

ANALIZA POVEZAVE MED GENOM MC4R TER MESNIMI IN KLAVNIMI LASTNOSTMI PRI KRŠKOPOLJSKEM PRAŠIČU

ASSOCIATION ANALYSIS BETWEEN THE MC4R POLYMORPHISM AND CARCASS AND MEAT QUALITY TRAITS IN THE KRŠKOPOLJE PIG

Klavdija POKLUKAR^{1*}, Marjeta ČANDEK-POTOKAR¹, Marie-José MERCAT², Bojana SAVIČ¹, Martin ŠKRLEP¹

IZVLEČEK

Za slovensko lokalno pasmo krškopoljski prašič je značilno večje nalaganje lipidov in manjše nalaganje proteinov kot pri selekcioniranih pasmah. Raziskave kažejo, da je polimorfizem c.892G>A pri drugih pasmah povezan z nalaganjem maščobe in variacijami v kakovosti mesa, zato je bila ta študija usmerjena v preučevanje asociacij z lastnostmi trupa in kakovosti mesa pri krškopoljskem prašiču. Fenotipski podatki so bili zbrani pri 525 živalih, genotipizacija pa izvedena z uporabo prilagojenega SNP-čipa Choice Genetics. Frekvenca alela 892A je znašala 0,61. Prašiči z genotipom AA so imeli večjo debelino slanine nad srednjo zadnjično mišico, na vihru ter večjo površino maščobe nad dolgo hrbtno mišico v primerjavi z živalmi z genotipom GG ($P<0,05$), medtem ko so bile živali z genotipom AG vmes med AA in GG. Živali z genotipom AA in AG so imele manjšo debelino srednje zadnjične mišice ($P<0,01$). Pri kakovosti mesa so med polimorfizmi bile zaznane razlike v trdoti mesa (strižna sila), izceji in intenzivnosti rdeče barve ($P<0,05$), medtem ko v vsebnosti intramuskularne maščobe, pH in sestavi maščobnih kislin v podkožni maščobi razlik ni bilo ($P>0,05$). Rezultati potrjujejo da polimorfizem MC4R c.892G>A vpliva na lastnosti zamaščenosti ter kakovosti mesa tudi pri krškopoljskem prašiču, kar kaže na njegov potencial za vključitev v rejski program.

Ključne besede: lokalna pasma prašičev, kakovost mesa, debelina podkožne maščobe, asociacijska študija, SNP

ABSTRACT

Slovenian local breed Krškopolje pig shows higher lipid and lower protein deposition than selected breeds. As the c.892G>A polymorphism has been linked to fat deposition and meat quality variation in many local and modern breeds, this study investigated its association with carcass and meat quality traits in the Krškopolje pig breed. Phenotypic data were collected from 525 animals, and genotyping was performed using the Choice Genetics custom SNP array. The frequency of the 892A allele was 0.61. Pigs with AA genotype showed greater backfat thickness over the *gluteus medius* muscle, at withers and larger fat area above loin eye than animals with GG genotype ($P<0.05$), while the animals with AG genotype were intermediate. Pigs with AA and AG genotypes had smaller *gluteus medius* muscle thickness than GG pigs ($P<0.01$). Concerning meat quality traits, significant differences were observed in muscle toughness (shear force), drip loss and in intensity of red color ($P<0.05$), while no differences were found in intramuscular fat content, pH and in backfat fatty acid composition ($P>0.05$). In conclusion, the MC4R c.892G>A polymorphism influences carcass fatness and meat quality traits in the Krškopolje pig, highlighting its potential for inclusion in breeding program.

