

## ГЕНЕТИЧЕН ПОЛИМОРФИЗЪМ В ЛОКУСА НА МИОСТАТИНОВИЯ ГЕН (MSTN) ПРИ СВИНЕ ОТ ДУНАВСКА БЯЛА ПОРОДА

Радостина Стойкова-Григорова, Катерина Стефанова\*, Иван Атанасов\*, Катя Енева\*\*

*Институт по животновъдни науки – Костинброд*

*\*Агробиоинститут – София*

*\*\*Земеделски институт – Шумен*

E-mail: rstoikova@abv.bg

### РЕЗЮМЕ

Миостатинът е основен растежен фактор, контролиращ формирането на миофибрилите през ембрионалното развитие, което определя неговата важна роля за развитието на скелетния мускул. MSTN е определен като кандидат ген, отговорен за двойно замускуления фенотип при свине, говеда и овце. Целта на настоящето изследване е да се направи генотипиране по миостатиновия (MSTN) ген при свине. Проучването е проведено с 52 ремонтни прасета от Дунавска бяла порода. Генотипирани са два участъка от локуса на MSTN ген – GDF8-exon 3 и GDF8-promoter, чрез метода Полиморфизъм на рестрикционните фрагментни дължини (PCR-RFLP анализ) и съответните рестрикционни ензими. DraI и MnlI са използвани за установяване на генетичния полиморфизъм в GDF8-promoter участъка на гена, а ензимът TaqI за GDF8-exon 3. В MSTN/promoter/MnlI и MSTN/exon 3/TaqI региони не е установен генетичен полиморфизъм. Всички тествани животни са съответно с TT и CC генотип. В MSTN/promoter/DraI се наблюдава едно хетерозиготно животно с генотип AT и 51 с генотип TT.

**Ключови думи:** миостатин, генетичен полиморфизъм, свине

## GENETIC POLYMORPHISM OF THE MYOSTATIN GENE (MSTN) IN DANUBE WHITE BREED PIGS

R. Stoikova-Grigорова, K. Stefanova\*, I. Atanasov\*, K. Eneva\*\*

*Institute of Animal science – Kostinbrod*

*\*Agrobiointitute – Sofia*

*\*\*Agricultural institute – Shumen*

E-mail: rstoikova@abv.bg

### ABSTRACT

Myostatin (MSTN/GDF8) is a general growth factor that regulates the embryonic process of mammalian myofiber formation. This fact determines its major role in the development of skeletal muscle. In pigs, cattle and sheep it is assumed that the MSTN gene is “candidate“ gene, responsible for the double muscularity phenotype. The aim of this study was to examine genetic variations or polymorphism in the locus of myostatin gene in pigs from Danube white breed. DNA was isolated from plucked hair of 52 animals from the herd of the Agricultural Institute – Shumen. Genotyping by searches locus (GDF8-exon3 и GDF8-promoter) was performed by polymerase chain reaction method (PCR method), the analysis of the polymorphism of the restriction fragment lengths (RFLP) and three restriction enzymes. MnlI and DraI enzymes were used to determine restriction polymorphism in the promoter region of GDF8-promoter and enzymes TaqI for GDF8-exon3. In total 52 pigs were analysed for DraI polymorphism in MSTN/promoter; out of them one animal were heterozygote – AT

genotype and 51 were TT homozygotes. No restriction polymorphism was detected using MnlI and TaqI enzymes in MSTN/promoter and MSTN/exon3 site; all animals were monomorphic for the T and C allele respectively.

