



**СЕЛСКОСТОПАНСКА АКАДЕМИЯ**  
**ИНСТИТУТ ПО ЖИВОТНОВЪДНИ НАУКИ – КОСТИНБРОД**

---

**Радостина Петрова Стойкова-Григорова**

**ГЕНЕТИЧНО РАЗНООБРАЗИЕ И НУКЛЕОТИДЕН**  
**ПОЛИМОРФИЗЪМ НА ГЕНИ ЗА**  
**МЕСНА ПРОДУКТИВНОСТ ПРИ СВИНЕ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

**на дисертация за придобиване на образователна и научна степен „Доктор”**

**Докторска програма: Развъждане на селскостопанските животни,**  
**биология и биотехника на размножаването**  
**Професионално направление: 6.3. Животновъдство**

Научни ръководители:  
проф. дн Пенка Маринова  
проф. дн Иван Атанасов

**Костинброд 2020**

Дисертационният труд е написан на 175 страници и съдържа 34 таблици и 28 фигури. В дисертацията е използвана литература от 245 източника, от които 44 на кирилица и 201 на латиница.

Номерацията на таблиците и фигурите не съответства на посочената в дисертационния труд.

Експерименталната дейност е извършена в лабораторията на Агробио институт, София към група “Молекулярна генетика”

*Изказвам най-сърдечна благодарност на научните си ръководители проф. дн Пенка Маринова и проф. дн Иван Атанасов, както и на научния колектив от ИЖН-Костинброд и АБИ-София за подкрепата, помощта и проявеното разбиране при разработването на настоящия дисертационен труд.*

*Изказвам благодарност и на проф. дн Апостол Апостолов и колегите от ЗИ-Шумен за съдействието при подбора на животните включени в изследването напътствията при обработката на данните.*

Дисертационният труд е обсъден и е даден ход на процедура по защитата му на разширено заседание на отдел „Генетика, развъждане, селекция, репродукция и биотехнологии на селскостопанските животни” при ИЖН – Костинброд на 02.12.2019 г., свикано със заповед на директора на института № IV-163/20.11.2019 г.

Материалите по защитата (дисертация, автореферат, рецензии и становища на журито) са на разположение в Институт по животновъдни науки-Костинброд и са публикувани на сайта на института ([www.ias.bg](http://www.ias.bg))

Защитата на дисертацията ще се състои на ..... 20..... г. от ..... часа в Заседателната зала на ИЖН – Костинброд съгласно заповед № ..... на Председателя на Селскостопанска академия.

## УВОД

Годишното производство на свинско месо в света за 2014 г. е 115.5 милиона тона, а консумацията му е приблизително 36% от консумираните червени меса (ФАО, 2011). През годините научните изследвания са насочени към подобряване на редица признаци от икономически интерес при производството на този вид месо. Създадени са високопродуктивни породи свине и в същото време са изчезнали и драматично намалели, с риск от изчезване локални породи, с което се стеснява генетичното разнообразие при този вид животни. Съществуват и редица трудности при поддържането на тези популации, когато техния брой е сравнително малък. За тяхното консервиране се провеждат проучвания на фенотипните и генотипните им характеристики, като последните имат все по-значителен принос за това.

В доклад на ФАО (2019), към март 2018г., от 8803 породи регистрирани в организацията 24 % са застрашени от изчезване, 7 % са изчезнали, 59 % са с неизвестен рисков статус и само 10 % не са изложени на риск. В редица държави още през 90-те години на миналия век стартират многобройни изследвания за характеризирание на генетичната структура и оценка на вътре- и между- породното разнообразие в редица популации селскостопански животни, като за целта се препоръчва използването на микросателитни маркери.

У нас за заплахи за националните генетични ресурси в животновъдството са посочени две породи свине – Източнобалканска и Дунавска бяла (Николов, 2013). При първата се извършва поддържаща селекция, а при втората се прилага чистопородно, линейно развъждане и в определени етапи селекционни дейности по усъвършенстването ѝ.

Стандартните селекционни процедури включват групиране на животни според адитивния генетичен компонент на признаците, използвайки различни модели в зависимост от варирането, херитабилитета, генерационния интервал, точност на оценката на развъдната стойност и интензивността на селекция. Генетичният прогрес, получен чрез тази „класическа“ развъдна техника е значителен, но той може да има по-голям и бърз ефект с използването на нови молекулярно базирани технологии за подобряване на месната продуктивност при свинете. ДНК маркерите (региони в хромозомите, показващи полиморфизми в нуклеотидните последователности) с успех се ползват в страните с добре развито свиневодство за ускорена „асистирана“ селекция чрез откриване на гени за количествени признаци (QTL – quantitative trait loci) като миогенеза, интензитет на растеж, качество на кланичния труп и на месото и др.

## ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Целта на проучването е характеристика на генетичното разнообразие при свине от породите Източнобалканска и Дунавска бяла чрез микросателитни маркери и генотипиране по локусите на три гена за месна продуктивност – рианодин рецепторен (RYR1), миостатинов (MSTN) и калпастатинов (CAST) ген.

За изпълнението на целта са поставени следните задачи:

1. Характеристика на генетичното разнообразие и генетичната структура на две стада от Източнобалканска порода, отглеждани в два различни агроекологични района.
2. Определяне на генетичната дистанция и сходство между изследваните стада от Източнобалканската порода.
3. Изследване на нивото на генетично разнообразие в стадо от Дунавска Бяла порода.

4. Установяване на алелното състояние на RYR1 ген в изследваните две породи свине и генотипиране на животни от Дунавска бяла порода по MSTN и CAST гени.
5. Определяне величината на угоителните способности и кланични качества (in vivo) оценка на ремонтни прасета от стадото Дунавска бяла породата.
6. Установяване на физикохимичните и технологичните характеристики на m. Longissimus Dorsi и m. Semimembranosus при прасета от Източнобалканската и Дунавска бяла порода.
7. Определяне ефективността на влияние на полиморфизма в локусите на гените за местна продуктивност върху някои угоителни и кланични качества на свинете.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ**

### **Експериментални животни**

Проучването е проведено с общо 95 животни от породите: *Източнобалканска порода* - 34 животни от две стада: стадо 1 (n=20) и стадо 2 (n=14) и *Дунавска бяла порода* - 63 тествани през 2014г. мъжки и женски ремонтни прасета. От тях са генотипирани 53 прасета.

Биологичните проби (космена луковица) за ДНК анализ са събрани от гърба и плешката на животните.

Изолирането на геномна ДНК е извършено с помощта на комерсиален кит за ръчно изолиране Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience).

### **Микросателитният анализ включва стъпките:**

1. Изолиране на геномна ДНК
2. Полимеразно верижна реакция (PCR анализ)
3. Фрагментен анализ

### **Анализ на алелното състояние на рианодин рецепторния (RYR1), миостатиновия (MSTN) и калпастатиновия (CAST) ген**

Генотипирането е извършено чрез метода анализ на Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти (PCR-RFLP анализ) и включва стъпките:

1. Полимеразно верижна реакция (PCR анализ)
2. RFLP анализ за определяне на алелите и генотипове, извършен чрез използването на съответните рестрикционни ендонуклеази:
  - HhaI за рианодин рецепторния (RYR1) ген;
  - TaqI, DraI и MnlI за миостатиновия (MSTN) ген;
  - RsaI, HinfI и MspI за калпастатиновия (CAST) ген.

Идентификацията на получените фрагменти след PCR амплификацията и Рестрикционния анализ е извършена чрез електрофореза агарозен гел, наситен с флуоресцентно багрило RedGel. По броя и дължината на наблюдаваните фрагменти са определени съответните генотипове на животните. За точното определяне на дължината на фрагментите в базови двойки (bp) е използвана контрола DNA HyperLadder 100bp (BIOLINE).

### **Величина на in vivo контролирани селекционни признаци за месна продуктивност**

В изследването са включени 68 ремонтни прасета (в т. ч. 11 нерезчета) от Дунавската бяла порода. Контролирани са следните признаци: живо тегло – при раждане, 21-ви ден и при тестване; среден дневен прираст за цял период и след 21-ви ден; възраст – действителна и приравнена.

Прижизнената оценка на кланичните показатели е направена с апарат Piglog 105 и включва следните измерения: дебелина на сланина – на 7 cm (L1) и 10 cm (L2) от медиалната линия, съответно между 3-4-ти лумбален прешлен и между 3-4-то ребро (от последно ребро - краниално) и дебелина на m. Longissimus dorsi (m. LD) и прогнозен процент на постно месо.

### **Физикохимичен анализ на m. Longissimus dorsi и m. Semimembranosus**

Проби от двата мускула са взети на 14 животни от Дунавска бяла порода и на 16 животни от Източнобалканската порода от m. LD, след съхранение на кланичните трупове 24 h post mortem (p. m.) при 4° C. Определени са следните показатели: рН 45 min p.m. (рН 1) и 24 h p. m. (рН 2) с рН-метър с комбиниран електрод, протеин (Келдал), интрамускуларни мазнини (Сокслет), миоглобин (Hornsey, 1956), водосвързваща способност ВСС (Grau and Hamm, 1952), цвят (R/525nm, спектрофотометрично), влага и пепел (АОАС, 1990). Загубата на ексудат е определена след 24 часа съхранение на пробите при +4°C, изразена е в процент от теглото на пробата. Загуба при варене – пробата се вари в 5% разтвор на NaCl в продължение на 40 min при 100°C и е изразена в процент от първоначалното тегло на пробата. Влажността е определена в секунди до пълното овлажняване на 1 cm<sup>2</sup> филтърна хартия.

След измерването на рН 45 min p. m. на пробите от Източнобалканската порода са формирани две групи – 11 животни, които са с рН > 6.00 и 5 животни с рН ≤ 6.00 (PSE месо).

Клането на прасетата е извършено в регламентирани кланици, при спазване на ветеринарно медицинските изисквания.

### **Статистическа обработка на получените резултати**

Получените данни от микросателитните анализи са обработени със софтуерната програма GENALex 6.501. За установяване нивото на генетично вариране чрез SSR локусите са изчислени следните параметри: общ и ефективен брой алели, очаквана (H<sub>e</sub>) и наблюдавана (H<sub>o</sub>) хетерозиготност, информационен коефициент на Shannon (I), Fis, Fit и Fst – коефициентите.

### **F статистика**

Един от най-широко прилаганите методи за анализ на генетичните различия на популационно и/или междупопулационно ниво е F статистиката. Показателите, даващи възможност да бъдат направени тези анализи са т. нар. фиксирани индекси (F индекси): Fis – вътрепопулационен коефициент на инбридинг, Fit - междупопулационен коефициент на инбридинг, Fst - коефициент на генетична диференциация и Nm - поток на гени.

Генетичната дистанция между двете стада е определена с програмата PowerMarker V. 3.25 и въз основа на получената матрица е построена съответната дендрограма чрез програмата R/v.3.2.3 (<http://www.R-project.org>).

