

ГЕНОТИПОВЕ ПО ESR И FUT1 ЛОКУСИ И ПОКАЗАТЕЛИ НА СЕМЕННАТА ТЕЧНОСТ НА НЕРЕЗИ ОТ ПОРОДАТА ДУНАВСКА БЯЛА

СТЕФКА СТОЯНОВА, ВАЦЛАВ ДРБОХЛАВ,
СТОЙЧО МЕТОДИЕВ, СТАНИМИР ДИМИТРОВ
Тракийски университет, Аграрен факултет - Стара Загора

Постиженията на молекулярната генетика разкриват възможности за използване на селекция по генетични маркери при селскостопанските животни в съчетание с класическите методи на селекцията. В свинеждането селекцията по генетични маркери навлиза с най-бързи темпове. Проучени са и се проучват редица гени, влияещи върху продуктивни и стопански полезни качества на свинете. При избора на селекционните признаци стриктно се следи за взаимните им зависимости и за възможните корелиращи ефекти при провеждане на отбора. По същия начин следва да се процедира и при селекцията по генетични маркери, където трябва да се проучи евентуалното влияние на маркера за ген по даден признак върху други признаци. При усъвършенстването на репродуктивните качества на свинете майки надеждите се възлагат на естроген рецепторния ген ESR (estrogen receptor gene), полиморфизмът на който показва свързаност с големината на прасилото (Rothschild et al., 1994, Short et al., 1997 и др.). Вниманието е насочено и към фукозил трансферазния ген FUT1 (α 1,2 fucosyltransferase gene), който чрез създаването на условия за закрепване на бактериите *E. coli* F18 върху лигавицата на тънките черва влияе върху устойчивостта на прасетата към едемни заболявания и диарии (Meijering et al., 2000). Съществува индикация, че и двата споменати локуса имат отношение към репродуктивните качества на мъжките индивиди. Hess and

Carnes (2004) и Lazari et al. (2009) обобщават важноста на естрогена и естроген рецепторите за модулирането функциите на мъжкия репродуктивен тракт. Terman et al., (2006) установяват достоверни разлики между нерези с различни генотипове по ESR локуса при обема на еякулата, концентрацията на спермата и действителния брой сперматозоиди в еякулата. В редица проучвания се доказва ролята на гликозилтрансферазите (в това число и α 1,2 fucosyltransferase) при сперматогенезата (Raychoudhury and Millette, 1997, Chiu et al., 2007). По време на преминаване през надсеменика сперматозоидите при бозайниците под влиянието на гликохидролази и гликозилтрансферази претърпяват биохимични и физиологични промени, които са решаващи за оплодителната им способност (Tulsiani, 2006).

С настоящото проучване си поставихме за цел в стадо от Дунавската бяла порода свине да проучим някои показатели на семенната течност при нерези в зависимост от генотипа им по локусите ESR и FUT1.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проучването беше направено при нерези от свинефермата на фирма "Михаела 2000" ООД, с. Хан Аспарухово, Старозагорска област. За полиморфизъм PCR - RFLP по локусите на естроген рецепторния ген ESR и фукозилтрансферазния ген FUT1 бяха тествани 14 нерези от Дунавската бяла порода. При ESR

беше използвана PCR процедура по **Short et al.** (1997), а при FUT1 - PCR процедура по **Klukowska et al.** (1999). И при двата гена всяка проба за PCR реакцията съдържаше: 2.5 µL 10x PCR буфер, 1.5 µL 1.5 MgCl₂, 0.5 µL 10 mM dNTPs, по 0.5 µL 10 µM от всеки праймер, 3 µL геномна ДНК, 0.2 µL Taq ДНК полимераза, и 16.3 µL стерилна дейонизирана вода.

