

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

2132551

**POLYMORFIZMUS *ESR* GÉNU V PRODUKČNEJ
POPULÁCIÍ OŠÍPANÝCH**

2010

Bc. Lenka Púčiková

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

**POLYMORFIZMUS *ESR* GÉNU V PRODUKČNEJ
POPULÁCII OŠÍPANÝCH
Diplomová práca**

Študijný program: Genetické technológie v agrobiológii

Štúdijný odbor: 6.1.1 Všeobecné poľnohospodárstvo

Školiace pracovisko: Katedra genetiky a plemenárskej biológie

Školiteľ: Ing. Anna Trakovická, CSc.

Konzultant: Ing. Michal Gábor, PhD.

Nitra, 2010

Bc. Lenka Púčiková

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA V NITRE

FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV

Katedra genetiky a plemenárskej biológie

Akademický rok : 2009/2010

ZADÁVACÍ PROTOKOL DIPLOMOVEJ PRÁCE

Študent: Bc. Lenka Púčiková, FAPZ

Študijný program: Genetické technológie v agrobiológii

V zmysle 3. časti, čl. 21 Študijného poriadku SPU v Nitre z roku 2008, Vám zadávam tému diplomovej práce: Polymorfizmus *ESR* génu v produkčnej populácii ošípaných“.

Cieľ práce:

Identifikovať polymorfizmus génu *ESR* v produkčnej populácii ošípaných metódou PCR-RFLP a vyhodnotiť génovú a genotypovú štruktúru sledovanej populácie ošípaných.

Rámcová metodika práce:

- vytvorenie všeobecného teoretického základu z danej problematiky
- identifikácia genotypov zvierat génu *ESR* metódou PCR-RFLP
- vyhodnotenie génovej a genotypovej štruktúry v produkčnej populácii ošípaných

Rozsah grafických prác: 15 tabuliek, 7 obrázkov, 2 grafy, 1 schéma

Rozsah textovej časti: 67 strán

Literatúra: vedecké a odborné časopisy, odborné knižné publikácie

TRAKOVICKÁ, A. a et. al. 2005. Genetické markéry a kvalita produktov špeciálnych odvetví živočíšnej výroby. Monografia. Nitra : SPU, 178s., ISBN 80-8069-633-0

HOROGH, G – ZSOLNAI, A. - KOMIOSI, I. et al. 2005. Estrogen receptor genotypes and litter size in Hungarian Large White pigs. In J. Anim. Breed. Genet. Vol. 122, p. 56-61

OMELKA, R. 2003. Analýza vybraných genetických polymorfizmov vo vzťahu k reprodukčným vlastnostiam ošípaných. Doktorandská dizertačná práca. Nitra: UKF

KNOLL, A. - DVOŘÁK, J. - NEBOLA, M. - ČEPICA, S. 1998. Gene frequencies of candidate gene (*ESR and CYP 21*) for litter size in two pig breeds. In 49th Annual Meeting of the EAAP, 25 august, Warsaw

Vedúci záverečnej práce: doc. Ing. Anna Trakovická, CSc.

Dátum zadania záverečnej práce: september 2008

Harmonogram postupu práce:

2008/2009 - zoštudovanie literatúry

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

Dátum odovzdania diplomovej práce: apríl 2010

doc. Ing. Juraj Candrák, PhD

Vedúci katedry

prof. Ing. Daniel Bíro, CSc.

Dekan FAPZ

ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaná Lenka Púčiková týmto vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému: „ Polymorfizmus *ESR* génu v produkčnej populácii ošípaných“ vypracovala samostatne s použitím literatúry.

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

V Nitre 16. apríla 2010

POĎAKOVANIE

Dovoľujem si touto cestou úprimne poďakovať mojej školiteľke doc. Ing. Anne Trakovickej, CSc. za pomoc, odborné vedenie, cenné rady a pripomienky pri vypracovávaní diplomovej práce. Poďakovanie patrí taktiež Ing. Michalovi Gáborovi, PhD., za odbornú pomoc v laboratóriu.

.....

Abstrakt

Štúdium polymorfizmu génu *ESR* sa uskutočnilo metódou PCR-RFLP optimalizovanej pre podmienky nášho laboratória. Amplifikované PCR produkty boli vizualizované v 2 % agarózovom géle.

