

## Występowanie niekorzystnego allelu genu *RYR1* w populacji świń rasy puławskiej\*

Katarzyna Ropka-Molik<sup>\*1</sup>, Katarzyna Piórkowska<sup>1</sup>, Maria Oczkiewicz<sup>1</sup>,  
Magdalena Szyndler Nęcza<sup>2</sup>, Tadeusz Blicharski<sup>3</sup>

*Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, 32-083 Balice k. Krakowa,*

<sup>1</sup>*Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt, <sup>2</sup>Dział Genetyki i Hodowli Zwierząt*

<sup>3</sup>*Instytut Genetyki i Hodowli Zwierząt, Zakład Immunogenetyki, Jastrzębiec, ul. Postępu 36A, 05-552 Magdalenka; \*katarzyna.ropka@izoo.krakow.pl*

Krzyżowanie zwierząt w populacjach o małej liczebności lub jednostronna selekcja skierowana na poprawę określonej grupy cech może doprowadzić do zmniejszenia różnorodności genetycznej populacji oraz ujawnienia się w populacjach rzadkich, często niekorzystnych wariantów allelicznych (mutacji). Jest to poważny problem w przypadku ras zachowawczych, w których liczebność osobników jest z reguły niewielka a możliwość doboru zwierząt do krzyżowania ograniczona.

Obecnie, rozwój metod genetyki molekularnej umożliwia identyfikację genetycznego podłoża wybranych zespołów chorobowych występujących w populacjach zwierząt hodowlanych oraz ich szybką identyfikację. U świń mutacja w genie *RYR1*, powodująca zmianę sekwencji aminokwasowej w pozycji 614 powstającego białka z argininy na cysteinę (p.Arg614-Cys; c.1843C>T; rs118192172), została uznana za główny czynnik genetyczny warunkujący występowanie hipertermii złośliwej (ang. *malignant hyperthermia*). Gen *RYR1* (receptor ryanodyny 1) koduje podjednostkę sarkoplazmatycznego

kanału wapniowego zlokalizowanego w mięśniach szkieletowych i pełni kluczową funkcję w utrzymaniu homeostazy wapniowej (Tilgen i in., 2001). Badania przeprowadzone u ludzi potwierdziły związek mutacji w *locus* genu *RYR1* z występowaniem chorób układu mięśniowego, takich jak hipertermia złośliwa oraz miopatia typu central core (ang. *central core disease*) (Lunardi i Monnier, 2004; Robinson i in., 2006).

W przypadku trzody chlewnej wykazano, że występowanie allelu T w *locus* mutacji w genie *RYR1* (c.1843C>T) jest związane ze zmianą transportu jonów Ca<sup>2+</sup> w retikulum sarkoplazmatycznym, co w konsekwencji prowadzi do wystąpienia gorączki złośliwej. Obecność mutacji w genie *RYR1* (HAL) warunkuje zmniejszenie odporności zwierząt na czynniki stresowe, co wpływa na zaburzenie procesów życiowych organizmu poddanego stresowi, pojawienie się zachowań agresywnych w stadzie, a w konsekwencji kończy się obniżeniem produktywności świń, a nawet chorobą i śmiercią. Ponadto, uzyskiwane od takich świń mięso jest obciążone wadą typu PSE (mięso blade, miękkie i wodniste) i charakteryzuje się obniżoną wartością technologiczną (Janik i in., 2006; Kapelański i in., 1999). W latach 2009–2010 przeprowadzono ocenę genotypów w *locus* genu *RYR1* związanego z podatnością świń na stres, która została wykonana dla świń ras popularnie hodowanych w kraju (rasy pbz, wbp, Pietrain, Duroc). Pozwoliło to na eliminację z hodowli świń wrażliwych i zmniejszenie ilości heterozygotycznych nosicieli badanej mutacji. To

\*Praca wykonana w ramach projektu „Kierunki wykorzystania oraz ochrona zasobów genetycznych zwierząt gospodarskich w warunkach zrównoważonego rozwoju” współfinansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w ramach Strategicznego programu badań naukowych i prac rozwojowych „Środowisko naturalne, rolnictwo i leśnictwo” – BIOSTRATEG, nr umowy: BIOSTRATEG2/297267/14/NCBR/2016.

