

# SIGADE STRESSISÜNDROOMI MOLEKULAARGENEETILINE DIAGNOOSIMINE JA STRESSISÜNDROOMI ESINEMINE EESTI SEAKASVATUSETTEVÕTETES

D. Sabre, H. Viinalass, S. Värv

**ABSTRACT.** *Molecular diagnostics of porcine stress syndrome and occurrence of porcine stress syndrome in Estonian pig breeding enterprises.* A total of 477 pigs from eight Estonian pig breeding enterprises were genotyped for porcine stress syndrome and the occurrence of porcine stress syndrome was investigated. The DNA extraction method from hair roots by using 200 mM NaOH was developed.

According to the results of PCR-RFLP analysis 91.0% of pigs were stress-negative (genotype NN), 8.6% heterozygous carriers (genotype Nn) and 0.4% stress-positive (genotype nn). All genotyped pigs were stress-negative in three out of eight investigated pig breeding enterprises. The occurrence of heterozygous pigs for PSS was up to 22.9%. The stress-positive pigs were found only in one pig breeding enterprise. The frequency of porcine stress syndrome varied from 0 to 0.115, on average 0.047. The relative low occurrence of PSS can be explained by selection of boars for implementing breeding programmes.

**Keywords:** pig, porcine stress syndrome, PCR-RFLP.

## Sissejuhatus

Sigade stressisündroom e PSS (*Porcine Stress Syndrome*) on monogeense autosoomse retsessiivse geeni poolt põhjustatud pärilik sündroom, mis tekitab seakasvatusele suurt majanduslikku kahju. PSS-i võivad esile kutsuda paljud füüsilised stressorid, nagu näiteks liikumine ühest sigalast teise, emiste omavaheline võitlemine, loomade transportimine tapamajja, vaktsineerimine ja kastreerimine, tiinus, paaritamine ja ümbritseva keskkonna kõrge temperatuur. PSS-i võib esile kutsuda ka halotaanesteesia, mistõttu nimetatakse sündroomi põhjustavat geeni sageli halotaangeeniks. PSS-i põhjustavat geeni nimetatakse veel stressigeeniks, Hal-geeniks ja PSS-geeniks (Sellier, 1998; *Porcine Stress Syndrome...*, 2003). Stressigeeni kandvaid sigu võib tabada äkksurm ning pärast tapmist saadav liha on madala kvaliteediga – saadakse PSE-liha, mis on hele, pehme ja vesine (Christian, Lundstrom, 1992).

Halotaan(stress)positiivsed sead on homosügootsed retsessiivsed rüanodiinretseptori (RYR) geeni mutatsiooni suhtes (Lee, Choi, 1998). Mutantne geen asub 6. kromosoomis, kus 1843. nukleotiidis on pürimidiinialus tsütosiin (C) asendunud tümiiniga (T). See viib rüanodiinretseptorvalgu aminohappelise järjestuse muutuseni, kus 615. positsioonis muutub aminohape arginiin tsüsteiiniks (O'Brien, 1995). Rüanodiinretseptor on 350 kDa suurune valk, mis on sarkoplasmaatilise retiikulumi  $Ca^{2+}$  kanali komponent. Stresspositiivsetel sigadel on  $Ca^{2+}$  vabanemise kiiruskonstant sarkoplasmaatilisest retiikulumist kaks korda suurem kui stressnegatiivsetel loomadel, mistõttu  $Ca^{2+}$  kontsentratsioon sarkoplasmas tõuseb tunduvalt kõrgemale tasemele kui lihaste kontraktsioonitsükli käivitamiseks vajalik. Isegi  $Ca^{2+}$  ATPaasi kõrge ensümaatiline aktiivsus sarkoplasmaatilise retiikulumi membraanis (kaltsiumipump) ei ole piisav, et taastada  $Ca^{2+}$  kontsentratsiooni sarkoplasmas. Nii pikeneb lihaste kontraktsiooni stimulatsioon ja samas stimuleeritakse glükogeeni kiiret lagundamist intensiivistades metabolismi, mis viib soojuse produktsioonini.  $Ca^{2+}$  tõus sarkoplasmas põhjustab ka pH languse. Madala pH ja kuumenenud lihaste kombinatsioon vallandab valkude denaturatsiooni-protsessid, eriti müofibrillidel, mis mõjutavad vee sidumist lihas. Selle tulemuseks ongi heledad ja lõtvunud lihased, mis kaotavad palju vett ja muudavad liha tootmise väheefektiivseks (Rübensam, 2000).

