
Polimorfismos de nucleótido simple asociados a servicios por concepción en cerdas infectadas con el virus del PRRS

C. M. Aguilar-Trejo¹, J.A. Romo-Rubio¹, R. Zamorano-Algandar², G. Luna-Nevárez², M.G. Thomas³, R.M. Enns³, S.E. Speidel³, M.A. Sánchez-Castro³, J.R. Reyna-Granados², P. Luna-Nevárez^{2*}

¹Colegio de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma de Sinaloa, 80260, Culiacán Rosales, Sinaloa, México.

²Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, CP 85000 Cd. Obregón Sonora, México.

³Department of Animal Sciences, Colorado State University; P.C. 80523-1171, Fort Collins, CO.

Single nucleotide polymorphisms associated with services per conception in sows infected with PRRS virus.

Abstract

The porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) is a disease that causes economic losses in global swine industry and is characterized by affecting the reproductive performance of sows. The objective of the present study was to identify single nucleotide polymorphisms (SNP) that are associated with the number of services per conception in the first pregnancy (NSC1) in breeding sows infected with the PRRS virus. The investigation included 53 sows Landrace/Yorkshire line previously detected as positive to PRRS virus by PCR. A blood sample from each of the sow was collected and fixed in FTA-Cards™ cards. These cards were sent to Geneseek lab for to genotype 10,000 SNP. A mixed model effects was used to identify five SNP associated to NSC1 ($P < 0.001$), which were rs81364943, rs81382736, rs80976363, rs80890869 and rs81460050. The effect of allelic substitution was calculated using a regression model that included the term genotype as a covariate, and this model demonstrated an increasing in NCS1 of 0.41 ± 0.15 , 0.11 ± 0.07 , 0.23 ± 0.08 , 0.15 ± 0.11 y 0.20 ± 0.09 for each SNP, respectively. These results indicate the existence of genetic basis associated with reproductive efficiency in sows infected with the PRRS virus.

Key words: sows, genome, PRRS, SNP, fertility.

Resumen

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una enfermedad que genera pérdidas económicas en la porcicultura mundial y se caracteriza por afectar el desempeño reproductivo de las cerdas. El objetivo del estudio fue identificar polimorfismos de nucleótido simple (SNP) asociados al número de servicios por concepción en la primera gestación (NSC1) en cerdas reproductoras infectadas naturalmente por el virus del PRRS. La investigación incluyó 53 hembras de la línea Landrace/Yorkshire previamente detectadas como positivas al virus del PRRS a través de PCR. Una muestra de sangre de cada una de las hembras fue recolectada y fijada en tarjetas FTA-Cards™. Las tarjetas fueron enviadas al laboratorio Geneseek para la genotipificación de 10,000 SNP. Un modelo de efectos mixtos identificó una asociación ($P < 0.001$) entre el NSC1 con los SNPs rs81364943, rs81382736, rs80976363, rs80890869 y rs81460050. El efecto de sustitución alélica fue calculado usando un modelo de regresión que incluyó el término genotipo como covariable, el cual demostró un incremento en la variable NSC1 de 0.41 ± 0.15 , 0.11 ± 0.07 , 0.23 ± 0.08 , 0.15 ± 0.11 y 0.20 ± 0.09 para los cinco SNP, respectivamente. Los resultados encontrados indican la existencia de bases genéticas asociada a la eficiencia reproductiva en hembras porcina infectadas por el PRRS.

*Autores de correspondencia

Email: pluna@itson.edu.mx; (644) 410 90 00

Palabras claves: cerdas, genoma, PRRS, SNP, fertilidad.

