

ПОЛИМОРФИЗЪМ НА РЕТИНОЛ-СВЪРЗВАЩИЯ ПРОТЕИН 4 (RBP4) ГЕН ПРИ СВИНЕ ОТ ПОРОДИТЕ ДУНАВСКА БЯЛА И ЛАНДРАС

Желязко Събев, Стойчо Методиев

Тракийски университет, Аграрен факултет, Стара Загора 6000

E-mail: zhsabev@uni-sz.bg

Напредъкът в изследването на генома при свинете позволи да се идентифицират полиморфни локуси на отделни гени, които контролират нивото на репродуктивните признаци и които оказват влияние върху репродуктивната способност както при свинете майки (**Wang et al.**, 2006, **Terman**, 2005, **Linville et al.**, 2001; **Drogemuller et al.**, 1999; **Rothschild et al.**, 1996), така и при нерезите (**Terman et al.**, 2006; **Makkowski et al.**, 2004; **Schlingmann et al.**, 2002; **Kmieć et al.** 2001).

Ретиноидите (витамин А и неговите аналози) са необходими за поддържане на нормалния растеж и развитие, на имунитета, репродукцията, зрението и други важни физиологични процеси (**Napoli**, 1996).

Ретинол-свързващите протеини (RBPs), са специфични носители на ретинол (витамин А) в кръвта, те доставят ретинол от черния дроб до периферните тъкани (**Do et al.**, 2012).

Способността на RBP4 да транспортира и буферира ретинола, го прави кандидат – ген за размера на прасилото при свине.

Ретинол-свързващия протеин (RBP4) е предложен като кандидат-ген за размера на прасилото, въз основа на очакванията, че доставянето на подходящи количества ретинол в матката по време на критичния период от бремеността е от решаващо значение за развитието на ембрионите (**Ollivier et al.**, 1997, **Rothschild et al.**, 2000).

Генът кодиращ ретинол–свързващия протеин 4 (RBP4) е картиран на хромозома 14q25-26, има 6721 бази двойки по дължина, състои се от шест екзона и четири интрона, неговата мРНК е 937 бази двойки и кодира 201 аминокиселини (**Messer et al.**, 1996).

Установеният генетичен полиморфизъм по RBP4/MspI локус сочи за наличието на два алела **A** и **B** и три генотипа. С настоящето проучване си поставихме за цел да установим полиморфизма по RBP4 локус - наличните алелни и генотипни честоти при свине от породите Дунавска бяла и Ландрас.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Проучването беше проведено със свине от породите Дунавска бяла и Ландрас, отглеждани и развъждани чистопородно в свинефермата на ЕТ „Михаела“, с. Хан Аспарухово, обл. Стара Загора. Кръвните проби на 12 броя нерези Дунавска бяла, 53 броя женски ремонтни свине Дунавска бяла и 77 броя свине майки Дунавска бяла, 7 броя нереза Ландрас и 66 броя свине майки Ландрас, бяха взети от орбиталния синус посредством затворена система за вземане на кръв с антикоагулант ЕДТА. Изолирането на ДНК от кръв и генотипирането на животните беше извършено в лабораторията по ДНК анализ към АФ на Тракийски университет.

Амплифицирането на фрагмент от RBP4 гена с големина 550 bp беше извършено по методика на **Rothschild et al. (2000)**, като бяха използвани следните праймери: 5'–GAG CAA GAT GGA ATG GGTT – 3' и съответно 3' – CTC GGT GTC TGT AAA GGTG – 5'. Полимеразната верижна реакция беше извършена с термосайклер Gene amp PCR system 9700, производство на Applied Biosystems, при следните условия: начална денатурация при 93°C за 3 минути, повторения от 40 цикъла на денатурация при 93°C за 30 секунди, последвани от хибридизация при 56°C за 45 секунди, удължаване при 72°C за 45 секунди и крайна екстензия

при 72°C за 5 минути. Анализът по дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP) на фрагмент от RBP4 гена беше извършен, като към PCR продукта беше добавяна 10 U от Msp I рестрикционна ендонуклеаза при 37°C за 3 часа. Рестрикционните фрагменти ДНК бяха разделени чрез хоризонтална гел-електрофореза върху 3% агарозен гел, оцветен с EvaGreen. Получените гелове бяха наблюдавани на трансилюминатор под ултравиолетови лъчи и бяха отчитани съответните генотипове. Дължините на получаваните фрагменти по генотипове са както следва: генотип **AA** –190 bp, 154 bp и 136 bp, генотип **AB** – 190 bp, 154 bp, 136 bp и 125 bp, генотип **BB** - 190 bp, 136 bp и 125 bp.