Na analýzu boli použité vzorky krvi ošípaných krížencov biela ušľachtilá x landras (38), landras x biela ušľachtilá (47), biela ušľachtilá (51) a duroc (75).

Pre RFLP analýzu bol vybraný reštrikčný enzým Fastdigest *Ava I* (Fermentas), ktorý štiepil PCR produkt (185 bp) v mieste C↓BCGRG. Detekovali sme 3 genotypy WW (109 bp - +76 bp) 118 zvierat, WM (109 bp + 62 bp + 47 bp) 58 zvierat a MM (76 bp + 62 bp + 47 bp) 45 zvierat.

Výsledky analýz boli vyhodnotené matematicko-štatistickými metódami v podobe genotypovej štruktúry. Prevažujúcim genotypom *ESR* génu u všetkých hodnotených plemien ošípaných bol genotyp WW (118 zvierat) a jeho frekvencia sa pohybovala v rozmedzí 0,4043 – 0,7066. Frekvencia genotypu WM sa u sledovaných populácií pohybovala v rozsahu 0,2266 – 0,3333, pričom v populácii LxBU mala rovnakú frekvenciu ako genotyp MM. Najmenej bolo jedincov s genotypom MM (45 zvierat), ktorého frekvencia výskytu bola 0,16 – 0,2979. Genotyp WW bol u sledovaných plemien zastúpený nasledovne: DU>BUxL>BU>LxBU. Genotyp MM bol u všetkých sledovaných plemien zastúpený najmenej a to v nasledovnom poradí: LxBU>DU>BU>BUxL. Frekvencia alely W bola u všetkých plemien vyššia, ako frekvencia alely M, pričom najvyššiu frekvenciu mala alela W u plemena DU (0,8199) a najnižšiu u plemena LxBU (0,5531). Frekvencia alely M bola najvyššia v populácii plemena LxBU (0,4469) a najnižšia u plemena DU (0,1801).

Kľúčové slová: ošípané, polymorfizmus *ESR*, genotypová štruktúra

Abstract

ESR study of gene polymorphism was done by PCR-RFLP conditions optimized for our laboratory. Amplified PCR products were visualized on 2 % agarose gel.

The analysis of blood samples were used pig hybrids large white x landrace (38), landrace x large white (47), large white (51) and duroc (75).

For RFLP analysis was selected restriction enzymes Fastdigest *Ava I* (Fermentas), which cleaves the PCR product (185 bp) at the C↓BCGRG. We detected genotypes WW (109 bp + 76 bp) 118 animals, WM (109 bp + 62 bp + 47 bp) 58 animals and MM (76 bp + 62 bp + 47 bp) 45 animals.

For results were evaluated by analysis of mathematical methods in the form statistics genotype structure. Predominant *ESR* genotype of the gene in all breeds of pigs was evaluated genotype WW (118 animals) and its frequency ranged 0,4043 – 0,7066. WM genotype frequency was observed among populations ranged from 0,2266 – 0,3333, while LxBU populations had the same frequency as the MM genotype. At least was the subjects with genotype MM (45 animals), whose frequency of occurrence was 0,16 – 0,2979.

WW genotype was observed among the breeds represented following: DU>BUxL>BU>LxBU. Genotype MM was observed in all breeds and least in the following order: LxBU>DU>BU>BUxL. W allele frequency in all breeds was higher than the frequency of allele M the highest frequency was the breed DU (0,8199) populations and lowest in LxBU (0,5531) populations. M allele frequency was highest in the breed LxBU (0,4469) populations, and lowest in DU breed (0,1801).