Et kõik geenid esinevad paaridena, üks päritud isalt, teine emalt, siis on võimalikud kolm Hal-genotüüpi. Kui järglane pärib Hal-geeni mõlemalt vanemalt, siis on ta stresspositiivne (nn genotüüp) loom. Kui pärandub normaalne geen mõlemalt vanemalt, siis on siga stressnegatiivne (NN genotüüp), ja kui järglane saab normaalse geeni ühelt vanemalt ja Hal-geeni teiselt vanemalt, siis on ta stressigeeni kandja e heterosügoot (Nn genotüüp).

Heterosügootsed loomad on stressiresistentsed ja nende produktiivomadused (liha kvaliteet, viljakus) on sarnased stressnegatiivsete sigadega (Kuryl, Zwierzchowski, 1995). Samas on leitud, et heterosügootsetel loomadel on mitmeid eeliseid stressnegatiivsete sigade ees, nagu parem söödaväärindus, suurem tapasaagis ja suurem tailiha sisaldus lihakehas (Ellis jt, 1998; Fisher jt, 2000). Christiani (1995) uurimuse põhjal on PSS-i suhtes heterosügootsete ja stressnegatiivsete sigade erinevused kasvukiiruses ja seljapeki paksuses olematud. Nn-grupi sigadel on täheldatud vähest ( $1,9 \text{ cm}^2$ ) selja pikima lihase ristlõike pindala suurenemist. Siiski on stressigeeni kandjatel heledam lihaste värvus ja väiksem veesidumise võime (Lee, Choi, 1998). Tänavots jt (2001) leidsid Hal-

geeni kandvate ja normaalsete samas vanuseklassis olevate sigade kontrollvõrdlemisel, et suurem tõenäosus olla Hal-geeni kandja on väiksema kehamassiga sigadel.

Uurijad on märkinud positiivset korrelatsiooni RYR-geeni mutatsiooni ja lihakeha kvaliteedi vahel. Homosügootsed mutandid on õhema seljapekiga, suurema tailiha sisaldusega lihakehas ja kõrgema söödaväärdusega võrreldes heterosügootsete ja stressnegatiivsete sigadega (Kuryl, Zwierzchowski, 1995). Fisher jt (2000) järgi saadi nn genotüübiga sigadelt suurema massiga lihalõiked, kuid liha kvaliteedinäitajad olid madalamad kui NN ja Nn genotüübiga sigadel.

Santoro ja Faucitano (1996) andmetel varieerus stressitundlike sigade osatähtsus tõuti 0–88%, Christiani ja Lundstromi (1992) andmetel 0–89%. Kõige suurem on stressitundlike sigade osatähtsus pjeträäni ja belgia maatõugu sigadel. Ka Sellieri (1998) andmetel varieerub Hal-geeni sagedus maailma tõugude hulgas 0–0,97, kusjuures kõige kõrgem on see pjeträäni tõul. O'Brieni (1995) andmetel esineb PSS-i sagedamini pjeträänil ja maatõugudel, harvem hämpširi, djuroki, suurt valget ja jorkširi tõugu sigadel. Sama uurimuse kohaselt oli PSS Inglismaal rohkem levinud kui Põhja-Ameerikas ning esines USA-s sagedamini kui Kanadas.

Sigade stressisündroomi esineb ka Eesti seakarjades (Tänavots jt, 2001), sest kohalike tõugude parandamiseks kasutatakse imporditud hämpširi ja pjeträäni kulte, keda on iseloomustatud kõrge Hal-geeni sagedusega.

