fructans in diets for veal calves and broilers. Inulin and oligofructose feel good factors for health and well-being. 4th Orafit Research Conference, Paris, 50-51.
- Verstegen, M.W.A., Williams, B.A. (2002). Alternatives to the use of antibiotics as growthpromoters for monogastric animals. *Anim. Biotechnol.*, 13(1), 113-127. DOI: [10.1081/abio-120005774](https://doi.org/10.1081/abio-120005774)
- Vogt, L., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M., Smelt, M. (2015). Immunological properties of inulin-typefructans. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 55(3), 414-436. DOI: [10.1080/10408398.2012.656772](https://doi.org/10.1080/10408398.2012.656772)



## Examination of the causes of mortality in non-beak-trimmed pure line laying hens with special regard to aggression

Zoltán Zomborszky<sup>1</sup>, Gábor Milisits<sup>2\*</sup>, Zoltán Budai<sup>3</sup>, Sándor Szász<sup>2</sup>,  
Olga Pócz<sup>2</sup>, Jolán Ujvári<sup>2</sup>, Tamás Péter Farkas<sup>2</sup>, Erik Garamvölgyi<sup>2</sup>,  
Péter Horn<sup>2</sup>, Zoltán Sütő<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Health, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Kaposvár University, H-7400 Kaposvár, Guba Sándor Street 40., Hungary

<sup>2</sup>Institute of Animal Science, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences, Kaposvár University, H-7400 Kaposvár, Guba Sándor Street 40., Hungary

<sup>3</sup>Bábolna TETRA Ltd., H-2943 Bábolna, Radnóti Miklós Street 16., Hungary

**ABSTRACT** - The experiment was started with 1,508 Rhode Island Red (RIR) and 1,820 Rhode Island White (RIW) type non-beak-trimmed day-old pullets, which originated from 58 RIR and 70 RIW different pedigree cocks, respectively. From all of the 128 cocks 26 half sibling offspring were tested. The pure line pullets were raised up to 18 weeks of age in a closed building, in deep litter pens and moved to the laying house and placed into three types of keeping systems [furnished cage, alternative pen (litter and floor) and conventional cage] thereafter. The number of dead birds and the cause of mortality were recorded daily during the whole rearing and egg-laying period, up to 72 weeks of age. During the rearing period the most frequent cause of mortality was wasting (due to feed intake refusal), which accounted for nearly 36% of the total mortality. Aggression was responsible for 28.3% of the total mortality. Depending on the type of the pullets (RIR or RIW), differences were observed in the frequency of occurrence of mortality causes. For example, oedema and beak deformation occurred only in the RIR, whereas technological injury and aggression only in the RIW pullets during the rearing period. During the egg-laying period aggression was the most common cause of mortality. Its lowest occurrence was observed in the alternative pens. In both of the examined types there were cocks, whose offspring died exclusively by aggression, and cocks, whose offspring did not show any loss due to aggression. The ratio of these cocks differed significantly ( $P < 0.05$ ) between the two types examined. Based on the results it was established that the genetic background has significant effect on the mortality caused by aggression in non-beak-trimmed laying hens.

**Keywords:** pullet, laying hen, feather pecking, aggression, cannibalism

## INTRODUCTION

Animal breeders are sometimes encountered with binding regulations that they find difficult to identify with, on the basis of their professional experience. However, in order to stay sustainable and to remain competitive, they need to adapt to these regulations.

\*CORRESPONDING AUTHOR

Kaposvár University, Faculty of Agricultural and Environmental Sciences

✉ H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40., ☎ +36-82-505-800

E-mail: milisits.gabor@ke.hu

One of these regulations is the EU Council Directive 99/74/EC of 19 July (1999), which laid down the minimum standards for the protection of laying hens, and prohibited the use of the conventional cage system in the European Union member countries from the 1<sup>st</sup> of January 2012. According to the provisions of the Annex to this Directive, the mutilation of animals in the EU is also prohibited, but in order to prevent feather pecking and cannibalism, beak trimming may be authorised by individual member states, if it is carried out by trained personnel up to 10 days of age of the animals.

In spite of the circumstances mentioned above, Denmark, Finland, Sweden and Germany from the EU member states have banned beak trimming simultaneously with the technological change, while the United Kingdom, France and the Netherlands are considering the introduction of banning. However, the application and spread of the alternative housing systems, as well as the continuously increasing rejection of beak trimming in Europe, raised serious animal welfare problems.

