

**ПОЛИМОРФИЗЪМ НА ПРОСТАГЛАНДИН-ЕНДОПЕРОКСИД СИНТАЗА 2 (PTGS2)
ГЕН ПРИ СВИНЕ ОТ ПОРОДИТЕ ДУНАВСКА БЯЛА И ЛАНДРАС**

Желязко Събев

Тракийски университет, Аграрен факултет, Стара Загора 6000.

E-mail: zhsabev@uni-sz.bg

Простагландините произведени от матката играят важна роля в различните репродуктивни процеси, включително в овулацията, лутеализата, имплантирането на зародиши, ранното ембрионално развитие (**Bazer et al.**, 1982; **Weems et al.**, 2006; **Kennedy et al.**, 2007; **Ziecik et al.**, 2011).

Простагландин-ендопероксид синтаза 2 е ензим ограничаващ скоростта на образуване на простагландини, **Lim et al.**, (1997), **Wilson et al.**, (2002), установяват, че мишки с изключен PTGS2 ген имат репродуктивни отклонения изразяващи се както с нарушение в овулацията, така и в съзряването на ооцитите, ембрионалната имплантация и раждането.

Поради своята критична роля в редица репродуктивни процеси простагландин-ендопероксид синтаза 2 гена е избран за кандидат ген свързан с репродуктивните признаци при свине.

PTGS2 гена е картиран на девета хромозома при свине, чрез използване анализ на хибриден панел на соматични клетки (SCHP) и флуоресцентна *in situ* хибридизация (FISH) (**Sun et al.**, 2002).

Gladney et al., 1999, чрез RFLP анализ на продукт от PCR амплификация на участък от PTGS2 гена, установяват полиморфизъм – два алела **A** и **B**, и три генотипа. С настоящето проучване си поставихме за цел да установим полиморфизма по PTGS2 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 PTGS2 гена с големина 1550 bp беше извършено по методика на **Gladney et al.** (1999), като бяха използвани следните праймери: 5'–GTGCACTACATACTTACCCACTTC – 3' и съответно 3' – AGGCTTCCCAGCTTTT(A/G)TA – 5'. Полимеразната верижна реакция беше извършена с термосайклер Gene amp PCR system 9700, производство на Applied Biosystems, при следните условия: начална денатурация при 94°C за 3.5 минути, повторения от 36 цикъла на денатурация при 93°C за 30 секунди, последвани от хибридизация при 53°C за 30 секунди, удължаване при 72°C за 90 секунди и крайна екстензия при 72°C за 5 минути. Анализът по дължината на рестрикционните фрагменти (RFLP) на фрагмент от PTGS2 гена беше извършен, като към PCR продукта беше добавяна 10 U от Mse 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. Наличието на фрагмент с

големина 360 bp е характерно за алел **A**, а наличието на фрагменти с дължина 240 bp и 120 bp характеризират алел **B**.

Определена и анализирана беше честотата на алелите и генотиповете по локуса PTGS2 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 породата Дунавска бяла, се установи ниска стойност на алел **A** – 0.14 като само 31 свине са негови притежатели (9 хомозиготни **AA** и 22 хетерозиготни **AB**). Алел **B**, респективно генотип **BB** се срещат с честота съответно 0.86 и 0.783. Сходни резултати докладват Korwin-Kossakowska et al., (2005), те определят честотата на алел **A** и **B**, съответно 0.200 и 0.800, като не установяват хомозиготни индивиди носители на генотип **AA**. Най – ниска е честотата на хомозиготния генотип **AA** – 0.063, най – висока честота е установена по отношение на хомозиготния генотип **BB** – 0.783, честотата на хетерозиготния генотип **AB** е 0.154.

Стойността на χ^2 от 18.600, 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 хомозиготните генотипи **AA** и **BB** за сметка на понижена, спрямо очакваната честота на хетерозиготния генотип **AB**.

