



liegt wesentlich über dem Wert von Rapsschrot (Abb. 3). Hingegen in absoluten Zahlen ausgedrückt, ist die Erbse eine bescheidene Rohprotein- und APD-Quelle, die aber ein vorteilhaftes Aminosäuremuster aufweist. Der Gehalt an essentiellen Aminosäuren ist im Vergleich zu Soja- und Rapsschrot als gut einzustufen (Abb. 4; Rulquin *et al.* 1993).

Die Erbse interessanter als die Ganzpflanze

Der interessante Teil der Erbsenpflanze ist die Erbse selbst. Sie besitzt einen hohen Energiewert bei einem etwas bescheideneren APD-Gehalt. Daraus resultiert ein für die Milchproduktion ausgeglichenes Futter. Vorteilhafterweise wird die Erbse als Ersatz für einen Teil der Schrote im Kraftfutter mit mittlerem Rohproteingehalt verwendet, wie das bei ausgeglichene Leistungsfutter für Milchkühe der Fall ist.

Wegen möglicher erdiger Verunreinigungen und einer mittelmässigen Siliereignung sollte die Ganzpflanze nur aus-

nahmsweise zu Futterzwecken eingesetzt werden.

LITERATUR

Andrieu J., Demarquilly C. et Le Du J., 1982. Valeur alimentaire de la plante entière de féverole, de lupin, de pois et de soja sur pied et après ensilage. Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix, I.N.R.A., 47, 19-26.

CVB, 1991. Veevoedertabel. Centraal veevoederbureau, Lelystad.

Hoden A., 1982. Valeur nutritive des légumineuses à graines pour ruminants et utilisation par les vaches laitières. Bull. Techn. C.R.Z.V. Theix, I.N.R.A., 49, 27-31.

Rulquin H., Guinard Jocelyne, Vórité R. et Delaby L., 1993. Teneurs en Lysine et Méthionine digestibles des aliments pour ruminants. Tables. Station de Recherches sur la Vache Laitière, I.N.R.A., Saint Gilles.

Wyss U., 1994. Gärqualität von Gerste-Proteinerbse-Ganzpflanzensilagen. *Agrarforschung* 1 (1), 19-21.

RÉSUMÉ

Valeur nutritive du pois protéagineux pour le ruminant

L'ensilage de plante entière de pois a une valeur énergétique et une teneur en

PAI comparables à celles d'un ensilage de maïs de qualité moyenne. Les risques de souillures de terre à la récolte et son aptitude à l'ensilage qui n'est pas excellente devraient limiter son utilisation à des cas palliatifs.

Avec sa valeur énergétique élevée et sa valeur azotée satisfaisante, la graine de pois est un composant nutritionnellement intéressant pour le ruminant dans des aliments concentrés ayant des teneurs moyennes en matière azotée.

SUMMARY

Nutritive value of pea for ruminants

The whole plant silage of pea has an energy value and a content of absorbable proteins in the intestine similar to a maize silage of medium quality. The risk of soil contamination at harvest and its limited ability to be ensiled restrict its use mainly to forage scarcity.

The pea seed has a high energy value and a good protein value. It is therefore an interesting ingredient for ruminant mixed feed with medium protein content.

KEY WORDS: whole plant of pea, pea seed, digestibility, nutritive value

NUTZTIERE



Der MHS-Test: ein Durchbruch im Kampf gegen das Schweinestress-Syndrom

Peter VÖGELI, Hans-Rudolf FRIES, Roger BOLT und Gerald STRANZINGER, Institut für Nutztierwissenschaften, ETH-Zentrum, CH-8092 Zürich

Mit dem MHS (engl. malignant hyperthermia susceptibility)-Test werden Schweine entdeckt, die durch Einwirkung von Stressoren das Schweinestress-Syndrom (PSS) entwickeln können. Diese genetisch bestimmte Krankheit führt zu hohen wirtschaftlichen Verlusten infolge Herztod und Fleischqualitätsmängeln. Die genetische Mutation, die PSS verursacht, ist bekannt. Der neue Test beruht auf molekulargenetischen Methoden und ersetzt weitgehend den traditionellen Halothantest.