Key words: local pig breed, meat quality, backfat thickness, association study, SNP

¹ Kmetijski inštitut Slovenije (KIS), Hacquetova ulica 17, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Institut du Porc, 9 Bd du Trieux, 35740 Pacé, Francija

* Corresponding author: klavdija.poklukar@kis.si

1 UVOD

Krškopoljski prašič je edina ohranjena avtohtona pasma prašičev v Sloveniji. V primerjavi z modernimi genotipi je krškopoljski prašič znan po večji kapaciteti nalaganja maščobe ter manjši mesnatosti (Poklukar in sod. 2023; Škrlep in sod. 2024). Meso ima bolj primerne lastnosti za predelavo v visoko kakovostne mesnine (Škrlep in sod. 2024; Savič in sod. 2025). V zadnjem času je bilo na krškopoljskem prašiču opravljenih več raziskav, ki so poskušale identificirati genetske mehanizme odgovorne za večjo kapaciteto nalaganja maščobe (Poklukar in sod. 2023, 2024; Bovo in sod. 2020; Muñoz in sod. 2018, 2019). Identifikacija kandidatnih markerjev, ki vplivajo na omenjene lastnosti, bi lahko prispevala k boljšemu razumevanju teh procesov ter v primeru velikih učinkov na fenotip omogočila njihovo vključitev v rejski program. V okviru H2020 projekta TREASURE je bila izvedena raziskava v kateri so analizirali distribucijo kandidatnih polimorfizmov pri 20 evropskih lokalnih pasmah prašičev, ki vplivajo na zamaščenost, kakovost mesa in rastnost. Rezultati so pokazali, da je v populaciji krškopoljskega prašiča prisotna visoka frekvenca alela A na melanokortinskem receptorju 4 (MC4R p.Asp298Asn ali c.892 G>A; v nekaterih študijah tudi c.1426G>A; Muñoz in sod. 2018), ki je povezan s hitrejšo rastjo, večjo zamaščenostjo in večjim zauživanjem krme, medtem ko ima alel G nasprotni učinek (Kim in sod., 2000).

Melanokortinski receptor 4 spada med receptorje sklopljene z G proteinom in se izraža v živčnem sistemu, kjer je vključen v melanokortinsko signalno pot. Zamenjava c.892G>A v visoko ohranjeni regiji vpliva na izražanje MC4R na celični površini, kar vpliva na regulacijo energetskega ravnoesja in posledično apetit (Zhang in sod. 2020). Ker imajo polimorfizmi na MC4R velik potencial za selekcijo s pomočjo markerjev, so njihovo povezavo raziskovali v mnogih modernih pasmah (Óvilo in sod. 2006; Davoli in sod. 2012; Fontanesi in sod. 2013), hkrati pa le v nekaterih

lokalnih pasmah (Piórkowska in sod. 2010). Pri večini pasem so dokazali povezavo z zamaščenostjo in rastnostjo (Switonski in sod. 2013), pri nekaterih pa tudi vpliv na lastnosti kakovosti mesa (Óvilo et al. 2006; Ótto in sod. 2007).

Kljub temu da je alel c. 892A na MC4R genu prisoten v številnih pasmah prašičev, se pri nekaterih sicer močno zamaščenih lokalnih pasmah pojavlja v zelo nizki frekvenci ali pa je celo odsoten (npr. Basque, Alentejana; Muñoz in sod. 2018), kar nakazuje da je pasemsko-specifičen. Prav tako je v literaturi pokazan zelo raznolik vpliv polimorfizma c.892G>A pri različnih pasmah na klavne lastnosti, lastnosti kakovosti ter na rastnost (Switonski in sod. 2013). Zaradi omenjenega je bil cilj naše raziskave potrditi visoko frekvenco c.892A na genu MC4R pri krškopoljskem prašiču ter ugotoviti, ali obstaja povezava med tem polimorfizmom in klavnimi lastnostmi oziroma lastnostmi kakovosti mesa.