Определена и анализирана беше честотата на алелите и генотиповете по локуса PRLR при генотипираните свине по породи, развъдни категории и генеалогични групи. Критерия χ^2 за достоверност на разликите между очакваните (теоретични) и действителните генотипни честоти беше определен, за да се потвърди или отхвърли дали популацията е в равновесно състояние съгласно принципа на Харди - Вайнберг.

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

На таблица 1 са представени резултатите за алелните и генотипните честоти при свинете от породите Дунавска бяла и Ландрас. При генотипираните свине от Дунавска бяла порода се установява по-висока честота на RBP4 алел **A** (0.680), спрямо честотата на алел **B** (0.320). При Дунавска бяла честотата на хомозиготния генотип **AA** (0.520), преобладава над честотите на останалите два генотипа – хетерозиготния **AB** и хомозиготния **BB**, които са представени съответно с честоти от 0.330 и 0.150. Тези резултати са близки с установените от **Terman et al.**, (2007) честоти на алелите и генотиповете по локуса на ретинол-свързващия протеин 4 при свине от породата Полска голяма бяла. Подобна честота на алел **A** (0.62) се наблюдава при кръстоски Германски Ландрас x Дюрк (**Droegemuller et al.**, 2001; **Rothschild et al.**, 2000). По – ниска честота на алел **A** от това изследване се установява при Ландрас (0.59), Голяма бяла (0.55), кръстоски между Ландрас и голяма бяла (0.42) от **Rothschild et al.**, 2000; **Wang et al.**, 2006; **Linville et al.**, 2001

Стойността на χ^2 от 9.200, установена между действителните и очакваните стойности на генотипите, общо за генотипираните свине от Дунавска бяла порода показва, че разликата между тях е достоверна и популацията е в неравновесно състояние, поради вероятното действието на фактори като изкуствен и естествен отбор, както и от практикувания подбор, които биха могли да променят съотношението между генотипите. В случая, при нарушеното равновесие в популацията, се наблюдава по-висока действителна честотата на хомозиготния генотип **BB** и хомозиготния генотип **AA** за сметка на понижена, спрямо очакваната честота на хетерозиготния генотип **AB**.

При генотипираните свине от породата Ландрас, се вижда, че честотата на алел **A** (0.555) е сравнително сходна спрямо честотата на алел **B** на RBP4 гена (0.445). Сходни на нашите резултати докладват **Marantidis et. al.**, (2016), в изследване обхващащо 400 свине кръстоски между Голяма бяла и Ландрас. При генотипираните свине от породата Ландрас, най-висока е честотата на хетерозиготния генотип **AB** – 0.534 следвана от тази на хомозиготния генотип **AA** с честота 0.288 и честотата на хомозиготния генотип **BB** – 0.178.

На таблица 2 са представени резултатите за алелните и генотипните честоти при различни категории разплодни животни от двете изследвани породи. Честотата на алел **A** от 0.679 при женски ремонтни свине Дунавска бяла превъзхожда тази при основните свине майки (0.660) и при нерезите (0.625) от същата порода. Отчита се превъзходство на честотата на алел **A** при нерези, спрямо честотата на същият алел при основните свине майки при породата Ландрас, съответно 0.570 и 0.550. При Дунавска бяла честотата на хомозиготния генотип **AA** преобладава над честотата на останалите генотипи при всички категории разплодни животни. С най-висока честота, както при генотипираните нерези, така и при основните свине майки от

породата Ландрас се проявява хетерозиготния генотип АВ. Соченият от **Wang et al.**, (2006), **Terman et al.**, (2007), като благоприятен за някои признаци на прасилото, генотип **ВВ** се среща с най-висока честота (0.182) при свинете майки от породата Ландрас. Същевременно, ниска е неговата честота при основните свине майки от породата Дунавска бяла (0.155). Стойността на χ^2 от 5.070 при женските ремонтни свине от породата Дунавска бяла, е ясен сигнал за възникнало неравновесие в дадената популация, като е налице по-висока действителната честота на хомозиготните генотипи **АА** и **ВВ** спрямо очакваната, за сметка на понижената честота на хетерозиготния генотип **АВ**.