z kolei wpłynęło na zmniejszenie ilości upadków zwierząt spowodowanych czynnikami stresującymi (transport, przepędzanie, wysoka temperatura itp.) i znacznie zwiększyło efektywność produkcji. W rodzimej rasie puławskiej w 2003 r. przeprowadzono kontrolę frekwencji tego genotypu u 52 loszek pochodzących z pięciu linii ojcowskich (Babicz i in., 2003). W badanej grupie zwierząt wykazano, że 52% osobników posiadało genotyp heterozygotyczny *CT*, a osobników o niekorzystnym homozygotycznym genotypie *TT* było 14%. Przez wiele lat w hodowli świń tej rasy przyjmowano strategię dopuszczającą utrzymanie heterozygot *RYRIC/T* w celu poprawy mięsności tuszy. Jednakże, z uwagi na występujące problemy związane z jakością mięsa oraz rozrodem loszek i loch o genotypie *CT* (Antosik i in., 2006; Bogdzińska, 2006) należy podjąć działania zmierzające do eliminacji obu genotypów (*CT* oraz *TT*) z populacji zarodowej.

Celem przeprowadzonych badań było oszacowanie frekwencji występowania niekorzystnego allelu genu *RYRI* w objętej aktualnie programem ochrony zasobów genetycznych populacji świń rasy puławskiej. Uzyskane informacje mogą zostać uwzględnione przy doborze zwierząt do krzyżowania i umożliwią eliminację z hodowli nosicieli badanych mutacji.

### Material i metody

Materiał do badań stanowiły cebulki włosowe pobrane w latach 2016–2017 od świń rasy puławskiej w ilości 411 sztuk (81 knurów oraz 330 loszek pochodzących ze stad objętych programem ochrony zasobów genetycznych). DNA genomowe wyizolowano z cebulek przy użyciu zestawu Sherlock (A & A Biotechnology). Jakość oraz stężenie uzyskanego DNA oceniono na aparacie Nanodrop. Warianty polimorficzne badanej mutacji c.1843C>T oznaczono za pomocą metody PCR-RFLP przy użyciu enzymu restrykcyjnego *HinPI* (Fujii i in., 1991).

### Wyniki i ich omówienie

Objęte programami ochrony świni ras rodzimych cechują się dużą zmiennością i różnorodnością genetyczną, która warunkuje występowanie cennych cech, między innymi takich jak bardzo dobra jakość mięsa. Jednak, w ostat-

nim czasie liczba tych zwierząt w hodowli waha się i jest niewielka, co może sprzyjać wzrostowi homozygotyczności populacji oraz zwiększeniu występowania niekorzystnych wariantów alleli. Taka sytuacja ma miejsce w przypadku genu *RYRI* i allelu T związanego z podatnością świń na warunki stresowe. Zwierzęta wrażliwe na stres (świnie homozygotyczne *TT*) charakteryzują się zwiększoną liczbą upadków w czasie trwania tuczu oraz obniżoną efektywnością reprodukcji. Do rozprzestrzeniania się niekorzystnego allelu w populacji przyczynił się fakt, że osobniki heterozygotyczne pod względem omawianej mutacji (*CT*) charakteryzują się wyższą zawartością mięsa w tuszy i niższym otluszczeniem w stosunku do świń wolnych od mutacji – *CC* (Koćwin-Podsiadła i in., 1994, 2000).

Potwierdzono, że allel T zwiększa tempo spadku pH w tkance mięśniowej *post mortem*, co istotnie wpływa na częstotliwość pojawiania się mięsa z wadą typu PSE. Badania wielu autorów potwierdziły znacznie wyższy odsetek osobników posiadających mięso charakteryzujące się wadą typu PSE (36–100%) w grupie świń homozygotycznych *TT* w porównaniu do zwierząt homozygotycznych *CC* (0–14%) (Koćwin-Podsiadła i in., 1994, 2000; Przybylski i in., 1994). Za koniecznością eliminacji z hodowli osobników posiadających niekorzystny allel T przemawia również fakt, że c.1843C>T polimorfizm genu *RYRI* istotnie wpływa na cechy reprodukcyjne świń. Badania Kurył i Wróblewskiego (1992) potwierdziły negatywny wpływ omawianej mutacji na ilość prosiąt urodzonych w miocie. Z kolei, badania Buczyńskiego i in. (2006) przeprowadzone u świń rasy złotnickiej białej wykazały istotny związek allelu T z upadkami prosiąt do 21. dnia życia.

