

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

2118552

**POLYMORFIZMUS H-FABP GÉNU V PRODUKČNÝCH
POPULÁCIÁCH OŠÍPANÝCH**

2010

Bc. Eva Kapaníková

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV**

**POLYMORFIZMUS *H-FABP* GÉNU V PRODUKČNÝCH
POPULÁCIÁCH OŠÍPANÝCH**

Diplomová práca

Študijný odbor:	6.1.1 Všeobecné poľnohospodárstvo
Študijný program:	Genetické technológie v agrobiológii
Školiace pracovisko:	Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Školiteľ:	doc. Ing. Anna Trakovická, Csc.
Konzultant:	Ing. Michal Gábor, PhD.

Nitra 2010

Bc. Eva Kapaníková

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH
ZDROJOV

Katedra genetiky a plemenárskej biológie

Akademický rok: 2009/2010

ZADÁVACÍ PROTOKOL DIPLOMOVEJ PRÁCE

Študent: Bc. Eva Kapaníková

Študijný odbor: Genetické technológie v agrobiológii

V zmysle 3. časti, čl. 21 Študijného poriadku SPU v Nitre z roku 2008, Vám zadávam tému diplomovej práce: „Polymorfizmus *H-FABP* génu v produkčných populáciách ošípaných“.

Cieľ práce:

Identifikovať polymorfizmus génu *H-FABP* v produkčných populáciách ošípaných metódou PCR-RFLP a vyhodnotiť génovú a genotypovú štruktúru sledovaných súborov ošípaných.

Rámcová metodika práce:

- vytvorenie všeobecného teoretického základu z danej problematiky
- identifikácia genotypov zvierat génu *H-FABP* metódou PCR-RFLP
- vyhodnotenie génovej a genotypovej štruktúry produkčných populácií ošípaných

Rozsah grafických prác: 12 tabuliek, 6 obrázkov, 1 schéma, 2 grafy

Rozsah textovej časti: 71 strán

Literatúra: vedecké a odborné časopisy, odborné knižné publikácie:

- GERBENS, F. - RETTENBERGER, G. - LENSTRA, J. - VEERKAMP, J. - PAS, M. 1997. Charakterization chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid – binding protein gene. *In Mammalian Genome*, vol. 8, 1997, no 5, p. 328-332.
- DVOŘÁK, J. - VRTKOVÁ, I. 1999. Perspektívni genetické markery pro šlechtění prasat. *In Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*. České Budejovice, 1999, s. 33-35.
- MINDEKOVÁ, S. - TRAKOVICKÁ, A. - STRAPÁKOVÁ, E. 2006. Efekty genotypu *LEPR* a *H-FABP* na produkciu ošípaných. *In: Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 9, 2006, mimoriadne číslo, s. 32 – 33.
- KOVÁČIK, A. - TRAKOVICKÁ, A. - BULLA, J. - RAFAYOVÁ, A. - LIESKOVSKÁ, Z. 2010. Vplyv polymorfizmu génov *LEPR*, *MC5R* a *H-FABP* na produkčné vlastnosti ošípaných. *In Potravinárstvo*, roč. 4, 2010, mimoriadne číslo, s. 460-465.

Vedúci diplomovej práce: doc. Ing. Anna Trakovická, Csc.

Dátum zadania diplomovej práce: september 2008

Harmonogram postupu práce:

2008/2009 – zoštudovanie literatúry

2009/2010 – laboratórne spracovanie vzoriek, vyhodnotenie a štatistické spracovanie výsledkov

Dátum odovzdania diplomovej práce: 16. 4. 2010

doc. Ing. Juraj Candrák, PhD.

Vedúci katedry

prof. Ing. Daniel Bíro, PhD.

Dekan

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaná Bc. Eva Kapaníková týmto vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému: „Polymorfizmus *H-FABP* génu v produkčných populáciách ošípaných“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 20. marca 2010

POĎAKOVANIE

Dovoľujem si týmto poďakovať doc. Ing. Anne Trakovickej, CSc. za jej rady, pomoc a odborné vedenie, ktoré mi poskytla pri riešení diplomovej práce.

Zároveň ďakujem Ing. Michalovi Gáborovi, PhD. za pomoc pri práci v laboratóriu a spracovaní metodickej časti práce.

V neposlednom rade ďakujem mojím rodičom za morálnu podporu počas môjho štúdia.

ABSTRAKT

Analyzovali sme polymorfizmus *H-FABP* génu u 255 ošípaných produkčných populácií plemena biela ušľachtilá (82), pietrain (82) a hybridov plemien biela ušľachtilá x landras domáci (91). Izoláciu genómovej DNA z krvi sme uskutočnili metódou vysoľovania. Na amplifikáciu cieľových úsekov boli použité špecifické oligonukleotidové primery FOR: 5' GGACCCAAGATGCCTACGCCG 3' a REV: 5' CTGCATCTTTGACCAAGAGG 3'. PCR-RFLP metódou použitím reštrikčného enzýmu *HinfI* bol charakterizovaný PCR produkt veľkosti 700 bp a detekovali sme tri genotypy: HH (197 bp + 59 bp), Hh (256 bp + 197 bp) a hh (256 bp), pričom u všetkých genotypov boli prítomné aj nepolymorfne fragmenty (444 bp). V súbore BU a BUxLD sa najviac vyskytoval genotyp hh (0,4391 – 0,4835), s menším zastúpením genotypu Hh (0,3902 – 0,3846) a HH (0,1707 – 0,1319). Naopak pri plemene pietrain bol detekovaný genotyp hh s najmenšou frekvenciou (0,2317) a heterozygot s najvyššou (0,4512). Vo frekvenciách alel sa hodnotené populácie líšili. Zistila sa zvýšená frekvencia alely H (0,5426) u plemena pietrain oproti súboru zvierat BU (0,3658) a BUxLD (0,3242). Úroveň polymorfnosti sa pri všetkých hodnotených skupinách približovala k hraničnej hodnote (2,00). Najvyššia bola u plemena pietrain (1,9859), pri plemene biela ušľachtilá a hybridoch BUxLD sme zistili nižšie hodnoty (1,8660 – 1,7799).

Kľúčové slová: ošípané, polymorfizmus, *H-FABP*, genotypová štruktúra

ABSTRACT

We have analysed polymorphism of the *H-FABP* gene with 255 pigs of production populations of large white breed (82), pietrain breed (82), hybrids of the large white breed and domestic landrace (91). Isolation of the DNA genome from blood was carried out by salting method. To amplify target sections specific oligonucleotide primers were applied FOR: 5'GGACCCAAGATGCCTACGCCG 3' and REV: 5'CTGCATCTTTGACCAAGAGG 3'. By PCR-RFLP method and using the restrictive enzyme *Hinfl* we managed to characterize the PCR product with the size of 700 bp and three genotypes were detected: HH (197 bp + 59bp), Hh (256 bp + 197 bp) and hh (256 bp), while with all genotypes also nonpolymorphous fragments (444 bp) were present. In the LW and LWxLD pools hh (0,4391 – 0,4835) was the most represented genotype and Hh (0,3902 – 0,3846) and HH (0,1707 – 0,1319) were less represented. But on the contrary, the genotype hh was detected as the genotype with the lowest frequency (0,2317) and the heterozygote with the highest frequency (0,4512) in the pietrain breed. The rated populations differed in allele frequencies. An increased frequency of allele H (0,5426) was found with the pietrain breed compared to the pool of animals (0,3658) and LWxLD (0,3242). The polymorphism level at all rated groups was close to the limit value (2,00). The highest one was at the pietrain breed (1,985), the large white breed and the LWxLD hybrids showed lower values (1,8660 – 1,7799).

Key words: pigs, polymorphism, *H-FABP*, genotype structure

OBSAH

Úvod.....	14
1. PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....	15
1.1 Mäsová úžitkovosť ošípaných.....	15
1.1.1 Mäso - charakteristika.....	15
1.1.2 Kvalita mäsa ošípaných.....	15
1.2 Charakteristika genómu a jeho mapovanie.....	16
1.2.1 Charakteristika cicavčieho genómu.....	16
1.2.2 Mapovanie genómu.....	17
1.2.3 Genóm ošípanej a jeho mapovanie.....	17
1.3 Genetické markery.....	18
1.4 QTL - lokusy kvantitatívnych znakov.....	20
1.4.1 Detekcia QTL.....	21
1.4.2 Význam detekcie QTL a kandidátnych génov.....	22
1.4.3 QTL pre kvalitu mäsa ošípaných.....	22
1.5 MAS - markermi podporovaná selekcia.....	23
1.5.1 Výhody MAS.....	24
1.5.2 Využitie MAS.....	24
1.6 Metódy detekcie genetických markérov.....	25
1.6.1 PCR - polymerázová reťazová reakcia.....	25
1.6.2 Základné komponenty pre úspešný priebeh PCR.....	26
1.6.3 Identifikácia a analýza produktov PCR.....	27
1.6.4 Modifikácie PCR.....	27
1.6.5 Metóda RFLP.....	28
1.7 Šiesty chromozóm ošípanej.....	29
1.7.1 Gén ryanodínového receptora (<i>RYR</i>).....	29
1.7.2 Gén leptínového receptora (<i>LEPR</i>).....	30
1.7.3 Melanokortínový 5 receptor (<i>MC5R</i>).....	30
1.8 Rodina <i>FABP</i> (fatty acid binding proteins).....	31
1.8.1 Biologická funkcia.....	31
1.8.2 Proteín tukového tkaniva viažuci mastné kyseliny (<i>A-FABP</i>).....	32
1.8.3 Srdcový proteín viažuci mastné kyseliny (<i>H-FABP</i>).....	32

1. 8. 3. 1	Lokalizácia na chromozóme.....	32
1. 8. 3. 2	Polymorfizmus <i>H-FABP</i>	33
1. 8. 3. 3	Vplyv na úžitkové vlastnosti.....	35
2.	CIEĽ PRÁCE.....	38
3.	MATERIÁL A METÓDY.....	39
3. 1	Biologický materiál.....	39
3. 1. 1	Charakteristika plemien ošípaných.....	39
3. 2	Chemické látky.....	40
3. 2. 1	Použité roztoky.....	41
3. 2. 2	Príprava roztokov.....	42
3. 3	Prístrojové vybavenie.....	43
3. 4	Použité metódy.....	43
3. 4. 1	Izolácia genómovej DNA z krvi.....	43
3. 4. 2	PCR <i>H-FABP</i> génu.....	45
3. 4. 3	PCR-RFLP.....	46
3. 4. 4	Elektroforéza v agarózovom géli.....	47
3. 5	Matematicko - štatistické spracovanie výsledkov.....	48
4.	VÝSLEDKY.....	50
4. 1	<i>H-FABP</i>	50
4. 2	Izolácia genómovej DNA.....	50
4. 3	PCR-RFLP.....	50
4. 4	Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry.....	52
4. 4. 1	Genetická štruktúra hybridov BUxLD na základe <i>H-FABP</i> génu.....	52
4. 4. 2	Genetická štruktúra plemena BU na základe <i>H-FABP</i> génu.....	52
4. 4. 3	Genetická štruktúra plemena pietrain na základe <i>H-FABP</i> génu.....	53
4. 4. 4	Polymorfny obsah lokusu <i>H-FABP</i> génu v sledovaných populáciách.....	53
5.	DISKUSIA.....	56
6.	NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV.....	59
7.	ZÁVER.....	60
8.	POUŽITÁ LITERATÚRA.....	62
	Prílohy.....	71

Zoznam tabuliek, obrázkov, schém a grafov

Tabuľky:

- Tabuľka 1** Skupiny genetických markerov
- Tabuľka 2** Komponenty nevyhnutné pre PCR
- Tabuľka 3** Frekvencia genotypu *H-FABP/HinfI* u troch plemien ošípaných
- Tabuľka 4** Chemické látky potrebné na prípravu roztokov
- Tabuľka 5** Zloženie reakčnej zmesi s objemom 25 µl
- Tabuľka 6** Teplotný a časový režim PCR reakcie
- Tabuľka 7** Zloženie štiepiacej zmesi RFLP s objemom 15 µl
- Tabuľka 8** Priebeh štiepenie reštrikčným enzýmom
- Tabuľka 9** Genetická štruktúra BUxLD na základe *H-FABP* génu
- Tabuľka 10** Genetická štruktúra plemena biela ušľachtilá na základe *H-FABP* génu
- Tabuľka 11** Genetická štruktúra plemena pietrain na základe *H-FABP* génu
- Tabuľka 12** Efektívnosť pôsobenia alel génu *H-FABP* v hodnotených populáciách

Obrázky:

- Obrázok 1** Cytogenetická mapa 6. chromozómu ošípanej (INRA)
- Obrázok 2** Reprezentatívne výsledky analýzy PCR-RFLP pre gén *H-FABP*
- Obrázok 3** Znázornenie karyotypu ošípanej
- Obrázok 4** Plemeno Biela ušľachtilá
- Obrázok 5** Plemeno Landras domáci
- Obrázok 6** Plemeno Pietrain

Schémy:

- Schéma 1** Schématické zobrazenie štiepných fragmentov *H-FABP* 700 bp

Grafy:

- Graf 1** Porovnanie percentuálneho zastúpenia genotypov v hodnotených populáciách ošípaných
- Graf 2** Porovnanie frekvencie alel v hodnotených populáciách ošípaných

Zoznam použitých označení

ACD	antikoagulačný roztok
<i>A-FABP</i>	gén kódujúci proteín tukových buniek viažuci mastné kyseliny
AFLP	polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov
<i>Ala.</i>	alanín
ARMS PCR	amplifikačný refrakčný mutačný systém
AS PCR	alelovo špecifická PCR
BFT	hrúbka chrbtovej slaniny
bp	páry báz
BU	plemeno Biela ušľachtilá
C _a	koeficient homozygotnosti
[CA] ₂₁	mikrosatelitný motív
cm	centimeter
CMČ	cenné mäsité časti
CRC	lokus ryanodínového receptora
BUxLD	hybrid plemien Biela ušľachtilá x Landras domáci
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleozidtrifosfát (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
e	pozorovaný počet genotypov
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
<i>ESR</i>	estrogénový receptor
EST	miesto s adresnou expresiou
ETL	lokusy ekonomických znakov
EU	Európska únia
FISH	fluorescenčná in situ hybridizácia
FOR	priamy primer
F2	druhá filiálna generácia
g	gram
GENETPIG	projekt mapovania genómu ošípanej
GLM	lineárny model
GPI	gén kódujúci glukózofosfát izomerázu
<i>H-FABP</i>	gén kódujúci srdcový proteín viažuci mastné kyseliny

<i>HaeIII</i>	reštrikčná endonukleáza
H _e	koeficient heterozygotnosti
<i>HinfI</i>	reštrikčná endonukleáza
h ²	koeficient dedivosti
IMF	vnútro svalový tuk
kb	kilo báza
kDA	kilodalton
kg	kilogram
LD	plemeno Landras domáci
<i>LEPR</i>	gén kódujúci leptínový receptor
LINE	dlhé poradia nukleotidov
LM	podiel cenných mäsitých častí
LW	plemeno Large white
M	molarita
MAS	markermi podporovaná selekcia
MDGI	inhibitor rastu nádorových buniek
ml	mililiter
mM	milimol
mRNA	mediátorová RNA
<i>MspI</i>	reštrikčná endonukleáza
<i>MC5R</i>	melanokortínový 5 receptor
n	počet genotypových tried
ng	nanogram
N _a	úroveň polymorfности lokusov
N	počet jedincov v populácii
P	hladina preukaznosti
P	plemeno Pietrain
p _A	frekvencia alely A
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PGD	gény kódujúce fosfoglukonát dehydrogenázu
PIC	polymorfný informačný obsah
pM	pikomol
PSS	stresový faktor ošípaných
q _B	frekvencia alely B

QTL	lokusy kvantitatívnych vlastností
RAPD	náhodne polymorfná amplifikovaná polymorfná DNA
RT PCR	PCR v reálnom čase
RBC	roztok na lýzu červených krviniek
REV	spätný primer
RFLP	polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov
RNA	ribonukleová kyselina
rpm	otáčky za minútu
<i>RYRI</i>	gén kódujúci ryadínový receptor
s	smerodajná odchylka
SAS 2000	štatistický program
SDS	sodná soľ dodecylsulfátu
SINE	krátke poradia nukleotidov
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus
t	teoretický počet genotypov
TAE	trisacetát EDTA
<i>TaqI</i>	reštrikčná endonukleáza
<i>Thr.</i>	treonín
Tris	tris hydroxymetyl aminometán
UV	ultrafialové žiarenie
XX	samičí pohlavný chromozóm
XY	samčí pohlavný chromozóm
χ^2	chí kvadrát test
μg	mikrogram
μl	mikroliter
μM	mikromol

ÚVOD

Bravčové mäso už v minulosti predstavovalo dôležitý zdroj potravy a bolo vyhľadávané vďaka vysokému obsahu energie. V súčasnosti patrí medzi dominantné druhy konzumovaného masa. Chov ošípaných patrí medzi najvýznamnejšie odvetvia živočíšnej výroby. Jedným z dôležitých faktorov, ktoré ovplyvňujú ekonomiku tohto odvetvia je aj úžitkovosť zvierat a jej zvyšovanie.

Pri zvyšovaní úžitkovosti v šľachtiteľskom procese nadobúda stále väčší význam využitie molekulovej genetiky. Pokrok je daný nekončiacim sa rozvojom molekulárnych metód, vďaka ktorým je možné mapovať, klonovať a sekvenovať veľké množstvá génov. Tomuto pokroku predchádzali desaťročia, kedy genetika pracovala prevažne s pomocou klasických metód.

V súčasnej dobe sa pri šľachtení ošípaných snažíme odhaliť genetickú podstatu sledovaných vlastností, t. j. snažíme sa identifikovať gény zodpovedné za variabilitu znakov, hoci situácia je komplikovaná tým, že málo vlastností je podmienených pôsobením iba jedného génu. Väčšina úžitkových vlastností má povahu kvantitatívnych vlastností, ktorých vývoj je ovplyvnený väčším počtom génov, prostredím a ich vzájomnou interakciou.

Dôležitým krokom pre zistenie genetického základu produkčných vlastností je mapovanie lokusov kvantitatívnych vlastností (QTL). Využívajú sa metódy polymerázovej reťazovej reakcie (PCR), metódy polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP) a elektroforetické metódy. Tieto spôsoby nám umožňujú detekovať jedincov, ktorí sú nositeľmi žiaducej alely v géne podieľajúcom sa na variabilite skúmaného znaku. U ošípaných je známa celá rada génov u ktorých bol preukázaný vplyv na produkčné znaky a sú využívané v šľachtiteľských programoch.

