

**СВИНЕВЪДСТВО
ГЕНЕТИКА И СЕЛЕКЦИЯ****ГЕНОТИПИРАНЕ ПО РИАНОДИН РЕЦЕПТОРНИЯ ГЕН
ПРИ СВИНЕ ОТ ДУНАВСКА БЯЛА ПОРОДА⁺**

РАДОСТИНА СТОЙКОВА-ГРИГОРОВА, КАТЕРИНА СТЕФАНОВА*,
АПОСТОЛ АПОСТОЛОВ**, ИВАН АТАНАСОВ*,
МАЯ ИГНАТОВА, ПЕНКА МАРИНОВА

Институт по животновъдни науки – Костинброд

*Агробиоинститут – София

**Земеделски институт – Шумен

Селекцията в страните с развито свиневъдство е насочена към създаване на високопродуктивни породи, кръстоски и хибриди за индустриално производство на свинско месо, което е около 60% от произвежданите годишно червени меса у нас. Увеличеният процент на постно месо в кланичния труп при породите Пиетрен и Белгийски ландрас е довело до дисбаланс между количество и качество на месото. При тези породи се наблюдават междупородни и вътрепородни различия за стрес чувствителност. Този феномен е известен като porcine stress syndrome (PSS) или malignant hyperthermia (MH), характеризиращ се с повишено съдържание на мускулна тъкан и с промени в качествената характеристика на месото, за което се съобщава в изследванията на редица чужди и български автори, използвали халотанов тест за идентифицирането му (Дрбохлав, 1991; Ангелов, 1995; Monin, 1994; Marinova et al., 1995; Lee et al., 1999; Fisher et al., 2000).

С развитието на молекулярните методи и с проучванията на полиморфизмите (SNP) е установено, че стрес синдромът при свине е генетично обусловен, дължи се на мутация в локуса на рианодин рецепторния ген (известен и като Hal ген) и се приема за т.н. „кандидат“ главен ген за висока замускуленост при свинете (De Vries et al., 2000; Hamilton et al., 2000; Pedersen et al., 2001; Jovanovij et al., 2005; Davalos-Aranda et al., 2010).

У нас тези изследвания в свиневъдството са ограничени. За проучвания върху ДНК полиморфизма, свързан с количествените признаци при действащи и ремонтни нерези и техни потомци от породите Шведска Голяма Бяла, Ландрас и новосъздадената синтетична бащина линия, по Hal гена съобщават Желязков и кол. (2001, 2004). Стоянова (2011) е изследвала генетичната структура по локуса на RYR 1 гена на друго стадо чистопородни свине от породата Дунавска бяла.

Целта на настоящото изследване бе да се направи генотипиране по рианодин рецепторния ген за свине от Дунавска бяла порода.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването беше проведено с 53 мъжки и женски ремонтни прасета от Дунавска бяла порода, отглеждани в Земеделски институт – Шумен. Генотипирани бяха 8 линии, с минимум по 5 животни от линия. Животните бяха развъждани при традиционни условия и хранени със стандартна концентратна смеска за съответната категория.

Биологичните проби бяха взети от гърба и плешката на животните (50 – 60 косъма) и бях съхранявани в стерилен контейнер при +4°C.

Генотипирането на включените в експеримента животни по RYR1 ген бе извършено по метода PCR – RFLP. Анализът беше проведен в лабораторията на Агробиоинститут – София и включва следните стъпки:

1. Изолиране на геномна ДНК.

Геномната ДНК на включените в изследването животни бе изолирана от космена луковича с помощта на комерсиален кит Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) по оригиналния протокол на производителя. Оценката на количеството и качеството на изолираната ДНК бе направена УВ-спектрофотометрично.

2. Полимеразно верижна реакция (PCR анализ) на RYR1 ген.