Despite the original intention of the breeders, the selection, for decades, in cages, favoured the outstandingly productive, but aggressive individuals, which are inclined to feather pecking, which can lead to massive cannibalism. In small groups (4-5 hens/cages), this type of social stress was not significant, or was possible to prevent effectively by beak trimming of the animals with thermo-cautery, laser or infra-red light (*Guesdon et al., 2006; Shimura et al., 2006; Dennis et al., 2009*). However, in larger group numbers, in those housing systems that enabled greater freedom (alternative, run-out, free/eco/organic housing) for the hens, this can lead to constant hierarchy fights or conflicting situations.

Since the cause of this phenomenon is breeding, it seems to be the most effective method of prevention, when looking for the resolution of the problem also from the side of the breeding. Selection methods, in which the genetic effect of an animal on the survival of its group members is taken into account, have been shown to be very effective in reducing mortality due to feather pecking and cannibalism in laying hens (*Bolhuis et al., 2009*).

In the current genetic constructions, neglecting beak trimming may result in a 2 to 4-fold increase of mortality in laying houses. This animal welfare concern and the simultaneous change in housing technology force breeders to produce hybrids that can be successfully maintained without the need for beak-trimming that meets the new animal welfare requirements and new housing systems as well. Since the inheritance of behavioural patterns makes

it possible to eliminate the aggressive individuals with abnormal social behaviour in breeding programs, a conscious selection may be a solution for the problem.

For this reason, the main goal of the present study was to examine the occurrence of mortality caused by aggression in non-beak-trimmed laying hens with different paternal origin, in order to detect aggressive and calm families in the TETRA pedigree lines. The novelty and the uniqueness of this study was the possibility of testing pure lines, which indicates the possibility of selection for this unfavourable behaviour.

## MATERIALS AND METHODS

The examination was started with 1,508 Rhode Island Red (RIR) and 1,820 Rhode Island White (RIW) type day-old pullets, which were originated from 58 RIR and 70 RIW different pedigree cocks, respectively. From all of the 128 cocks 26 half sibling offspring were tested.

The pullets were raised up to 18 weeks of age in a closed building, in pens, at the Experimental Poultry Farm of the Kaposvár University, in Hungary. Offspring of five cocks (5x26) – belonging to the same type (RIR or RIW) – were reared in each pen, using deep litter floor and 14 pullets/m<sup>2</sup> stocking density. During the rearing period commercially available starter, grower and finisher diets were used for the *ad libitum* feeding of the animals (*Table 1*). Drinking water was also continuously available from self-drinkers.

The number of dead birds and the cause of mortality were recorded daily during the whole rearing period.

At 18 weeks of age animals were moved to the laying house of the Experimental Poultry Farm of the Kaposvár University. In the laying house, both the RIR and RIW hens were placed into three types of keeping systems (*Table 2*):

1. EU conform furnished cage (7560 cm<sup>2</sup> basic area; 10 hens/cage; 756 cm<sup>2</sup>/hen);
2. Alternative pen (5,52 m<sup>2</sup> basic area, floor and litter combination, 53 hens/pen; 1040 cm<sup>2</sup>/hen);
3. Conventional cage (3780 cm<sup>2</sup>; 6 hens/cage; 630 cm<sup>2</sup>/hen).

[Permissions: MÁB 232.1/00412/0016/2011; SOI/312766-7/2016 (KA-2044)]

**Table 1**  
Composition of the diets used in the rearing period

Component	Diet			
	Starter I (0-3 weeks)	Starter II (4-8 weeks)	Grower (9-16 weeks)	Finisher (17-18 weeks)
Dry matter (%)	88.0	88.0	89.0	89.0
ME Poultry (MJ/kg)	12.29	12.09	11.56	11.69
Crude protein (%)	20.0	18.0	15.5	17.5
Crude fat (%)	4.33	2.93	3.33	3.44
Crude fibre (%)	4.20	4.23	3.59	4.84
Crude ash (%)	6.68	6.40	5.40	10.35
Nitrogen-free extractives (%)	56.4	60.7	63.8	57.8
Sodium (%)	0.17	0.17	0.17	0.17
Lysine (%)	1.15	1.00	0.75	0.80
Methionine (%)	0.49	0.43	0.35	0.40
Methionine + cysteine (%)	0.84	0.74	0.61	0.70
Calcium (%)	1.00	1.03	0.92	2.50
Phosphorous (%)	0.68	0.65	0.72	0.42