Medzi kandidátne gény, ktoré súvisia s mäsovou úžitkovosťou ošípaných svojim efektom na obsah tuku v bravčovom mäse patrí aj *H-FABP*, ktorým sa zaoberá predkladaná diplomová práca.

1. PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

1. 1 Mäsová úžitkovosť ošípaných

1. 1. 1 Mäso – charakteristika

Mäso v širšom slova zmysle zahŕňa všetky požívateľné časti zabitých zvierat (Kováč, 1998). Vzhľadom k nesmiernej rozmanitosti konzumačných zvyklostí rôznych národov a etnických skupín celého sveta je nutné pojem mäso zúžiť. Mäso je priečne pruhovaná svalovina z tiel teplokrvných jatočných zvierat, vrátane nedeliteľných súčastí svalových partií ako sú väzivové súčasti svalov, povrchový a vnútro svalový tuk, cievy, miazgové uzliny, nervy, kosti a v niektorých prípadoch aj koža (Steinhauser, 2000). Základným svalovým prvkom je svalové vlákno. Svalové vlákno je typickou bunkou (obsahuje viac jadier). Na povrchu je obalené jemnou blankou – sarkolemou. Vo vlastnej protoplazme (vo vnútri svalového vlákna) nachádzame sarkoplazmu a myofibrily (Paška *et al.*, 1998).

Podiel svaloviny, ako aj chemické zloženie mäsa závisia od množstva endogénnych a exogénnych faktorov. K nim patria napríklad vek a pohlavie zvierat'a, plemenná príslušnosť, hmotnosť pri zabíí, zdravotný stav, technika chovu, výživa v procese odchovu, výkrmu ošípaných a podobne (Demo, 2009).

1. 1. 2 Kvalita mäsa ošípaných

Využívanie moderných typov hybridných ošípaných, šľachtených jednostranne na vyšší podiel svaloviny, prináša niektoré problémy s kvalitou mäsa. Prešľachtenosť ošípaných na vysokú mäsovú úžitkovosť, sprevádzaná poklesom hrúbky chrbtovej slaniny (aj viac ako 10 mm) a zvýšením podielu celkovej svaloviny nad 60 % spôsobujú, že pri súčasných typoch ošípaných sa často stretávame s výskytom nevyhovujúcich fyzikálno – chemických – technologických a senzorických parametrov mäsa (Dvořák, 1997).

Snaženie genetikov, chovateľov i spracovateľov je preto v súčasnosti viac nasmerované na zvyšovanie kvality mäsa a výrobkov z neho. Vo výrobnom procese sa zdôrazňujú požiadavky na elimináciu ekologicky závadných vplyvov, ktoré by mohli negatívne vplývať na kvalitu produktov. V šľachtiteľskom procese sú prednostne využívané ošípané, ktoré sú odolné voči záťažiam chovateľského prostredia, vytvárajú sa línie kancov a prasníc rezistentné voči stresom (Trakovická, Györgyová, 2004).

ukazovatele kvality mäsa môžeme rozdeliť do štyroch hlavných skupín:

1. **organoleptické** - farba, mramorovanie, vôňa, obsah voľne viazanej vody a pod.
2. **chemicko technologické** - schopnosť viazať pridanú vodu, soľ a iné prídavné látky, hodnota pH, obsah spojovacieho tkaniva a pod.
3. **nutrično - dietetické** - obsah bielkovín, energetická hodnota, obsah tukov, cholesterol, minerálov, vitamínov a pod
4. **hygienické** - výskyt cudzorodých látok, hlavne ťažkých kovov, polychlórovaných bifenylov, reziduá agrochemikálii, mykotoxínov a pod. (Demo *et al.*, 1998).

1. 2 Charakteristika genómu a jeho mapovanie

1. 2. 1 Charakteristika cicavčieho genómu

Haploidný genóm cicavcov obsahuje v DNA asi $3,3 \times 10^9$ bp (Moran, 1993). Počet chromozómov v genóme sa však značne odlišuje v závislosti od druhu. Odhaduje sa, že menej ako 10 % cicavčieho genómu tvoria kódujúce sekvencie génov. Zvyšok je tvorený nekódujúcou DNA, ktorú možno rozdeliť na repetitívne a jedinečné sekvencie.

Repetície sú zastúpené rozptýlenými (krátke SINE a dlhé LINE) a tandemovými (minisatelity, mikrosatelity, satelitné a telomérové) opakovaniami. V kódujúcich častiach je variabilita spôsobená zmenami v sekvenciách nukleotidov. Polymorfizmus (alely) môže byť detekovaný po štiepení reštrikčnými enzýmami elektroforeticky. Táto variabilita môže vyvolať okrem variability produktov zmenu v sekundárnej štruktúre DNA. Variabilita nekódujúcich repetitívnych sekvencií v mikrosatelitoch je rozlišovaná podľa počtu opakovaní (di-, tri-, alebo tetranukleotidového motívu), ktorý je základom rôznej dĺžky fragmentov. Nekódujúce sekvencie sa vyznačujú vysokým stupňom polymorfizmu (Wintero *et al.*, 1992). Mutácia v týchto sekvenciách väčšinou neovplyvňuje funkčnosť organizmu a nie je preto prirodzeným výberom eliminovaná (Ferák, Sršeň, 1990).

1. 2. 2 Mapovanie genómu

Cieľom mapovania genómu hospodárskych zvierat je vytvorenie siete polymorfných markerov a odhalenie znakov poľnohospodárskeho a biologického významu (Fuji *et al.*, 1991). Ide o nájdenie takého markeru, ktorý môže byť zaradený do šľachtiteľského programu rámci selekcie podporovanej markermi - MAS (Příbil, 1995).

Pri mapovaní genómu sa používajú nasledovné typy máp:

Väzbové mapy: Používajú sa na zistenie poradia a vzdialenosti génov, alebo iných markerov. Zisťovanie väzieb prebieha na základe počtu crossing-overov. Toto mapovanie existuje len za predpokladu, že rekombinančná sekvencia je menšia ako 0,5.

RH mapy: Vychádza sa z hybridných buniek s vloženým cudzím chromozómom. Je to presnejšia konštrukcia máp ako iné techniky.

Cytogenetické mapy: Sú založené na lokalizácii pozície génov v určitej oblasti chromozómu. Používajú sa rôzne metódy upravovania, napríklad farbené pruhovanie chromozómu a fluorescenčné FISH značenie.

Porovnávacie mapy: Metóda založená na porovnávaní máp rôznych druhov, za predpokladu, že gény medzi ktorými je tesná genetická väzba pri jednom druhu, bývajú v tesnej genetickej väzbe aj u iných druhov.

Fyzické mapy: Sú založené na priamej analýze DNA (Trakovická, 1999).

1. 2. 3 Genóm ošípanej a jeho mapovanie

Genóm ošípanej je veľkosťou, zložitosťou a genetickou informáciou podobný genómu človeka (Zhihua, Rothschild, 2007). V somatických bunkách ošípanej je 38 chromozómov (Wintero *et al.*, 1992). 36 z nich je možné podľa veľkosti, polohy centromér a iných ďalších kritérií rozdeliť do 18 párov (obrázok 3). Zostávajúce dva sú pohlavné chromozómy, XX má prasnica, XY má kanec (Dvořák, Vrtková, 2001). V posledných rokoch sa naše vedomosti o genóme ošípaných posunuli z poznania lokalizácie génov na konkrétnych chromozómoch k veľkému množstvu markerových máp ošípaných (Chen, 2007).

Požiadavky producentov bravčového mäsa v Európe na genetický výskum viedli v roku 1998 výskumné skupiny štyroch štátov EU k začatiu špeciálneho projektu - GENETPIG. Tento projekt si postavil za cieľ zmapovať a identifikovať 700 génov v genóme ošípanej (Dvořák *et al.*, 1999). Na konci roku 2006 bolo zverejnených

takmer 1,3 miliónov záznamov sekvencií, z ktorých viac ako polovica predstavuje EST (Zhihua, Rothschild, 2007). V súčasnosti sú vytvorené mapy všetkých chromozómov ošípanej, ktoré zahŕňajú viac ako 1000 mikrosatelitných lokusov a niekoľko tisíc génov (Stratil, 2009). Určitá časť zmapovaných lokusov môže byť použitá ako genetické markery pre kvalitatívne, alebo kvantitatívne znaky (Dvořák *et al.*, 1999).

1.3 Genetické markéry

Problematika genetických markerov veľmi úzko súvisí s genetickým polymorfizmom, ktorý je jednou zo základných vlastností živých organizmov. Genetický marker je charakterizovaný presnou lokalizáciou v bunkovej štruktúre a konkrétnym fenotypovým prejavom v organizme. Fenotypové prejavy sú manifestované na morfologickej, fyziologickej, biochemickej a molekulárnej úrovni (Majerčiak, 1996).

Genetická úroveň chovaných ošípaných významne ovplyvňuje dosahované úžitkové parametre jatočnej hodnoty i výkrmnosti. Väčšina úžitkových vlastností hospodárskych zvierat sú znaky kvantitatívne, vyznačujú sa kontinuálnou premenlivosťou, sú určené pôsobením alel veľkého počtu génov spoločne s faktormi prostredia (Křenková, 1999).

Zvláštnu pozornosť si zasluhujú poznatky o vplyve jednotlivých génov na ekonomicky dôležité a využiteľné fenotypové vlastnosti. Jedná sa o cieľové (target) alebo markerové gény. Markery na úrovni DNA môžu byť kolerované s kvantitatívnymi vlastnosťami. Z toho vyplýva možnosť selekcie na základe týchto markerových génov, ktorá je označovaná ako MAS (Bulla, Kúbek, 1996).

Genetický marker je polymorfný znak, ktorého varianty vykazujú mendelistickú dedičnosť a môžu byť asociované s variabilitou úžitkových vlastností (Dvořák *et al.*, 1996). Identifikácia genetických markerov využívaných pri selekcii ošípaných sa stala predmetom výskumu v priebehu posledného desaťročia (Vaňo *et al.*, 2004).

Dôležitým predpokladom pre použitie DNA markerov je nezávislosť na podmienkach prostredia – selektívna neutrálnosť, čo v niektorých prípadoch nebýva splnené u izoenzymových markérov, na ktoré môže pôsobiť selekcia priamo, alebo ktoré bývajú často vo väzbe so selekciou vystavenými génmi (Bergmann, 1975).

Podľa Kopečného (2000) v šľachtení môžeme použiť len tie genetické markery, ktoré sa vyznačujú kodominantným typom dedičnosti, ich koeficient dedivosti je 1, môžeme ich stanoviť kedykoľvek bez ohľadu na vek zvieratá, dokonca aj po jeho smrti, vyznačujú sa jednoduchou a ľahko interpretovateľnou detekciou s malou pravdepodobnosťou chyby. Zároveň je táto detekcia ekonomicky nenáročná a automatizovateľná.

V minulosti boli používané biochemické a imunogenetické markery (krvné skupiny, antigény), ktoré reprezentujú menej ako 10 % markerov bežných väzbových máp. S vývojom nových techník sa dostali do popredia molekulárne DNA markery (Křenková, 1999). V roku 1999 O'Brien rozdelil genetické markery do skupín (tabuľka 1).

Tabuľka 1 Skupiny genetických markerov upravená podľa O'Brien (cit. Dvořák, Vrtková, 2001)

Markéry I. typu	- nevykazujú vysoký polymorfizmus - časté kandidátne gény QTL, ETL - využívajú sa pri komparatívnom mapovaní
Markéry II. typu	- nekódujúce sekvencie - charakteristický vysoký polymorfizmus - využívajú sa pre väzbové mapovanie s ohľadom na QTL - vhodné pri získavaní informácií o pôvode, populáciách, QTL
Markéry III. typu	- výskyt aj v kódujúcich i nekódujúcich sekvenciách, intrónoch a i. - známy polymorfizmus podmienený zámenou jednej bázy v DNA - poskytujú informácie o variabilite populácií, rodín, línií a i. - markery kandidátnych génov pre úžitkové znaky HZ

Na identifikáciu markerov viazaných ku QTL sa používajú dve stratégie:

- sekvenovaním genómu sú určené anonymné vysokovariabilné sekvencie DNA bez vlastného fenotypového prejavu (minisatelity, mikrosatelity) - štatistickým vyhodnotením sa určí marker najbližší ku QTL daného znaku.
- štúdiom exprimovaných (kandidátnych) génov, pri ktorých sa predpokladá, že môžu byť sami QTL na základe ich chromozomálnej lokalizácie - priamou účasťou vo fyziológii znaku alebo porovnaním účinku u iných organizmov (Rothschild, 1997).

Väzba medzi markerom a QTL nie je pevná, závisí na rekombináciách. Je možné ju stanoviť ak je narušená väzbová rovnováha medzi lokusmi (Zhang, Smith,

1993). Ak sa jedna alela markeru s určitou variantou znaku prenáša medzi generáciami, dá sa povedať, že marker a QTL pre daný znak sú vo väzbe (Bishop *et al.*, 1995).

Ideálnym markerom využiteľným v selekčnom programe by bol gén zodpovedný za konkrétny úžitkový znak (Womack, 1997).

Genetické markery sú využívané pre mapovanie QTL, ktorých bolo odhalených viac ako 2400 (reprezentujúcich 387 znakov a vlastností) na všetkých chromozómoch ošípanej (Stratil, 2009).

1.4 QTL - lokusy kvantitatívnych znakov

V šľachtení hospodárskych zvierat ide v princípe o dosiahnutie čo najlepších produkčných vlastností, čo je výsledkom nielen selekcie, ale aj mnohých molekulárno – genetických metód, využívajúcich lokusy kvantitatívnych znakov (Miluchová, 2009). Predpokladá sa, že vrámci polygénnej determinácie kvantitatívnych znakov existujú lokusy, ktoré majú veľký vplyv na úžitkovú vlastnosť (Rothschild *et al.*, 1997).

QTL označujeme ako súbor génov alebo alel génov, ktoré podmieňujú komplexnejší znak a, sú charakteristické plynulou variabilitou fenotypov a podmienenosťou viacerými génmi (Makovický *et al.*, 2007), často je biochemickej alebo fyziologickej povahy. QTL pre jeden znak sa môže nachádzať v jednom alebo rôznych chromozómoch, pôsobia samostatne alebo súborne pomocou interakcií (Bežo, Bežová, 1998). QTL môžu byť identifikované na základe viazaných DNA markerov. Prvýkrát poukázal na väzbu medzi mendelistickým markerom (farba a tvar) Sax v roku 1923 (Křenková, 1999).

Hlavným produktom na úrovni produkcie u ošípaných, t. j. na úrovni kvantitatívnych znakov je ekonomika produkcie. V genetickom výskume zameranom na ošípané (mapovanie genómu) sa najväčšia pozornosť venuje na tie lokusy kvantitatívnych vlastností (QTL), ktoré by mohli byť využité pri selekcii a hybridizácii ošípaných. Tým by bolo možné dosahovať lepšiu ekonomiku produkcie. Táto časť QTL sa preto nazýva lokusy ekonomicky významných znakov a označujú sa skratkou ETL - Economic Trait Loci (Dvořák *et al.*, 1999).

Ak je v oblasti QTL zistení gén ovplyvňujúci významnou mierou určitú vlastnosť a jeho produkt sa prejaví vo výslednom fenotype, podieľa sa na fenotypovej variabilite, označuje sa tento gén ako kandidát (Berg, 2006).

1. 4. 1 Detekcia QTL

Ku genetickej práci nestačí vedieť, že k určitému znaku existuje v populácii významný QTL, ktorý segreguje (t. j. v populácii sú rozdielne genotypy QTL). Je potrebné poznať na ktorom chromozóme a v ktorej jeho časti je daný QTL lokalizovaný. Preto sa v genóme uskutočňuje mapovanie QTL (Dvořák, Vrtková, 1999). Mapovanie zahŕňa hľadanie asociácie medzi alelami markerov a danou úžitkovosťou, vyžaduje si populáciu zvierat s dostatočne veľkou genetickou variabilitou v sledovaných znakoch (Geldermann *et al.*, 2003).

Väčšinou sa používajú dve rôzne cesty ktorými môžeme identifikovať gény ovplyvňujúce úžitkové vlastnosti:

Prvá je založená na porovnávaní (komparatívite) kandidátnych génov medzi zoologickými druhmi. Pri tejto metóde sa vychádza z bohatých informácií o genóme (napríklad myši alebo človeka) a znalosti fyziologických mechanizmov, ktoré sú podkladom pre sledované úžitkové vlastnosti a ich vonkajší prejav. Pomocou týchto informácií sú identifikované kandidátne gény u sledovaných druhov. U týchto génov sa následne hľadá polymorfizmus v kódujúcich a nekódujúcich oblastiach. Ak je polymorfizmus nájdený, je naďalej skúmaný z hľadiska možných asociácií s úžitkovými vlastnosťami štatistickými metódami. Touto cestou bolo identifikovaných niekoľko génov s ekonomickým významným účinkom, napríklad gén ryanodínového receptora (*RYR1*), ktorého recesívna alela nepriaznivo ovplyvňuje kvalitu mäsa (Rothschild, 1996).

Druhou cestou detekcie QTL je vyhľadávanie QTL pomocou genetických markerov v genóme daného druhu. Genetické markery sa použijú k „označeniu“ danej oblasti v genóme zvierat'a a následne sa v tomto úseku hľadajú polymorfné miesta. Táto metóda využíva populáciu medzidruhových a medzilíniových krížencov, pretože je u nich väčšia pravdepodobnosť segregácie alel. V rovnakých populáciách sú následne skúmané i asociácie fenotypových znakov a nájdených polymorfizmov. Nevýhodou pri tejto metóde je menšia presnosť vymedzenej oblasti kde sa nachádza QTL a potreba sledovať veľké populácie. Detekcia QTL často prebieha za pomoci oboch spomenutých metód. Metódy sa navzájom dopĺňajú (Dekkers, 1999).

1. 4. 2 Význam detekcie QTL a kandidátnych génov

Hľadanie kandidátnych génov a QTL má význam predovšetkým pri vlastnostiach s nízkou dedivosťou. Zlepšenie vlastnosti s vysokou heritabilitou je možné dosiahnuť aj klasickými metódami šľachtenia, ale molekulárna charakterizácia kandidátnych génov umožňuje urýchlenie selekcie (Mindeková, 2005).