W przeprowadzonych badaniach dla wszystkich zwierząt oznaczono genotyp mutacji c.1843C>T zlokalizowanej w genie *RYRI*. W populacji rodzimej rasy puławskiej wykazano najwyższą frekwencję genotypu *CC* – 70%. Osobniki heterozygotyczne stanowiły 27% oraz zidentyfikowano 3% świń posiadających genotyp *TT* (homozygoty recesywne). W przypadku analizy przeprowadzonej z uwzględnieniem płci wykazano niemal identyczny procentowy udział poszczególnych genotypów w grupie loszek, jak i w całej badanej populacji (tab. 1).

Tabela 1. Procentowy udział poszczególnych genotypów genu *RYR1* w rasie puławskiej  
 Table 1. Percentage share of *RYR1* genotypes in Puławska breed

Rasa <i>Breed</i>	Genotyp – <i>Genotype</i>			Ilość przebadanych zwierząt <i>Number of examined animals</i>
	CC	CT	TT	
Badana populacja <i>Examined population</i>	70% (288)	27% (112)	3% (11)	411
Knury – <i>Boars</i>	64,2% (52)	34,6% (28)	1,2% (1)	81
Lochy – <i>Sows</i>	71,5% (236)	25,5% (84)	3% (10)	330

Z kolei, w grupie knurów potwierdzono aż o 9% wyższą częstość występowania świń heterozygotycznych i o 7% niższą homozygot CC w porównaniu do loszek. Zaobserwowana w grupie knurów przewaga świń posiadających jedną kopię niekorzystnego allelu wynika prawdopodobnie z faktu, że świni heterozygotyczne charakteryzują się większą ilością mięsa w tuszy i w związku z tym są wybierane do krzyżowania jako pokolenie rodzicielskie z cennymi cechami fenotypowymi. Z uwagi na fakt, że potomstwo uzyskiwane od jednego knura może być bardzo liczne, a w stadzie jest utrzymywany z reguły jeden knur – wykazany rozkład genotypów wskazuje na możliwość szybkiego rozprzestrzenienia się niekorzystnego allelu T w populacji.

Przeprowadzone badania potwierdziły obecność niekorzystnego allelu T genu *RYR1* w rasie puławskiej. Niepokojący jest wysoki odsetek osobników heterozygotycznych oraz obecność homozygot recesywnych podatnych na wystąpienie gorączki złośliwej. Uzyskane wyniki powinny zostać uwzględnione przy doborze zwierząt do krzyżowania i umożliwić eliminację z hodowli świń wrażliwych na stres (homozygot TT) oraz wpłynąć na ograniczenie heterozygotycznych nosicieli badanej mutacji.

Tego typu działania wpłyną na zmniejszenie ilości upadków zwierząt spowodowanych czynnikami stresującymi (transport, przepędzanie, wysoka temperatura itp.) oraz zwiększą efektywność produkcji.

#### Literatura

- Antosik K., Krzęcio E., Sieczkowska H., Zybert A., Koćwin-Podsiadła M., Kurył J. (2006). Związek polimorfizmu genu *H-FABP* z mięsnością i otluszczeniem tusz tuczników heterozygot względem genu *RYR1* z udziałem rasy Pietrain. Mat. III Międz. Konf.: Zastosowanie osiągnięć naukowych z zakresu genetyki, rozrodu, żywienia oraz jakości tusz i mięsa w nowoczesnej produkcji świń. Wyd. AT-R Bydgoszcz, 62.
- Babicz M., Kurył J., Walkiewicz A. (2003). Evaluation of the genetic profile of the Puławska breed. J. Appl. Genet., 44 (4): 497–508.
- Bogdzińska M. (2006). Wstępne badania nad wpływem genotypów *RYR1* i *ESR* oraz kariotypu na wybrane cechy rozrodcze loch. Mat. III Międz. Konf.: Zastosowanie osiągnięć naukowych z zakresu genetyki, rozrodu, żywienia oraz jakości tusz i mięsa w nowoczesnej produkcji świń. Wyd. AT-R Bydgoszcz, 67.3.
- Buczyński J.T., Panek A., Kempisty B., Skrzypczak E., Luciński P. (2006). Reproductive performance of Złotnicka White pigs as related to *RYR1* gene. Anim. Sci. Pap. Rep., 24 (1): 43–50.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato S., Leon S. de, Khanna V.K., Weiler J.E., o'Brien P.J., MacLennan D.H. (1991). Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. Science, 253: 448.
- Janik A., Pieszka M., Migdał W. (2006). Effect of *RYR1* genotype on carcass and meat quality in Polish Landrace pigs. Anim. Sci., Suppl. 1: 70–71.
- Kapelański W., Kurył J., Bocian M., Rak B. (1999). The effect of *RYR1* gene on meat quality traits in Polish Landrace, Pietrain and Złotnicki Spotted pigs. Adv. Agric. Sci., 6 (2): 39–44.
- Koćwin-Podsiadła M. (1994). Efekt genu HAL w zakresie produktywności świń. Mat. Konf. Nauk.: Świnie rasy Pietrain w Polsce; ss. 1–15.
- Koćwin-Podsiadła M., Zybert A., Krzęcio E. (2000). The influence of carcass weight of fatteners with different