2 MATERIAL IN METODE DELA

V raziskavo smo vključili 525 živali pasme krškopoljski prašič, ki so bile vzorčene med letoma 2016 in 2024. Povprečna starost živali ob zakolu je znašala 380 ± 5 dni (povprečje $\pm$ standardna napaka). Ob zakolu smo živalim izmerili debelino podkožne maščobe na treh anatomskih mestih: najtanjšo debelino podkožne maščobe nad srednjo zadnjično (*gluteus medius* ali GM) mišico, na nivoju zadnjega rebra ter na vihru. Prav tako smo določili najkrajšo razdaljo med sprednjim koncem srednje zadnjične mišice in zgornjim robom hrbtničnega kanala ter izmerili površino podkožne maščobe in hrbtnice mišice. En dan po zakolu smo odvzeli vzorce hrbtnice mišice za določitev lastnosti kakovosti mesa. Merili smo vrednost pH (45 minut in 24 ur po zakolu) s pomočjo MP120 Mettler Toledo pH metrom (Mettler-Toledo, GmbH, Schwarzenbach, Švica) ter barvo z Minolta Chroma Meter

Preglednica 1. Vpliv genotipa na MC4R genu (c.892G>A) na klavne lastnosti pri krškopoljskem prašiču

Table 1. The effect of the MC4R gene genotype (c.892G>A) on carcass traits in the Krškopolje pig

	MC4R genotip			RMSE	P-vrednost
	AA (N=197)	AG (N=245)	GG (N=83)		
Povprečna starost (v dnevih)	370	383	396	62	0.539
Debelina podkožne maščobe					
nad GM mišico, mm	41,9 ^b	40,6 ^{ab}	38,8 ^a	7,33	0,018
na zadnjem rebro, mm	45,9	45,0	43,5	6,70	0,067
na vihru, mm	65,2 ^b	63,3 ^b	59,6 ^a	6,64	<0.001
Debelina GM mišice, mm	73,1 ^a	74,3 ^a	76,6 ^b	6,61	0.002
Površina maščobe	52,5 ^b	49,4 ^a	48,1 ^a	9,37	0,002
Površina mišice	46,7	45,8	45,9	8,21	0,595
Intramuskularna maščoba, %	4,4	4,5	4,7	1,45	0,285

MC4R = melanokortinski receptor 4 / *melanocortin 4 receptor*; RMSE = koren povprečne kvadratne napake / *root mean standard error*;
GM = srednja zadnjična mišica ali *gluteus medius* / *gluteus medius*

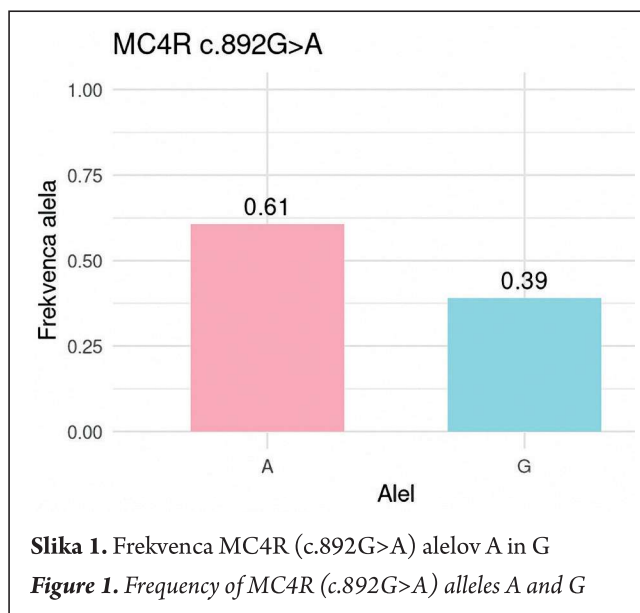
CR-300 (Minolta Co. Ltd, Osaka, Japonska). Izcejo vode po 24 urah smo ocenili s pomočjo EZ metode (Christensen, 2003). Trdoto mesa smo določili kot strižno silo na termično obdelanih vzorcih s teksturometrom TA Plus (Ametek, Lloyd Instruments Ltd., Fareham, Anglija). Vsebnost intramuskularne maščobe in maščobno-kislinske sestave podkožne maščobe smo ocenili s pomočjo bližnje infrardeče spektroskopije (aparatus NIR Systems 6500 Monochromator, Foss NIR System, Silver Spring, Maryland, ZDA) s kalibracijami razvitimi na Kmetijskem inštitutu Slovenije.