При генотипираните свине от породата Ландрас, алел **A** е представен с честота 0.349, а алел **B** с честота 0.651. За по-висока честота на алел **A**, спрямо честотата на алел **B** докладват Gladney et al., (1999), съответно 0.680 и 0.320, те обаче не установяват индивиди с хомозиготен генотип **BB**. Честотата на хетерозиготния генотип **AB** на PTGS2 локуса е 0.479, което е повече от двойно по – висока, спрямо Дунавска бяла – 0.154 .

На таблица 2 са представени резултатите за алелните и генотипните честоти при различни категории разплодни животни от двете изследвани породи. Честотата на алел **B** при основните свине майки от породите Дунавска бяла и Ландрас-0.857 и 0.659 е по-висока отколкото честотата на алела при нерезите, съответно 0.830 и 0.57. Честотата на алел **A** при нерези от породата Дунавска бяла е по-ниска отколкото честотата на алел **B**, съответно 0.170 и 0.830. Подобно на нас, Huang et al., (2006), докладват високи честоти на хомозиготния генотип **BB** при нерези от породата Дюрок – 0.93. При нерезите от породата Ландрас честотата на алел **A** е 0.429, което е близо до установеното от Huang et al., (2006), които докладват за подобна честота (0.500), при нерези от породата Ландрас. За разлика от Neng-Shui et al., (2006), които съобщават за алелна честота по отношение на алел **A** от 0.6371 и 0.3629 за алелна честота на алел **B** при свине от породата Ландрас. Същите автори определят и алелните честоти по локуса при свине от породата Дюрок и Голяма Бяла, съответно за алел **A** 0.0075 и 0.0082 и алел **B** 0.9925 и 0.9918. И при двете породи авторите не установяват хомозиготни индивиди с генотип **AA**. Най-висока е честотата на хетерозиготния генотип **AB** – 0.570, които преобладава над честотите на хомозиготния **AA** и хомозиготния **BB** генотип, които са представени с честоти 0.140 и 0.290. Стойността на χ^2 от 17.6200 при основни свине майки от породата Дунавска бяла, е ясен сигнал за възникнало неравновесие в дадената популация, като е налице по-висока действителната честота на хомозиготните генотипи **AA** и **BB** спрямо очакваната, за сметка на понижената честота на хетерозиготния генотип **AB**.

На таблица 3 са представени алелните и генотипните честоти по локуса на простагландин-ендопероксид синтаза 2 при генотипираните основни свине майки от породата Дунавска бяла в зависимост от генеалогичната им принадлежност. Честотата на алел **B** е по-висока, спрямо честотата на алел **A** при всички осем генеалогични групи. Варирането на честотата на алел **A** е от 0.000 в осма генеалогична група до 0.300 в пета генеалогична група, честотата на алел **B** варира от 0.700 до 1.000 съответно в пета и осма генеалогична група. При всички генеалогични групи честотата на хомозиготния генотип **BB** преобладава над честотите на хомозиготния генотип **AA** и хетерозиготния **AB**.

Установената стойност на χ^2 между действителните и теоретичните честоти на генотипите от 8.000 за четвърта генеалогична група при основни свине майки от породата Дунавска бяла, намира израз в повишаването на честотата на хомозиготните генотипи **AA** и **BB**, за сметка на понижената честота на хетерозиготния генотип **AB**.

На таблица 4 са представени алелните и генотипните честоти по локуса на простагландин-ендопероксид синтаза 2 при основни свине майки от породата Ландрас в зависимост от генеалогичната им принадлежност. Честотата на алел **B** е по-висока, спрямо честотата на алел **A** при всички генеалогични групи с изключение на втора и седма генеалогична група, където честотата на алел **A** е равна на честотата на алел **B** – 0.500. Варирането на алелната честота на алел **A** е от 0.100 в четвърта генеалогична група до 0.500 във втора и седма генеалогична група. Честотата на хомозиготния генотип **BB** преобладава над честотите на хомозиготния генотип **AA** и хетерозиготния генотип **AB** в първа, трета, четвърта и осма генеалогична група. Във Втора и седма генеалогични групи честотата на хетерозиготния генотип **AB** е 1.000, трябва да се обърне внимание на факта, че в посочените генеалогични групи има твърде малък брой генотипирани индивиди-само 3.