Introducción

El síndrome respiratorio y reproductivo porcino (PRRS) es una enfermedad viral infecciosa de los cerdos que se transmite por vía vertical, horizontal directa e indirecta a cerdos susceptibles y se considera la enfermedad viral más importante desde el punto de vista económico de las explotaciones intensivas de cerdos de Europa y América. El virus del PRRS es de tipo RNA y pertenece al orden Nidovirales, familia Arteriviridae, género Arterivirus (López-Heydeck *et al.*, 2015) cuyas principales características son una elevada tasa de mutación que le confiere una alta variabilidad antigénica y la capacidad para inducir infecciones persistentes (Lunney *et al.*, 2010; Boddicker *et al.*, 2012; Chand *et al.*, 2012). Las diferencias en las secuencias genómicas del PRRSV lo dividen en dos genotipos, Europeo (EU o tipo I) representado por la cepa prototipo Lelystad y Norteamericano (NA o tipo II) representada por la cepa prototipo ATTC VR-2332; estos tipos comparten el 63 % de su identidad genómica, con variaciones del 55 al 70% comparando todo el genoma (Flores *et al.*, 2001). Hay una gran diversidad genética dentro de las cepas NA y entre las cepas europeas EU y NA, lo cual ocasiona problemas en la vacunación y en el diagnóstico (Kleiboeker *et al.*, 2005).

La infección por el virus del PRRS se caracteriza por producir baja conversión alimenticia y bajo peso en los cerdos así como repeticiones del estro, muerte de lechones e incluso abortos en hembras reproductoras (Holtkamp *et al.*, 2013). Las vacunas han logrado prevenir parcialmente la infección por PRRS, ya que el virus posee la habilidad de evadir la respuesta inmune del hospedador (Collins *et al.*, 1996; Lewis *et al.* 2007; Mateu *et al.*, 2008; Geldhof *et al.*, 2013). Sin embargo, se han reportado poblaciones infectadas con el virus del PRRS donde algunas cerdas muestran el índice del número de servicios por concepción por encima del promedio (Sierra *et al.*, 2000); es decir, muestran cierta habilidad para convivir con la enfermedad sin sacrificar su comportamiento reproductivo.

En base en lo anterior, la genómica puede ser una alternativa para explorar los mecanismos detrás de la respuesta a la infección por el virus del PRRS, y poder seleccionar cerdas con menor vulnerabilidad

a la infección (Lunney y Chen, 2010). El análisis de su perfil genético que identifica aquellos polimorfismos de nucleótido simple (SNP), que son una variación en la secuencia de ADN con una sola base y que están implicados en la regulación de caracteres asociados a la reproducción en hembras infectadas con el virus del PRRS (Lunney *et al.*, 2011). La validación de dichos SNP como marcadores genéticos permite la aplicación de procedimientos estadísticos especializados para la selección genómica de individuos superiores. Por lo tanto, el objetivo de la presente investigación fue determinar y validar polimorfismos de nucleótido simple asociados al número de servicios por concepción en cerdas infectadas con el virus de campo del PRRS.

Materiales y métodos

Sitio y unidades experimentales

El presente estudio se realizó en una granja porcina comercial de ciclo completo ubicada en el valle del Yaqui, Sonora, México (LN: 27°17', LO: 109°56') Unidades experimentales. La investigación incluyó 53 hembras de la línea Landrace/Yorkshire de 9.03 meses de edad y un peso inicial de 108.23 ± 10.9 kg.

Datos fenotípicos

El número de servicios que recibió cada hembra para obtener su primera gestación (NSC1) fueron colectados en el programa PigWINTM. Se registró el número de servicios por concepción (NSC1) que recibió cada hembra para obtener su primera gestación.

Determinación viral

El aislamiento del ARN viral se obtuvo a partir de suero de cerdas positivas a PRRS diagnosticadas por la técnica de ELISA (ELISA-IDEXX, Lab Inc., i.e Enzyme Linked Immunoassay). La técnica para la determinación de los ácidos nucleicos de las hembras fue desarrollado con el Kit DNA/ARN (GeneReach Biotechnology Corporation) mediante un sistema de extracción automática de ácidos nucleicos (tacoTM), basado en la tecnología de separación magnética. Con las muestras de ARN identificadas se realizó el análisis de PCR en tiempo

real para PRRS utilizando un Kit comercial (Tetracore Nextgen Real-Time QT-PCR Target Specific reagents for the detection differentiation of North American European PRRSV Viral ARN), que reconoce un segmento del ORF 7 (Cepheid Smart Cycler Version 2.0d).