Статистическата обработка на данните, получени от ДНК – анализите от генотипирането включва изчисляване честотите на алелите и съответните генотипове на животните по RYR1, MSNT и CAST гена чрез програмата GENALex,

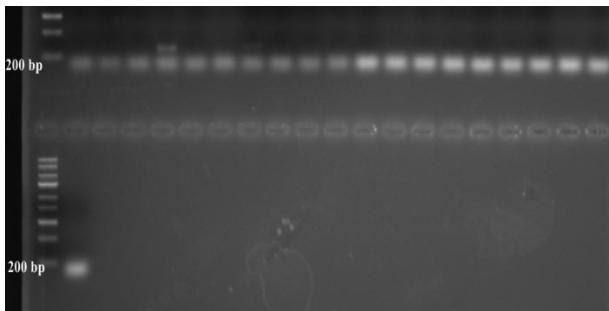
както и процентното съотношение на установените алели и генотипове към общия брой изследвани животни.

Данните за величината на изследваните фенотипни признаци са обработени по метода на вариационната статистика. Достоверността на разликите между групите е определена по t-тест по Student. Ефекта на фактора линейна принадлежност върху варирането на изследваните признаци и статистическите показатели е установен чрез еднофакторен дисперсионен анализ, като достоверността на факторите е определена по стойностите на F – критерия на Fisher.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

### Характеристика на генетичното разнообразие чрез микросателитни маркери на Дунавска бяла и Източнобалканска породи свине

Нивото на генетичното разнообразие в стадата от двете български, застрашени от изчезване породи свине Източнобалканска (автохтонна) и Дунавска бяла (културна) е проучено чрез микросателитни маркери, локализирани на различни хромозоми. Оптималната концентрация на ДНК, за амплифициране на локусите на микросателитните маркери е в границата на 10 – 20 ng/μl. При всички анализирани животни се получиха амплифицирани PCR продукти (фиг. 1).



Фигура 1. PCR продуктите след амплификацията на микросателитните маркери, визуализирани на 1.8 % агарозен гел.

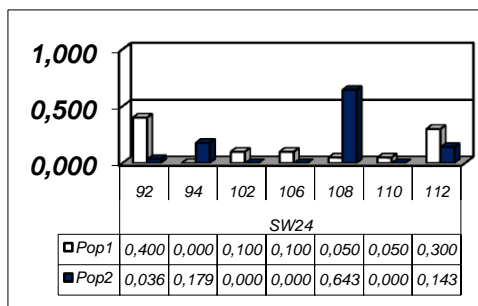
### *Източнобалканска порода свине*

#### Установени алели и алелна честота по съответните локуси при двете стада от Източнобалканска порода свине

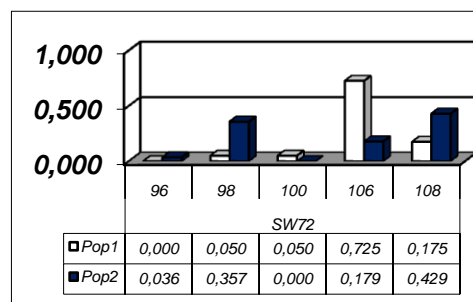
Честотите на установените алели е важен показател, който дава възможност да се оцени тяхната информативност и да се определи нивото на генетичното вариране в проучваните популации. Установените честоти по проучваните локуси е представено на Фигури 2 до 9.

От фигура 2 се вижда, че в локус SW24 областта на алелното вариране е от 92 до 112, като в стадо 1 с най-висока честота е представен алел 92, а във второто стадо най-висока е честотата на алел 108. Алелите 102, 106 и 110 са характерни за стадо 1, докато алел 94 за стадо 2.

Фигура 3 отразява резултатите за маркер SW72. Тук са установени 5 алела, с област на вариране от 96 до 108. Алел 100 се среща само в първото стадо, а алел 96 само във второто. С най-висока честота са алелите 106 в стадо1 и 108 в стадо 2.



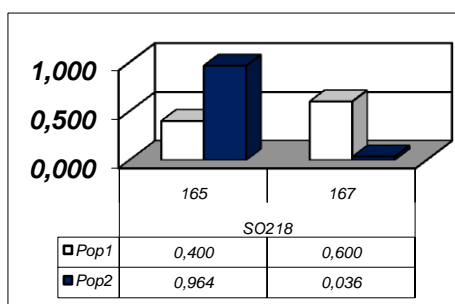
Фигура 2. Алелна честота на алелите в локуса на маркер SW24 в двете стада от Източнобалканска порода свине



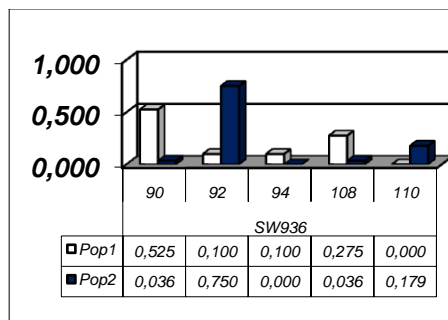
Фигура 3. Алелна честота на алелите в локуса на маркер SW72 в двете стада от Източнобалканска порода свине

На фигура 4 е представено разпределението на честотите при маркер SO218, който се характеризира с най-малък брой алели. Алел 165 е с много висока честота в стадо 2, докато в стадо 1 тя е значително по-ниска. Подобно разпределение се наблюдава и при втория алел.

В локуса на маркер SW936 алелите са 5 (фиг. 5), като най-често срещаните са 90 и 92 съответно в стадо 1 и 2. И в този локус са установени специфични за отделните стада алели - 94 (стадо 1) и 110 (стадо 2).



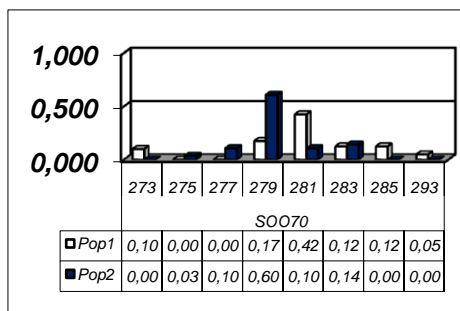
Фигура 4. Алелна честота на алелите в локуса на маркер SO218 в двете стада от Източнобалканска порода свине



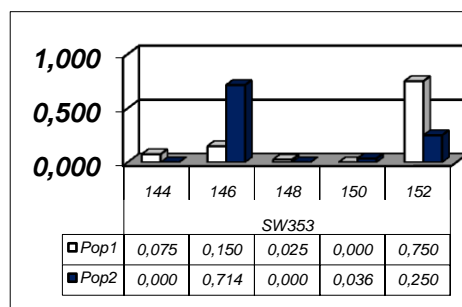
Фигура 5. Алелна честота на алелите в локуса на маркер SW936 в двете стада от Източнобалканска порода свине

Микросателитният маркер SOO70, представен на фигура 6 показва, по-висок полиморфизъм – наблюдават се 8 алела, като 3 от тях се срещат само в първото стадо (273, 285 и 293), а 275 и 277 са представени в стадо 2. С най-висока честота са алел 281 (стадо 1) и 279 (стадо 2).

Следващият включен в проучването маркер SW353 е представен от 5 алела, като алелите 144 и 148 се установяват в първото стадо, а алел 150 е намерен в стадо 2. С най-висока честота са алелите 152 и 146, съответно за стадо 1 и 2 (фиг. 7).



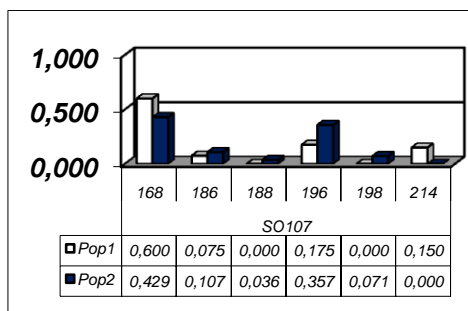
Фигура 6. Алелна честота на алелите в локуса на маркер SOO70 в двете стада от Източнобалканска порода свине



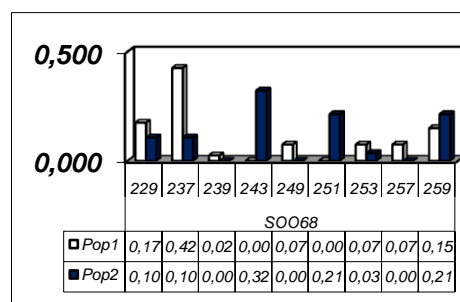
Фигура 7. Алелна честота на алелите в локуса на маркер SW353 в двете стада от Източнобалканска порода свине

От фигура 8 се вижда, че в локус SO107 областта на алелното вариране е от 168 до 214, като и в двете стада с най-висока честота е представен алел 168. Алел 214 е характерен за стадо 1, докато алелите 188 и 198 за стадо 2.

На следващата фигура 9 е отразен един от микросателитите с най-висок полиморфизъм - SOO68. В неговия локус са установени 9 алела, като 237 и 243 са с най-висока честота, съответно за първото и второто стадо. Три са алелите (239, 249 и 257) характерни за стадо 1 и два (243 и 251) за стадо 2.



Фигура 8. Алелна честота на алелите в локуса на маркер SO107 в двете стада от Източнобалканска порода свине



Фигура 9. Алелна честота на алелите в локуса на маркер SOO68 в двете стада от Източнобалканска порода свине

### Общ и ефективен брой алели, информационен коефициент на Shannon (I) и индекс на полиморфизъм (PIC) в локусите на микросателитните маркери в двете стада от Източнобалканската порода

Общият брой наблюдавани алели в стадо 1 е 37, а в стадо 2 – 33, като общо за двете стада по 8-те маркера този показател варира от 2 до 7 (табл. 1). Най-полиморфен е локус SOO68, при който в стадо 1 са установени 7, а във второто - 6 алела. Най-малък е броят на алелите в локуса на маркер SO 218, вероятна причина за този факта е, че локуса на този маркер е разположен в X хромозомата.

Ефективният брой е другия важен показател за нивото на вътрепородно вариране и е в обратно пропорционална зависимост с нивото на хомозиготност по съответния локус (Hart and Clark, 1989). Сравнявайки стойностите на общия и ефективния брой алели се вижда, че вторите са значително по-ниски (табл. 1).

На същата таблица е представен и друг важен показател – индекса на Shannon (I). Sherwin et al. (2006) оценяват възможностите му за характеризиране на вътрепопулационното генетично разнообразие и определянето на нивото на информативност на всеки маркер. В това изследване стойностите му варират от



0.673 до 1.628, средна стойност 1.153, за стадо 1 и от 0.154 до 1.623, средна стойност 0.981, съответно за второто стадо.