За амплифициране на RYR 1 гена чрез полимеразна верижна реакция (PCR) бяха използвани следните праймери: fw: 5'-TCC AGT TTG CCA CAG GTC CAT ACC A-3' и rev 5'-ATT CAC CGG AGT GGA GTC TCT GAG-3'. Реакционната смес с краен обем 15 µl бе приготвена чрез китове за PCR амплификация, съдържащи всички необходими компоненти (Taq полимеразата, буфер, dNTPs, MgCl₂, ddH₂O). Процесът на PCR амплификация (намножаване) бе извършен в Mastercycler-Eppendorf при следните условия: първоначална денатурация – 94°C за 3 min, допълнителна денатурация – 94 °C за 10 min, амплификация – 57°C за 40 s, слепване на фрагментите – 72°C за 10 s, повторение на цикала – от стъпка 2 до стъпка 4 – 34 пъти, допълнителна амплификация – 72 °C за 3 min, съхранение на 4 °C.

+ Статията е докладвана на научна конференция на ЗИ – Шумен „Иновации в аграрната наука за ефективно земеделие“, организирана със съдействието на Министерството на образованието и науката през 2015 г.

3. Полиморфизъм на рестрикционните фрагментни дължини (PCR – RFLP анализ) на RYR1 ген.

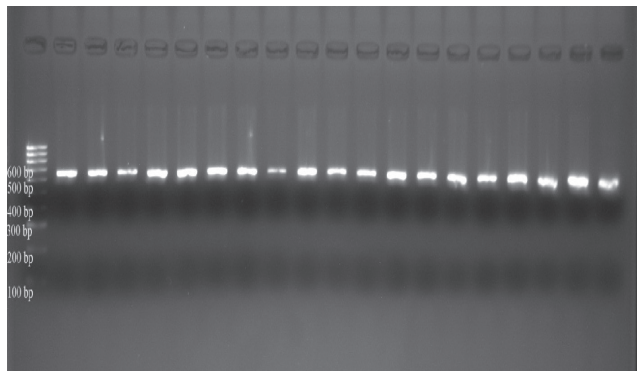
Рестрикционният анализ за установяване на полиморфизми по дължина на рестрикционните фрагменти (RFLP) бе проведен чрез използването на рестрикционна ендинуклеаза HhaI, като пробите бяха инкубирани в термостат на 37°C за 4 h.

Идентификацията на получените фрагменти след PCR амплификацията и след рестрикционния анализ беше извършена чрез електрофореза на 2% и съответно на 2.5 % агарозен гел, наситен с флуоресцентно багрило RedGel. Получените гелове бяха наблюдавани на трансилуминатор под UV-лъчи. По броя и дължината на наблюдаваните фрагменти бяха определени съответните генотипове на животните. За точното определяне на дължината на фрагментите в базови двойки (bp) бе използвана ДНК контрола – DNA Ladder, 100 bp.

Статистическата обработка на резултатите, получени от ДНК – анализите включва изчисляването честотите на алелите и съответните генотипове на животните по RYR 1 гена чрез програмата GENAlex, както и процентното съотношение на установените алели и генотипове към общия брой изследвани животни.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Получените резултати след проведената Полимерно верижна реакция (PCR) са представени на фиг. 1. При всички анализирани животни се получиха амплифицирани PCR продуктите на RYR 1 ген.



Фиг. 1. PCR продуктите след амплификацията на RYR 1 ген, визуализирани на 2% агарозен гел
Fig. 1. PCR products of RYR 1 gene, after amplification, visualized in 2 % agarose gel

В литературата се съобщава и за намножаване на проучвания локус с различни праймери двойки, които обхващат участъци от гена с големина от 81 до 660 bp (Bastos et al., 2000; Tăbăran et al., 2000; Davalos-Aranda et al., 2010; Staničić et al., 2012). В това изследване са подбрани специфични праймери, които да амплифицират фрагменти с дължини от 660 bp, тъй като на агарозен гел се визуализират по-добре (фиг. 1).

Рианодин рецепторният ген е локализиран близо до центромера на по-дългото рамо на 6-та хромозома, като за стрес синдрома при свинете е отговорна мутация в

точката R615C на RYR1 гена в скелетната мускулатура (Fujii et al., 1991; Mac Lennan and Philips, 1992). На база на многобройни генетични проучвания (Didion et al., 2000; Hebinck et al., 2000; Kim et al., 2001; Kuiper et al., 2001; Davoli et al., 2002) е направено картирането на генома при свинете вкл. е съставена и цитогенетичната карта на хромозома 6, където е отразено местоположението на локуса на RYR 1 ген (схема 1).