Key words: pigs, polymorphism *ESR*, genotypic structure

Obsah

Zoznam použitých tabuliek, obrázkov, grafov a schém

Zoznam použitých skratiek a značiek

Úvod	15
1. Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky	16
1.1 Molekulárna genetika v šľachtení ošípaných	16
1.2 Štruktúra eukaryotického genómu ošípaných	17
1.3 Mapovanie genómu ošípanej	18
1.4 Genetické markery a ich využitie v selekčných programoch ošípaných	19
1.5 Selekcia s podporou markerov (MAS)	21
1.6 Metódy detekcie genetických markerov	22
1.6.1 PCR (Polymerázová reťazová reakcia)	22
1.6.2 PCR-RFLP	25
1.6.3 Elektroforéza	26
1.7 Kandidátne gény ovplyvňujúce reprodukciu ošípaných	26
1.7.1 Estrogénový receptor	28
1.7.2 Estrogény a ich funkcia v organizme	29
1.7.3 Polymorfizmus génu estrogénového receptora	31
1.7.4 Vzťah génu <i>ESR</i> k úžitkovosti fyziologickým znakom reprodukcie	32
2. Cieľ práce	36
3. Materál a metódy	37
3.1 Biologický materiál	37
3.1.1 Charakteristika plemien	37
3.2 Chemikálie, roztoky a ich príprava	39
3.2.1 Použité chemikálie	39
3.2.2 Použité roztoky	39
3.2.3 Príprava roztokov	40
3.3 Prístrojové vybavenie	41
3.4 Použité metódy	42
3.4.1 Izolácia genómovej DNA z krvi	42
3.4. PCR génu <i>ESR</i>	43
3.4.3 PCR-RFLP	44

3.4.4 Elektroforéza v agarázovom géle	45
3.5 Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry, efektívnosti pôsobenia alel a genetickej diverzity	46
4. Výsledky	48
4.1 <i>ESR</i>	48
4.1.1 Izolácia genómovej DNA	48
4.1.2 PCR-RFLP	48
4.1.3 Genetická štruktúra a efektívnosť pôsobenia alel <i>ESR</i> génu	50
5. Diskusia	54
6. Návrh na využitie výsledkov	57
7. Záver	58
8. Zoznam použitej literatúry	59
Prílohy	68

Zoznam použitých tabuliek, obrázkov, grafov a schém

Tabuľka 1 Vlastnosti a typy genetických markerov

Tabuľka 2 Kritéria a postup MAS

Tabuľka 3 Základné zložky PCR pre úspešnú amplifikáciu

Tabuľka 4 Variácie PCR a ich princíp

Tabuľka 5 Prehľad vybraných génov ovplyvňujúcich reprodukciu ošípaných

Tabuľka 6 Použité chemikálie

Tabuľka 7 Zloženie reakčnej zmesi s objemom 25 μ l

Tabuľka 8 Teplotný a časový režim PCR reakcie

Tabuľka 9 Zloženie štiepacej zmesi RFLP s objemom 15 μ l

Tabuľka 10 Priebeh štiepenia reštrikčným enzýmom

Tabuľka 11 Genotypová štruktúra populácie BUxL

Tabuľka 12 Genotypová štruktúra populácie LxBU

Tabuľka 13 Genotypová štruktúra populácie BU

Tabuľka 14 Genotypová štruktúra plemena DU

Tabuľka 15 Efektívnosť pôsobenia alel *ESR* génu u jednotlivých plemien ošípaných

Obrázok 1 Karyotyp ošípanej

Obrázok 2 Reprezentatívne výsledky analýzy PCR-RFLP pre gén *ESR*

Obrázok 3 plemeno biela ušľachtilá

Obrázok 4 plemeno landras

Obrázok 5 plemeno duroc

Obrázok 6 Termocykler

Obrázok 7 Cytogenetická mapa chromozómu 1

Graf 1 Percentuálne zastúpenie genotypov v sledovaných populáciách ošípaných

Graf 2 Percentuálny podiel alel v sledovaných populáciách ošípaných

Schéma 1 Schématické znázornenie PCR produktu *ESR* pomocou *AvaI*

Zoznam použitých skratiek a značiek

A	adenín
<i>AvaI</i>	reštrikčná endonukleáza
bp	base pair - báзовý pár
BLUP	best linear unbiased prediction
BU	plemeno biela ušľachtilá
BUxL	hybridné plemeno biela ušľachtilá
BuxLD	hybridné plemeno biela ušľachtilá x landras domáci
C	cytozín
C _a	koeficient homozygotnosti
cDNA	complementary DNA - komplementárna DNA
CMČ	cenné mäsové časti
DGGE	denaturačná gradientová gélová elektroforéza
DNA	deoxyribonukleotidová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
DU	plemeno duroc
e	pozorovaný počet genotypov
EDTA	kyselina etyléndiamíntetraoctová
<i>ER</i>	estrogénový receptor
<i>ESR</i>	gén estrogénového receptoru
ETL	lokusy ekonomických znakov
ERE	estrogen responsive elements
FSH	folikulo stimulačný hormón
FSHB	gén beta podjednotky folikuly stimulujúceho hormónu
FRO	forvard – priamy primer
G	guanin
g	gram
HCl	kyselina chlorovodíková
H _e	koeficient heterozygotnosti
HRE	hormon responsive elements
L	plemeno landrace
LH	luteinizačný hormón