Нивото на информативност на всеки микросателитен маркер може да бъде оценено и чрез индекса на полиморфизъм (PIC). На молекулярно ниво полиморфизмът се определя от гентично вариране в структурата на ДНК молекулата. Стойността на PIC ще бъде почти нула, ако няма алелно разнообразие или да достигне максимум 1, ако варирането е изключително високо, което се наблюдава рядко. Това позволява, чрез PIC индекса прецизно да се оцени гентично разнообразието в популацията на ниво ДНК. И в двете стада най-ниски стойности са установени за маркер SO 218, съответно 0.365 за стадо 1 и 0.067 за стадо 2 (табл. 1). Най-висока е стойността за маркер SOO 68 (0.720 и 0.748), което потвърждава високата информативност на този маркер. Средните стойности на PIC са 0.546 и 0.473, съответно за първото и второто стадо. За сходни стойности на индекса на полиморфизъм съобщават Thuу et al. (2006); Vrtková, (2015) и Zaman et al. (2014).

Анализът на резултатите показва, че избраните микросателитни маркери са полиморфни и могат да бъдат използвани при анализа на генетичното разнообразие при автохтонни породи свине.

Таблица 1. Общ и ефективен брой алели, информационен коефициент на Shannon и индекс на полиморфизъм в локусите на микросателитните маркери в двете стада от Източнобалканската порода

стадо	Стадо 1 (n=20)				Стадо 2 (n=14)			
	Na	Ne	I	PIC	Na	Ne	I	PIC
<b>SW24</b>	6	3.636	1.488	0.683	4	2.142	0.989	0.487
<b>SO218</b>	2	1.923	0.673	0.365	2	1.074	0.154	0.067
<b>SW72</b>	4	1.782	0.838	0.401	4	2.904	1.157	0.588
<b>SW936</b>	4	2.694	1.154	0.573	4	1.675	0.761	0.364
<b>SOO70</b>	6	3.922	1.569	0.714	5	2.420	1.179	0.553
<b>SW353</b>	4	1.691	0.787	0.376	3	1.742	0.706	0.361
<b>SO107</b>	4	2.388	1.090	0.537	5	3.039	1.278	0.613
<b>SOO68</b>	7	3.980	1.628	0.720	6	4.558	1.623	0.748
<b>Средно</b>	4.625	2.752	1.153	0.546	4.125	2.444	0.981	0.473
<b>SE</b>		0.342	0.132			0.380	0.157	
<b>Общ брой</b>	37				33			

Na - Общ брой алели

Ne - Ефективен брой алели

I - Информационен коефициент на Shannon

PIC - Индекс на полиморфизъм

#### **Очаквана (Ne) и наблюдавана (No) хетерозиготност, F – индекс и $\chi^2$ критерия в двете стада от Източнобалканската порода**

Получените стойности за наблюдаваната (No) и очаквана (Ne) хетерозиготност, F-индекса и  $\chi^2$  критерия са представени в таблица 2.

Средните стойности за No са съответно 0.600 в стадо 1 и 0.580 в стадо 2. За Ne са установени стойности 0.595 и 0.516, респективно за стадо 1 и 2.

Хетерозиготността отразява генетичното разнообразие на дадена популация и по този начин до известна степен, също е показателна и за състоянието на инбридинга в проучваната извадка (Серіса et al., 1995).

По-високите стойности на очакваната ( $H_e$ ) хетерозиготност в сравнение с тези на наблюдаваната ( $H_o$ ) са показател за хетерозиготен дефицит (Peakall and Smouse, 2012). И в двете стада хетерозиготен дефицит се наблюдава при три от изследваните маркери, за стадо 1 маркерите са SW24, SO218 и SW68 и съответно за стадо 2 - SW72, SOO70 и SW353. Тези резултати се потвърждават и от изчисленията за F-индекса, който позволява да се оценят родственията отношения между индивидите в една група. Стойностите му варират от -1 до +1, като положителните стойности са показател за хетерозиготен дефицит по съответният локус. В това изследване стойностите на индекса за стадо 1 са в границите от -0.101 за маркер SW353 до 0.583 за маркер SO218. Средната стойност е -0.012. За второто изследвано стадо стойностите са от -0.037 за SO218 до 0.162 за SW353, със средна стойност -0.102. Прави впечатление, че и при двете стада са установени отрицателни средни стойности на F-индекса, което показва, че при направеното проучване с избрания панел от микросателитни маркери в стадата от автохтонната Източнобалканска порода не се наблюдава хетерозиготен дефицит. Този факт, средните стойности на  $H_e$  и на  $I$  (близки до единица) са определящи и за средното ниво на генетично разнообразие по избраните микросателитни маркери и при двете проучени стада.

Таблица 2. Очаквана (He) и наблюдавана (Ho) хетерозиготност, F – индекс и  $\chi^2$  критерия в двете стада от Източнобалканската порода

Стадо	Стадо 1 (n = 20)					Стадо 2 (n = 14)				
	Ho	He	F-индекс	$\chi^2$	P	Ho	He	F-индекс	$\chi^2$	P
SW24	0.650	0.725	0.103	20.104	0.168	0.643	0.533	-0.206	8.599	0.197
SO218	0.200	0.480	0.583	6.806	0.009**	0.071	0.069	-0.037	0.019	0.890
SW72	0.550	0.439	-0.254	2.878	0.824	0.643	0.656	0.019	5.180	0.521
SW936	0.750	0.629	-0.193	4.102	0.663	0.500	0.403	-0.241	1.556	0.956
SOO70	0.850	0.745	-0.141	9.463	0.852	0.500	0.587	0.148	16.907	0.076
SW353	0.450	0.409	-0.101	1.644	0.949	0.357	0.426	0.162	3.303	0.347
SO107	0.750	0.581	-0.290	4.940	0.551	0.929	0.671	-0.384	7.233	0.703
SOO68	0.600	0.749	0.199	32.991	0.046*	1.000	0.781	-0.281	21.000	0.137
Средно	0.600	0.595	-0.012			0.580	0.516	-0.102		
SE	0.073	0.049	0.104			0.106	0.078	0.072		

достоверност - \* P<0.05, \*\* P<0.01

С цел установяване на вероятното отклонение на изследваните стада от равновесието на Харди-Вайнберг (HWE), са изчислени стойностите на  $\chi^2$  критерия, при съответните степени на вероятност (P). Анализът на резултатите показва, че изследваните стада са в състояние на HWE-равновесие, с изключение на отклонение при микросателитите SO218, (\*\* P<0.01) и SOO68 (\* P<0.05) в стадо 1. Сравнението на стойности с тези на F-индекса показва, че по двата маркера стадото е в хетерозиготен дефицит, което е в съответствие с изводите от проучването на Dies-Tascon et al. (2000), че причината да не се констатира равновесие по закона на Харди – Вайнберг е именно хетерозиготния дефицит и инбридинга по даден локус.

## **F статистика**

Един от най-широко прилаганите методи за анализ на генетичните различия на популационно и/или междупопулационно ниво е F статистиката. Показателите, даващи възможност да бъдат направени тези анализи са т. нар. фиксирани индекси (F индекси): Fis – вътрепопулационен коефициент на инбридинг, Fit - междупопулационен коефициент на инбридинг, Fst - коефициент на генетична диференциация и Nm - поток на гени (Nei, 1977; Nei and Chesser, 1983; Hedrick, 2011; Meirmans and Hedrick, 2011).

В таблица 3 са представени изчислените стойности на F индексите.

Стойностите на Fis варират от -1 до +1, като положителните са показател за хетерозиготен дефицит по съответният локус. Този коефициент е показател за степента на родственоост между индивидите в дадена популация, което е една от причините за отклонението от закона на Харди-Вайнберг. Обобщените резултати показват, че средната стойност на Fis за всички локуси е отрицателна, което съпоставено и с ниската средната стойност на Fit (0.148) показва, че в тези две стада няма хетерозиготен дефицит. Анализът на табличните данни при всеки от локусите показва, че положителни стойности на Fis и по-високи на Fit има само при два маркера SO 218 и SW 353.

Таблица 3. F статистика, стойности на коефициентите на инбридинг

Локус	Fis	Fit	Fst	Nm
SW24	-0.028	0.160	0.183	1.117
SO218	0.505	0.687	0.367	0.431
SW72	-0.090	0.100	0.174	1.187
SW936	-0.211	0.115	0.269	0.678
SOO70	-0.014	0.098	0.110	2.024
SW353	0.033	0.281	0.256	0.725
SO107	-0.341	-0.293	0.036	6.770
SOO68	-0.046	0.039	0.082	2.807
Средно	-0.024	0.148	0.185	1.967
SE	0.087	0.096	0.039	0.740

Fis – вътрепопулационен коефициент на инбридинг

Fit - междупопулационен коефициент на инбридинг

Fst - коефициент на генетична диференциация

Nm – поток на гени

Стойностите на Fst, като показател, който дава възможност да се определи нивото на генетична диференциация между популациите варират от 0 до 1. Средната стойност в проценти на коефициентът на генетична диференциация показва, че 18.5 % от общото ниво на генетично разнообразие е резултат от

различия между изследваните стада свине в съответните микросателитни маркери. Останалите 81.5 % е т. нар. вътрепородно генетично разнообразие или това са процентите, които се обуславят от различията между индивидите в изследваните стада. Средната стойности на  $F_{st}$  по всички локуси показва, че двете стада от автохтонната порода са достатъчно разграничени т. е. има средно нивото на генетична диференциация. В локусите на маркерите SO218, SW936 и SW353 се наблюдава най-високо ниво на генетична диференциация между стадата, съответно 0.367, 0.269 и 0.256. Установената средна стойност за двете стада е 0.185, което е показателно за ниско ниво на хетерозиготен дефицит. Това се потвърждава и при сравнението на средните стойности на  $F_{is}$  и  $F_{st}$  ( $-0.024 < 0.185$ ).

В анализа на получените данни е включена и стойността на показателя Поток на гени ( $N_m$ ), отразяващ процеса на преминаване на гени, характерни за една популация в генофонда на друга чрез миграция или кръстосване (табл. 3). Високите стойности на  $N_m$  показват увеличено генетично сходство. Този процес може съществено да повлияе нивото на генетична диференциация между популациите, особено на такива, които са разпространени в близки географски региони. В това изследване за три от маркерите са установени стойности под единица (SO218, SW936, SW353). Високи стойности на  $N_m$  са установени само при SO107, което подвърждава средното ниво на генетична диференциация отразено и чрез  $F_{st}$  индекса. Средната стойност на  $N_m$  (1.967) е показателна за факта, че процесът на съешаване и/или миграция между двете стада е ограничен.

#### Анализ на молекулната варианса (AMOVA)

AMOVA-анализът е направен с цел да се установи разпределението на общата генетична варианса между двете стада и между индивидите (Meirmans, 2006). Резултатите показват, че 27% е генетичното вариране между стадата, докато 73 % е варирането между индивидите в рамките на двете стадата (фиг. 10).