Sigade ristandaretuse programm Eestis käivitus 1995. aastal, mil Rootsist imporditi hämpširi tõugu ning 1999. a Austriast pjeträäni tõugu emiseid ja kulte, et võimaldada kvaliteetset lihatootmist ristandaretuse baasil (Eesti Tõusigade Aretusühistu..., 2003). Vastavalt programmile "Marmorliha" saadakse ristandsiga kolme või nelja seatõu ristamisel. Kahe ematõu, suure valge ja eesti peekoni tõu sigu ristatakse omavahel ning saadud ristandemis ristatakse veel omakorda suurt tailiha osakaalu andva isapoolse tõu pjeträäni tõugu või hämpširi või pjeträäni ja hämpširi ristandkuldiga. Ristandemis annab sellisel ristamisel suuri ja hea kasvukiirusega pesakondi ning ristandkult vähese pekipaksuse ja suure tailiha osakaaluga liha (Rätsep, 2000).

Varem kasutatud halotaantesti puhul ei olnud võimalik eristada halotaangeeni kandjaid heterosügootseid sigu stressnegatiivsetest sigadest, kuna halotaani manustamisel ei teki iseloomulikke eristatavaid tunnuseid. Test võib lõppeda stressitundlike sigade surmaga, ka on test töömahukas. Halotaantesti kasutati Eesti seafarmides 1980-ndatel aastatel. Fuyii jt (1991) poolt esimesena kirjeldatud PCR-RFLP test on võrreldes halotaantestiga täpsem meetod, kuna võimaldab eristada ka heterosügootseid isendeid.

Uurimuse eesmärgiks oli identifitseerida stressigeeni retsessiivset alleeli kandvad loomad PCR-RFLP testi põhjal ja teha kindlaks retsessiivse alleeli esinemissagedus erinevates Eesti seakasvatustevõtetes.

**Võtmesõnad:** siga, sigade stressisündroom, PCR-RFLP.

## Materjal ja meetodika

Kokku uuriti sigade stressiresistentsuse suhtes 477 siga kaheksast Eesti seakasvatustevõttest.

Uurimismaterjalina kasutati K<sub>3</sub>EDTA-ga stabiliseeritud verd ja karvu. Genoomse DNA eraldamiseks kasutati erinevaid meetodikaid. Genoomse DNA eraldamiseks verest kasutati *Puregene DNA Isolation Kit-i* (Genra), *Genomic DNA Purification Kit-i* (MBI Fermentas) ja *DNA Zol® BD Reagent* (Life Technologies). Töötati välja karvadest DNA eraldamise meetodika, mille järgi lüüsiiti proove 200 mM NaOH-ga. Proove inkubeeriti 97 °C juures 15 minutit, lisati 200 mM HCl ja 100 mM Tris-HCl (pH 8,3). Polümeraasi ahelreaktsiooni matriitsina kasutati 6 µl saadud lüsaati.

Uuritavate DNA-lõikude amplifitseerimiseks kasutati *MJ Research* termotsüklerit PTC-100-60. Iga reaktsioonisegu sisaldas 0,2 mM dNTP-sid, 1 x PCR-i puhvrit, 0,12 U Taq polümeraasi (*MBI Fermentas*), 2,5 pmol praimereid, 6 µl karvalüsaati või 30 ng verest eraldatud genoomset DNA-d ja vett lõppmahuni 36 µl. Praimerid (praimer 1: 5'-GTG CTG GAT GTC CTG TGT TCC CT-3' ja praimer 2: 5'-CTG GTG ACA TAG TTG ATG AGG TTT G-3') telliti kirjanduse põhjal (Brening, Brem, 1992) firmast *DNA Technology*. Pärast 3-minutilist denaturatsiooni 96 °C juures amplifitseeriti DNA-d 40 tsükli jooksul järgmistes tingimustes: denaturatsioon 94 °C 30 sekundit, praimerite seondumine 58 °C 30 sekundit ja ekstensioon 72 °C 30 sekundit. Lõplik ekstensioon toimus 72 °C juures 10 minutit.

Vajalikud restriksiooniensüümid (*Alw21I* ja *Hin6I*) telliti firmast *MBI Fermentas*. PCR-i produkti inkubeeriti *Alw21I* ja *Hin6I* restriksioonidega 3 tundi 37 °C juures.

Tekkinud DNA-fragmendid eraldati 3% agarosgeelil (NuSieve 3:1) ja värviti etiidiumbromiidiga. DNA fragmendid visualiseeriti UV-valguses. Geelid analüüsiti ja dokumenteeriti Bio-Capt V.99 tarkvara ja polaroidfotosid kasutades.