Die bekannte Stressanfälligkeit des Schweines ist eine Erbkrankheit. Diese Krankheit wird auch als Schweinestress-Syndrom (engl. porcine stress syndrome, PSS) bezeichnet. PSS manifestiert sich unter anderem durch Transporttod und durch PSE- und DFD-Fleisch. PSE bedeutet blasses, weiches, wässriges Fleisch und DFD dunkles, festes, trockenes Fleisch. Die Stressanfälligkeit verursacht vor allem bei fleischreichen Rassen wie Pietrain und Belgische Landrasse bedeutende Verluste für die Schweinezüchter.

Beim Veredelten Landschwein sind stressanfällige Tiere durch die konsequente Zuchtauswahl selten geworden. Als Entscheidungsgrundlage diente der sogenannte Halothantest. Bei diesem Test wird durch Verabreichung des Narkosemittels Halothan bei Tieren mit erblich bedingter Stressanfälligkeit eine charakteristische Reaktion ausgelöst: die Muskeln und Gliedmassen versteifen sich, die Körpertemperatur steigt an (Maligne Hyperthermie, MH) und die Atem- und Pulsfrequenz erhöht sich. Sofern die Halothannarkose

bei positiv reagierenden Tieren nicht sofort abgebrochen wird, tritt der Tod ein.

Ursache der halothan-induzierten Malignen Hyperthermie und Muskelstarre

Amerikanische Forscher (Mickelson und Louis 1992) zeigten, dass die halothaninduzierte MH und Muskelstarre auf eine veränderte Konzentration des freien Kalziums in der Muskelzelle zurückzuführen ist, und dass darum im Zusammenhang mit dieser Krankheit das sogenannte «Calcium Release Channel» Protein bedeutungsvoll ist. Dieses Protein ist auch unter dem Namen Ryanodin-Rezeptor bekannt; der entsprechende Genort wird als RYR1

bezeichnet. Ryanodin ist eine Substanz (Alkaloid), die in einer exotischen Pflanze vorkommt. Bei halothanempfindlichen Tieren ist die Fähigkeit des Rezeptors, das Ryanodin zu binden, verändert. Die gestörte Aufnahme und Abgabe von Kalzium in das Innere und aus der Muskelzelle führt bei halothanempfindlichen Schweinen zu einer verzögerten Einleitung der Muskelentspannung.

Genetische Basis der Malignen Hyperthermie

Die Überempfindlichkeit auf Halothan ist auch beim Menschen bekannt. Der entsprechende Genort heisst hier MHS. Die Erbinformation des RYR1-Gens ist beim Menschen und auch beim Schwein entschlüsselt worden. Mit molekulargenetischen Methoden konnte das Gen auf Chromosom 6 des Schweines zugewiesen werden (Davies *et al.* 1988). Beim Menschen und beim Schwein fällt die chromosomale Lage von MHS und HAL (Halothanangort) zusammen. Dies zeigt, dass das RYR1 Genprodukt mit dem MHS- beziehungsweise HAL-Genprodukt mit grosser Wahrscheinlichkeit identisch ist. Um die Vererbung der Halothanreaktionen zu verstehen, sind einige Erklärungen zur Vererbungslehre nötig. Die Chromosomen sind in jedem Zellkern paarweise vorhanden. Je ein Chromosom eines Paares stammt dabei vom Vater und das andere von der Mutter. Halothanempfindliche Tiere haben nun sowohl vom Vater als auch von der Mutter eine ganz bestimmte veränderte Version des Gens (HAL n/n) erhalten. Solche Tiere sind reinerbig (homozygot) für das veränderte Gen. Tiere, die eine normale und eine veränderte Version des entsprechenden Gens (HAL N/n) erhalten haben, sind mischerbig (hetero-

zygot). Sie reagieren normalerweise nicht auf den Halothantest. Auch die für die normale Genversion homozygoten Tiere (HAL N/N) sind halothannegativ.