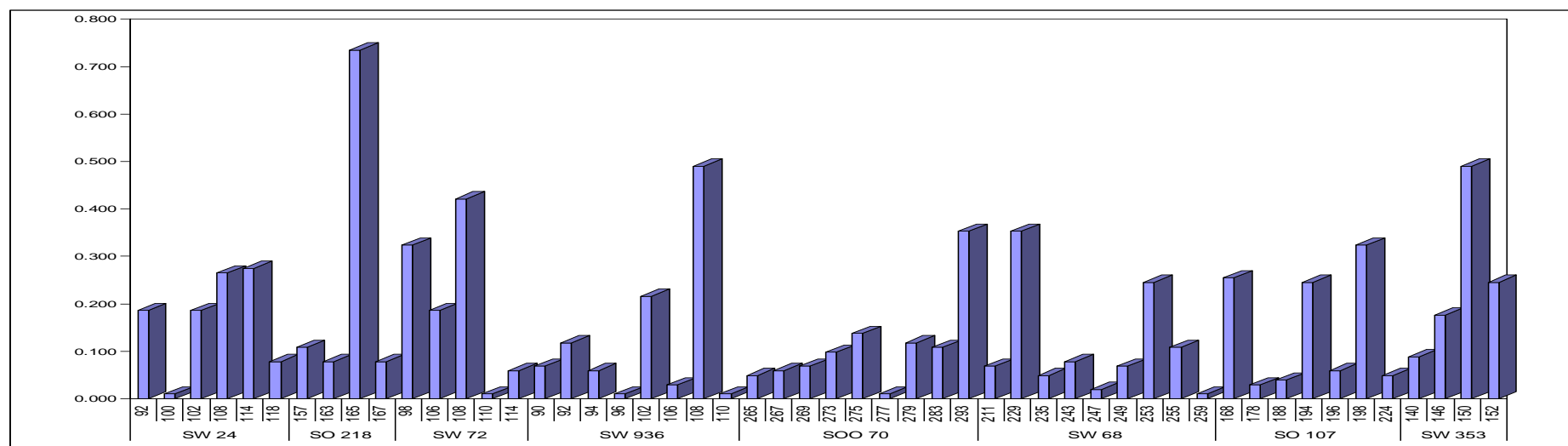


Фигура 10. Анализ на молекулната варианса (AMOVA)

#### UPGMA дендрограма

За да се определи родствената връзка между двете стада е приложена стандартната генетична дистанция  $D_{st}$  (Nei, 1978). Изборът е направен, основавайки се на факта, че този метод взема под внимание действието на еволюционните сили, като мутации и генетичен дрейф.





SW24		SO218		SW72		SW936		SOO70		SOO68		SO107		SW353	
але л	често та	але л	често та	алел	честота	але л	честота	алел	честота	алел	честота	алел	честота	алел	честота
92	0,186	157	0,108	98	0,324	90	0,069	265	0,049	211	0,069	168	0,255	140	0,088
100	0,010	163	0,078	106	0,186	92	0,118	267	0,059	229	0,353	178	0,029	146	0,176
102	0,186	165	0,735	108	0,422	94	0,059	269	0,069	235	0,049	188	0,039	150	0,490
108	0,265	167	0,078	110	0,010	96	0,010	273	0,098	243	0,078	194	0,245	152	0,245
114	0,275			114	0,059	102	0,216	275	0,137	247	0,020	196	0,059		
118	0,078					106	0,029	277	0,010	249	0,069	198	0,324		
						108	0,490	279	0,118	253	0,245	224	0,049		
						110	0,010	283	0,108	255	0,108				
								293	0,353	259	0,010				

Фигура 12. Алелни честоти в локусите на 8<sup>-те</sup> микросателитни маркера в стадото Денавска бяла порода

**Общ и ефективен брой алели, информационен коефициент на Shannon (I) и индекс на полиморфизъм (PIC) в локусите на микросателитните маркери в стадото от Дунавска бяла порода**

Получените стойности за общия и ефективен брой алели, информационния коефициент на Shannon (I) и индекса на полиморфизъм (PIC), са представени в таблица 4.

Общият брой установени алели за 8-те включени в изследването маркера е 58, със среден брой алели на локус – 6. Установен е полиморфизъм във всички изследвани локуси и е определена областта на алелно вариране. Най-полиморфни са локусите SOO70 и SW68, в които са идентифицирани по 9 алела. Висока полиморфност е установена и за маркерите SW936 и SO107, съответно с 8 и 7 алела. Значително вариране се установява и при броя на ефективните алели от 1.771 за маркер SO218 до 4.657 и 5.287 за най-полиморфните локуси SW68 и SOO70. Средната стойност за броя на ефективните алели за популацията като цяло е 3.718.

Таблица 4. Общ и ефективен брой алели, информационен коефициент на Shannon и полиморфен индекс в стадото Дунавска бяла порода

Локус	Na	Ne	I	PIC
SW24	6	4.523	1.578	0.743
SO218	4	1.771	0.866	0.409
SW72	5	3.119	1.254	0.620
SW936	8	3.237	1.483	0.654
SOO70	9	5.287	1.903	0.791
SW68	9	4.657	1.790	0.759
SO107	7	4.202	1.603	0.724
SW353	4	2.947	1.214	0.608
Средно	6	3.718	1.461	0.664
SE		0.405	0.119	
Общ брой	58			

Na - Общ брой алели

Ne - Ефективен брой алели

I - Информационен коефициент на Shannon

PIC - Индекс на полиморфизъм

Средните стойности на коефициента на Shannon (I) - 1.461 и индекса на полиморфизъм (PIC) - 0.664 в това стадо са по-високи от тези при автохтонната порода. Тези резултати показват, че генетичното вариране по избрания панел микросателитни маркери в извадката от Дунавска бяла порода е по-голямо, което води и до по-високо ниво на информативност за всеки от маркерите.

**Очаквана (He) и наблюдавана (Ho) хетерозиготност, F – индекс и  $\chi^2$  критерия в проучваното стадо**

Стойностите за очакваната (He) и наблюдавана (Ho) хетерозиготност, F–индекса и  $\chi^2$  критерия, са представени в таблица 5.

Нивото на Ho варира от 0.353 за маркер SO218 до 0.902 за маркер SO107, средна стойност – 0.760.



Нивото на  $H_e$  варира от 0.435 за маркер SO218 до 0.811 за маркер SOO70, средна стойност - 0.700. Анализата на данните показва, че с изключение на SO218, при всички останали маркери стойностите на този показател са над 0.5. По-високият общ брой на установени алели по отделните локуси дава отражение върху нивото на генетичното разнообразие, което се обозначава и като очакваната ( $H_e$ ) хетерозиготност.

Сравнявайки стойностите на двата показателя прави впечатление, че по-високи стойности на  $H_e$  се наблюдават само при един от изследваните маркери - SO218, което дава възможност да бъде направено заключение, че хетерозиготен дефицит е установен само в локуса на този маркер.

Този факт се потвърждава и от стойностите на  $F$  – индекса. Положителна стойности на  $F$  (0.189) са установени само за SO218. Отрицателната средната стойност - 0.072 дава основание да се направи заключение, че в изследваното стадо хетерозиготен дефицит не се наблюдава.

Анализата на данните отразяващи равновесието по закона на Харди – Вайнберг показва, че в стадото не се установява  $HWE$ -отклонение в локусите на избраните маркери (табл. 5).

Таблица 5. Очаквана ( $H_e$ ) и наблюдавана ( $H_o$ ) хетерозиготност,  $F$  – индекс и  $\chi^2$  критерии в стадото Дунавска бяла порода

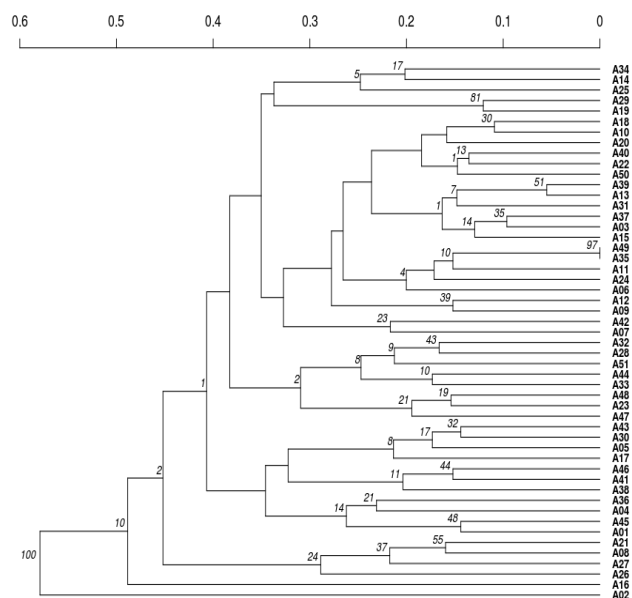
Локус	$H_o$	$H_e$	$F$ -индекс	$\chi^2$	$P$
<b>SW24</b>	0.843	0.779	-0.082	14.461	0.491
<b>SO218</b>	0.353	0.435	0.189	8.771	0.187
<b>SW72</b>	0.745	0.679	-0.097	6.416	0.779
<b>SW936</b>	0.706	0.691	-0.023	27.746	0.478
<b>SOO70</b>	0.863	0.811	-0.064	31.991	0.660
<b>SW68</b>	0.863	0.785	-0.099	25.376	0.907
<b>SO107</b>	0.902	0.762	-0.184	16.120	0.763
<b>SW353</b>	0.804	0.661	-0.217	11.804	0.066
<b>Средно</b>	0.760	0.700	-0.072		
<b>SE</b>	0.063	0.043	0.043		

достоверност –  $P$

### UPGMA дендрограма

За да се определи родствена връзка между индивидите в стадото е приложена стандартната генетична дистанция  $D_{st}$  (Nei 1978). На база стойността на  $D_{st}$  е конструирано филогенетично дърво.

Анализът на дендрограмата показва, че тя не се състои от обособени клъстери, което е показателно за високото ниво на консолидиране в чистопородното стадо от Дунавската бяла порода (фиг. 13).



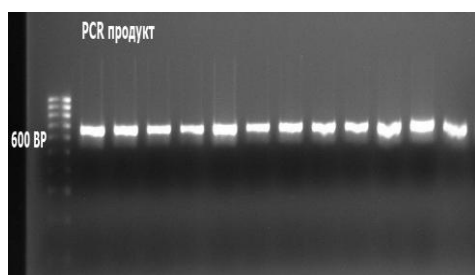
Фигура 13. UPGMA дендрограма на изследваното стадо построена на база генетична дистанция Dst (Nei 1978)

### Локуси за количествени признаци (QTL)

### Генотипиране по рианодин рецепторният ген (RYR1 / HAL)

#### *Източнoбалканската порода*

Получените резултати след проведената Полимеразноверижна реакция (PCR) са представени на фигура 14. При всички анализирани животни се получи амплифицирани PCR продукти на RYR1 ген. В това изследване е избрана праймерна двойка, която да амплифицира фрагменти с дължини от 660 bp, които се визуализират най-добре на агарозен гел.