Živalim smo ob zakolu vzorčili del ušesnega tkiva iz katerega smo izolirali DNK s pomočjo Qiamp DNA Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Nemčija) po navodilih proizvajalca. Količina in kakovost izolirane DNK je bila preverjena s pomočjo spektroskopa Tecan Infinite M Nano+ z uporabo Infinite NanoQuant platke (Tecan Trading AG, Männedorf, Švica) z merjenjem absorbance pri 260 nm ter razmerij A260/A280 ter A260/A230. Visokokakovostni vzorci DNK so bili genotipizirani z uporabo prilagojenega SNP-čipa Choice Genetics, ki vsebuje polimorfizem na MC4R genu (kromosom 1, pozicija 160773437, verzija genoma *Sus scrofa* 11.1 oziroma 892G>A oziroma c.1426G>A). Genotip je bil ekstrahiran z uporabo programske opreme PLINK 1.9 (Purcel in sod., 2007).

Vpliv genotipa MC4R (c.892G>A) je bil ocenjen s pomočjo analize variance v programu R (različica 4.4.2) z uporabo paketa sasLM. Model je vključeval fiksni vpliv genotipske skupine MC4R (tj., AA, AG in GG) ter rejca in teže trupov. Na osnovi modela smo izračunali prilagojene srednje vrednosti (angl. estimated marginal means) in razlike med genotipi ocenili z uporabo funkcije PDIFF.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Genotip AA na genu MC4R (c.892G>A) je bil v analizirani populaciji prisoten pri 197 živalih, genotip AG pri 245 in genotip GG pri 83 živalih. Frekvenca alela 892G je v populaciji znašala 0,39, frekvenca alela 892A pa 0,61 (Slika 1).



V primerjavi z objavljeno literaturo je frekvenca alela 892A pri krškopoljskem prašiču podobna ugotovitvam predhodnih študij, ki poročajo o frekvenci 0,66 (Muñoz in sod. 2018) oziroma 0,75 (Poklukar in sod. 2023). Razmeroma visoka frekvenca alela 892A pri krškopoljskem prašiču je verjetno posledica dejstva, da pasma ni bila selekcionirana na rastnost ali povečano mesnatost kot so bile moderne pasme, pri katerih je ta frekvenca pogosto nižja (Burgos in sod. 2006). Študije prav tako ugotavljajo, da je učinek genotipa MC4R pasemsko-specifičen (Switonski in sod., 2013; Davoli in sod., 2012).

Pri preučevanju vpliva genotipa na klavne lastnosti (pregl. 1) smo ugotovili statistično značilne razlike v debelini podkožne maščobe nad GM mišico pri čemer so bile živali z genotipoma AA v primerjavi z genotipom GG bolj zamaščene ($P < 0,05$), podobno tudi pri debelini podkožne maščobe na zadnjem rebri (tendenco po bolj zamaščenem fenotipu živali z alelom 892A;

Preglednica 2. Vpliv genotipa na MC4R genu (c.892G>A) na lastnosti kakovosti mesa pri krškopoljskem prašiču

Table 2. The effect of the MC4R gene genotype (c.892G>A) on meat quality traits in the Krškopolje pig