**Table 2**  
Number of cocks and their offspring examined in the laying house

Lines	Keeping system						Total	
	EU conform furnished cage		Alternative pen		Conventional cage			
	Cocks (n)	Offspring (n)	Cocks (n)	Offspring (n)	Cocks (n)	Offspring (n)	Cocks (n)	Offspring (n)
<b>Rhode Island Red</b>								
Line 1	4	80	7	106	2	48	<b>13</b>	<b>234</b>
Line 2	20	400	9	157	6	143	<b>35</b>	<b>700</b>
Line 3	5	100	4	54	1	22	<b>10</b>	<b>176</b>
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>580</b>	<b>20</b>	<b>317</b>	<b>9</b>	<b>213</b>	<b>58</b>	<b>1110</b>
<b>Rhode Island White</b>								
Line 1	19	380	8	106	2	48	<b>29</b>	<b>534</b>
Line 2	20	400	9	157	6	143	<b>35</b>	<b>700</b>
Line 3	2	40	3	53	1	24	<b>6</b>	<b>117</b>
<b>Total</b>	<b>41</b>	<b>820</b>	<b>20</b>	<b>316</b>	<b>9</b>	<b>215</b>	<b>70</b>	<b>1351</b>

Both in the case of the EU conform and conventional cages, only the half-sibling offspring of one cock were placed into one cage. In the case of the alternative pens, offspring of 2 or 3 cocks were placed into one pen.

For the *ad libitum* feeding of the hens, commercial layer starter diet was supplied until 20 weeks of age, followed by layer feed (Table 3). Drinking water was continuously available from self-drinkers.

The number of dead birds and the cause of mortality were recorded daily during the whole egg-laying period, up to 72 weeks of age.

Statistical evaluation of the experimental data was performed by the Chi<sup>2</sup>-test, using the 10.0 version of the SPSS statistical software package (*SPSS for Windows*, 1999).

**Table 3**

Composition of the diets used in the egg-laying period

Component	Diet	
	Layer starter (18-19 weeks)	Layer (20-72 weeks)
Dry matter (%)	89.0	89.0
ME Poultry (MJ/kg)	11.69	11.40
Crude protein (%)	17.5	17.5
Crude fat (%)	3.44	4.72
Crude fibre (%)	4.84	3.61
Crude ash (%)	10.35	14.00
Nitrogen-free extractives (%)	57.8	54.9
Sodium (%)	0.17	0.17
Lysine (%)	0.80	0.85
Methionine (%)	0.40	0.42
Calcium (%)	2.50	3.80
Phosphorous (%)	0.42	0.40

## RESULTS

### Mortality during the rearing period

During the rearing period – till 18 weeks of age – the following causes of mortality were recorded in the non-beak-trimmed pullet populations:

- hatching disability,
- wasting (due to feed intake refusal),
- respiratory diseases (mainly upper respiratory disorders),
- oedema,
- foot disorders,
- beak torsion,
- technological injury (caused by the keeping systems and their equipments),
- feather pecking,
- other.

The most frequent cause of mortality was *wasting*, which accounted for nearly 36% of all mortality. In addition, *feather pecking* caused also a high proportion (28.3%) of the total mortality, while the other causes of mortality did

not reach 10% of the total losses. The least cause of mortality was *oedema*, which was registered only once during the rearing period.

Depending on the type of pullets (RIR or RIW), differences were observed in the frequency of occurrence of mortality causes (*Table 4*).

**Table 4**

Frequency of different cause of mortality in non-beak-trimmed Rhode Island Red and Rhode Island White laying hen pure lines during the rearing period (0-18 weeks of age)

Cause of mortality	Ratio of mortality in the per cent of total mortality (%)		Level of significance
	Rhode Island Red	Rhode Island White	
Hatching disability	7.3	11.7	N. S.
Wasting	48.8	25.5	P<0.05
Respiratory diseases	14.6	2.0	P<0.05
Oedema	2.4	0.0	N. S.
Foot disorder	9.8	3.9	N. S.
Beak torsion	7.3	0.0	N. S.
Technological injury	0.0	3.9	N. S.
Feather pecking	0.0	51.0	P<0.001
Other	9.8	2.0	N. S.