Реакциите бяха извършени с MJ Research PTS-200 Peltier Cycler. Температурната програма за ESR беше както следва: начална денатурация при 95°C за 3 min, последвана от повторения за 30 цикъла при 95°C/40s, 60°C/60s, 70°C/5min и крайна екстензия 5 min при 72°C. При FUT1 температурната програма беше съответно: начална денатурация при 95°C за 3 min, последвана от повторения за 30 цикъла на денатурация 95°C/30s, хибридизация 56°C/30s, удължаване 72°C/30s и крайна екстензия за 4 min при 72°C.

При пробите за ESR ген беше използвана рестрикционна ендонуклеаза Pvu II (TopBio) при 37°C за една нощ, а при пробите за ген FUT1 беше използвана рестрикционна ендонуклеаза Sfo I (TopBio) при 37°C за 3 h. Рестрикционните фрагменти ДНК при ESR и FUT1 бяха разделени съответно чрез електрофореза на 4% и 3% агарозен гел, оцветен с етидиум бромид.

През пролетния сезон, месец април на 2009 г. от тестираните нерези бяха получени и анализирани 69 еякулата. По общоприетите методи бяха установени обем на еякулата, подвижност, концентрация на сперматозоидите, процент на мъртви и патологични сперматозоиди. Бяха изчислени общият брой и корегираният брой живи сперматозоиди, по **Smital et al.** (2004). Резултатите за признаците на семенната течност при изследваните нерези бяха обобщени и анализирани по генотиповете на проучваните локуси.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

В табл. 1 са представени резултатите за признаците, характеризиращи количеството и качеството на еякулата на нерезите в зависи-

мост от техния генотип по естроген рецепторния ген ESR. Най-ниската стойност по отношение на обема на еякулата установихме при нерезите с генотипа CC, а най-високата при тези с генотипа DD. Разликата по обем на еякулата от близо 55 cm³ обаче не е статистически достоверна поради малкия брой установени нерези с генотип DD. Отчита се все пак наличие на благоприятното влияние на алела D върху обема на еякулата. Подобни са резултатите за признака концентрация на спермата, като нерезите с генотип DD превъзхождат останалите два генотипа, но разликите са недостоверни. Тази тенденция отчасти се потвърждава от изследванията на **Ter-man et al.**, (2006), които установяват, че достоверно по-висока концентрация на спермата имат нерезите с генотип DD, но при обема на еякулата са имали преимущество нерезите с генотип CC.

В настоящото изследване при признаците общ брой и брой живи сперматозоиди в еякулата се кумулира тенденцията за положителен ефект на генотипа DD върху обема на еякулата и концентрацията на семенната течност, като са налице достоверни разлики спрямо другите два генотипа (CC и CD). Този кумулативен ефект беше очакван като резултат от високите положителни корелации между обема на еякулата и общия брой сперматозоиди (**Oh et al.**, 2003, **Smital et al.**, 2005) и между концентрацията и общия брой сперматозоиди (**Grandjot et al.**, 1997).

При останалите проучвани признаци не са установени достоверни разлики между нерезите с различни генотипове по ESR локуса. При това подвижността на сперматозоидите е много добра, а процентът на мъртви и патологични сперматозоиди е в рамките на нормалното. Може да се отбележи, че при хетерозиготния генотип CD процентът на мъртвите сперматозоиди е най-нисък, но вероятно ограниченият брой установени тестиращи нерези с този генотип е причина за липса на достоверни разлики.