На таблица 3 са представени алелните и генотипните честоти по локуса на ретинол-свързващия протеин при генотипираните основни свине майки от породата Дунавска бяла в зависимост от генеалогичната им принадлежност. Установихме значително вариране на честотата на алел **А** от 0.550 в пета генеалогична група, до 1.000 в шеста генеалогична група при анализиране на поддържаните осем налични генеалогични групи. Във всички генеалогични групи, честотата на алел **А** е по-висока, спрямо тази на алел **В**. В трета четвърта, шеста и осма генеалогична група отсъства хомозиготния генотип **ВВ**, а в шеста генеалогична група отсъства хетерозиготния генотип **АВ**. Най-ниската честотата на хомозиготния генотип **АА** се отчита в пета генеалогична група – 0.300. В шеста, четвърта и трета генеалогични групи честотата на хомозиготния генотип **АА** е най-висока, съответно 1.00, 0.750 и 0.600. Трябва да отбележим, че високата честота на алел **А** и хомозиготния генотип **АА** в шеста генеалогична група, вероятно се дължи на малкия брой индивиди в тази група – 2.

Установената стойност на χ^2 между действителните и теоретичните честоти на генотипите от 4.240 за първа генеалогична група при основни свине майки от породата Дунавска бяла, намира израз в повишаването на честотата на хомозиготните генотипи **АА** и **АВ**, за сметка на понижената честота на хетерозиготния генотип **АВ**.

На таблица 4 са представени алелните и генотипните честоти по локуса на ретинол-свързващия протеин 4 при основни свине майки от породата Ландрас в зависимост от генеалогичната им принадлежност. Варирането на алелната честота на алел **А** е от 0.444 в осма генеалогична група до 0.875 в първа генеалогична група. В първа, четвърта, шеста и осма генеалогична група честотата на алел **А** е по-висока отколкото честотата на алел **В**. В първа и втора генеалогични групи липсва хомозиготния генотип **ВВ**, а във втора генеалогична група отсъства хомозиготния генотип **АА**. Трябва да се обърне внимание на това, че втора генеалогична група е представена със сравнително малък на брой индивиди.

Установените стойности на χ^2 между действителните и теоретичните честоти на генотипите от 13.000 за втора генеалогична група и 5.560 при основни свине майки от породата Ландрас за пета генеалогична група са сигнал за възникнало неравновесие изразяващо се с повишена честота на хетерозиготния генотип **АВ** за сметка на понижените честоти на хомозиготните генотипи **АА** и **ВВ**.

ИЗВОДИ

Установен е полиморфизъм по проучвания RBP4 локус при свине от породите Дунавска бяла и Ландрас.

RBP4 алел **А** е с по-висока честота при стадото от породата Дунавска бяла (0.680), а RBP4 алел **В** е с по-висока честота при породата Ландрас (0.445).

Честотата на хомозиготния генотип **АА** при свинете от породата Дунавска бяла е по-висока при всички категории разплодни животни.

Честотата на хетерозиготния генотип **АВ** при свинете от породата Ландрас е по-висока при всички категории разплодни животни.

Установяват се различия на алелната и генотипните честоти по локуса на RBP4 в зависимост от различната генеалогична принадлежност на свинете майки при двете изследвани породи.

При установените случаи на неравновесие в популациите при Дунавска бяла порода това се свързва с понижена честота спрямо очакваната на хетерозиготния генотип **AB**, за сметка на увеличената честота на хомозиготните генотипи **AA** и **BB**.

При установените случаи на неравновесие в популациите при породата Ландрас това се свързва с повишена честота спрямо очакваната на хетерозиготния генотип **AB**, за сметка на понижената честота на хомозиготните генотипи **AA** и **BB**.

Получените резултати са добра основа за оценка на връзките между генотипите по RBP4 локуса и репродуктивните и продуктивните признаци в изследваните популации на свинете.