Alleelide sagedused arvutati genotüübisagedustest valemitega

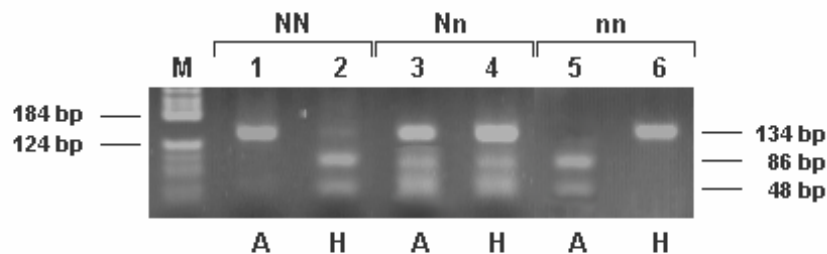
$$p = d + \frac{h}{2} \qquad q = r + \frac{h}{2},$$

kus p on N alleeli sagedus ja q on n alleeli sagedus; d, h ja r vastavate genotüüpide (NN, Nn ja nn) sagedused.

Uurimistöö viidi läbi EPMÜ Loomakasvatusteaduste instituudi geneetikalaboris.

## Tulemused ja arutelu

Sigade stressisündroomi esinemise ja leviku selgitamiseks uuriti 477 siga kaheksast ettevõttest. Sigade stressigeeni PCR produkti erinevate restriksioonifragmentide jaotus 3% agarosgeelil on kujutatud joonisel 1. Lõigates PCR produkti *Alw21I* ensüümiga on stressnegatiivsetel sigadel (NN genotüüp) geelelektroforeesil näha 134 bp pikkune fragment, NN genotüübiga sigadel PCR produkti ei lõigata; heterosügootidel e stressigeeni kandjatel (Nn genotüüp) 134, 86 ja 48 bp pikkused fragmendid ja stresspositiivsetel sigadel (nn genotüüp) 86 ja 48 bp pikkused fragmendid. *Hin6I* ensüümiga lõikamisel tekivad stressnegatiivsetel sigadel 86 ja 48 bp pikkused fragmendid, heterosügootidel 134, 86 ja 48 bp fragmendid ning stresspositiivsetel sigadel 134 bp pikkune fragment.



**Joonis 1.** Sigade stressigeeni PCR produkti restriksioonifragmentide jaotus 3% agarosgeelil. NN – stressnegatiivne, Nn – heterosügootne e stressigeeni kandja ja nn – stresspositiivne siga. M – marker pBR322 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) marker, 5. A – *Alw21I* ja H – *Hin6I*

**Figure 1.** Distribution of porcine stress gene PCR product restriction fragments on 3% agarose gel. NN – stress-negative, Nn – heterozygote, stress gene carrier and nn – stress-positive pig. M – marker pBR322 DNA/*BsuRI* (*HaeIII*) marker, 5. A – *Alw21I* ja H – *Hin6I*.

PCR-RFLP testi tulemusena osutus stresspositiivseteks (genotüüp nn) keskmiselt 0,4%, heterosügootideks (genotüüp Nn) 8,6% ja stressnegatiivseteks (genotüüp NN) 91,0% sigadest (tabel 1). Kolmes seakasvatuseetevõttes olid kõik uuritud sead stressnegatiivsed, heterosügootsete sigade osatähtsus erinevates ettevõtetes oli kuni 22,9%. Ainult ühes ettevõttes tehti kindlaks stresspositiivsed sead. Retsessiivse alleeli esinemissagedus varieerus Eesti seakasvatuseetevõtetes 0–0,115, keskmiselt 0,047. Võrreldes Leedus ja Lätis läbi viidud uurimiste tulemustega on Eestis stresspositiivsete ja heterosügootsete sigade osatähtsus väiksem, vastavalt 0,4 ja 8,6%. Miceikienė ja Jokūbka (2000) uurimuse kohaselt olid Leedus 874 seast 83% stressnegatiivsed, 13% olid heterosügootsed ja 4% stresspositiivsed. Leedus kasvatatavatest pjetraani tõugu sigadest olid 85% stresspositiivsed, 9% stressigeeni kandjad ja 6% stressnegatiivsed. Lätis läbi viidud uurimuse kohaselt (Stira jt, 2003) osutus 85% uuritud kultidest (n=60) stressnegatiivseteks, 13,3% stressigeeni kandjateks ja 1,7% kultidest stresspositiivseteks.