**Key words:** myostatin gene, DNA variations, double muscularity phenotype, pigs

Миостатинът (GDF8) е член на фамилията *Transforming Growth Factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ), която включва група растежни и диференциращи фактори от голямо значение за регулиране на ембрионалното развитие и хомеостаза на мускулната тъкан при възрастни животни (Sonstegard et al., 1998). Установен е в скелетната мускулатура при прасета и говеда (Arnold et al., 1998), и в мастна тъкан при говеда и мишки (McPherron et al., 1997; Ji et al., 1998). Известно е, че при свинете генът на миостатина – MSTN, е локализиран в хромозома 15. Съставен е от два интрона и три екзона и кодира гликопротеин, който се експресира широко в скелетните мускули (Bellinge et al., 2005). Промени в структурата и експресията му биха могли да окажат съществено влияние върху регулирането на развитието, структурата на мускулите и качеството на месото (Cieslak et al., 2003). Допуска се връзка между мутации в различни полиморфни райони на гена и мускулната хипертрофия (Hanset, 1991; Williams, 2008; Rybarczyk et al., 2010). Според McPherron et al. (1997); Stratil and Корещny (1999) и Cieslak et al. (2003) по време на мускулния растеж MSTN инхибира белтъчния синтез и деленето на сателитните мускулни клетки в зрели клетки. Този факт го определя като кандидат-ген, отговорен за двойно замускуления фенотип.

При високопродуктивните породи свине, кръстоски и хибриди се наблюдава дисбаланс между икономически важни признаци като съдържание на постно месо в кланичния труп и качество на месото. С напредъка в развитието на молекулярните методи е установено, че може да се постигне ефективно управление на този процес.

У нас изследванията, свързани с определяне на ДНК полиморфизмите в генома на сви-

нете и връзката им с количествени признаци за местна продуктивност, са ограничени. Желязков и кол. (2001, 2006) и Стоянова (2011) са анализирали генетичната структура по локуса на RYR (рианодин рецепторен ген) при културни породи. Генетично вариране в миостатиновия локус при други животни със стопанско значение, като овце и зайци, е установено от Bozhilova-Sakova et al. (2016), Bozhilova-Sakova et al. (2017), Dimitrova et al. (2016), Dimitrova et al. (2017) и Hristova et al. (2017).

Целта на настоящето изследване е да се проучи генетичният полиморфизъм в два участъка в локуса на миостатиновия ген (MSTN) при свине от Дунавска бяла порода.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването е проведено с 52 ремонтни прасета (10 мъжки и 42 женски) от Дунавска бяла порода, отглеждани в Земеделски институт – Шумен. Генотипирани са 8 линии, с минимум по 5 животни от линия. Животните са развъждани при традиционни условия и хранени със стандартна концентратна смеся за съответната категория.

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

Генотипирането на включените в експеримента животни по MSTN/promoter и MSTN/exon 3 ген е извършено по метода PCR-RFLP. Анализът е проведен в лабораторията на Агробиоинститут – София, и включва следните стъпки:

### 1. Изолиране на геномна ДНК.

Геномната ДНК на включените в изследването животни е изолирана от косме-

на луковица 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 е измерено УВ-спектрофотометрично.

2. Полимеразно-верижна реакция (PCR анализ) на MSTN/promoter и MSTN/exon 3.

За амплифициране на проучваните участъци в локуса на гена чрез полимеразно-верижна реакция (PCR) са използвани следните два праймера, които амплифицират различни участъци от локуса на MSTN гена: GDF8-promoter (GenBank accession number AJ133580): Forward: 5' "TTT TTG AGG AAA AAG ACA TTT CAA 3"; Reverse: 5' ACA ACT TGC CAC ACC AGT GA 3' и GDF 8 - exon 3 (GenBank accession numbers AJ237920) Forward: 5' CTG CCT CTC TCT CTC TTC TCT GTC CTC 3'; Reverse: 5' CTT TTT ATT GTA TGA TTT GTT TTG ATG 3'. Реакционната смес, с краен обем 15 µl, е приготвена чрез кит за амплификация MyTaq HS Mix-BIOLINE. Процесът е извършен в Mastercycler-Eppendorf. Условиата, при които е проведена амплификацията, са описани от Cieslak et al. (2003).

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

Анализът за установяване на полиморфизмите по дължина на фрагментните дължини (RFLP) е проведен чрез три рестрикционни ендонуклеази: TaqI за GDF8-exon 3; DraI; MnlII за GDF8-promoter, като пробите са инкубирани в PCR-апарат на 60 °C – 2 часа с ензима TaqI, и в термостат на 37 °C – 4 часа с другите два ензима.