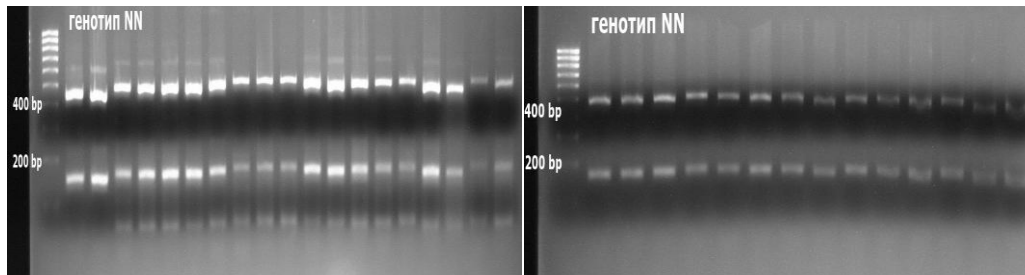


Фигура 14. PCR продуктите след амплификацията на RYR1 ген визуализирани на 2 % агарозен гел

RYR1 гена продуцира два алела - доминантен N и рецесивен n, отговорни съответно за устойчивост и за чувствителност към стрес. Стрес чувствителните индивиди са с рецесивен хомозиготен генотип (nn), докато другите два генотипа -

хомозиготен доминантен (NN) и хетерозиготен (Nn), обуславят устойчивост към стрес (Tăbăran et al., 2000).

След направения PCR-RFLP анализ на пробите се наблюдават фрагменти със следните дължини за генотип NN – 494 bp и 166 bp (фиг. 15).



Фигура 15. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на RYR1 ген, визуализиране на сегментите на 2,5 % агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендинуклеаза HhaI

Честотите на генотиповете и алелите от проучвания локус при изследваните стада са представени на таблица 6.

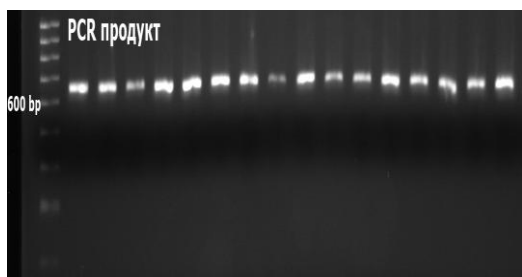
При тестираните 32 животни е установен само доминантния алел на RYR1 гена. Не е наблюдавана мутация на RYR1 (рецесивен алел n) гена и тестваните животни са негативни за porcine stress syndrome.

Таблица 6. Честота на генотиповете и алелите на RYR 1 (HAL) ген в изследваните свине от Източнобалканска порода (n=32)

Ген	Генотипове	Честоти	Алели	Честоти
<b>RYR1 (HAL)</b>	NN	1 (100 %)	N	1 (100 %)
	Nn	0	n	0
	nn	0	-	-

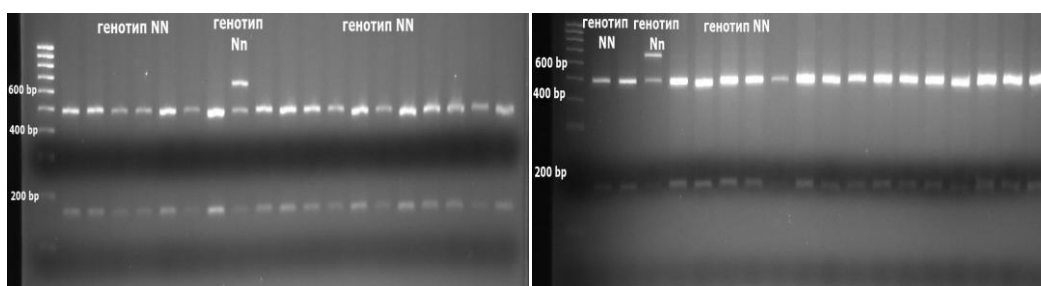
### *Дунавска бяла порода*

Получените резултати след проведената Полимеразно верижна реакция (PCR) са представени на фигура 16. При всички анализирани животни се получи амплифицирани PCR продукти на RYR1 ген.



Фигура 16. PCR продуктите след амплификацията на RYR1 ген, визуализирани на 2 % агарозен гел

След направения PCR-RFLP анализ на пробите се наблюдават фрагменти със следните дължини за генотип NN – 494 bp и 166 bp и за генотип Nn – 660 bp, 494 bp и 166 bp (фигура 17).



Фигура 17. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на RYR1 ген, визуализирани на сегментите на 2,5 % агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендонуклеаза HhaI

Честотите на генотиповете и алелите от проучвания локус при изследваното стадо са представени на таблица 7.

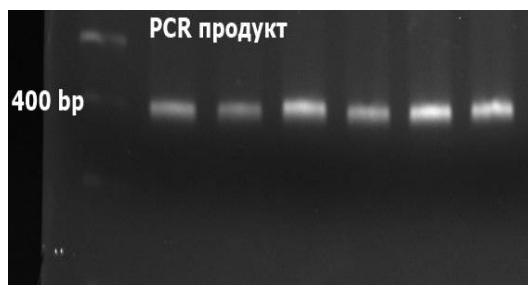
Анализът на резултатите показва, че при изследваните 53 свине не са установени хомозиготни по рецесивен алел животни ( $n/n = 0$ ). Хетерозиготните индивиди са 2 броя, честота на доминантния алел N е 0.981, а на рецесивния n - 0.019. Наличието на рецесивния алел (n) в Дунавска бяла порода се дължи вероятно на участието на породите Пиетрен и Ландрас в породообразователния процес.

Таблица 7. Честота на генотиповете и алелите на RYR1 (HAL) ген в изследваните свине от Дунавска бяла порода (n=53)

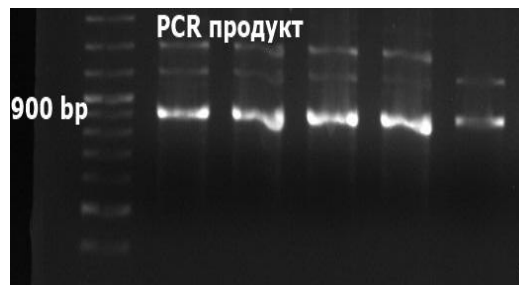
Ген	Генотипове	Честоти	Алели	Честоти
RYR1 (HAL)	NN	0.962 (96 %)	N	0.981 (98 %)
	Nn	0.037 (4 %)	n	0.019 (2 %)
	nn	0		

## Генотипиране по миостатиновия ген (MSTN) на свине от Дунавската бяла порода

Проучването е проведено с 52 ремонтни прасета (10 мъжки и 42 женски) от Дунавска бяла порода. При всички анализирани животни са получени PCR продуктите на MSTN и с двете избрани праймерни двойки (фиг. 18 и 19). Фрагментите амплифицирани в GDF8-promoter участък от гена са с дължина 397 bp, а тези в GDF8-exon3 участък съответно с дължина 899 bp.



Фигура 18. PCR продуктите след амплификацията на MSTN/GDF8-promoter участък от гена, визуализирани на 1,8 % агарозен гел



Фигура 19. PCR продуктите след амплификацията на MSTN/GDF8-exon3 участък от гена, визуализирани на 1,8 % агарозен гел

Получените резултати след проведения анализ по Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти с избраните ензими - DraI, MnlI и TaqI са представени на фигури 20, 21 и 22. Имената на алелите са свързани с точковата мутация, която ензима 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 MnlI (GDF8-promoter):

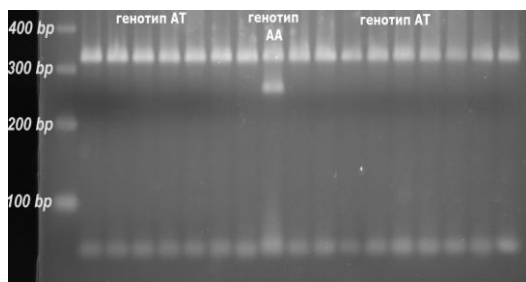
алел С: 3 фрагмента с дължини  $186 + 117 + 94$  bp

алел Т: 2 фрагмента с дължини  $280 + 117$  bp

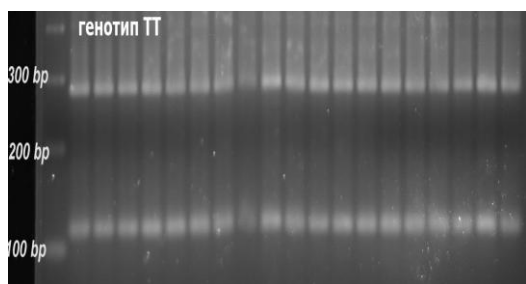
Ензим TaqI (GDF8-exon3):

алел С: 3 фрагмента с дължини  $493 + 378 + 28$  bp

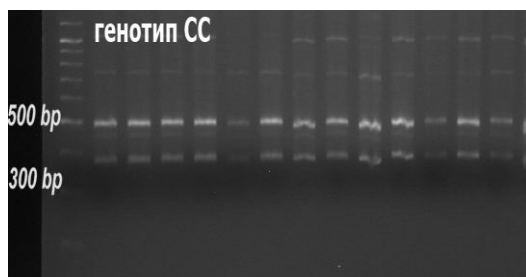
алел Т: 2 фрагмента с дължини  $493 + 406$  bp



Фигура 20. 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 ендонуклеаза DraI



Фигура 21. 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 ендонуклеаза MnlI



Фигура 22. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на MSTN ген с праймер GDF8-exon3, визуализиране на сегментите на 3,5 % агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендонуклеаза TaqI

Резултатите показват, че в стадо по локуса на MSTN/promoter/DraI ген се наблюдава едно хетерозиготно животно с генотип АТ и 51 животни с генотип ТТ, честотата на алел Т е 0.99, а на алел А – 0.01 (табл. 8).

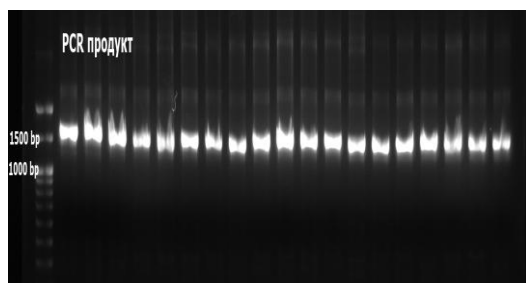
Таблица 8. Алелни честоти в GDF8 promoter и GDF8 exon 3 участък от локуса на MSTN ген в изследваното стадо Дунавска Бяла порода (n=52)

Участък от локуса на ген	MSTN (GDF8) Promoter/DraI		MSTN (GDF8) Promoter/MnII		MSTN (GDF8) Exon 3/TaqI	
	А	Т	С	Т	С	Т
Алел	А	Т	С	Т	С	Т
Честота	0.01 (1 %)	0.99 (99 %)	0 (0 %)	1.00 (100 %)	1.00 (100 %)	0 (0 %)

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/ exon3/TaqI – по алел С (генотип СС) (табл. 17). Получените резултати при генотирането на стадото по локуса на RYR1 и MSTN ген вероятно са свързани с участието на породите Пиетрен и Ландрас в породообразователния процес.