N. S. = non significant (P>0.05)

While nearly half of the mortality was caused by *wasting* in the RIR pullets, only one-quarter of the mortality occurred by the same reason in the RIW population. The difference in the ratio of mortality caused by wasting between the two types of the hens was statistically proven at P<0.05 level.

*Respiratory diseases* were responsible for 14.6% of the total loss in the RIR, while only for 2% in the RIW population. The difference between the two examined types was significant at P<0.05 level.

It was observed that certain causes of mortality occurred only in the RIR or in the RIW population, respectively. For example, *oedema* and *beak deformation* occurred only in the RIR, while *technological injury* and *feather pecking* (aggression) only in the RIW pullets during the rearing period. While aggression was not observed in the RIR population, it accounted for more than the half of the total mortality in the RIW population.

### Mortality during the egg-laying period

During the egg-laying period – between 18 and 72 weeks of age – the following causes of mortality were recorded in the non-beak-trimmed laying hen populations:

- aggression (feather pecking, cannibalism),



- cloaca fissure,
- egg retention,
- wasting (due to feed intake refusal),
- pericarditis and pneumonia,
- technological injury (caused by the keeping systems and their equipments),
- poultry mite.

The most common cause of mortality was *aggression* in both of the examined types. However, while the ratio of mortality caused by aggression did not reach two-third of the total loss in the RIR hens, the rate of this was slightly higher than three-quarters of the total loss in the RIW layers (*Table 5*).

**Table 5**

Frequency of different cause of mortality in non-beak-trimmed Rhode Island Red and Rhode Island White laying hen pure lines during the egg-laying period (18-72 weeks of age)

Cause of mortality	Ratio of mortality in the per cent of total mortality (%)		Level of significance
	Rhode Island Red	Rhode Island White	
Aggression	64.4	76.8	P<0.001
Cloaca fission	1.1	0.0	N. S.
Egg retention	23.6	17.7	N. S.
Wasting	3.4	1.2	N. S.
Pericarditis and pneumonia	0.6	0.4	N. S.
Technological injury	4.6	0.4	P<0.001
Poultry mite	2.3	3.5	N. S.

N. S. = non significant (P>0.05)

The difference between the two types examined was statistically proven at P<0.001 level.

The second most common cause of mortality was egg retention in both examined types. While it was responsible for nearly one quarter (23.6%) of the total mortality in the RIR hens, it caused nearly one fifth (17.7%) of the total mortality in the RIW population. However, the difference between the two types examined was statistically not proven in this case (P>0.05).

The rate of any of the other causes of mortality did not reach 10% of the total mortality in any of the tested types. Among these, *technological injury* caused the greatest difference in the mortality between the two types examined. On the contrary to the growing period, 4.6% of the total mortality was caused by *technological injury* in the RIR and only 0.4% of the total mortality in the RIW hens. This difference between the examined types was statistically proven at P<0.001 level.

It was interesting to see that the ratio of mortality caused by aggression differed not only between the examined types, but also between the examined lines within the tested types. In both examined types there was found a line (Line 1 in the RIR and Line 3 in the RIW type), where the ratio of mortality caused by aggression compared to the total mortality was significantly lower than in the other two lines of the same type (Table 6). Among the observed causes of mortality in laying hens, *aggression* caused less mortality in alternative pens than in cages (Table 7).

**Table 6**

Mortality in non-beak-trimmed Rhode Island Red and Rhode Island White laying hen pure lines during the egg-laying period (18-72 weeks of age)

Type of hens	Line 1	Line 2	Line 3
Total mortality (%)			
Rhode Island Red	14.1	17.0	12.0
Rhode Island White	31.8 <sup>b</sup>	41.4 <sup>a</sup>	37.6 <sup>ab</sup>
Mortality caused by aggression (%)			
Rhode Island Red	5.1 <sup>b</sup>	11.4 <sup>a</sup>	8.4 <sup>ab</sup>
Rhode Island White	24.5 <sup>b</sup>	32.4 <sup>a</sup>	19.7 <sup>b</sup>
Ratio of mortality caused by aggression in the per cent of total mortality (%)			
Rhode Island Red	36.4 <sup>b</sup>	67.2 <sup>a</sup>	70.0 <sup>a</sup>
Rhode Island White	77.1 <sup>a</sup>	78.3 <sup>a</sup>	52.3 <sup>b</sup>

<sup>ab</sup>Different letters in the same row indicate significant differences ( $P < 0.05$ )

In alternative pens, mortality caused by *aggression* was significantly lower ( $P < 0.05$ ) compared to conventional cages in both examined types. In the case of the RIW laying hens, the difference was statistically proven also compared to the furnished cages ( $P < 0.001$ ).