ЛИТЕРАТУРА

1. **Do, C. H., Cho, B. W., Lee, D. H.**: Study on the prolactin receptor 3 (PRLR3) gene and the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as candidate genes for production traits in Berkshire pigs. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 25(2), 183, 2012.
2. **Droegemüller, C.; Hamann, H.; Thieven, U.; Krieter, J.; Distl, O.; Harlizius, B.**: Influence of the genome region surrounding the estrogen receptor (ESR) gene on litter size in a German Landrace population. *Arch. Tierz., Dummerstorf 42 Special Issue*, 175-177, 1999.
3. **Droegemüller, C., Hamann, H., Distl, O.** Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. *Journal of animal science*, 79(10), 2565-2570, 2001.
4. **Kmiec, M., Dybus, A., Terman, A.** Prolactin receptor gene polymorphism and its association with litter size in Polish Landrace. *Archives Animal Breeding*, 44(5), 547-552, 2001.
5. **Linville, R. C., Pomp, D., Johnson, R. K., Rothschild, M. F.** Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *Journal of Animal Science*, 79(1), 60-67, 2001.
6. **Linville, R.C.; Pomp, D.; Johnson, R.K.; Rothschild, M.F.**: Candidate gene analysis for loci affecting litter size and ovulation rate in swine. *J. Anim. Sci.* 79, 60-67, 2001
7. **Maćkowski, M.; Świtoński, M.; Maćkowska, J.; Perz, W.** Polymorphism of the GPX-5 gene and characteristics of boar semen. *Arch. Tierz., Dummerstorf 47, 2*, 165-171, 2004.
8. **Marantidis, A., Laliotis, G. P., Avdi, M.** Association of RBP4 genotype with phenotypic reproductive traits of sows. *Genetics research international*, 2016.
9. **Napoli, J. L.** Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism, and signal transduction. *Clinical immunology and immunopathology*, 80(3), S52-S62, 1996.
10. **Ollivier, L., Messer, L. A., Rothschild, M. F., Legault, C.** The use of selection experiments for detecting quantitative trait loci. *Genetics Research*, 69(3), 227-232, 1997.
11. **Rothschild, M. F., Messer, L., Day, A., Wales, R., Short, T., Southwood, O., Plastow, G.** Investigation of the retinol-binding protein 4 (RBP4) gene as a candidate gene for increased litter size in pigs. *Mammalian Genome*, 11(1), 75-77, 2000.
12. **Rothschild, M.; Jacobson, C.; Vaske, D.; Tuggle, C.H.; Wang, L.; Short, T.; Eckardt, G.; Sasaki, S.; Vincent, A.; McLaren, M.; Southwood, O.; Van Der Steen, H.; Mileham, A.; Plastow, G.**: The estrogen receptor locus is associated with major gene influencing litter size in pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 201-205, 1993.

13. **Schlingmann, C.; Dietl, G.; Räder, I.:** Association von Polymorphismen im Promotbereich des porcinen HSP 70.2-Gens bei Ebern mit der Wurfgrösse. Arch. Tierz., Dummerstorf 45, 2, 171-180, 2002.
14. **Terman, A., Kmiec, M., Polasik, D. L., Pradziadowicz, K. Retinol binding protein 4 gene and reproductive traits in pigs. Arch. Tierz, 50, 181-185, 2007.**
15. **Terman, A.:** Effect of the polymorphism of prolactin receptor (PRLR) and leptin (LEP) genes on litter size in Polish pigs. J. Anim. Breed. Genet. 122 (6), 400-404, 2005.
16. **Terman, A.; Kmiec, M.; Polasik, D.:** Estrogen receptor gene (ESR) and semen characteristics of boars. Arch. Tierz., Dummerstorf 49 (1), 71-76, 2006.
17. **Wang, X., Wang, A., Fu, J., Lin, H.** Effects of ESR1, FSHB and RBP4 genes on litter size in a Large White and a Landrace Herd. Archives Animal Breeding, 49 (1), 64-70, 2006.

Таблица 1. Честоти на алели и генотиповете по RBP4 локус при породите Дунавска бяла и Ландрас.

Table 1. Allele and genotype frequencies at RBP4 locus of Danube White and Landrace breeds.

