

OCENA WIELKOŚCI REGIONÓW JĄDERKOTWÓRCZYCH (NOR) U ŚWIŃ RASY PUŁAWSKIEJ*

Barbara Danielak-Czech¹, Ewa Słota¹, Marek Babicz²,
Anna Kozubska-Sobocińska¹, Barbara Rejduch¹

¹Instytut Zootechniki, Dział Immuno- i Cytogenetyki Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

²Katedra Hodowli i Technologii Produkcji Trzody Chlewnej, Akademia Rolnicza, ul. Akademicka 13,
20-950 Lublin

Celem badań była ocena wariantów wielkości regionów jąderkotwórczych jako markerów genetycznych przydatnych do charakterystyki świń rasy puławskiej. Metodą barwienia Ag-I i fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) zidentyfikowano polimorfizm wielkości regionów jąderkotwórczych (NOR) u 16 świń rodzimej rasy puławskiej. Na podstawie mikroskopowej i komputerowej analizy obrazu sklasyfikowano cztery warianty wielkości sygnałów fluorescencyjnych, specyficznych dla rDNA oraz depozytów srebrowych w obszarach jąderkotwórczych. Generalnie, proporcje sygnałów rDNA i depozytów srebrowych w chromosomach 8. i 10. pary były podobne. Uzyskane rezultaty sugerują, że markery te mogą być wykorzystane do charakterystyki rasy puławskiej.

W genomie świni domowej rybosomalny DNA tworzy dwie klasy tandemowo powtarzalnych sekwencji. Główna klasa, kodująca 18S, 5,8S i 28S RNA (18S+28S rRNA) występuje w miejscach drugorzędowej struktury chromosomów pary 8. (RNR1), pary 10. (RNR2) i pary 16. (RNR3) (Toga-Piquet i in., 1984; Miyake i in., 1988; Bosma i in., 1991; Mellink i in., 1991; 1994; Danielak-Czech i in., 1999). Natomiast druga koduje 5S RNA i występuje tylko na chromosomach 14. pary (RN5S) (Lomholt i in., 1995; Mellink i in., 1996).

Badania przeprowadzone metodą fluorescencyjnej hybrydyzacji in situ (FISH) ze specyficzną sondą DNA wykazały, że lokalizacja sekwencji RNR1 i RNR2 odpowiada depozytom srebrowym w miejscu regionów jąderkotwórczych (Ag-NOR) (Solinas-Toldo i in., 1992; Danielak-Czech i in., 1999).

* Praca wykonana w ramach działalności statutowej IZ, temat nr 3210.1.

Zarówno sygnały fluorescencyjne rDNA, jak i depozyty srebrowe na chromosomach charakteryzujących się obecnością regionów jąderkotwórczych, wykazują wyraźną zmienność wielkości. Zmienność sygnałów FISH pod względem wielkości i intensywności jest rezultatem zmiennej liczby powtórzonych sekwencji rDNA, podczas gdy zróżnicowanie wielkości Ag-NOR wiąże się z poziomem jej aktywności transkrypcyjnej. Zjawisko to, szczególnie w odniesieniu do pary 10., spełnia kryteria polimorfizmu i w związku z tym polimorficzne regiony jąderkotwórcze zaliczono do kategorii markerów chromosomowych. Polimorfizm wielkości NOR analizowany był u licznych ras świń (Mellink i in., 1994; Słota, 1998; Świtoński i in., 1997 a, b). Także w Polsce, stosując technikę FISH objęto badaniami rasy: polską białą zwisłouchą, Duroc, Pietrain, wielką białą polską i Hampshire (Danielak-Czech i in., 1999).

Celem badań była charakterystyka świń rasy puławskiej na podstawie markerów chromosomowych dotyczących wielkości regionów jąderkotwórczych.

Materiał i metody

Analizą cytogenetyczną przy zastosowaniu technik FISH i Ag-I objęto 16 świń rasy puławskiej pochodzących z gospodarstw indywidualnych (4 knury) i Gospodarstwa Doświadczalnego (Czesławice) Akademii Rolniczej w Lublinie (12 loch).