Estudio de genoma completo

Se utilizaron 8,826 polimorfismos de nucleótidos único (SNP, por sus siglas en inglés), provenientes del panel comercial “GeneSeek Genomic Profiler (GGP) low density BeadChip (GeneSeek®, Lincoln, NE)”, versión GSGT 1.9.4. La detección de SNP asociados al NSC1 fue realizada por selección genómica de Bayes C (Habier *et al.*, 2011).

Análisis estadístico

Mediante el procedimiento MEANS en SAS (Versión 9.4; SAS Inst. Inc., Cary, NC). Se calculó la estadística descriptiva para los datos fenotípicos (Edad y NSC1). La normalidad e igualdad de varianzas fueron probadas usando el procedimiento UNIVARIATE. Los SNP identificados mediante el análisis de genoma completo que fueron significativamente relacionados con la variable NSC1 se validaron en un modelo de efectos mixtos, el cual incluyó el NSC1 como variable respuesta, el genotipo del SNP y la edad de la madre como efectos fijos, y el macho como efecto aleatorio. La comparación entre las medias para cada genotipo de los polimorfismos asociados ($P < 0.05$) con el NSC1 la variable fenotípica de estudio fue calculada utilizando la opción PDIF del procedimiento LSMEANS. La sustitución de alelos y su efecto sobre la variable NSC1 fue estimado mediante la regresión lineal que incluyendo el término genotipo

como covariable (Habier *et al.*, 2011).

Resultados y discusión

La media, valores máximos y mínimos de la variable NSC1 y la edad de las hembras reproductoras infectadas con el virus del PRSS se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Valores mínimos, máximos, media y desviación estándar para las variables de NSC1 del número de servicios por concepción en la primera gestación en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.

Carácter	No.	Min	Media	Max	DS
*Edad al primer servicio (meses)	53	5.00	9.03	14.00	1.414
NSC1	53	1.00	2.96	5.00	0.619

*Edad en meses al primer servicio, NSC1.

En el análisis del genoma completo identificaron cinco SNP (rs81382736, rs80976363, rs80890869 y rs81460050) asociados ($P < 0.001$) NSC1, los cuales fueron rs81364943. En la tabla 2 se describe la secuencia y el cambio de bases de los marcadores para cada uno de los cinco SNP asociados fueron encontrados en las hembras reproductoras infectadas con el virus del PRSS.

Los marcadores mostraron una frecuencia de alelo menor por arriba del 10 % ($FAM > 0.10$), asegurando así que todos los posibles genotipos para estos marcadores tienen una frecuencia mínima del 1 % en la población, lo cual de acuerdo con Balding (2006) evita resultados falsos en el estudio asociativo entre genotipo y fenotipo. Posteriormente, los polimorfismos fueron analizados a través de la prueba de Chi-cuadrada ($X^2 < 0.05$), la cual demostró que la distribución de sus genotipos estuvo en equilibrio Hardy-Weinberg

Tabla 2. Marcadores significativos, secuencia y cambio de las bases para la variable NSC1 en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.

Marcador	Secuencia	N	Pr > f
rs81364943	CACACATCTTGAGCTGGGCTTTCCT[C/T]CAGGCAGAAGGAAGCAGATGTAGGT	49	0.0201
rs81382736	TATAAACACAGGTCTTTATTTCCCT[C/T]CCAGTTTAGCTGTACGTGTA TATCT	49	0.0606
rs80976363	ACCTAAGGGGCCACCCCTAGCATGT[A/C]AAAGCTATAGATCCATTCC CCCAGG	49	0.0058
rs80890869	ATGCAGGGAAACAAGAGTCTACCAA[A/G]AGCTAGCAGCAGGAGAAC TCAGCTC	49	0.0361
rs81460050	GCTCCCTGCTGAAACACCGGTACCT[A/G]TCGGGGTCTGGGACAGAGA AGATGC	49	0.0361

($P > 0.05$). Lo anterior indica que la población de cerdas utilizadas para el presente estudio ha mantenido cierto grado de estabilidad alélica y genotípica a través del tiempo.