Идентификацията на получените фрагменти след PCR амплификацията и след Рестрикционния анализ е извършена чрез електрофореза на 1,8% и съответно на 3 и 3,5% агарозен гел, наситен с флуоресцентно багрило RedGel. Получените гелове са наблюдавани на трансилюминатор под UV-лъчи. По броя и дължината на наблюдаваните фраг-

менти са определени съответните генотипове на животните. За точното определяне на дължината на фрагментите в базови двойки (bp) е използвана ДНК контрола – DNA Ladder, 100 bp.

Анализът на данните от генотипирането включва изчисляване честотите на алелите и съответните генотипове на животните по CAST гена чрез програмата GENAlex.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

При всички анализирани животни са получени PCR продуктите на MSTN и с двете избрани праймерни двойки (фигура 1a и 1b). Фрагментите, амплифицирани в GDF8-promoter участък от гена, са с дължина 397 bp, а тези в GDF8-exon 3 участък – съответно с дължина 899 bp.

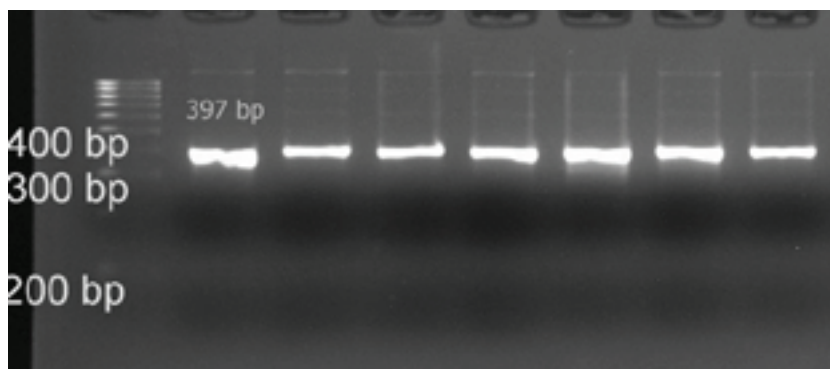
Получените резултати след проведения анализ по Полиморфизъм на рестрикционните фрагментни дължини с избраните ензими – DraI, MnlII и TaqI, са представени на фигура 2a, 2b и 2c. Имената на алелите са свързани с точковата мутация, която ензимът разпознава и разрязва PCR продуктите на фрагменти с определени дължини, съответно за:

- Ензим DraI (GDF8-promoter):
  - алел А: 4 фрагмента с дължини 259 + 65 + 60 + 13 bp;
  - алел Т: 3 фрагмента с дължини 324 + 60 + 13 bp;
- Ензим MnlII (GDF8-promoter):
  - алел С: 3 фрагмента с дължини 186 + 117 + 94 bp;
  - алел Т: 2 фрагмента с дължини 280 + 117 bp;
- Ензим TaqI (GDF8-exon3):
  - алел С: 3 фрагмента с дължини 493 + 378 + 28 bp;
  - алел Т: 2 фрагмента с дължини 493 + 406 bp.

Анализът на получените резултати показва, че в генотипираното стадо по локуса на MSTN/promoter/DraI ген се наблюдава едно хетерозиготно животно с генотип АТ и 51

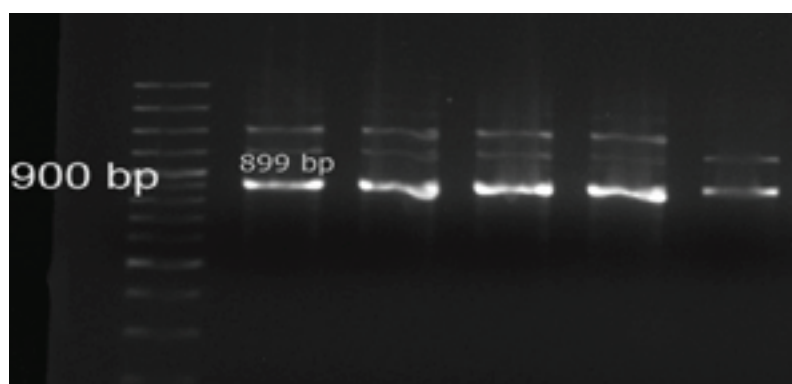
животни с генотип TT. Честотата на алел T е 0,99, а на алел A – 0,01 (табл. 1).

