

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV

**2118722**

**HODNOTENIE GENETICKEJ DIVERZITY POPULÁCIE  
DIVIAKA LESNÉNO (*SUS SCROFA FERUS*)**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Študijný program: denný

Študijný odbor: Agroekológia

Školiace pracovisko: Katedra genetiky a plemenárskej biológie

Školiteľ: doc. Ing. Anna Trakovická, CSc.

Konzultant: doc. Ing. Anna Trakovická, CSc.

**2009**

**Bc Marianna Leváková**

## ABSTRAKT

Biodiverzitu je možné popísať mnohými spôsobmi od fenotypových pozorovaní až po analýzy na molekulárnej úrovni. Pre stanovenie odlišností sú používané rôzne molekulové markéry. V práci sme použili dva druhy zvierat, diviaka lesného (*Sus scrofa ferus*) ako zástupcu divo žijúceho druhu a domácu ošípanú (*Sus scrofa domesticus*). Genotypovanie sme uskutočnili PCR-RFLP metódou.

Pre gén *ESR* sme v súbore sledovaných ošípaných zistili najväčšie zastúpenie heterozygotnej formy WM (25,8808) a prevahu alely W (0,6018) nad alelou M (0,3982). Pri *RYR1* géne sme zistili najväčší výskyt genotypu NN (53,4730) a prevahu alely H (0,9140) nad alelou h (0,0860). Pre *H-FABP* gén sme zistili najväčšie zastúpenie heterozygotnej formy Hh (29,1796) a vyšší výskyt alely h (0,6485) ako aleloy H (0,3515). Pri cytochróme B sme zistili, že všetky sledované populácie boli identické, monomorfné. V testovanej populácii sme zistili, že pri štiepení reštrikčným enzýmom *AluI* vznikli u oboch druhov rovnaké fragmenty s dĺžkou 244 bp a 115 bp.

Pri diviakoch sme genetickou analýzou zistili pri *ESR* géne najväčšie zastúpenie genotypu WW (24,4802) a prevahu alely W (0,8026) nad alelou M (0,1974). V prípade *H-FABP* génu sme zaznamenali najväčšiu frekvenciu pri genotype HH (34,2250) a vyšší výskyt alely H (0,9250) ako alely h (0,0750).

Pri *RYR1* géne sme vo všetkých vzorkách diviaka zistili frakcie NN, to znamená, že u všetkých diviakov bol potvrdený. Ostatné genotypy neboli zistené.

**Kľúčové slová:** biodiverzita, diviak lesný, kandidátne gény, PCR-RFLP

## ABSTRACT

Biodiversity can be described by several approaches, starting with phenotype observation up to molecular analysis. For determining the differences we use several molecular markers. In the theses we observed two animal specieses, the wild boar (*Sus scrofa ferus*) as the representative of wild living species, and the swine (*Sus scrofa domesticus*). Genotyping was provided by PCR – RFLP method.

In the complex of spotted swines for the gene *ESR* we detected the highest abundance of heterozygote form WM (25,8808) and the dominance of W allele (0,6018) above the M allele (0,3982). By the gene *RYR1* we detected the highest abundance of NN genotype (53,4730), and the dominance of H allele (0,9140) above the h allele (0,0860). For the *H-FABP* gene we detected the highest abundance of heterozygote form Hh (29,1796) and the dominance of h allele (0,6485) above the H allele (0,3515). By the cytochrome B we have found out, that all the spotted populations were identical and monomorphic. In the sample of tested population we have found out, that by splitting with a restrictive enzyme *AluI*, in both species equal fragments with the length 244bp and 115 bp incured.

In the sample of wild boars for the gene *ESR* with a genetical analysis we detected the highest abundance of WW genotype (24,4802) and the dominance of W allele (0,8026) above the M allele (0,1974). For the *H-FABP* gene we noted the highest abundance by HH genotype (34,2250) and the dominance of H allele (0,9250) above the h allele (0,0750).

By the *RYR1* gene we recorded NN fractions in all samples of wild boars. That means, it was confirmed by all the wild boars. Other genotypes were not determined.

Key words: biodiversity, wild boar, candidate genes, PCR-RFLP

## ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaná Marianna Leváková týmto vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému:  
„HODNOTENIE GENETICKEJ DIVERZITY POPULÁCIE DIVIAKA LESNÉNO  
(*SUS SCROFA FERUS*).“ vypracovala samostatne s použitím literatúry.

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

V Nitre, 15.3.2010

---

podpis diplomanta

## **POĎAKOVANIE**

Touto cestou by som sa chcela úprimne poďakovať mojej školiteľke doc. Ing. Anna Trakovickej, CSc. za odborné vedenie, podnetné rady a pripomienky, ktoré mi veľmi pomohli pri mojej práci. Taktiež ďakujem všetkým, ktorí sa akýmkoľvek spôsobom pricinili o vznik tejto práce , najmä však mojim rodičom, mojej mladšej sestre, priateľovi za ich stálu ochotu, pomoc a podporu.

# OBSAH

<b>Obsah.....</b>	<b>6</b>
<b>ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK .....</b>	<b>8</b>
<b>ÚVOD .....</b>	<b>10</b>
<b>1 PREHĽAD O SÚČASŤNOM STAVE PROBLEMATIKY .....</b>	<b>12</b>
<b>1.1 BIODIVERZITA .....</b>	<b>12</b>
1.1.1 Význam biodiverzity .....	13
1.1.2 Druhov ochrana.....	13
1.1.3 Ohrozen populácie .....	14
1.1.4 Hodnotenie biodiverzity.....	15
<b>1.2 ŽIVOČÍŠNE GENETICK ZDROJE.....</b>	<b>16</b>
1.2.1 Stav a ochrana živoišnych genetickch zdrojov.....	16
1.2.2 Konzervovanie živoišnych genetickch zdrojov.....	16
1.2.3 Metdy konzervovania.....	17
<b>1.3 PVOD OŠÍPANEJ .....</b>	<b>18</b>
1.3.1 Genetick parametre populácie.....	20
1.3.2 Hardy- Weibergov zkon.....	21
<b>1.4 MAPOVANIE GENMU ZVIERAT.....</b>	<b>22</b>
1.4.1 Analza genmu opanch.....	23
<b>1.5 GENETICK MARKRY .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5.1 MOLEKULÁRNO-GENETICK METDY HODNOTENIA.....</b>	<b>25</b>
1.5.1.1 Polymerzov reazov reakcia (PCR).....	25
1.5.1.2 Polymorfizmus dlky restriknych fragmentov (PCR-RFLP) .....	26
1.5.1.3 Sekvenovanie.....	27
<b>1.6 SLEDOVAN GNY PRE HODNOTENIE VARIABILITY.....</b>	<b>27</b>
1.6.1 Rianodinov receptor - RYR.....	27
1.6.2 Srdcov proteín viazuci mastn kyseliny ( <i>H-FABP</i> ).....	28
1.6.3 Gn estrognovho receptoru ( <i>ESR</i> ).....	30
1.6.4 Cytochrm B.....	31
<b>2 CIEĽ PRCE .....</b>	<b>33</b>
<b>3 MATERIÁL A METDY .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Materiál.....</b>	<b>34</b>

<b>3.2</b>	<b>Prístrojové vybavenie .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3</b>	<b>Použité laboratórne metódy.....</b>	<b>34</b>
3.3.1	Izolácie genómovej DNA z krvi pomocou komerčného pomocou komerčného kitu Nucleospin Blood (Macherey Nagel) .....	34
3.3.2	Polymerázová reťazová reakcia (PCR) .....	35
3.3.3	Plymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov PCR-RFLP .....	38
3.3.4	Kontrola kvality DNA .....	39
3.3.5	Elektroforéza v agarózovom géle .....	39
<b>3.4</b>	<b>Metódy hodnotenia genetickej diverzity .....</b>	<b>40</b>
3.4.1	Matematický model Hardy – Weinbergovho zákona .....	40
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUSIA.....</b>	<b>42</b>
4.1	PCR cytochrómu B.....	42
4.2	PCR – RFLP cytochrómu B reštrikčným enzýmom <i>AluI</i> .....	43
4.3	PCR <i>RYR1</i> génu .....	45
4.4	PCR – RFLP <i>RYR1</i> génu .....	46
4.5	PCR Génu <i>ESR</i> .....	47
4.6	PCR – RFLP <i>ESR</i> génu .....	48
4.7	PCR H – <i>FABP</i> génu.....	49
4.8	Genetická štruktúra sledovaných druhov na základe <i>ESR</i> génu .....	51
4.9	Genetická štruktúra sledovaných druhov na základe <i>RYR</i> génu.....	52
4.10	Genetická štruktúra sledovaných druhov na základe <i>H-FABP</i> génu .....	53
4.11	Genetická štruktúra sledovaných druhov na základe cytochrómu .....	54
4.12	Efektívnosť pôsobenia alel a genetická diverzita.....	54
<b>5</b>	<b>DISKUSIA .....</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY .....</b>	<b>58</b>
<b>7</b>	<b>ZÁVER .....</b>	<b>59</b>
<b>8</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>61</b>
	<b>PRÍLOHY.....</b>	<b>68</b>

## ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK

A	adenín
ACD	antikoagulačný roztok
<i>AluI</i>	reštrikčná endonukleáza
bp	base pair – bázový pár
C	cytozín
°C	stupeň Celzia
C <sub>a</sub>	koeficient homozygotnosti
cDNA	complementary DNA – komplementárna DNA
cM	centi Morgan
Cyt B	cytochróm B
DNA	deoxyribonukleovová kyselina
ddNTP	dideoxy..
dNTP	deoxyribonukleozidtrifosfát
ESR	gén estrogénového receptoru
<i>FokI</i>	reštrikčná endonukleáza
FOR	forward – predný
g	gram
G	guanín
GPI	glukózofosfát izomeráza
<i>HaeIII</i>	reštrikčná endonukleáza
<i>HaeIII</i>	reštrinkčná endonukleáza
H <sub>e</sub>	priemerná heterozygotnosť skupín
H-FABP	srdcový proteín viažuci mastné kyseliny
<i>HinfI</i>	reštrikčná endonukleáza
<i>HinfI</i>	reštrinkčná endonukleáza
IMF	intramuscular fat – vnútro svalový tuk
kDa	kilo Dalton
<i>MboI</i>	reštrikčná endonukleáza
MgCl <sub>2</sub>	chlorid horečnatý
min	minúta
ml	mililiter



mld.	miliarda
<i>MspI</i>	reštrikčná endonukle
mtDNA	mitochondriálna DNA
N	dusík
N <sub>a</sub>	úroveň polymorfnosti lokusov
ng	nanogram
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	síran amónny
PCR	Polymerase Chain Reaction - Polymerázová reťazová reakcia
PGD	fosfoglukonát dehydrogenáza
PIC	polymorfný informačný obsah
pmol	pikomol
PSE	mäkké, bledé, vodnaté mäso ošípanej
<i>PvuII</i>	reštrikčná endonukleáza
REV	reverse – opačný
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism – polymorfyzmus dĺžky
<i>RYR1</i>	gén ryanodínového receptora
s	sekunda
s <sub>p</sub>	smerodajná odchylka
T	thymín
Taq	reštrikčná endonukleáza
TBE	tlmivý roztok
TTP	tymíndeoxyribinukleozidtrifosfát
U	unit (jednotka)
UV	ultrafialové žiarenie
V	Volt
μl	mikroliter

## ÚVOD

Druhy tak rastlín, ako aj živočíchov, ktoré už v minulosti vyhynuli, i tie, ktorých prežitie teraz doslovne „visí na vlásku“, neobnoví a neprinavrátí do prírody ani genetické inžinierstvo, ani žiadna technológia a modelovanie. Biodiverzita ako celok s druhmi, ktoré sa na jej obsahu podieľajú, tvoria jedinečnú, sotva vyčísliteľnú a ničím nenahraditeľnú hodnotu celej planéty Zem ( Kleinert, 1999).

Biodiverzita znamená variabilitu všetkých žijúcich organizmov včítane komplexov, ktorých sú súčasťou. Zahŕňa rôznorodosť, rozmanitosť v rámci druhov, medzi druhmi i medzi ekosystémami. Biologické zdroje zahŕňajú genetické zdroje, organizmy alebo ich časti, populácie alebo akúkoľvek inú biotickú zložku ekosystému so skutočným alebo potencionálnym využitím alebo hodnotou pre ľudstvo (Pivko, 1996).

Každý aj dosiaľ neznámy a nepopísaný druh je jedinečný, nenahraditeľný a predstavuje objektívnu hodnotu s právom na život. V súčasnosti si najmä v záujme druhovej ochrany každý civilizovaný štát dotvára a zákonmi zabezpečuje sieť chránených území rôznych kategórií. Podporujú to aj medzinárodne prijaté dohovory, plány, programy a opatrenia (Kleinert, 1999).

V súčasnosti už vieme, že aj pri hospodárskych zvieratách tradičné postupy chovu a šľachtenie nevedli k dostatočnej ochrane biodiverzity. Aj preto medzinárodné spoločenstvo prijalo globálnu dohodu, ktorá zastrešila nielen ochranu biodiverzity ale zároveň aj problematiku prístupu ku genetickým zdrojom, trvalo udržateľné využívanie biodiverzity, biotechnológii, vytváranie partnerských vzťahov medzi krajinami a rovnoprávne rozdeľovanie prínosov z využívania biodiverzity (Pivko, 1996).

Vznik nových a vymieranie starých druhov je prirodzený evolučný proces. Životnosť druhu je logickým dôsledkom prírodného výberu. Z genetického hľadiska je dôležité že súčasne sa nenávratne stráca aj genofond druhu.

Pôvod druhov a ich domestikácia sa intenzívne študujú aj v súčasnosti. Fylogénza ako náuka o vývoji druhov má svoje metódy, ktoré sa zdokonaľujú. Okrem kultúrno – historických majú významné miesto predovšetkým prírodovedecké metódy. Ich základ tvorí porovnávací anatómia, kranológia a genetika. Významné postavenie majú metódy molekulovej genetiky, ktoré v súčasnosti tvoria základ štúdia pôvodu druhov. Hospodárske zvieratá majú vo svojej DNA približne 3 mld. párov báz, ktoré sa spoľahlivo prenášajú z generácie na generáciu nezmenené, s výnimkou mutácií a pohlavného rozmnožovania, kedy dochádza k spájaniu polovic rodičovských

informácií. Na úrovni základnej štruktúry DNA sa jedinci navzájom odlišujú. Táto variabilita sa prejavuje aj na bielkovinovej úrovni a ich biochémií. Rozdiely medzi jedincami je najlepšie vidieť priamo vo fenotype. Morfológické, fyziologické a psychické vlastnosti, rozdielne medzi jedincami, populáciami, ale aj celými plemenami sú dôsledkom rozdielov zdedenej DNA.

Vývoj genetických metód testovania pôvodu začínal štúdiom krvných systémov a antigénového polymorfizmu, ktoré boli základom testov rodičovstva. Tieto neumožňovali zisťovanie pôvodu z fylogenetického hľadiska, boli limitované presnosťou genetickej analýzy na bielkovinovom princípe.

Pri štúdiu fylogenetického pôvodu sa výskum zameril na tie techniky, ktoré umožňovali hodnotenie časti genómu, ktoré sú dedené separátne (maternálne dedené mitochondriálne chromozómy, Y pohlavný chromozóm), popri tom sú čiastočne využívané aj autozomálne mikrosatelity. Na základe mikrosatelitov je možné určiť druhovú príslušnosť. Vychádza sa z predpokladu, že alely na lokuse, ktoré sú rovnakého pôvodu sú aj rovnakej dĺžky. Mitochondriálna DNA vykazuje veľmi nízku mieru mutácií, ktoré sú detekovateľné (odhadnúť ako často v týchto úsekoch dôjde k mutácii). Uvedený poznatok viedol k najširšiemu využívaniu tejto časti genómu pri štúdiách o evolúcii druhov a zisťovaní fylogenetických vzdialeností historických druhov. Genetické vzdialenosti medzi jednotlivými druhmi (plemenami, líniami, rodinami, atď.) sa často vyjadrujú vo forme dendrogramov (Trakovická a i., 2005).

V chove ošípaných sa pokúsime stručne načrtnúť vývinový proces, ktorý tento druh prekonal od dôb domestikácie až dosiaľ. Jednoznačne je vedecky dokázané, že domáca ošípaná pochádza z divej ošípanej. Oblasťou domestikácie bol celý euroázijský kontinent spolu s Indiou, juhovýchodnou Áziou a severnou Afrikou. Tu bola vyhovujúca klíma a bohaté zdroje výživy. Keď človek poznal výhody živočíšnych produktov pre konzum začal poľovať na diviaky.

Spojenie medzi človekom a ošípanou má dlhé historické korene. Nemožno ich obmedzovať len na výživovú stránku produkcie mäsa a masti pre ľudskú výživu.

# 1 PREHĽAD O SÚČASŤNOM STAVE PROBLEMATIKY

## 1.1 BIODIVERZITA

Biodiverzita je moderný pojem, tvoria ho dva slovné základy. Grécky „BIOS“ je „ŽIVOT“, románsky „DIVERS“ je „RÔZNY“, „ROZMANITÝ“. V slovenčine sa nový pojem udomácnil najmä vo vedeckej a odbornej terminológii. Mimo nej v bežnej reči a publicistike je vhodnejšie a pre laikov zrozumiteľnejšie dvojslovné spojenie „ROZMANITOSŤ ŽIVOTA“, alebo „BIOLOGICKÁ ROZMANITOSŤ“.

Biodiverzita sa definuje ako variabilný súbor všetkých žijúcich organizmov a všetkých ekosystémov suchozemských, sladkovodných aj morských, ktoré umožňujú a podporujú život v jeho rozličných podobách (Kleinert, 1999).

Dňa 20. apríla 1993 vláda SR prerokovala návrh na pristúpenie k Dohovoru o biologickej diverzite a svojim uznesením č. 272/1993 vyslovila súhlas s pristúpením. V dohovore o biologickej diverzite (článok 2) je definovaná ako variabilita všetkých živých organizmov ako aj suchozemských, morských a ostatných vodných ekosystémov a ekologických komplexov, v ktorých tieto organizmy žijú. Zahŕňa diverzitu genetickú, medzidruhovú a ekosystémovú (Glowka, Burhenne-Guilmin a i., 1994).

