DISS. ETH NO. 24417

Perinatal nutritional effects on muscle development and growth from birth to slaughter age of low birth weight pigs from hyperprolific sows

A dissertation submitted to

ETH Zurich

For the degree of

Doctor of Sciences

Presented by

JOHANNES GULMANN MADSEN

M.Sc. Animal Science

University of Copenhagen, Denmark

Born: 25'th of February 1985

Citizen of Denmark

Accepted on the recommendation of

Professor Dr. Michael Kreuzer, examiner

Dr. Giuseppe Bee, co-examiner

Dr. Roland Weber, co-examiner

2017

Summary

Breeding for more pigs born per sow is a rational measure to increase the efficiency of a modern pig production. The mordern pig production is a business and like any other business it is subjected to a large degree of competition between pig producers. For this reason producers, advisors and researchers have for many years aimed a optimizing and improving all aspects of pig production from breeding to nutrition to management. However, in particular with regards to breeding, after decades of selecting for sows that give birth to a greater number of total born piglets, it has been speculated and to some degree criticized whether an improvement of production efficiency has actually occurred. This breeding goal has been associated with a number of challenges. Most critical is the increasing impact of intra-uterine growth retardation (IUGR) when the number of embryos exceeds a certain level, leading to great competition with respect to available nutrients and energy among foetuses. Thus, eventually a greater number of offspring are born with altered muscle morphology among other impairments that negatively influence their postnatal performance. In addition, the increased number of total born piglets does not correspond to a greater number of functional teats or to a great extent increased milk yield. Hence, especially true for low birth weight (L-BtW) piglets which are less viable from birth, more piglets will likely suffer from undernourishment and eventually die prior to weaning. Furthermore, should the piglets survive until weaning and make it all the way till they reach slaughter weight, they are often of less economical value compared with their larger litter mates due to their impaired carcass composition and meat quality traits. Despite these negative traits related to L-BtW the breeding scheme has not been changed, likely because using hyperprolific compared with lowerprolific sows drives a greater profit. However, the increased mortality rate and impaired growth performance is of great concern to both producers and consumers, thus when the selection criteria will not be changed other measures are necessary to manage the excess number of L-BtW growth impaired piglets. For this very reason, a gestation diet supplemented with additional nutrients considered useful and an alternative rearing and nutritional strategy during the lactation period was proposed as measures potentially improve muscle development and growth of L-BtW piglets from large litters.

This was in the center of the research carried out in the present doctoral project. Prior to the three main experiments conducted during the lactation period, an experiment using five intact (IN) and five unilateral oviduct ligated (OL) sows fed either an L-arginine (ARG) supplemented or unsupplemented standard gestation diet from day 14-28 of gestation was conducted. The experiment was conducted as a

2 × 2 crossover design (two periods for each sow in their 5th and 6th parity). This study investigated the impact of uterine environment and effect of additional amounts of ARG on myofiber characteristics of piglets at birth. At the day of farrowing, two female and two male piglets per sow per parity were sacrificed, one with the lowest BtW (L) and one with intermediate BtW (M). Immediately after, organs, *Psoas Major* (PM) and *Semitendinosus* muscle (STM) were sampled and weighed, where the latter was later assessed for total number of myofibers and myofiber characteristics in the dark (STM_d) and light portion (STM_l) of the muscle. Furthermore, in the STM gene expression of myogenesis-related genes was analysed. Main findings of this experiment were that ARG supplementation increased hyperplasia and hypertrophy of piglets, thus reducing the negative impacts of IUGR. However, ARG supplementation did not prove to be especially efficient in L-BtW piglets.

In the three main experiments conducted during the early postnatal (lactation) period, the less viable animals of the litters were selected for the experiment assuming this would have the greatest impact on the production efficiency. Therefore, piglets with birth weight below 1.2 kg and originating from sows giving birth to ≥ 15 total born were chosen for alternative rearing, and selected for rearing in rescue decks and fed an unsupplemented or one of two supplemented milk replacers during the lactation period. The first selection criteria was based on previous experiments performed at the Agroscope research facility, showing that piglets with BtW below this threshold display impaired preweaning growth compared with larger littermates. The second set of criteria was based on previous studies showing that exceeding this number of embryos critically affects the uterine environment enhancing the impact of IUGR. The choice of supplements, L-carnitine (CAR) and ARG, were also based on previous studies eliciting, respectively, postnatal hyperplasia and enhanced protein synthesis which both could potentially improve the growth of young piglets. The aim of the three main experiments was to determine the impact of the supplements added to a basic milk replacer compared with and unsupplemented control (CON), on growth and muscle development of L-BtW piglets from large litters that were artificially reared in rescue decks from day 7-28 of age. In the first experiment ten piglets per group (CON, CAR and ARG) were equally balanced between gender as much as possible within groups and moved to rescued decks in pairs and fed a restricted amount of milk replacer and supplements based on previously reported requirements. In the second experiment 12 piglets per group were used, but due to the observed poor BW on day 28 of the first experiment, feeding regimen was changed from restrictive to *ad libitum*. Furthermore, piglet BW on day 7 was slightly greater in the second experiment as a consequence of the attempt to ensure similar