La tabla 3 describe el registro oficial para cada SNP que existe dentro de la base bioinformática de NCBI, su posición dentro del genoma, así como las frecuencias alélicas y genotípicas de cada SNP.

La tabla 4 muestra los genotipos favorables para los SNP rs81364943, rs81382736, rs80976363, rs80890869 y rs81460050 fueron TC, TT, AA, AA

y GG, respectivamente, puesto que las cerdas con dichos genotipos mostraron el menor número de servicios por concepción que la media de sus grupos.

Los cinco marcadores asociados a NSC1 en 0.41 ± 0.15 , 0.11 ± 0.07 , 0.23 ± 0.08 , 0.15 ± 0.11 y 0.20 ± 0.09 , servicios por concepción, respectivamente (Tabla 5). Los 5 marcadores ya han sido caracterizados, en un estudio previo (SnapGene®), por lo que a partir del presente estudio y debido a que los polimorfismos son estadísticamente

Tabla 3. Frecuencias alélicas y genotípicas para la variable NSC1 en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.

*Marcador	Posición	Frec. de alelos		Frec. genotípicas		
		<i>C</i>	<i>T</i>	<i>CC</i>	<i>TC</i>	<i>TT</i>
rs81364943	SSA 02	0.826	0.173	0.680	0.293	0.026
rs81382736	SSA 05	0.713	0.287	0.507	0.413	0.080
rs80976363	SSA 14	<i>A</i>	<i>C</i>	<i>AA</i>	<i>CC</i>	<i>AC</i>
		0.480	0.520	0.213	0.253	0.533
rs80890869	SSA 15	<i>A</i>	<i>G</i>	<i>AA</i>	<i>GG</i>	<i>AG</i>
		0.573	0.426	0.253	0.106	0.640
rs81460050	SSA 16	0.460	0.540	0.200	0.280	0.520

* Marcadores que cumplen con ($MAF > 10\%$) y equilibrio Hardy-Weinberg ($\chi^2 < 0.05$).

Tabla 4. Medias de cuadrados mínimos \pm EE para el carácter de NSC1 entre los genotipos de SNP encontrados en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.

NSC1	Genotipo	No.	Media	Prob
rs81364943	CC	49	3.03 ^a	.0001
	TT	49	3.26 ^a	.0001
	TC	49	2.82 ^b	.0001
rs81382736	CC	49	2.98 ^a	.0001
	TC	49	3.01 ^a	.0001
	TT	49	2.16 ^b	.0001
rs80976363	AA	49	2.67 ^a	.0001
	AC	49	3.02 ^a	.0001
	CC	49	3.14 ^b	.0001
rs80890869	AG	49	3.04 ^a	.0001
	GG	49	3.01 ^a	.0001
	AA	49	2.68 ^b	.0001
rs81460050	AA	49	3.14 ^a	.0001
	AG	49	3.01 ^a	.0001
	GG	49	2.74 ^b	.0009

Tabla 5. Efectos de sustitución alélica para los genotipos de los polimorfismos para NSC1, en cerdas reproductoras expuestas al virus de campo del PRRS.

Polimorfismo	Alelo favorable	Efectos de sustitución alélica		
		Prob	Valor estimado	± EE
rs81364943	C	0.0095	0.4128	0.1506
rs81382736	T	0.1434	0.1114	0.0739
rs80976363	C	0.0133	0.2352	0.0876
rs80890869	G	0.1764	0.1539	0.1088
rs81460050	A	0.0379	0.2021	0.0915

significativos ($P < 0.05$), es necesario realizar estudios para validar la función del marcador dentro del gen. La sustitución alélica indica la capacidad que tienen las cerdas de ser eficientes reproductivamente pese a estar infectadas con el virus del PRRS, lo que indica que dichas hembras reproductoras poseen un alelo favorable y por consiguiente, las crías podrían tener la misma habilidad de la madre al mostrar una conducta reproductiva favorable, aun estando infectadas con PRRS.