- diverzitu genetickú – variabilitu a zastúpenie rôznych génov na úrovni populácií,
- diverzitu druhovú – variabilitu a zastúpenie rôznych druhov organizmov v regióne,
- diverzitu ekosystémov – variabilitu a početnosť rôznych ekosystémov v krajine.

**Druhovú diverzitu** predstavuje súbor všetkých známych, rozpoznateľných a vedecky popísaných organizmov (zhruba dva milióny), ako aj doposiaľ nepopísané, ale predpokladané (až 10 a viac miliónov) formy života so štatútom druhu – species.

**Diverzita ekosystémov** je rozmanitosť jednotlivých ekosystémov, teda životných prostredí. Tie sa môžu líšiť nadmorskou výškou, dostupnosťou vody, type horniny, pôdnym type, podnebným pásmom atď.

**Diverzita génová** sa v rámci druhu a populácie prejavuje premenlivosťou individuálnych, hlavne vonkajších znakov, prejavov a detailov, postrehnuteľných zmyslami. Novonadobudnuté znaky môžu, ale nemusia byť prenosné na potomstvo. Obzvlášť ak proti pretrvaniu znakov pôsobí prirodzený, alebo človekom riadený výber. No ak sú prenosné a ustália sa, môžu viesť k vzniku nových druhov. A práve cieľový, človekom riadený výber s opakovaným krížením, šľachtením a preferovaním niektorých

znakov zmnohonásobil fond génovej diverzity rôznych, pôvodne málo premenlivých divo žijúcich druhov.

### **1.1.1 Význam biodiverzity**

Biologická rozmanitosť priťahuje dnes, v dobe svojho ohrozenia, pozornosť celého ľudstva. Diverzita živého sveta predstavuje obrovské bohatstvo, či už v čisto ekonomickom či kultúrnom slova zmysle. Je pravda na mieste sa pýtať, aký je jej ekologický význam, inými slovami, do akej miery je vysoká diverzita nevyhnutná pre zaistenie ekologických procesov potrebných pre trvalú existenciu spoločností. Je zrejmé, že druhové ochudobňovanie spoločností nemôže pokračovať do tej miery, že spoločnosť prestane byť spoločnosťou, na druhú stranu neexistujú žiadne doklady, ktoré by svedčili o tom, že prirodzene vzniknuté druhovo chudobnejšie spoločnosti sú nejakým spôsobom menejcenné oproti spoločnostiam bohatším. Ochudobnenie diverzity vonkajším zásahom však predstavujú zmenu, ktorá niekedy môže viesť k reťazcu ďalších nezvratných zmien. Záleží na tom, do akej miery sa môžu druhy v spoločnosti z hľadiska funkcie vzájomne zastupovať – pokiaľ dojde k vymiznutiu druhov, ktoré hrajú v spoločnosti zásadnú rolu a nie sú nahraditeľné, reťazcu zmien sa nedá vyhnúť. Rovnako je tomu aj v prípade, kedy zníženie množstva určitej skupiny druhov ktoré nestačí na vykonanie základných funkcií nevyhnutných pre zachovanie celého spoločnosti. Bohužiaľ prakticky nikdy nemôžeme dopredu vedieť, kedy táto situácia nastane ( Storch - Mihulka, 1997).

### **1.1.2 Druhová ochrana**

Tá má zaručiť právnu a legislatívnu ochranu chránených, ohrozených, zraniteľných a inak pozitívne významných druhov a skupín. Podľa takýchto charakteristík vybrané druhy rastlín aj živočíchov zo všetkých systematických kategórií sú zahrnuté do „Červených zoznamov“ (Red lists, Rote liste), spracovaných vo väčšine štátov sveta, ako aj celosvetovo.

Problém úbytku druhov je významný na celom svete. Z celkového počtu 555 voľne žijúcich stavovcov 244 je ohrozených. Významné zmeny v stave živočíšnej výroby na

Slovensku popísali Oravcová a i. (2004). V dôsledku zmeny produkčného systému sa zmenili aj veľkosti populácií hospodárskych zvierat (Tabuľka 1).

Tabuľka 1: Stav diverzity v živočíšnej výrobe na Slovensku v tis.ks (Oravcová a i., 2004)

ROK	DRUH	POČET v tis. ks
1990	HD	1 500
2001		630
1990	OVCE	600
2001		310
1990	KOZY	10
2001		30
1990	OŠÍPANÉ	2 500
2001		1 500
1990	KONE	14
2001		9
1990	HYDINA	16 500
2001		13 000

### 1.1.3 Ohrozené populácie

Nie je jednoduché vyjadriť, pri akom počte zvierat je populácia ohrozená alebo by mala byť určená na konzervovanie. Záleží to od viacerých faktorov. Pri hodnotení stupňa ohrozenia plemena najčastejšie sa berie do úvahy skutočný počet jedincov aktívne využívaných v plemenitbe alebo efektívna veľkosť populácie. Je veľa organizácií, ktoré sa snažia a vo svojej práci majú vytvorené systémy hodnotenia a kategorizácie plemien na posúdenie stupňa ich ohrozenia. Veľmi často sú populácie triedené podľa počtu jedincov (Bodó,1992) alebo podľa typických znakov plemena, adaptácie na miestne prostredie a počet jedincov (Alderson, 2003). Podľa počtu jedincov sa plemená triedia do 4-5 podskupín.

Bodó (1992) na základe odporúčaného minimálneho počtu zvierat navrhol rozdelenie ohrozených populácií do 5 skupín (Tabuľka 2) :

Tabuľka 2 : **Rozdelenie ohrozených populácií na základe odporúčaného minimálneho počtu zvierat spracované podľa Bodóho (1992).**

<b>SKUPINA</b>	<b>CHARAKTERISTIKA</b>
<b>Vymreté</b>	Tie plemená, ktoré už nie je možné obnoviť, nevyskytuje sa žiadna čistokrvná plemennica, plemenník, embryá alebo iný revitalizovateľný genetický zdroj
<b>Kritické</b>	Majú menej ako 100 plemenníc a najviac 5 plemenníkov (minimálne 80 % z nich je čistokrvných)
<b>Ohrozené</b>	Má 100 – 1 000 plemenníc a 5 – 20 plemenníkov predpokladá sa, že 80 % jedincov je čistokrvných
<b>Zraniteľné</b>	Tvorí 1 000 – 5 000 plemenníc a 5-20 plemenníkov 80 % jedincov je čistokrvných
<b>Neisté, alebo vzácne</b>	Tvorí 5 000 – 10 000 plemenníc a 5-20 plemenníkov 80 % jedincov je čistokrvných

#### 1.1.4 Hodnotenie biodiverzity

Biodiverzitu môžeme hodnotiť a popisovať rôznymi spôsobmi, ale základným meradlom je genetická diverzita, ktorá charakterizuje rôznorodosť genotypov na úrovni znakov detekovateľných genetickými metódami.

Hodnotiť úroveň genetickej diverzity druhu, populácie, plemena je možné rôznymi postupmi napr. štúdiom genetickeho polymorfizmu matematicko-populačnými, biochemickými, imunologickými, alebo molekulárno-genetickými metódami.

Výsledkom sú parametre genetickej diverzity na úrovni génových frekvencií, miery homozygotnosti, heterozygotnosti, počtu alel a pod. Nové a objektívne postupy do hodnotenia genetickej diverzity prinášajú najmä metódy molekulárnej genetiky na úrovni sekvenovania DNA, pre účely mapovania genómu. Cieľom je genetické definovanie druhu, populácie a jedinca (Pivko, 1996).

## 1.2 ŽIVOČÍŠNE GENETICKÉ ZDROJE

Živočíšne genetické zdroje zahŕňajú všetky druhy, plemená a línie ekonomického, vedeckého a kultúrneho významu z hľadiska súčasných i budúcich potrieb ľudskej spoločnosti a poľnohospodárstva.

Živočíšne genetické zdroje sú geneticky jedinečné populácie spolu s ich priamymi, divými predkami, vytvorené všetkými domestikáčnymi procesmi v rámci každého živočíšneho druhu, využívaného na produkciu potravy a pre účely poľnohospodárstva.

Na Zemi sa predpokladá existencia 30 – 50 mil. druhov žijúcich organizmov, z nich približne 30 druhov chová človek na produkciu potravy a poľnohospodárske účely. Týchto 30 druhov bolo domestikovaných počas uplynulých 10 000 rokov. Počas domestikáčnych procesov sa vyčlenili, aklimatizovali a prispôsobili podmienkam geneticky jedinečné typy alebo plemená ( FAO DAD-IS, 2000).

### 1.2.1 Stav a ochrana živočíšnych genetických zdrojov

Podľa odhadu FAO približne 10% plemien domácich zvierat sa stratilo počas uplynulého storočia a ďalších 20 % je v riziku straty. Situácia plemien je obzvlášť nepriaznivá v Európe. Z výsledkov Scherfa et al., (2005) vyplýva, že zo 6300 plemien domestikovaných zvierat je 1300 plemien v nebezpečenstve vyhynutia.

Predmetom ochrany je vzorka populácie genetického živočíšneho zdroja určená k izolovanému procesu udržiavania v prostredí bez takej činnosti človeka, ktorá by spôsobila genetickú zmenu. Ochrana sa uskutočňuje metódami in situ a ex situ.

Z predznačeného hľadiska by bolo mimoriadne dôležité konzervovať a udržiavať všetky zdroje genetickej variability. Z praktického hľadiska sa nedarí vytvoriť predpoklady pre takýto stav. Preto sa uskutočňuje identifikácia a výber plemien.. Významným dôvodom ochrany je skutočnosť, že živočíšne genetické zdroje sú jedinečné, sú súčasťou národného bohatstva a integrujúcim faktorom dedičstva národov.

### 1.2.2 Konzervovanie živočíšnych genetických zdrojov

Programy zachovania živočíšnych genetických zdrojov sú zamerané na konzervovanie génov alebo plemien, resp. populácií. Zdrojmi genetickej informácie



môžu byť napríklad nukleotidy, chromozómy, samčie a samičie pohlavné bunky, prvojadrá, embryá, bunky a dospelé zvieratá.

Konzervovanie je systém, pomocou ktorého je vzorka alebo celá populácia zvierat vystavená plánovanej genetickej zmene s cieľom udržania, využitia, obnovenia a zvýšenia kvality a kvantity živočíšneho genetického zdroja a jeho produktov (potravín, vlákien, ťažnej sily).

Konzervovaním sa myslí pozitívna činnosť človeka, ktorej predmetom je ochrana zvierat, ich udržanie, systematické využívanie a jeho významnou súčasťou je obnova a rozlišovanie prírodného prostredia zvierat (Kadlečík – Kasarda, 2007).

### **1.2.3 Metódy konzervovania**

Metódy konzervovania rizikových populácií sa rozdeľujú do dvoch skupín – podľa toho či sa ich konzervovanie uskutočňuje v pôvodnom, alebo umelom prostredí.

#### **Metóda in situ**

Metódy in situ konzervovania sú zamerané na udržanie živých populácií zvierat v pôvodnom prostredí. In situ konzervovanie divých zvierat sa často nazýva in situ ochraňovanie. Znamená to udržanie živých populácií zvierat v prostredí, na ktoré sú adaptované alebo čo najbližšie k podmienkam ich pôvodného prostredia.

#### **Metódy ex situ**

Ex situ je skupina metód konzervovania zvierat mimo miesta ich pôvodného výskytu, t.j. v situácii, keď boli odstránené z chovu v pôvodnom prostredí a boli umiestnené v umelom prostredí (Kadlečík – Kasarda, 2007).

Medzi ex situ metódy patrí:

- konzervovanie embryí, samčích a samičích pohlavných buniek uskladnených v tekutom dusíku
- ochrana DNA segmentov
- chov divých zvierat v zooparkoch, zoologických záhradách alebo na iných miestach vzdialených ich pôvodnému prostrediu

### 1.3 PÔVOD OŠÍPANEJ

Príčiny domestikácie ošípaných sú rôzne. Predpokladá sa, že hlavným dôvodom bolo zabezpečiť významný zdroj bielkovín v ľudskej výžive. Ošípané sú jedným z najrozšírenejších druhov cicavcov. Pôvod ošípaných na základe morfológie, paleontológie, biogeografie a iných údajov popísali Rothschild a Ruvinsky (1998). *Sus scrofa* je hlavný divý predok domestikovaných ošípaných. Vyznačuje sa veľkou variabilitou znakov, pričom popísaných bolo jeho 16 poddruhov.

Plemená ošípaných sú polyfyletického pôvodu a rozdeľujú sa podľa príslušnosti k divému predkovi nasledujúco (Kadlečík – Kasarda, 2007):

- stredoeurópska divá ošípaná alebo diviak európsky (*Sus scrofa ferus*) – divý predok, ktorý sa stále vyskytuje v prírode,
- pásiková divá ošípaná (*Sus scrofa vittatus*) – dala vzniku väčšine kultúrnych plemien ako napríklad slovenská biela ušľachtilá, veľká biela ušľachtilá, pietran, cornwal, landras
- stredozemná divá ošípaná (*Sus scrofa mediterraneus*) – je pravdepodobne prechodnou formou. Dĺžkou a tvarom lebky sa podobá typu *Sus scrofa ferus*, slznú kosť má však štvorcového až kosoštvorcového tvaru. Patria sem plemená : mangalica a bakonská ošípaná (bagún)

**Diviak lesný** (staršie slovenské názvy: **diviak obyčajný**, **sviňa divá**; v poľnohospodárstve **divá ošípaná**, v poľovníctve **čierna zver**, lat. *Sus scrofa*) je druh z rodu *Sus* (diviak). Žije (s medzerami) v celej južnej polovici Euroázie a severnej Afrike. V Európe nežije prakticky len vo Veľkej Británii, na Škandinávskom poloostrove a v severnom Rusku. Prípadný poddruh domáca ošípaná samozrejme žije aj inde. V súčasnosti je rozšírený vo všetkých lesnatých oblastiach Slovenska s výnimkou vysokohorských. Kraniologické výskumy nasvedčujú tomu, že v našich populáciách prevláda genofond karpatskobalkánskeho poddruhu (Hell a Paule, 1983) .

V súčasnosti odhadujeme u nás stavy diviacej zveri asi na 27 000 jedincov (Michaelli, 2008).

Dospelý diviak má svoje zavalité telo dlhé až 180 cm a výšku v kohútiku aj 1 m. Hmotnosť sa pohybuje od 100 do 250 kg, niekedy aj viac. Diviačice vážia menej, od 80 do 150 kg. Tvarom tela sa diviak podobá domácej ošípanej. Je však vyšší v pleciach a zadok tela má akoby zrazený. Na hlave má mocný pretiahnutý rypák, veľké

vzpriamené ušnice a malé oči. Kanec má v chrupe vyvinuté mohutné špiciaky – kly, ktoré stále dorastajú a vzájomne sa obrusujú. Spodné sú dlhšie ako horné, asi dve tretiny z nich sú vrastené v sánke, takže z papule trčí len jedna tretina. Diviačica má tieto špiciaky podstatne kratšie, nazývajú sa háky.

Žijú asi 20 rokov. Sfarbenie kolíše od čiernej, cez červenohnedú po svetlohnedú. Osrstie v lete je kratšie a má popolavý odtieň. V zime sú štetiny husté, dlhé a majú tmavý až čierny odtieň. Kanec má pozdĺž chrbta štetiny ešte dlhšie a tvoria tzv. hrebeň, ktorý sa mu pri rozčúlení naježí. Chvostík, dlhý asi 30 cm je mierne stočený.

Žijú v skupinách (samica s mláďatami), dorozumievajú sa krochkaním a kvičaním. Samce sa k skupine pripájajú iba v čase rozmnožovania. Uprednostňujú listnaté a zmiešané lesy, živia sa rozmanitou potravou, rýchlo behajú, vynikajúco plávajú a radi sa vŕajú v bahne. Zo zmyslov majú výborne vyvinutý sluch a čuch, zrak je slabší.

Samice sa zvyknú zoskupovať do čried pozostávajúcich z 20 aj viac jedincov. Inak samotársky žijúce samce sa k týmto čriedam niekedy pripájajú, najmä v období rozmnožovania. Kance v tomto období vôbec nežerú a neraz stratia až 15 % svojej hmotnosti. Pária sa v zime medzi novembrom a januárom. Priemerná doba gravidity je 16-17 týždňov (115 dní). Samica privádza na svet 4 – 12 mláďat, majú hmotnosť asi 1 kg, sú slabšie osrstené, hnedé a pozdĺžne bledo pásikované. Matka ich dojčí asi 2 mesiace, i keď už po 14 dňoch začínajú konzumovať aj pevnú stravu. Prasiatkam sa už po 3 mesiacoch začína bledé pruhovanie strácať a v 6. mesiaci majú už červeno- hnedé sfarbenie, ktoré sa postupne mení na normálne.

Väčšinou sa pod *Sus scrofa* zaraďuje aj domáca ošípaná, ale niektorí autori ju zaraďujú ako samostatný druh. Európske diviaky majú niekoľko rozlišovacích znakov, ktorými sa odlišujú od domácich ošípaných. Medzi nimi sú hnedá až čiernohnedá farba, s prešedivými pesíkmi, hriva vlasov (8 – 16 cm) beží dorzálnu od krku až po zadok, chlpatý chvost a uši pokryté srst'ou. Vlastnosti diviakov sú rôzne, v závislosti na plemene predkov populácie.

V niektorých regiónoch sa vypúšťali aj krížence svine domácej s diviakom, čo sa však neosvedčilo. V minulosti vznikali takéto krížence aj samovoľne v oblastiach kde sa voľne pásli ošípané.

Diviaky môžu mať zrejmy vplyv na voľne žijúce zvieratá a rastlinné spoločenstvá. Rozsiahlemu narušeniu vegetácie a pôdy dochádza v dôsledku ich zakorenených návykov, diviak aj súťaží, do určitej miery, s niekoľkými druhmi voľne žijúcich živočíchov pre niektoré potraviny.

Stavy tejto zvery vie výrazne zdecimovať vírusová nákaza- mor ošípaných. Niekedy na tejto zvery parazituje červ svalovec špirálovitý, ktorý môže vážne ohroziť i zdravie človeka. Z predátorov útočí na túto zver medveď a vlk, na mláďatá si trúfne aj rys alebo túlavé psy (Michaelli, 2008).