Kahjuks ei olnud teada kõigi uuritud sigade tõuline kuuluvus, mistõttu ei olnud võimalik teha järeldusi stressigeeni sageduse kohta tõuti, kuid Eestis tehtud varasema uuringu põhjal (Tänavots jt, 2001) ei ole soome jorkširidel ja ristanditel mutantset n-alleeli leitud, eesti peekoni ja eesti suurel valgel tõul on n-alleeli esinemissagedus olnud vastavalt 0,075 ja 0,125.

**Tabel 1.** Sigade stressiresistentsuse DNAanalüüsi tulemused  
**Table 1.** The results of pigs stress resistance by DNA analyse

Omanik <i>Owner</i>	Uuritud sigu <i>No. of investigated pigs</i>	Uuritud sigadest / <i>Investigated pigs</i>			PSS esinemissagedus <i>Frequency of PSS</i>	
		stressnegatiivsed <i>stress negative</i>	heterosügoidid <i>heterozygote</i>	stresspositiivsed <i>stress positive</i>	N	n
		n	%	%		
1	48	77,1	22,9	0,0	0,885	0,115
2	21	100,0	0,0	0,0	1,000	0,000
3	17	100,0	0,0	0,0	1,000	0,000
4	59	91,5	8,5	0,0	0,957	0,043
5	148	90,5	8,1	1,4	0,946	0,054
6	97	100,0	0,0	0,0	1,000	0,000
7	51	86,3	13,7	0,0	0,931	0,069
8	36	91,7	8,3	0,0	0,958	0,042
<b>Kokku/Total</b>	<b>477</b>	<b>91,0</b>	<b>8,6</b>	<b>0,4</b>	<b>0,953</b>	<b>0,047</b>

Homosügootse retsessiivse genotüübi sagedus varieerub nii tõuti kui ka maast sõltuvalt. 1991–1993. aastal tehtud rahvusvaheline test (National Barrow Show™) näitas, et stressigeeni sagedus oli kaheksa tõu piires (berkšir, tšesteri valge, djurok, hämpšir, landrass, hiina tõug, täpiline ja jorkšir) keskmiselt 0,07. Näitajad kõikisid tõuti 0-st tšesteri valgel kuni 0,43-ni Poolas kasvatataval hiina tõul (Porcine Stress Syndrome..., 2003). Fuyii jt (1991) põhjendavad suurenenud stressitundlikkust ülemaailmse aretuse tagajärjena, sest aretus on suunatud tailiha osatähtsuse ja lihaselisuse suurendamisele.

Maailma seakasvatavad on püüdnud paaridevalikuga elimineerida PSS-mutatsiooni aretuskarjadest, kuid on teada, et DNA regioon, milles mutatsioon esineb, omab väga tähtsat rolli keharasva vähenemises. Et sealihaga tarbijad nõuavad jätkuvalt taisyemat liha, siis on aretajad säilitanud mutatsiooni seapopulatsioonides (Miceikienė, Jokūbka, 2000).

Ristandaretusprogrammi "Marmorliha" rakendamisel tuleks kohalike emiste paaritamisel imporditud või mitme tõu ristandkultidega kasutada teadaoleva PSS-määranguga kulte, vältimaks retsessiivsete homosügootide saamist.

## Kokkuvõte

Käesoleva uurimistöö eesmärgiks oli identifitseerida stressigeeni retsessiivset alleeli kandvad sead ja kindlaks teha retsessiivse alleeli esinemissagedus erinevates Eesti seakasvatustevõtetes. Uuringu tulemusena selgus, et 477-st seast 8,6% osutasid stressigeeni suhtes heterosügootseks ja 0,4% stresspositiivseteks. Erinevates ettevõtetes oli retsessiivse alleeli esinemissagedus kuni 0,115. PSS-i suhteliselt madalat keskmist esinemissagedust Eesti seapopulatsioonis saab selgitada ristandaretusprogrammi valitud sigade kasutamisega.