Aguilar *et al.*, (2017) encontraron doce SNP asociados con el desempeño reproductivo en función al número de lechones nacidos vivos, en hembras reproductoras infectadas por PRRS. De acuerdo con la literatura, la variante rs81364943 se localiza dentro del gen ISOC1 y su función está asociada con la actividad catalítica, aún y cuando se desconoce su función in vivo (Kikuchi *et al.*, 2004). La variante rs81382736 se localiza dentro del gen SEC31-like, y son proteínas asociadas con el retículo endoplásmico en el procesamiento de proteínas de exportación y la apoptosis (Shibata *et al.*, 2007). La variante rs80976363 se ubica dentro del gen LZTS1 (encoding leucine zipper), el cual codifica una proteína supresora de tumores que se expresa en los tejidos normales (Vecchione *et al.*, 2007). El SNP variante rs81460050 se localiza en el gen KCNMB1 (encoding potassium large conductance calcium-activated channel, subfamily M, beta member1), se asocia con el control del tono/contracción del músculo liso, y codifica para proteínas con funciones moleculares de la actividad del canal de potasio, activado por el calcio, (Xie *et al.*, 2010).

El PRRS es una importante enfermedad viral que afecta la producción de cerdos en todo el mundo y trae como consecuencia la disminución del rendimiento reproductivo en hembras (Lewis *et al.*, 2009; Rowland *et al.*, 2012; Serão *et al.*, 2014). De acuerdo a algunas estimaciones recientes, el PRRS es la enfermedad más costosa que afecta a la

industria porcina (Charerntantanakul, 2012; Alonso *et al.*, 2013), esto debido a que los rasgos reproductivos del ganado porcino son sumamente importantes por el papel principal que desempeñan en el éxito económico de la producción (Rothschild *et al.*, 1996). De este modo, los parámetros reproductivos son considerados uno de los aspectos más importantes en la cría de cerdos debido a su influencia en la eficiencia económica de la producción porcina (Bergfelder-Drüing *et al.*, 2015). Otros autores afirman que, con el fin de generar mayores ganancias en la producción de lechones, los objetivos de selección para la cría de cerdos se centran en la crianza y reproducción de marranas con superiores parámetros reproductivos (Koning *et al.*, 2001; Hanenberg *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 2005). De acuerdo con Boddicker *et al.* (2012), ellos fueron los primeros en reportar hallazgos en las regiones genómicas asociadas con la resistencia al PRRS o la susceptibilidad en los cerdos en crecimiento. En su estudio identificaron regiones genómicas para el día 42 post-infección en los cromosomas 1, 4, 7 y 17.

En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se puede proponer que hay más regiones dentro del genoma del cerdo que indican tolerancia al PRRS, mientras que la conducta reproductiva de las cerdas permanece estable. Balding *et al.* (2006) mencionan que al explorar el genoma completo, resulta complicado detectar una variante causal o directamente responsable de los cambios fenotípicos en las poblaciones, sin embargo, debido a la presencia del desequilibrio de ligamiento, es posible detectar asociaciones indirectas a través del estudio, por lo que al encontrar polimorfismos asociados a variaciones fenotípicas es necesario considerar en cuenta también a los genes que rodean al polimorfismo significativo.

Conclusiones

Se identificaron cinco polimorfismos asociados al

carácter de número de servicios por concepción en la primera gestación en hembras reproductoras infectadas con el virus del PRRS. Los alelos favorables de estos polimorfismos (SNP) mostraron un efecto eficiente con respecto a la media de sus grupos, lo cual significa que al estar presente al menos una copia del alelo favorable en el genotipo de la cerda, ésta mostrará una mejora significativa en la disminución del número de servicios por concepción.

Por lo anterior, estos polimorfismos pueden ser considerados como parte de un programa de selección asistida por marcadores moleculares (SAM), con el propósito de obtener un mejoramiento genético entre las explotaciones porcinas, de manera que las nuevas generaciones del pie de cría, sean capaces de tolerar la presencia del PRRS, mientras que su conducta reproductiva no se vería afectada.