### 1.3.1 Genetické parametre populácie

Sú určované celým súborom génov, ich vzájomnou interakciou a interakciou s prostredím.

Genofond populácie je súbor génov všetkých jedincov v populácii, t.j. počet rôznych alel jednotlivých genetických systémov prítomných v populácii. Genofond populácie má svoju štruktúru:

- génové frekvencie, vyjadrujú početnosť určitej alely v populácii absolútnej alebo relatívnej frekvencii
- genotypové frekvencie vyjadrujú zastúpenie jednotlivých genotypov v populácii v absolútnom alebo relatívnom počte

Veľkosť populácie je celkový počet jedincov v populácii. Veľkosť populácie určuje schopnosť danej populácie prežiť. Náhodné nepriaznivé javy ohrozujú malý počet jedincov viac ako veľký počet jedincov. V súčasnosti dochádza k miznutiu populácii mnohých druhov rastlín a živočíchov. Minimálna veľkosť populácie je taká veľkosť populácie, ktorá ešte zabezpečuje prežitie populácie v mnohých generáciách (je to približne 100-1000 generácií).

Hustota populácie sa vyjadruje ako počet jedincov na jednotku plochy alebo objemu. Zisťuje sa sčítaním jedincov, pri živočíchoch aj odchytom. Opakované sčítanie alebo odchyt jedincov (tzv. sensus) poskytuje obraz o dynamike populácie.

Často sa za základný ukazovateľ hodnotenia stavu plemien považuje efektívna veľkosť populácie ( $N_e$ ). Rozumie sa ňou počet jedincov, ktoré sa podieľajú v danej populácii na tvorbe potomstva pre nasledujúcu generáciu.

Efektívna veľkosť populácie je ovplyvnená predovšetkým počtom nepríbuzných samcov ( $N_m$ ) a samíc ( $N_f$ ) aktívne využívaných v plemenitbe. V jednoduchom prípade sa odhaduje podľa vzťahu:

$$N_e = 4 \times N_m \times N_f / (N_m + N_f)$$

Efektívna veľkosť populácie závisí od vyrovnanosti pomeru pohlavia chovaných čistokrvných, nepríbuzných jedincov plemena. Ak sa pomer jedincov blíži

k pôvodnému, predpoklad prežitia plemena sa zlepšuje. V tomto smere pôsobí aj veková štruktúra populácie súvisiaca s ustálením početnosti potomkov vo vrhu a dĺhovekosťou zvierat.

Hodnotenie stupňa ohrozenia závisí od ďalších ukazovateľov, ktorými sú:

- intenzita inbrídingu v populácii a minimalizovanie rizík súvisiacich s príbuzenským párením,
- drift génov,
- genetická variabilita v rámci populácie,
- potreba času, za ktorý plán prežitia plemena začne plniť svoju funkciu,
- zväčšovanie zastúpenie jedincov, ktoré sa podieľali na vytvorení pôvodnej populácie,
- vytváranie podskupín v populácii, delenie populácie na podskupiny má význam hlavne vtedy, ak existuje riziko nákaz alebo výskytu príbuzných jedincov.

### 1.3.2 Hardy-Weibergov zákon

Hardy-Weibergov zákon je zákon rovnováhy v génových a genotypových frekvenciách v panmiktickej populácii.

Pre potreby populačnej genetiky bolo potrebné zaviesť zjednodušený matematický model, ktorý by umožnil kvantitatívne vyjadrenie genetickej variability. Jedným z nich je Hardyho-Weinbergov zákon, ktorý vyjadruje vzťah medzi alelickými a genotypovými frekvenciami v populácii. Tento zákon sformulovali v roku 1908 anglický matematik GODFREY HAROLD HARDY (1877-1947) a nemecký fyziológ WILHELM WEINBERG (1862-1937) ( Hraška,1997).

Použitie H-W zákona pre konkrétnu populáciu vyžaduje splnenie niekoľkých podmienok:

- párovanie jedincov v populácii je náhodné
- druh sa rozmnožuje pohlavným spôsobom
- analyzovaný organizmus by mal byť diploidný
- uvažovaný gén má dve alely
- alelické frekvencie sú rovnaké u samčieho aj samičieho pohlavia
- veľkosť populácie je veľmi veľká (500 a viac jedincov)

- generácie nasledujú v rade za sebou alelické frekvencie sa nemenia vplyvom evolučných síl (mutácie, migrácia, selekcia)

Ak sú tieto podmienky splnené, platí H-W zákon a populácia sa nachádza v tzv. H-W rovnováhe, pretože sa v nej nemenia alelické frekvencie.

V minulosti sa pri šľachtení hospodárskych zvierat využívali poznatky z genetiky populácií. Progresívne sa rozvíjajúce biotechnologické a molekulárno-genetické metódy umožňujú rýchlejšie dosiahnutie žiadúcich genetických zmien v porovnaní s klasickými šľachtiteľskými metódami. Prudký rozvoj molekulárnej genetiky a rastúce množstvo poznatkov o genetickom polymorfizme DNA viedlo k využitiu molekulárno-genetických metód aj v plemenárskej práci, najmä z dôvodu presunu šľachtiteľských cieľov z kvantitatívnej stránky na kvalitatívnu. Štúdium genetického polymorfizmu DNA je dôležité nielen z hľadiska popisu populácie a definovania jej genetického založenia, ale predstavuje aj významnú pomôcku pri selekcii zvierat.

## 1.4 MAPOVANIE GENÓMU ZVIERAT

Postupne prebiehajúce mapovanie genómu jednotlivých druhov zvierat, rastlín i človeka má, resp. bude mať, celú radu praktických dôsledkov. Šľachtitelia potrebujú poznať nie len počet a účinky jednotlivých génov, ale aj ich rozloženie v genóme. Genóm je definovaný ako celkový genetický materiál bunky, alebo jedinca v haploidnej chromozómálnej sústave (Bežo a Bežová, 1998).

Hlavným cieľom výskumu genómu zvierat je mapovanie a charakterizácia lokusov, ktoré kontrolujú ekonomicky významné úžitkové znaky a vlastnosti (Andersson, 2001). Výsledky mapovania prináša informácie o organizácii genómu, rozloženie génov na chromozómoch, medzidruhové rozdielnosti a celú radu ďalších prakticky využiteľných informácií. Analýza genómu je potrebná pre efektívnu selekciu populácií intenzívne využívaných v živočíšnej výrobe a ochrane biodiverzity (Haley, Wischer, 1998).

Špeciálne odvetvie genetiky zaoberajúce sa štúdiom genómu, jeho mapovaním a sekvenovaním sa nazýva genomika. Genomika predstavuje účinný nástroj odhaľovania molekulárnych príčin fenotypovej diverzity hospodárskych zvierat, spôsobenej súborom mutácií s fenotypovým efektom, ktoré boli účelovo zhromažďované plemenitbou (Čepica, 2002).

### 1.4.1 Analýza genómu ošípaných

Genóm ošípanej (*Sus scrofa*) je tvorený 38 chromozómami (18 homologických párov autozómov a 1 pár gonozómov), s veľkosťou približne  $2.7 \times 10^9$  bp, čo predstavuje dĺžku 2700 cM (Schmitz, 1992). Ak vychádzame z predpokladu, že genóm ošípanej zahŕňa približne 40 000 génov, na jeden chromozóm pripadá priemerne 2 105 génov (Dvořák, Vrtková, 2001).

Rejduch et al., (2003) zistili v stredoeurópskej populácii diviaka chromozómový polymorfizmus, kedy v diploidných bunkách boli počty chromozómov rozdielne (36, 37 a 38). Ako najčastejší dôvod uviedli Robertsonovu translokáciu 15/17 v dôsledku, ktorej sa realizuje počet 36 a 37. Rozdiely v karyotypoch ( $2n$  36 a  $2n$  38) boli pozorované hlavne vo voľne žijúcich západoeurópskych populáciách, kým východoeurópske populácie sú typické karyotypom  $2n$  38 (Aravena, Skewes, 2007).

Do roku 1999 bolo známych okolo 1 700 markérov v genóme ošípanej. V genóme s dĺžkou 2286 cM bolo identifikovaných 1 800 lokusov, z toho 510 lokalizovaných na chromozóme (Hruban, 1999) s najrozsiahlejšou cytogenetickou mapou obsahujúcou približne 1 100 lokusov (Rohrer et al., 1996). Fyzikálna mapa pozostávala zo 700 génov a väzbová mapa zahŕňala 650 lokusov a 200 génov.

Ošípaná spĺňa mnohé kritéria genetického objektu. Vyznačuje sa vhodným karyotypom (relatívne malý počet dobre pozorovateľných chromozómov), krátkym generačným intervalom (1 rok) a početným potomstvom (na jeden vrh priemerne 10 potomkov).

## 1.5 GENETICKÉ MARKÉRY

**Genetický markér** je polymorfný znak varianty, ktorý vykazuje mendelistickú dedičnosť a ktorý je v asociácii s genetickou variabilitou selekčne významného znaku (Dvořák et al., 1996).

V súčasnosti sa metódy molekulárnej genetiky využívajú predovšetkým na testovanie a vyhľadávanie genetických markérov (mapovanie génov a QTL, asociačné vzťahy), ktoré v spojení s kvantitatívnou genetikou vedú k zlepšeniu kvality živočíšnych produktov (Čepica, 2002).

## **Vlastnosti genetického markéru**

Pre genetické markéry k využitiu u ošípaných v šľachtiteľských a chovateľských programoch sú dôležité nasledujúce vlastnosti (Dvořák, Vrtková, 2001 ):

- musí mať známy spôsob dedičnosti
- musí byť polymorfný, mať v populácii viac variant (alel)
- musia byť vypracované vhodné metódy ich zisťovania
- musia byť zistiteľné v každom veku zvierat'a, vrátane embryí, alebo spermií
- pre znaky alebo vlastnosti, ktoré sa realizujú iba u určitého pohlavia, možno stanoviť markéry i u druhého pohlavia
- pre znaky tvorby a kvality mäsa, ktoré sú hodnotiteľné až po zabití, môžu byť markéry určené už u mladých zvierat, u embryí
- alely jedného markéru majú medzi sebou kodominantný vzťah, tzn. dajú sa presne určiť jednotlivé genotypy aj heterozygotné, ktoré sa vo fenotype neprejavia
- na základe znalostí genotypov markérov sa môžu zámerne vyberať rodičia, vykonávať plemenitba a tak cielene produkovať jatočné zvieratá s určitými, ekonomicky výhodnými genotypmi

Vďaka variabilite na úrovni DNA detekovateľnej molekulárno – genetickými metódami, je možné získať dostatočné množstvo polymorfných znakov (genetických markérov) a konštruovať vhodné genetické mapy jednotlivých živočíšnych druhov využiteľných pri ochrane živočíšnej biodiverzity (Trakovická a kol., 2005).

## **Molekulárne genetické markéry**

Aplikácia molekulárnych markérov v genetike živočíchov je metodicky zameraná do dvoch hlavných oblastí: analýza genómu a vlastná manipulácia a génmi.

Hlavné molekulárne markéry podľa Trakovickej a kol., (2005), ktoré môžu byť použité pre požadované ciele sú:

- Variabilný počet tandemových opakovaní (VNTR)
  - Minisatelity ( segment opakovania 15 – 100 bp)
  - Mikrosatelity (segment opakovania 1 – 5 bp)
- Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov ( RFLP)
- Náhodne amplifikovaná polymorfná DNA (RAPD)

Jednonukleotidový polymorfizmus (SNP)



## 1.5.1 MOLEKULÁRNO – GENETICKÉ METÓDY HODNOTENIA

### 1.5.1.1 Polymerázová reťazová reakcia (PCR)

V posledných rokoch došlo k obrovskému rozmachu metódy polymerázovej reťazovej reakcie. Jej podstata spočíva v schopnosti in vitro syntézy definovaného špecifického úseku DNA vo veľkom množstve kópií. Pre amplifikáciu sú nevyhnutná genómová DNA ako templát, dva oligonukleotidové primery špecifické pre daný úsek DNA, voľné nukleotidy (dNTP), termostabilný enzým Taq polymeráza a ďalšie zložky ( $Mg^{2+}$ , tlmivé roztoky atď.). Množí sa iba definovaný úsek (okraje, ktoré sú definované sekvenciou použitých primerov a veľkosť, ktorá je presne známa), a to do takého množstva kópií, ktoré je potom možné identifikovať priamo v agarózovom géli po zafarbení etídium bromidom. Amplifikovaný produkt sa analyzuje pomocou restriktčných endonukleáz a vizualizuje sa elektroforeticky (Uhrín a i., 1996).

Polymerázová reťazová reakcia (Polymerase Chain Reaction, PCR) je v súčasnosti jednou z najpoužívanejších techník v molekulárnej biológii a v molekulárnej genetike. Využíva sa na namnoženie špecifických úsekov DNA pomocou enzymatickej syntézy in vitro. Túto veľmi citlivú, exaktnú a v princípe veľmi jednoduchú metódu vyvinul Kary Banks Mullis v Kalifornii, USA. Amplifikácia DNA sa uskutočňuje zmenou teploty reakčnej zmesi opakovaním (25 – 35 násobným) cyklu skladajúceho sa z troch krokov:

- 1) Denaturácia dvojvláknovej chromozomálnej DNA
- 2) Hybridizácia (annealingu) prajmerov
- 3) Polymerizácia – syntéza nových vlákien DNA

Reakcia má zvyčajne 30-40 cyklov, počas ktorých sa jednotlivé kroky opakujú, pričom pôvodný templát a podľa neho nasyntetizované kópie slúžia ako vzory pre vznik ďalších produktov. V každom cykle (t.j. v troch vyššie uvedených krokoch) sa teda počet molekúl DNA zdvojnásobí. Prajмеры (syntetické jednovláknové oligonukleotidy dĺžky 17-30 báz) svojou polohou vymedzujú požadovaný úsek na molekule DNA, ktorý chceme amplifikovať. Základné zložky PCR sú templátová DNA, oligonukleotidové prajмеры, DNA polymeráza, zmes štyroch voľných deoxynukleotidov (dNTP), tlmivý roztok a horčíkové ióny (Trakovická a kol, 2005).

Enzymatická reakcia prebieha v termocykleri, ktorý umožňuje účinné rýchle striedanie rôznych teplôt v procesoch denaturácie, annealingu a polymerizácie.

V prvom kroku denaturácie sa pôvodne dvojvláknová DNA rozdelí – denaturuje na jednotlivé vlákna DNA. Znížením teploty na špecifickú hodnotu, ktorá závisí od konkrétne použitých primerov, tieto selektívne hybridizujú s denaturovanou jednovláknovou DNA len na miestach ich úplnej komplementarity. V treťom kroku sa táto jednovláknová DNA sa špecificky hybridizovaným oligoprimérom so zmenou teploty stáva substrátom pre DNA polymerázu, ktorá syntetizuje dvojvláknovú DNA identickú s pôvodnou DNA. Počet molekúl sa, za optimálnych podmienok, v každom nasledujúcom cykle približne zdvojnásobí, čo pri 25 – 35 cykloch znamená ich  $10^5$  –  $10^8$  násobné rozmnoženie (Uhrín a i., 1996).

### **Využitie PCR**

Stanovenie genetického polymorfizmu : určovanie poradia nukleotidov DNA, určovanie paternity, genetická analýza, populačná genetika, súdnictvo, lekárska a veterinárna diagnostika, klinická imunológia, poľnohospodárske biotechnológie, testovanie potravín, testovanie podmienok životného prostredia

#### **1.5.1.2 Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov (PCR-RFLP)**

Pomocou PCR sa na základe genómovej DNA amplifikuje špecifická sekvencia (napr. úsek génu). Pomocou polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP) sa detekujú alely na základe prítomnosti alebo absencie špecifického reštrikčného miesta. To má za následok vznik fragmentov DNA rôznej veľkosti, ktoré sú rozdelené 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 a kol, 2005).

### 1.5.1.3 Sekvenovania

Sekvenovanie DNA (určenie poradia nukleotidov) významne prispelo k rýchlemu rozvoju molekulárnej genetiky.

Sekvenovanie je metóda pri ktorej sa stanovujú priamo sekvencie jednotlivých nukleotidov DNA. Chemická metóda založená na degradácii reťazca DNA chemickými činidlami (Maxam a Gilbert, 1977), ktoré odbúrajú reťazec po špecifický nukleotid, sa dnes uskutočňujú len výnimočne. Väčšina sekvenačných metód používaných v súčasnosti je založená na enzymatickej reakcii (Sanger a i.,1977). Súčasťou sekvenačnej reakcie je aj zmes normálnych nukleotidov spolu s modifikovanými nukleotidmi – dideoxynukleotidy ddNTP (samostatne ddATP, ddCTP, ddGTP a ddTTP), ktorým chýba – OH skupina potrebná na väzbu ďalšieho nukleotidu. Ich zaradením do reťazca DNA sa reakcia zastaví. Týmto spôsobom sú získané fragmenty rôznej dĺžky končiace vždy príslušným ddNTP. Sekvenačná metóda je vyhodnocovaná po separácii dvojakým spôsobom, a to buď na polyakrylamidovom géli alebo kapilárnou elektroforézou. Pre bežné testovanie genetického polymorfizmu je dôležité zavedenie metód pre sekvenovanie priamo na základe genómovej DNA alebo PCR produktu (neklonovaného), kedy na základe jednej sekvenačnej reakcie môžeme rozlíšiť aj heterozygotný genotyp (Trakovická a kol, 2005).

## 1.6 SLEDOVANÉ GÉNY PRE HODNOTENIE VARIABILITY

### 1.6.1 Gén ryanodinového receptora – *RYR1*

Ryanodinové receptory (RYR) sú rodina medzibunkových spúšťacích kanálov  $Ca^{2+}$ . Prvýkrát boli identifikované v terminálnej cisterne sarkoplazmatického retikula kostrových a srdcových svalov a ktorých štruktúra bola sledovaná u rôznych stavovcov a človeka.

Harbitz et al. (1990) metódou rádioaktívnej in situ hybridizácie lokalizovali gén pre *RYR1* ošípaných na chromozóme 6p11- q21, teda na mieste výskytu predpokladaného halotanového génu (HAL lokus). Aj podľa Archibalda a Imlaha (1985) zodpovedal tento región lokalizácii génu HAL, podmieňujúcej malígnu hypertermiu a tzv. halotan-väzbovej skupine.