	MC4R genotip			RMSE	P-vrednost
	AA (N=197)	AG (N=245)	GG (N=83)		
pH po 45 min	6,3	6,4	6,3	0,24	0,272
pH po 24 urah	5,5	5,5	5,4	0,13	0,059
Barva L* mišice <i>longissimus dorsi</i>	52,7	52,4	52,6	4,37	0,754
Barva a* mišice <i>longissimus dorsi</i>	10,6 ^a	10,9 ^a	11,5 ^b	1,82	0,004
Barva b* vrednost mišice <i>longissimus dorsi</i>	5,0	5,2	5,5	1,94	0,246
Izceja vode po 24 urah	4,8 ^a	4,9 ^a	5,7 ^b	2,15	0,020
Trdota mesa, N	50,7 ^b	51,2 ^b	46,2 ^a	10,73	0,010

$P < 0,10$). Večja debelina podkožne maščobe na vihru je bila prav tako opažena pri živalih z genotipom AA in AG v primerjavi z genotipom GG ($P < 0,001$). Živali z genotipom AA so imele večjo površino maščobe nad mišico LD v primerjavi z AG in GG ($P < 0,01$). Manjša debelina GM mišice je bila opažena pri živalih z genotipom AA in AG ($P < 0,01$). Pri vsebnosti intramuskularne maščobe ter pri površini LD mišice med genotipi nismo ugotovili statistično značilnih razlik ($P > 0,05$).

Rezultati so v skladu z drugimi predhodno objavljenimi študijami, ki so prav tako dokazali zmanjšanje debeline podkožne maščobe pri alelu 892A (Davoli in sod. 2012; Óvilo in sod. 2006; Van den Maagdenberg in sod. 2007). Čeprav podatka o količini zaužite krme v naši študiji nimamo, je lahko za razlike v zamaščenosti odgovoren tudi večji apetit živali z genotipom 892A, kar vodi v povečan povprečni dnevni prirast in povečano nalaganje maščobe (Bruun in sod. 2006; Adan in sod. 2006; Van den Maagdenberg in sod. 2007).

V povezavi z lastnostmi kakovosti mesa (pregl. 2) so imeli krškopoljski prašiči z genotipom GG v primerjavi z AG in AA mehkejšo meso z večjo izcejo mišičnega soka ter bolj intenzivno rdečo barvo ($P < 0,05$) ter tendenco k nižjemu pH po 24 urah ($P = 0,06$). Pri preostalih lastnostih kakovosti, kot so pH po 45 minutah ter barvnimi parametri L in b* med genotipi nismo ugotovili statistično značilnih razlik ($P > 0,05$).

V nasprotju z našimi rezultati so v predhodno objavljenih raziskavah pokazali povezavo alela 892A s temnejšo (Óvilo in sod. 2007) in pa tudi s svetlejšo barvo (Óvilo in sod. 2006), z razlikami v vsebnosti intramuskularne maščobe (Stachowiak in sod. 2005; Davoli in sod. 2012; Piórkowska in sod. 2010), medtem ko v mehki mesu niso našli razlik (Muñoz in sod. 2011) ali pa je bila opažena tendenca k tršemu mesu homozigotov 892G v primerjavi s heterozigoti (Van den Maagdenberg in sod. 2007). Razlike v sami trdoti mesa heterozigotov in homozigotov z alelom 892A je lahko povezana s faktorji, ki niso bili kontrolirani, kot so velikost mišičnih vlaken ali proteolitična aktivnost.

Pri preverjanju vpliva genotipa na MC4R genu na maščobno-kislinsko sestavo (pregl. 3) nismo našli statistično značilnih razlik ($P > 0,05$), kar je skladno z raziskavo Muñoz in sod. (2011).

V nasprotju s tem je študija avtorjev Óvilo in sod. (2006) našla povezavo 892A alela z vsebnostjo nasičenih maščobnih kislin, kar je lahko tudi posledica raznolike in nekontrolirane sestave krme, količine vnosa krme ter starosti živali.