At the same time, the rate of the second most frequent cause of mortality, *egg retention*, was lowest in the conventional cages in both of the examined types. However, the effect of the housing system was statistically not proven in this case ( $P > 0.05$ ).

Mortality caused by *poultry mite* occurred only in the alternative housing system for both of the examined types. The rate of mortality caused by poultry mite was more than twofold higher in the RIW than in the RIR hens (21.0% and 9.3%, respectively). However, despite the great difference between the two types, the difference observed was statistically not proven ( $P > 0.05$ ).

By the examination of the mortality caused by aggression it was established that the paternal origin of the hens played a significant role in the appearance of aggression in both of the examined types. The ratio of mortality caused by aggression varied between 0 and 100 in the per cent of total mortality depending on the paternal origin of the hens in both types.

**Table 7**

Frequency of different cause of mortality in non-beak-trimmed Rhode Island Red and Rhode Island White laying hen pure lines during the egg-laying period (18-72 weeks of age) in different keeping systems

Cause of mortality	Keeping system	Ratio of mortality in the per cent of total mortality (%)			
		Rhode Red	Island	Rhode White	Island
Aggression	EU cage*	64.9 <sup>abAB</sup>		80.3 <sup>aA</sup>	
	Alternative pen	53.5 <sup>B</sup>		54.3 <sup>B</sup>	
	Conventional cage	75.7 <sup>A</sup>		84.2 <sup>A</sup>	
Cloaca fission	EU cage*	0.0		0.0	
	Alternative pen	2.3		0.0	
	Conventional cage	2.7		0.0	
Egg retention	EU cage*	28.7 <sup>a</sup>		18.4 <sup>b</sup>	
	Alternative pen	20.9		19.8	
	Conventional cage	13.5		13.9	
Wasting	EU cage*	4.3		1.3	
	Alternative pen	0.0		1.2	
	Conventional cage	5.4		1.0	
Pericarditis and pneumonia	EU cage*	0.0		0.0	
	Alternative pen	2.3		2.5	
	Conventional cage	0.0		0.0	
Technological injury	EU cage*	2.1 <sup>abB</sup>		0.0 <sup>b</sup>	
	Alternative pen	11.6 <sup>aA</sup>		1.2 <sup>b</sup>	
	Conventional cage	2.7 <sup>AB</sup>		1.0	
Poultry mite	EU cage*	0.0 <sup>B</sup>		0.0 <sup>B</sup>	
	Alternative pen	9.3 <sup>A</sup>		21.0 <sup>A</sup>	
	Conventional cage	0.0 <sup>B</sup>		0.0 <sup>B</sup>	

\*EU conform furnished cage

<sup>ab</sup>Different letters in the same row indicate significant differences between the types of hens ( $P < 0.05$ )

<sup>ABC</sup>Different letters in the same column (within one cause of mortality) indicate significant differences between the keeping systems ( $P < 0.05$ )

Both in the RIR and RIW type we have found cocks, whose offspring were died exclusively by aggression. However, the ratio of these cocks was significantly lower ( $P < 0.05$ ) in the RIR than in the RIW type (8.6% and 22.9%, respectively). On the contrary, the ratio of cocks, whose offspring did not show any loss due to aggression was 55.2% in the RIR and 15.7% in the RIW type. The difference between the two types was significant also in this case ( $P < 0.001$ ).

## DISCUSSION

Aggressive behaviour (feather pecking and cannibalism) is a common problem in the egg production. Although beak trimming in laying hens can prevent or

reduce damages caused by these behavioural disorders, this procedure has already been banned in a few European countries (*Spindler et al.*, 2016). Therefore, feather pecking is becoming a substantial problem in the layer industry, both from animal welfare and economic points of view (*Sun et al.*, 2014), especially in non-cage laying flocks (*Hartcher et al.*, 2015).