Okrem *RYR1* sú známe ďalšie dve izoformy tohto génu (Hakamata et al., 1992).

Druhá forma ryanodinového receptora, kódovaná génom *RYR2*, sa exprimuje predovšetkým v srdcovom svale, hladkej svalovine a mozgu (McPherson a Campbell, 1990; Nakai et al., 1990; Takeshima, 1989). Sekvencia aminokyselín je zo 75 % totožná, sekvencia cDNA zo 66 % so sekvenciou v géne *RYR1*. *RYR2* bol lokalizovaný aj na ľudskom chromozóme 1q42.1-q43 (Leeb et al., 1995).

Tretia forma ryanodinového receptora, kódovaná génom *RYR3*, sa exprimuje predovšetkým v mozgu, ďalej v kostrovej svalovine a svalovine dutiny ústnej u stavovcov. Sekvencia aminokyselín je zo 70 % homológna k sekvencii *RYR1* a *RYR2*. Tento typ má úlohu pri proliferácii T-buniek imunitného systému.

Ľudská cDNA z *RYR3* bola lokalizovaná metódou in situ hybridizácie na chromozóme 15q14-q15 (Sorrentino et al., 1993).

V populáciách jednotlivých plemien ošípaných sa vyskytujú dve alelické formy N a n, pričom recesívny genotyp nn je asociovaný so stresovým syndrómom a PSE mäsom (Bauerová et al., 1995). Jednotlivé plemená ošípaných sa líšia vo výskyte recesívnej alely n, ale všeobecne platí jej nízky výskyt v dôsledku negatívnej selekcie genotypov nn (Trakovická et al. 2005, Kováčik et al. 2009)

Anderson-Eklund et al., (1998) pri testovaní populácie diviakov zistil prítomnosť genotypu Nn. Ernst et al., (2003) v rozsiahlej analýze diviakov poddruhu *Sus scrofa scrofa* a *Sus scrofa attila* u všetkých jedincov zistili genotyp NN. Na monomorfný stav lokusu *RYR1* s výskytom genotypov NN, poukázali aj Jovanovic et al., (2005) a Gábor et al. (2007).

Jovanovic et al., (2005) poukazujú na výskyt stresového syndrómu u diviakov, pričom predpokladajú, že malígna hypertermia môže mať multifaktoriálny charakter.

### 1.6.2 Srdcový proteín viažuci mastné kyseliny (H – FABP)

Proteíny H-FABP o veľkosti 15 kDa sa vyskytujú v tkanivách s vysokým obsahom mastných kyselín, akými sú srdcové a kostrové svalstvo a mliečna žľaza. Gén *H-FABP* ošípanej bol lokalizovaný na šiestom chromozóme. Vykazuje 86 až 92 % homológiu aminokyselín s inými *H-FABP* génmi cicavcov (Gerbens et al., 1997). Autori PCR-RFLP metódou s použitím reštrikčných enzýmov *HinfI*, *HaeIII* a *MspI* odhalili tri jednoduché polymorfizmy. Reštrikčné miesto pre *HinfI* je lokalizovaný v 5' spätnom regióne, zatiaľ čo reštrikčné miesta pre *HaeIII* a *MspI* detekované rovnakým priemerom

amplifikujúcim PCR produkt veľkosti 800 bp sú lokalizované v druhom intróne *H-FABP* génu.

PCR produkt polymorfného typu *HinfI* má veľkosť 702bp a reštrikčné fragmenty H (197 + 59bp) a h (256bp), pričom prítomné sú aj nepolymorfné fragmenty. Štúdiom niekoľkých plemien Gerbens et al. (1997) zistili rozdiely vo frekvenciách genotypov, predovšetkým v polymorfnom mieste *Hinf I*, s jednoznačne najfrekvencovanejším genotypom HH v prípade plemien yorkshire a duroc a z miernou prevahou genotypu Hh pri plemene landras. Veľmi nízka frekvencia genotypu hh bola zaznamenaná pri plemene landras, v prípade plemena yorkshire genotyp hh nebol detekovaný (Gerbens et al., 1997). Rovnako vyššiu frekvenciu výskytu alely H zistili Urban et al. (2002), pri plemenách biela ušľachtilá a landras.

V polymorfnom mieste *HaeIII*, Gerbens et al. (1998), detekovali pri plemenách hampshire a meishan len alelu D (850bp), kým pri plemenách duroc, landras, yorkshire, zistili vyššiu frekvenciu alely d (450+400bp). Emmett et. al (2001) súhrnnou analýzou génovej štruktúry plemien berkshire, duroc, landras a hampshire stanovili prevahu alely D. Ye et al., (2002) uvádzajú v populáciách hybridov troch plemien hampshire x duroc x biela ušľachtilá mali genotypy DD a Dd takmer vyrovnanú frekvenciu, kým genotyp dd sa vyskytoval len ojedinele.

V polymorfnom mieste *MspI* detekovaná iba alela A (750+110 bp) u plemien hampshire a mieshan. Rovnako veľmi vysoká frekvencia alely A bola zaznamenaná pri plemenách landras a yorkshire. Rozdielna frekvencia alel ako aj prevaha alely a (850 bp), bola zistená pri plemene duroc, ktoré má vyššie percento IMF a väčšie prírastky (Gerbens et al., 1997).

Ye et al. (2002) štúdiom hybridov troch plemien hampshire x duroc x biela ušľachtilá potvrdili prevahu alely A a genotypu AA. Jedinice s genotypom aa sa v sledovanej populáciách vyskytovali vo veľmi nízkych frekvenciách.

Nový variant polymorfného miesta *MspI* pri všetkých sledovaných plemenách Nechtelberger et al. (2001) stanovili metódou PCR – RFLP.

Gerbens et al. (1998) pri hodnotení homozygotných haplotypových tried aa/dd/HH zaznamenali vyšší obsah IMF. Na základe efektu heterozygotných genotypov autori uvádzajú, že *MspI* a *HaeIII* typ polymorfizmu vykazujú aditívny, zatiaľ čo polymorfizmus *HinfI* recesívny spôsob dedičnosti. To môže byť dôsledok rekombinácie alel u rodičov. Podobne preukazné diferencie zistili aj v prípade asociácie *H-FABP* génu v hrúbke chrbtovej slaniny, čím potvrdili vzájomnú koreláciu medzi obsahom IMF

a hrúbkou chrbtovej slaniny. Gerbens et al. (1999) uvádzajú, že hrúbku slaniny ovplyvňujú aj gény, ktoré sú vo väzbe s *H-FABP* génom na 6. chromozóme ošípanej, fosfoglukonát dehydrogenáza (*PGD*), glukózofosfát izomeráza (*GPI*), *RYR* a pod.

Polymorfizmus génu *H-FABP* sledovali Ernst et al., (2003) v rozsiahlej analýze diviakov poddruhu *Sus scrofa scrofa* a *Sus scrofa attila*. Zistili vysokú frekvenciu genotypu HH. V populácii poddruhu *Sus scrofa scrofa* a uvádzajú monomorfný stav. Alela h bola zistená len u *Sus scrofa attila*, pričom jej výskyt bol veľmi vzácný (0,02).

Pri plemenách ošípaných je frekvencia alel *H-FABP*<sup>H</sup> a *H-FABP*<sup>h</sup> ovplyvňovaná selekciou a zámerným priparovaním rodičovských párov.

Mindeková et al., (2010) zistili pri plemene Biela ušľachtilá x Landrace prevahu alely H (0,694) nad alelou h (0,306). Frekvencie alel pri rôznych plemenách skúmal aj Kováčik et al., (2009), ktorý rovnako pri plemene Biela ušľachtilá x Landrace zistil prevahu alely H (0,6862) nad alelou h (0,3137).

### 1.6.3 Gén estrogénového receptora (*ESR*)

Gén pre estrogénový receptor *ESR* je u ošípanej lokalizovaný na 1. chromozóme. Jeho expresiou vzniká proteín, ktorý umožňuje pôsobenie samičích pohlavných hormónov – estrogénov v bunkách cieľových tkanív (Omelka et al., 2001).

Estrogénový receptor je v súčasnosti považovaný za ekonomicky efektívny genetický marker, ktorého variabilita je asociovaná s počtom narodených prasiat (Dvořák, Vrtková, 2001).

V géne pre *ESR* (*PvuII*) boli popísané tri polymorfizmy, z ktorých jeden preukazne ovplyvňuje celkový počet narodených mláďat, ako aj počet živo narodených mláďat. Jeho podstata je zámena adenínu (A) a tymínu (T) za guanín (G) v intrónovej oblasti medzi 3. a 4. exónom génu (Omelka et al., 2001)

Drogemüller et al. (2001) sledovali polymorfizmus *ESR* génu u plemien nemecký landras a duroc. Všetky zvieratá boli homozygotné AA. Genotypy AB a BB neboli u tejto populácie nájdené. Prítomnosť genotypu *ESR* BB neuvádzajú ani Kmiec et al., (2002) u plemena poľský landrace.

Trakovická et al., (2006) identifikovali reštrikčnou analýzou PCR produktov, získaných enzýmom *PvuII*, alely A (120bp) a B (65 a 55bp), ktoré tvorili tri genotypové kombinácie AA, AB a BB. V hybridnej populácii biela ušľachtilá x landrace bol vysoko frekventovaný genotyp AA, kým najmenej častý bol genotyp BB.

Ernst et al., (2003) v analýze diviakov poddruhu *Sus scrofa scrofa* a *Sus scrofa attila* u všetkých jedincov zistili po štiepení PCR produktu enzýmom *Pvu* II iba genotypy CC.

Na monomorfný stav lokusu *ESR* s výskytom genotypov WW (enzým *Ava* I), poukázali aj Gábor et al. (2007).

#### 1.6.4 Cytochróm B (*CytB*)

Cytochróm B je bielkovina nachádzajúca sa na vnútornej membráne mitochondrií. Je súčasťou reťazca transportujúceho elektróny a je prítomná u všetkých organizmov, ktoré uskutočňujú aerobné dýchanie (Adkins et al. 1996). Cytochróm B je hlavná podjednotka transmembránového komplexu cytochrómu (Palumbi 1994).

Cytochrómy obsahujú hémovú skupinu (podobné myoglobínu alebo hemoglobínu). Rozdelené sú do troch typov (A, B, C) podľa typu hémovej skupiny a podľa včlenenia do bielkoviny (Berg et al., 2006).

Sekvencia mtDNA pre gén cytochróm B je dlhá 1140 bp, je druhovo špecifická a vytvára vhodné podmienky pre využitie reštrikčných endonukleáz. Cytochróm B/B6 je tvorený približne 400 aminokyselinami a tvorí 8 transmembránových segmentov (helixov A – H). Gén *petB* kóduje helixy A-D a gén *petD* kóduje helixy E-H (Machler, Bauer, 2007). Cytochróm B/B6 nekovalentne viaže dve hemové skupiny, známe tiež ako B562 a B566.

Mutácie v cytochróme B primárne vedú k neschopnosti jeho využitia u ľudských pacientov, i keď boli zaznamenané aj multi systémové ochorenia (Howell, 1989, Esposti et al., 1993).

Gén pre cytochróm B je najviac používaný gén pre fylogenetickú prácu medzi druhmi stavovcov, pretože je dosť variabilný pre populačné otázky a dosť konzervatívny pre fylogenetické štúdie (Meyer et al., 1990).

Sekvencie génu *CytB* sú známe pre mnohé organizmy, čo sa využíva pre porovnávanie jeho sekvencií v rámci databáz DNA sekvencií. Štruktúra a funkcia cytochrómu B je veľmi dobre známa, čo je dôležité pre fylogenetické štúdie z hľadiska vytvorenia funkčného génového produktu (Meyer, 1994).

Alternatívny systém zisťovania pôvodu DNA je založený na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR), zmnožení úseku pre mitochondriálny gén cytochróm B. Úsek naštípený reštrikčným enzýmom vedie k druhovo špecifickej vzorke na agarózovom géle. Metóda si nevyžaduje vytváranie druhovo špecifických sond a je vhodná aj pre

kritické vzorky, v ktorých je DNA viac či menej degradovaná (Winter et al., 1990, Meyer, 1995).

Doteraz bolo publikovaných niekoľko štúdií, ktoré využili rôzne veľký fragment génu cytochrómu B pre určenie živočíšnych druhov pomocou metódy PCR-RFLP (Gábor et al., 2009).

Využitie špecifických úsekov mitochondriálnej DNA (mtDNA) pri identifikácii živočíšnych druhov má dva významné dôvody. Prvým dôvodom je fakt, že pomer kópií mitochondriálnej DNA k jadrovej DNA v jednej bunke je približne 2500 : 1, a to najmä v prípade kostrového svalstva, ktoré sa vyznačuje vysokou post-mitotickou aktivitou (Sorenson, Quinn, 1998).

Zehner et al. (1998) pri identifikácii cytochrómu B rôznych živočíšnych druhov (ovca, ošípaná, hovädzí dobytok, pes) štiepili PCR produkt s veľkosťou 981 bp.

Pascaol et al., (2004) pri analýze polymorfizmu *CytB* zistil u ošípanej prítomnosť len jedného fragmentu o veľkosti 359 bp, kým u diviaka popisuje prítomnosť dvoch fragmentov o veľkosti 198 bp a 161 bp.

Gábor et al. (2009) využitím univerzálnych primerov komplementárnych ku konzervačne uzavretej oblasti génu pre cytochróm B pri stavovcoch amplifikovali 359 bp fragment, ktorý v sebe zahŕňa variabilnú oblasť s veľkosťou 307 bp. Špecifické reštrikčné fragmenty piatich použitých reštrikčných enzýmov mali pri oboch druhoch, ošípanej a diviaka, rovnakú veľkosť.

K rovnakému poznatku dospel aj Minarovič (2009) po PCR-RFLP analýze pomocou reštrikčných endonukleáz *AluI*, *FokI*, *HinfI*, *HaeIII* a *MboI* pri identifikácii deviatich živočíšnych druhov.



## 2 CIEĽ PRÁCE

Práca je zameraná na analýzu biodiverzity diviaka lesného (*Sus scrofa ferus*) a porovnaná s genetickou štruktúrou domácej ošípanej (*Sus scrofa domestica*) ako najbližšieho druhu metódou polymerázovej reťazovej reakcie a polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov.

Na základe uvedeného sme stanovili nasledovné ciele diplomovej práce:

- Analyzovať polymorfizmus v génoch: ryanodinový receptor (*RYR1*), srdcový proteín viažuci mastné kyseliny (*H-FABP*), gén estrogénového receptora (*ESR*) a cytochróm B (*CytB*).
- Porovnať genetické rozdiely v polymorfizme hodnotených génov medzi druhmi *Sus scrofa domestica* a *Sus scrofa ferus*.
- Stanoviť základné ukazovatele genetickej diverzity, génovú a genotypovú štruktúru testovanej populácie *Sus scrofa ferus* otestovanej na základe sledovaných génov.

### 3 MATERIÁL A METÓDY

#### 3.1 Materiál

Pre analýzu polymorfizmu vybraných génov na základe prítomnosti špecifických fragmentov po RFLP analýze v PCR produkte sme použili krv dvoch druhov zvierat:

- Diviak lesný (*Sus scrofa ferus*)
- Sviňa domáca (*Sus scrofa domesticus*)

Použitá krv bola odoberatá do ACD roztoku (0,48 % kyselina citrónová, 1,32 % citrát sodný, 1,47 % glukóza) v pomere 1:5 (ACD: krv). Jadrová DNA spolu s mitochondriálnou DNA bola vyizolovaná z lymfocytov pomocou komerčného kitu Nucleo Spin (Macherey Nagel) (Biotech) a vysoľovacou metódou podľa Millera et. al. (1987).

#### 3.2 Prístrojové vybavenie

Pre izoláciu DNA a PCR – RFLP sme použili nasledovné prístroje: analytické váhy, centrifúga, elektroforéza, zdroj napätia, automatické pipety, spektrofotometer, vodný kúpeľ, vortex, termostat, termocyklér, UV transiluminátor, fotoaparát Olympus C 700.

#### 3.3 Použité laboratórne metódy

##### 3.3.1 Izolácia genómovej DNA z krvi pomocou komerčného kitu Nucleospin Blood (Macherey Nagel)

Pred začiatkom izolácie sme nastavili vodný termostat na 70 °C a zohriali tlmivý roztok BE na 70 °C. Do 1,5 ml mikroskúmavky sme pridali 200 µl krvi a 25 µl proteínázy K a 200 µl lýzovacieho tlmivého roztoku B3. Zmes sme vortexovali 10 – 20 sekúnd a inkubovali 10 – 15 minút pri 70 °C kým vzorka zhnedla. Následne sme do vzorky pridali 210 µl 96 % etanolu a preniesli do separačnej kolónky vlozenej do 2 ml centrifugačnej skúmavky. Po 1 minútu centrifugácie pri 11 000 g, sme kolónku vybrali a vzorku preložili do novej 2 ml skúmavky s 500 µl tlmivého roztoku BW a

centrifugovali ďalšiu 1 minútu pri 11 000 g. Po premytí roztokom B5 a následnej centritrifugácii sme vložili do 1,5 ml skúmavky a pridali sme 100 µl tlmivého roztoku BE (predhriateho na 70 °C). Tlmivý roztok sme naliali priamo na silikátovú membránu. Vzorku sme inkubovali 1 minútu pri laboratórnej teplote, centrifugovali 1 minútu pri 11 000 g. Skúmavku s roztokom DNA sme označili a uschovali pri teplote 4 – 8 °C.

### 3.3.2 Polymerázová reťazová reakcia ( PCR)

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili v termocykéry PTC 150 (MJ Reasearch).

Oligonukleotidové primery pre amplifikáciu cieľových úsekov *H-FABP* génu boli prevzaté z práce Gerbens et al. (1997). Na amplifikáciu špecifického úseku génu *Cyt B* sme použili primery FOR 26- mer a REV 26-mer prevzaté z práce Kochera et al. (1989). Genotypy *RYR1* boli stanovené primermi navrhnutými Bauerová et al. (1995) a genotypy *ESR* podľa Gábor et al. 2007.