- HAL* genotype on carcass leaness and selected traits. 46th ICoMST, Buenos Aires; pp. 92–93.
- Kurył J., Wróblewski P. (1992). The effect of halotane-sensitivity gene (*HALn*) in pigs on litter size, piglets live and rate of piglets survival to the age of 9–11 weeks. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 9: 47–52.
- Lunardi J., Monnier N. (2004). Genetic of diseases by abnormal functioning of the skeletal muscle-calcium releasing complex. *Rev. Neurol. (Paris)*, 160 (5 Pt 2): S70–77.
- Przybylski W., Koćwin-Podsiadła M., Kaczorek S., Krzęcio E., Kurył J. (1994). Effect of the *HAL<sup>n</sup>* gene in heterozygous pigs on the carcass traits, fresh meat quality and its technological yield. *Proc. 2nd Conf.: Influence of genetic and non-genetic traits on carcass and meat quality. Science*, pp. 176–183.
- Robinson R., Carpenter D., Shaw M.A., Halsall J., Hopkins P. (2006). Mutations in *RYR1* in malignant hyperthermia and central core disease. *Hum. Mutat.*, 27 (10): 977–989.
- Tilgen N., Zorzato F., Halliger-Keller B., Muntoni F., Sewry C., Palmucci L.M., Schneider C., Hauser E., Lehmann-Horn F., Müller C.R., Treves S. (2001). Identification of four novel mutations in the C-terminal membrane spanning domain of the ryanodine receptor 1: association with central core disease and alteration of calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet.*, 10 (25): 2879–2887.

## THE OCCURRENCE OF THE UNFAVORABLE ALLELE OF THE *RYR1* GENE IN THE POPULATION OF PUŁAWSKA BREED

### Summary

Conservative breeds are usually characterized by small number of individuals and thus the selection of animals to cross is very limited. *RYR1* gene coding for ryanodine receptor 1 which is as a calcium release channel in the sarcoplasmic reticulum. RYR1 protein plays a key role in calcium homeostasis in skeletal muscle and mutation in *RYR1* gene is associated with malignant hyperthermia susceptibility. The purpose of the study was to estimate the frequency of the occurrence of the unfavorable allele of the *RYR1* gene in the currently protected genetic resources of the puławska pig population. The analysis was performed on 411 pigs (330 sows and 81 boars). The *RYR1* genotypes were identified by PCR-RFLP method. The obtained results showed the highest frequency of CC genotype (70%). Heterozygous individuals accounted for 27% and 3% of pigs with TT genotype (recessive homozygotes) were identified. In the case of gender, the 9% higher number of heterozygous and 7% lower homozygote CC pigs were detected when compared to gilts group. The prevalence of boars with one copy of the unfavorable allele is probably because heterozygous pigs have more meat in carcasses and are therefore they have been chosen for crossbreeding as a parental race with valuable phenotypic characteristics. Given the fact that the offspring obtained from one boar may be very numerous showed distribution of genotypes indicates the possibility of rapidly spreading the unfavorable T allele in the population. The information obtained may be considered during selecting animals for crossing.

**Key words:** *RYR1*, malignant hyperthermia, Puławska breed, conservation breed



Świnie rasy puławskiej  
*Puławska breed*  
(fot. M. Szyndler-Nędza)