Podľa Hurbana (1999) spočíva význam detekcie QTL a kandidátnych génov v:

- mapovaní QTL, ktoré vytvára predpoklady pre pozičné klonovanie umožňujúce štúdium molekulárnych príčin existujúcej variability
- informácie získané pomocou polymorfných znakov môžu byť použité k zlepšeniu odhadu efektu šľachtenia alebo plemennej hodnoty
- poskytujú základné poznatky o pôsobení jednotlivých génov a ich vzájomných interakciách, čím umožňujú tvoriť reálnejší model fenotypovej premenlivosti

1. 4. 3 QTL pre kvalitu mäsa ošípaných

Produkcii i kvalitu mäsa u ošípaných môžeme hodnotiť veľkým množstvom ukazovateľov. Čím všeobecnejší je ukazovateľ, tým väčšiu časť genómu a tým i viac QTL sa bude na úžitkovom ukazovateli podieľať. Fenotypový efekt jednotlivých QTL môže byť rôzne veľký (Dvořák, Vrtková, 1999).

Vzhľadom k požiadavkám spotrebiteľov sa čoraz viac kladie dôraz na zlepšovanie kvality mäsa. Detekcia QTL pre tieto znaky je pomerne obtiažna. Hlavným dôvodom je komplexnosť jej regulácie vzhľadom k vplyvu polygénnych faktorov a jednak k faktorom prostredia pred a po porážke (Nii *et al.*, 2005). Na kvalitu mäsa majú najväčší efekt QTL detekované na šiestom chromozóme (Geldermann *et al.*, 2003). Počiatky mapovania QTL produkcie a kvality mäsa sú v polovici 90-tych rokov. Prvé komplexnejšie výsledky boli získané v populácii 200 ks ošípaných z F2 generácie referenčnej rodiny divoká ošípaná x yorkshire. Boli určené 4 významné QTL na 4 a 13 chromozóme. Výsledky rôznych laboratórií publikované do roku 2000 určili QTL pre celú radu ukazovateľov na ďalších chromozómoch (Dvořák, Vrtková, 2001).

V posledných rokoch bola za účelom mapovania QTL u ošípaných realizovaná celá rada programov, ktoré sa zameriavajú predovšetkým na znaky rastu, kvalitu mäsa

a zloženie jatočného tela (Bidanel, Rothschild, 2002). Vo väčšine z nich sú pre mapovanie využívané trojgeneračné rodiny, ktoré vznikli krížením divergentných plemien. Výsledkom je veľké množstvo QTL pre produkčné vlastnosti a ich počet sa neustále zvyšuje (Vykoukalová, 2005).

Identifikované QTL

1. pre rast = chromozóm : 1, 3, 4, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, X
2. pre kvalitu mäsa = chromozóm : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12,
13, 14, 15, 16, 17, 18
3. pre tuk = chromozóm : 1, 5, 6, 7, 13, 14, 18, X

(Dvořák, Vrtková, 2001).

1.5 MAS - markermi podporovaná selekcia

S vývojom molekulárno - genetických metód a objavom metódy RFLP sa zvýšil záujem o využitie lokusov genetických markerov v selekčných programoch (Trakovická, Kúbek, 1996). Vývojom genetickým máp hospodárskych zvierat, ktoré poskytl veľké množstvo vysoko polymorfných markerov rovnomerne rozmiestnených po genóme sa tento predpoklad využitia MAS stal reálnym (Křenková, 1999).

Aplikácia markerov pre monogénny znak (prvý prípad MAS) bola uvedená v 80-tych rokoch minulého storočia využívaním biochemických markerov viazaných k lokusu *RYRI* u ošípaných za účelom eliminácie alely stresovej náchylnosti z maternálnych línií (Rothschild, Ruvinsky, 1998). Prostredníctvom markeru, ktorý je rozpoznateľný laboratórnou technikou je uskutočňovaná selekcia na QTL s ktorým je vo väzbe (Přibil, 1995).

Základné hľadisko dobrého využitia markerov v MAS spočíva v odhalení umiestnenia QTL na chromozómoch, vo veľkosti ich účinku a v ich alelových frekvenciách. Väčšina dostupných štúdií zaoberajúcich sa odhaľovaním QTL je obmedzená množstvom vzťahov, štruktúrami rodokmeňov a počtom zvierat hodnotených v molekulárnych variantách. Toto spôsobuje, že väčšina odhadov má pomerne vysokú štatistickú chybu (Bobrová, 2003).

MAS je veľmi efektívna hlavne pri vlastnostiach s nízkou dedivosťou alebo znakoch, ktoré sú viazané na pohlavie. Jej efekty boli overené v rôznych štúdiách založených na simulačných prepočtoch (Bulla, Kúbek, 1996).

Markery, ktoré sú použité v rámci MAS musia byť presne označené, vysoko polymorfne, spoľahlivé, zverejnené, heterozygotné a musia mať presnú fyzikálnu úlohu (Keatson *et al.*, 1991).

1. 5. 1 Výhody MAS

Prínos tejto metódy je hodnotený ako dodatočné zvýšenie efektu selekcie oproti bežným programom. Zvýšenie genetického zisku je odhadované od + 5 % do + 30 % (Bulla, Kúbek, 1996).

Výhody spočívajú v možnosti selekcie u oboch pohlaví (pri znakoch pohlavím limitovaných), v selekcii znakov ťažko merateľných (kvalita mäsa, rezistencia voči chorobám), vo využití včasnej selekcie (nie je nutné čakať na údaje z výkrmu a jatočného rozboru, na výsledky z prvého vrhu plemenných zvierat a podobne), čo zvýši selekčnú intenzitu. Na včasnejšiu selekciu nadväzuje skrátenie generačného intervalu. U ošípaných je obvykle dosahovaný krátky generačný interval, preto je táto výhoda skôr zohľadňovaná u druhov ako je hovädzí dobytok. Pokiaľ budú mať dve zvieratá rovnakú plemennú hodnotu, následne informácie o markeroch môže uľahčiť výber v prospech zvierat'a, ktoré bude nositeľom výhodnejšej alely pre sledovaný znak (Křenková, 1999).

1. 5. 2 Využitie MAS

Použitie MAS v praxi závisí na stave markerovej technológie (Visscher, Halley, 1995), na cene laboratórnej detekcie genotypov zahrnutých génov, na frekvencii markerových alel, sile väzby markeru ku QTL a efektu major génu na prejav daného znaku (Webb, 1996).

Podľa Spelmana *et al.*, (1996) uplatnenie MAS v selekčných schémach je závislé na správnej identifikácii QTL. Môžu vznikať problémy vyplývajúce z nepresného odhadu pozície alebo efektu QTL. Pri chybnom odhade QTL (vysvetľuje 10 % fenotypovej variability) sú straty spôsobené selekciou na priaznivú alelu v neexistujúcom QTL vyjadrené genetickým ziskom v prvej generácii (odhadované sú na 7 % oproti kontrolnej populácii v ktorej nie je známy QTL).

Markerovo podporovaná selekcia má uplatnenie pri úžitkových vlastnostiach s nízkymi koeficientami heritability, s vlastnosťami ťažko merateľnými, merateľnými v neskoršom veku a manifestovanými len u jedného pohlavia (Jakubec, 2002). Najlepšie

výsledky boli dosiahnuté v situáciách, kde je normálna selekcia obmedzená alebo neúčinná (Bobrová, 2003).

MAS môže byť prostriedkom introgresie priaznivých alel individuálnych génov z jedného plemena do druhého. Predpokladá sa využitie genetických markerov k spresneniu odhadu koeficientu inbridingu, k charakterizácii plemien podľa frekvencií alel viacerých markerov, k určeniu genetických vzdialeností medzi líniami (Visscher, Haley, 1995).

Aplikácia MAS a genetickej informácie v šľachtení vyžaduje riešenie mnoho dôležitých technických problémov, zhodnotenie všetkých výhodných informácií dostupných inými účinnými cestami, zmenšením nákladov na získanie genetickej informácie a získanie spoľahlivých odhadov efektu QTL (Bobrová, 2003).

1. 6 Metódy detekcie genetických markerov

1. 6. 1 Polymerázová reťazová reakcia - PCR

Trakovická *et al.*, (2005) uvádza, že polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction) je v súčasnosti jednou z najpoužívanejších techník v molekulárnej biológii a v molekulárnej genetike. Využíva sa na amplifikáciu (namnoženie) špecifických úsekov DNA pomocou enzymatickej syntézy *in vitro*. Túto veľmi citlivú, exaktnú a v princípe veľmi jednoduchú metódu vyvinul Kary Banks Mullis v laboratóriu H. A. Erlicha firmy Cetus Corp (California, USA).

Princíp PCR metódy spočíva v syntéze DNA zmenou teploty reakčnej zmesi opakovaním (25 – 35 krát) cyklu skladajúceho sa z troch krokov:

- **denaturácia DNA**
- **annealing** - hybridizácia primerov
- **polymerizácia** - syntéza nových vlákien DNA na matrici (Miluchová *et al.*, 2009).

PCR sa môže rozdeliť na špecifickú (štandardnú, konvenčnú) a nešpecifickú. Špecifická využíva dva špecifické primery, navrhnuté na základe poznania sekvencie špecifického úseku amplifikovaných fragmentov DNA. Nešpecifická PCR využíva

primery náhodnej sekvencie pre amplifikáciu náhodných úsekov DNA v akomkoľvek genóme (Ma *et al.*, 2003).

Výsledkom PCR je zmnoženie pôvodného počtu kópií cieľového úseku DNA 2^n krát (kde n znamená počet cyklov). Skutočnosť však úplne nezodpovedá matematickému modelu, empiricky zistená efektívnosť cyklu sa pohybuje medzi 60 % – 85 %. Prakticky to znamená, že z desiatok, či stoviek kópií DNA je možné získať rádovo pikogramy až nanogramy cieľovej sekvencie - dostatočné množstvo pre presnú detekciu a ďalšie spracovanie (Ferenčík *et al.*, 2000).

1. 6. 2 Základné komponenty pre úspešný priebeh PCR

Aby mohla reakcia prebehnúť úspešne, je potrebné mať k dispozícii základné zložky PCR nevyhnutné pre amplifikáciu, ktoré tvorí templátová DNA, *Taq* polymeráza, primery - priamy, spätný, voľné nukleotidy - dNTP, reakčný roztok, horčíkové ióny a deionizovaná voda (tabuľka 2).

Tabuľka 2 Komponenty nevyhnutné pre PCR

Templátová DNA	<ul style="list-style-type: none"> • plazmidová, vysokomolekulárna DNA v rôznom stupni čistoty • možnosť použitia hrubých bunkových lyzátov • ako templát môže byť aj RNA 	Bauerová, 2004
<i>Taq</i> polymeráza	<ul style="list-style-type: none"> • izolovaná z termofilnej baktérie <i>Thermus aquaticus</i> • kľúčový enzým celého procesu • podstatný vplyv na výsledok PCR 	Bauerová, 2004 Rosypal, 2002
Primery	<ul style="list-style-type: none"> • syntetické jednovláknové oligonukleotidy dĺžky 17 - 30 báz • vymedzujú požadovaný úsek na molekule DNA, ktorú chceme amplifikovať 	Trakovická, 2005
Voľné nukleotidy	<ul style="list-style-type: none"> • potrebné deoxyribonukleotidtrifosfáty: dATP, dGTP, dCTP, dTTP • ich optimálna koncentrácia sa pohybuje v rozpätí 50 – 200 μM 	Petruska, 1988
Reakčný roztok	<ul style="list-style-type: none"> • predstavuje potrebné iónové prostredie • štandardne obsahuje 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,5) pri 25 °C, 1,5 mM MgCl₂, 200 μM dNTPs, 0,1-0,01 μM primery, 1-2 U enzýmu a tlmivý roztok 	Miluchová, 2009

Horčíkové ióny (Mg²⁺)	<ul style="list-style-type: none"> • obvykle sa používa MgCl₂, alebo MgSO₄ • koncentrácia MgCl₂ v PCR reakcii pri použití <i>Taq</i> polymerázy je 1 – 4 mM. • pre každý templát a pár primerov sa stanovuje koncentrácia Mg²⁺ empiricky 	Petruska, Goodman, 1998
---	---	-------------------------------

1. 6. 3 Identifikácia a analýza produktov PCR

Produkty PCR analyzujeme elektroforeticky. Výber typu nosiča - gélu (agaróza, polyakrylamid) závisí od veľkosti fragmentov, ktoré chceme separovať. Vizualizácia fragmentov je možná pomocou transiluminátora s UV žiarením. Veľkosť produktu zistíme pomocou štandardných DNA markerov molekulových hmotností. Na podrobnejšie preskúmanie produktu využívame reštrikčnú analýzu, sekvenačné metódy a hybridizáciu so špecifickou sondou - rádioaktívne alebo enzymaticky značenou (Bauerová, 2004).

1. 6. 4 Modifikácie PCR

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov je metóda založená na detekcii DNA reštrikčných fragmentov pomocou PCR amplifikácie. Amplifikácia reštrikčných fragmentov je založená na ligácii dvojvláknových adaptorových sekvencií čo slúži ako univerzálne väzbové miesto pri primery počas PCR reakcie (Knoll, Vykoukalová, 2002).

AS PCR (Allele Specific PCR)

Alelovo špecifická PCR na detekciu bodových mutácií a delécií využíva alelovo špecifické primery. Na stanovenie alely nie je potrebné reštrikčné miesto pre pôsobenie endonukleázy, varianty alel sú detekované priamo elektroforetickým delením PCR produktov (Dvořák, Vrtková, 2001).

ARMS PCR (Amplification Refractory Mutation System)

Amplifikačný refrakčný mutačný systém je varianta AS PCR. Je založená na princípe detekcie akejkoľvek mutácie v rozsahu zámény jedného nukleotidu alebo

malej delécie. Táto metóda je jednoduchá, spoľahlivá, neizotopová a jasne odliší heterozygota od oboch homozygotov (Ferrie et al., 1992).

RT PCR (Real –Time PCR)

PCR v reálnom čase je moderná metóda umožňujúca sledovanie priebehu PCR v reálnom čase na základe intenzity fluorescenčného signálu. Pre priebeh reakcie je potrebný špeciálny typ cyklera, ktorý okrem cyklovania dokáže odčítať intenzitu fluorescencie a obsahuje riadiacu a vyhodnocovaciu jednotku (Knoll, Vykoukalová, 2002).

RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)

Náhodne polymorfna amplifikovaná DNA je technika umožňujúca rýchlu detekciu polymorfizmu v genóme založená na amplifikácii (zmnožení) oblasti genómu použitím krátkych primerov (10 - 12 nukleotidov) náhodnej sekvencie (Williams *et al.*, 1990).

Multiplex PCR

Predstavuje technicky jednoduchšiu efektívnejšiu detekčnú metódu SNP polymorfizmov génov. Pre jej úspešnosť je rozhodujúci najmä design vhodných primerov, voľba správneho teplotného a časového profilu (Manga, Dvořák, 2007). Môže slúžiť na zvýšenie rýchlosti DNA sekvenovania (Carvalho, Pena, 2005), pri detekcii mutácii zapríčiňujúcich rôzne ochorenia, pri génovej expresii, testovaní paternity a dekodovaní genetického kódu (Manga, Dvořák, 2007).

1. 6. 5 Metóda RFLP

Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov je označenie pre jav, pri ktorom sa po štiepení vzoriek DNA prejavia rozdiely v dĺžke takto vzniknutých DNA reštrikčných fragmentov. Vzniknutý polymorfizmus je spôsobený rozdielmi v stavbe týchto reťazcov v DNA, na čo citlivo reagujú štiepiace enzýmy - reštrikčné endonukleázy (King *et al.*, 2006), ktoré môžu štiepiť DNA priamo v nich, v susedstve, alebo na vzdialenom mieste (Miluchová, 2009).

PCR - RFLP

Pomocou PCR sa na základe genómovej DNA amplifikuje špecifická sekvencia (napríklad úsek génu) a pomocou polymorfizmu dĺžky reštrikčných enzýmov (RFLP) sa detekujú alely na základe prítomnosti alebo absencie špecifického reštrikčného miesta. To má za následok vznik fragmentov DNA rôznej veľkosti, ktoré sú prerozdelené na agarózovom géli. Výhodou metódy je nenáročnosť a možnosť určenia miesta mutácie. Hlavnou nevýhodou je skutočnosť, že pravdepodobnosť detekcie mutácie je relatívne nízka a závisí od počtu použitých enzýmov. Táto metóda je vhodná pre gény s väčším polymorfizmom alebo analýzou intrónov (nekódujúcich sekvencií) (Trakovická, 2005).

1. 7 Šiesty chromozóm ošípanej

Najviac preskúmaným chromozómom ošípaných je práve šiesty chromozóm (obrázok 1). Dôvodom tohto obrovského záujmu výskumných pracovníkov má začiatky vo zvýšenom záujme po chudom bravčovom mäse. Prvá vedecká konferencia o tomto chromozóme sa uskutočnila v roku 1995 (Dvořák, 1997).

Medzi významné gény lokalizované na šiestom chromozóme, ktoré súvisia s mäsovou úžitkovosťou patrí gén ryanodínového receptora *RYR1*, gén leptínového receptora *LEPR* a melanokortínový 5 receptor *MC5R*.

1. 7. 1 Gén ryanodínového receptora (*RYR1*)

Florescenčnou in situ hybridizáciou - FISH bol *CRC* gén lokalizovaný na chromozóme *6q12* (Chowdhary *et al.*, 1994).

Fujii *et al.*, (1991), zistil preukaznú súvislosť medzi genotypmi *RYR1* a stresovým faktorom prasiat (PPS). Maligna hypertermia je autozomálne dedičná porucha charakterizovaná zvýšeným osmotickým tlakom kostrovej svalovine, spôsobuje náhle zvýšenie telesnej teploty, srdcovú aritmiu a zlyhanie obličiek. Príčinou je abnormálne zvýšenie Ca^{2+} v svalových bunkách (Tammaro *et al.*, 2003). Príčinou vzniku genotypu zodpovedného za syndróm malignej hypertermie je mutácia. Podstata mutácie spočíva v jednoduchej zámene nukleotidu cytozínu za tymín v pozícii 1843 sekvencie DNA (Gábor *et al.*, 2007).

Balatskii, Metlitskaia, (2001) preukázali asociáciu medzi genotypmi *RYR1* génu a životaschopnosťou mladých prasiat. Od konca 70-tych rokov je selekcia v oblasti kvality bravčového mäsa zameraná na elimináciu mutovanej recesívnej alely ryanodínového receptora (Matoušek *et al.*, 2006).