LW	plemeno large white
MAS	markermi podporovaná selekcia
M	mol
mM	milimol
ml	mililiter
N	počet jedicov v populácii
n	počet genotypových tried
N _a	úroveň polymorfizmu lokusov
NBA	number born alive –počet živo narodených mláďat
ng	nanogram
<i>OPN</i>	gén pre osteopontín
P	hladina preukaznosti
p _A	frekvencia alely A
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PIC	polymorfny informačný obsah
PN	plemeno pietrain
<i>PRLR</i>	gén pre prolaktínový receptor
<i>PvuII</i>	reštrikčný enzým
q _B	frekvencia alely B
QTL	lokusy kvantitatívnych znakov
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RBC	roztok na lýzu červených krviniek
<i>RBP4</i>	retinol – binding protein 4
REV	spätný primer
rpm	revolutions per minute – otáčky za minútu
RFLP	polymorfizmus dĺžky reštrikčných fragmentov
s	smerodajná odchýlka
SDS	sodná soľ dodecylsulfátu
SGSC	Swine Genome Sequencing Consortium
SHBG	Sex hormone-binding globulin
SM	slovenské mäsové plemeno
SNPs	jednonukleotidové polymorfizmy
SSC	chromozóm <i>Sus scrofa</i>
SSCP	konformačný polymorfizmus jednoreťazcov

SZ	počet odchovaných zvierat
T	tymín
t	pozorovaný počet genotypov
TAE	trisacetát EDTA, pH puffer
Taq	Taq polymeráza
TBE	trisborát EDTA; pH pufr
TNB	total number of born – celkový počet narodených
Tris	tris hydroxymetyl aminometán
USDA–ARS	US Department of Agriculture – Agricultural Research Service
USDA-CSREES	Cooperative State Resea Education and Extension Service
UV	ultrafialové žiarenie
VNTR	Variable Number of Tandem Repeats
WM	plemeno white meaty
μg	mikrogram
μl	mikroliter
μM	mikromol

Úvod

Využívanie výkonného genofondu je jedným zo základných predpokladov efektívnej výroby bravčového mäsa. Cieľom šľachtenia je predovšetkým dosahovanie maximálneho genetického pokroku v šľachtiteľských populáciách hospodárskych zvierat a jeho prenos do produkčnej sféry. Aj napriek tomu, že v priebehu posledného desaťročia s rozvojom štatistických metód BLUP – animal model došlo k zlepšeniu genetických a fenotypových parametrov populácií ošípaných, je kladený stále väčší dôraz na využitie možností, ktoré poskytuje prudko sa rozvíjajúca molekulárna genetika. Predpokladá sa, že využitie genetických markerov v šľachtiteľských programoch ďalej akceleruje selekčný pokrok, ktorý je dosahovaný v šľachtiteľských populáciách.

Aj z toho dôvodu, že genetické mapovanie poskytuje veľké množstvo génov vznikajú otázky o spôsobe ich využitia. V oblasti šľachtenia sa to týka predovšetkým otázok ohľadom kvantifikácie vzťahov jednotlivých markerov k úžitkovosti a stratégie zaradenia jednotlivých poznatkov do šľachtiteľských programov. Využitie molekulárnej genetiky v šľachtení poskytuje nástroj k cieľovým a predvídateľným zmenám. Výskum v tejto oblasti je v súčasnej dobe orientovaný na sledovanie asociácií polymorfizmu DNA k ekonomicky významným znakom a ich využití v selekcii. Pri DNA testoch je využívaná metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR - polymerase chain reaction), ktorá umožňuje rýchlu *in vitro* syntézu špecifického fragmentu DNA, ďalej je to metóda polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov (RFLP – restriction fragment length polymorphism) a elektroforetické metódy. Na základe týchto metód je možné detekovať jedincov, ktorí sú nositeľmi žiadúcej alely v géne podieľajúcom sa na variabilite skúmaného znaku.