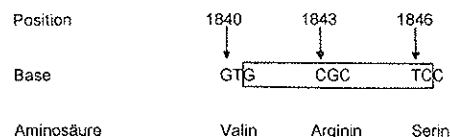
Hauptbestandteil der Chromosomen und Baustoff der Gene ist die DNS (Desoxyribonucleinsäure), die aus der Aneinanderreihung der vier Bausteine (Basen) Adenin (A), Cytosin (C), Thymin (T) und Guanin (G) besteht. Bei Erbkrankheiten wie dem PSS ist die Abfolge der Bausteine im verantwortlichen Gen verändert. Kanadischen Forschern (Fujii *et al.* 1991) ist es gelungen, das für das PSS verantwortliche Halothangen zu charakterisieren und die bei Halothanempfindlichkeit an einer ganz bestimmten Stelle ausgetauschte Base zu bestimmen. Während in der normalen Version an der Position 1843 die C Base vorliegt, findet sich an der gleichen Stelle des veränderten Gens die Base T (Abb. 1).

Solche Veränderungen nennt man Punktmutationen. Dadurch ändert sich die Aminosäurezusammensetzung des CRC-Proteins in dieser Position vom Arginin zum Cystein. Die Funktion des CRC-Proteins ist damit gestört.

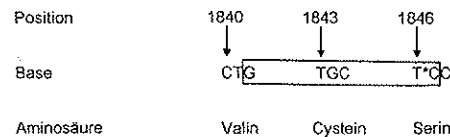
Methode zur Bestimmung der C zu T Punktmutation Polymerasekettenreaktion

Für die Bestimmung der C zu T Punktmutation verwenden wir die sogenannte Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR). Diese Methode hat die Molekulargenetik revolutioniert. Für die Entdeckung der PCR-Methode wurde Mullis 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet. PCR erlaubt die millionenfache Vermehrung eines bestimmten DNS-Abschnittes aus dem

Normale Sequenz



Mutierte Sequenz



Basen: C = Cytosin, G = Guanin, T = Thymin

Abb. 1. Schematische Darstellung der Punktmutation im CRC (RYR1) Gen, die für die Maligne Hyperthermie (MH) (Halothanreaktion) verantwortlich ist. Die Änderung der normalen Sequenz G CGC TC, beginnend bei Base 1842, zur mutierten Sequenz G TGCTC führt zu einer Schnittstelle mit dem Restriktionsenzym BsiHKAI.

* Bezeichnet die Schnittstelle

Gesamtgenom (Summe aller Gene einer Art). Die Voraussetzung für die Anwendung der PCR-Methodik ist, dass an den beiden Enden des DNS-Abschnittes, der vermehrt werden soll, die Sequenz von 20 bis 30 Basen bekannt ist. Damit ist der interessierende DNS-Abschnitt definiert. Im Labor werden dann kurze DNS-Stücke (Starter) künstlich hergestellt, die zu den endständigen Sequenzen komplementär sind. Die Starter können sich über Paarung mit den DNS-Bausteinen verbinden. Wenn die Starter zu einem gesamten DNS-Gemisch gegeben werden, dessen Doppelstränge vorher durch Erhitzen in ihre Einzelstränge zerlegt worden sind, verbinden sie sich mit den komplementären Stellen, das heisst mit den Enden des Abschnittes, der vermehrt werden soll (Abb. 2). Die gebundenen Starter sind Ausgangspunkt für den Aufbau neuer DNS. Diese Reaktion wird durch das Enzym Polymerase bewerkstelligt und bedingt die Zugabe von freien DNS-Bausteinen. Die neuen DNS-Stränge werden gemäss Vorlage, das heisst der DNS-Bausteinabfolge nach den Startern, aufgebaut. Das DNS-Gemisch wird anschliessend wieder erwärmt, und nach einer Abkühlung können sich die Starter wieder neu anlagern. Durch den Vorgang der Erhitzung der DNS, Anlagerung der Starter und Neuaufbau von DNS wird jedesmal eine neue Verdopplungsrunde eingeleitet bis mehrere Millionen identischer DNS-Zielfragmente vorliegen. Für das zyklische Erhitzen und Abkühlen sind speziell konstruierte programmierbare Geräte verfügbar. Der zyklische PCR-

Tab. 1. Vergleich der RYR1 Genotypen bestimmt durch molekulargenetische Analyse (MHS-Test) mit den Halothanotypen, bestimmt durch Halothantest und Nachkommenprüfung zur Definition des Schweine-Stress-Syndrom Status in verschiedenen Rassen