Полиморфизмът в MSTN/promoter/DraI региона за първи път е описан от Stratil and



**Фиг. 1а.** PCR продуктите след амплификацията на MSTN ген с праймер GDF8-promoter, визуализирани на 1,8% агарозен гел, DNA Ladder, 100 bp

**Fig. 1a.** PCR products of GDF8-promoter gene, after amplification, visualized in 1.8% agarose gel, DNA Ladder, 100 bp



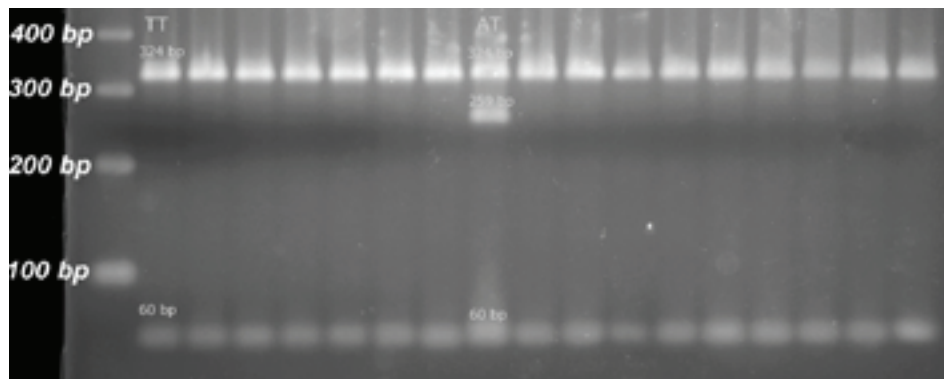
**Фиг. 1б.** PCR продуктите след амплификацията на MSTN ген с праймер GDF8-exon 3, визуализирани на 1,8% агарозен гел, DNA Ladder, 100 bp

**Fig. 1b.** PCR products of MSTN/GDF8-exon 3 gene, after amplification, visualized in 1.8% agarose gel, DNA Ladder, 100 bp

**Таблица 1.** Алелни честоти в GDF8-promoter и GDF8-exon 3 участък от локуса на MSTN ген в изследваното стадо Дунавска Бяла порода (n = 52)

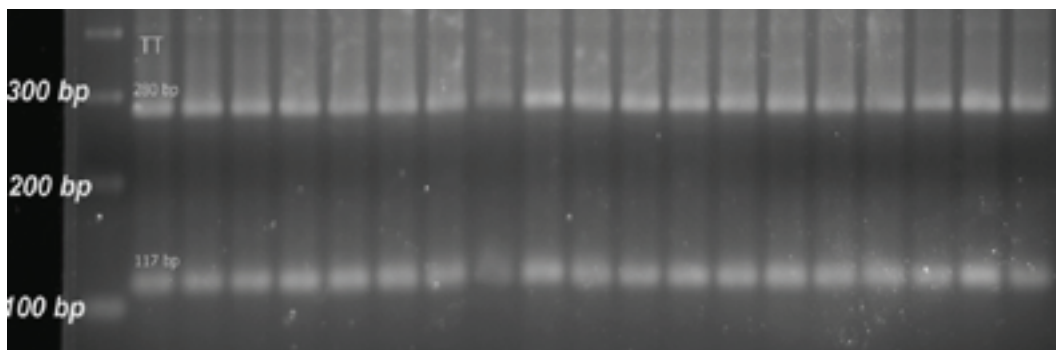
**Table 1.** Allele frequencies in GDF8-promoter and exon-3 polymorphic sites in the studies pigs from the Danube White breed (n = 52)

Участък от локуса на ген Polymorphic sites	MSTN (GDF8) Promoter/DraI		MSTN (GDF8) Promoter/MnII		MSTN (GDF8) Exon 3/TaqI	
	A	T	C	T	C	T
Алел Allele	A	T	C	T	C	T
Честота Frequencies	0,01	0,99	0	1,00	1,00	0