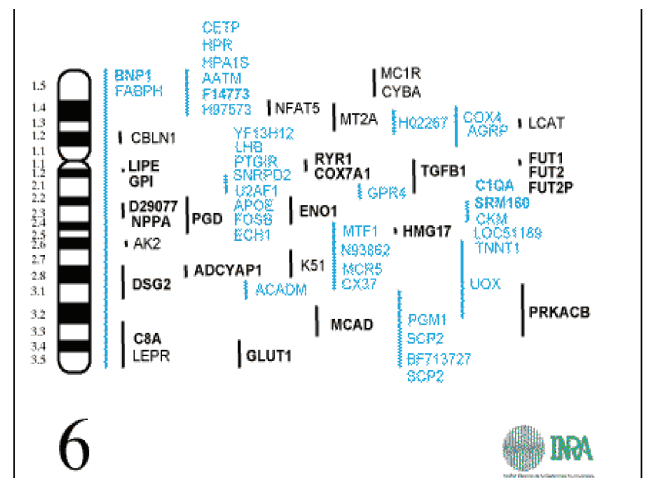
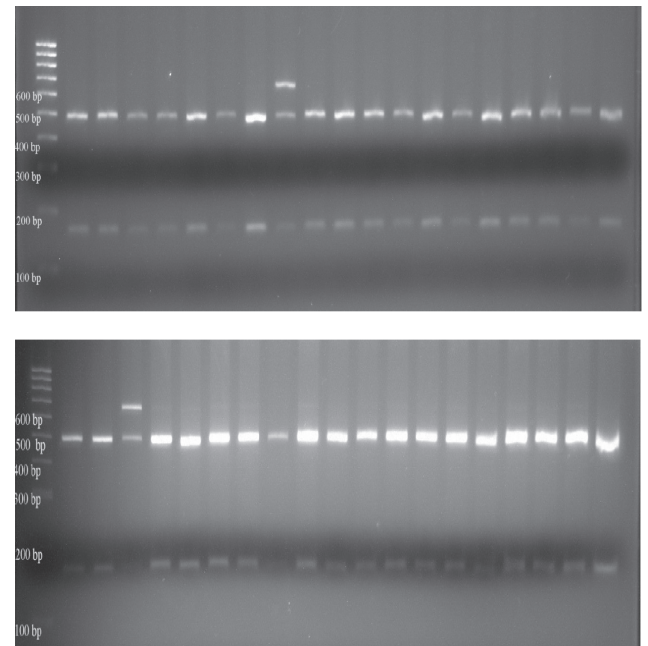


Схема 1. Генетична карта на хромозома 6 при свине (по данни на INRA-Франция)
Scheme 1. Genetic map of the chromosome 6 of pig (INRA-France)



Фиг. 2. Резултати от проведения PCR-RFLP анализа на RYR 1 ген, визуализирани на сегментите на 2.5% агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендинуклеаза HhaI
Fig. 2. Results of PCR-RFLP analysis of RYR 1 gene segment digested with the restriction endonuclease HhaI, visualized in 2.5% agarose gel

Рианодин рецепторният ген има два алела, доминантен N и рецесивен n , отговорни съответно за устойчивостта и за чувствителността към стрес. Стрес чувствителните индивиди са с рецесивен хомозиготен генотип, докато другите два генотипа – хомозиготен доминантен и хетерозиготен, обуславят устойчивост към стреса (Tăbăran et al., 2000).

След направения PCR-RFLP анализ на пробите се наблюдават фрагменти със следните дължини за генотип NN – 494 bp и 166 bp и за генотип Nn – 660 bp, 494 bp и 166 bp (фиг. 2).