В табл. 2 са посочени признаците на семенната течност на нерезите, групирани в

Таблица 1. Показатели на спермограмата в зависимост от генотипа по гена ESR

Table 1. Sperm quality traits of different ESR genotypes

Признаци / Traits	ESR генотипове/ ESR genotypes		
	CC	CD	DD
Брой нерези / Number of boars	6	6	2
Брой еякулати / Number of ejaculates	27	32	10
	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$
Обем, cm ³ Semen volume, cm ³	185.81±27.63	195.28±27.55	240.00±21.21
Подвижност, % Sperm motility, %	82.81±1.27	81.50±0.58	83.34±2.35
Концентрация, x 10 ⁹ cm ³ Sperm concentration x 10 ⁹ cm ³	180.40±19.73	170.78±20.34	194.21±20.56
Мъртви сперматозоиди, % Dead spermatozoa, %	20.11±3.29	14.17±1.11	20.64±2.78
Патологични сперматозоиди, % Abnormal spermatozoa, %	16.09±2.58	15.89±1.69	12.50±4.00
Общ брой сперматозоиди, x 10 ⁹ Total sperm cells, x 10 ⁹	32072.58±3432.22 c	32594.44±4855.59 a	46144.00±1104.50 a, c
Брой живи сперматозоиди, x 10 ⁹ Alive number of sperm cells, x 10 ⁹	23271.04±3077.18 a	22196.13±3061.03 b	34045.98±3593.69 a, b

Разликите в средните аритметични стойности обозначени в хоризонталния ред с еднакви букви са статистически достоверни както следва: a-a, b-b $P \leq 0.05$, c-c $P \leq 0.01$

Means with the same letter in the same row are significantly different as follows, a-a, b-b $P \leq 0.05$, c-c $P \leq 0.01$

зависимост от генотиповете по гена FUT1. С генотип AA на FUT1 в стадото има установен само един действащ нерез, поради което не си позволяваме да правим задълбочен анализ на получените данни, независимо от достоверността на някои различия. Налице е обаче достоверна тенденция за понижени качества на спермата при този индивид спрямо тези с останалите генотипове по локуса.

В допълнителни проучвания трябва да се провери дали генотипът AA, респективно алелът A на ген FUT1, не е свързан с влошени показатели на семенната течност при нерезите. **Horak et al.**, (2005) съобщават за влошени репродуктивни признаци при свине-майки с генотип FUT1 AA (общ брой родени прасета, брой на живородени прасета, брой на отбити прасета).

Известно е, че генотипът AA е устойчив на колонизиране с *E. coli* и е с повишена резис-

тентност спрямо колибактериозите (**Meijering et al.**, 2000). По тази логика естественият отбор би трябвало да толерира този генотип и честотата на алела A в популациите да е висока. На практика обаче не е така, като повечето автори съобщават за сравнително ниска честота на "благоприятния" алел A. При проучванията на **Методиев и сътр.**, (2006) в същото стадо и порода са установени честоти на алелите G и A съответно 0.859 и 0.141, като при нерезите честотата на алелите е съответно 0.932 и 0.068. За подобни честоти на тези алели при съвременни европейски породи съобщават и други автори (**Klukowska et al.**, 1999, **Shi et al.**, 2002 и др.). Много е вероятно генът FUT1 да е свързан и с друг или с други признаци, при които алелът A действа в "неблагоприятна" насока и бива елиминиран под действието на отбора (естествен или изкуствен). Логично, сред подобни признаци биха

Таблица 2. Показатели на спермограмата в зависимост от генотипа по гена FUT1

Table 2. Sperm quality traits of different FUT1 genotypes

Признаци / Traits	FUT1 генотипове/ FUT1 genotypes		
	GG	AG	AA
Брой нерези / Number of boars	7	6	1
Брой еякулати / Number of ejaculates	36	28	5
	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$	$x \pm Sx$
Обем, cm ³	212.26±26.13 a	191.78±22.02	130.00±44.72 a
Semen volume, cm ³			
Подвижност, %	82.24±0.64	82.47±1.37	82.00±4.47
Sperm motility, %			
Концентрация, x 10 ⁹ cm ³	195.21±19.73 a	166.13±8.84 b	132.20±3.90 a, b
Sperm concentration x 10 ⁹ cm ³			
Мъртви сперматозоиди, %	18.11±2.89	17.13±2.29	17.40±4.77
Dead spermatozoa, %			
Патологични сперматозоиди, %	15.30±1.62	16.81±2.31	9.40±6.11
Abnormal spermatozoa, %			
Общ брой сперматозоиди, x 10 ⁹	39084.83±3281.23 a	31599.39±3608.10	17100.00±5572.25 a
Total sperm cells, x 10 ⁹			
Брой живи сперматозоиди, x 10 ⁹	27938.56±2402.84 a	22089.77±3126.47	12786.40±4536.47 a
Alive number of sperm cells, x 10 ⁹			