Przedmiotem analiz były preparaty chromosomów metafazowych, otrzymanych po rutynowej hodowli limfocytów *in vitro*.

Barwienie azotanem srebra przeprowadzono techniką Ag-I (Bloom i Godpasture, 1976; Howell i Black, 1980). Depozyty srebrowe oceniano wykorzystując komputerowy system analizy obrazu mikroskopowego MultiScan 6.08 (Poland).

Polimorfizm Ag-NOR wyrażano średnią wartością względną powierzchni depozytów srebrowych, wyliczaną z proporcji powierzchni depozytu srebrowego do powierzchni całego chromosomu z regionem jąderkotwórczym, mierzonej w co najmniej 10 komórkach. Wartości względnej powierzchni Ag-NOR zostały podzielone na cztery kategorie (I: 0,101–0,200; II: 0,201–0,300; III: 0,301–0,400; IV: 0,401–0,500 dla chromosomów pary 10. oraz I: 0,051–0,100; II: 0,101–0,150; III: 0,151–0,200; IV: 0,201–0,250 dla pary 8.) według założeń przyjętych przez Słotę (1998).

Hybrydyzację *in situ* przeprowadzano zgodnie z metodyką opisaną przez Pinkela i in. (1986), przy wykorzystaniu ludzkiej biotynylowanej sondy 5,2 kb *Bg*/II-*Eco*RI 18S+28S rDNA (Wachtler i in., 1986).

Miejsca hybrydyzacji na chromosomach barwionych DAPI identyfikowano przy wykorzystaniu awidyny połączonej z FITC i analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym w co najmniej 20 metafazach u każdego osobnika.

Wielkość sygnałów hybrydyzacyjnych oceniano przy pomocy komputerowego programu analizy obrazu mikroskopowego LUCIA-FISH (Laboratory Imaging Ltd, Praga, Czechy).

Na podstawie mikroskopowej i komputerowej analizy obrazu ustalono warianty wielkości i intensywności sygnałów FISH specyficznych dla rDNA, określając jako: 1 — mały i słaby oraz 2, 3, 4 — duży i mocny (proporcjonalnie do wielkości i intensywności).

Wyniki

Szczegółowe wyniki oceny wariantów wielkości NOR przedstawiono w tabeli 1. Na podstawie uzyskanych danych stwierdzono u poszczególnych osobników maksymalne zróżnicowanie pod względem wielkości sygnałów fluorescencyjnych, które sklasyfikowano zgodnie z przyjętą skalą (od 1 do 4). Proporcje te odpowiadały wariantom określonym na podstawie pomiarów Ag-NOR, zaliczonym również do czterech kategorii wielkości (I–IV), przy skrajnych wielkościach — 0,109 (I) i 0,477 (IV) dla chromosomów 10. pary oraz — 0,075 (I) i 0,245 (IV) dla pary 8. (tab. 1).

Tabela 1. Sygnały rDNA FISH i warianty wielkości Ag-NOR na chromosomach 10. i 8. pary u świń rasy puławskiej

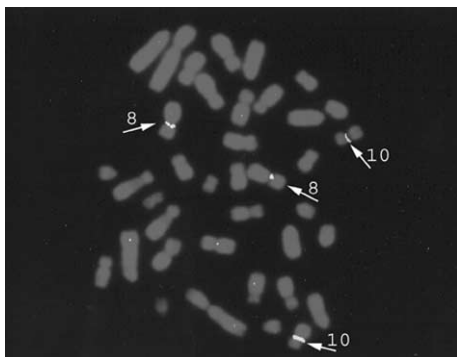
Table 1. The rDNA FISH-signal and Ag-NOR size variants on 10 and 8 chromosome pairs of Puławska pigs