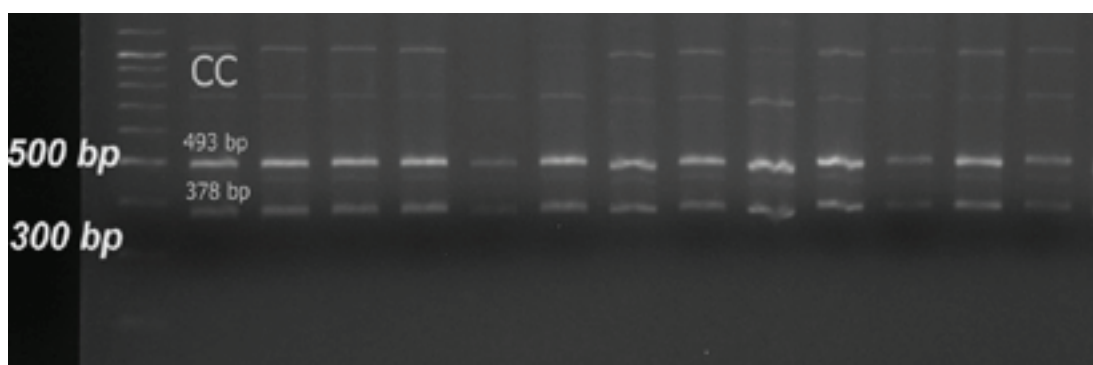
**Фиг. 2а.** Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на MSTN ген с праймер GDF8-promoter, визуализиране на сегментите на 3% агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендинуклеаза DraI, DNA Ladder, 100 bp

**Fig. 2a.** Results of PCR-RFLP analysis of MSTN/GDF8-promoter gene, segment digested with the restriction endonuclease DraI, visualized in 3% agarose gel, DNA Ladder, 100 bp



**Фиг. 2б.** Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на MSTN ген с праймер GDF8-promoter, визуализиране на сегментите на 3% агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендинуклеаза MnlI, DNA Ladder, 100 bp

**Fig. 2b.** Results of PCR-RFLP analysis of MSTN/GDF8-promoter gene, segment digested with the restriction endonuclease MnlI, visualized in 3% agarose gel, DNA Ladder, 100 bp



**Фиг. 2с.** Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на MSTN ген с праймер GDF8-exon 3, визуализиране на сегментите на 3,5% агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендинуклеаза TaqI, DNA Ladder, 100 bp

**Fig. 2c.** Results of PCR-RFLP analysis of MSTN/GDF8-exon 3 gene segment digested with the restriction endonuclease TaqI, visualized in 3.5% agarose gel, DNA Ladder, 100 bp



Кореџну (1999). Авторите установяват честоти, сравними с тези, представени в това изследване. Всички тествани животни от породите Пиетрен, Дюрок и Хемпшир са хомозиготни по Т алела, докато в другите три породи – Голяма Бяла, Ландрас и Мейшан, честотата на алел А варира от 0,05 – 0,21. За сходни резултати съобщават и Cieślak et al. (2003), висока честота на алел Т и ниска за А алела – 0,03 при свине – кръстоска, Голяма Бяла х Пиетрен.

В другите изследвани участъци от локуса на MSTN не се наблюдават мутантни алели. За MSTN/promoter/MnII всички тествани животни са хомозиготни по алел Т (генотип TT), а за MSTN/exon 3/TaqI – по алел С (генотип CC) (табл. 1).

Проучвайки културни породи като Пиетрен, Ландрас, Голяма Бяла (ГБ), Йоркшир, Хемпшир, Дюрок и кръстоски – Пиетрен х ГБ и PIC, Stratil et al. (1999) и Cieślak et al. (2003) също не намират мутации в MSTN/promoter/MnII участък на локуса, а честотата на алел Т е 1,0. Авторите посочват, че все още няма яснота относно ефекта на високата честота на този алел.