Данни за честотите на генотиповете и алелите от проучвания локус при изследваното стадо са представени в табл. 1. Анализът на резултатите показва, че при изследваните 53 свине не са установени хомозиготни по рецесивен алел животни ($n/n = 0$). Хетерозиготните индивиди са 2 броя, честота на доминантният алел N е 0.981, а на рецесивния n – 0.019. Наличието на рецесивния алел (n) в Дунавска бяла порода се дължи вероятно на участието на породите Пиетрен и Ландрас в породообразователния процес. При тези две породи Bašić et al. (1997), Tăbăran (2000) и Russo et al. (2004) установяват висока честота на рецесивния алел, като честотата на хетерозиготните животни е съответно 0.75 и 0.45.

Таблица 1. Честота на генотиповете и алелите на RYR 1 (HAL) ген в изследваните свине от Дунавска Бяла порода ($n=53$)

Table 1. Genotypes and alleles frequencies of RYR 1 (HAL) of the studies pigs from the Danube White breed ($n=53$)

Ген / Gene	Генотипове / Genotypes	Честоти / Frequencies	Алели / Alleles	Честоти / Frequencies
RYR 1 (HAL)	NN	0.962 (96 %)	N	0.981 (98 %)
	Nn	0.037 (4 %)	n	0.019 (2 %)
	nn	0		

В това проучване установените честоти на генотиповете са близки до тези на свинете от породата Голяма бяла, при които честотата на генотип N/N е 91%, на N/n – 9% и на n/n – 0% (Bartos et al., 2000).

Посочените от нас резултати са сходни по стойност с установените честоти на алелите и генотиповете по локуса на RYR 1 гена в друго стадо на породата Дунавска бяла (Стоянова, 2011). Авторите посочват като причина за установената ниска честота на рецесивния алел n (0.090) и хомозиготния рецесивен генотип n/n (0.004) действието на отбора (естествен и изкуствен) и недотам интензивната селекция по кланични признаци в тази популация.

За проучвания върху ДНК полиморфизма на Hal гена и връзката му с количествените признаци при нерези и техни потомци от породите Синтетична линия – Ямбол и Шведска Голяма Бяла съобщават Желязков и кол. (2001, 2004). Авторите установяват разлики в генетичните структури на нерезите от изследваните популации, като при синтетичната бащина линия честота на реце-

сивния алел n е сравнително висока (0.36), докато при породата Шведска голяма бяла всички генотипирани животни са били хомозиготни по доминантен алел N . В посоченото изследване е установено и достоверно влияние на Hal гена върху редица кланични показатели. Същите автори посочват, че установеното разпределение по генотиповете на изследваните популации се дължи на провежданата селекция, която при синтетична линия – Ямбол е насочена към специализирана бащина линия, а при Шведска Голяма Бяла – специализирана майчина.

Получените резултати от молекулярните изследвания се различават значимо от тези при използване на халотанов тест за установяване на стрес чувствителност при свинете. Jovanović et al. (2005) при използване на халотанов тест съобщават за 11% проявена стрес реакция, докато чрез PCR-RFLP тест не установяват наличие на мутация в локуса на RYR1.

Ангелов и кол. (1995) при изследвания с халотанов тест на свине от Дунавска бяла порода за наличие на стрес синдром съобщават, че при 12.30% от проучените 523 животни се наблюдава положителна реакция (HAL+) към халотановата анестезия.

Различията в получените резултати при използване на двата метода за анализ се дължат, от една страна, на точността на прилаганата методология – халотановият тест не разграничава генетичния компонент от фенотипната проява на стрес чувствителност, а от друга страна, породата е динамична структура и през годините е претърпяла редица генетични промени.

ИЗВОДИ

В генотипираното по локуса на RYR 1 ген чистопородно стадо, отглеждано в Земеделски институт – Шумен, се наблюдават свине с два генотипа – хомозиготни по доминантен алел (N/N), с честота 0.962 и хетерозиготни (N/n), с честота 0.037.

В стадото не са установени хомозиготни по рецесивен алел (n/n) свине и всички тествани животни са негативни по porcine stress syndrome (PSS).