La selección genómica ayuda a los métodos convencionales, por su economía y alto rendimiento. Se requiere identificar los mapas de interacción de genes involucrados para de esta forma determinar los mecanismos fisiológicos de la respuesta en la interacción genotipo con el fenotipo.

Agradecimiento

Fuentes de financiamiento del proyecto de investigación: Laboratorio de Diagnóstico ITSON-UGRPS \$31,000.00 (45.5%); Laboratorio ITSON, \$223,000.00 (2.5 %); Unión Ganadera de Porcicultores del Estado de Sonora = \$150,000.00 (22.0 %) y Convenio con el Laboratorio de Genética Molecular del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Colorado (CSU) y Universidad Estatal de Iowa (ISU), Facultad de MVZ de Universidad Autónoma de Sinaloa y CONAcYT becario 279847/302410

Referencias

Aguilar-Trejo, C.M., Valerio-Valle, K.M., Luna-Ramirez, R.I., Luna-Nevarez, G., Reyna-Granados, J.R., Romo, J.A., Sanchez-Castro, M.A., Zeng, X., Enns, R.M., Speidel, S.E., Thomas, M.G., y Luna-Nevarez, P. 2017. Validation of candidate markers associated with reproductive performance in porcine respiratory and reproductive syndrome virus naturally infected replacement gilts in southern Sonora México. *J. Anim.Sci.* 95(4):29

Alonso, C., Murtaugh, M.P., Dee, S. A. & Davies, P.R. 2013. Epidemiological study of air filtration systems for preventing PRRSV infection in large sow herds. *Prev. Vet. Med.* 112(1-2):109-17

Balding, D.J. A.

Bergfelder-Drüing, S., Grosse-Brinkhaus, C., Lind, B., Erbe, M., Schellander, K., Simianer, H., & Tholen, E. 2015. A Genome-Wide Association Study in Large White and Landrace Pig Populations for Number Piglets Born Alive. *PLoS ONE* 10(3).

Boddicker, N., E.H. Waide, R.R.R. Rowland, J.K. Lunney, D.J. Garrick, J.M. Reecy, and J.C.M. Dekkers. 2012. Evidence for a major QTL associated with hot response to Porcine Reproductive and Respiratory virus syndrome challenge. *J. Anim. Sci.* 90:1733.

Chand R.J., Tribble B.R, Rowland R.R.R. 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opinion in Virology*: 2:256-263.

Charentantanakul, W. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccines: Immunogenicity, efficacy and safety aspects. 2012. *World. J. Virol.* 1(1):23-30.

Collins J.E., Mollitor T.W., Shin J.R., Pijoan C., Casamiglia M., Kapur V. 1999. Necesidad de los Médicos Veterinarios de diagnosticar enfermedades porcinas, por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Memorias del curso "Actualidades en la Producción Porcina y en el diagnóstico de Enfermedades, México, D.F. 13-18

Flores-Mendoza, L. y Hernández, J. 2001. Vacunas contra el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV): escribiendo una historia. *Vet. México.* 41:139-159.

Geldhof M.F., Breedam W.V., Jong E., Rodriguez A.L., Karniychuk U.U., Vanhee M, Doorsselaere Jv, Maes D., Nauwynck H.J. 2013. Antibody response and maternal immunity upon boosting PRRSV-immune sows with experimental farm-specific and commercial PRRSV vaccines. *Vet Microbiol*;167:260-271.

Habier D., Fernando R. L., Kizilkaya K., Garrick D. J. 2011. "Extension of the Bayesian Alphabet for Genomic Selection". *BMC Bioinformatics* 12:186.

Hanenberg, E. H. A. T., Knol, E. F. y Merks, J. W. M. 2001. Estimates of genetic parameters for reproduction traits at different parities in Dutch Landrace pigs. *Livest. Prod. Sci.* 69: 179-186.