В цитираните изследвания е направен анализ и на полиморфизма в локуса на MSTN/exon 3 регион на гена, изследван чрез TaqI рестрикционен ензим. Въпреки че точковата С-Т мутация не променя аминокиселинната последователност на протеина, тя може да повлияе стабилността на тРНК. Това води до промяна на експресията и се отразява върху развитието на мускула. Установена е висока честота на С алела във всички породи (от 0,58 до 1,0), а честотата на алел Т е по-ниска, като само в Пиетрен тя е с висока стойност – 0,42. Като интересен факт е посочено, че въпреки относително сравнимата честота на алелите, честотата на хомозиготните животни по Т алела е много ниска, докато хетерозиготният генотип се среща много по-често. По-висока честота на генотип TT се среща само при комерсиалните линии прасета PIC, които имат хиперплазия – 29% по-висок брой мускулни влакна

на единица площ, в сравнение с кръстоски Голяма Бяла х Полски ландрас.

Други автори (Guimaraes et al., 2007) намират няколко полиморфни участъка в интрона на MSTN, при различните породи свине. Stinckens et al. (2008) в промоторния участък от гена установяват три мутации – g. 435G > A; g. 447A > G; g. 879T > A, при 5 фенотипно различни породи – Пиетрен, кръстоски на Голяма бяла х Ландрас, Мейшан и диви прасета.

В последните години расте интересът към проучване на генетичното вариране в различни участъци от локуса на миостатиновия ген. Наблюдаваните мутации обаче са с много ниска честота и връзката им с продуктивните качества остава не добре изяснена. Това е доказателство, че при свинете MSTN е много по-консервативен и стабилен, в сравнение с други селскостопански животни като говеда, овце и коне (Grobet et al., 1998; Bass et al., 1999; Stratil and Kopečny, 1999; Cieślak et al., 2003; Dall'Olio et al., 2014).

В предишно проучване (Стойкова-Григорова и кол., 2015) е генотипирано същото стадо по локуса на RYR1 ген и са установени два генотипа – хомозиготен по доминантен алел (N/N), с честота 0,962; хетерозиготен (N/n), с честота 0,037. Наличието на рецесивния (мутантен) алел в Дунавска бяла порода се дължи вероятно на участието на породите Пиетрен и Ландрас в породообразувателния процес. При тези две породи Tăbăran (2000), Russo et al. (2004) и Cieślak et al. (2003) съобщават за висока честота на мутации както в локуса на RYR1, така и в този на MSTN гена.

Формирането на мускулната тъкан и метаболитните промени в нея е комплексен процес и се влияе от множество генетични фактори (Sellier, 1998). Някои автори (Williams, 2008; Rybarczyk et al., 2010) допускат, че мутациите в определени кандидат-гени могат да модифицират ефекта на главни гени като RYR1, свързан с количествени и качествени признаци за месна продуктивност при свинете.

## ИЗВОДИ

В генотипираните по локуса на MSTN/promoter/DraI ген чистопородни свине от Дунавска бяла порода е установена честота 0,99 за алел Т и 0,01 за алел А.

В другите изследвани участъци от локуса на MSTN не се наблюдават мутантни алели. За MSTN/promoter/MnII всички тествани животни са хомозиготни по алел Т (генотип ТТ), а за MSTN/ ехон 3/TaqI – по алел С (генотип СС).