4 ZAKLJUČKI

V raziskavi smo pri krškopoljskem prašiču potrdili visoko vsebnost alela 892A na genu MC4R ter hkrati pokazali značilno povezavo z debelino podkožne maščobe in površino maščobe. Bistvenih vplivov na kakovost mesa prisotnost 892A alela nismo odkrili, razen na samo trdoto mesa ter izcejo, kar pa je lahko posledica nekontroliranih faktorjev. Dokazana asociacija alela c.892A na MC4R genu predstavlja priložnost za nadaljnje asociacijske študije ter možno vključitev v rejski program.

5 ZAHVALA

Raziskovalno delo avtorjev je bilo financirano s strani Javne agencije za znanstveno raziskovalno in inovacijsko dejavnost ARIS (P4-0133, Z4-60178, J4-3094) in projekta GEroNIMO (H2020, št. 101000236). Zahvaljujemo se Debeljak Janiju za njegovo pomoč pri laboratorijskih analizah.

6 LITERATURA

- Adan, R.A.H., Tiesjema, B., Hillebrand, J.J.G., la Fleur, S.E., Kas, M.J.H., de Krom, M. 2006. The MC4 receptor and control of appetite. *British Journal of Pharmacology*, 149, 815-827.
- Bovo, S., Ribani, A., Muñoz, M., Alves, E., Araújo, J.P.P., Bozzi, R. et al. 2020. Genome-wide detection of copy number variants in European autochthonous and commercial pig breeds by whole-genome sequencing of DNA pools identified breed-characterising copy number states. *Animal genetics*, 51, 4, 541-556.

Preglednica 3. Vpliv genotipa na MC4R genu (c.892G>A) na maščobno-kislinsko sestavo podkožne maščobe pri krškopoljskem prašiču

Table 3. The effect of the MC4R gene genotype (c.892G>A) on the fatty acid composition of subcutaneous fat in the Krškopolje pig

	MC4R genotip			RMSE	P-vrednost
	AA (N=197)	AG (N=245)	GG (N=83)		
SFA, %	42,3	42,2	41,9	1,91	0,545
MUFA, %	47,2	47,0	47,3	1,92	0,460
PUFA, %	10,6	10,8	11,0	1,60	0,163

SFA = nasičene maščobne kisline / *saturated fatty acids*; MUFA = enkrat nenasičene maščobne kisline / *monounsaturated fatty acids*; PUFA = večkrat nenasičene maščobne kisline / *polyunsaturated fatty acids*