#### Генотипиране по калпастатиновия ген (CAST) на свине от Дунавската бяла порода

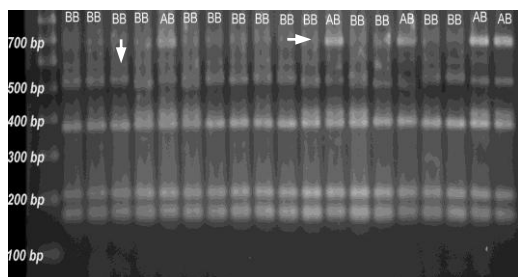
След проведената Полимеразно верижна реакция (PCR) при всички анализирани животни са получени амплифицирани PCR продукти на CAST гена с дължина ~ 1600 bp. Резултатите са визуализирани на 1.5 % агарозен гел (фиг. 23).



Фигура 23. PCR продуктите след амплификацията на CAST ген, визуализирани на 1.5 % агарозен гел

На фигурите 24, 25 и 26 са представени резултати след проведения анализ по Полиморфизъм по дължината на рестрикционните фрагменти, след използването на трите специфични ендонуклеази HinfI, MspI и RsaI. По броя и големината на получените фрагменти са определени алелите и съответните генотипове.

След рестрикцията с ензим HinfI са установени 5 фрагмента с големина съответстващи на 174, 200, 372, 503 и 646 bp. Профилът на алел А е представен от 4 фрагмента: 174, 200, 372 и 646 bp, като полиморфния фрагмент е с големина ~ 700 bp, а за алел В са характерни фрагментите: 174, 200, 372 и 503 bp, с вариабилен фрагмент с големина ~ 500 bp (фиг. 24).

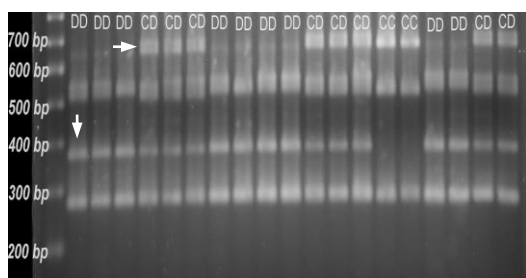


*Забележка: със стрелки са означени полиморфните фрагменти*

Фигура 24. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на CAST гена, визуализиране на сегментите на 2.5 % агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендонуклеаза HinfI

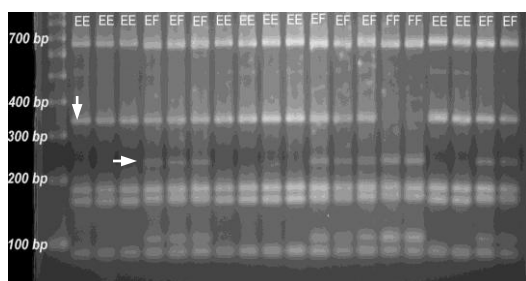
Рестрикционният анализ с ензим MspI показва наличие на 4 фрагмента съответстващи на 275, 369, 500 и 650 bp. В този участък на гена профила на алел С е прадставен от 3 фрагмента: 275, 500 и 650 bp, с полиморфен фрагмент ~ 700 bp, при алел D фрагментите са: 275, 369 и 500 bp, полиморфен фрагмент ~ 370 bp (фиг. 25).

Идентифицираните алели след обработка на PCR продуктите на CAST гена с ендонуклеаза RsaI са представени на фигура 26. Установени са 7 фрагмента с големини съответстващи на 90, 130, 160, 180, 250, 330 и 650 bp. Профилът на алел Е е представен от фрагменти: 90, 160, 180, 330 и 650 bp, с вариабилен фрагмент с големина ~ 360 bp. Другият алел F в този участък е с профил: 90, 130, 160, 180, 250 и 650 bp, като той се определя от полиморфен фрагмент с големина ~ 250 bp (фиг. 26).



*Забележка: със стрелки са означени полиморфните фрагменти*

Фигура 25. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на CAST гена, визуализиране на сегментите на 2.5% агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендонуклеаза MspI



*Забележка: със стрелки са означени полиморфните фрагменти*

Фигура 26. Резултати от проведения PCR-RFLP анализ на CAST гена, визуализиране на сегментите на 3.5 % агарозен гел, след фрагментиране на пробите с рестрикционна ендонуклеаза RsaI



Честотите на генотиповете и алелите от проучвания локус са представени на таблица 9.

Таблица 9. Алелни и генотипни честоти в локуса на гена в изследваното стадо Дунавска Бяла порода (n=49)

Полиморфен участък	CAST/HinfI			CAST/MspI			CAST/RsaI				
	AA	AB	BB	CC	CD	DD	EE	EF	FF		
Генотипов	AA	AB	BB	CC	CD	DD	EE	EF	FF		
Брой животни (n)	0	11	38	5	17	27	29	15	5		
Генотипни честоти	0	0.22 (22%)	0.78 (78%)	0.10 (10%)	0.35 (35%)	0.55 (55%)	0.60 (60%)	0.30 (30%)	0.10 (10%)		
Алелни честоти	A = 0.11 (11%)		B = 0.89 (89%)		C = 0.28 (28%)		D = 0.72 (72%)		E = 0.74 (74%)		F = 0.26 (26%)

Резултатите показват, че в стадото Дунавска бяла порода, в CAST/HinfI участъка на гена се наблюдават два генотипа, като хомозиготния по алел В генотип (BB) е със сравително по-висока честота от хетерозиготния АВ генотип.

При тестираните животни в другите два полиморфни участъка от локуса на гена CAST/MspI и CAST/RsaI се наблюдават три генотипа. Рестрикцията с ензим MspI показва най-висока честотата на генотип DD и най-ниска на генотип CC, докато при CAST/RsaI най-висока е стойността за хомозиготните по алел E животни и най-ниска за другия хомозиготен генотип FF.

### **Фенотипни параметри на контролираните признаци за месна продуктивност на ремонтни прасета от Дунавската бяла порода**

#### ***Интензитет на растеж***

При разработване на развъдните програми на чистопородните стада свине за разплод, селекционерите се фокусират основно върху тегловното развитие на ремонтните животни, ефективността от угояването, качеството на кланичния труп и на месото.

Резултатите за тегловното развитие на тестваните ремонтни прасета през 2014 г. са представени на таблица 10. Средното живо тегло на новородените прасета е в нормални граници за културните породи свине, със сравнително висок коефициент на вариране.

Тестваните прасета са със средно живо тегло 93.15 kg, което е достигнато на 233.67 дни, при средни нива на вариране на последния признак.

Таблица 10. Тегловно развитие на тествани ремонтни прасета от Дунавска бяла порода

Показатели	$\bar{x}$	$\bar{Sx}$	CV
<b>Живо тегло, kg</b>			
- при раждане	1.46	0.04	19.72
- на 21- и ден	4.86	0.08	12.67
- при тестване	93.15	0.76	6.68
<b>Среден дневен прираст, g</b>			
- след 21 ден	414.09	10.14	20.04
- за целия период	407.78	8.11	16.27
<b>Възраст, дни</b>			
- действителна	233.67	4.48	15.71
- приравнена	228.96	4.59	16.42

### *Качество на кланичния труп*

Генотипираните по RYR1 ген животни от ДБ показаха наличие на честота на рецесивния *p* алел - 0.019 или 2 броя животни с генотип *Np*, което не дава възможност статистическа обработка на резултатите от генотипирането.

Дебелината на сланината при *in vivo* оценката, свързана с прогнозиране на постното месо в трупа е от значение при подбора на разплодните животни.

При прасета за разплод се използва апарат за *in vivo* прогнозиране на този признак - Piglog 105. Получените резултати за прогнозните стойности на процента на постно месо показват, че според скалата на системата SEUROP, качеството на труповете е в категория „U” т.е. в гарниците от 50-54.9 % (табл. 11).

Таблица 11. *In vivo* оценка на някои кланични показатели на ремонтни прасета от Дунавска бяла порода

Показатели	$\bar{x}$	$\bar{Sx}$	CV
<b>Дебелина на сланина, mm</b>			
- на 7 cm от медиалната линия, между 3/4 лумбален прешлен, L1	17.52	0.67	31.20
- на 10 cm между 3/4 ребро (от последното ребро, краниално) , L2	14.76	0.49	27.15
- L1+ L2	32.28	0.98	24.81
<b>Дебелина на m.LD, mm</b>	42.12	0.75	14.60
<b>Съдържание на постно месо, %</b>	53.80	0.59	8.92

## Качествена характеристика на месото

### Физикохимичен състав и технологични характеристики на *m. Longissimus dorsi* и *m. Semimembranosus* на прасета от Дунавска бяла порода

Получените резултати за качеството на месото от двата мускула го характеризират, като месо, без наличие на PSE и DFD дефекти (табл. 12 и 13).

Стойностите на показателите, които се повлияват в най-голяма степен от наличието на мутантния *p* алел като *pH 45 min p.m.* и свързаните с него промени в цвета, ВСС, влажност, ексудат и загуба при варене са в нормални граници за животни с NN и Nn генотип. В това изследване прасетата са с NN генотип, тъй като тези с Nn генотип са с много ниска честота, което не позволи формирането на отделна група, докато такива с nn генотип не са установени.

Таблица. 12. Физикохимичен състав на *m. Longissimus dorsi*

Показатели	$\bar{x}$	$S \bar{x}$	CV
<b>pH 45 min p.m.</b>	6.17	0.02	1.26
<b>pH 24 h p.m.</b>	5.59	0.03	2.13
<b>Цвят, 525 nm/R</b>	25.98	0.31	3.72
<b>ВСС, %</b>	38.06	0.78	5.40
<b>Влага, %</b>	74.37	0.36	1.27
<b>Миоглобин, mg/g</b>	0.95	0.05	13.74
<b>Мазнини, %</b>	3.11	0.40	34.33
<b>Протеин, %</b>	20.96	0.21	2.63
<b>Пепел, %</b>	1.08	0.01	1.35
<b>Влажност, sec</b>	0.14	0.01	27.82
<b>Загуба на ексудат, %</b>	7.53	1.01	35.63
<b>Загуба при варене, %</b>	44.34	0.58	3.48

Таблица 13. Физикохимичен състав на *m. Semimembranosus*

Показатели	$\bar{x}$	$\bar{Sx}$	CV
рН 24 h p.m.	5.68	0.03	1.20
Цвят, 525nm/R	25.66	0.99	12.22
ВСС, %	36.65	0.57	4.10
Влага, %	75.76	0.25	0.88
Миоглобин, mg/g	1.47	0.10	17.99
Мазнини, %	2.03	0.31	40.14
Протеин, %	20.70	0.22	2.86
Пепел, %	1.06	0.01	3.24
Влажност, sec	19.92	12.74	169.18
Загуба на ексудат, %	4.91	0.64	34.74
Загуба при варене, %	47.18	0.45	2.54

Наблюдават се известни различия в нивото на отделните показатели между двата мускула, които се дължат основно на различия в преобладаващия метаболитен тип на мускулните влакна. *M. LD* е по-хомогенен, с преобладаващ бърз, гликолитичен тип влакна, докато *m. SM* има две добре разграничени зони - по-светла, с основен дял бърз, гликолитичен тип влакна и по-тъмна, съдържаща по-висок относителен дял на оксидотивно-гликолитичен тип влакна месо.