Halothantest A	MHS-Test B	% Nicht-Übereinstimmung (A-B)
+ ¹ (67) ²	T/T (70)	4,3
- (167)	C/T (168)	0,6
+ (1)	C/C (154)	0,0

¹ Halothantest, (+) = Reagenten, (-) = Nichtreagenten

² Anzahl Tiere

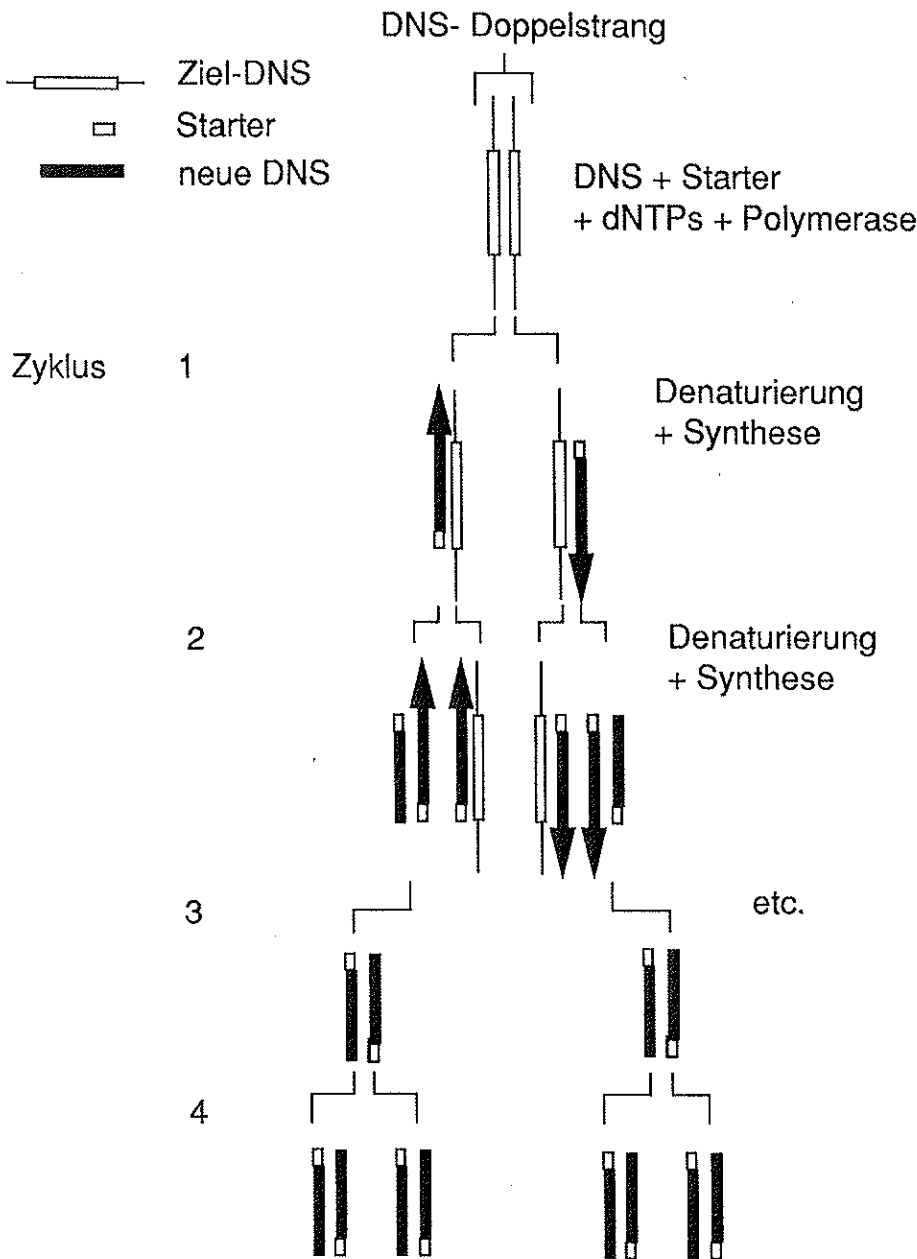


Abb. 2. Darstellung des Prinzips der Polymerasekettenreaktion (PCR). Die PCR ist ein zyklischer Prozess, bei dem sich die Zahl der interessierenden DNS-Abschnitte mit jeder Runde verdoppelt. Die Zahl der Kopien wächst exponential, binnen weniger Stunden auf mehr als 100 Millionen (Fries 1992).