Установените стойности на χ^2 между действителните и теоретичните честоти на генотипите при основни свине майки от породата Ландрас са ниски по стойност и това е сигнал че популацията се намира в равновесно състояние.

ИЗВОДИ

Установен е полиморфизъм по проучвания PTGS2 локус при свине от породите Дунавска бяла и Ландрас.

PTGS2 алел **A** е с по-висока честота при стадото от породата Ландрас (0.349), а PTGS2 алел **B** е с по-висока честота при породата Дунавска бяла (0.860).

Честотата на алел **A** при основните свине майки и при двете породи преобладава над честотата на алела при нерезите.

Варирането на алелните и генотипните честоти по локуса на PTGS2 е по-ясно изразено при различните генеалогична групи на основните свине 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**.

Получените резултати са добра основа за оценка на връзките между генотипите по PTGS2 локуса и репродуктивните и продуктивните признаци в изследваните популации на свинете.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bazer, F. W., Geisert, R. D., Thatcher, W. W., Roberts, R. M. The establishment and maintenance of pregnancy. In 'Control of Pig Reproduction'. (Eds DSA Cole and GR Foxcraft.) pp. 227–252, 1982.
2. Weems, C. W., Weems, Y. S., Randel, R. D. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *The Veterinary Journal*, 171(2), 206-228, 2006.

3. **Kennedy, T. G., Gillio-Meina, C., Phang, S. H.** Prostaglandins and the initiation of blastocyst implantation and decidualization. *Reproduction*, 134(5), 635-643, 2007.
4. **Ziecik, A. J., Waclawik, A., Kaczmarek, M. M., Blitek, A., Jalali, B. M., Andronowska, A.** Mechanisms for the establishment of pregnancy in the pig. *Reproduction in domestic animals*, 46(s3), 31-41, 2011.
5. **Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., Dey, S. K.** Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell*, 91(2), 197-208, 1997.
6. **Wilson M.E., Fahrenkrug S.C., Smith T.P., Rohrer G.A., Ford S.P.**, Differential expression of cyclooxygenase-2 around the time of elongation in the pig conceptus. *Animal Reproduction Science* 71 (3-4), 229-237, 2002.
7. **Sun, H. S., Tuggle, C. K., Goureau, A., Fitzsimmons, C. J., Pinton, P., Chardon, P., Yerle, M.** Precise mapping of breakpoints in conserved synteny between human chromosome 1 and pig chromosomes 4, 6 and 9. *Animal genetics*, 33(2), 91-96, 2002.
8. **Gladney, C. D., Martinez, V. G., Brumbaugh, K. A., DeGroot, B. J., Linville, R. C., Oommen, A. M., Pomp, D.** Rapid Communication: Mapping of the prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene to porcine chromosome 9 and bovine chromosome 16 by linkage analysis using novel PCR-RFLP. *Journal of animal science*, 77(3), 787-788, 1999.
9. **Korwin-Kossakowska, A., Kamyczek, M., Cieślak, D., Pierzchała, M., Kurył, J.** Candidate gene markers for reproductive traits in polish 990 pig line. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(3), 181-191, 2003.
10. **Huang, S. Y., Song, H. L., Lin, E. C., Kuo, Y. H., Tsou, H. L., Lee, W. C.** A Candidate gene approach for identifying genes associated with semen quality traits in boars, 2002.
11. **Neng-Shui, D., Dong-Ren, R., Yuan-Mei, G., Jun, R., Ying, Y., Jun-Wu, M. A., Huang, L. S.** Genetic variation of porcine prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) gene and its association with reproductive traits in an Erhualian× Duroc F2 population. *Acta Genetica Sinica*, 33(3), 213-219, 2006.