Tabuľka 4: Špecifické oligonukleotidové primery pre jednotlivé gény

GÉN	PRIMER	SEKVENCIA
<i>H - FABP</i>	FOR	5'GGA CCC AAG ATG CCT ACG CCG 3'
	REV	5' CTG CAT CTT TGA CCA AGA GG3'
<i>cyt B</i>	FOR 26-mer	5'CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3'
	REV 26-mer	5' GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGT CCT CA 3'
<i>ESR</i>	FOR 20-mer	5' CCC TCT ATG ACC TGC TGC TG 3'
	REV 22-mer	5' TCA GAT TGT GGT GGG GAA GTT C3'
<i>RYR 1</i>	FOR	5'GTG CTG GAT CTC CTC TGT TCC CT 3'
	REV	5' CTG GTG ACA TAG TTG ATG AGG TTT G 3'

## Reakčné zmesi

Zloženie reakčných zmesí pre jednotlivé gény bolo optimalizované na podmienky laboratória. Na amplifikáciu PCR produktu podľa ich veľkosti boli pridávané jednotlivé zložky mastermixu.

Tabuľka 5: Zloženie reakčnej zmesi pre objem 25 µl *CytB*.

Zložka	Konečná koncentrácia
PCR sterilná redestilovaná voda	-
10 x Reaction buffer (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1x
MgCl <sub>2</sub>	1,7 mM
dNTP - mix	2 mM
primery <i>cytB</i>	3 pmol
Taq DNA Polymeráza	1 U
Templátová DNA	50 ng.µl <sup>-1</sup>

Tabuľka 6: Teplotný a časový režim PCR reakcie *Cytb*

Krok	teplota	čas
„štart“	94 °C	90 s
Denaturácia	94 °C	10 s
Anneling (hybridizácia)	55 °C	30 s
Polymerizácia	72 °C	40 s
Elongácia	72 °C	10 min.
Zachladenie	4 °C	uskladnenie

Počet cyklov : 35 (1 cyklus = 2. + 3. + 4.)

Tabuľka 7 : Zložky PCR reakčnej zmesi pre objem 25µl *H-FABP*

Zložka	výsledná koncentrácia	množstvo na 1 vzorku
PCR sterilná redestilovaná voda	doplniť do objemu 25µl	
10 x PCR roztok	1x	2,5µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,7 mM	1,7µl
dNTP - mix (1mM)	0,2 mM	5µl
Taq DNA Polymeráza	1,25 U	0,25µl
Templátová DNA	50 ng	5µl

Tabuľka 8: **Teplotný a časový režim PCR reakcie *H-FABP***

Krok	teplota	čas
„štart“	94 °C	3 min.
Denaturácia	94 °C	1 min.
Anneling (hybridizácia)	57 °C	1 min.
Polymerizácia	72 °C	1 min.
Elongácia	72 °C	10 min.
Zachladenie	4 °C	Počet cyklov: 33

Tabuľka 9: **Zloženie reakčnej zmesi pre objem 25 µl *ESR***

Zložka	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku
Sterilná voda		10,89 µl - 14,4 µl
10 x Reaction buffer	1x	1,5 µl - 2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM - 25 mM	0,75 µl - 1,3 µl
dNTP Mix	0,2 mM - 10 mM	1,0 µl - 5,0 µl
Primery	10 pmol/µl	1,0 µl - 1,2 µl
Taq DNA polymeráza	1,0 U/µl - 5 U/µl	0,4 µl - 0,6 µl
Templát DNA	50 ng/µl	5,0 µl

Tabuľka 10 : **Teplotný a časový režim PCR reakcie *ESR***

Krok	teplota	čas
„štart“	95 °C	2 - 3 min
Denaturácia	94°C - 95 °C	1 - 2 min
Anneling (hybridizácia)	55°C - 56 °C	1 min
Polymerizácia	72 °C	1 - 2 min
Elongácia	72 °C	10 min
Zachladenie	4 °C	počet cyklov : 30

Tabuľka 11: **Zložky PCR reakčnej zmesi pre objem 25  $\mu$ l RYR1**

Zložka	Konečná koncentrácia	Objem na 1 vzorku
PCR sterilná redestilovaná voda	doplniť do 25 $\mu$ l	
10 x PCR roztok	1x	2,50 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,4 mM	0,70 $\mu$ l
dNTP – mix (1 mM)	0,2 mM	5,00 $\mu$ l
Primer FOR (1 ng/ $\mu$ l)	10 pM	0,80 $\mu$ l
Primer REV (1 ng/ $\mu$ l)	10 pM	0,70 $\mu$ l
Taq DNA Polymerase Recombinant (5U/ $\mu$ l)	1,25 U	0,25 $\mu$ l
Templátová DNA	$\approx$ 50 ng	5,00 $\mu$ l

Tabuľka 12: **Teplotný a časový režim PCR reakcie RYR1**

Krok	teplota	čas
„štart“	95 °C	3 min.
Denaturácia	95 °C	1 min.
Anneling (hybridizácia)	56 °C	1 min.
Polymerizácia	72 °C	1 min.
Elongácia	72 °C	7 min.
Zachladenie	4 °C	Počet cyklov: 30

### 3.3.3 Polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov PCR - RFLP

Pre štiepenie amplifikovaných PCR produktov boli použité reštrikčné endonukleázy *AluI*, *FokI*, *HaeIII*, *HinfI* (Promega) a *MboI* (Fermentas). PCR produkty sme pridali do pripravenej štiepnej reakčnej zmesi. Inkubácia prebiehala v termostate pri teplote 37°C, 4 – 16 hodín.

Tabuľka 13: **Priebeh štiepenia reštrikčným enzýmom**

Enzým	RE miesto	Teplota štiepenia	Doba inkubácie
<i>AluI</i>	AG↓CT	37°C	3 hodiny
<i>FokI</i>	GGATGNN↓	55°C	12 hodín
<i>HaeIII</i>	GG↓CC	37°C	3 hodiny
<i>HinfI</i>	G↓ANTC	37°C	3 hodiny
FastDigest <i>MboI</i>	N↓GATCN	37°C	5 minút
<i>Hinf6I</i>	G↓CGC	37°C	3 hodiny
<i>AvaI</i>	C↓BCGRG	30°C	3 hodiny

### 3.3.4 Kontrola kvality DNA

Kvalita amplifikovanej DNA bola vizuálne preverovaná po elektroforéze (cca 10 min) v UV svetle na transiluminátore. Pri kontrole bolo použité 5 µl PCR produktu zmiešaného s glukózou a brómfenolovou modrou, ktorý bol nanášaný na 2% agarózový gél s ethidium bromidom (100 µg/100 ml gélu). Pri kontrole bolo sledované predovšetkým množstvo amplifikovanej DNA a prítomnosť nešpecifických PCR produktov

### 3.3.5 Elektroforéza v agarózovom géle

Identifikácia a analýza produktov po izolácii, amplifikácii a štiepení sa uskutočňuje elektroforetickou separáciou. Horizontálna gélová elektroforéza prebieha v TBE tlmiacom roztoku. Koncentrácia agarózy sa volí podľa očakávanej veľkosti fragmentov. Elektroforéza prebieha pri elektrickom napätí 80-120 V po dobu 30 - 90 minút. Gél môže obsahovať interkalačné činidlo etídium bromid. Po skončení elektroforézy sa naštiepené PCR produkty detekujú pod UVtransiluminátorom.

### 3.4 Metódy hodnotenia genetickej diverzity

#### 3.4.1 Matematický model Hardy – Weinbergovho zákona

Na matematicko-štatistické spracovanie ukazovateľov genetickej diverzity zo vstupných údajov ( identifikované genotypové kombinácie ) sme použili výpočet pre frekvencie alel a genotypov so vzťahmi pre dvojalelový polymorfný systém prebraté s práce Trakovická et al.(2005).

##### **Frekvencie alel:**

$$p(A) = \frac{2x(AA) + x(AB)}{2N}$$

$$q(B) = \frac{2x(BB) + x(AB)}{2N}$$

$$\text{pričom plati, že: } p(A) + q(B) = 1$$

kde:  $p_A, q_B$ , – frekvencie jednotlivých alel,  $N$  – počet jedincov v populácii

##### **Genotypové frekvencie:**

$$(p + q)^2 = 1$$

teda

$$p^2(AA) + 2pq(AB) + q^2(BB) = 1$$

$p^2(AA)$  – frekvencia homozygótov AA

$2pq(AB)$  – frekvencia heterozygótov AB

$q^2(BB)$  – frekvencia homozygótov BB

##### **Genetická vzdialenosť:**

$$D_{\text{std}} = -\ln \frac{\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} P_{X_{ij}} * P_{Y_{ij}}}{\sqrt{\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} P_{X_{ij}} * \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{n_i} P_{Y_{ij}}^2}}$$

kde:

$r$  - počet lokusov

$n_i$  – počet alel na  $i$ -tom lokuse



$P_{x_{ij}}, P_{y_{ij}}$  – frekvencia j-tej alely na i-tom lokuse

**Polymorfny informacny obsah PIC ( Botstein et al.,1980):**

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

**Efektivny počet alel EA ( Crow Kimura, 1970):**

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

**Koeficient homozygotnosti  $C_a$ :**

$$C_a = p^2_A + q^2_B$$

## 4 VÝSLEDKY PRÁCE A DISKUSIA

Pre analýzu polymorfizmu vybraných génov na základe prítomnosti špecifických fragmentov po RFLP analýze v PCR produkte sme použili krv dvoch druhov zvierat: Diviak lesný (*Sus scrofa ferus*) a domáca ošípaná (*Sus scrofa domesticus*). Použitá krv bola odobratá do ACD roztoku v pomere 1:5 (ACD: krv).

Jadrová DNA spolu s mitochondriálnou DNA jednotlivých druhov bola vyizolovaná z lymfocytov pomocou komerčného kitu Nucleo Spin (Macherey Nagel) (Biotech) a vysoľovacou metódou tak, ako je podrobne popísané v kapitole Materiál a metódy (3.3.1).

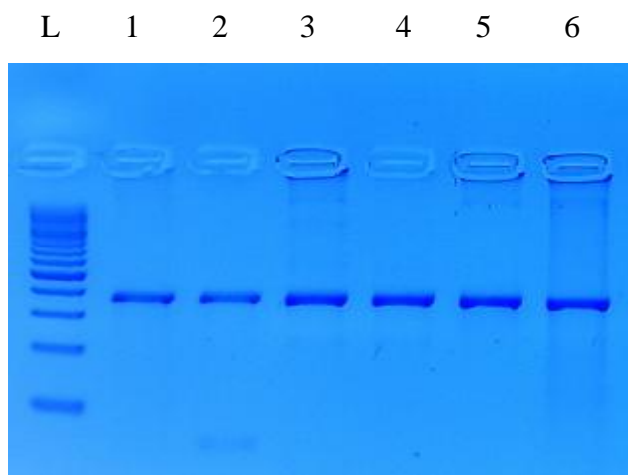
### 4.1 PCR cytochrómu B

PCR reakcie boli uskutočnené použitím konzerzačných primerov navrhnutých Kocherom et al., (1989) a podrobne popísaných v kapitole 3.3.2.

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili v termocykleri PTC 150 (MJ Reasearch).

Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v predchádzajúcej kapitole Materiál a metódy (3.3.2 v tabuľka 5). Reakcia prebieha v celkovom objeme 25  $\mu$ l v termocykleri. PCR program obsahoval iniciačný denaturačný krok pri teplote 94°C trval 90 sekúnd. Každý z 35 cyklov pozostával z denaturácie pri teplote 94°C počas 10 sekúnd, anealingu pri teplote 55 °C počas 30 sekúnd, polymerizácie pri teplote 72°C počas 40 sekúnd. Posledný krok polymerizácie – elongácie pri teplote 72°C trval 10 minút. Po skončení boli vzorky schladené na teplotu 4°C a uskladnené.

Identifikácia PCR produktu bola vykonaná pomocou elektroforézy. Horizontálna gélová elektroforéza prebieha v TBE tlmiacom roztoku. Elektroforéza prebieha pri elektrickom napätí 80-120 V po dobu 30 - 90 minút. Gél môže obsahovať interkalačné činidlo etídium bromid. Po skončení elektroforézy sa naštiepené PCR produkty detekujú pod UV transiluminátorom (obrázok 1).



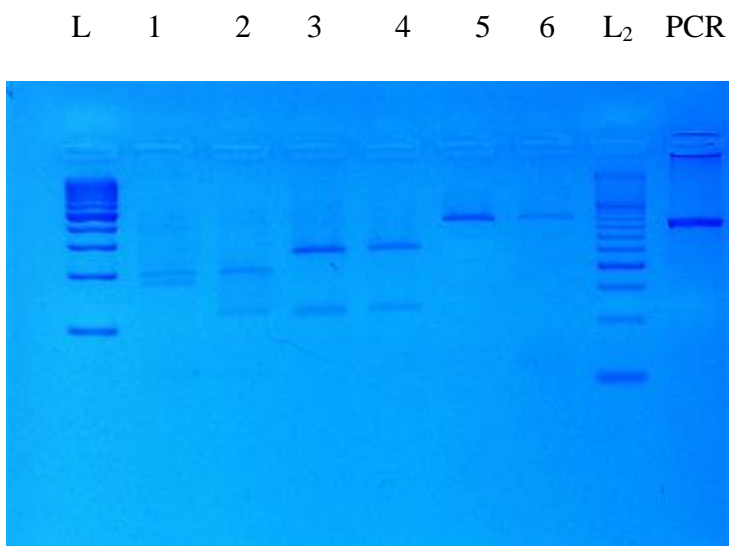
**Obrázok 1:** Schematické znázornenie PCR produktu cytochrómu B .

L ladder 100 bp (Fermentas), 1-6 PCR produkt cytochrómu B (veľkosť 359 bp)

Na fotografii vizualizovaného 359 bp PCR produktu cytochrómu B (obrázok 1) je znázornených 7 dráh. V prvej (označenej „L“) sa nachádza ladder (markér) s veľkosťou 100 bp. V dráhach 1 - 6 je PCR produkt cytochrómu B s veľkosťou 359 bp.

#### 4.2 PCR – RFLP cytochrómu B reštrikčným enzýmom *AluI*

Do pripravenej štiepnej zmesi (25 $\mu$ l) (tabuľka.5, kapitola 3.3.2) sme pridali PCR produkty (8 $\mu$ l) a inkubovali 3 hodiny pri teplote 37 °C. Identifikácia reštrikčných fragmentov bola vykonaná pomocou elektroforézy, ktorá prebieha v TBE tlmiacom roztoku, pri elektrickom napätí 80-120 V po dobu 30 - 90 minút. Gél môže obsahovať interkalačné činidlo etídium bromid. Vizualizácia fragmentov bola uskutočnená pomocou UV transiluminátora. Pre presné určenie veľkosti fragmentov sme používali DNA markéry (Fermentas).



**Obrázok 2:** Schématické znázornenie štiepenia 359 bp fragmentu cytochrómu B reštrikčným enzýmom *AluI*.

L – ladder 100 bp

1 – *Bos taurus* (190 bp, 169 bp,)

2 – *Bison bonasus* (315 bp, 114 bp, 55 bp)

3 – *Sus scrofa domesticus* (244 bp, 115 bp)

4 – *Sus scrofa scrofa* (244, 115 bp,)

5 – *Ovis aries* (359 bp)

6 – *Cervus elaphus* (359 bp)

L<sub>2</sub> – ladder 50 bp

PCR – 359 bp

Na fotografii (obrázok 2) je znázornených 9 dráh. Pre objektivnosť hodnotenia sme otestovali aj ďalšie druhy. Dráha „L“ je ladder (markér) s veľkosťou 100 bp. Dráhy 1 – 6 sú vizualizované fragmenty, ktoré vznikli pri štiepení PCR produktu cytochróm B dlhého 359 bp enzýmom *AluI*. PCR produkty jednotlivých druhov boli štiepené na charakteristických miestach a vznikli špecifické produkty: dráha 1 vzorka *Bos taurus* so vzniknutými dvoma fragmentmi s dĺžkou 190 bp a 169 bp, dráha 2 vzorka *Bison bonasus* so vzniknutými tromi fragmentmi s dĺžkou 315 bp, 114 bp a 55 bp, dráha 3 vzorka *Sus scrofa domesticus* so vzniknutými dvoma fragmentmi s dĺžkou 244 bp a 115 bp, dráha 4 vzorka *Sus scrofa scrofa* so vzniknutými dvoma fragmentmi s dĺžkou 244 bp a 115 bp, dráhy 5 a 6 vzorky *Ovis aries* a *Cervus elaphus* neboli štiepené týmto enzýmom takže na elektroforéze je vidno fragment dlhý 359 bp. Dráha označená „L<sub>2</sub>“ je ladder (markér) s veľkosťou 50 bp. V dráhe označenej ako „PCR“ je produkt PCR dlhý 359 bp.

### 4.3 PCR *RYR1* génu

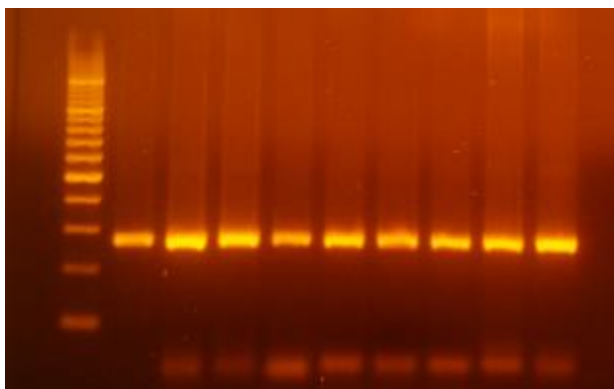
PCR reakcie boli uskutočnené použitím konzervačných primerov navrhnutých Bauerovou et al., (1995) a podrobne popísaných v kapitole 3.3.2.

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili v termocykleri PTC 150 (MJ Reasearch).

Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v predchádzajúcej kapitole Materiál a metódy (3.3.2 v tabuľke.11). Reakcia prebieha v celkovom objeme 25  $\mu$ l v termocykleri. PCR program obsahoval iniciačný denaturačný krok pri teplote 95°C trval 1 minútu. Každý z 30 cyklov pozostával z denurácie pri teplote 95°C počas 1 minúty, anealingu pri teplote 56 °C počas 1 minúty, polymerizácie pri teplote 72°C počas 1 minúty. Posledný krok polymerizácie – elongácie pri teplote 72°C trval 7 minút. Po skončení boli vzorky schladené na teplotu 4°C a uskladnené.