Holtkamp D.J., Kliebenstein J.B., Neumann E.J., Zimmerman J.J., Rotto H.F., Yoder T.K., Wang C., Yeske P.E., Mowrer C.L., Haley C.A. 2013. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers. *J Swine Health Prod*; 21:72-84

Kikuchi M., Hatano N., Yokota S., Shimozaawa N., Imanaka T., Taniguchi H. 2004. Proteomic analysis of rat liver peroxisome: Presence of peroxisome-specific isozyme of Lon protease. *J Biol Chem.* 279(1):421-8.

Kleiboeker, S. B., Schommer, S. K., Lee, S. M., Watkins, S., Chittick, W. & Polson, D. 2005. Simultaneous detection of North American and European porcine reproductive and respiratory syndrome virus using real-time quantitative reverse transcriptase-PCR. *Journal Vet. Diagn. Invest.* 17:165-170.

Koning D.J., Rattink B., Harlizius M.A., Groenen E.W., Brascamp 2001. Detection and characterization of Quantitative Trait Loci for growth and reproduction traits in pigs. *Livestock Production Science.* 72: 185-198

Lewis T. W., Wiseman J., Woolliams J.A. 2005. Genotype by mating type interaction for litter size in Landrace and Large White sows. *Anim. Sci.*; 81: 331-335

Lewis C.R., Ait-Ali T., Clapperton M., Archibald A.L., Bishop, S. 2007. Genetic perspectives on host responses to porcine

- reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Viral Immunol* ;20(3), 343-358.
- Lewis C.R., Torremorell M., Galina P.L., Deeb N., Mellencamp M.A., Archibald A.L. Bishop S. A genomewide association analysis identifying SNPS for PRRS tolerance on a commercial pig farm. *Proc. Assoc. Advmt. J Anim Breed Genet.* 2009; (18)187–190.
- Lunney J.K., Steibel J.P., Reecy J.M., Fritz E., Rothschild M.F. 2011. Probing genetic control of swine responses to PRRSV infection: current progress of the PRRS host genetics consortium. *BioMed Central Ltd.* pp. S30
- Lunney J.K., Chen H. 2010. Genetic control of host resistance to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection. *Virus Research.* 154:161–169.
- Rothschild, M., Jacobson, C., Vaske, D., Tuggle, C., Wang, L., Short, T., Eckardt, G., Sasaki, S., Vincent, A., McLaren, D., Southwood, O., van der Steen, H., Mileham, A. & Plastow, G. 1996. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. . *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 201–205.
- Rowland R.R, 2012. Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Current Opinion in Virology*;2:256–263.
- Serão, N.V.L., Matika, O., Kemp, R. A., Harding, J.C., Bishop, S. C., Plastow, G. S. & Dekkers, J.C. M. 2014. Genetic analysis of reproductive traits and antibody response in a PRRS outbreak herd. *J. Anim. Sci*; 92:2905–21.
- Shibata H., Suzuki H., Yoshida H., Maki M. 2007. ALG-2 directly binds Sec31A and localizes at endoplasmic reticulum exit sites in a Ca²⁺- dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* Feb 16;353(3):756-63. Epub 2006 Dec 22
- Sierra N., Ramírez, R. Mota, D. 2000. Aislamiento del virus de PRRS en México: Estudio clínico, serológico y virológico. *Archivos de medicina veterinaria*; 32(1), 1-9
- Vecchione A, Baldassarre G, Ishii H, Nicoloso M.S., Belletti B, Petrocca F, Zanasi N, Fong LY, Battista S, Guarnieri D, Baffa R, Alder H, Farber JL, Donovan PJ, Croce CM. 2007. Fez1/Lzts1 absence impairs Cdk1/Cdc25C interaction during mitosis and predisposes mice to cancer development. *Cancer Cell. Mar*; 11(3):275-89.
- Xie M.J., Ma Y.G., Gao F., Bai Y.G., Cheng J.H., Chang Y.M., Yu Z.B., Ma J. 2010. Activation of BKCa channel is associated with increased apoptosis of cerebrovascular smooth muscle cells in simulated microgravity rats. *Am J Physiol Cell Physiol.* Jun;298(6):C1489-500. doi: 10.1152/ajpcell.00474.2009.