Osobnik Pig no.	Warianty sygnałów rDNA FISH					Warianty wielkości Ag-NOR			
	rDNA FISH-signal variants					Ag-NOR size variants			
	10	10	8	8	8	10	10	8	8
1	4	1	3	1	0.465/IV	0.323/III	0.108/II	0.085/I	
2	3	1	4	4	0.370/III	0.124/I	0.245/IV	—	
3	4	1	2	1	0.460/IV	0.109/I	0.102/II	—	
4	2	1	3	1	0.202/II	0.130/I	0.170/III	—	
5	3	1	3	2	0.375/III	0.126/I	0.166/III	0.101/II	
6	4	2	3	2	0.413/IV	0.270/II	0.198/III	0.135/II	
7	3	1	2	2	0.322/III	0.177/I	0.106/II	0.114/II	
8	3	1	2	1	0.319/III	0.145/I	—	0.075/I	
9	3	1	2	2	0.303/III	0.126/I	0.142/II	—	
10	4	3	3	3	0.477/IV	0.319/III	—	—	
11	2	1	3	2	0.212/II	0.177/I	0.170/III	—	
12	4	2	2	1	0.474/IV	0.212/II	0.105/II	—	
13	3	2	3	1	0.335/III	0.214/II	0.164/III	—	
14	3	3	2	1	0.379/III	0.350/III	0.120/II	—	
15	3	2	2	2	0.360/III	0.281/II	0.114/II	0.110/II	
16	3	2	3	2	0.320/III	0.219/II	0.160/III	0.148/II	

NOR, identyfikowane zarówno techniką FISH jak i metodą Ag-I, były bardziej intensywne i większe na chromosomach 10. pary w porównaniu z sygnałami i depozytami srebrowymi na chromosomach pary 8., czego przykładem są kategorie wielkości charakteryzujące osobnika numer 6 (fot. 1, fot. 2, tab. 1).

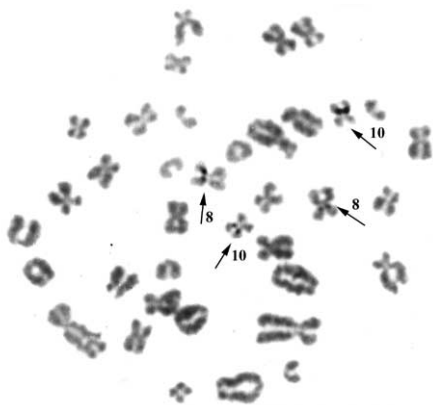
Omówienie wyników

Hybrydyzacja *in situ* i barwienie srebrowe potwierdziły lokalizację genów rRNA w przycentromerowym rejonie ramion krótszych chromosomów 8. i 10. pary w kariotypie badanych świń rasy puławskiej. Sygnały fluorescencyjne były regularnie obserwowane w czterech regionach jąderkotwórczych (fot. 1), natomiast depozyty srebrowe rejestrowano w liczbie od 2 do 4 (fot. 2), przy czym ujawniały się one na trzech chromosomach: dwóch — pary 10. i jednym — 8. pary (tab. 1). Większe i wyraźne sygnały, a także depozyty srebrowe, zawsze identyfikowane na obu chromosomach 10. pary, potwierdzają sugerowaną przez Mellinka i in. (1994) prawidłowość, dotyczącą dominującej roli chromosomów tej pary w syntezie rybosomalnego RNA u świń.



Fot. 1. Sygnały fluorescencyjne rDNA w regionach jąderkotwórczych chromosomów metafazowych świni rasy puławskiej (osobnik nr 6). Strzałki wskazują sygnały hybrydyzacyjne na chromosomach 10. pary (warianty: 4+ i 2+) i pary 8. (warianty: 3+ i 2+)

Figure 1. The rDNA fluorescent signals in nucleolar organizer regions in metaphase chromosomes of Puławska pigs (animal no. 6). Arrows show hybridization signals on chromosomes of 10 pair (variants: 4+ and 2+) and chromosomes of 8 pair (variants: 3+ and 2+)



Fot. 2. Depozyty srebrowe w regionach jąderkotwórczych u świni rasy puławskiej (osobnik nr 6). Strzałki wskazują depozyty na chromosomach 10. pary (warianty: IV i II) i pary 8. (warianty: III i II)

Figure 2. The silver deposits in nucleolar organizer regions in the Puławska pig no. 6. Arrows show deposits on chromosomes of 10 pair (variants: IV and II) and chromosomes of 8 pair (variants: III and II)

U wszystkich analizowanych osobników świń rasy puławskiej, podobnie jak u innych ras tego gatunku (Bosma i in., 1991; Mellink i in., 1994; Danielak-Czech i in., 1999), sygnały FISH w miejscach struktury drugorzędowej chromosomów 16. pary występowały tylko sporadycznie i były trudne do oceny, natomiast brak depozytów srebrowych świadczył o nieaktywności genów *RNR3*.