Identifikácia PCR produktu bola vykonaná pomocou elektroforézy. Horizontálna gélová elektroforéza prebieha v TBE tlmiacom roztoku. Elektroforéza prebieha pri elektrickom napätí 80-120 V po dobu 30 - 90 minút. Gél môže obsahovať interkalačné činidlo etídium bromid. Po skončení elektroforézy sa naštiepené PCR produkty detekujú pod UV transiluminátorom (obrázok 3).

L 1 2 3 4 5 6 7 8 9



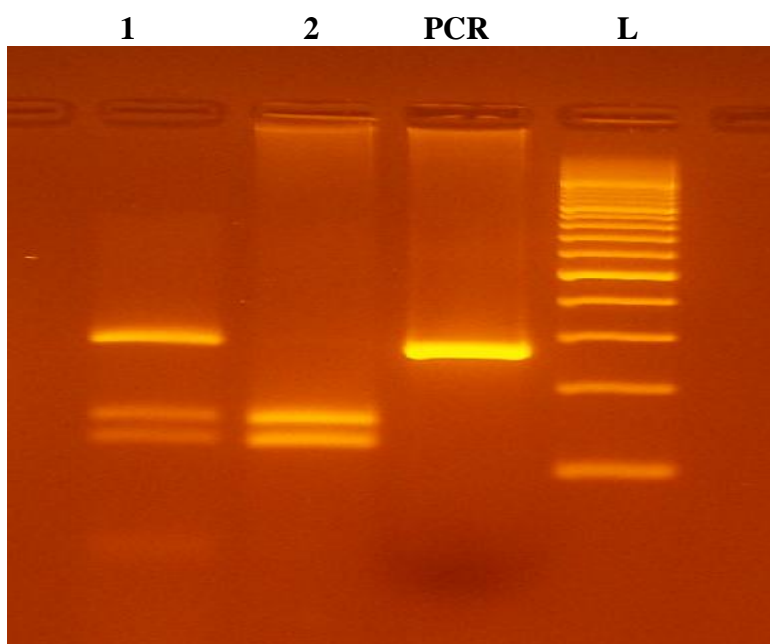
**Obrázok 3:** Schématické znázornenie 272 bp PCR produktu *RYR 1*

L – ladder 100 bp (Fermentas)

1 – 9 PCR produkt génu *RYR 1* (veľkosť 272 bp )

Na fotografii vizualizovaného 272 bp PCR produktu *RYR 1* (obrázok 3) je znázornených 10 dráh. V prvej (označenej „L“) sa nachádza ladder (markér) s veľkosťou 100 bp. V dráhach 1 - 9 je PCR produkt génu *RYR 1* (veľkosť 272 bp).

#### 4.4 PCR – RFLP *RYR1* génu



**Obrázok 4 :** Schematické znázornenie 272 bp PCR - RFLP produktu *RYR 1*

1 .genotyp Nn (272 bp + 149 bp + 123 bp)

2. genotyp NN (149 bp + 123 bp )

PCR – produkt 272 bp

L – 100 bp Ladder (Fermentas)

Na fotografii vizualizovaného 272 bp PCR produktu *RYR1* (obrázok 4) sú znázornené 4 dráhy. V prvej sa nachádza heterozygot s genotypom Nn, ktorého fragmenty mali molekulovú hmotnosť 272 bp, 149 bp a 123 bp. V druhej homozygot s genotypom NN s molekulovou hmotnosťou 149 bp a 123 bp. Mutantný genotyp nn (272 bp) nebol v skúmanej vzorke zistený. V dráhe označenej ako „PCR“ je produkt PCR dlhý 279 bp a v dráhe označenej „L“ sa nachádza ladder (markér) s veľkosťou 100 bp

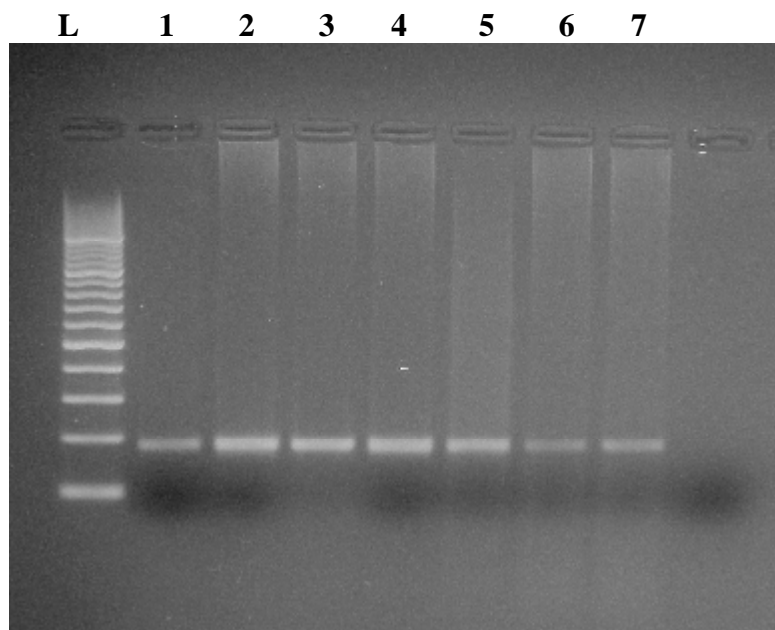
## 4.5 PCR Génu ESR

PCR reakcie boli uskutočnené použitím konzervačných primérov podľa Gábora et al., (2007) a podrobne popísaných v kapitole 3.3.2.

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili v termocykleri PTC 150 (MJ Reasearch).

Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v predchádzajúcej kapitole Materiál a metódy (3.3.2 v tabuľka 9). Reakcia prebieha v celkovom objeme 25  $\mu$ l v termocykleri. PCR program obsahoval iniciačný denaturačný krok pri teplote 94 - 95°C trval 1 – 2 minúty. Každý z 30 cyklov pozostával z denaturácie pri teplote 94 - 95°C počas 1 – 2 minút, anealingu pri teplote 55 - 56 °C počas 1 minúty, polymerizácie pri teplote 72°C počas 1-2 minút. Posledný krok polymerizácie – elongácie pri teplote 72°C trval 10 minút. Po skončení boli vzorky schladené na teplotu 4°C a uskladnené.

Identifikácia PCR produktu bola vykonaná pomocou elektroforézy. Horizontálna gélová elektroforéza prebieha v TBE tlmiacom roztoku. Elektroforéza prebieha pri elektrickom napätí 80-120 V po dobu 30 - 90 minút. Gél môže obsahovať interkalačné činidlo etídium bromid. Po skončení elektroforézy sa naštiepené PCR produkty detekujú pod UV transiluminátorom (obrázok 5).



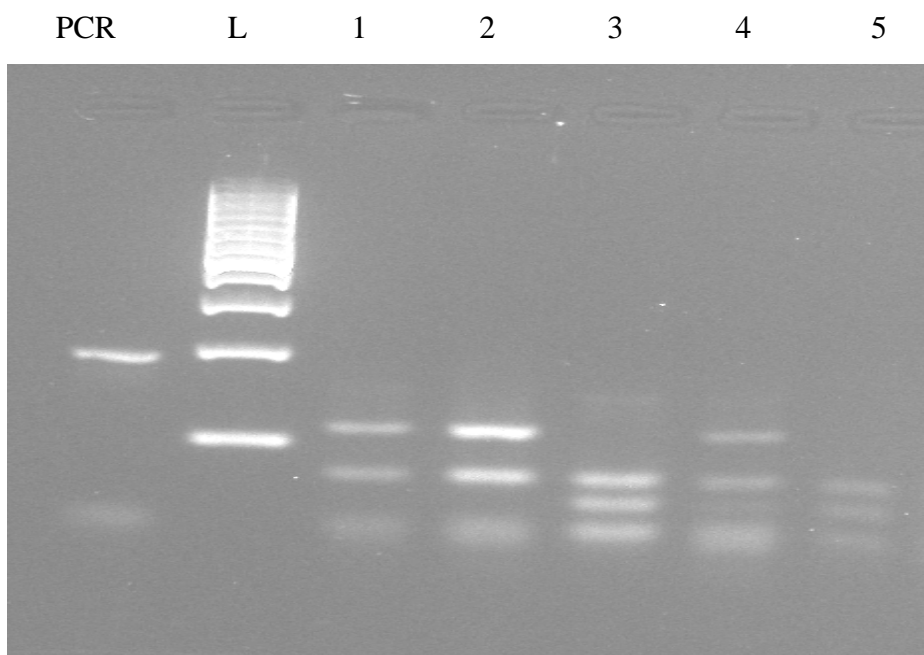
**Obrázok 5:** Schematické znázornenie 185 bp PCR produktu *ESR*

L – ladder 100 bp (Fermentas)

1. – 7. PCR produkt génu *ESR* – 185 bp

Na fotografii vizualizovaného 185 bp PCR produktu *ESR* (obrázok 5) je znázornených 8 dráh. V prvej (označenej „L“) sa nachádza ladder (markér) s veľkosťou 100 bp. V dráhach 1 - 7 je PCR produkt génu *ESR* (veľkosť 185 bp).

#### 4.6 PCR – RFLP *ESR* génu



**Obrázok 6 :** Schematické znázornenie 185 bp PCR - RFLP produktu *ESR*

PCR –PCR produkt génu *ESR* (veľkosť 185 bp)

L – 100 bp ladder (Fermentas)

1 – Genotyp WW (109 bp + 76 bp)

2 - Genotyp WW (109 bp + 76 bp)

3 - Genotyp MM (76 bp + 62 bp + 47 bp)

4 – Genotyp WM (109 bp + 76 bp + 62 bp + 47 bp)

5 – Genotyp MM (76 bp + 62 bp + 47)

Na fotografii vizualizovaného 185 bp PCR produktu *ESR* (obrázok 6) sú znázornené 7 dráhy. V dráhe označenej ako „PCR“ je produkt PCR dlhý 185 bp a v dráhe označenej „L“ sa nachádza ladder (markér) s veľkosťou 100 bp. V prvej sa nachádza homozygot s genotypom WW, ktorého fragmenty mali molekulovú hmotnosť 109 bp a 76 bp. V druhej dráhe sa nachádza homozygot s genotypom WW s molekulovou hmotnosťou 109 bp a 76 bp. V tretej dráhe sa nachádza homozygot



s genotypom MM, ktorého fragmenty mali molekulovú hmotnosť 76 bp, 62 bp a 47 bp. V štvrtej dráhe sa nachádza heterozygot s genotypom WM s molekulovou hmotnosťou 109 bp, 76 bp, 62 bp a 47 bp. V piatej dráhe sa nachádza homozygot s genotypom MM, ktorého fragmenty mali molekulovú hmotnosť 76 bp, 62 bp a 47 bp.

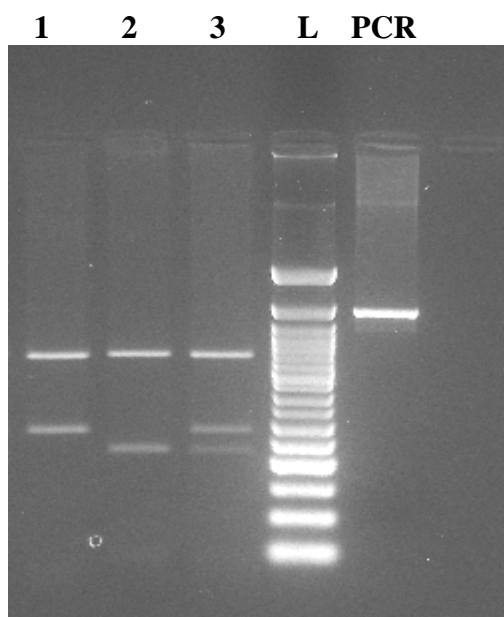
#### **4.7 PCR H – *FABP* génu**

Oligonukleotidové primery pre amplifikáciu cieľových úsekov *H-FABP* génu boli prevzaté z práce Gerbens et al. (1997) a podrobne popísaných v kapitole 3.3.2.

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili v termocykleri PTC 150 (MJ Research).

Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v predchádzajúcej kapitole Materiál a metódy (3.3.2 v tabuľka 7). Reakcia prebieha v celkovom objeme 25  $\mu$ l v termocykleri. PCR program obsahoval iniciačný denaturačný krok pri teplote 94 °C trval 3 minúty. Každý z 33 cyklov pozostával z denurácie pri teplote 94 °C počas 3 minút, anealingu pri teplote 57 °C počas 1 minúty, polymerizácie pri teplote 72°C počas 1 minúty. Posledný krok polymerizácie – elongácie pri teplote 72°C trval 10 minút. Po skončení boli vzorky schladené na teplotu 4°C a uskladnené.

Identifikácia PCR produktu bola vykonaná pomocou elektroforézy. Horizontálna gélová elektroforéza prebieha v TBE tlmiacom roztoku. Elektroforéza prebieha pri elektrickom napätí 80-120 V po dobu 30 - 90 minút. Gél môže obsahovať interkalačné činidlo etídium bromid. Po skončení elektroforézy sa naštiepené PCR produkty detekujú pod UV transiluminátorom ( obrázok 7).



**Obrázok 7 :** Schematické znázornenie PCR - RFLP produktu *H-FABP*

1. Genotyp hh (256 bp ) + nepolymorfny fragment,
2. Genotyp HH ( 197 bp + 59 bp ) + nepolymorfny fragment
3. Genotyp Hh (256bp + 197 bp) + nepolymorfny fragment,
- L Ladder 50 bp (Fermentas)
- PCR produkt ( 700 bp)

Na fotografii vizualizovaného PCR produktu *H-FABP* (obrázok 7) je znázornených 5 dráh. V prvej sa nachádza homozygot s genotypom hh, ktorého fragmenty mali molekulovú hmotnosť 256 bp + nepolymorfny fragment. V druhej dráhe sa nachádza homozygot s genotypom HH s molekulovou hmotnosťou 197 bp a 59 bp + nepolymorfny fragment. V tretej dráhe sa nachádza heterozygot s genotypom Hh, ktorého fragmenty mali molekulovú hmotnosť 256 bp a 197 bp + nepolymorfny fragment. V dráhe označenej „L“ sa nachádza ladder (markér) s veľkosťou 100 bp. V dráhe označenej ako „PCR“ je produkt PCR dlhý 700 bp.

#### 4.8 Genetická štruktúra sledovaných druhov na základe *ESR* génu

V súbore sledovaných diviakov s počtom 38 (tabuľka 14) mal najväčšie zastúpenie genotyp WW (24,4802), heterozygotná forma WM sa vyskytovala s nižšou frekvenciou (12,0394). Najmenej sa v populácii vyskytovala homozygotná forma MM (1,4802).

V súbore sledovaných ošípaných (tabuľka 15), ktorých počet bol 54, najväčšie zastúpenie mala heterozygotná forma WM (25,8808), s o niečo nižšou frekvenciou nasleduje genotyp WW (19,5568). Najmenej sa v populácii vyskytovala forma homozygotná MM (8,5624).

Z analýzy genotypovej štruktúry vyplýva v skupine diviakov prevaha alely W (0,8026) nad alelou M (0,1974) a v skupine sledovaných ošípaných sme rovnako zistili prevahu alely W (0,6018) nad alelou M (0,3982).

Pri hydrologických pokusoch je bežné, že experimentálna (empirická) fenotypová, tak aj genotypová frekvencia sa viac alebo menej približuje teoreticky očakávanému štiepnemu pomeru. Na overenie experimentálne zistených štiepných pomerov a teoreticky očakávanými, sa používa metóda  $\chi^2$ - test (chíkvadrát test). Zistíme či je rozdiel preukazný – významný (signifikovaný) alebo nepreukazný, nevýznamný. Keď je rozdiel nepreukazný, nevýznamný, experimentálny štiepny pomer sa zhoduje s teoretickým a opačne.

V súbore ošípaných sme zistili vysoko preukazný vplyv ako poukazujú výsledky  $\chi^2$ -testu v tabuľke 14. V súbore diviakov rozdiel v očakávanej a pozorovanej frekvencii genotypov nebol preukazný, čomu nasvedčujú nízke hodnoty  $\chi^2$ -testu (tabuľka 15).

Tabuľka14: Genetická štruktúra *sus scrofa ferus* – diviaka lesného na základe *ESR* génu, počet skúmaných vzoriek 38

Genotyp	Počet	Frekvencie		s <sub>p</sub>	$\chi^2$ - test
		Genotyp	Alela		
WW	27	24,4802	W	± 0,0924	6,6579 <sup>++</sup>
WM	7	12,0394	M		
MM	4	1,4802			

P>0,05<sup>+</sup>, P>0,01<sup>++</sup>, P>0,001<sup>+++</sup>,

Tabuľka15: **Genetická štruktúra *sus scrofa domesticus* – domáca ošípaná na základe *ESR* génu, počet skúmaných vzoriek 54**

Genotyp	Počet	Frekvencie		s <sub>p</sub>	χ <sup>2</sup> - test
		Genotyp	Alela		
WW	27	19,5568	W	± 0,0634	0,6709 <sup>-</sup>
WM	11	25,8808	0,6018		
MM	16	8,5624	0,3982		

P>0,05<sup>+</sup>, P>0,01<sup>++</sup>, P>0,001<sup>+++</sup>,

#### 4.9 Genetická štruktúra sledovaných druhov na základe *RYR* génu

Genetickú štruktúru ošípaných na základe *RYR* génu uvádzame v tabuľke 16. Zo 64 ošípaných genotypovaných na *RYR* gén sme zistili najväčší výskyt genotypu NN (53,4730). Frekvencia výskytu homozygotného nn bola najnižšia (0,4720), na druhom mieste prevládal genotyp Nn (10,0550).

Z genotypových frekvencií vyplýva prevaha alely H (0,9140) nad alelou h (0,0860).

V súbore sledovaných ošípaných rozdiel v očakávanej a pozorovanej frekvencii genotypov nebol preukazný, čomu nasvedčujú nízke hodnoty χ<sup>2</sup>- test (tabuľka 16).