DNS=Desoxyribonucleinsäure, dNTPs = freie DNS-Bausteine (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin).

Prozess führt zu einer starken Anreicherung des gewünschten Zielfragmentes.

Verdauung der DNS-Zielfragmente und ihre Darstellung

Die durch die PCR-Methode angereicherten DNS-Zielfragmente werden mit dem Restriktionsenzym BsiHKAI verdaut. Dieses durchtrennt überall dort die DNS-Zielfragmente, wo es auf die Basensequenz GTGCTC trifft. Nach Abbildung 1 ist dies bei der mutierten Sequenz der Fall. Die normale Sequenz weist nicht diese Abfolge von Basen auf. Unterschiedlich

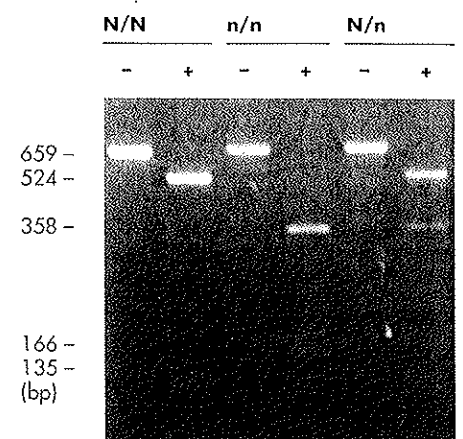
Abb. 3. Entdeckung der Schweine C1843 zu T Mutation im RYR1 Gen durch Anreicherung und anschließende Verdauung des angereicherten Produktes mit dem Restriktionsenzym BsiHKAI. Die erste Linie (-) zeigt das angereicherte Polymerasekettenreaktionsprodukt, während die zweite Linie (+) dasselbe Produkt nach der Verdauung zeigt. Die Verdauung von DNS eines stressresistenten N/N Typs erzeugt 524- und 135 Basenpaar (bp)- Fragmente, die von einer konstanten BsiHKAI Schnittstelle herrühren. Die konstante Schnittstelle ist unabhängig vom Halothangenotyp und kommt bei allen Tieren vor. Die Verdauung von DNS eines stressanfälligen n/n Typs erzeugt 358-, 166- und 135 bp Fragmente, die von einer Kombination der Verdauung von der konstanten und der wechselnden BsiHKAI Schnittstelle kommen. Die wechselnde Schnittstelle ist jene, die den Halothangenotyp bestimmt. Fragmente von 524-, 358-, 166- und 135 bp werden in einem mischerbigen N/n Typ erzeugt.

grosse Fragmente können in einem Gel aufgetrennt (Elektrophoreseverfahren) und durch Anfärbung mit fluoreszierenden Stoffen sichtbar gemacht werden. Kleine Fragmente wandern schneller, grössere langsamer. In Abbildung 3 ist die elektrophoretische Auftrennung je eines reinerbigen C/C (N/N) und T/T (n/n) Tieres sowie eines mischerbigen C/T (N/n) Tieres dargestellt.

Die 1843 C zu T Mutation ist Ursache für Schweinestress-Syndrom

Um dies zu erklären, haben wir 392 Schweine von verschiedenen Rassen auf das Vorkommen der 1843 C zu T Mutation untersucht (Bolt 1992; Vögeli *et al.* 1993). Alle diese Tiere wurden auch dem Halothantest unterzogen.