- Bruun, C.S., Jørgensen, C.B., Nielsen, V.H., Andersson, L., Fredholm, M. 2006. Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire. *Animal Genetics*, 37, 4, 359-362.
- Burgos, C., Carrodegas, J.A., Moreno, C., Altarriba, J., Tarrafeta, L., Barcelona, J.A. 2006. Allelic incidence in several pig breeds of a missense variant of pig melanocortin-4 receptor (MC4R) gene associated with carcass and productive traits; its relation to IGF2 genotype. *Meat Science*, 73, 1, 144-155.
- Christensen, L.B. 2003. Drip loss sampling in porcine m. longissimus dorsi. *Meat Science*, 63, 469-477.
- Davoli, R., Braglia, S., Valastro, V., Annaratone, C., Comella, M., Zambonelli, P. 2012. Analysis of MC4R polymorphism in Italian Large White and Italian Duroc pigs: Association with carcass traits. *Meat Science*, 90, 4, 887-892.
- Fontanesi, L., Buttazzoni, L., Galimberti, G., Caló, D.G., Scotti, E., Russo, V. 2013. Association between melanocortin 4 receptor (MC4R) gene haplotypes and carcass and production traits in Italian Large White pigs evaluated with a selective genotyping approach. *Livestock Science*, 157, 1, 48-56.
- Kim, S.K., Larsen, N., Short, T., Plastow, G., Rothschild, M.F. 200. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome*, 11, 131-135.
- Muñoz, M., Alcázar, E., Fernández, A., Barragán, C., Carrasco, A., de Pedro, E. et al. 2011. Effects of porcine MC4R and LEPR polymorphisms, gender and Duroc sire line on economic traits in Duroc × Iberian crossbred pigs. *Meat Science*, 88, 1, 169-173.
- Muñoz, M., Bozzi, R., García, F., Núñez, Y., Geraci, C., Crovetto, A. et al. 2018. Diversity across major and candidate genes in European local pig breeds. *Plos One*, 20.
- Muñoz, M., Bozzi, R., García-Casco, J., Núñez, Y., Ribani, A., Franci, O. et al. 2019. Genomic diversity, linkage disequilibrium and selection signatures in European local pig breeds assessed with a high density SNP chip. *Scientific Reports*, 19, 9, 1: 13546.
- Ótto, G., Roehe, R., Looft, H., Thoelking, L., Knap, P.W. et al. 2007. Associations of DNA markers with meat quality in pigs with emphasis on drip loss. *Meat Science*, 75, 185-195.
- Óvilo, C., Fernández, A., Rodríguez, M.C., Nieto, M., Sílío, L. 2006. Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. *Meat Science*, 73, 7, 42-47.
- Piorkowska, K., Tyra, M., Rogoz, M., Ropka-Molik, K., Oczkowicz, M., Rózycki, M. 2010. Association of the melanocortin-4 receptor (MC4R) with feed intake, growth, fatness and carcass composition in pigs raised in Poland. *Meat Science*, 85, 297-301.
- Poklucar, K., Čandek-Potokar, M., Batorek-Lukač, N., Škrlep, M. 2023. Biochemical and gene expression differences associated with higher fat deposition in Krškopolje pigs in comparison with lean hybrid pigs. *Livestock science*, 272, 105247.
- Poklucar, K., Mestre, C., Škrlep, M., Čandek-Potokar, M., Óvilo, C., Fontanesi, L. et al. 2023. A meta-analysis of genetic and phenotypic diversity of European local pig breeds reveals genomic regions associated with breed differentiation for production traits. *Genetics selection evolution*, 55, 88, 1-17.
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M.A., Bender, D. et al. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81, 3, 559-75.
- Savič, B., Škrlep, M., Marušić, Radovčić, N., Petričević, S., Čandek-Potokar, M. 2025. Quality of Slovenian dry-cured ham from Krškopolje and hybrid pigs: Influence of skin trimming methods. *Meat science*, 222, 109762, 1-10.
- Stachowiak, M., Szydlowski, M., Obarzanek-Fojt, M., Switonski, M. 2005. An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene on production traits in Polish pig breeds is doubtful. *Animal Genetics*, 37, 1, 55-57.
- Switonski, M., Mankowska, M., Salamon, S. 2013. Family of melanocortin receptor (MCR) genes in mammals - mutations, polymorphisms and phenotypic effects. *Journal of Applied Genetics*, 54, 461-472.
- Škrlep, M., Poklucar, K., Vrecl, M., Brankovič, J., Čandek-Potokar, M. 2024. Growth performance, carcass quality, and lipid metabolism in Krškopolje pigs and modern hybrid pigs: comparison of genotypes and evaluation of dietary protein reduction. *Animals*, 22, 3331, 1-19.
- Škrlep, M., Poklucar, K., Millet, S., Čandek-Potokar, M. 2025. Reducing protein levels in diets for local pig breeds: a case study on fat-type krškopolje pig. *Animal science journal*, 96, 1, 1-10.
- Van den Maagdenberg, K., Stinckens, A., Claey, E., Seynaeve, M., Clinquart, A., Georges, M. 2007. The Asp298Asn missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. *Animal*, 1, 8, 1089-1098.
- Zhang, J., Li, J., Wu, C., Hu, Z., An, L., Wan, Y. et al. 2020. The Asp298Asn polymorphism of melanocortin-4 receptor (MC4R) in pigs: evidence for its potential effects on MC4R constitutive activity and cell surface expression. *Animal Genetics*, 12986.