Таблица 1. Честоти на алели и генотипове по PTGS2 локус при породите Дунавска бяла и Ландрас.

Table 1. Allele and genotype frequencies at PTGS2 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	0.063	0.154	0.783	0.140	0.860	18.600
	Очаквана Expected	0.020	0.240	0.740			
Ландрас Landrace n=73	Действителна Observed	0.110	0.479	0.411	0.349	0.651	0.226
	Очаквана Expected	0.122	0.454	0.424			

χ^2 (df=1; p≤0.05)

Таблица 2. Честоти на алели и генотипове по PTGS2 локус при различни развъдни категории свине от породите Дунавска бяла и Ландрас.

Table 2. Allele and genotype frequencies at PTGS2 locus of Danube White and Landrace breeds for different categories of breeding animals.

Порода Breed	Категория Category	n	Честота на алелите		Честота на генотиповете						χ^2
			Allele frequencies		Действителна Observed			Очаквана Expected			
			A	B	AA	AB	BB	AA	AB	BB	
Дунавска бяла Danube White	Нерези/Boars	12	0.170	0.830	0.080	0.160	0.760	0.029	0.280	0.691	1.560
	Женски ремонт/ Gilts	53	0.130	0.870	0.040	0.190	0.770	0.017	0.226	0.757	1.700
	Свине майки/Sows	77	0.143	0.857	0.078	0.130	0.792	0.020	0.250	0.730	17.620
Ландрас Landrace	Нерези/Boars	7	0.429	0.571	0.140	0.570	0.290	0.184	0.490	0.326	0.190
	Свине майки/Sows	66	0.341	0.659	0.110	0.470	0.420	0.116	0.449	0.435	0.518

χ^2 (df=1; p≤0.05)

Таблица 3. Честоти на алели и генотипове по PTGS2 локус при основни свине майки от породата Дунавска Бяла с различна генеалогична принадлежност.

Table 3. Allele and genotype frequencies at PTGS2 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	0.056	0.944	0.000	0.111	0.889	0.003	0.106	0.891	0.090
2										
3	10	0.150	0.850	0.100	0.100	0.800	0.022	0.255	0.723	2.900
4	8	0.250	0.750	0.333	0.000	0.667	0.063	0.375	0.562	8.000
5	10	0.300	0.700	0.200	0.200	0.600	0.090	0.420	0.490	2.740
6	2	0.250	0.750	0.000	0.500	0.500	0.063	0.375	0.562	0.219
7	14	0.250	0.750	0.143	0.214	0.643	0.062	0.375	0.563	2.570
8	6	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000	0.000	1.000	0.000

χ^2 (df=1; p≤0.05)

Таблица 4. Честоти на алели и генотипове по PTGS2 локус при основни свине майки от породата Ландрас с различна генеалогична принадлежност.

Table 4. Allele and genotype frequencies at PTGS2 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	0.375	0.625	0.250	0.250	0.500	0.141	0.469	0.390	0.638
2	3	0.500	0.500	0.000	1.000	0.000	0.250	0.500	0.250	3.000
3	10	0.150	0.850	0.100	0.100	0.800	0.023	0.128	0.849	2.666
4	5	0.100	0.900	0.000	0.200	0.800	0.01	0.180	0.810	0.061
5	18	0.360	0.640	0.111	0.500	0.389	0.129	0.462	0.409	0.127
6	13	0.346	0.654	0.077	0.538	0.385	0.119	0.454	0.427	0.465
7	3	0.500	0.500	0.000	1.000	0.000	0.250	0.500	0.250	3.000
8	9	0.440	0.560	0.330	0.220	0.450	0.194	0.492	0.314	3.570

χ^2 (df=1; p≤0.05)