BW between pairs of piglets on the day of artificial rearing. Otherwise the experimental design was similar between the two experiments. Growth and feed intake were measured monitored throughout the experimental period, and piglets were slaughtered on day 28 of age. At slaughter blood was sampled for assessment of serum metabolites, organs weighed, and the STM was removed, weighed and its length and circumference was measured. The STM was later assessed for TNF and myofiber characteristics in the STM_d and STM_l. Furthermore, in the STM gene expression of proteasome, myogenesis-related, and myosin heavy chain genes was analysed. In the third main and last experiment CAR and ARG (CarArg) were combined in one dietary treatment and compared with a CON group. The supplements were combined in one dietary treatment, as one supplement did not show to have an advantage over the other in the two previous experiments. In addition, in contrast to the first and second main experiment and to assess the possible effect of dietary supplementation in the post weaning period, only the piglet of the pair with the lowest BW day 21 was slaughtered day 28, while the other piglet of the pair of both the CON and CarArg group was weaned and housed together with conventionally reared L-BtW piglets from large litters. All weaned piglets were fed a standard starter, grower and finisher diet until slaughter at day 170 of age. Growth and individual feed intake was monitored from beginning of starter diet period to slaughter day 170. Of the piglets slaughtered on day 28 the sampling procedure was similar to the second and third experiment, in addition to weighing and measuring length of small and large intestine and sampling of pieces of the duodenum, jejunum and ileum for later assessment of gut morphology and function. Pigs that were slaughtered day 170 were in addition subjected to analysis of metabolic properties of the STM also assessed for carcass composition and selected meat quality traits.

The dietary supplements did not have an effect on growth performance, feed intake and feed efficiency during the lactation period in any of the three main experiments. This was quite unexpected especially with regards to ARG which has in previous experiment shown a great effect on particularly on growth. Also L-carnitine did not as previously show to be able to elicit postnatal hyperplasia. However, both supplements did have an impact on muscle maturity emphasized by a preference of glycolytic over oxidative metabolism in the STM in the first main experiment. In the second main experiment, both L-carnitine and L-arginine showed to promote protein synthesis through increased phosphorylation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signalling pathway and increased gene expression of a gene involved in protein synthesis, respectively, compared with the CON group. In the third main experiment, also a supplemental effect on STM metabolism was observed of piglet slaughtered day 28, however in

contrast to the two previous experiment this effect did not promote muscle maturity. Of the piglets weaned on day 28, the CarArg compared with CON group displayed greater BW at the beginning of the grower period, and greater daily gain and feed intake in the starter-grower period. Interestingly, although not analysed statistically growth performance from birth to slaughter of CON and CarArg compared with conventionally reared piglets did not differ. As the average litter size of the conventionally reared piglets was less than 11 piglets from day 7 to 28 of age, it was assumed that competition for sow milk among siblings was minimized and piglets therefore reared under close to optimal conditions. With this observation and results from the first two main experiments in mind it was concluded that improving the growth performance of L-BtW piglets from large litters by nutritional means is not straight forward. However, there are indications that certain nutrients have an impact on muscle development of L-BtW piglets, and surely milk replacers with respect to energy and protein content and amino acid composition can be optimized. In addition, artificial rearing is also an interesting measure worthwhile investing further, especially in relation to rearing earlier than day 3 of age. Thus, much more research is still needed in relation to improving survival and growth of L-BtW/IUGR piglets from large litters, where other measures such as nursing sows exclusively for L-BtW/IUGR piglets in combination with provision of an optimized milk could be an interesting subject of investigation.