Uzyskane wyniki umożliwiły określenie polimorfizmu dotyczącego wielkości i liczby regionów jąderkotwórczych u świń rasy puławskiej. Podobne oceny zmienności NOR, przeprowadzone wcześniej w wielu populacjach świń, zostały wykorzystane do charakterystyk rasowych, a także okazały się przydatne w określaniu dystansów genetycznych i związków ewolucyjnych (Świtoński i Pietrzak, 1992; Mellink i in., 1994; Liu i in., 1995; Świtoński i in., 1997 a, b; Słota, 1998; Danielak-Czech i in., 1999).

Zróżnicowanie wielkości sygnałów rDNA i Ag-NOR w grupie badanych zwierząt okazało się wystarczająco wyraźne, aby sklasyfikować je do czterech wariantów wielkości, odpowiadających skali przyjętej przez Mellinka i in. (1994), Słotę (1998) i Danielak-Czech i in. (1999), będących markerami cytogenetycznymi stosowanymi do charakterystyki różnych ras świń.

U świń rasy puławskiej, podobnie jak u innych polskich ras oraz licznych ras europejskich, zarówno warianty wielkości sygnałów fluorescencyjnych, jak i depozytów srebrowych na chromosomach 10. pary, zaliczane były do kategorii wyższych wartości niż warianty NOR na chromosomach 8. pary. Jednakże, przypadki dużych depozytów srebrowych rejestrowano na chromosomie ósmym u osobników ras Pietrain i Yorkshire, a także u przedstawicieli ras prymitywnych: Meishan i złotnicka pstra (Mellink i in., 1994; Świtoński i in., 1997 b; Słota, 1998; Danielak-Czech i in., 1999).

Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że polimorfizm wielkości sygnałów rDNA i aktywnych Ag-NOR koresponduje ze zmienną długością tandemowych powtórzeń sekwencji DNA, która jest efektem niesymetrycznego crossing-over wynikającego z nieprawidłowej koniugacji chromosomów homologicznych w mejozie (Harding i in., 1992).

Przedstawione markery chromosomowe regionów jąderkotwórczych — cztery kategorie wariantów wielkości sygnałów rDNA i depozytów srebrowych, są uzupełnieniem charakterystyki genetycznej świń rasy puławskiej, która wcześniej została scharakteryzowana w oparciu o markery heterochromatyny centromerowej (Babicz i in., 2004).

Piśmiennictwo

- Babicz M., Rejduch B., Kozubska-Sobocińska A., Danielak-Czech B., Walkiewicz A., Słota E. (2004). Assessment of size of centromeric heterochromatin regions in Puławska pigs. *Ann. Anim. Sci.*, 4 (1): 15–21.