Ein Vergleich der Übereinstimmung der RYR1 Genotypen, die durch molekular-genetische DNS-Analyse (MHS-Test) bestimmt wurden, mit den Halothangenotypen, die durch Halothantest und Nachkommenprüfung bestimmt wurden, ist in Tabelle 1 dargestellt. Von den 68 Halothanreagenten waren 67 T/T im MHS-Test. Ein halothanempfindliches Tier zeigte den Genotyp C/T. Von den 324 halothanresistenten Tieren waren 321 C/T oder C/C, und nur drei wiesen den Typ T/T im MHS-Test auf. Die drei von 70 (4,3 %) T/T Schweinen, die nicht reagierten (falsch negativ) und das einzige Tier von 168 C/T (0,6 %) Schweinen, das reagierte (falsch positiv), liegt innerhalb des Streubereichs falscher Halothantestresultate. Es kann daher der Schluss gezogen werden, dass Übereinstimmung zwischen den C/C, C/T und T/T MHS-Genotypen und den Halothangenotypen N/N, N/n und n/n besteht. Die 1843 C zu T



Mutation im RYR1 Gen ist folglich die Ursache für die halothaninduzierte Maligne Hyperthermie.

Patentierung der Technologie des MHS-Tests und Schutzmarken

In 45 Ländern wurden Patente durch die Universitäten Toronto und Guelph angemeldet. Angaben zur Lizenzierung des Tests beziehungsweise Benützung der MHS-Testergebnisse in der Zucht können bei folgender Adresse bezogen werden: Innovations Foundations, 203 College St, Suite 205, Toronto, Ontario M5T 1P9, Canada.

Der Patentbescrieb enthält folgende Bestimmungen:

Lizenzen für Züchter und/oder Zuchtorganisationen sind bei der oben angegebenen Adresse zu beantragen. Die Züchter oder Zuchtorganisationen haben dann das Recht, ihre untersuchten Zuchtschweine und deren Nachkommen mit einer Schutzmarke (RYR1: C/C, C/T, T/T) zu versehen. Diese Schweine sind dann bezüglich dieser Mutation patentiert. Die Züchter können die Tests in einem von ihnen beauftragten Servicelabor durchführen lassen. Das Labor hat in diesem Falle keine Gebühr mehr an die Lizenzgeber zu bezahlen.

Die Höhe der Lizenzgebühr pro Tier richtet sich nach der Anzahl Tests pro Jahr, die von einer Organisation beansprucht wird (ca. Fr. 15.— pro Test). Zusätzlich muss für jedes verkaufte Zuchttier, oder jedes Tier, das vor dem Schlachten in der Zucht eingesetzt wurde und bei dem die 1843 C zu T Mutation bekannt ist, eine Schutzgebühr entrichtet werden. Diese beträgt 1% des Nettoverkaufspreises. Sofern Nachkommen von getesteten Eltern, bei denen der Genotyp der RYR1 Mutation von den Genotypen der Eltern abgeleitet werden kann, in der Zucht eingesetzt werden, muss für die Nachkommen die Schutzgebühr ebenfalls bezahlt werden. Für die Bestimmung der RYR1 1843 C zu T Mutation wird das PCR-Verfahren angewendet. Inhaber des PCR-Patentes ist die Firma Hoffmann-La Roche (Roche Molecular Systems). Labors, die diese Verfahren kommerziell anwenden, werden voraussichtlich ebenfalls Gebühren entrichten müssen.

Folgerungen für die Praxis

Der auf molekulargenetischen Methoden beruhende MHS-Test erlaubt, PSS emp-

findliche Tiere zu entdecken. Der grosse Vorteil dieses Tests liegt in der hohen Genauigkeit der Testmethode im Vergleich zum Halothantest. Er identifiziert beide Tiergruppen: Reagenten und Schweine, die nicht reagieren, aber Träger des mutierten Gens sind, das zu PSS führt. Der neue Test bietet daher die Möglichkeit, das schadhafte Gen aus einer Population auszuschalten, was bisher praktisch unmöglich war. Ebenfalls kann das Halothangen in selektionierten Linien so manipuliert werden, dass hohes Wachstum und gute Fleischigkeit erreicht wird, ohne Risiko von vermehrten PSS Problemen und damit verbundenen Fleischqualitätsmängeln.