Необходими са допълнителни изследвания за изясняване на генетичното състояние на породата във връзка с нейното поддържане и усъвършенстване.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ангелов, К., 1995. Разпространение на стрес чувствителността в основните популации свине, развъждани в България. Животновъдни науки, XXXII, 5-8, 333-336.
2. Дрбохлав, В., 1991. Честота на бледо, меко, ексулативно месо при свине. Животновъдни науки, 1-8, 46.
3. Желязков, Е., В. Дрбохлав, С. Методиев и Г. Бъчварова, 2001. ДНК полиморфизъм по три локуса (HAL, CM и ESR) при нерези. Животновъдни науки, 2, 34-37.
4. Желязков, Е., С. Танчев, Ц. Яблански, В. Дрбохлав, С. Методиев, С. Георгиева и Г. Бъчварова, 2004. Възможности за селекция по HAL и CM генетични маркери за подобряване угоителните и кланични признаци при свине. Животновъдни науки, 6, 11-15.

5. **Стоянова, С.**, 2011. Повишаване ефективността на селекцията при свине чрез използване на генетични маркери. Дисертация. Стара Загора.
6. **Vašić, I., Z. Tadić, V. Lacković, A. Gomerčić**, 1997. Stress syndrome: Ryanodine receptor (RYR1) gene in malignant hyperthermia in humans and pigs. *Periodicum Biologorum*, vol. 99, No. 3, 313-317.
7. **Bastos R. G., Federizzi J., Deschamps J. C., Cardellino R. and Degostin, O. A.**, 2000. Characterization of swine stress gene by DNA testing using plucked hair as source of DNA. *Genetics and Molecular Biology*, 23, 4, 815 – 817.
8. **Davalos-Aranda, G., R. Maldonado-Mena, M. V. Garza-Zermeno, S. Cedillo-Rosales, L. C. Galan-Alejo, V. M. Riojas-Valdes**, 2010. Association among Ryanodine Receptor and Insulin-Like Growth Factor Genes with Production Traits in a Commercial Type Swine population from Mexico. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Vol. 9, 3, 639-642.
9. **Davoli, R., Fontanesi, L., Zambonelli, P., Bigi, D., Gellin, J., Yerle, M., Milc, J., Braglia, S., Cenci, V., Cagnazzo, M., Russo, V.**, 2002. Isolation of porcine expressed sequence tags for the construction of a first genomic transcript map of the skeletal muscle in pig. *Anim. Genet.* 33, 3-18.
10. **Didion, B. A., Paszek, A. A., Rohrer, G. A., Sun, H. S., Tuggle, C. K.**, 2000. Genetic linkage and physical mapping of a porcine sequence characterized amplified region (SCAR) to chromosome 6. *J. Anim. Sci.* 78, 3195-3196.
11. **Fisher, P., F. Mellett and L. C. D. Hoffman**, 2000. Halothane geno-type and porc quality.1. Carcass and meat quality traits from the three halothane genotypes. *Meat Science*, 54, 97-105
12. **Fujii J., K. Otsu, F. Zorzatu, S. De Leon, V. K. Khanna, J. E. Weiler, P. J. O'Brien, D. H. MacLennan**, 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 253, 448.
13. **Hamilton D. N., M. Ellis, K. D. Miller, F. K. McKeith, D. F. Parret**, 2000. The effect of the halotane and randerment Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs. *J. Animal Science*, 78: 2862.
14. **Hebinck, A., A. Dalski, H. Engel, Mattei, M. G., Hawken, R., Schwinger, E., Zohlke, Ch.**, 2000. Assignment of transcription factor NFAT5 to human chromosome 16q22.1, murine chromosome 8D and porcine chromosome 6p1.4 and comparison of the polyglutamine domains. *Cytogenet. Cell Genet.* 90, 68-70.
15. **Jovanović S., Trailović Rušca, Savij Mila and Sara M.**, 2005. Porcine stress syndrome (PSS) and Ryanodine receptor 1 (RYR1) gene mutation in european wild pig (*sus scrofa ferus*). *Acta Veterinaria (Belgrad)*, vol. 55, No 2-3, 251.
16. **Kim, K. S., Rothschild, M. F.**, 2001. Mapping of the porcine agouti-related protein (AGRP) gene to chromosome 6. *Anim. Genet.* 32, 316-331.
17. **Kuiper, H., Spstter, A., Drsgemeller, C., Brenig, B., Leeb, T., Distl, O.** 2001. Assignment of the porcine inter-a trypsin inhibitor heavy chain 4 (ITIH4) gene to SSC13q2.1P>2.2 by fluorescence *in situ* hybridization and radiation mapping. *Cytogenet Cell Genet* 95
18. **Lee S. J., A. C. MacPherron**, 1999. Myostatin and the control of the skeletal mass. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Current Biology Publications, London, 5, 604.
19. **MacLennan, D. H. and M. S. Phillips**, 1992. Malignant hyperthermia. *Science*, 256, 789-793.
20. **Marinova, P., Lahucky R., T. Astruc, X. Vingnon, G. Monin**, 1995. Effect of halothane sensitivity and slaughter on miofilament spacing and extracallular space in pig muscle. 41st ICoMST, E 57,656, USA.
21. **Monin, G.**, 1994. Influence of genetics and non genetics traits on carcass and meat quality. 2nd Int. Conf. Poland.
22. **Pedersen P. H., N. Oksbjerg, A. N. Kalson, H. Busk, E. Bendixen, P. Henckel**, 2001. A within litter comparison of muscle fiber characteristics and growth of halotane carrier and halotane free crossbreed pigs. *Livestock Science*, 73: 15.
23. **Russo V., Fontanesi L., Davoli R., Chiofalo L., Liotta L. and Zumbo A.**, 2004. Analysis of single nucleotide polymorphisms in major and candidate gene for production traits in Nero Siciliano pig breed. *Italian Journal of Animal Science*, 3, 19 -29.
24. **Stanisic N., S. Aleksic, L. Di, Z. Stanimiravic, G. Zhenhua, M. Petrovic, N. Delic, C. Radovic, N. Parunovic, M. Gogic**, 2012. Porcine stress syndrome (PSS) in Mangalitsa pigs. *Biotechnology in Animal Husbandry*, 28 (4), 873.
25. **Tăbăran, A., S. D. Dan, R. Mihaiu, A. Tăbăran, D. L. Pusta, M. Mihaiu**, 2000. First detection of ryanodine receptor mutation in Mangalitsa crossbred pigs bred in Transylvania. *Genetics Selection Evolution*. <http://www.gsejournal.org/content/44/1/5>.