Because literature suggests that rearing is an important period for the development of behaviours later in life, *Hartcher et al.* (2015) have examined, whether behavioural tests during the rearing period could be predictive for plumage damage in adulthood. Their results indicated that environmental enrichment affected the birds' behaviour during the rearing period, but it did not affect the plumage damage due to severe feather-pecking later in life.

In the study of *Shimmura et al.* (2008) it was examined whether the hens in different housing systems have the same time budget for different beak-related behaviours. It was found that the total frequency of beak use was almost the same in the examined housing systems, but the breakdown of types of beak use was different. For example, the proportion of hens performing severe feather pecking was higher in large furnished cages and single-tiered aviary than in free-range, and more in free-range than in small and large conventional cages, and small furnished cages.

In the study of *Morrissey et al.* (2016) the authors tried to answer the question, whether non-beak-trimmed hens can be kept in commercial furnished cages. Examining the effects of breed and beak treatment on the mortality, behaviour and feather cover of the hens they have established that both of the examined traits have significant effect on the injurious pecking related mortality. However, the non-beak-trimmed hens showed not only higher mortality compared to their beak-trimmed counterparts, but also their feather cover was significantly worse at most body sites, and it worsened more quickly with age.

*Bolhuis et al.* (2009) have pointed out that selection could be very effective in reducing mortality due to feather pecking and cannibalism in laying hens. In their experiment hens from already the second generation of the low mortality line showed less fear-related behaviour than hens in the control line.

The effectiveness of selection for hen-days without beak-inflicted injuries was studied by *Craig and Muir* (1993). The base population was known to have a high incidence of beak-inflicted injuries when pullets' beaks were intact. After two generations, mean hen-days without beak-inflicted injuries from 16 to 40 weeks of age were 164.8 and 155.3 for selected and unselected stocks, respectively, yielding a realized family heritability of  $0.65 \pm 0.13$  SE. However, selection did not appear to alter the relative frequency of beak-inflicted injuries

by body regions affected; about 30% of all injuries involved the vent-cloacal area.

In a later study of these authors it was examined that selection on the basis of family means for increased survival and hen-housed egg production, when sisters with intact beaks were kept together in multiple-bird cages, would cause adaptive changes in behaviour (*Craig and Muir, 1996*). Based on the results it was established that for cages with greater than or equal to 1 cannibalistic death, the commercial stock had twice and the control stock 1.6 times as many with repeated losses as the selected stock in the seventh generation. The selected stock had also better feather scores and body weights than either the control or the commercial stock.

Similarly to the results of *Morrissey et al. (2016)* we have also established that the genetic background significantly affects the presence and injury of feather pecking in non-beak-trimmed laying hens. In our examination it was observed that the differences in the mortality caused by feather pecking exist not only between the types, but also between the lines in the examined types. The examination of the paternal origin of the hens showed that – similarly to the opinion of *Craig and Muir (1993, 1996)* and *Bolhuis et al. (2009)* – selection seems to be a possible way to reduce mortality due to feather pecking and cannibalism in laying hens. Based on our results selection is suggested in both of the examined types, but especially in the Rhode Island White, where significantly more cocks had mortality due to aggression in their offspring population.

According to *Spindler et al. (2016)* optimal housing and management of pullets and laying hens are also necessary if untrimmed flocks should be kept without causing increased damages due to feather pecking and cannibalism. From among the keeping systems examined the alternative pen seemed to be the most favourable in our study from this point of view.

However, despite the optimal housing and flock management, the risk of the occurrence of behavioural disorders, such as feather pecking and cannibalism cannot be eliminated completely. In practice, the access to additional environmental enrichment materials, the supply of water- and feed additives as well as the modulation of the lighting conditions in the barn, have proven effective to calm down the situation in affected flocks (*Spindler et al., 2016*).

## CONCLUSIONS

Based on the results it was established that the genetic background has significant effect on the mortality caused by aggression in non-beak-trimmed laying hens. It was also pointed out that the differences in the mortality caused by

feather pecking and cannibalism exist not only between the types, but also between the lines in the examined types. Because the paternal origin of the hens also showed differences in the mortality caused by aggression it was stated that selection could be a possible way to reduce mortality due to feather pecking and cannibalism in non-beak-trimmed laying hens.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by the ‘2018-1.3.1-VKE-2018-00042’ project, funded from the Hungarian State and by the ÚNKP-19-3-KE-21 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology.