Untersuchungen von Vögeli *et al.* (1992) zeigten, dass zwei von RYR1 benachbarte Genorte auf Chromosom 6, die Blutgruppe H und das Enzymssystem Phosphohexose Isomerase, mit der Empfindlichkeit für die Infektion durch hoch ansteckende *Escherichia coli* Bakterien, die Ödemkrankheit verursachen, in einem Zusammenhang stehen. Da die Empfindlichkeit gegen Ödemkrankheit oft mit dem HAL^N (halothanresistente Variante) einhergeht, ist bei der Zucht auf halothanresistente Tiere Vorsicht geboten.

DANK

Wir danken Elisabeth Wenk für ihren unermüdlichen Einsatz im Labor und Ursula Lenherr für die Reinschrift des Manuskripts. Die Forschungsarbeiten werden von der ETH Zürich und der Trägerorganisation des Blutgruppenlabors (MLP, Primärzucht, UFA, KVZ, SSZV, Suissem, Fritz Marti, Provimi, IGA, Uniporc, Prosus) finanziell unterstützt.

LITERATUR

Bolt R., 1992. Diagnose der Halothanempfindlichkeit des Schweines durch die Identifizierung von Polymorphismen im Gen eines Kalziumfreisetzungskanals mit molekulargenetischen Methoden. Diss. ETH Nr. 9846. 104 S.

Davies W., Harbitz I., Fries R., Stranzinger G. and Hauge J.G., 1988. Porcine malignant hyperthermia carrier detection and chromosomal assignment using a linked probe. *Anim. Genet.* 19, 203-212.

Fujii J., Otsu K., Zorzato F., DeLeon S., Khanna V.K., Weiler J.E., 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.

Fries R., 1992. Grundkenntnisse für den Einsatz der Molekulargenetik in der Tierzucht. Weiterbildungskurs SVIAL Zollikofen und ETH Zürich vom 7./8. April 1992. 14 S.

Mickelson J.R. and Louis C.F., 1992. Calcium (Ca²⁺) regulation in porcine skeletal muscle - review. In: *Pork Quality: Genetic and Metabolic Factors* (ed. by E. Puolanne and D.I. Demeyer). CAB International, Wallingford, UK, pp. 160-184.

Vögeli P., Fries R., Bolt R., Gerwig C., Affentranger P., Künzi N., Bertschinger H.U., and Stranzinger G., 1992. Genetics of porcine stress and association with oedema disease. In: *Pork Quality: Genetic and Metabolic Factors* (ed. by E. Puolanne and D.I. Demeyer). CAB International, Wallingford, UK, pp. 22-36.

Vögeli P., Bolt R., Fries R. and Stranzinger G., 1993. Cosegregation of the malignant hyperthermia and the Arg⁶¹⁵ - Cys⁶¹⁵ mutation in the skeletal muscle calcium release channel protein in five European Landrace and Pietrain pig breeds. *Anim. Genet.* (in press).

RÉSUMÉ

Le test MHS: une percée dans la bataille contre le syndrome du stress porcin

Une simple mutation ponctuelle dans le gène du muscle squelettique Ryanodine receptor (RYR1) est responsable de l'hyperthermie maligne (MH) ou réaction à l'halothane chez le porc. Ces résultats montrent que la modification de la séquence des bases de C à T à la base 1843 est la raison principale pour l'hyperthermie maligne. Le test ADN (MHS-test) est précis et permet la manipulation du gène MH dans des programmes d'élevage de porcs. Cependant, les avantages et désavantages économiques doivent être pondérés au cas d'une manipulation de la fréquence du gène MH. Il est prévu de breveter la procédure de détection de la mutation. S'il y a une brevetisation, il y aura des droits de licence pour tous les animaux testés.

SUMMARY

The MHS-test: a breakthrough in the battle against porcine stress syndrome

A single point mutation in the gene for skeletal muscle ryanodine receptor (RYR1) is correlated with malignant hyperthermia (MH) in pigs. The substitution of T for C at nucleotide 1843 has been shown to be the causative mutation in porcine MH. A DNA-based test (MHS-test) is accurate and will provide the basis for manipulating the MH gene in pig breeding programs. However, the extent to which the frequency of the MH gene should be manipulated should be based on economic and animal welfare considerations. The use of the technology for carrying-out the MHS-test is subject to a patent application. If the patent will be granted trademark royalty payments for all tested animals will be due.

KEY WORDS: pigs, malignant hyperthermia, molecular genetic methods.