GENOTYPING OF THE RYANODINE RECEPTOR GENE
IN PIGS FROM DANUBE WHITE BREED⁺

R. Stoikova-Grigorova, K. Stefanova, I. Atanasov*, A. Apostolov**, M. Ignatova, P. Marinova*
Institute of Animal science – Kostinbrod

** Agrobioinstitute – Sofia*

*** Agricultural institute – Shumen*

SUMMARY

Porcine stress syndrome is genetically determined and it is due to a mutation in the locus of the ryanodine receptor gene. When the pigs are stressed the Malignant hyperthermia is activated in the homozygous for the recessive allele, known as PSS syndrome. Animals with this syndrome is characterized by a high content of muscle tissue, which is accompanied by characteristic changes in the quality of the meat. The aim of this study is to make genotyping for ryanodine receptor gene in pigs from Danube white breed. Genotyping by searches locus was performed by polymerase chain reaction method (PCR method) and the analysis of the polymorphism of the restriction fragment lengths (RFLP). DNA is isolated from plucked hair of 53 animals from the herd of the Agricultural Institute – Shumen. Established frequencies of genotypes are 0.962 for the homozygous for the dominant allele pigs (N / N) and 0.037 for heterozygous animals (N / n). The frequency of the dominant allele N is 0.981 and of the recessive allele n is 0.019. Homozygous for the recessive allele animals have not been established. All tested animals from the herd are PSS negative.

Key words: *Danube white breed pigs, ryanodine receptor gene, stress syndrome*

rstoikova@abv.bg

⁺ This article was reported at a scientific conference of AI-Shumen “Innovations in agricultural science for effective agriculture”, organized in collaboration with the Ministry of Education and Science in 2015.