1. 7. 2 Gén leptínového receptora (*LEPR*)

Vytvorením panelu 27 hybridných somatických buniek (ošípanej a myši) bol gén lokalizovaný na chromozóme ošípanej *6q3.3q3.5* (Yerle *et al.*, 1996).

Leptínový receptor je proteín reagujúci na signály vyjadrujúce výživový stav, množstvo tukového tkaniva, množstvo prijímanej potravy. Pomocou neho dochádza k regulácii produkcie leptínu (Mikolášová, 2005). Boli identifikované dve základné formy leptínového receptora. Dlhá forma, kde produkcia prebieha v hypotalame a krátka forma, ktorá je popísaná v piatich variantách a vyskytuje sa v mnohých orgánoch, tukovom tkanive, v hypotalame a jej funkcia v porovnaní s dlhou formou je menej významná (Larade, 1997).

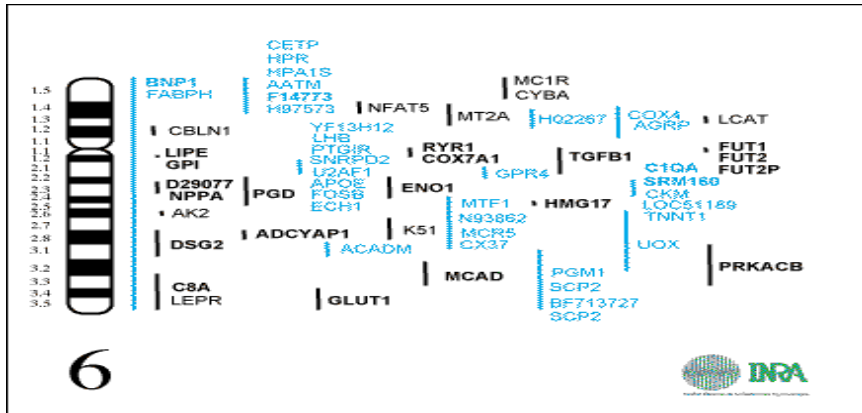
Pri štúdiu kandidátnych génov u ktorých sa predpokladá možný vplyv na produkčné vlastnosti bol odhalený výrazný účinok génu *LEPR* na obsah tuku bravčového mäsa ošípaných. Vyhodnotením vzťahu tohto génu k ukazovateľom kvality mäsa autori zistili preukazný vplyv na priemerné denné prírastky, na obsah IMF pri plemene hampshire a na hrúbku chrbtovej slaniny plemena landras (Emnett *et al.*, 2001).

1. 7. 3 Melanokortínový 5 receptor (*MC5R*)

Vytvorením panelu hybridných somatických buniek potkana a ošípanej bol gén lokalizovaný na chromozóme *6q24-(1/2)q31* (Kim *et al.*, 2000).

Medzi kandidátne gény s efektom na obsah tuku bravčového mäsa zaraďujeme gén melanokortínového 5 receptora (Mindeková, Trakovická, 2006). Gén *MC5R* patrí do rodiny melanokortikotropných génov kóduje syntézu receptora pre adrenokortikotropný hormón a melanokortikotropný hormón. Proteín *MC5R* predstavuje mediátor pre termoreguláciu, sekréciu žliaz a sexuálne správanie (Kim *et al.*, 2000). Nukleotidová substitúcia *A303G* vedie k aminokyselinovej zámene *Ala.* za *Thr.* v 109. pozícii (Kováčik *et al.*, 2010).

Emnett *et al.*, (2001) analýzou celej populácie zistili preukazný vplyv *MC5R* na hrúbku chrbtovej slaniny, hoci individuálnou analýzou neodhalili žiadne preukazné asociácie.



Obrázok 1 Cytogenetická mapa 6. chromozómu ošípanej (INRA)

V kapitole nie je uvedený významný gén šiesteho chromozómu *H-FABP*. Tento kandidátny gén je predmetom nasledujúcej kapitoly.

1. 8 Rodina FABP (fatty acid binding proteins)

Vnútrosvalový tuk (IMF) je významným ukazovateľom kvality bravčového mäsa. Významnou mierou vplýva na organoleptické vlastnosti mäsa. Za optimálny obsah vnútrosvalového tuku sa považuje 2 - 3 % (De Vol *et al.*, 1998). Hrúbka chrbtovej slaniny a obsah vnútrosvalového tuku sú v genetickej kolerácii 0,37 (Hovenier *et al.*, 1992). Šľachtením ošípaných zameraného na redukciiu tuku obsah vnútrosvalového tuku (IMF) klesá pod požadovanú úroveň (Gerbens *et al.*, 1999). Podľa Hoveniera *et al.*, (1992) genetické zlepšenie obsahu vnútrosvalového tuku môžeme dosiahnuť vďaka vysokej dedivosti ($h^2 = 0,6$).

1. 8. 1 Biologická funkcia

FABPs – fatty acid binding proteins - je označenie pre rodinu cytoplazmatických proteínov uvoľňovaných pri metabolizme a prenose mastných kyselín z bunkovej membrány do miesta ich oxidácie a miesta vzniku fosfolipidov a triacylglycerolu. Bolo identifikovaných a podľa hlavného miesta pôsobenia pomenovaných deväť členov tejto skupiny proteínov (Damcott *et al.*, 2003).

FABP môžu ovplyvňovať vnútrobunkovú koncentráciu mastných kyselín a tým regulovať rôzne bunkové procesy a čiastočne aj metabolizmus tukov (Mikolášová, 2005).

Specht *et al.*, (1996) uvádzajú, že inhibítor rastu nádorových buniek produkovaný mliečnou žľazou (MDGI - mammary derived growth inhibitor), je kombinácia *H-FABP* a proteínu *A-FABP*.

1. 8. 2 Proteín tukového tkaniva viažuci mastné kyseliny (*A-FABP*)

Pomocou chromozomálnej lokalizácie sa určila lokalizácia *A-FABP* génu na štvrtom chromozóme. Bielkovina *A-FABP* sa prednostne exprimuje v bunkách tukového tkaniva. Okrem transportu mastných kyselín z cytoplazmy k miestu biosyntézy tukov *A-FABP* navyše zabezpečuje ich spätný presun k membráne.

Analýzou genetickej variability šiestich plemien pomocou mikrosatelitného motívu [CA]₂₁ lokalizovaného na začiatku druhého exónu, amplifikovaného PCR metódou bolo identifikovaných deväť alel. Pri plemene duroc boli detekované tri alely so zodpovedajúcou dĺžkou opakovania 22(A1), 33(A2), 19(A3), ktoré môžu tvoriť šesť genotypových kombinácií (Gerbens *et al.*, 1998).

1. 8. 3 Srdcový proteín viažuci mastné kyseliny (*H-FABP*)

H-FABP (heart-fatty acid binding protein) je 15 kDa proteín, ktorý je prítomný v tkanivách vysoko náročných na mastné kyseliny, napríklad kostnej a srdcovej svalovine, laktujúcej mliečnej žľaze (Mikolášová, 2005).

1. 8. 3. 1 Lokalizácia na chromozóme

Mapovanie dvoma panelmi hybridných buniek. Lokalizácia na šiestom chromozóme (Gerbens *et al.*, 1997). Pri komparatívnom mapovaní a ZOO-FISH analýze bola vykonaná lokalizácia na *6q21-q26* (Gerbens *et al.*, 2000). Podľa Óvilo *et al.*, (2002) je *H-FABP* gén lokalizovaný medzi lokusmi: *Sw316-4,4cM-H-FABP-12,5 cM-SO228*. Kompletná sekvencia *H-FABP* génu je uvedená v prílohe 2.

Vyказuje 86 až 92 % aminokyselinovú homológiu s inými cicavčiami *H-FABP* génmi (Gerbens *et al.*, 1997).

1. 8. 3. 2 Polymorfizmus *H-FABP*

PCR-RFLP metódou s použitím reštrikčných enzýmov *Hinfl*, *HaeIII* a *MspI* sa odhalili tri jednoduché polymorfizmy. Reštrikčné miesto pre *Hinfl* je lokalizované v 5' spätnom regióne. Polymorfný typ *Hinfl* je charakteristický pre PCR produkt veľkosti 700 bp a reštrikčné fragmenty štiepené nasledovne: H (197 + 59 bp) a h (256 bp), pričom vznikajú aj nepolymorfne fragmenty. (Gerbens *et al.*, 1997, cit. Dvořák, Vrtková, 2001). Podľa Dvořáka, Vrtkovej (2001) existujú rozdiely vo frekvencii genotypov rôznych plemien predovšetkým v polymorfnom mieste *Hinfl* (tabuľka 3). Reštrikčné miesta pre *MspI* a *HaeIII*, detekované rovnakým primerom amplifikujúci PCR produkt veľkosti 800 bp sú lokalizované v druhom intróne *H-FABP* génu.

Gerbens *et al.*, (1997) reštrikčnou endonukleázou *Hinfl* uviedli ako jednoznačne najfrekventovanejší pri plemenách yorkshire, duroc genotyp HH. U plemena landrace zistili miernu prevahu genotypu Hh. Veľmi nízka bola frekvencia genotypu hh pri plemene landrace. Pri yorkshire genotyp hh vôbec nebol detekovaný.

Urban *et al.*, (2002) študovali 97 ošípaných (46 prasníc a 51 kancov) plemena large white a landrace. Použité boli primery 5' GGACCCAAGATGCCTACGCCG a 5' CTGCATCTTTGACCAAGAGG. Identifikovali tri genotypy *H-FABP/Hinfl*, kde ako najfrekventovanejší označili genotyp HH (0,56), ďalej zistili nízky výskyt hh (0,05), heterozygotný genotyp sa vyskytoval s frekvenciou (0,39). Títo autori zistili vyššiu frekvenciu výskytu alely H oproti h.

Gerbens *et al.*, (1998) zistili pomocou *HaeIII* 100 % prevahu alely D pri plemenách hampshire a meishan, zatiaľ čo pri plemenách duroc, landras, yorkshire zistili prevahu recesívnej alely (d).

Emnett *et al.*, (2001) si vybrali k štúdiu polymorfizmu *H-FABP/HaeIII* štyri otcovské populácie plemien berkshire (180), duroc (77), landrace (55), hampshire (160). Svojím výskumom stanovili prevahu dominantnej alely (D) nad recesívnou (d).

Ye *et al.*, (2002) v experimente pomocou PCR-RFLP použili 429 krížencov plemien hampshire (H), duroc (D), a large white (LW). Ako reštrikčná endonukleáza bola použitá *HaeIII*, *MspI*. Štúdiom *H-FABP/HaeIII* bol zistený genotyp DD (0,410), s podobnou frekvenciou genotyp Dd (0,469). Najmenej sa vyskytoval genotyp dd (0,121). Pomocou *MspI/H-FABP* sa zistila jednoznačná prevaha AA (0,666). Jedince

s genotypmi Aa (0,267) a aa (0,067) sa vyskytovali v skúmanej populácii veľmi zriedkavo.

Ernst *et al.*, (2003) analyzovali genetickú variabilitu *H-FABP* génu a ďalších 7 kandidátnych génov 67 ošípaných (*Sus scrofa scrofa*). Analýza *H-FABP* génu sa uskutočnila pomocou metódy PCR-RFLP reštrikčnou endonukleázou *HinfI*. Týmto experimentom analýzy genetickej variability bola zistená frekvencia alely H = 1,00. Z tejto génovej a genotypovej štruktúry vyplýva nulová hodnota heterozygotnosti a nulová hodnota PIC.

Yang *et al.*, (2005) študoval genotypovú štruktúru *H-FABP/HaeIII* použitím PCR-RFLP u 286 ošípaných plemien mashen, shanxi white pig a krížencov. Zistil 100 % prevahu genotypu DD pri plemene mashen. Pri krížencoch detekoval genotypy DD a Dd. Použitím *HinfI* u hybridov plemien shanxi white pig a duroc bol detekovaný len genotyp HH. Pri plemene mashen bola frekvencia alely h 0,9727. V reštrikčnom mieste *HinfI* druhého intrónu tohto plemena boli nájdené genotypy BB a Bb.

Mindeková *et al.*, (2006) uskutočnila genotypovanie prasníc BU, BUxLD a plemenných kancov viacerých plemien PCR-RFLP metódou. Pomocou enzýmu *HinfI* zistila miernu prevahu homozygotného genotypu HH (0,487) nad heterozygotným Hh (0,381). Zaznamenala vyššiu frekvenciu alely H (0,678) v porovnaní s alelou h (0,322).

Antosik *et al.*, (2006) hodnotili 18 krížencov plemien yorkshire, landrase, duroc, pietran a 36 jedincov Line 890. Genotypy boli identifikované metódou PCR-RFLP a boli použité *HaeIII*, *MspI* a *HinfI* enzýmy. Enzýmom *MspI* bol detekovaný genotyp AA (78,38 %) u skupiny Line 890. U krížencov (LxY)x(DxP) tento genotyp nebol vôbec detekovaný. Genotyp Aa u skupiny Line 890 bol oveľa nižší (16,22 %) oproti krížencom (LxY)x(DxP), kde dosiahol vysoké hodnoty (93,75 %). Genotyp aa u oboch hodnotených skupín dosiahol nízke - podobné hodnoty Line 890 (5,4 %) a (LxY)x(DxP) (6,25 %). Z analýzy jednoznačne vyplýva prevaha alely A (89,62 %) nad alelou a (10,38 %). Enzýmom *H-FABP/HaeIII* zistili vyššie percentuálne zastúpenie genotypu DD u krížencov (LxY)x(DxP) = 41,18 % oproti skupine Line 890 = 16,21 %. Frekvencia genotypov Dd bola 37,84 % u Line 890 a 58,82 % u krížencov. Frekvencia genotypov dd bola nájdená len u skupiny Line 890, kde predstavovala hodnotu 45,95 %. Bola stanovená mierna prevaha alely d (53,70 %) oproti dominantnej alele (46,30 %). Pomocou *H-FABP/HinfI* autori nezistili genotyp HH ani v jednej hodnotenej populácii. Frekvencia Hh dosiahla nižšiu hodnotu pri

skupine Line 890 (28,57 %) oproti krížencom (82,35 %). Pomerne vysoká frekvencia genotypu hh (71,43 %) bola u skupiny Line 890 oproti skupine krížencov (LxY)x(DxP), kde dosahovala hodnotu 17,65 %, z čoho vyplýva prevaha alely h (76,92 %) nad alelou H (23,08 %).

Kováčik et al., (2010) uskutočnili experiment, kde hodnotili 102 jedincov. 50 kancov a 52 prasničiek hybridnej kombinácie biela ušľachtilá a landras pomocou metódy PCR-RFLP. Použili špecifické oligonukleotidové primery, endonukleázu *HinfI*. V skupine identifikovali tri genotypy s frekvenciami: HH – 0,5490, Hh – 0,2745 a hh – 0,1765 pre *H-FABP* gén. Frekvencie alel kandidátnych génov v populácii ošípaných boli pre alelu H = 0,6862 a pre alelu h = 0,3137. Z tejto génovej a genotypovej štruktúry zistili heterozygotnosť ($H_e = 0,4392$) a polymorfny informačný obsah (PIC = 0,3323).

Tabuľka 3 Frekvencia genotypu *H-FABP/HinfI* u troch plemien ošípaných (upravené podľa Dvořák, Vrtková, 2001).

GENOTYP	PLEMENO		
	Landrace	Duroc	Yorkshire
HH	0,45	0,60	0,94
Hh	0,50	0,20	0,06
hh	0,05	0,20	0,00

1. 8. 3. 3 Vplyv na úžitkové vlastnosti

Gerbens *et al.*, (1998) sa v asociačných štúdiách zamerali na plemeno duroc. Pri homozygotných haplotypových triedach aa - dd - HH zistili vyšší obsah IMF. Podľa efektu heterozygotných genotypových tried autori uvádzajú, že *MspI* a *HaeIII* typ polymorfizmu vykazujú aditívny, zatiaľ čo polymorfizmus *HinfI* recesívny spôsob dedičnosti. Toto zdôvodňujú rekombináciou alel niektorých rodičovských jedincov. Podobne preukázané diferencie zistili aj v prípade asociácie *H-FABP* génu k hrúbke chrbtovej slaniny, čím potvrdili vzájomnú koreláciu medzi obsahom IMF a hrúbkou chrbtovej slaniny. S ohľadom na aplikovateľnosť *H-FABP* génu v MAS odporúčajú selekciu na aa - dd - HH genotypovú triedu, ktorá vedie k zvýšeniu obsahu IMF a hrúbky chrbtovej slaniny.

Gerbens *et al.*, (1999) odporúčajú selekčným programom zameraným na redukciu tuku eliminovať nežiaduci nárast hrúbky chrbtovej slaniny. Súčasne však

poukazujú na obtiažnosť hodnotenia asociácie *H-FABP* proteínu na hrúbku chrbtovej slaniny, pretože proteín sa neexprimuje v bunkách tukového tkaniva. Podľa nich hrúbku slaniny ovplyvňujú gény, ktoré sú vo väzbe s *H-FABP* génom (gény kódujúce fosfoglukonát dehydrogenázu - *PGD*, glukózofosfát izomerázu - *GPI*, *RYS* a podobne).

Štúdiom expresie génu *H-FABP* boli zistené významné rozdiely medzi jednotlivými *H-FABP/HaeIII* genotypmi na úrovni expresie mRNA, nie však na úrovni expresie proteínu. Zároveň je úroveň expresie *H-FABP* mRNA v preukázanej asociácii k obsahu vnútro svalového tuku. Preukázané rozdiely v obsahu IMF medzi jednotlivými *H-FABP/HaeIII* genotypmi boli zistené v skupine kancov. V skupine prasníc neboli stanovené (Gerbens *et al.*, 2001).

Nechtenberger *et al.*, (2001) uskutočnili štúdiu na rakúskych populáciách ošípaných plemien pietrain, large white a landras za účelom potvrdenia asociácie génu *H-FABP* s obsahom IMF a ďalších ukazovateľov mäsovej úžitkovosti. Genotypy boli stanovené pre *HinfI*, *MspI* a *HaeIII* *H-FABP* metódou PCR-RFLP. Štatistická analýza bola uskutočnená použitím GLM metódy pre každé plemeno zvlášť. Analýza nepreukázala vplyv *H-FABP* genotypu na obsah IMF, ale boli nájdené preukazné asociácie s inými znakmi mäsovej úžitkovosti v závislosti na jednotlivých plemenách. Preukazne lepšie hodnoty denného prírastku a farby mäsa boli asociované s genotypom HH u large white, plemeno landras nemalo žiadny ukazovateľ preukazne asociovaný s týmto polymorfizmom a u jedincov plemena pietrain mal genotyp hh pozitívny vplyv na kvalitatívny ukazovateľ mäsa, stratu odkvapom, ale autori konštatovali, že nepokladajú testované polymorfizmy vhodné k využitiu v šľachtení rakúskych plemien.