Zusammenfassung

Die Zucht auf mehr geborene Schweine pro Sau ist eine Massnahme um die Effizienz der modernen Schweineproduktion zu steigern. Die moderne Schweineproduktion ist ein Geschäft und wie jedes andere Geschäft im hohen Masse dem Wettkampf zwischen den Schweineproduzenten ausgesetzt. Aus diesem Grund haben Produzenten, Berater und Forscher für viele Jahre alle Aspekte der Schweinproduktion auf eine Optimierung und Verbesserung ausgerichtet, welche von der Zucht über die Ernährung bis hin zum Management reichen. Insbesondere im Hinblick auf die Züchtung, wurde nach Jahrzehnten der Selektion auf Sauen, welche eine grössere Anzahl an total geborenen Ferkeln gebären, spekuliert und zu einem gewissen Masse kritisiert, ob eine Verbesserung der Produktionseffizienz tatsächlich aufgetreten ist. Dieses Zuchtziel ist mit einer Reihe an Herausforderungen assoziiert. Am kritischsten ist mit Sicherheit der steigende Einfluss der intra-uterinen Wachstumsretardation (IUWR) zu sehen, was besonders dann zu beobachten ist, wenn die Anzahl der Embryonen ein bestimmtes Niveau überschreitet. Dies führt zu einem grossen Wettkampf zwischen den Föten hinsichtlich verfügbarer Nährstoffe und Energie. Als Folge dessen, könnten möglicherweise eine grössere Anzahl Nachkommen mit einer veränderten Muskelmorphologie geboren werden, welche, wie andere Beeinträchtigungen, die postnatale Leistungsfähigkeit negativ beeinflusst. Darüber hinaus geht eine steigende Zahl total geborener Ferkel nicht mit einer grösseren Zahl an Zitzen oder einer im hohen Masse gesteigerten Milchleistung einher. Daher gilt besonders für Ferkel mit einem niedrigen Geburtsgewicht (N-GGw), die von Geburt an auch weniger lebensüberfähig sind, dass diese wahrscheinlich vermehrt unter Mangelernährung leiden und eventuell vor dem Absetzen sterben. Des Weiteren, sollten Ferkel bis zum Absetzen überleben und ihr Schlachtalter erreichen. Aufgrund ihrer verschlechterten Schlachtkörperzusammensetzung und Merkmalen der Fleischqualität, haben die N-GGw Ferkel häufig einen geringeren ökonomischen Wert für den Produzenten verglichen mit normalgewichtigen Ferkeln. Das Züchtungsschema hat sich trotz dieser negativen mit dem geringen Köpergewicht verbundenen Eigenschaften nicht geändert, wahrscheinlich da sehr fruchtbare Sauen verglichen mit weniger fruchtbaren Sauen einen grösseren Gewinn generieren. Dennoch ist die wachsende Sterblichkeitsrate und die verschlechterte Wachstumsleistung sowohl für Produzenten als auch für Konsumenten von grossem Belang. Daher werden, sofern sich die Selektionskriterien nicht ändern, andere Massnahmen nötig sein, um die übermässige Zahl an N-GGw Ferkeln, die eine verschlechtertes Wachstum aufweisen, zu handhaben. Aus diesem besonderen Grund wurde eine Trächtigkeitsration, die mit zusätzlichen Nährstoffen

supplementiert wurde, als eine Massnahme vorgeschlagen, welche möglicherweise die Muskelentwicklung und das Muskelwachstum bei N-GGw Ferkeln aus grossen Würfen stammend verbessern soll.

Dies war der zentrale Inhalt der wissenschaftlichen Arbeit, welche im vorliegenden Promotionsprojekt durchgeführt wurde. Vor den drei Hauptexperimenten, welche während der Laktationsperiode durchgeführt worden sind, wurde ein Experiment mit fünf gesunden Sauen (IN) und fünf Sauen mit einem einseitig Ovidukt ligiert (OL) durchgeführt, die entweder eine standardisierte Trächtigkeitsration erhielten oder eine Ration, welche mit L-Arginin (ARG) supplementiert wurde. Die Sauen wurden mit diesen Rationen vom 14. – 28. Trächtigkeitstag gefüttert. Das Experiment wurde als 2 x 2 Crossover Design durchgeführt (zwei Perioden für jede Saue in der 5. und 6. Parität). In dieser Studie sollte der Einfluss der uterinen Umwelt und der Effekt einer zusätzlichen Menge an ARG auf die Myofasercharakteristika von frisch geborenen Ferkeln untersucht werden. Am Tag des Abferkelns wurden zwei weibliche und zwei männliche Ferkel pro Sau und Wurf geopfert. Das mit geringsten GGw (G) und eines mit einem mittleren GGw (M). Direkt danach wurden Organe, der *Psoas Major* (PM) sowie der *Semitendinosus* Muskel (STM) gesammelt und gewogen. Der Letztere wurde verwendet um die totale Nummer an Myofibrillen und Myofibirllencharakteristika des dunklen (STM_d) und hellen (STM_l) Teil zu bestimmen. Des Weiteren, wurde in dem STM die Genexpression, der mit der Myogenesis in Verbindung stehenden Gene, analysiert. Die Haupterkenntnisse dieses Versuchs waren, dass eine ARG Supplementierung Hyperplasie und Hypertrophie von Ferkeln steigert. Folglich reduziert diese den negativen Einfluss des IUWR. Jedoch, konnte nicht bewiesen werden, dass eine ARG Supplementierung besonders effizient bei N-GGw Ferkeln ist.