Tabuľka16: **Genetická štruktúra *sus scrofa domesticus* – domáca ošípaná na základe *RYR* génu, počet vzoriek bol 64**

Genotyp	Počet	Frekvencie		s <sub>p</sub>	χ <sup>2</sup> - test
		Genotyp	Alela		
NN	53	53,473	H	± 0,0783	0,5655 <sup>-</sup>
Nn	11	10,055	0,914		
nn	0	0,472	0,086		

P>0,05<sup>+</sup>, P>0,01<sup>++</sup>, P>0,001<sup>+++</sup>,

Vo všetkých vzorkách diviaka sme zistili frakcie NN, to znamená, že u všetkých diviakov bol potvrdený. Ostatné genotypy neboli zistené.

#### 4.10 Genetická štruktúra sledovaných druhov na základe *H-FABP* génu

V súbore 64 ošípaných sme zistili najväčšie zastúpenie heterozygotnej formy Hh (29,1796), s len o čosi nižšou frekvenciou nasleduje genotyp hh ( 26,9102). Najmenej sa v populácii vyskytovala homozygotná forma HH (7,9102). Z analýzy genotypovej štruktúry vyplýva prevaha alely h ( 0,6485) nad alelou H ( 0,3515) (tabuľka17).

V súbore 40 diviakov sme zaznamenali najnižšiu frekvenciu genotypu hh (0,2250), väčšie zastúpenie mala heterozygotná forma Hh (5,5500) a najväčšiu frekvenciu sme zaznamenali pri genotype HH (34,2250). Z analýzy genotypovej štruktúry vyplýva prevaha alely H (0,9250) nad alelou h (0,0750) (tabuľka18).

Na základe  $\chi^2$ - test sme zistili štatisticky preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov v súbore ošípaných a diviakov. Hodnota  $\chi^2$ -kvadrát testu v skupine diviakov je nepreukazná a teda realizoval sa rovnovážny stav(tabuľka 18).

Tabuľka17: Genetická štruktúra *sus scrofa domesticus* – domáca ošípaná na základe *H-FABP* génu, počet vzoriek 64

Genotyp	Počet	Frekvencie		s <sub>p</sub>	$\chi^2$ - test
		Genotyp	Alela		
HH	14	7,9102	H	± 0,0569	11,504 <sup>++</sup>
Hh	17	29,1796	h		
hh	33	26,9102			

P>0,05<sup>+</sup>, P>0,01<sup>++</sup>, P>0,001<sup>+++</sup>,

Tabuľka18: Genetická štruktúra *sus scrofa ferus* – diviaka lesného na základe *H-FABP* génu, počet vzoriek 40

Genotyp	Počet	Frekvencie		s <sub>p</sub>	$\chi^2$ - test
		Genotyp	Alela		
HH	34	34,225	H	± 0,1370	0,2629 <sup>-</sup>
Hh	6	5,55	h		
hh	0	0,225			

P>0,05<sup>+</sup>, P>0,01<sup>++</sup>, P>0,001<sup>+++</sup>,

#### 4.11 Genetická štruktúra sledovaných druhov na základe cytochrómu B

Na prezentovanie rozdielu a pre objektívnosť hodnotenia sme otestovali aj ďalšie druhy zvierat (obrázok 2). Dráhy 1 – 6 sú vizualizované fragmenty, ktoré vznikli pri štiepení PCR produktu cytochróm B dlhého 359 bp enzýmom *AluI*. PCR produkty jednotlivých druhov boli štiepené na charakteristických miestach a vznikli špecifické produkty: dráha 1 vzorka *Bos taurus* so vzniknutými dvoma fragmentmi s dĺžkou 190 bp a 169 bp, dráha 2 vzorka *Bison bonasus* so vzniknutými tromi fragmentmi s dĺžkou 315 bp, 114 bp a 55 bp, dráha 3 vzorka *Sus scrofa domesticus* so vzniknutými dvoma fragmentmi s dĺžkou 244 bp a 115 bp, dráha 4 vzorka *Sus scrofa scrofa* so vzniknutými dvoma fragmentmi s dĺžkou 244 bp a 115 bp, dráhy 5 a 6 vzorky *Ovis aries* a *Cervus elaphus* neboli štiepené týmto enzýmom takže na elektroforéze je vidno fragment dlhý 359 bp.

Druhy ako *Sus scrofa domesticus* a *Sus scrofa scrofa* sú veľmi fylogeneticky príbuzné a preto aj naštiepené fragmenty sú rovnaké. Identifikácia jednotlivých druhov nie je preto pri štiepení vybranou endonukleázou možná.

#### 4.12 Efektívnosť pôsobenia alel a genetická diverzita

Najvyššia úroveň polymorfizmu bola zistená u ošípaných v lokusoch *ESR 1,9426*, zároveň najnižšiu úroveň sme zistili v skupine diviakov v lokusoch *H-FABP* génu. Pri analýze diviaka sme zistili úroveň polymorfности lokusov pri *ESR 1,4639*. Polymorfный informačný obsah (PIC) bol 0,2667. U tohto druhu bola potvrdená vysoká homozygotnosť 0,6831.

Nízku úroveň polymorfности 1,1611 sme zistili u diviakov v lokuse *H-FABP*. Táto hodnota sa približuje k minimálnej hodnote úrovne polymorfizmu 0,5. Zároveň sme zistili nízku hodnotu PIC 0,1291 čo vyplýva s vysokého podielu homozygotov až 86,12 %. Nízka úroveň polymorfizmu lokusu *H-FABP* vyplýva aj z veľkého rozdielu vo frekvenciách alel, nakoľko drift recesívnej alely *h* bol vyšší ako jej frekvencia (0,075).

Tabuľka19: Efektívnosť pôsobenia alel a genetická diverzita

Lokus	$C_a$	$N_a$	$H_e$	PIC
<i>ESR</i> diviak	0,6831	1,4639	0,3169	0,2667
<i>ESR</i> ošípaná	0,5147	1,9426	0,4852	0,3675
<i>RYR1</i> ošípaná	0,8428	1,1865	0,1572	0,1449
<i>H-FABP</i> diviak	0,8612	1,1611	0,1388	0,1291
<i>H-FABP</i> ošípaná	0,5441	1,8378	0,4559	0,3520

## 5 DISKUSIA

V prípade Diviaka lesneho (*Sus scrofa ferus*) a svine domácej (*Sus scrofa domesticus*) sme porovnali genetické rozdiely v polymorfizme hodnotených génov medzi týmito druhmi a stanovili sme základné ukazovatele genetickej diverzity, génovú a genotypovú štruktúru testovaných populácií.

V prípade *RYR1* génu sa v populáciách jednotlivých plemien ošípaných vyskytujú dve alelické formy N a n. Zo 64 ošípaných genotypovaných na *RYR1* gén sme zistili najväčší výskyt genotypu NN (53,4730). Frekvencia výskytu homozygotného nn bola najnižšia (0,4720), rovnako ako uvádza Trakovická et al., (2005) a Kováčik et al., (2009), podľa ktorých sa jednotlivé plemená ošípaných líšia vo výskyte recesívnej alely n, ale všeobecne platí jej nízky výskyt v dôsledku negatívnej selekcie genotypov nn. Na druhom mieste prevládal genotyp Nn (10,0550), ktorých prítomnosť zistil aj Anderson – Eklund et al., (1998) pri testovaní populácie diviakov. Vo všetkých vzorkách diviaka sme zistili frakcie NN, to znamená, že u všetkých diviakov bol potvrdený. Naše výsledky sa zhodujú so zisteniami Ernsta et al., (2003), ktorý v rozsiahlej analýze diviakov poddruhu *Sus scrofa scrofa* a *Sus scrofa attila* u všetkých jedincov zistili genotyp NN. Na monomorfný stav lokusu *RYR1* s výskytom genotypov NN, poukázali aj Jovanovic et al., (2005) a Gábor et al., (2007).

Štúdiom *H-FABP* génu u niektorých plemien sa zaoberal Gerbens et al., (1997), ktorý zistil jednoznačne najfrekventovanejší výskyt genotypov HH v prípade plemien yorkshire a duroc a z miernou prevahou genotypov Hh pri plemene landras. Veľmi nízku frekvenciu genotypov hh zistil pri plemene landras a pri plemene yorkshire genotyp hh nebol detekovaný, čo nie je v súlade s našimi výsledkami. V prípade sledovaných ošípaných sme zaznamenali najväčšie zastúpenie heterozygotnej formy Hh (29,1796), s len o čosi nižšou frekvenciou nasleduje genotyp hh (26,9102). Najmenej sa v populácii vyskytovala homozygotná forma HH (7,9102). V prípade sledovaných diviakov sme zaznamenali najväčšiu frekvenciu pri genotype HH (34,2250) rovnako ako Ernst et al., (2003) pri sledovaní polymorfizmu génu *H-FABP* zistil pri rozsiahlej analýze diviakov poddruhu *Sus scrofa scrofa* a *Sus scrofa attila*. Z analýzy genotypovej štruktúry vyplýva prevaha alely h (0,6485) nad alelou H (0,3515) v skupine sledovaných ošípaných, čo sa nezhoduje so zisteniami Mindekovej et al., (2010) a Kováčika et al., (2009), ktorý uvádzajú prevahu alely H nad alelou h.



Pri sledovaní polymorfizmu *ESR* génu v skupine ošípaných sme zistili najväčšie zastúpenie heterozygotnej formy WM (25,8808), s o niečo nižšou frekvenciou nasleduje genotyp WW (19,5568). Najmenej sa v populácií vyskytovala forma homozygotná MM (8,5624). K rozdielnym zisteniam dospel Drogemüller et al., (2001) pri použití iného štiepneho enzýmu, ktorý pri sledovaní plemien ošípaných, nemecký landras a duroc zistil, že všetky zvieratá boli homozygotné AA. Genotypy AB a BB nezistil. Rovnako prítomnosť genotypu BB neuvádzajú ani Kmiec et al., (2002) u plemena poľský landrace. Trakovická et al., (2006) identifikovali reštrikčnou analýzou PCR produktov, získaných enzýmom *PvuII*, alely A (120bp) a B (65 a 55bp), ktoré tvorili tri genotypové kombinácie AA, AB a BB. V hybridnej populácii biela ušľachtilá x landrace bol vysoko frekventovaný genotyp AA, kým najmenej častý bol genotyp BB.

V skupine diviakov sme zistili najväčšie zastúpenie genotyp WW (24,4802), heterozygotná forma WM sa vyskytovala s nižšou frekvenciou (12,0394). Najmenej sa v populácií vyskytovala homozygotná forma MM (1,4802). Ernst et al., (2003) v analýze diviakov poddruhu *Sus scrofa scrofa* a *Sus scrofa attila* u všetkých jedincov zistili po štiepení PCR produktu enzýmom *Pvu II* iba genotypy CC. Na monomorfný stav lokusu *ESR* s výskytom genotypov WW (enzým *Ava I*), poukázali aj Gábor et al., (2007).

Pri analýze polymorfizmu *CytB* sme zistili u ošípanej a diviaka prítomnosť dvoch fragmentov o veľkosti 244 bp a 115 bp. Špecifické reštrikčné fragmenty štiepené reštrikčným enzýmom *AluI* mali pri oboch druhoch rovnakú veľkosť. K rovnakému záveru dospel aj Minarovič (2009) po PCR – RFLP analýze pomocou reštrikčných endonukleáz *AluI*, *FokI*, *HinfI*, *HaeIII* a *MboI*. Pascaol et al., (2004) pri analýze polymorfizmu *CytB* zistil u ošípanej prítomnosť len jedného fragmentu o veľkosti 359 bp, kým u diviaka popisuje prítomnosť dvoch fragmentov o veľkosti 198 bp a 161 bp.

## **6 NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY**

Práca bola zameraná, na základe polymorfizmu jednotlivých génov poukázať na vzťahy, ktoré môžu významne prispieť k poznaniu a ochrane genetickej diverzity.

- v práci použitá metóda je využívaná najmä na zistenie vnútroľíniovej a medzilíniovej diverzity. Jej potenciál sa dá využiť pri zisťovaní genetických vzdialeností medzi pôvodnými populáciami a komerčnými líniami, ale aj na zisťovanie genetických vzťahov medzi populáciami rovnakých plemien
- význam je tiež v poznaní a špecifikácii prítomnosti jednotlivých alel, ich existencia nám dáva poznatky o úrovni genetickej príbuznosti, či nepríbuznosti jednotlivých často aj fylogeneticky blízkych plemien
- odporúčame však testovanie s rôznymi štiepnymi enzýmami
- mapovanie genómu populácii na základe polymorfných genetických markérov sú prínosom pre plemenársku prácu, ktorá ich cieľavedome využíva na tvorbu genotypov so špecifickými úžitkovými vlastnosťami, ale aj pri hodnotení homozygotnosti alebo heterozygotnosti konkrétneho jedinca i celej populácie

## 7 ZÁVER

Pod ekonomickým tlakom na chov zvierat postupne miznú niektoré plemená a nahrádzajú sa výkonnejšími, jednostranne šľachtenými, čím sa strácajú cenné gény pri novovyšľachtených plemenách a tieto majú príznaky vyčerpania génovej premenlivosti. Je preto veľmi dôležité vhodnou tvorbou a ochranou génových rezerv zabezpečiť zdroje génovej premenlivosti menej zošľachtenými plemenami, ktoré sa budú vyznačovať aktívnym zdravím a pevnou konštitúciou. Týmto sa zabezpečí ochrana genofondu a genetickej diverzity.

V súlade s vytýčenými cieľmi diplomovej práce sme optimalizovali a aplikovali PCR- RFLP metódu pre identifikovanie a genotypovanie kandidátnych génov : ryanodinový receptor (*RYR1*), srdcový proteín viažuci mastné kyseliny (*H-FABP*), gén estrogénového receptora (*ESR*) a cytochróm B (*Cyt B*).

Na experiment sme použili biologický materiál - krv Diviaka lesného (*Sus scrofa ferus*) a Svine domácej (*Sus scrofa domesticus*). Na základe výsledkov molekulárno – genetickej detekcie sme vyhodnotili geneticкую štruktúru, efektívnosť pôsobenia alel sledovaných génov vo vybraných druhoch. V sledovaných polymorfných systémoch sme medzi populáciami zistili genetické rozdiely vo frekvenciách alel a genotypov.

Geneticou analýzou jednotlivých súborov ošípaných sme dospeli k nasledovným záverom:

V prípade *ESR* géne sme v súbore sledovaných ošípaných zistili najväčšie zastúpenie heterozygotnej formy WM (25,8808), s o niečo nižšou frekvenciou nasleduje genotyp WW (19,5568). Najmenej sa v populácií vyskytovala forma homozygotná MM (8,5624). Z analýzy genotypovej štruktúry vyplýva v skupine sledovaných ošípaných prevaha alely W (0,6018) nad alelou M (0,3982).

Pri *RYR1* géne sme zistili najväčší výskyt genotypu NN (53,4730). Frekvencia výskytu homozygotného nn bola najnižšia (0,4720) na druhom mieste prevládal genotyp Nn (10,0550). Z genotypových frekvencií vyplýva prevaha alely H (0,9140) nad alelou h (0,0860).

V prípade *H-FABP* génu sme zistili najväčšie zastúpenie heterozygotnej formy Hh (29,1796) s len o čosi nižšou frekvenciou nasleduje genotyp hh (26,9102). Najmenej sa v populácii vyskytovala homozygotná forma HH (7,9102). Z analýzy genotypovej štruktúry vyplýva prevaha alely h (0,6485) nad alelou H (0,3515).

Pri analýze polymorfizmu *CytB* sme zistili u ošípanej prítomnosť dvoch fragmentov o veľkosti 244 bp a 115 bp.

Genetickou analýzou jednotlivých súborov diviakov sme dospeli k nasledovným záverom:

Pri *ESR* géne mal najväčšie zastúpenie genotyp WW (24,4802), heterozygotná forma WM sa vyskytovala s nižšou frekvenciou (12,0394). Najmenej sa v populáciách vyskytovala homozygotná forma MM (1,4802). Z analýzy genotypovej štruktúry vyplýva v skupine diviakov prevaha alely W (0,8026) nad alelou M (0,11974).

V prípade *H-FABP* génu sme zaznamenali najnižšiu frekvenciu genotypu hh (0,2250), väčšie zastúpenie mala heterozygotná forma Hh ( 5,5500) a najväčšiu frekvenciu sme zaznamenali pri genotype HH (34,2250). Z analýzy genotypovej štruktúry vyplýva prevaha alely H (0,9250) nad alelou h (0,0750).

Pri analýze polymorfizmu *CytB* sme zistili rovnako ako u ošípanej prítomnosť dvoch fragmentov o veľkosti 244 bp a 115 bp.

Pri *RYR1* géne sme vo všetkých vzorkách diviaka zistili frakcie NN, to znamená, že u všetkých bol potvrdený. Ostatné genotypy neboli zistené.