Порода/Breed		Честота на генотиповете			Честота на алелите		χ^2
		Genotype frequencies			Allele frequencies		
		AA	AB	BB	A	B	
Дунавска бяла Danube White n=142	Действителна Observed	0.520	0.330	0.150	0.680	0.320	9.200
	Очаквана Expected	0.460	0.440	0.100			
	Ландрас Landrace n=73	Действителна Observed	0.288	0.534	0.178	0.555	
	Очаквана Expected	0.308	0.494	0.198			

χ^2 (df=1; p≤0.05)

Таблица 2. Честота на алели и генотиповете по RBP4 локус при различни категории свине от породите Дунавска бяла и Ландрас.

Table 2. Allele and genotype frequencies at RBP4 locus of Danube White and Landrace breeds for different categories of breeding animals.

Порода Breed	Категория Category	n	Честота на алелите		Честота на генотиповете Genotype frequencies						χ^2
			Allele frequencies		Действителна Observed			Очаквана Expected			
			A	B	AA	AB	BB	AA	AB	BB	
Дунавска бяла Danube White	Нерези/Boars	12	0.625	0.375	0.500	0.250	0.250	0.391	0.469	0.140	2.640
	Женски ремонт/Gilts	53	0.679	0.321	0.528	0.302	0.170	0.461	0.436	0.103	5.070
	Свине майки/Sows	77	0.660	0.340	0.481	0.364	0.155	0.436	0.449	0.115	2.710
Ландрас Landrace	Нерези/ Boars	7	0.570	0.430	0.290	0.570	0.140	0.325	0.490	0.185	0.190
	Свине майки/Sows	66	0.550	0.450	0.288	0.530	0.182	0.300	0.495	0.205	0.370

χ^2 (df=1; p≤0.05)

Таблица 3. Честота на алелите и генотиповете на ген RBP4 при основни свине майки от породата Дунавска Бяла с различна генеалогична принадлежност.

Table 3. Allele and genotype frequencies at RBP4 locus of Danube White sows from different lines.

Генеалогична група	n	Честота на алелите		Честота на генотиповете						χ^2
		Allele frequencies		Действителна Observed			Очаквана Expected			
Line		A	B	AA	AB	BB	AA	AB	BB	
1	27	0.685	0.315	0.556	0.259	0.185	0.469	0.431	0.100	4.240
2										
3	10	0.800	0.200	0.600	0.400	0.000	0.640	0.320	0.04	0.625
4	8	0.875	0.125	0.750	0.250	0.000	0.766	0.218	0.016	0.163
5	10	0.550	0.450	0.300	0.500	0.200	0.303	0.495	0.202	0.030
6	2	1.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000
7	14	0.643	0.357	0.429	0.429	0.142	0.413	0.459	0.128	0.059
8	6	0.750	0.250	0.500	0.500	0.000	0.563	0.375	0.062	1.180

χ^2 (df=1; p≤0.05)

Таблица 4. Честота на алелите и генотиповете на ген RBP4 при основни свине майки от породата Ландрас с различна генеалогична принадлежност.

Table 4. Allele and genotype frequencies at RBP4 locus of Landrace sows from different lines.

Генеалогична група Line	n	Честота на алелите Allele frequencies		Честота на генотиповете Genotype frequencies						χ^2
				Действителна Observed			Очаквана Expected			
		A	B	AA	AB	BB	AA	AB	BB	
1	4	0.875	0.125	0.750	0.250	0.000	0.766	0.219	0.015	0.198
2	3	0.500	0.500	0.000	1.000	0.000	0.250	0.500	0.250	13.000
3	10	0.500	0.500	0.300	0.400	0.300	0.250	0.500	0.250	0.400
4	5	0.600	0.400	0.400	0.400	0.200	0.360	0.480	0.160	0.139
5	18	0.500	0.500	0.111	0.778	0.111	0.250	0.500	0.250	5.560
6	13	0.654	0.346	0.385	0.538	0.077	0.428	0.453	0.119	0.460
7	3	0.500	0.500	0.330	0.340	0.330	0.250	0.500	0.250	0.330
8	9	0.444	0.556	0.330	0.220	0.450	0.197	0.494	0.309	2.530

χ^2 (df=1; p≤0.05)