In den drei Hauptexperimenten, die in der frühen post natalen (Lakation) Phase durchgeführt wurden, wurden die weniger vitalen Tiere eines Wurfs für das Experiment selektiert, bei denen angenommen wurde, dass diese den grössten Einfluss auf die Produktionseffizienz haben. Daher wurden Ferkel für eine alternative Aufzucht ausgewählt, die ein geringeres Geburtsgewicht als 1.2 kg hatten und von Sauen stammten, die mehr als 15 Ferkel geworfen hatten. Diese Ferkel wurden ausgewählt um sie unter einem Rescue Deck aufzuziehen. Diese wurden mit einem nicht supplementierten oder einem von zwei supplementierten Milchaustauschern, während der Laktationsphase gefüttert. Das erste Selektionskriterium basierte auf früheren Studien, die gezeigt haben, dass eine Überschreitung dieser Anzahl an Embryos sich durch einen gesteigerten Einfluss auf IUWR kritisch auf die uterine Umwelt

auswirkt. Die Wahl der Supplemente, L-Carnitin (CAR) und ARG, basierte ebenfalls auf vorherigen Studien, welche respektive eine postnatale Hyperplasie hervorrufen und die Proteinsynthese fördern. Beide Effekte könnten möglicherweise das Wachstum junger Ferkel verbessern. Das Ziel der drei Hauptexperimente war zu bestimmen, inwieweit ein Supplement, welches einem einfachen Milchaustauscher hinzugefügt worden ist, verglichen mit einer unsupplementierten Kontrolle (CON), das Wachstum und die Muskelentwicklung von N-GGw Ferkeln, die künstlich unter Rescue Decks von Tag 7-28 aufgezogen wurden, beeinflusst. Im ersten Versuch wurde zehn Ferkel wurden pro Gruppe (CON, CAR und ARG) soweit möglich gleichmässig innerhalb der Gruppen aufgeteilt und paarweise unter Rescue Decks gebracht sowie eine restriktive Menge an Milchaustauscher und Supplemente basierend auf früher berichteten Anforderungen verabreicht. Im zweiten Experiment wurden 12 Ferkel pro Gruppe verwendet, aber aufgrund des geringen beobachteten Körpergewichts (KGw) an Tag 28 des ersten Experiments, wurde das Fütterungsregime von restriktiv auf ad libitum geändert. Das Gewicht der Ferkel an Tag 7 war im zweiten Experiment leicht grösser, was eine Konsequenz des Versuchsansatzes war, gleiche Körpergewichte zwischen den Ferkelpaaren am Tag der künstlichen Aufzucht sicherzustellen. Ansonsten war das experimentelle Design zwischen den zwei Experimenen gleich. Das Wachstum und die Futteraufnahme wurde über die gesamte experimentelle Periode erfasst und überwacht und die Ferkel wurden im Alter von 28 Tagen geschlachtet. Bei der Schlachtung wurde das Blut zur Beurteilung von Serummetaboliten gesammelt, Organe gewogen und der STM entfernt, gewogen sowie dessen Länge und Umfang erfasst. Der STM wurde später nach TNF und Myofibrillencharakteristika im STM_d und STM_l beurteilt. Des Weiteren wurde, in der STM Genexpression der Proteasomen, die mit der Myogenese zusammenhängende Gene und die Gene der schweren Myosinketten, analysiert. Im dritten und letzten Versuch wurde CAR und ARG (CarArg) in einer Ration kombiniert und mit der CON Gruppe verglichen. Die Supplemente wurden in einer Ration kombiniert, da keines der Supplemente in de zwei vorherigen Versuchen einen Vorteil gegenüber dem anderen gezeigt hatte. Zusätzlich, und im Gegensatz zu dem ersten und zweiten Versuch und um den möglichen Effekt der Rationssupplementierung in der Periode nach dem Absetzen zu beurteilen, wurde nur das Ferkel des Paares mit dem geringsten Körpergewicht (KGw) am 21. Tag, am 28. Tag geschlachtet, während das andere Ferkel des Paares beider Gruppen (CON, CarArg) zusammen mit den konventionell aufgezogenen N-GGw Ferkeln von grossen Würfen, gehalten und abgesetzt wurden. Allen abgesetzten Ferkeln wurde eine übliche Starter-, Grower- und Finisher-Ration verfüttert bis sie im Alter von 170