- Bloom S.E., Goodpasture C. (1976). An improved technique for selective silver staining of molecular regions in human chromosomes. *Hum. Genet.*, 34: 199–206.
- Bosma A.A., Haan N.A. de, Mellink C.H. (1991). Ribosomal RNA genes located on chromosome 16 of the domestic pig. *Cytogenet. Cell Genet.*, 58: p. 2124.
- Danielak-Czech B., Słota E., Lindblad K., Gustavsson I. (1999). Size polymorphism of nucleolar organizer regions in pigs bred in Poland as determined by FISH and silver staining technique. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 17: 163–171.
- Harding R.M., Boyce A.J., Clegg J.B. (1992). The evolution of tandemly repetitive DNA: Recombination rules. *Genetics*, 132: 847–859.
- Howell W.M., Black D.A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36: 1014–1015.
- Liu W.S., Lu X.Z., Qiu H. (1995). Number and distribution of silver stained nucleolar organizer regions and evolutionary relationships in domestic pigs. *Anim. Genet.*, 26: 293–298.
- Lomholt B., Christenssen K., Hallenberg C., Frederiksen J. (1995). Porcine 5S *rRNA* genes mapped to 14q23 revealing syntenic relation to human HSPA6- and 7. *Mamm. Genome*, 6: 439–441.
- Mellink C.H.M., Bosma A.A., Haan N.A. de, Wiegant J. (1991). Distribution of *rRNA* genes in breeds of domestic pig studied by non-radioactive *in situ* hybridization and selective silver-staining. *Genet. Sel. Evol.*, 23 (suppl. 1): 168–172.
- Mellink C.H.M., Bosma A.A., Haan N.A. de (1994). Variation in size of Ag-NORs and fluorescent rDNA *in situ* hybridization signals in six breeds of domestic pig. *Hereditas*, 120 (2): 141–149.
- Mellink C.H.M., Bosma A.A., Haan N.A. de, Zijlstra C. (1996). Physical localization of 5S *rRNA* genes in the pig by fluorescence *in situ* hybridization. *Hereditas*, 124: 95–97.
- Miyake M.L., O'Brien S.J., Kaneda Y. (1988). Regional localization of rDNA genes on pig chromosome 10 by *in situ* hybridization. *Jap. J. Vet. Sci.*, 50: 341–345.
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. (1986). Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitive, fluorescence hybridization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 83: p. 2934.
- Słota E. (1998). Polymorphism of pig chromosomes. *Rocz. Nauk. Zoot. Rozpr. hab.*, 7, 59 ss.
- Solinas Toldo S., Pieńkowska A., Fries R., Świtoński M. (1992). Localization of nucleolar organizer regions in farm animals by *in situ* hybridization method with a probe from a human *rRNA* gene. *Proc. 10th Europ. Coll. Cytogenet. Dom. Anim.*, Utrecht, pp. 228–231.
- Świtoński M., Pietrzak A. (1992). Cytogenetic survey of AI boars; distribution of C-band and Ag-NORs polymorphism. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 9: 91–96.
- Świtoński M., Komisarek J., Pietrzak A. (1997 a). The Polish Pig Genome Project: III. Chromosomal markers in generation F₁. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 15 (2): 93–99.
- Świtoński M., Pietrzak A., Buczyński J. (1997 b). Chromosomal markers (C-band and Ag-NOR) in the Zlotnicka Spotted pig. *Anim. Sci. Pap. Rep.*, 15 (3): 173–178.
- Toga-Piquet C., Henderson A.S., Grillo J.M., Vagner-Capodano A.N., Stahl A. (1984). Localisation des genes ribosomiques et activite nucleolaire dans les lymphocytes du porc (*Sus scrofa domestica*) stimules par la phytohemagglutinine. *C.R. Seances Acad. Sci. (III)*, 298: 383–386.
- Wachtler F., Hopman A.H.N., Wiegant J., Schwarzacher H.G. (1986). On the position of nucleolus organizer regions (NORs) in interphase nuclei. Studies with a new, non-Autoradiographic *In Situ* Hybridization Method. *Exp. Cell Res.*, 167: 227–240.

BARBARA DANIELAK-CZECH, EWA SŁOTA, MAREK BABICZ,
ANNA KOZUBSKA-SOBOCIŃSKA, BARBARA REJDUCH

Evaluation of nucleolar organizer region (NOR) size in Puławska pigs

SUMMARY

The aim of this study was to evaluate the NOR size variants as markers for genetic characterization of Puławska pigs. Size polymorphism of nucleolar organizer regions (NOR) in 16 pigs of the Polish native Puławska breed was identified by Ag-I staining method and fluorescent *in situ* hybridization (FISH). On the basis of microscope and computer image analysis four rDNA FISH-signal and Ag-NOR size variants were classified. In general, the proportions of rDNA signals and silver deposits in 8 and 10 chromosome pairs were similar. The results obtained suggest that these markers can be used for characterization of the Puławska breed.

Key words: pig, Puławska breed, nucleolar organizer regions, FISH, genetic markers