Индиректна информация за различията в относителния състав на отделните типове влакна дава съдържанието на миоглобин, който е с по-ниски стойности в *m. LD* и не се влияе от наличие на стесови генетични и средови фактори.

Другите физични и технологични параметри на месото от изследваните мускули при свинете са в тесни корелационни зависимости и се повлияват в голяма степен от наличие на стрес синдрома и появата на PSE месо).

### **Физикохимичен състав на *m. Longissimus dorsi* на прасета от Източнобалканска порода и ефективност на влиянието на полиморфизма в локуса на *RYR1* ген върху появата на стрес синдром**

Резултатите от изследването на физикохимичния състав на *m. LD* показват, че те значимо се различават по стойност от горе посочените показатели (табл. 14, но са близки с тези за рН 45 min на групата с рН > 6.00.

Генотипирането на животните по *RYR1* ген, включително и на тези, от които са взетите проби за физикохимичния анализ на месото показва отсъствие на рецесивния алел *p*, свързан с появата на PSE месо. Наличие на този тип месо е установено при 31.2% от изследваните проби, определено по стойностите на рН ≤ 6.00, 45 min p.m. Промените при спадане на рН на месото са резултат от *post mortem* метаболизма в

мускулната тъкан и преобразуването на гликогена в млечна киселина. Рязкото спадане на рН при все още висока температура на кланичния труп води до денатурация на мускулните протеини, което се свързва с намаление на ВСС и по-светъл цвят на месото. Установените стойности на 45 min p.m. при една от групите са с PSE месо, които са в горната граница за този тип месо ( $pH \leq 6.00$ ), тъй като типичното PSE месо се характеризира с малко по-ниски стойности  $\sim 5.8-5.7$ . Разликите между групите за този показател са достоверни ( $P < 0.001$ ) и достатъчни да окажат достоверен ефект за намаление на ВСС ( $P < 0.05$ ) и тенденция за по-светъл цвят на m. LD. Близките стойности за съдържание на мазнини и миоглобин между групите са показателни, че тенденцията за по-светлия цвят на мускула е резултат от промените в рН 45 min p.m. Показателите рН 24h p.m., съдържание на протеин и пепел са в нормални граници за този вид месо.

Таблица 14. Физикохимични свойства на m. Longissimus dorsi на прасета от Източнобалканската порода (n=16)

Показател	рН > 6.00 ( n = 11 )			рН < 6.00 ( n = 5 )			Достоверност
	$\bar{X}$	$\bar{S}_x$	CV	$\bar{X}$	$\bar{S}_x$	CV	
рН 45 min p.m.	6.24	0.03	1.53	5.94	0.01	0.41	***
рН 24 h p.m.	5.74	0.04	2.41	5.66	0.09	3.80	n. s.
Цвят, (R/525 nm)	28.62	0.77	6.04	30.77	0.62	3.48	n. s.
ВСС, %	38.40	0.48	2.81	41.41	0.20	0.83	**
Влага, %	74.17	0.43	1.83	74.29	0.50	1.66	n. s.
Миоглобин, mg/g	1.59	0.10	20.72	1.60	0.18	27.05	n. s.
Мазнини, %	3.24	0.32	31.24	3.83	0.45	28.75	n. s.
Протеин, %	20.44	0.28	4.28	19.84	0.32	3.96	n. s.
Пепел, %	1.09	0.06	17.76	1.06	0.02	3.67	n. s.

Достоверност на резултатите между групите:  $p < 0.01$  - \*\*;  $p < 0.001$  - \*\*\*

Получените резултати за физикохимичния състав на m. LD показват наличие на стрес при част от животните, който не се дължи на мутация в RYR1 ген.

Получените резултати от изследването са показателни за необходимост от мерки за ограничаване факторите на средата, които могат да предизвикват появата на стрес синдрома и неблагоприятна промяна във физикохимичния състав на месото при прасета от Източнобалканската порода.

**Анализ на ефективността на влиянието на полиморфизма в локуса на CAST върху някои угоителни и кланични качества на свинете в стадото Дунавска бяла порода**

Установеното генетично вариране в трите участъка на локуса на CAST даде възможност да определим ефективността на влиянието на полиморфизма върху някои угоителни и кланични качества на свинете в стадото Дунавска бяла порода, което е представено на таблици 15, 16 и 17.

Анализът на резултатите показва, че статистически достоверна разлика има само при живото тегло при раждане (табл. 16), като хомозиготните прасета по алел D в CAST/MspI участъка от локуса на гена, са с достоверно по-високо тегло от хетерозиготните животни ( $P < 0.05\%$ ).

Таблица 15. Угоителни и кланични качества на свинете в CAST/HinfI участъка от локуса на гена

Показатели	CAST / HinfI					
	Генотип AA n = 35			Генотип AB n = 10		
	$\bar{X}$	Sd	CV	$\bar{X}$	Sd	CV
<b>Живо тегло, kg</b>						
- при раждане	1.51	0.29	19.33	1.32	0.29	21.66
- на 21- и дни	4.87	0.64	13.14	4.8	0.67	13.99
- при приключване на опита	93.46	6.90	7.38	93.5	5.28	5.64
<b>Възраст, дни</b>	240.26	41.78	17.39	250.1	40.99	16.39
<b>Среден дневен прираст за целия период, g</b>	392.03	98.87	25.22	383.7	71.20	18.56
<b>Среден дневен прираст след 21 ден, g</b>	391.31	115.71	29.57	404	76.15	18.85
<b>Дебелина на сланина, mm</b>						
- на 7 cm от медиалната линия, между 3/4 лумбален прешлен (L1)	17.86	5.88	32.94	19.7	6.38	32.38
- на 10 cm от медиалната линия, между 3/4 ребро (L2)	15.57	4.22	27.08	17.1	2.85	16.64
- L1+ L2	33.43	8.50	25.72	36.8	7.83	21.27
<b>Дебелина на m.LD, mm</b>	41.20	5.12	12.43	40	6.36	15.80
<b>Съдържание на постно месо, %</b>	53.29	4.18	7.85	52.51	4.42	8.41

Забележка: Не са установени статистически достоверни разлики между групите

Таблица 16. Угоителни и кланични качества на свинете в CAST/MspI участъка от локуса на гена

Показатели	CAST / MspI					
	Генотип DD n = 26			Генотип CD n = 15		
	$\bar{X}$	Sd	CV	$\bar{X}$	Sd	CV
<b>Живо тегло, kg</b>						
- при раждане	1.53 *	0.32	20.67	1.33	0.25	18.73
- на 21- и ден	4.77	0.50	12.51	4.87	0.65	13.26
- при приключване на опита	92.81	7.28	7.85	95.67	4.85	5.07
<b>Възраст, дни</b>	241.42	39.66	16.43	245.80	48.22	19.62
<b>Среден дневен прираст за целия период, g</b>	383.39	103.76	27.07	403.73	82.88	20.53
<b>Среден дневен прираст след 21 ден, g</b>	375.58	119.30	31.77	425.60	91.60	21.55
<b>Дебелина на сланина, mm</b>						
- на 7 cm от медиалната линия, между 3/4 лумбален прешлен (L1)	17.69	5.95	33.60	19.60	6.14	31.32
- на 10 cm от медиалната линия, между 3/4 ребро (L2)	15.00	4.45	29.64	16.87	3.12	18.46
- L1+ L2	32.69	8.89	27.21	36.47	8.04	22.03
<b>Дебелина на m.LD, mm</b>	41.58	5.38	12.93	40.13	4.93	12.27
<b>Съдържание на постно месо, %</b>	53.73	4.31	8.03	52.35	4.16	7.95

Достоверност – P < 0.05 \*

Таблица 17. Угоителни и кланични качества на свинете в CAST/RsaI участъка от локуса на гена

Показатели	CAST / RsaI					
	Генотип EE n = 27			Генотип EF n = 14		
	$\bar{X}$	Sd	CV	$\bar{X}$	Sd	CV
<b>Живо тегло, kg</b>						
- при раждане	1.51	0.33	21.61	1.36	0.24	17.75
- на 21- и ден	4.77	0.59	12.28	4.86	0.67	13.77
- при приключване на опита	92.82	7.14	7.69	95.86	4.98	5.19
<b>Възраст, дни</b>	243.41	40.23	16.53	242.29	48.005	19.81
<b>Среден дневен прираст за целия период, g</b>	380.85	102.60	26.94	410.07	82.15	20.03
<b>Среден дневен прираст след 21 ден, g</b>	375.37	116.99	31.17	429.57	93.81	21.84
<b>Дебелина на сланина, mm</b>						
- на 7 cm от медиалната линия, между 3/4 лумбален прешлен (L1)	17.56	5.87	33.45	20.00	6.16	30.82
- на 10 cm от медиалната линия, между 3/4 ребро (L2)	15.11	4.40	29.10	16.79	3.22	19.15
- L1+ L2	32.67	8.72	26.70	36.79	8.24	22.40
<b>Дебелина на m.LD, mm</b>	41.22	5.58	13.55	40.71	4.55	11.17
<b>Съдържание на постно месо, %</b>	53.670	4.24	7.90	52.36	4.32	8.25

Забележка: Не са установени статистически достоверни разлики между групите

При стойностите на някои показатели като възраст, среден дневен прираст и живо тегло също се наблюдават съществени разлики между групите, но поради високата величината на вариационните коефициенти те са недоказани. По величина на коефициента на вариране за признака среден дневен прираст се наблюдават близки стойности на установените генотипове при CAST/MspI и CAST/RsaI, докато при CAST/Hinf са по-ниски. Измеренията за дебелината на сланината са сходни във всички групи, като характерни за този показател са високите по стойност вариационни коефициенти (19.15% -33.45%).