Urban *et al.*, (2002) študovali asociáciu *H-FABP* genotypov na obsah intramuskulárneho tuku, percento cenných mäsových častí a hrúbku chrbtovej slaniny. Za pomoci GLM analýzy (SAS 2000) nezistili preukazný vplyv *H-FABP* genotypov na hodnotené vlastnosti. Boli zistené len rozdiely v vplyve genotypov HH a Hh na obsah IMF. Plemeno nemalo vplyv na dosahovanú úžitkovosť.

Genotyp AA (*MspI*) má významný vplyv na telesnú hmotnosť v rôznej fáze rastu. *H-FABP/HaeIII* sa nepreukázala významná asociácia s hrúbkou chrbtovej slaniny a vnútro svalového tuku (Ye *et al.*, 2002).

Nebol nájdený žiadny významný vzťah *H-FABP* génu identifikovaný reštrikčnými endonukleázami *HaeIII*, *MspI* a *HinfI* a obsahom vnútro svalového tuku (Antosik *et al.*, 2006).

Efekty genotypu *H-FABP* nie sú jednoznačne potvrdené, ale pri analýzach sa preukázal pozitívny vplyv genotypového zloženia matiek na niektoré kvantitatívne ukazovatele produkcie, predovšetkým na podiel cenných mäsových častí a obsah svaloviny v jatočnom tele (Mindeková *et al.*, 2006).

Pang *et al.*, (2006) tiež analyzovali efekty *H-FABP* génu pre obsah IMF a hrúbku chrbtovej slaniny metódou PCR-RFLP. Na štúdiu sa zúčastnilo 256 plemien ošípaných duroc, large white, landrace, neijiang, rongchang, bamei pig, hanjiang black, hanzhong white. Boli použité enzýmy *HinfI* s primermi P1: 5'-GGACCCAAGATGCCTACGCCG-3', 5'-CTGCAGCTTTGACCAAGAGG-3', *HaeIII*, *MspI* s použitými primermi P2 : 5' - ATTGCTTCGGTGTGTTTGAG-3', 5'-TCAGGAATGGGAGTTATTGG-3'. Pri homozygotných haplotypových triedach HH, dd, aa bol zaznamenaný vyšší obsah IMF aj hrúbky chrbtovej slaniny, (HH>Hh>hh, DD<Dd<dd, a AA<Aa<aa). Touto analýzou sa potvrdila vzájomná korelácia týchto vlastností. Výsledky naznačujú, že kvalitu bravčového mäsa možno zlepšiť zvýšením frekvencie genotyp aa-dd-HH v chovu ošípaných.

Uemoto *et al.*, (2007) analyzovali 499 čistokrvných ošípaných plemena duroc metódou PCR-RFLP. Zistili významné rozdiely pri produkčnej vlastnosti IMF medzi *H-FABP* genotypmi. Podľa neho Genotyp AA má podstatne väčší pozitívny vplyv na obsah IMF ako genotypy Aa a aa, (*MspI*), genotyp DD má tiež podstatne vyšší pozitívny vplyv na obsah IMF ako Dd a dd, (*HaeIII*). Naproti tomu *H-FABP* (*HinfI*) má vyšší vplyv na obsah vnútro svalového tuku pri genotype hh ako pri HH. Výsledky ukázali, že vplyv genotypu na hodnoty IMF boli približne 40 %.

Zhao *et al.*, (2009) hodnotili ošípané plemena zhaotong wujin, metódou PCR-RFLP (*HinfI*, *HaeIII*). Svojimi výsledkami zistili, že *H-FABP* genotypy ovplyvňujú obsah IMF v tomto plemene. Vplyv *H-FABP* genotypov na obsah IMF bol nasledovný: HH>Hh>hh (*HinfI*), dd>Dd>DD (*HaeIII*).

Na základe *H-FABP* génu majú rozdiely medzi jednotlivými genotypmi štruktúru pre ukazovatele: hrúbka chrbtovej slaniny (BFT) a podiel cenných mäsitých častí (LM) (HH > Hh > hh). Priemerný denný prírastok (ADG) bol najvyšší pri genotype hh. BFT index (hrúbka chrbtovej slaniny) bol pozorovaný na dolnej hranici preukaznosti pre gén *H-FABP* (Kováčik *et al.*, 2010).

2. CIEĽ PRÁCE

Cieľom predkladanej diplomovej práce bolo:

1. identifikovať polymorfizmus *H-FABP* génu prostredníctvom optimalizovanej PCR-RFLP
2. zistiť génovú a genotypovú štruktúru produkčných populácií plemien biela ušľachtilá, pietrain a hybridov biela ušľachtilá x landras domáci
3. vyhodnotiť medzipliesennú variabilitu sledovaných produkčných populácií ošípaných

3. MATERIÁL A METÓDY

3.1 Biologický materiál

Pre štúdium polymorfizmu vybraného kandidátneho génu bol použitý biologický materiál získaný od ošípaných z produkčných populácií.

Ošípaným bola odoberaná krv veterinárnym lekárom z krčnej žily – *vena jugularis* do skúmavky s antikoagulačným roztokom ACD (0,48 % kyselina citrónová, 1,32 % citrát sodný, 1,47 % glukóza), v pomere 1 : 6 (ACD : krv). Vzorky boli až do zahájenia analýz zmrazené.

Plemenné zloženie a počty ošípaných testovaných plemien:

1. krížence plemien Biela ušľachtilá a Landras domáci (BUxLD) - 91
2. plemeno Biela ušľachtilá - 82
3. plemeno Pietrain - 82

3.1.1 Charakteristika plemien ošípaných

Biela ušľachtilá (BU)

Toto plemeno vzniklo z pôvodných ošípaných *Sus scopa palustris* žijúcich v Anglicku. Je stredného až väčšieho telesného rámca. Má nepigmentovanú pokožku, z ktorej vyrastajú biele štetiny. Hlava je strednej veľkosti, ľahká a suchá, uši vzpriamené, končatiny pevné a suché. Je kombinovaného úžitkového až mäsového typu. Kance v dospelosti dosahujú hmotnosť 300 – 320 kg, prasnice 220 – 250 kg. Plemeno dosahuje tieto parametre : 11 živonarodených prasiatok, 48,5 % CMČ, hrúbka slaniny 2,33 cm a 18,92 % mäsa zo stehna z hmotnosti jatočnej polovičky (obrázok 4).

Landras domáci (LD)

Slovenský landras domáci vznikol na základe importovaného plemena z Kanady, Poľska, Švédska v šesťdesiatych rokoch. Plemenný typ je vyjadrený bielym sfarbením, hlava je ľahká, uši sklopené, je stredného až veľkého telesného rámca. Živá hmotnosť dospelých kancov 270 – 290 kg, výška v kohútiku u kancov 85 – 90 cm. Živá hmotnosť prasníc 230 – 250 kg, výška v kohútiku 80 – 85 cm. Dlhé stredotrupie, veľmi dobre osvalené. Je to plemeno s vynikajúcimi reprodukčnými vlastnosťami, primeranou

mäsovou úžitkovosťou. Plemeno dosahuje tieto parametre: 11 živonarodených prasiatok, 50 % podiel CMČ, hrúbka slaniny 2,37 cm a 18,93 % mäsa v stehne z hmotnosti jatočnej polovičky (obrázok 5).

Pietrain (P)

Ide o najmladšie plemeno v západnej Európe. Je mäsového úžitkového typu. Je typické svojím šedo bielym sfarbením s nepravidelnými čiernymi až červenožltými škvrkami. Má hlboké, dobre vyvinuté stehno, mohutné pliecko, široký chrbát s výraznou strednou ryhou. Dospelé kance majú živú hmotnosť 280 kg a prasnice 240 kg. Spomedzi všetkých plemien sa vyznačujú najväčším množstvom mäsa s najmenším množstvom tuku v jatočnom tele, nižšou reprodukčnou úžitkovosťou. Plemeno dosahuje tieto parametre: počet živonarodených prasiat je 10,2, podiel CMČ je z jatočnej polovičky je 61,9 %, hrúbka chrbtovej slaniny 1,1 cm, pri podiele mäsa v stehne z hmotnosti jatočnej polovičky 26,98 % (obrázok 6).

3. 2 Chemické látky

Na prípravu potrebných roztokov sme použili chemické látky uvedené v tabuľke 4.

Tabuľka 4 Chemické látky potrebné na prípravu roztokov

Chemická látka	Chemický vzorec	Molekulová hmotnosť (g.mol⁻¹)
EDTA Kyselina etyléndiamíntetraoctová	$C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2 H_2O$	372,24
Tris Hydroxymethyl – aminomethane	$C_4H_{11}NO_3$	121,14
SDS Sodná soľ dodecylsulfátu	$C_{12}H_{25}O_4S \cdot Na$	288,4
Chlorid amónny	NH_4Cl	53,49
Hydrogénuhličitan draselný	$KHCO_3$	262,89

3. 2. 1 Použité roztoky

1. Roztok na lýzu červených krviniek – 5 x RBC roztok:

Zloženie:	250 ml
0,77 M NH ₄ Cl	10,2968 g
0,046 M KHCO ₃	1,1514 g
0,01 M EDTA pH 8,0	5 ml 0,5 M EDTA
Sterilizované filtráciou.	
Použili sme 1 x RBC	

2. Lyzačný roztok:

Zloženie:	100ml
50 mM Tris-HCl pH 8,0	5 ml 1M Tris-HCl pH 8,0
100 mM EDTA pH 8,0	20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
100 mM NaCl	2 ml 5 M NaCl
1 % SDS	10 ml 10 % SDS
H ₂ O MiliQ	do 100 ml

3. Roztok na precipitáciu proteínov:

Zloženie:
10 M octan amónny

4. Roztok na rozpúšťanie DNA:

Zloženie:
10 mM Tris-HCl pH 8,5

5. Roztok pre elektroforézu:

Zloženie:
50 x TAE
Pre elektroforézu sme použili 1 x TAE.

3. 2. 2 *Príprava roztokov*

1. EDTA - 0,5 M, pH 8,0

Di-natrium EDTA x 2 H ₂ O	93,05 g
Pridať H ₂ O	400 ml
Upraviť na pH 8,0 konc. NaOH	10 g
H ₂ O	doplniť do 500 ml

2. EDTA - 0,01 M, pH 8,0

Nariedené z 0,5 M EDTA.

3. Tris-HCl - 1 M, pH 7,5

Tris	60,5 g
Pridať H ₂ O	400 ml
Upraviť na pH 7,5 konc. HCl	30 ml
H ₂ O	doplniť do 500 ml

4. Tris-HCl - 1 M, pH 8,0

Tris	60,5 g
Pridať H ₂ O	400 ml
Upraviť na pH 8,0 konc. HCl	21 ml
H ₂ O	doplniť do 500 ml

5. Etídium bromid

Ethidiumbromid	1 g
H ₂ O	100 ml

6. Etanol 70 %

96 % etanol	87,5 ml
H ₂ O	30 ml

7. Izopropanol 100 %

100 % izopropanol (2-propanol)

8. 50 x TAE

Tris	242,0 g
EDTA . 2H ₂ O	37,2 g
Kyselina octová ľadová CH ₃ COOH	57,1 ml
H ₂ O	doplniť do 1000 ml

9. 1 x TAE

Nariedili sme z pripraveného 50 x TAE v pomere 1 : 50

3. 3 Prístrojové vybavenie

Pri izolácií DNA a PCR-RFLP sme použili nasledovné prístroje: analytické váhy, centrifuga, elektroforéza, pipety, spektrofotometer, vodný kúpeľ, vortex, termostat, termocykler, UV transiluminátor.

3. 4 Použité metódy

3. 4. 1 Izolácia genómovej DNA z krvi

Izoláciu krvi sme uskutočnili z krvi produkčných populácií ošípaných lýzou buniek, precipitáciou proteínov, precipitáciou DNA a rozpustením DNA.

Lýza buniek

Rozmrazenú krv sme premiešali pipetou a napipetovali 500 µl celkovej krvi do 1,5 ml eppendorfky s 1000 µl 1 x RBC roztokom. Inkubovali sme vzorku 1-3 minúty pri laboratórnej teplote a premiešali 3 x obracanim hore dnom. Eppendorfky sme centrifugovali pri 13000 otáčkach dve minuty. Odstránili sme supernatant, ale nechali 10-20 µl roztoku nad peletom bielych krviniek. Vzorky sme vortexovali 10-20 sekúnd. Po vortexovaní by pelet bielych krviniek nemal byť viditeľný! Potom sme pridali sme 600 µl lyzačného roztoku a pipetovaním hore-dole 3-5 krát sme lyzovali bunky. Obyčajne nie je potrebná inkubácia, ale v niektorých vzorkách, v ktorých bolo vidieť zhľuky buniek po premiešaní, sme inkubovali pri 37 °C vo vodnom kúpeli pokiaľ nebol roztok homogénny.

Precipitácia (zrážanie) proteínov

Vzorky sme ochladili na laboratórnu teplotu. K lyzovaným vzorkám sme pridali 200 μ l roztoku na precipitáciu proteínov. Vortexovali sme pri najvyššej rýchlosti 20 sekúnd, aby sa roztok na precipitáciu proteínov dôkladne premiešal s bunkovým lyzátom. Vzorky sme centrifugovali pri maximálnych otáčkach (13 000) pri teplote 20-25 °C 20 minút. Precipitované proteíny vytvorili pevný tmavo-hnedý pelet na dne eppendorfky. Ak nebolo vidieť na dne proteínový pelet, znova sme vortexovali pri najvyššej rýchlosti. Potom sme inkubovali vzorku 5 minút na ľade a znova uskutočnili centrifugáciu pri rovnakých podmienkach.

Precipitácia DNA

Supernatant obsahujúci DNA sme odliali (pelet precipitovaných proteínov zostal v eppendorfke) do čistej 1,5 ml eppendorfky obsahujúcej 600 μ l 100 % izopropanolu (2-propanol). Vzorky sme premiešali obrátením 50-krát. Potom sme ich centrifugovali pri 13 000 otáčkach 5 minút. DNA bolo viditeľné ako malý biely pelet. Dôkladne sme odpipetovali supernatant. Pridali sme 600 μ l 70 % etanolu a premyli pelet DNA obrátením uzatvorenej eppendorfky niekoľko krát hore-dole. Eppendorfky sme centrifugovali pri 13 000 rpm 5 minút. Potom sme veľmi dôkladne odpipetovali etanol. Je nutné dávať pozor na plávajúci pelet – nemôžeme ho odsať! Nakoniec sme vzorky dali vysušiť do termostatu pri teplote 37 °C po dobu 10-15 minút, alebo dlhšie, podľa potreby v závislosti od veľkosti peletu.

Rozpustenie DNA

Na rozpustenie DNA sme pridali potrebné množstvo 30 μ l 10 mM Tris-HCl pH 8,5, aby sme mohli zriediť pre prípad potreby. Vzorky DNA sme rozpúšťali inkubáciou po dobu 30 minút až 1 hodiny pri 65 °C, alebo cez noc pri laboratórnej teplote. Vzorky sme periodicky premiešavali jemným zatrasením skúmaviek na uľahčenie rozpúšťania. DNA sme skladovali pri 4 °C. Pre dlhodobé skladovanie sa DNA uskladňuje pri teplote - 20 °C alebo - 80 °C.

3. 4. 2 PCR *H-FABP* génu

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili na Termocykléri PTC 150 (MJ Reasearch).

Primery:

Na amplifikáciu špecifických úsekov génu *H-FABP* sme použili nasledovné oligonukleotidové primery FOR a REV prevzaté z práce Gerbens et al., (1997).

H-FABP FOR 21-mer:

5' - GGA CCC AAG ATG CCT ACG CCG- 3'

H-FABP REV 20-mer:

5' - CTG CAT CTT TGA CCA AGA GG- 3'

Reakčná zmes:

Na polymerázovú reťazovú reakciu sme použili *Taq* DNA polymerázu Recombinant (5U/μl) a ostatné zložky (tabuľka 5).

Tabuľka 5 Zloženie reakčnej zmesi s objemom 25 μl.

Komponent	Konečná koncentrácia
1. Sterilná voda	-----
2. 10 x Reaction buffer (NH ₄) ₂ SO ₄ (<i>Fermentas</i>)	1 x
3. MgCl ₂ 25 mM (<i>Fermentas</i>)	1,7 mM
4. dNTP Mix 10 mM (<i>Fermentas</i>)	0,2 mM
5. Primery <i>H-FABP</i> 10 pM/μl (<i>Invitrogen</i>)	10 pM
6. <i>Taq</i> DNA polymerase 5 U/μl (<i>Fermentas</i>)	1 U
7. Templát DNA	100 ng/ μl

Tabuľka 6 Teplotný a časový režim PCR reakcie

Kroky	Cyklus	Teplota	Čas
1.	„štart“	94 °C	3 minút
2.	Denaturácia	94 °C	30 sekúnd
3.	Annaeling	60 °C	40 sekúnd
4.	Polymerizácia	72 °C	1 minút
5.	Elongácia	72 °C	10 minút
6.	Schladenie	4 °C	uskladnenie

Počet cyklov: 30 (1 cyklus = 2. + 3. + 4.)

3. 4. 3 PCR - RFLP

Pre RFLP analýzu bol vybraný reštrikčný enzým Fastdigest *HinfI* (Fermentas) (tabuľka 7), ktorý štiepil získané PCR produkty so známou sekvenciou.

Tabuľka 7 Zloženie štiepiacej zmesi RFLP s objemom 15 µl.

Komponent	Výsledná koncentrácia	Množstvo na 1 vzorku
Sterilná voda (MiliQ)	-----	12 µl
10 X FastDigest Buffer	1x	2 µl
ENZÝM <i>HinfI</i>	-----	1 µl

Postup štiepenia:

Do pripravenej štiepiacej reakčnej zmesi sme pridali PCR produkty.