## 8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. ADKINS, R. M. – HONEYCUTT, R. L. – DISOTELL, T. R. 1996. Evolution of the eutherian cytochrome c oxidase subunit II: heterogeneous rates of protein evolution and altered interaction with cytochrome c. In: *Mol. Biol. Evol.* 13, 1996. s. 1393 – 1404.
2. ALDERSON, L. 2003. Criteria for the recognition and prioritization of breeds of special genetic importance. IN: *AGRI*, vol. 33, 2003, p. 1 – 9.
3. ANDERSSON, L. 2001. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. In: *Nature Genetics*, vol. 2, 2001, p. 130-138.
4. ANDERSSON – EKLUND, L. – MARKLUND, L. – LUNDSTRÖM, K. – HALEY, C. S. – ANDERSSON, K. – HANSON, I. – MOLLER, M. - ANDERSSON, L. 1998. Mapping quantitative trait loci for carcass and meat quality traits in a Wild Boar x Large White intercross. *J. Anim. Sci.*, 76, 694 – 700.
5. ARAVENA, P., SKEWES, O. 2007. European wild boar purebred and sus scrofa intercrosses. discrimination proposals. In: *Agrocienia* 23 (3): 133-147, 2007 ISSN 0716-1689 In general, two different karyotypes (2n36 and 2n38) take place in native wild boar populations. Wild boars in Western Europe (European wild boar) have a 2n36, whereas most wild boars from East Europe and Asia, as well as all domestic pigs, have 2n38
6. ARCHIBALD, A. L. – IMLAH, P. 1985. The halothane sensitivity locus and its linkage relationship. In *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.*, vol. 16, 1985, p. 253-263.
7. BAUEROVÁ, M. et. al.: Detekcia malígnej hypertermie ošípaných analýzou PCR-RFLP s využitím chlpov ako zdroja DNA. In: *Živočišná výroba*, roč. 40, 1995, s. 145-147.
8. BERG, J. M. – TYMOCZKO, J. L. – STRYER, L. 2006. *Biochemistry*. 6. vydanie. W. F. Freeman and Company, New York. s. 502 – 540.
9. BEŽO, M. – BEŽOVÁ, K. 1998. *Genetický slovník*. Nitra: SPU, 1998, s. 152. ISBN 80-7137-556-X.
10. BODÓ, I. 1992. The minimum number of preserved populations. In: *The management of global animal genetic resources*. FAO Animal Production and Health Paper, 1992, 104, p. 91 – 105

11. ČEPICA, S. 2002. Současná genomika hospodářských zvířat. In: *Sb. XX Genetické dny*, Brno: MZLU, 2002, s.12–18. ISBN 80-7157-607-7.
12. DROGEMULLER, C. – HAMANN, H. – DISTL, O. 2001. Candidate gene markers for litter size in different German pigs lines. In *Animal Science*, vol. 79, 2001, pp. 2565 – 2570.
13. DVORŽÁK, J. – BULLA, J. – ČEPICA, S. 1996. Uplatnění molekulární genetiky ve šlechtění prasat. In: *Sb. XVII. Genetické dny*, Brno: MZLU, 1996, s. 11-15.
14. DVORŽÁK, J. – VRTKOVÁ, I. 2001. *Malá genetiká prasat*. Brno: MZLU, 2001, 91 s. ISBN 80-7157-521-6.
15. 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- $\gamma$ . 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), 57-63
16. ERNST, M. – KUCIEL, J. – URBAN, T. 2003. Analysis of genetic variation of candidate genes in two wild boar subspecies. In: *Czech Journal of Anim. Sci.*, 48, 2003 (12) , 533 - 539.
17. ESPOSTI, M. D. – CRIMI, M. – GHELLI, A. – PATARNELLO, T. – MEYER, A. – DE VRIES, S. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1143 (3), 1993. s. 243 – 271. doi: 10.1016/0005-2728(93)90197-N. PMID 8329437
18. FAO DAD-IS. 2000. One third of farm animal breeds face extinction.
19. GÁBOR, M. – TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M. 2007. Variability cytochrómu b pri identifikácii živočíšnych druhov pomocou metódy PCR-RFLP. In: *Acta fytotechnica et zootechnica – Mimoriadne číslo*, 2009, s. 185 – 190
20. GÁBOR, M. et al. 2009. Využitím univerzálnych primerov komplementárnych ku konzervačne uzavretej oblasti génu pre cytochróm b pri stavovcoch amplifikovali 359 bp fragment, ktorý v sebe zahŕňa variabilnú oblasť s veľkosťou 307 bp. Špecifické reštrikčné fragmenty piatich použitých reštrikčných enzýmov mali pri oboch druhoch, ošípanej a diviaka, rovnakú veľkosť. Avšak rozlíšenie týchto druhov je možné v prípade podrobnejšieho preskúmania rozdielnosti 359 bp fragmentu cytochrómu b

21. GERBENS, F. – RETTENBERG, G. – LENSTRA, J. A. et al. 1997. Charakterization chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid – binding protein gene. In: *Mammalian Genome*, 8, 1997, p. 328-332
22. GERBENS, F. – JANSEN, A. – Van ERP, A. J. M. et al. 1998. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: charakterization and association with intramuscular fat content in pig. In: *Mammalian Genome*, 9, 1998, p. 1022-1026.
23. 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 variatns are associated with intramuscular fat content and back fat thickness in pigs. In: *6<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 26, 187, 1998.
24. 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. Effects of Genetics Variants of the Heart Fatty Acid Binding Protein Gene on Intramiscular Fat and Performance traits in Pigs. In: *J. anim. Sci.*, 77, 1999, p. 846-852.
25. GLOWKA, L. – BURHENNE-GUILMIN, F: - SYNGE, H. a i. 1994. A Guide to the Convention on Biological Diversity, IUCN. The W3orld Conservation Union, Gland, 1994. p. 161.
26. HALEY, C. S. – WISSCHER, P. M 1998. Strategies to utilize marker-quantitative traits loci associations: In: *Journal Dairy Science*, 81, 1998, p. 85-97.
27. HAKAMATA, Y. 1992. Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain. In *FEBS Letters*, vol. 312, 1992, p. 229-235.
28. HARBITZ, I. 1990. Assignment of the porcine calcium release channel gene, a candidate for the malignant hyperthermia locus, to the 6p11-q21 segment of the chromosome 6. In *Genomics*, vol. 8, 1990, p. 243-248.
29. HELL, P. – PAULE, L. 1983. Systematische Stellung des westkarpatischen Wildschweines *Sus scrofa*. In: *Prírodovedné práce ustavu ČSAV, XVII, Nova series*, 3, s. 54
30. HOWELL, N. 1989. Evolutionary conservation of protein regions in the protonmotive cytochrome b and their possible roles in redox catalysis. In: *J. Mol. Evol.* 29 (2), 1989. s. 157-169. doi: 10.1007/BF02100114. PMID 2509716.
31. HRAŠKA, Š. 1997. genetika populácií, Nitra: SPU, 1997. s 11 – 19. ISBN 80-7137-402-4

32. HRUBAN, V. 1999. Principy a aplikace molekulární genetiky ve šlechtění. Praha: ČZU, 1999, 242 s. ISBN 80-213-0519-3.
33. JOVANOVIČ, S.- TRAILOVIČ, R. – SAVIČ, M. – ANDSARAČ, M. 2005. Porcine stress syndrome (PSS) and ryanodine receptor 1 (RYR 1) gene mutation in european wild pig (*Sus scrofa ferus*). In: Acta Veterinaria (Beograd), Vol. 55, No. 2-3, 251 – 255, 2005.
34. KADLEČÍK, O. – KASARDA, R. 2007. Všeobecná zootechnika, Nitra: SPU, 2007. s.10 – 50. ISBN 978-80-8069-959-6
35. KLEINERT, J. 1999. Biodiverzita. Nitra: SPU, 1999, 5 s. ISBN 80-7137-583-7.
36. KMIEC, M. – DVOŘÁK, J. – VRTKOVÁ, I. 2002. Study on a relation between estrogen receptor (ESR) gene polymorphism and some pig reproduction performance characters in Polish Landrace breed. In Czech J. Anim. Science, roč. 47, 2002, č. 5, s. 189-193.
37. KOCHER, T. D. – THOMAS, K. W. – MEYER, A. – EDWARDS, V. S. – PÄÄBO, S. – VILLABLANCA, X. F. – WILSON, C. A. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 86(16), 6196-6200.
38. KOVÁČIK, A.- TRAKOVICKÁ, A. – BULLA, J. – BOBČEK, B. – RAFAYOVÁ, A., 2009. Effects of genotypes LEPR and MC4R on pigs production. In scientific papers: Animal sciences and biotechnologies. vol. 42 (2), 2009, p. 397-401.
39. LEEB, T. 1995. Construction of a porcine YAC library and mapping of the cardiac muscle ryanodine receptor gene to 14q22-q23. In *Mam. Genome*, vol. 6, 1995, p. 37-41.
40. MACHLER-BAUER, A. – ANDERSON, J.B. – DERBYSHIRE, M. K. – DEWEESE – SCOTT, C. – GONZALES, N. R. – GWADZ, M. – HAO, L. – HE, S. a další. 2007. cdd: A CONSERVED DOMAIN DATABASE FOR INTERACTIVE DOMAIN FAMILY ANALYSIS. In: *Nucleic Acids Res.* 35., 2007. s. 237 -240.
41. MAXAM, A. M. – GILBERT, W. 1977. A new method for sequencing DNA. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1977, p. 560 – 564.
42. McPHERSON, E. V. – CAMBELL, P. K. 1990. Solubilization and biochemical characterization of the high affinity (H3) ryanodine receptor from rabbit brain membranes. In *J. Biol. Chem.*, vol. 65, 1990, p. 18454-18460.
43. MEYER, A. – WILSON, A.C. 1990. Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. In *J. Mol. Evol.* 31. 1990. s. 359 – 364



44. MEYER, A. 1994. Shortcomings of the cytochrome b gene as a molecular. 9. 1994. s. 278 – 280.
45. MEYER, R. – HOFELEIN, C. – LÜTHY, J. – CANDRIAN, U. 1995. Polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism analysis: a simple method for species identification in food marker. In Trends Ecol. Evol. J. Assoc. Off. Anal. chem. Int. 78, 1995. s. 1542 – 1551.
46. MICHAELLI, L. 2008. Naša zver, Obrazová encyklopédia, 2008. Neografia a. s. Martin, s. 132-135. ISBN 978-80-88892-82-3
47. MILLER, S. A. – DYKES, D. D. – POLESKY, H. F. 1987. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In *Nucleic Acids Research*, 16 N3, 1988. s. 1215.
48. MINAROVÍČ, T. 2009. Využitie polymorfizmu cytochrómu b na identifikáciu živočíšnych druhov, Diplomová práca, Nitra 2009.
49. MINDEKOVÁ, S. – TRAKOVICKÁ, A. – TRANDŽÍK, J. 2010. Corelation of pig LEPR and H- FABP parental genotypes with content of ment in offsprings, Hungarian veterinary journal, 132, n. 1 , 2010, s. 14-21.
50. MURRAY, B. W. – MCCLYMONTS, R. A – SROBECK, C. 1995. Forensic identification of ungulate species using restriction digestion of PCR-amplified DNA. In *J. For. Sci.* 40, 1995. s. 943-951.
51. NAKAI, J. et al. 1990. Primary structure and functional expression from cDNA of the cardiac ryanodine receptor/calcium release channel. In *FEBS Letters*, vol. 271, 1990, p. 169-177.
52. NECHTELBERGER, D. –PIRES, V. – SOOLKNER, J. 2001. Intramuscular fat content and genetic variants az H-FABP loci in Austrian pigs. In: *J. Anim. Sci.*, 79, 2001, p. 2798-2804.
53. ORAVCOVÁ, M. – HUBA, J. – HETÉNYI, L. – BULLA, J. – MÁTLOVÁ, V. – KADLEČÍK, O. 2004. Živočíšne genetické zdroje v SR ako súčasť svetového genofondu hospodárskych zvierat. In: *Journal Farm Anim. Sci.*, Vedecké práce Výskumného ústavu živočíšnej výroby v Nitre, roč. 37, 2004, s. 111 – 118. ISSN 1335-3683  
<http://www.fao.org/news/2000/001201-e.htm>guidelines
54. OMELKA, R. – BAUER, M. et al. 2001. Estrogénový receptor – genetický marker plodnosti ošípanej. In *Genetika a šľachtení hospodárskych zvierat. IV.* Odborný

seminář doktorandů a studentů. 14. září 2001. Brno: MZLU, 2001, s. 55-56- ISBN 80-7157-532-1.

54. PALUMBI, S. R. – BAKER, C. S. 1994. Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. In: *mol. Biol. Evol.* 11, s. 426 – 435.
55. PASCOAL, A. – PRADO, M. – CASTRO, J. – CEPEDA, A. – BARROS – VELÁSQUEZ, J. 2004. Survey of authenticity of meat species in food products subjected to different technological processes, by means of PCR-RFLP analysis. In *Eur. Food Res. Technol* 218, 2004. s. 306-312.
56. PIVKO, J a kol.1996. Biodiverzita v chove zvierat, Nitra: SPU, Výskumný ústav živočišnej výroby, 1996, s. 27- 47. ISBN 80-7148-020-7
57. REJDUCH, B. – SLOTA, E. – ROZYCKI, M. – KOSCIELNY, M. 2003. Chromosome number polymorphism a litter of european wild boar ( *Sus scroffa scroffa*L.) In: *Animal Science Papers and Reports*, 21: no1, 57 -62
58. ROHRER, G. A. – ALEXANDR, L. J. – HU, Z. – SMITH, T. P. – KEELE, J. W. – BEATTIE, C. W. 1996. Comprehensive map of the porcine genome. In: *Genome Res.*, 6, 1996, p. 371-391.
59. ROTHSCILD, M. F. – RUVINSKY, A. 1998. The Genetics of the Pig. In: CAB International, 622p.
60. SANGER, F. – NICKLEN, S. – COULSON, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1977, p. 5463 – 5467
61. SCHERF, B.- RISCHKOWSKY, B. – HOFFMANN, I. 2005. Status of animal genetic resources – time for action? In: International Workshop on options and strategies for conservation of farm animal genetic resources, Agropolis Montpellier, 2005, p. 3 – 11
62. SCHMITZ, A. 1992. Swine chromosomal DNA quantification by bivariate flow karyotyping and karyotype interpretation. In: *Cytometry*, 12, 1992, p. 703–710
63. SORENSON, M. D. – QUINN, W. T., 1998. Numts: A challenge for avian systematics and population biology. In *The Auk* 115: 214-221.
64. SORENTINO, V. – VOLPE, P. 1993. Ryanodine receptor: how many, where and why? In *Trends in Pharm. Sci.*, vol. 14, 1993, p. 98-103.
65. STORCH, D. – MIHULA, S. 1997. Ekologie, Praha, 1997. ISBN 80-86088-12-0

66. TAKESHIMA, H. 1989. Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor. In *Nature*, vol. 339, 1989, p. 439-445.
67. TRAKOVICKÁ, A. – BEŽOVÁ, K. – ANGELOVIČOVÁ, M. a ďalší. 2005. Genetické markéry a kvalita produktov špeciálnych odvetví živočíšnej výroby, Nitra: SPU, 2005. S.12 – 14., s.149. ISBN 80-8069-633-0
68. TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M. – GÁBOR, M. 2006. Analýza polymorfizmu *ESR* (*PVU* II) génu ošípanej metódou PCR –RFLP. *Acta fytotechnica et zootechnica – mimoriadne číslo 2006*, s. 18.
69. UHRÍN, P. – KÚBEK, A. – BULLA, J. 1996. Základy molekulárnej genetiky, Nitra: SPU, 1996. s. 52 – 53. ISBN 80-7137-240-4
70. URBAN, T. – KUCIEL, J. – MIKOLÁŠOVÁ, R. 2002. Polymorphism of genes encoding for ryanodine receptor, growth hormone, leptin and MYC proto-oncogene protein and meat production in Duroc pigs. In: *Czech Journal of Anim. Sci.*, 47, 2002, 10, 411-412.
71. WINTER, A. K. – THOMSEN, P. D. – DAVIES, W. 1990. A comparison of DNA – hybridization, immunodiffusion, countercurrent immunoelectrophoresis and isoelectric focusing for detecting the admixture of pork to beef. In *Meat Science* 27, 1990. s. 75-85.
72. YE, X. – ROBINSON, J. A. B. – JIANG, Z. – VERRINDER GIBBINS, A. M. – GIBSON, J. P. 2002. Polymorphism of histone deacetylase 1 and 3 genes and fatty acid – binding protein 3 and 4 genes and thier associations with economic traits in swine. In: 7<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 19 – 23, 2002, Montpellier, France.
73. ZEHNER, R. – ZIMMERMANN, S. – MEBS, D., 1998. RFLP and sequence analysis of the cytochrome B gene of selected animals and man. methodology and forensis application. In *J Legal Med*, 111:323-7.

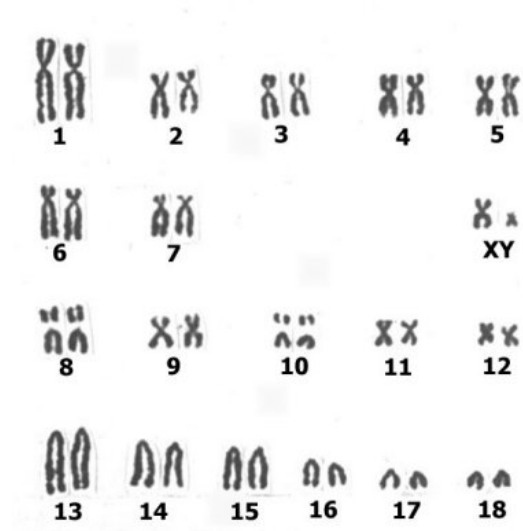
## **PRÍLOHY**

Tabuľka 1: **Biodiverzita – počet známych druhov organizmov na Slovensku v porovnaní so svetom**

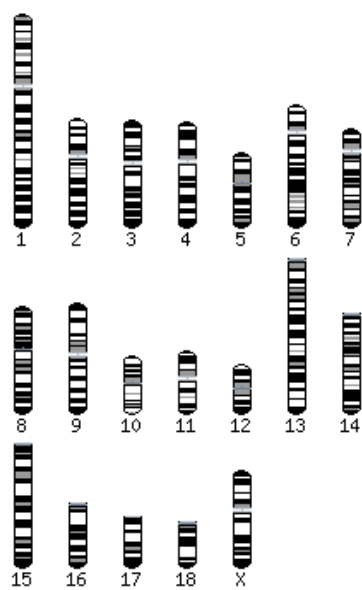
Skupiny	Počet druhov	
	Slovensko	Svet
Jednobunkovce	1000	40000
Riasy	3400	40000
Huby	2000	70000
Lišajníky	1493	17000
Machorasty	877	14000
Cievnaté rastliny	3500	250000
Bezstavovce okrem článkonožcov	2300	90000
Článkonožce okrem hmyzu	2300	90000
Hmyz	22600	1000000
Ryby	78	8500
Obojživelníky	18	4000
Plazy	15	6300
Vtáky	352	9881
Cicavce	85	4327
Spolu	40018	1644008

Tabuľka 2: **Predpokladané časové obdobie a miesto domestikácie druhov zvierat**

Druh zvierat'a	Časové obdobie domestikácie	Miesto domestikácie
Kone	4000	Stredná Azia
Dobytok	100 005 000	Egypt, oblasť Stredozemného a čierneho mora, Sibír
Ovce	8000	juhovýchodná ázia, stredozemné more
Kozy	8000	juhovýchodná ázia, stredozemné more
Ošípané	8000	juhovýchodná ázia, čína
Sliepky	3500	Stredná Azia
Psy	10000	juhovýchodná ázia, čína, severná amerika, Európa



Obrázok 1: Karyotyp *Sus scrofa* (URL1)



Obrázok 2: Idiogram *Sus Scrofa* (URL2)

*Sus scrofa ferus*



*Sus scrofa domesticus*