## ИЗВОДИ

Получените резултати от експерименталната работа и анализите, в рамките на дисертационния труд ни дават основание да формулираме следните изводи:

1. Установен е полиморфизъм в осемте микросателитни маркера в изследваните стада от двете породи. За Източнобалканската порода са идентифицирани общо 37 алела в стадо 1 и 33 в стадо 2. В стадото Дунавска бяла порода се наблюдават общо 58 алела, със среден брой алели на локус – 6.
2. Средните стойности на очакваната (0.595, 0.516 и 0.760) и наблюдавана (0.600, 0.580 и 0.700) хетерозиготност и тези на F-индекса (-0.012, -0.102 и -0.072) не показват наличие на хетерозиготен дефицит в стадата от двете породи.
3. Установената стойност на Fst (0.185) по всички локуси е показател за средна генетична диференциация на базата на алелните честоти между двете стада от автохтонната порода. Изчислената стандартна генетичната дистанция Dst и анализа на дендрограмата показват отчетлива генетична дистанция между индивидите от двете стада.
4. UPGMA дендрограмата на база на стандартната генетична дистанция Dst не показва наличие на обособени клъстери в Дунавска бяла порода, което е показателно за високото ниво на консолидиране в стадото.
5. Генотипираното по локуса на риадонин рецепторният ген (RYR1 / HAL) на включените в проучването стада от двете породи не показва хомозиготни по рецесивен алел (n/n) свине и всички тествани животни са негативни по porcine stress syndrome (PSS). Честотата на установените два генотипа за Дунавска бяла порода са съответно 0.96 за хомозиготния по доминантен алел (N/N) генотип и 0.04 за хетерозиготния (N/n) генотип. В Източнобалканска порода всички животни са хомозиготни по доминантен алел.
6. При Дунавска бяла порода е установен полиморфизъм в MSTN/promoter/DraI участъка от локуса на миостатиновия ген, с честота 0.99 на алел T и 0.01 на алел A. В MSTN/promoter/MnlI и MSTN/exon3/TaqI регионите не е установен генетичен полиморфизъм, всички тествани животни са съответно с TT и CC генотип.
7. Анализ на резултатите показва генетично вариране и в трите полиморфни участъка на калпастатиновия ген при стадото Дунавска бяла порода. В CAST/HinfI се наблюдават два генотипа – хомозиготен BB с честота 0.78 и хетерозиготен AB с честота 0.22.
8. В другите два участъка честотите на трите генотипа са, съответно: за CAST/MspI – 0.55 за генотип DD, 0.35 за генотип CD и 0.10 генотип CC. за CAST/RsaI най-висока е честотата на генотип EE – 0.60. Хетерозиготните животни с генотип EF са 0.30, а най-ниска е честотата на генотип FF – 0.10.
9. Не са установени достоверни разлики във величините на контролираните *in vivo* признаци за угоителни способности и кланични качества между ремонтните прасета и нерезчетата от Дунавска бяла порода.
10. Дебелината на измерената в двата пункта сланина (L1 и L2) е в отрицателна и достоверна корелационна зависимост с процента на постното месо в кланичния труп ( $r = -0.65$  и  $0.80$ ,  $P < 0.001$ ) на ремонтни прасета от Дунавска бяла порода.
11. Физикохимичният състав на *m. Longissimus dorsi* и на *m. Semimembranosus* при прасета с NN генотип от Дунавска бяла порода е в нормални граници за този вид месо. Установено е по-високо съдържание на интрамускуларни мазнини (над 2%), което е благоприятно за вкусовите качества на месото.

12. Установена е фенотипна проява на бледо, меко, ексудативно месо в *m. Longissimus dorsi* при Източнобалканската порода свине след предизвикан стрес, който е с негенетичен произход.
13. Установено е достоверно по-високо живо тегло при раждане на хомозиготните животни по алел D в *CAST/MspI* участъка от локуса на гена в сравнение с хетерозиготните прасата.

## **ПРЕПОРЪКИ ЗА ПРАКТИКАТА**

1. Тестваните стада от Източнобалканската порода не показаха наличие на мутация в риондин рецепторния ген (*RYR1*), което определя животните като негативни за porcine stress syndrome. Физикохимичните анализи, установиха PSS месо в *m. Longissimus dorsi*. Този факт е показателен за необходимостта от мерки за ограничаване факторите на средата, които могат да предизвикват появата на стрес синдрома и неблагоприятна промяна в състава на месото при прасета от тази порода.
2. Идентифицираното генетично вариране и в трите полиморфни участъка на калпастатиновия (*CAST*) ген, както и достоверното влияние на хомозиготния DD генотип в *CAST/MspI* участъка върху живо тегло при раждане, определят този генетичен маркер като подходящ за включване в селекционната практиката.

## **ПРИНОСИ**

### **Приноси с теоретичен характер**

1. За пръв път у нас чрез микросателитни маркери, е направен анализ на генетичното разнообразие и генетичната структура на две стада от автохтонната Източнобалканска порода и на едно стадо от културната Дунавска бяла порода свине.
2. Проучен е нуклеотидният полиморфизъм в локусите на три гена за месна продуктивност – риондин рецепторния (*RYR1*), миостатиновия (*MSTN*) и калпастатиновия (*CAST*) ген.
3. Определена е ефективността на влияние на полиморфизма в локусите на гените за местна продуктивност върху някои угоителни и кланични качества на свинете.

### **Приноси с научно-приложен характер**

1. Получената информация за алелното вариране, на основа микросателитен анализ, дава възможност да се направи коректна оценка на генетичната структура на стадата, която може да се приложи в практиката, с цел опазването на тези генетични ресурси и подържане на породите в оптимални граници.
2. Установения нуклеотиден полиморфизъм в локусите на гените за месна продуктивност и ефективността на влиянието му върху някои фенотипни показатели е основа за разработването и предлагане на съвременен подход за управление на селекционния процес в свиневъдството у нас.

## SUMMARY

### GENETIC DIVERSITY AND NUCLEOTIDE POLYMORPHISM OF GENES ASSOCIATED WITH MEAT PRODUCTION TRAITS IN PIG BREEDS

The aim of the present PhD thesis was to study the genetic diversity utilising microsatellite markers and nucleotide variation of genes associated with meat production traits in pigs - ryanodine receptor gene (RYR1), myostatin gene (MSTN) and calpastatin gene (CAST).

Estimation of the genetic diversity is an accent in many research, in native and in cultural pigs breeds as well. Using microsatellite DNA markers for genetic structure analysis is a modern and reliable method successfully applied in animal husbandry. The research was conducted on a total of 86 animals of East Balkan breed and Danube white breed. The genetic diversity was studied through a panel of 8 microsatellite markers, selected according the recommendation of FAO/ISAG. Genotyping by locus of the *three* genes RYR1, MSTN, CAST was carried out by polymerase chain reaction (PCR) method and of the of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis.

The performed microsatellite analysis shown polymorphism in all studied SSR loci. Estimated overall number of alleles is 37 (herd 1) and 33 (herd 2) in native East Balkan breed. The effective number varied from 1.691 (SW353) to 3.980 (SW68) in herd 1 and from 1.074 (SO218) to 4.558 (SW68) in herd 2. In marker SW68 was found the highest number of effective number of alleles. High value index of Shannon and Polymorphism information content (PIC) identified SW68 as the most polymorphic marker. The mean values of observed heterozygosity (0.600, 0.580), expected heterozygosity (0.595, 0.516) and The index of inbreeding (-0.012, -0.102) did not indicate heterozygote deficiency. Breed differentiation between the two herds from native breed was shown by fixation indices (Fit, Fis, and Fst). The Fst per locus varied from 0.036 (SO 107) to 0.367 (SO 218) and the average Fst of all loci was 0.185. These implied that 81.5% of the genetic variation lay within breeds, and only 18,5% between breeds. Neighbour-joining phylogenetic trees based on Dst distances showed clear genetic distance between the individuals of the two herds from East Balkan breed.

In the Danube white breed estimated overall number of alleles is 58, while the effective number varies from 1.771 (SO218) to 4.657 (SW68). In markers SW68 and SOO70 were found the highest numbers of alleles, high index of Shannon and index Polymorphism information content, which identifies them as the most informative analysis of genetic diversity in pigs. The mean observed heterozygosity (Ho) was from 0.353 to 0.863 and the expected heterozygosity was from 0.435 to 0.811. The mean values of observed heterozygosity (0.760), expected heterozygosity (0.0.700) and the index of inbreeding (-0.072) did not indicate heterozygote deficiency.

Analyses of genotyping at RYR1 locus from pigs of East Balkan breed showed only homozygous dominant allele and only genotype NN. Two heterozygous animals (N / n) was established in the herd of the Danube white breed. Homozygous for the recessive allele animals have not been established. All tested animals from the herd are PSS negative. Established phenotype of pale, soft and exudative meat in m Longissimus dorsi at East Balkan breed pigs after induced stress that is by non-genetic origin.

Genotyping by at porcine loci MSTN (GDF8-exon3 и GDF8-promoter) in Danube white breed, was carried out by 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 51 pigs were analyzed for DraI polymorphism in MSTN/promoter; one animal was heterozygous - AT genotype and 50 were TT homozygous.

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.

Analysis of genotyping at CAST locus from pigs of Danube white breed showed high levels of genetic variability. In CAST/HinfI were determined two genotypes - homozygous BB with frequency 78% and heterozygous with frequency 22%. Three different genotypes were determined for CAST/MspI and CAST/RsaI. Genotype frequencies were 55%, 35%, 10% for DD, CD, CC in CAST/MspI and 60%, 30%, 10% for EE, EF in CAST/RsaI, respectively. The study was identified a significant effect of the CAST/MspI polymorphism on live weight at birth of pigs. The pigs of DD genotype showed a significant higher live weight at birth as compared to CD animals.

**Key words:** East Balkan breed pigs, Danube white breed, ryanodine receptor gene (RYR1), myostatin gene (MSTN), calpastatin gene (CAST)

## **СПИСЪК С НАУЧНИ ПУБЛИКАЦИИ ВЪВ ВРЪЗКА С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД**

1. **Стойкова-Григорова, Р.,** К. Цочева, 2009. Приложение на някои молекулни маркери с оглед съхранението на генетичните ресурси при селскостопанските животни. Животновъдни науки, XLVI, 2:73-81.
2. **Стойкова-Григорова, Р.,** К. Цочева, 2009. Молекулни маркери и тяхното приложение с оглед определяне на кандидат гени с подходящо влияние върху признаци, свързани с продуктивността и здравето на селскостопанските животни. Животновъдни науки, XLVI ,5:57-68.
3. **Стойкова-Григорова, Р.,** К. Стефанова, И. Атанасов, П. Маринова. 2017. Генетичен полиморфизъм в локуса на калпастатиновия (CAST) ген и месна продуктивност при свине. Сборник доклади от конференция с международно участие „Животновъдната наука – предизвикателства и иновации” на Институт по животновъдни науки – Костинброд, София, 1-3 ноември 2017 г.
4. **Стойкова-Григорова, Р.,** К. Стефанова, И. Атанасов, К. Енева. 2018. Генетичен полиморфизъм в локуса на миостатиновия ген (MSTN) ген при свине от Дунавска бяла порода. Животновъдни науки, 55, (2):27-34.