Selleks, et aretajad saaksid edukalt rakendada ristamiskeeme, on vajalik teada ristamiseks kasutatavate sigade, eelkõige kultide stressimäärangut. Stressimääranguga arvestamine võimaldab paaridevalikuga vältida soovimatut defekti levikut seapopulatsioonides, vähendada sigade äkksurmast saadavat majanduslikku kahju ja vähe kvaliteetse sealihaga osatähtsust lihatööstustes.

## Kirjandus

- Brening, B., Brem, G. 1992. Molecular cloning and analysis of the porcine "halotane" gene. – Arch. für Tierzucht. Dummerdorf 35 (1/2), 129–135.
- Christian, L. L. 1995. Clarifying the impact of stress gene. – National Hog Farmer 40 (6), 44–46.
- Christian, L. L., Lundstrom, K. 1992. Porcine Stress Syndrome. In: Diseases of Swine. Ed. by: Lemen A. D., Straw B. E. etc. 7th Ed. – Iowa State University, p. 763–769.
- Eesti Tõusigade Aretusühistu. Eesti kvaliteetsealihaga tootmise programm "Marmorliha". 2003. [<http://hot.ee/estpig/etsay/eesmargid.html>]. 10. juuni 2003.

- Ellis, M., McKeith, F. K. and Miller, K. D. 1998. The effects of genetic and nutritional factors on pork quality. – Proceedings. Pre-conference symposia. The 8<sup>th</sup> World Conference on Animal Production. Seoul, Korea, p. 157–170.
- Fisher, P., Mellett F. D., Hoffman L. C. 2000. Halothane genotype and pork quality. 1. Carcass and meat quality characteristics of three halothane genotypes. – *Meat Science* 54, 97–105.
- Fuyii, J., Otsu, K., Zorzato, F., De Leon, S., Khann, V. K., Weiler, J., O'Brien, P. J. and MacLennan, D. H. 1991. Identification of a Mutation in Porcine Ryanodine Receptor Associated with Malignant Hyperthermia. – *Science* 253, 448–451.
- Kuryl, J. and Zwierzchowski, L. 1995. Heterogeneity of structural genes and its application in animal breeding. – *Animal Science Papers and Reports* 13 (4), 125–130.
- Lee, Y. B. and Choi, Y. I. 1998. PSE (Pale, Soft, Exudative) Pork: The Causes and Solutions. – Proceedings. Pre-conference symposia. The 8<sup>th</sup> World Conference on Animal Production. Seoul, Korea, p 139–146.
- Miceikiene, I., Jokūbka, R. 2000. Porcine Stress Syndrome (PSS) – identification, gene frequencies and selection for stress resistant pigs. – Proceedings of the 6th Baltic Animal Breeding Conference. Jelgava 27–28 April 2000. Jelgava, Latvia, p 16–18.
- O'Brien, P. J. 1995. The causative mutation for porcine stress syndrome. – *The Compendium*. February, 257–295.
- Porcine Stress Syndrome and its effects on maternal, feedlot and carcass quantitative and qualitative traits. [<http://www.utextension.utk.edu/pbfiles/PB1606.pdf>]. 2. juuni 2003.
- Rätsep, M. 2000. Ristandaretusprogrammi "Marmorliha" põhimõtted, edusammud ja probleemid. – *Tõuloomakasvatuse* 3, 8–9.
- Rübensam, J. M. 2000. Post mortem changes and pork quality. [[http://www.cnpsa.embrapa.br/pork/anais00cv\\_jane\\_en.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/pork/anais00cv_jane_en.pdf)]. 2. juuni 2003.
- Santoro P., Faucitano, L. 1996. Stress in pig production. – *Pig News and Information*. Vol. 17, 2, 49N–52N.
- Sellier, P. 1998. Genetics of Meat and Carcass Traits. In: *The Genetics of Pig*. Ed. by: Rotschild, F. M., Ruvinsky, A. – New York, CAB International, p. 463–510.
- Stira, A., Raminš, E., Nudiens, J., Kaugers, R., Veide, Dz. 2003. Porcine stress syndrom (PSS) in purebred and crossbred Latvian pigs. – Proceedings of the 9<sup>th</sup> Baltic Animal Breeding Conference. Sigulda 29–30 May 2003. Sigulda, Latvia, p. 92–95.
- Tänavots, A., Somelar, E., Viinalass, H., Värvi, S., Kaart, T., Saveli, O., Eilart, K., Pöldvere, A. 2001. Pork quality and porcine stress syndrome in Estonia. – Proceedings of the Latvian Academy of Sciences. Section B, Vol. 55, 5/6 (616/617), 242–246.