H-FABP (*HinfI*) - celkový objem 25 µl, z toho :

- štiepiaca zmes 15 µl
- PCR produkt 10 µl

Inkubácia prebiehala pri 37 °C po dobu 5 minút. Použitý reštrikčný enzým je uvedený v tabuľke 8:

Tabuľka 8 Priebeh štiepenie reštrikčným enzýmom

Názov	RE miesto	Teplota štiepenia	Doba inkubácie
<i>HinfI</i>	G↓ANTC	37 °C	5 minút

3. 4. 4 Elektroforéza v agarózovom géli

Na prípravu agarózových gélov (Sambrook *et al.*, 1989) sme použili agarózu (Invitrogen) a 1 x TAE roztok, pričom výsledná koncentrácia gélu závisela od veľkosti fragmentu DNA. Pri kontrole PCR produktov sme použili 2 % gél. Gél obsahoval interkalačné činidlo etídium bromid (0,5 µg/ml). Vzorok boli sme naniesli spolu s farbiacim roztokom (Blue orange). Pri elektroforetickej identifikácii štiepných fragmentov sme nanášali celý objem štiepnej zmesi 30 µl spolu s 5 µl xylenciánovo modrým farbiacim roztokom s obsahom EDTA. Elektroforéza prebiehala v 1 x TAE roztoku pri napätí maximálne 130 V po dobu 30 minút. Po skončení elektroforézy sme nadelené fragmenty DNA detekovali UV transiluminátorom. Pre presné určenie veľkosti fragmentov sme používali DNA markery (Gene Ruler 50 bp, Fermentas).

3. 5 Matematicko - štatistické spracovanie výsledkov

Na matematicko - štatistické spracovanie vstupných údajov (genotypová štruktúra hodnotených súborov ošípaných) sme použili výpočet pre génovú a genotypovú frekvenciu so vzťahmi pre dvojalelový polymorfny systém.

1. Frekvencie alel podľa Hardy – Weinbergovho zákona

$$p_A = \frac{2AA + AB}{2N} \quad q_B = \frac{2BB + AB}{2N}$$

p_A – frekvencia alely A

q_B – frekvencia alely B

N – počet jedincov v populácii

2. Frekvencie genotypov podľa Hardy – Weinbergovho zákona

$$(p_A + q_B)^2 = p_A^2 + 2p_Aq_B + q_B^2 = 1$$

χ^2 – testom sme overili významnosť rozdielov medzi experimentálnou a teoretickou frekvenciou genotypov hodnotených skupín zvierat.

3. Genotypová rovnováha overená χ^2 – testom

$$AA : AB : BB = (p_A)^2 : 2p_Aq_B : (q_B)^2$$

$$\chi^2_{(n-1)} = \sum \frac{(e-t)^2}{t}$$

e – pozorovaný počet genotypov

t – teoretický počet genotypov

n – počet genotypových tried

Vypočítaná hodnota χ^2 - testu bola na základe stupňov voľnosti porovnávaná s tabuľkovou hodnotou podľa Fischera a následne určená pravdepodobnosť zhody alebo rozdielov medzi teoretickými a experimentálnymi hodnotami.

$p > 0,05$ = štatisticky nepreukazné
 $p < 0,05$ = štatisticky preukazné
 $p < 0,001$ = štatisticky vysoko preukazné

4. Smerodajná odchylka

$$s = \pm \sqrt{\frac{p_A \cdot q_a}{2N}}$$

Polymorfny obsah lokusu sme zhodnotili na základe koeficienta homozygotnosti (C_a), koeficienta heterozygotnosti (H_e), úrovne polymorfnosti lokusov (N_a) a polymorfneho informačného obsahu (PIC).

5. Koeficient homozygotnosti

$$C_a = \sum p_i^2$$

6. Koeficient heterozygotnosti

$$H_e = 1 - \sum (p^2 + q^2)$$

7. Úroveň polymorfnosti

$$N_a = \frac{1}{p^2 + q^2}$$

8. Polymorfny informačný obsah

$$PIC = 1 - \sum (p^2 + q^2) - \left(\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2 \right)$$

4. VÝSLEDKY

4.1 *H-FABP*

V súlade so stanovenými cieľmi sme uskutočnili optimalizáciu jednotlivých krokov či už pri samotnej izolácii DNA alebo v metóde PCR-RFLP génu *H-FABP* pre podmienky nášho laboratória.

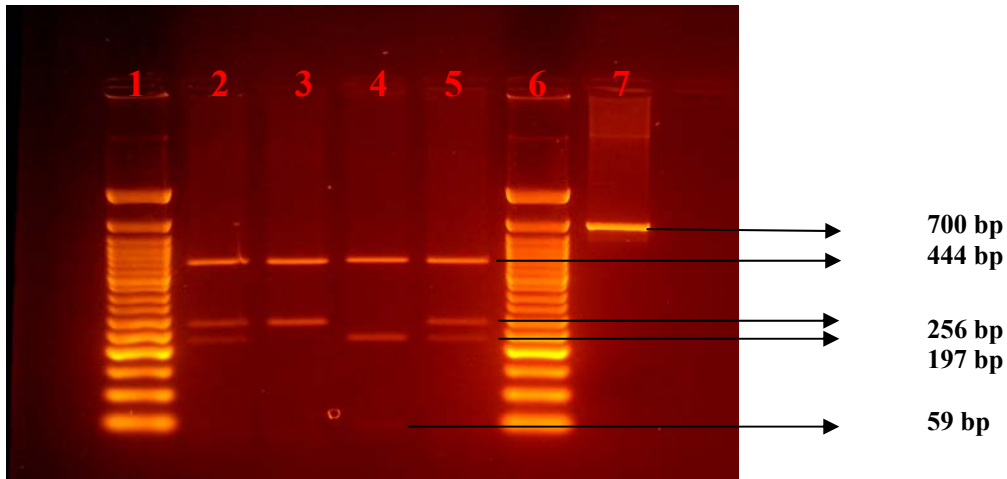
4.2 Izolácia genómovej DNA

Genómová DNA bola izolovaná z krvi 255 jedincov produkčnej populácie ošípaných vysolovacou metódou podľa Millera *et al.*, (1987). Presný postup izolácie je uvedený v kapitole Materiál a metódy.

4.3 PCR - RFLP

Analýzu polymorfizmu *H-FABP* génu sme uskutočnili PCR-RFLP metódou použitím primerov FOR : 5' - GGA CCC AAG ATG CCT ACG CCG - 3' a REV: 5'- CTG CAT CTT TGA CCA AGA GG - 3' podľa Gerbens *et al.*, (1997). Celkový objem reakčnej zmesi bol 25 µl a jej zloženie je uvedené v tabuľke 4 v kapitole Materiál a metódy. Samotná reakcia prebehla v termocykleri za dodržania teplotných a časových podmienok PCR programu (tabuľka 6). Počas prvých troch minút prebehla úvodná denaturácia pri teplote 94 °C. Následne prebehol 30 násobný cyklus troch krokov, ktorý pozostával z denaturácie pri teplote 94 °C 30 sekúnd, annealingu pri teplote 60 °C 40 sekúnd a polymerizácie počas 1 minúty a pri teplote 72 °C. Nakoniec prebehla záverečná polymerizácia, ktorá trvala 10 minút pri 72 °C. Po skončení všetkých krokov došlo k schladeniu na teplotu 4 °C.

Takto získané PCR produkty veľkosti 700 bp sme štiepili reštrikčnou endonukleázou *HinfI* v reštrikčnom mieste G↓ANTC pri teplote 37 °C (tabuľka 8) a dobe inkubácie 5 minút, pričom vo všetkých hodnotených súboroch produkčných populácií ošípaných sme detekovali tri genotypy.



Obrázok 2 Reprezentatívne výsledky analýzy PCR-RFLP pre gén *H-FABP*

Dráha 1: 50 bp marker - DNA Step Ladder (Fermentas)

Dráha 2: 444 bp (nepolymorfny fragment) + 256 bp + 197 bp..... Hh genotyp

Dráha 3: 444 bp (nepolymorfny fragment) + 256 bp..... hh genotyp

Dráha 4: 444 bp (nepolymorfny fragment) + 197 bp + 59 bp..... HH genotyp

Dráha 5: 444 bp (nepolymorfny fragment) + 256 bp + 197 bp Hh genotyp

Dráha 6: 50 bp marker - DNA Step Ladder (Fermentas)

Dráha 7: 700 bp - PCR produkt

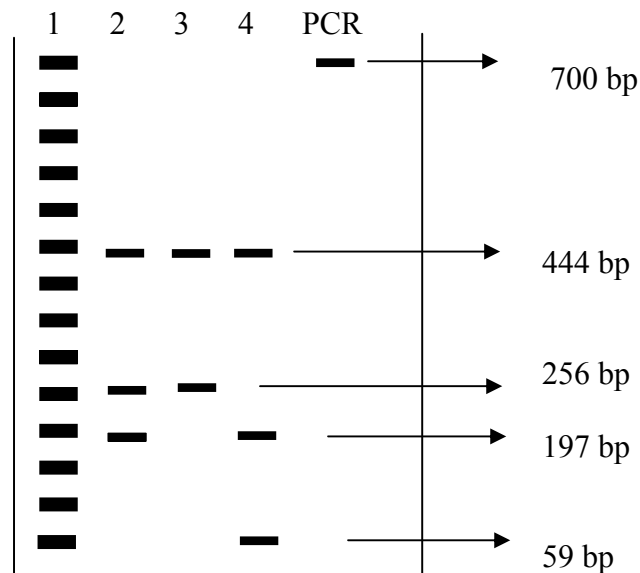


Schéma 1 Schématické zobrazenie štiepných fragmentov *H-FABP* 700 bp

1 : 50 bp DNA step ladder, 2 : genotyp Hh, 3 : genotyp hh, 4 : genotyp HH, 5 : PCR produkt.

4. 4 Matematicko - štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry

4. 4. 1 Genetická štruktúra hybridov BUxLD na základe H-FABP génu

V súbore 91 hybridov ošípaných BUxLD sme detekovali tri genotypy *H-FABP* génu. Najviac sa vyskytoval genotyp hh (48,35 %), menšie zastúpenie mala heterozygotná forma (38,46 %) a genotyp HH mal najmenšie zastúpenie (13,19 %). Z tejto analýzy genetickej štruktúry vyplýva vyššia frekvencia alely h (0,6758) oproti alele H (0,3242).

Na základe χ^2 - testu sme zistili štatisticky nepreukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov v populácii krížencov biela ušľachtilá x landras domáci, realizoval sa rovnovážny stav (tabuľka 9).

Tabuľka 9 Genetická štruktúra BUxLD na základe *H-FABP* génu

Plemeno	Genotyp	Počet	Frekvencie			χ^2 -test d.f.=2
			Genotyp	Alela		
BUxLD	HH	12	9,5631	H	h	1,3594
	Hh	35	39,8736	0,3242	0,6758	
	hh	44	41,5631	$\pm 0,0500$	$\pm 0,0500$	

4. 4. 2 Genetická štruktúra plemena BU na základe H-FABP génu

V produkčnej populácii plemena biela ušľachtilá sme analyzovali 82 jedincov, pričom sme detekovali tiež tri genotypy *H-FABP* génu. S najväčším zastúpením sa vyskytoval genotyp hh (43,91 %), o niečo menej bolo heterozygotov (39,02 %). Dominantných homozygotov bolo najmenej aj v tomto súbore (17,07 %). S touto genotypovou štruktúrou súvisí prevaha alely h (0,6341) nad alelou H (0,3658).

Chí kvadrát testom sme zistili štatisticky nepreukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov v súbore jedincov plemena biela ušľachtilá a teda realizoval sa rovnovážny stav (tabuľka 10).

Tabuľka 10 Genetická štruktúra plemena biela ušľachtilá na základe *H-FABP* génu

Plemeno	Genotyp	Počet	Frekvencie			χ^2 -test d.f.=2
			Genotyp	Alela		
BU	HH	14	10,9756	H	h	2,0723
	Hh	32	38,0487	0,3658	0,6341	
	hh	36	32,9757	±0,0181	±0,0181	

4. 4. 3 Genetická štruktúra plemena pietrain na základe *H-FABP* génu

Pri plemene pietrain sme do hodnotenia genotypovej štruktúry *H-FABP* génu zapojili 82 jedincov produkčnej populácie a následne detekovali tri genotypy. V tomto hodnotenom súbore sa na rozdiel od predchádzajúcich najviac vyskytovali heterozygoti (45,12 %), s menším zastúpením genotypov HH (31,71 %) a hh (23,17 %). Na základe tejto genotypovej štruktúry vyplýva prevaha alely H (0,5426) nad alelou h (0,4573).

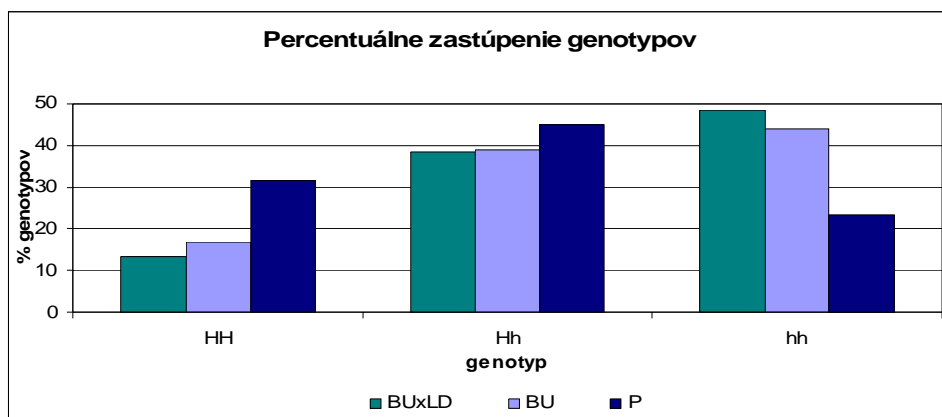
Hodnota chí kvadrát testu bola v súbore jedincov plemena pietrain tiež štatisticky nepreukazná, realizoval sa rovnovážny stav (tabuľka 11).

Tabuľka 11 Genetická štruktúra plemena pietrain na základe *H-FABP* génu

Plemeno	Genotyp	Počet	Frekvencie			χ^2 -test d.f.=2
			Genotyp	Alela		
Pietrain	HH	26	24,1493	H	h	0,6780
	Hh	37	40,7012	0,5426	0,4573	
	hh	19	17,1495	±0,0193	±0,0193	

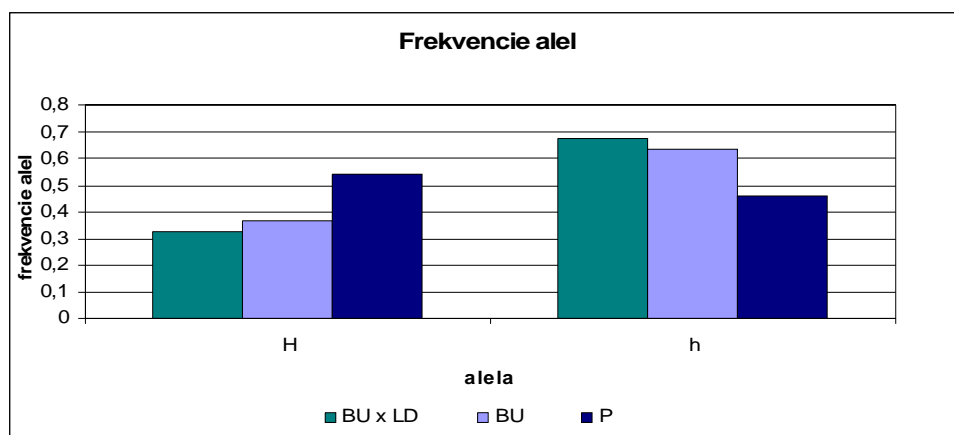
4. 4. 4 Polymorfny obsah lokusu *H-FABP* génu v sledovaných populáciách

Porovnaním študovaných produkčných skupín ošípaných sme zistili porovnateľnú genotypovú štruktúru v súbore BUxLD a BU, ktorá bola nasledovná: hh > Hh > HH. Percentuálny zastúpenie genotypu hh u týchto hodnotených populácií presiahlo 40 %. Naopak pri plemene pietrain bol detekovaný genotyp hh s najmenšou frekvenciou a heterozygot s najvyššou (graf 1).



Graf 1 Porovnanie percentuálneho zastúpenia genotypov v hodnotených populáciách ošípaných

Vo frekvenciách alel sa hodnotené populácie líšili. Zistila sa zvýšená frekvencia alely H u plemena pietrain oproti ostatným dvom súborom zvierat v poradí P (0,5426) > BU (0,3658) > BUxLD (0,3242). Z toho vyplývajú frekvencie recesívnej alely v poradí P (0,4573) < BU (0,6341) < BUxLD (0,6758) (graf 2).



Graf 2 Porovnanie frekvencie alel v hodnotených populáciách ošípaných

Vo všetkých hodnotených súboroch produkčných populácií ošípaných sme zistili prevahu homozygotnosti (C_a) nad heterozygotnosťou (H_e). Najväčšia homozygotnosť bola zaznamenaná v populácii krížencov biela ušľachtilá x landras domáci (0,5618), menšie hodnoty boli pri plemenách biela ušľachtilá (0,5351) a pietrain (0,5035), z čoho vyplýva následna heterozygotnosť v poradí BUxLD < BU < P.

Efektívnosť pôsobenia alel sme vyjadrili v populácii úrovňou polymorfnosti (N_a). V dvojalelovom systéme sa za hraničnú hodnotu udáva 2,00 za predpokladu, že sa obe alely efektívne podielajú na tvorbe genotypov. V našom prípade sa táto úroveň blíži k tejto hranici (1,7799 – 1,9859), v poradí $BU_{xLD} < BU < P$. Na vyššiu úroveň polymorfnosti poukazuje aj hodnota PIC, ktorá sa tiež vykazuje vyššie hodnoty, v poradí $BU_{xLD} > P > BU$ (tabuľka 12).

Tabuľka 12 Efektívnosť pôsobenia alel génu *H-FABP* v hodnotených populáciách

Plemeno	C_a	H_e	N_a	PIC
BU_{xLD}	0,5618	0,4381	1,7799	0,4210
BU	0,5359	0,4640	1,8660	0,3563
Pietrain	0,5035	0,4963	1,9859	0,3731

5. DISKUSIA

Srdcový proteín viažuci mastné kyseliny je kandidátnym génom pre obsah intramuskulárneho tuku. Tento gén je asociovaný s hrúbkou chrbtovej slaniny u ošípaných.

V hodnotených súboroch ošípaných plemien biela ušľachtilá, pietrain a krížencov BUxLD sme detekovali tri genotypy (HH, Hh a hh) pomocou *HinfI* rovnako ako Urban *et al.*, (2002) pri plemenách large white, landrace, Mindeková *et al.*, (2006) pri prasniciach BU, BUxLD a plemenných kancov rôznych plemien a Kováčik *et al.*, (2010) pri hybridoch BUxLD. Yang *et al.*, (2005) použitím rovnakého enzýmu pri plemene mashen detekovali len dva genotypy (BB, bb) a krížencoch plemien shanxi x duroc zistili iba genotyp HH. Toto tvrdenie vyvracia Antosik *et al.*, (2006), ktorí tento genotyp nenašli ani v jednej svojej hodnotenej populácii ošípaných.