## ЛИТЕРАТУРА

- Arnold, H. H., & Winter, B.** (1998). Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. *Current opinion in genetics & development*, 8(5), 539-544.
- Bass, J., Oldham, J., Sharma, M., & Kambadur, R.** (1999). Growth factors controlling muscle development. *Domestic animal endocrinology*, 17(2-3), 191-197.
- Bellinge, R. H. S., Liberles, D. A., Iaschi, S. P. A., O'brien, P. A., & Tay, G. K.** (2005). Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal genetics*, 36(1), 1-6.
- Bozhilova-Sakova, M., & Dimitrova, I.** (2017). Pcr-rflp analysis of three genes associated with meat productivity in il de france sheep breed. *Животновъдната наука–предизвикателства и иновации*, 1, 332.
- Bozhilova-Sakova, M., Dimitrova, I., Teneva, A., & Petrov, N.** (2016). PCR-RFLP analysis of MSTN gene in Karakachan sheep breed. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(1), 115-117.
- Cieślak, D., Blicharski, T., Kapelański, W., & Pierzchała, M.** (2003). Investigation of polymorphisms in the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. *Czech J. Anim. Sci*, 48, 69-75.
- Dall'Olio, S., Wang, Y., Sartori, C., Fontanesi, L., & Mantovani, R.** (2014). Association of myostatin (MSTN) gene polymorphisms with morphological traits in the Italian Heavy Draft Horse breed. *Livestock Science*, 160, 29-36.
- Dimitrova, I., Bozhilova-Sakova, M., Iliev, M** (2017). Study of genes associated with meat productivity on Karnobat Merino sheep breed, *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary science*, 10(8), 61-65.
- Dimitrova, I., Bozhilova-Sakova, M., Stancheva, N., & Tzonev, T.** (2016). Molecular Analysis Of Ovine Myostatin Gene (MSTN) In Northeast Bulgarian Merino Sheep Breed Using PCR-RFLP. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(2), 000-000.
- Grobet L., Poncelet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux Ch., Ménéssier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M.,** (1998). Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammalian genome*, 9(3), 210-213.
- Guimaraes, S. E., Stahl, C. H., Lonergan, S. M., Geiger, B., & Rothschild, M. F.** (2007). Myostatin promoter analysis and expression pattern in pigs. *Livestock Science*, 112(1-2), 143-150.
- Hanset, R.** (1991). The major gene of muscular hypertrophy in the Belgian Blue cattle breed. *Breeding for disease resistance in farm animals.*, 467-478.
- Hristova, D., Tanchev, S., Velikov, K., Gonchev, P., Georgieva, S.** (2017). C/T polymorphism at second intron of the myostatin (mstn) gene in inbred and outbred rabbits. *Science & technologies*, VII, 5: 8-14.
- Jeliaskov, E., Drbohlav, V., Metodiev, S., Bachvarova, G., and J. Dvorak.** (2001). DNA polymorphism on three loci (HAL, CM и ESR) in boars. *Journal of Animal Science*, 2, 34-37. (Bg)
- Jeliaskov, E., S. Tanchev, S., Yablanski, Ts., Drbohlav, V., Metodiev, S., S Georgieva, S., and G. Bachvarova, G.** (2006). Possibilities for selection on HAL and CM genetic markers for improvement of the fattening and carcass traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 6, 11-15. (Bg)
- Ji, S., Losinski, R. L., Cornelius, S. G., Frank, G. R., Willis, G. M., Gerrard, D. E., Depreux, F. F. S., & Spurlock, M. E.** (1998). Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 275(4), R1265-R1273.
- McPherron, A. C., & Lee, S. J.** (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(23), 12457-12461.
- 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.
- Rybarczyk A., M. Kmiec, M., Napierala, F., W. Natalczyk-Szymkowska, W.,** (2010). The effect of calpastatin polymorphism (CAST/HinfI and CAST/Hpy 1881) and its interaction with RYR1 genotypes on carcass and pork quality of crossbred pigs, *Animal Science Papers and Reports vol. 28, № 3*, 253-260.

**Sellier P.**, (1998). Genetics of meat and carcass traits. *The Genetics of the pigs*. Eds. Rothschild M. E., A. Ruvinski, Wallingford, UK, CAB International, pp. 463.

**Sonstegard, T. S., Rohrer, G. A., & Smith, T. P. L.** (1998). Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. *Animal Genetics*, 29(1), 19-22.

**Stoikova-Grigorova, R., Stefanova, K., Atanasov, I., Apostolov, A., Ignatova, M., Marinova, P.** (2015). Genotyping of the ryanodine receptor gene in pigs from Danube white breed. *Journal of animal science. volume LII*, 5, 3-7. (Bg)

**Stoyanova, S.**, (2011). Improving the efficiency of selection in pigs by using genetic markers. Dissertation, Stara Zagora.

**Stratil, A., & Kopečný, M.** (1999). Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. *Animal Genetics*, 30(6), 462-478.

**Tăbăran, A., Dan, S. D., Mihaiu, R., Tăbăran, A., Pusta, D. L., Mihaiu, M.** (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>.

**Williams, J. L.** (2008). Genetic control of meat quality traits. In *Meat Biotechnology* (pp. 21-60). Springer, New York, NY. F. Toldra (ed.)