### Tänuavaldused

Uurimistöo on läbi viidud Eesti Teadusfondi rahalisel toel (grant nr 5001). Autorid on tänulikud kõigile, kes olid abiks uurimismaterjali kogumisel.

## Molecular Diagnostics of Porcine Stress Syndrome and Occurrence of Porcine Stress Syndrome in Estonian Pig Breeding Enterprises

D. Sabre, H. Viinalass, S. Värvi

### Summary

The aim of this investigation was molecular diagnostics of the porcine stress syndrome and occurrence of porcine stress syndrome in Estonian pig breeding enterprises. In Estonia the pig crossbreeding programme was implemented in 1995 when Hampshire boars from Sweden and the Pietrain sows and boars from Austria in 1999 were imported to produce high quality pork by using crossbreeding.

A total of 477 pigs from eight pig breeding enterprises were investigated. DNA was isolated from blood by using following commercial kits: Puregene DNA Isolation Kit (Gentra), Genomic DNA Purification Kit (MBI Fermentas) and DNA Zol® BD Reagent (Life Technologies). DNA from hair was obtained by lysing hair roots with 200 mM NaOH and 6 µl of the lysate was used for PCR.

A PCR reaction mixture with the final reaction volume of 36 µl contained 0.2 mM dNTP, 1xPCR Reaction Buffer, 0.12 U Taq DNA Polymerase (*MBI Fermentas*), 2.5 pmol of each primers (primer 1: 5'-GTG CTG GAT GTC CTG TGT TCC CT-3' and primer 2: 5'-CTG GTG ACA TAG TTG ATG AGG TTT G-3', Brening and Brem,

1992) from *DNA Technology* and 6 µl of lysate from hair roots or 30 ng of genomic DNA isolated from blood. After 3 min denaturation at 96 °C, DNA was amplified for 40 cycles under the following conditions: denaturation at 94 °C for 30 seconds, annealing at 58 °C for 30 seconds and extension at 72 °C for 30 seconds. The final extension was at 72 °C for 10 minutes. The PCR product (134 bp) was digested with *Alw21I* and *Hin6I* (*MBI Fermentas*) at 37 °C for 3 hours. The DNA fragments were separated on a 3% agarose (NuSieve 3:1) gel and stained with ethidium bromide.

Digestion of PCR product by *Alw21I* yields one 134 bp fragment for stress-negative pigs (genotype NN), three fragments of 134, 86 and 48 bp for heterozygotes (Nn) and two fragments 86 and 48 bp for stress-positive pigs (genotype nn). Digestion of PCR product by *Hin6I* yields 86 and 48 bp fragments for stress-negative pigs (genotype NN), three fragments of 134, 86 and 48 bp for heterozygotes (Nn) and the 134 bp fragment for stress-positive pigs (genotype nn). The distribution of porcine stress gene PCR product restriction fragments on 3% agarose gel is presented (Figure 1).

According to the results of PCR-RFLP analysis 91.0% of pigs were stress-negative (genotype NN), 8.6% heterozygous carriers (genotype Nn) and 0.4% stress-positive (genotype nn). All genotyped pigs were stress-negative in three out of eight investigated pig breeding enterprises (Table 1). The occurrence of heterozygous pigs for PSS was up to 22.9%. The stress-positive pigs were found only in one pig breeding enterprise. The frequency of porcine stress syndrome varied from 0 to 0.115, on average 0.047. Unfortunately the breed information for all genotyped pigs was not available. The relative low occurrence of PSS can be explained by selection of boars for implementing breeding programmes.

For implementing the breeding and crossbreeding programmes the status of porcine stress syndrome, especially for the boars, is needed. Knowing of PSS status of pigs will help breeders to perform selection to avoid distribution of undesirable defect in the pig populations, diminish the economic loss caused by stress-induced sudden death of pigs and diminish the share of low quality pork in the pork industry.