Aj Ye *et al.*, (2002) analýzou krížencov plemien hampshire, duroc, large white a Antosik *et al.*, (2006) pri krížencoch plemien yorkshire, landrace, duroc, pietrain identifikovali tri polymorfizmy *H-FABP* génu, ale ako reštrikčný enzým nepoužili *HinfI* ako my, ale *HaeIII* s ktorým detekovali genotypy DD, Dd a dd. Naopak Yang *et al.*, (2005) touto reštrikčnou endonukleázou pri plemene mashen zistil len genotyp DD.

Enzýmom *MspI* Ye *et al.*, (2002) v experimente identifikovali AA, Aa, aa genotypy hoci Antosik *et al.*, (2006) u krížencov (LxY)x(DxP) AA genotyp nezistili.

Gerbens *et al.*, (1997) štúdiom plemien yorkshire, duroc charakterizovali genotyp HH ako najfrekvantovanejší, Urban *et al.*, (2002) štúdiom plemien large white, landrace ich výsledky potvrdili (HH – 0,56, Hh – 0,39, hh – 0,05). Ernst *et al.*, (2003) reštrikčnou endonukleázou *HinfI* detekovali genotyp HH so stopercentnou prevahou. Aj Mindeková *et al.*, (2006) zistili miernu prevahu homozygotného genotypu HH (0,487) nad heterozygotným Hh (0,381). Kováčik *et al.*, (2010) rovnakým postupom uskutočnil experiment s hybridnou populáciou BUxLD, kde zistil frekvencie genotypov: HH (0,5490), Hh (0,2745) a hh (0,1765). Avšak všetky tieto výsledky vôbec nekolerujú s našimi hodnotenými súbormi zvierat. Ako najfrekvantovanejší sme označili genotyp hh pri BUxLD (48,35 %) a BU (43,91 %). Prevahu recesívnych homozygotov (71,43 %) nám potvrdili Antosik *et al.*, (2006) u skupiny hybridov Line 890, pričom genotyp HH nebol detekovaný. Výsledky Dvořáka, Vrtkovej (2001), ktorí

pri plemene landrace zistili minimálnu prevahu heterozygotov, potvrdzujú našu analýzu plemena pietrain, kde sme zistili najviac Hh (45,12 %).

Ye *et al.*, (2002) analýzou *H-FABP/HaeIII* pri krížencoch hampshire, duroc a large white zistil podobné frekvencie genotypov DD (0,410), Dd (0,469) a s nižšou frekvenciou dd (0,121), pričom Yang *et al.*, (2005) pri štúdiu plemena mashen týmto enzýmom zistil 100 % prevahu dominantných homozygotov.

Ye *et al.*, (2002) pri svojom experimente okrem toho použil aj enzým *MspI*, kde tiež zistil jednoznačnú prevahu AA (0,666) oproti Aa (0,267) a zriedkavým výskytom aa (0,067). Toto tvrdenie podporili aj Antosik *et al.*, (2006) s percentuálnym podielom genotypu AA - 78,38 % , aa - 5,4 % u skupiny Line 890. Naopak títo autori vyvracajú svoje tvrdenie pri krížencoch (LxY)x(DxP), kde zistili vysoký percentuálny podiel heterozygotov s hodnotou 93,75 %.

Z hľadiska frekvencie alel sme v hodnotených skupinách produkčných populácií ošipaných zistili podobné hodnoty pri plemene BU a krížencoch BUxLD. Alela H dosahovala nižšie hodnoty (0,3658 – 0,3242) z čoho vyplýva vyššia frekvencia h. (0,6341 – 0,6758). Z hľadiska génovej frekvencie sledovaného plemena pietrain bola stanovená takmer vyrovnaná frekvencia alel H (0,5426) a h (0,4573). S našimi výsledkami sa nezhoduje štúdia Urbana *et al.*, (2002), ktorí zistili vyššiu frekvenciu alely H pri plemenách LW a LD, ani s experimentom Ernsta *et al.*, (2003), ktorí zistili maximálnu prevahu alely H. Aj Mindeková *et al.*, (2006) zistili vyšší výskyt alely H (0,678) v porovnaní s alelou h (0,322). Podobné hodnoty identifikovali Kováčik *et al.*, (2010). Naopak Yang *et al.*, (2005) pri plemen mashen zistili takmer stopercentnú prevahu recesívnej alely. Aj Antosik *et al.*, (2006) identifikovali vysokú prevahu alely h (76,92 %) nad alelou H (23,08 %).

Gerbens *et al.*, (1998) *H-FABP/HaeIII* analýzou plemien hampshire a meishan zistil 100 % prevahu alely D, hoci pri plemenách duroc, landras, yorkshire bol zistený vyšší výskyt recesívnej alely. Vysokú frekvenciu alely D potvrdzujú aj Emmett *et al.* v roku 2001 súhrnnou analýzou plemien berkshire, landras, duroc, hampshire. K úplne odlišným výsledkom dospeli Antosik *et al.*, (2006), ktorí zaznamenali skoro vyrovnané frekvencie dominantnej a recesívnej alely (0,463 – 0,537).

Ye *et al.*, (2002) *H-FABP/MspI* experimentom použitím krížencov plemien hampshire, duroc, large white označil alelu A za frekventovanejšiu. Toto tvrdenie koleruje s výskumom krížencov plemien yorkshire, landrase, duroc, pietrain a skupine

Line 890, ktoré uskutočnili Antosik *et al.*, (2006). Zistili vysokú prevahu dominantnej alely (0,8962) oproti recesívnej (0,1038).

Z génovej a genotypovej štruktúry produkčných populácií ošípaných sme vyhodnotili homozygotnosť a heterozygotnosť. Najvyššia heterozygotnosť (H_e) bola zistená pri plemene pietrain (0,4963), o málo menšie hodnoty sme zistili pri plemene biela ušľachtilá (0,4640) a krížencoch plemien biela ušľachtilá a landras domáci (0,4381). Z tejto heterozygotnosti následne vyplývajú vyššie hodnoty homozygotnosti.

Heterozygotnosť hodnotili aj Ernst *et al.*, (2003), ktorí zistili nulové hodnoty pri *Sus scrofa scrofa*. Naopak Kováčik *et al.*, (2010) pri krížencoch BUxLD zhodnotili heterozygotnosť a vo svojej práci uvádzajú hodnoty porovnateľné s našimi (0,4392).

Zistili sme úroveň polymorfности (N_a), ktorá sa približovala k hraničnej hodnote (2,00). Najväčšia hodnota bola pri plemene P (1,9859), o málo nižšia pri plemene BU (1,8660) a pri BUxLD bola (1,7799).

Polymorfny informačný obsah (PIC) vykazuje vyššie hodnoty v poradí BUxLD (0,4210) > BU (0,3563) > P (0,3731). Tieto hodnoty sa približujú k tvrdeniu Kováčika *et al.*, (2010), ktorí pri krížencoch BUxLD zistili hodnotu 0,3323. Toto vyvracajú Ernst *et al.*, (2003), ktorí zistili nulovú hodnotu (*Sus scrofa scrofa*) aj pri tomto ukazovateli.

6. NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV

H-FABP predstavuje kandidátny gén pre obsah tuku ošípaných.

V našej práci sme identifikovali polymorfizmus *H-FABP* génu prostredníctvom optimalizovanej PCR-RFLP, zistili sme génovú a genotypovú štruktúru sledovaných produkčných populácií a vyhodnotili medziľemennú variabilitu.

Odporúčame ďalej pokračovať v štúdiu polymorfizmu tohto génu, pretože poznatky z molekulovej genetiky môžu významne prispieť k plneniu cieľov šľachtiteľov a uspokojiť dopyt spotrebiteľov po chudom a zároveň kvalitnom bravčovom mäse.

Ďalej odporúčame využiť *H-FABP* gén v selekčných programoch, čím je možné znížiť hrúbku chrbtovej slaniny bez redukcie intramuskulárneho tuku.

7. ZÁVER

Nové trendy v stravovaní v súlade so zdravším životným štýlom vedú spotrebiteľov k zvýšenej spotrebe chudého bravčového mäsa. Na túto situáciu reagujú šľachtitelia, ktorí sa vo svojich programoch zameriavajú na zníženie hrúbky chrbtovej slaniny. Problém vyplýva z priamej genetickej kolerácie tejto vlastnosti s obsahom vnútro svalového tuku, ktorý je významným ukazovateľom kvality bravčového mäsa. Tento negatívny jav je možné zmierniť využitím markermi podporovanej selekcie a molekulárno – genetických metód využívajúcich QTL a kandidátne gény. Jedným z kandidátnych génov s efektom na obsah vnútro svalového tuku je *H-FABP* (srdcový proteín viažuci mastné kyseliny), ktorým sa zaoberá práca.

Stanovili sme si za cieľ identifikovať polymorfizmu *H-FABP* génu prostredníctvom optimalizovanej PCR-RFLP, zistiť génovú a genotypovú štruktúru produkčných populácií plemien biela ušľachtilá, pietrain, hybridov biela ušľachtilá x landras domáci a nakoniec vyhodnotiť medziľemennú variabilitu týchto hodnotených produkčných populácií ošípaných.

V súlade so stanovenými cieľmi sme uskutočnili analýzu polymorfizmu metódou PCR-RFLP génu *H-FABP* použitím primerov FOR: 5'-GGACCCAAG ATGCCTACGCCG-3', REV: 5'-CTGCATCTTTGACCAAGAGG-3' a reštrikčnej endonukleázy *HinfI* sme vo všetkých produkčných populáciách ošípaných stanovili tri genotypy. Následne sme pomocou matematicko - štatistických metód tieto vstupné údaje vyhodnotili.

V súbore BU a BUxLD sa najčastejšie vyskytoval genotyp hh (0,4391 – 0,4835), s menším zastúpením genotypu Hh (0,3902 – 0,3846) a HH (0,1707 – 0,1319). Naopak pri plemene pietrain bol detegovaný genotyp hh s najmenšou frekvenciou (0,2317) a heterozygot s najvyššou (0,4512).

Vo frekvenciách alel sa hodnotené populácie líšili. Zistila sa zvýšená frekvencia alely H (0,5426) u plemena pietrain oproti súboru zvierat BU (0,3658) a BUxLD (0,3242).

Vo všetkých hodnotených súboroch produkčných populácií ošípaných sme zistili prevahu homozygotnosti (C_a) nad heterozygotnosťou (H_e). Najväčšia homozygotnosť bola zaznamenaná v populácii krížencov biela ušľachtilá x landras domáci (0,5618), menšie hodnoty boli pri plemenách biela ušľachtilá (0,5351) a pietrain (0,5035), z čoho vyplýva následna heterozygotnosť v poradí BUxLD < BU < P.

Úroveň polymorfnosti sa pri všetkých hodnotených skupinách približovala k hraničnej hodnote (2,00). Najvyššia bola u plemena pietrain (1,9859), pri plemene biela ušľachtilá a hybridov BUxLD sme zistili nižšie hodnoty (1,8660 – 1,7799). Na vyššiu úroveň polymorfnosti poukazuje aj hodnota PIC, ktorá sa tiež vykazuje vyššie hodnoty v poradí BUxLD > P > BU.

Odporúčame ďalej pokračovať v štúdiu polymorfizmu tohto génu, pretože poznatky z molekulovej genetiky môžu významne prispieť k plneniu cieľov šľachtiteľov a uspokojiť dopyt spotrebiteľov po chudom a zároveň kvalitnom bravčovom mäse znížením hrúbky chrbtovej slaniny bez redukcie intramuskulárneho tuku.

8. POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ANTOSIK, K. - KRZECIO, E. - SIECZKOWSKA, H. - ZYBERT, A. - PODSIADLA-KOĆWIN, M. - KURYL, J. - LYCZYŃSKI. 2006. Relation between the polymorphism in *H-FABP* gene and chemical composition and quality of meat from Pietrain crossbreds heterozygous as regards *RYR1* gene. In *Animal Science Papers and Reports*, vol. 24, 2006, supplement 2, p. 19-27.
2. BAUEROVÁ, M. - TURČÁNI, M. - OMELKA, R. 2004. *Polymerázová reťazová reakcia*. [online]. Nitra : UKF, 2004 [cit. 2010-06-02]. Dostupné na internete: <www.kbg.fpv.ukf.sk/publikacie/PCRmaterial.pdf>
3. BALATSKII, V. N. - METLITSKAIA, E. N. 2001. DNA diagnosis of porcine stress syndrome and RYR1 genotype asociation with variability of young pig. In *Tsitol Genet.*, vol. 35, 2001, p. 43-49.
4. BERG, F. 2006. Genetic analysis of fat metabolism in domestic pigs and their wild ancestor. In *Acta Universitatis Upsaliensis, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations*, 2006, vol. 164, 40 pp. ISBN 91-554-6623.
5. BERGMANN, F. 1975. Adaptive acid phosphatase polymorphism in conifer seeds. In *Silvae Genetica*, vol. 24, 1975, no. 5/6, p. 175-177.
6. BEŽO, M. - BEŽOVÁ, K. 1998. *Genetický slovník*. Nitra : SPU. 1998, 318 s. ISBN 80-7137-556-X
7. BIDANEL, J. P. - ROTHSHILD, M. 2002. Current status of quantitative trait locus mapping in pigs. In *Pig news and Information*, 2002, vol. 23, no. 2, p. 39-54
8. BISHOP, M. D. - HAWKINS, G. A. KEEFER, C. L. 1995. Use of DNA markers in animal selection In *Theriogenology*, vol. 43, 1995, no. 1, p. 61-70.
9. BOBROVÁ, O. 2003. *Vyhodnocení asociaci genetických markeru s užitkovosti v komerční populaci prasat*. Doktorská dizerační práce. Brno : MZLU, 2003. 75 s.
10. BULLA, J. - KÚBEK, A. 1996. Uplatnenie molekulárno - genetických markérov v šľachtení ošípaných. In *Manažment a marketing v chove ošípaných*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 1996, s. 163-166. ISBN 80-7137-305-2
11. CARVALHO, C. M. - PENA, S. D. 2005. Optimization of a multiplex minisequencing protocol for population studies and medical genetics. In *Genetic and Molecular Research*, vol. 4, 2005, no. 2, p. 115-25.

12. DAMCOTT, C. - FEINGOLD, E - MOFFET, S. P. - BARMADA, M. M. - MARSHALL, J. A. - HAMMAN, R. F. - FERRELL, R. F. 2003. Variation in the FABP2 promoter alters transcriptional activity and is associated with body composition and plasma lipid levels. In *Human Genetics*, 2003, vol. 112, p. 610-616.
13. DEKKERS C. M. 1999. New technologies In Animal breeding. In *NSFI Proceedings, Des moines*. [online]. Iowa, 1999, [cit. 2009-06-10]. Dostupné na internete: <[http:// mark.asci.nscu.edu/nsif/99proc/](http://mark.asci.nscu.edu/nsif/99proc/)>
14. DEMO, P. - KRŠKA, P. - BAHELKA, I. 1998. Kvalita mäsa ošípaných bude zohrávať významnejšiu úlohu. In *Slovenský chov*, roč. 3, 1998, č. 12, s. 16-17.
15. DEMO, P. 2009. Produkty ošípaných a ich kvalita. In *Chov ošípaných* [online]. 2009, [cit. 2010-22-02]. Dostupné na internete: <<http://www.agroporadenstvo.sk/zv/osipane/chovosipanych05.htm>>
16. DE VOL, D. L. - MC KEITH, F. K. 1988. Variation in composition and possibility traits and relationships between muscle characteristics and palatability in a random sample of pork carcasses. In *Journal of Animal Science*, vol. 66, 1988, p. 385-395.
17. DVOŘÁK, J. - BULLA, J. - ČEPICA, S. 1996. Uplatnění molekulární genetiky ve šlechtění prasat. In *Sb. XVII. Genetické dny*, Brno : MZLU, 1996, s. 11-15.
18. DVOŘÁK, J. 1997. Genetické markery a plodnost prasat. In *Aktuálne a perspektívne úlohy v chove a šľachtení hospodárskych zvierat*. Nitra : INFORMA, 1997, s. 230-232. ISBN 80-967700-2-0.
19. DVOŘÁK, J. - VRTKOVÁ, I. 1999. Perspektívni genetické markery pro šlechtění prasat. In *Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*. České Budejovice, 1999, s. 33-35.
20. DVOŘÁK, J. - VRTKOVÁ, I. - HRUŠKA, D. - COUFALOVÁ, M. 1999. Genetické markery pro masnou užitkovost prasat. In *Aktuální problémy chovu prasat* [online]. Brno : MZLU, 1999 [cit. 2010-22-02]. Dostupné na internete: <<http://www.agris.cz/vyzkum/detail.php?id=127917&iSub=566&PHPSESSID=3e>>.
21. DVOŘÁK, J. - VRTKOVÁ, I. 2001. *Malá genetika prasat II*. Brno : MZLU, 2001. 91 s. ISBN 80-7157-521-6.
22. EMNETT, R. - MOELLER, S. - IRWIN, K. - ROTHSCHILD, M. F. - PLASTOW, G. - GOODWIN, R. 2001. Association Studies With Leptin

- Receptor, Melanocortin-4 Receptor, Melanocortin-5 Receptor, and Peroxisome Proliferator Activated Receptor- γ . In *Eastridge, M. L., Bacon, W. L., Knipe, C. L., Meeker, D. L., Turner, T. B., and Zartman, D. L. Research and Reviews: Swine 2001*. (OARDC Special Circular; 185), p. 57-63.
23. ERNST, M. - KUCIEL, J. - URBAN, T. 2003. Analysis of genetic variation of eight candidate genes in two wild boar subspecies. In *Czech Journal of Animal Science*, vol. 48, 2003, no. 12, s. 533-539.
24. FERÁK, V. - SRŠEŇ, Š. 1990. *Genetika človeka*. 2. preprac. vyd. Bratislava : Slovenské pedagogické nakladateľstvo, 1990. 447 s. ISBN 80-80-00349-9.
25. FERENČÍK, M. - ŠKÁRKA, B. - NOVÁK, M. - TURECKÝ, L. 2000. *Biochémiá*. Bratislava : Slovak Academic Press, 2000, 924 s. ISBN 80-88908-58-2.
26. FERRIE, R. M. - SCHWARZ, M. J. - ROBERTSON, N. H. - ET AL. 1992. Development multiplexing and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. In *American Journal of Human Genetics*, vol. 51, 1992, p. 251-262.
27. FUJII, J. - OTSU, K. - ZORZATO, F. - DE LEON, S. - KHANNA, V. K. - WEILER, J. E. - O'BRIEN, P. J. - MACLENNAN, D. H. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. In *Science*, vol. 253, 1991, p. 448-451.
28. GÁBOR, M. - TRAKOVICKÁ, A. - KASARDA, R. - MILUCHOVÁ, M. - DOBIÁŠ, M. 2007. Molekulárno – genetická detekcia génov RYR1 a ESR v populácii svine divjej európskej (*Sus scrofa scrofa*). In *Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 10, 2007, č. 1, s. 23-26.
29. GELDERMANN, H. - MÜLLER, E. - MOSER, G. - REINER, G. - BARTENSCHLAGER, H. - ČEPICA, S. - STRATIL, A. - KURYL, J. - MORAN, C. - DAVOLI, R. - BRUNSCH, C. 2003. Genome-wide linkage and QTL mapping in porcine F2 families generated from Pietrain, Meishan and Wild Boar crosses. In *Journal Breeding and Genetics*, vol. 120, 2003, no. 6, p. 363-393.
30. GERBENS, F. - RETTENBERGER, G. - LENSTRA, J. - VEERKAMP, J. - PAS, M. 1997. Charakterization chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid – binding protein gene. In *Mammalian Genome*, vol. 8, 1997, no 5, p. 328-332.