Разликите в средните аритметични стойности обозначени в хоризонталния ред с еднакви букви са статистически достоверни както следва: a-a, b-b $P \leq 0.05$

Means with the same letter in the same row are significantly different as follows, a-a, b-b $P \leq 0.05$

могли да бъдат и тези, които са обект на наше проучване.

Сперматозоидите при бозайниците по време на преминаване през епидидимиса претърпяват биохимични и физиологични промени, които се наричат "епидидимално узряване". **Marengo (2008)** обсъжда ролята на епидидимиса в процесите за съзряването на сперматозоидите и изменението на мембранните им протеини като подчертава сред основните функции на епидидимиса - концентрацията на спермата, функционалното узряване на сперматозоидите, съхраняването им до еякулацията, както и отстраняването на дегенерирали сперматозоиди. Предполага се, че процесът на съзряване включва кратко свързване на епидидималната фукозилтрансфераза от сперматозоидите и фукозилирането на сайтовете на свързване. Роля при това играят гликан модифициращи ензими - гликохидролази и гликолтрансферази (**Tulsiani, 2006**). Много е

вероятно FUT1 (α 1,2 fucosyltransferase) ген като принадлежащ към групата на фукозилтрансферазните гени да има отношение към тези процеси. Това разбира се изисква по-задълбочено интердисциплинарно проучване като механизми на действие.

ИЗВОДИ

В условията на проведеното проучване нерезите от Дунавска бяла порода с генотип DD по ESR гена притежават по-добри показатели на семенната течност, като общият брой и броят на живи сперматозоиди в еякулата при тях е по-висок в сравнение с нерезите с другите два генотипа.

Предполагаме, че нерезите с генотип AA по гена FUT1, за които се смята, че са с повишена резистентност спрямо колибактериозите, са с влошени показатели на семенната течност. Това би могло да е една от причините за