Tagen geschlachtet wurden. Wachstum und individuelle Futteraufnahme wurde vom Beginn der Starter-Rationsgabe bis zur Schlachtung erfasst (170 Tage). Das Vorgehen beim Proben nehmen bei den Ferkeln, die nach 28 Tagen geschlachtet wurden, war das gleiche im zweiten und dritten Versuch. Zusätzlich wurde der Dünn-und Dickdarm gewogen, dessen Länge bestimmt und es wurden Proben von Teilen des Duodenums, Jejunums und Ileums für die spätere Beurteilung der Darmmorphologie und -funktion genommen. Ferkel, welche nach 170 Tagen geschlachtet wurden, wurden zusätzlich einer Analyse des metabolischen Eigenschaften des STMs unterworfen, auch um die Schlachtkörperzusammensetzung und ausgewählte Fleischqualitätsmerkmale zu beurteilen.

Die Supplementierung der Ration hatte während der Laktationsperiode in allen drei Versuchen keinen Effekt auf die Wachstumsleistung, Futteraufnahme und Futterverwertung. Dies war ziemlich unerwartet hinsichtlich des ARG, welches in vorherigen Versuchen besonders einen Effekt auf das Wachstum hatte. Auch L-Carnitin, wie bereits gezeigt wurde, war nicht in der Lage eine postnatale Hyperplasie auszulösen. Jedoch hatten beide Supplemente im ersten Versuch einen Einfluss auf die Muskelmaturität hervorgerufen durch die Bevorzugung eines glykolytischen gegenüber eines oxidativen Stoffwechsels im STM. Sowohl L-Carnitin als auch L-Arginin zeigten im zweiten Versuchen, dass sie die Proteinsynthese durch eine gesteigerte Phosphorylierung des Mammalian target of rapamycin (mTOR) Signalstoffwechsels fördern und zu einer gesteigerten Genexpression eines Gens, welches in die Proteinsynthese involviert ist, verglichen mit der CON Gruppe führen. Auch im dritten Hauptversuch konnte ein Effekt des Supplements auf den STM Stoffwechsel bei Ferkeln mit einem Schlachtalter von 28 Tagen beobachtet werden, jedoch im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen förderte dieser Effekt nicht die Muskelmaturität. Von den Ferkeln, die mit 28 Tagen abgesetzt wurden, entwickelte die CarArg Gruppe verglichen zur CON Gruppe ein grösseres KGw am Beginn der Grower Periode, grössere Zunahmen sowie höhere Futteraufnahmen in der Starter-Grower Periode. Interessanterweise und obwohl es statistisch nicht analysiert wurde, unterschied sich die Wachstumsleistung von der Geburt bis zum Schlachten der CON und CarArg Gruppe nicht von konventionell aufgezogenen Ferkeln. Da die durchschnittlichen Wurfgrössen der konventionell aufgezogenen Ferkel kleiner als 11 Ferkel zwischen dem 7. und 28. Lebenstag waren, wird angenommen, dass der Wettkampf um die Sauenmilch zwischen den Ferkeln minimiert war und die Ferkel daher unter fast optimalen Bedingungen aufgezogen worden sind. Mit diesen Beobachtungen und der Ergebnisse der ersten zwei Hauptversuche, konnte geschlussfolgert werden, dass eine Verbesserung des Muskelwachstums von N-GGw Ferkeln durch

Fütterungsstrategien nicht einfach zu bewerkstelligen ist. Jedoch gibt es Hinweise das bestimmte Nährstoffe einen Einfluss auf die Muskelentwicklung der N-GGw Ferkel haben und mit Sicherheit ist es möglich den Milchaustauscher hinsichtlich Energie- und Proteingehalt sowie Aminosäurenzusammensetzung zu optimieren. Zusätzlich ist das künstliche Absetzen besonders im Hinblick auf die Aufzucht vor dem 3. Lebenstag eine interessante Massnahme, bei der weitere Untersuchung lohnenswert scheinen. Hinsichtlich verbesserter Überlebenschancen und des Wachstums der N-GGw/IUWR Ferkel von grossen Würfen ist eine intensivere Forschung zu empfehlen, wobei auch andere Massnahmen wie der Einsatz Ammensauen speziell für N-GGw/IUWR Ferkel in der Kombination mit der Versorgung optimierter Milch ebenfalls ein interessanter Forschungsschwerpunkt sein können.