The publication of the research was supported by the project ‘EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 2.3.4-15-2016-00005’ co-funded from EU sources and European Social Investment Funds and the Hungarian State.

## REFERENCES

- Bolhuis, J. E., Ellen, E. D., Van Reenen, C. G., De Groot, J., Ten Napel, J., Koopmanschap, R. E., Reilingh, G. D. V., Uitdehaag, K. A., Kemp, B. and Rodenburg, T. B. (2009). Effects of genetic group selection against mortality on behavior and peripheral serotonin in domestic laying hens with trimmed and intact beaks. *Physiol. Behav.* 97, 470-475. DOI: [10.1016/j.physbeh.2009.03.021](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.021)
- Craig, J. V. and Muir, W. M. (1993). Selection for reduction of beak-inflicted injuries among caged hens. *Poultry Sci.* 72, 411-420. DOI: [10.3382/ps.0720411](https://doi.org/10.3382/ps.0720411)
- Craig, J. V. and Muir, W. M. (1996). Group selection for adaptation to multiple-hen cages: Beak-related mortality, feathering, and body weight responses. *Poultry Sci.* 75, 294-302. DOI: [10.3382/ps.0750294](https://doi.org/10.3382/ps.0750294)
- Dennis, R. L., Fahey, A. G. and Cheng, H. W. (2009). Infrared beak treatment method compared with conventional hot-blade trimming in laying hens. *Poultry Sci.* 88, 38-43. DOI: [10.3382/ps.2008-00227](https://doi.org/10.3382/ps.2008-00227)
- EU Council Directive 99/74/EC of 19 July (1999). Minimum standards for the protection of laying hens. *Official Journal of the European Communities* No. L 203, 03, 08. 1999, p. 53
- Guesdon, V., Ahmed, A. M. H., Mallet, S., Faure, J. M. and Nys, Y. (2006). Effects of beak trimming and cage design on laying hen performance and egg quality. *Brit. Poultry Sci.* 47, 1-12. DOI: [10.1080/00071660500468124](https://doi.org/10.1080/00071660500468124)
- Hartcher, K. M., Tran, M. K. T. N., Wilkinson, S. J., Hemsworth, P. H., Thomson, P. C. and Cronin, G. M. (2015). Plumage damage in free-range laying hens: Behavioural characteristics in the rearing period and the effects of environmental enrichment and beak-trimming. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 164, 64-72. DOI: [10.1016/j.applanim.2014.12.011](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2014.12.011)
- Morrissey, K. L. H., Brocklehurst, S., Baker, L., Widowski, T. M. and Sandilands, V. (2016). Can non-beak treated hens be kept in commercial furnished cages? Exploring the effects of strain and extra environmental enrichment on behaviour, feather cover, and mortality. *Animals* 6, Article Number: 17. DOI: [10.3390/ani6030017](https://doi.org/10.3390/ani6030017)
- Shimmura, T., Suzuki, T., Azuma, T., Hirahara, S., Eguchi, Y., Uetake, K. and Tanaka, T. (2008). Form but not frequency of beak use by hens is changed by housing system. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 115, 44-54. DOI: [10.1016/j.applanim.2008.04.002](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.04.002)

- Shinmura, T., Eguchi, Y., Uetake, K. and Tanaka, T. (2006). Effects of light intensity and beak trimming on preventing aggression in laying hens. *Anim. Sci. J.* 77, 447-453. DOI: [10.1111/j.1740-0929.2006.00371.x](https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00371.x)
- Spindler, B., Giersberg, M. F., Andersson, R. and Kemper, N. (2016). Keeping laying hens with untrimmed beaks - A Review of the status quo in practice and science. *Züchtungskunde* 88, 475-493.
- SPSS for Windows (1999). Version 10.0 Copyright SPSS Inc.
- Sun, Y., Ellen, E. D., van der Poel, J. J., Parmentier, H. K. and Bijma, P. (2014). Modelling of feather pecking behavior in beak-trimmed and non-beak-trimmed crossbred laying hens: Variance component and trait-based approach. *Poultry Sci.* 93, 773-783. DOI: [10.3382/ps.2013-03367](https://doi.org/10.3382/ps.2013-03367)