ниската честота на алела А в популациите свине.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Методиев, С., В. Дрбохлав, И. Връткова**, 2006. Генна и генотипна честота на локуса FUT1 при свине от Дунавската бяла порода. *Животновъдни науки*, 4, 33-35.
2. **Chiu, P. C. N., M. Chung, R. Koistinen, H. Koistinen, M. Seppala, P. Ho, E. H. Y. Ng, K. Lee and W. S. B. Yeung**, 2007. Glycodelin-A interacts with fucosyltransferase on human sperm plasma membrane to inhibit spermatozoa-zona pellucida binding. *Journal of Cell Science*, 120, 33-34.
3. **Grandjot, G., H. Brandt, P. Glodek**, 1997. Genetische und phanotypische Untersuchungen zu Eigenleistungs, Sperma und Fruchtbarkeitsmerkmalen von Besamungsebern. 2. Mitteilung: Beziehungen zwischen Eigenleistungs, Sperma und Fruchtbarkeitsmerkmalen. *Arch. Tierz.* 40, 433-443.
4. **Hess, R. A., K. Carnes**, 2004. The role of estrogen in testes and male reproductive tract: review and species comparison. *Animal Reproduction*, 1, 1, 5-30.
5. **Horak, P., T. Urban and J. Dvorak**, 2005. The FUT1 and ESR genes - their variability and associations with reproduction in Prestice Black-Pied sows. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 122, 210-213.
6. **Klukowska, J., B. Urbaniak and M. Switonski**, 1999. High frequency of M 307 mutation at FUT1 locus, causing resistance to edema disease, in autochthonous Polish pig breed, the Zlotnicka Spotted. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 116, 6, 519-524.
7. **Lazari, M. M. F., T. F. G. Lucas, F. Yasuhara, G. R. O. Gomes, E. R. Siu, C. Royer, S. A. F. Fernandes, C. S. Porto**, 2009. Estrogen receptors and function in male reproductive functions. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53, 8, 923-933.
8. **Marengo, S. R.**, 2008. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Animal Reproduction Science*, 105, 52-63.
9. **Meijering, E., S. Neuenschwander, R. Fries, A. Dinter, H. U. Bertschinger, G. Stranzinger and P. Vogeli**, 2000. A DNA polymorphism influencing a (1,2) fucosyltransferase activity of the pig FUT1 enzyme determines susceptibility of small intestinal epithelium to Escherichia coli F18 adhesion. *Immunogenetics*, 52, 129-136.
10. **Oh, S. H., See, M. T., Long, T. E., Galvin, J. M.**, 2003. Genetic correlations between boar semen traits. *J. Anim. Sci.*, 81, Suppl. 1, 317.
11. **Raychoudhury, S. S., C. F. Millette**, 1997. Multiple fucosyltransferases and their carbohydrate ligands are involved in spermatogenic Cell-Sertoli cell adhesion in vitro in Rats. *Biology of Reproduction*, 56, 1268-1273.
12. **Rothschild, M. F., C. Jacobson, D. A. Vaske, C. K. Tuggle, T. H. Short, S. Sasaki, G. R. Eckardt and D. G. Mc Laren**, 1994. A major gene for litter size in pigs. *Proc. 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Vol. 21, 225-228.
13. **Shi, Q. S., X. M. Xie, X. C. Liu, S. Q. Huang and C. Q. He**, 2002. Enterotoxigenic E. coli F18 receptor genotypes in different pig populations. *Proc. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, August 19-23, Montpellier, France, Vol. 31, 787-789.
14. **Smital, J., L. L. De Sousa, A. Mohsen**, 2004. Differences among breeds and manifestation of heterosis in AI boars sperm output. *Anim. Reprod. Sci.*, 80, 121-130.
15. **Short, T. H., M. F. Rothschild, O. I. Southwood, D. G. Mc Laren, A. De Vries, H. Van der Steen, G. R. Eckardt, C. K. Tuggle, J. Helm, D. A. Vaske, A. J. Mileham, and G. S. Plastow**, 1997. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction traits in four commercial pig lines. *J. Anim. Sci.*, 75, 3138-3142.
16. **Smital, J., J. Wolf, L. L. De Sousa**, 2005. Estimation of genetic parameters of semen characteristics and reproductive traits in AI boars. *Animal Reproduction Science*, 86, 119-130.
17. **Terman, A., M. Kmiec, and D. Polasik**, 2006. Estrogen receptor gene (ESR) and semen characteristics of boars. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 49, 1, 71-76.
18. **Tulsiani, D. R. P.**, 2006. Glycan modifying en-

zymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm

maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 250, 58-65.

GENOTYPES OF ESR AND FUT1 LOCI AND SPERM QUALITY TRAITS OF DANUBE WHITE BOARS

S. Stoyanova, V. Drbohlav, S. Metodiev, S. Dimitrov
Thracian University, Agricultural Faculty - Stara Zagora

SUMMARY

Danube white boars were genotyped for ESR and FUT1 loci. Detection of ESR and FUT1 genotypes was performed by PCR-RFLP method. Sperm quality traits were studied of genotyped board - semen volume, motility, sperm concentration, dead and abnormal percentage spermatozoa, total number and number of alive spermatozoa. The total number and number alive spermatozoa were significantly higher in boars with ESR DD genotypes compared to other ESR genotypes.

Boars with AA genotypes of FUT1 gene that could be with resistance to *Escherichia coli* F18 infections were with lower sperm quality traits. This could be one of the reasons for low frequency of allele A in pig populations.

Key words: *ESR genotypes, FUT1 genotypes, boar's sperm quality traits*

Correspondence: drbohlav@af.uni-sz.bg