31. GERBENS, F. - VAN ERP, A. J. M. - MEUWISSEN, T. H. E. - VEERKAMP, J. H. - TE PAS, M. F. W. 1998. Heart fatty-acid binding protein gene variants are associated with intramuscular fat content and back fat thickness in pigs. In *6th World Congresson Genetics Applied to Livestock Production*, 26, 187, 1998.
32. GERBENS, F. - VAN ERP, A. J. M. - HARDERS, F. L. - VERBURG, F. J. - MEUWISSEN, T. H. E. - VEERKAMP, J. H. - TE PAS, M. F. W. 1999. Effect of genetics Variants of the heart Fatty Acid Binding Protein Gene on Intramuscular Fat and Performace traits in pig. In *Journal of Animal Science*, vol. 77, 1999, no. 4, p. 846-852.
33. GERBENS, F. - DE KONING, D. J. - HARDERS, F. L. - MEUWISSEN, T. H. E. - JANSS, L. L. G. - GROENEN, M. A. - ET AL. 2000. The effect of adipocyte and heart fatty acid-binding protein genes on intramuscular fat and bacfat content in Meishan crossbred pigs. In *Journal of Animal Science*, vol. 78, 2000, p. 552-559.
34. GERBENS, F. - VERBURG, F. J. - VAN MOERKERT, H. T. B. - ENGEL, B. - BUIST, W. - VEERKAMP, J. H. 2001. Association of heart and adipocyte fatty acid-binding protein gene expresion with intramuscular fat content in pigs. In *Journal of Animal Science*, vol. 79, 2001, no. 2, p. 347-354.
35. HOVENIER, R. - KANIS, E. - VAN ASSELDONK, T. 1992. Genetic parameters of pig meat quality traits in a halotane negative population. In *Livestock Production Science*, vol. 32, 1992, no. 4, p. 309-321.
36. HURBAN, V. 1999. *Princípy a aplikace molekulární genetiky v šlechtění*. Praha : ČZU, 1999. 242 s. ISBN 80-213-0519-3.
37. CHEN, K. - BAXTER, T. - MUIR, W. M. - GROENEN, M. A. - SCHOOK, L. B. 2007. Genetic Resources, Genome Mapping and Evolutionary Genomics of the Pig (*Sus scrofa*). In *International Journal of Biological Sciences*, vol. 3, 2007, no. 3, p. 153-165.
38. CHOWDHARY B. P. - THOMSEN P. D. - HARBITZ I. - LANDSET, M. - GUSTAVSSON, I. 1994. Precise localisation of the genes for glucose phosphate isomerase (GPI), calcium release channel (CRC), hormone-sensitive lipase (LIPE), and growth hormone (GH) in pigs, using nonradioactive in situ hybridisation. In *Cytogenetics and Cell Genetics*, vol. 67, 1994, no. 3, p. 211-214.

39. JAKUBEC, V. 2002. Molekulární genetika ve šlechtění IV. – uplatnění přímých a nepřímých markeru. In *Náš chov*, 10, 2002, s. 42–44.
40. KEATSON, B. ET AL. 1991. Guidelines for human linkage map : An international system for human linkage map (ISLM, 1990). In *Genomic*, vol. 9, 1991, p. 557-560.
41. KIM, K. S. - MARKUND, S. - ROTHSCHILD, M. F. 2000. The porcine melanocortin 5-receptor (MC5R) gene: polymorphisms, linkage, and physical mapping. In *Animal Genetics*, vol. 31, 2000, p. 230-231.
42. KING, R. C. - STANFIELD, W. D. - MULLIGAN, P. K. 2006. *A Dictionary of Genetics*, Seventh Edition. [s.1]. 2006 : Oxford University Press. p. 242
43. KNOLL, A. - VYKOUKALOVÁ, Z. 2002. *Molekulární genetika zvířat*. Brno : MZLU, 2002. 100 s. ISBN 80-7157-616-6.
44. KOPEČNÝ, M. 2000. *Polymorfizmus vybraných kandidátných genů pro znaky jatečný hodnoty prasat*. Doktorská dizertační práce. Brno : MZLU, 2000, 94 s.
45. KŘENKOVÁ, L. 1999. *Vztah polymorfizmu kandidátných genů k proměnlivosti produkce a kvality masa prasat*. Doktorská dizertační práce. Brno : MZLU, 1999, 139 s.
46. KOVÁČ, L. 1998. *Chov ošípaných*. Bratislava : Devos spol. s r. o., 1998, 181 s. ISBN 80-968016-7-8.
47. KOVÁČIK, A. - TRAKOVICKÁ, A. - BULLA, J. - RAFAYOVÁ, A. - LIESKOVSKÁ, Z. 2010. Vplyv polymorfizmu génov LEPR, MC5R a H-FABP na produkčné vlastnosti ošípaných. In *Potravinárstvo*, roč. 4, 2010, mimoriadne číslo, s. 460-465.
48. LARDE, K. 1997. Leptin and friends : Regulation of body Weight & Fat metabolism. Lipids and Membranes. In *Biochemistry*, vol. 36, 1997, p. 4511.
49. MA, W. - ZHANG, W. - GALE, K. R. 2003. Multiplex – typing of high molecular weight glutenin alleles in wheat. In *Euphytica*, vol. 134, 2003, no. 1, p. 51-60.
50. MAJERČIAK, P. 1996. *Od diviaka po dnešnú ošípanú*. Nitra : SPU, 1996, 106 s. ISBN 80-7137-260-9
51. MAKOVICKÝ, P. - MAKOVICKÝ, P. ML. - KULÍŠEK, V. 2007. Vplyv genetických faktorov na genézu a rast priečne pruhovaného kostrového svalového tkaniva. In *Československá fyziologie*. vol. 56, 2007, č. 1, s. 15-21.

52. MANGA, I. - DVOŘÁK, J. 2007. Rýchla a efektívna konštrukcia multiplex PCR-RFLP. In *Genetika a šlechtění zvířat - VII. mezinárodní konferenci doktorandů a pregraduálních studentů*. Brno : MZLU, 2007, s. 83.
53. MATOUŠEK, V. - KERNEROVÁ, N. - VÁCLAVOVSKÝ, J - VEJČÍK, A. 2006. Analýza ukazovateľů jatečné hodnoty s ohledem na genotyp RYR1 a MC4R. In *Acta fytotechnica et zootechnica*. roč. 9, 2006, s. 20-23.
54. MIKOLÁŠOVÁ, R. 2005. *Perspektívni polymorfni kandidátni geny a jejich využití ke zlepšení produkce masa prasat*. Doktorská disertační práce. Brno : MZLU, 2005, 111 s.
55. MILLER, S. ET AL. 1987. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In *Nucleic Acids Research*, vol. 16, 1987, no. 3, 1215 p.
56. MILUCHOVÁ, M. 2009. *Genetické markéry kvality mlieka a zdravia hovädzieho dobytku*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2009, 71 s. ISBN 978-80-552-0281-5.
57. MINDEKOVÁ, S. 2005. *Vplyv génov LEPR a H-FABP na produkčné vlastnosti ošípaných*. Dizertačná práca. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. 157 s.
58. MINDEKOVÁ, S. - TRAKOVICKÁ, A. 2006. Polymorfizmus MC5R (HSP92I) génu ošípaných. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 9, 2006, mimoriadne číslo, s. 203-204.
59. MINDEKOVÁ, S. - TRAKOVICKÁ, A. - STRAPÁKOVÁ, E. 2006. Efekty genotypu LEPR a H-FABP na produkciu ošípaných. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, roč. 9, 2006, mimoriadne číslo, s. 32-33.
60. MORAN, C. 1993. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. In *The Journal of Heredity*, vol. 84, 1993, no. 4, s. 274-280.
61. NECHTELBERGER, D. - PIRES, V. - SOOLKNER, J. 2001. Intramuscular fat content and genetic variants at H-FABP loci in Australian pigs. In *Journal of Animal Science*, vol. 79, 2001, no. 11, p. 2798-2804.
62. NII, M. - HAYASHI, T. - MIKAWA, S. - ET AL. 2005. Quantitative trait loci mapping for meat quality and muscle fiber traits in Japanese wild boar x Large white intercross. In *Journal of Animal Science*, vol. 83, 2005, no. 2, p. 308 -315.

63. OVILO, C. - CLOP, A. - NOGUERA, L. J. - OLIVER, A. M. - BARRGÁN, C. - RODRÍGUEZ, C. - SILIÓ, L. - TORO, A. M. - COLL, A. - FOLCH, M. J. - ET AL. 2002. Quantitative trait locus mapping for meat quality traits in an Iberian x Landrace F2 pig population. In *Journal of Animal Science*. vol. 80, 2002, p. 2801-2808.
64. PANG, W. J. - LIANG, M. - YANG, G. S. 2006. Relationship Among H-FABP Gene Polymorphism, Intramuscular Fat Content and Adipocyte Lipid Droplet Content in Main Pig Breeds with Different Genotypes in Western China. In *Acta Genetica Sinica*, vol. 33, 2006, no. 6, s. 515-524.
65. PAŠKA, I. - KOVÁČ, Ľ. - MLYNEK, J. 1998. *Chov ošípaných a trh*. Bratislava: vyd. NOI-ÚVTIP, 1998. 96 s. ISBN 80-85330-55-5.
66. PETRUSKA, J. - GOODMAN, M. F. 1988. Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. In *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 85, 1988, no. 17, p. 6252-6256.
67. PŘIBIL, J. 1995. Využití markéru při selekci hospodářských zvířat. In *Živočišná Výroba*, roč. 40, 1995, č. 8, s. 375-382.
68. ROTHSCHILD, M. F. 1996. Genetics a reproduction in the pigs In *Animal Reproduction Science*. vol. 42, 1996, no. 1-4, p. 143-151.
69. ROTHSCHILD, M. F. 1997. Identification of Major Genes and Quantitative trait Loci In Swine. In *NSIF Conference and Annual Meeting*, 1997. December 5-6.
70. ROTHSCHILD, M. F. - RUVINSKY, A. 1998. *The Genetics of the pig*. CAB International, 1998, p. 640, ISBN 0851992293.
71. ROSYPAL, S. - DOŠKÁŘ, J. - PETRZIK, K. - RÚŽIČKOVÁ, V. 2002. *Úvod do molekulární biologie - díl čtvrtí. třetí inovované vydání*. Brno : GRAFEX, 2002. 1200 s. ISBN 80-9025-62-4-4.
72. SAMBROOK, J. - FRITZ, E. F. - MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nded., In *Cold spring Harbor. Laboratory Press*, USA. vol. 1-3, 1989
73. SPECHT, B. - BARTETZKO, N. - HOHOFF, C. - KUHL, H. - FRANKE, R. - BÖRCHERS, T. - SPENER, F. 1996. Mammary derived growth inhibitor is not a distinct protein but a mix of heart type and adipocyte-type-binding protein. In *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 33, p. 19943-19949.

74. SPELMAN, R. J. - COPPIETERS, W. - KARIM, L. - VAN ARENDOK, J. A. M. - BOVENHUIS, H. 1996. Quantitative trait loci analysis for five milk production traits on chromosome six in the dutch Holstein - Friesian population. In *Genetics*, vol. 144, 1996, no. 4, p. 1799-1808.
75. STEINHAUSER, L. 2000. *Produkce masa*. Brno : Last, 2000. 464 s. ISBN 80-900260-7-9.
76. STRATIL, A. 2009. Genomika prasete – současný stav poznání, aplikace a perspektivy. In *Aktuální poznatky v chovu a šlechtění prasat*. Brno : MZLU, 2009, s. 55.
77. TAMMARO, A - BRACCO, A. - COZZOLINO, S. - ESPOZITO, M. - DI MARTINO, A. - SAVOIA, G. - ZEULU, L. ET AL. 2003. Scanning for mutations of the ryanodine receptor (RYR1) Gene by Denaturing HPLC : Detection of Three Novel malignant Hyperthermia Alleles In *Clinical Chemistry*, vol. 49, 2003, no. 5, p. 761-768.
78. TRAKOVICKÁ, A. - KÚBEK, A. 1996. Možnosti využitia genetických markérov krvi na hodnotenie úžitkových vlastností oviec. In *Acta zootechnica*, 1996, č. 51, s. 77-81.
79. TRAKOVICKÁ, A. 1999. *Genetické polymorfne znaky a ich využitie pri hodnotení populácií hospodárskych zvierat*. Habilitačná práca. Nitra : SPU, 1999, 120 s.
80. TRAKOVICKÁ, A. - GYÖRGYOVÁ, S. 2004. Vybrané genetické markéry a ich vplyv na trhovosť mäsa ošípaných. In *Biologická bezpečnosť a agropotravinárstvo*. NITRA : SPU, 2004, s. 70-79.
81. TRAKOVICKÁ, A. - BEŽOVÁ, K. - ANGELOVIČOVÁ, M. - KÚBEK, A. - ET AL. 2005. *Genetické markéry a kvalita produktov špeciálnych odvetví živočíšnej výroby*. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita. 2005. 180 s. ISBN 80-8069-633-0.
82. UEMOTO, Y. - SUZUKI, K. - KOBAYASHI, E. - SATO, S. - SHIBATA, T. - KADOWAKI, H. - NISHIDA, A. 2007. Effects of heart fatty acid-binding protein genotype on intramuscular fat content in duroc pigs selected for meat production and meat quality traits. In *Asian-australasian journal of animal sciences*, vol. 20, 2007, no. 5, pp. 622-626.

83. URBAN, R. - MIKOLÁŠOVÁ, R. - KUCIEL, J. - ERNST, M. - INGR, I. 2002. A study of associations of the H-FABP genotypes with fat and meat production of pigs. In *Journal of Applied Genetics*, vol. 43, 2002. no 4, p. 505-509.
84. VAŇO, M. - BUČKO, O. - KOVÁČ, Ľ. - DVOŘÁK, J. 2004. *Vplyv genetických markerov ESR a FSHB na reprodukciu prasnic* [online] [cit. 2010-22-02], 2004. Dostupné na internete: <<http://www.agroporadenstvo.sk/zv/osipane/clanky/markery.htm>>
85. VISSCHER, P. M. - HALEY, C. S. 1995. Utilizing genetic markers on pig breeding programmes. In *Animal Breeding Abstracts*, vol. 63, 1995, no. 1, p. 1-8.
86. VYKOUKALOVÁ, Z. 2005. *Variabilita DNA genů MYF6, IGF2, ACSL4 u prasat*. Doktorská dizertační práce. Brno : MZLU, 2005, 114 s.
87. WEBB, A. J. 1996. Future challenges in pig genetics. In *Pig News and Information*, vol. 17, 1996, p. 11-16.
88. WILLIAMS, J. K. G. - KUBELIK, A. - LIVAK, K. - RAFALSKI, J. A. - TINGEY, S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker. In *Nucleic Acids Research*, vol. 18, 1990. no. 22, p. 6531-6536.
89. WINTERO, A. K. – FREDHOLM, M. – THOMSEN, P. D. 1992. Variable (dG-dT)_n- (dC-dA) sequences in the porcine genome. In *Genomics*, vol. 12, no. 2, 1992, p. 281-288
90. WOMACK, J. E. 1997. Mapping Animal genomes. In *Advances in veterinary medicine*, vol. 40, 1997, p. 157-188.
91. YANG, W. P. - CAO, G. Q. - XUE, S. - LIU, J. H. - LI, B. G. – ZHOU, Z. X. 2005. Research on the polymorphism of heart fatty acid-binding protein gene in Shanxi pig breeds and their crossbred populations using PCR-RFLP. In *Yi Chuan*, vol. 27, 2005, no. 6, p. 882-6.
92. YE, X. - ROBINSON, J. A. B. - JIANG, Z. – VERRINDER-GIBBINS, A. M. - GIBSON, J. P. 2002. Polymorphisms of histone deacetylase 1 and 3 genes and fatty acid binding protein 3 and 4 genes and their associations with economic traits in swine In *7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 2002, August 19-23.

93. YERLE, M. - MANSAIS, Y. - THOMSEN, P. D. - GELLIN, J. 1993. Localization of the porcine growth hormone gene to chromosome 12p1.2 - p1.5. In *Animal Genetics*, vol. 24, 1993, p. 129-131.
94. ZHAO, S. - REN, L - GUO, L. - CHENG, M. - ZHANG, X. - GE, C. - GAO, S. 2009. Muscle lipid metabolism gene expression in pigs with different H-FABP genotypes. In *Livestock Science*, 2009. vol. 128, no. 1, p. 101-107.
95. ZHANG, W. - SMITH, C. 1993. Simulation of marker – assisted selection utilizing linkage disequilibrium: the effects of several additional factors In *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 86, 1993, no. 4, p. 492-496.
96. ZHIHUA, J. - ROTHSCHILD, M. F. 2007. Swine genome Science Comes of Age. In *International Journal of Biological Sciences*, vol. 3, 2007, no. 3, p. 129-131.

Internetové odkazy:

<http://www.animalgenome.org/edu/gene/pigkar.gif>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2780211?report=gbwithparts&log\\$=seqview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/2780211?report=gbwithparts&log$=seqview)

<http://www.zootechnika.estranky.cz/clanky/chov-prasat>