Významným faktorom ovplyvňujúcim efektivitu výroby bravčového mäsa je reprodukčná úžitkovosť. Z toho dôvodu nájdenie genetických markerov ovplyvňujúcich ukazovatele reprodukcie je v popredí záujmov mnohých šľachtiteľov a molekulárnych genetikov. Jedným z najznámejších polymorfizmov sledovaných vo vzťahu k plodnosti ošípaných je polymorfizmus génu pre estrogénový receptor.

Detailná analýza štruktúry génov na ktorú sú zamerané rôzne projekty mapovania genómu jednotlivých organizmov bude hnacou silou pre využívanie nových techník v šľachtení a chove zvierat, čo je jedným z dôležitých krokov na ceste k zlepšeniu ich úžitkovosti.

1. Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

1.1 Molekulárna genetika v šľachtení ošípaných

Cieľom šľachtenia je poskytnúť produkčnej sfére zvieratá takých genotypov, ktoré umožňujú produkciu kvalitných živočíšnych produktov podľa predstáv spotrebiteľov a zaisťujúcich ekonomickú efektivitu ich výroby.

Šľachtiteľský program je súborom celej rady organizačných opatrení zahrňujúcich definíciu chovných cieľov, výber vhodných populácií, stanovenie sledovaných ukazovateľov úžitkovosti, voľby metód genetického hodnotenia zvierat a prenos genetického pokroku do výrobnnej sféry (Pražák, 2002).

Dôležitou súčasťou každého šľachtiteľského programu je výber zvierat s najväčšou genetickou hodnotou, ktoré môžu byť využité ako rodičia budúcich generácií (Van Arendonk et al., 1999). Vo väčšine chovateľsky vyspelých zemí sa štandardom genetického hodnotenia stali odhady plemenných hodnôt metódami BLUP – animal model (Wolfová a Wolf, 1999).

Všeobecne sú tradičné metódy v šľachtení vhodné a kompetitívne pre zlepšenie úrovne produkčných znakov. Uplatnenie molekulárnej genetiky by však mohlo zvýšiť genetický zisk v šľachtení na reprodukčné znaky, pretože tieto znaky sú viazané na pohlavie, väčšinou majú nízku heritabilitu a prejavujú sa až v dospelosti jedinca (Visscher a Haley, 2002).

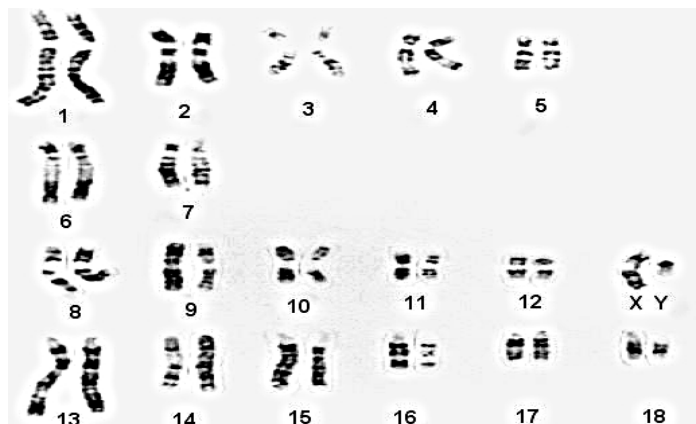
Zvyšovaním úrovne úžitkovosti ošípaných v šľachtiteľskom procese nadobúdajú stále väčší význam metódy využívajúce informácie z mnohých oblastí molekulárnej genetiky, štatistiky a informatiky. Molekulárna genetika tak poskytuje nástroj k cieľovým a predvídateľným zmenám (Křenková, 1999).

V súčasnej dobe dochádza k výraznému prehĺbovaniu výskumu funkcií génov u ošípaných, ktorý využíva informácie z prebiehajúceho sekvenovania genómu ošípanej a zo štúdií expresie génov u rôznych plemien, v rôznych tkanivách a v rôznych štádiách vývoja. Súčasný prístup genomiky a proteomiky umožňujú študovať množstvo génov a proteínov súčasne, vrátane ich regulácií a interakcií, čo umožňuje lepšie pochopenie biológie ošípanej a fyziologických funkcií uplatňujúcich sa pri realizácii úžitkových vlastností (Stratil, 2009).

1.2 Štruktúra eukaryotického genómu ošípaných

Genómy hospodársky významných cicavcov, vrátane ošípaných, sú veľmi podobné genómu človeka, a pri výskume sa tieto podobnosti využívajú (Stratil, 2009).

V somatických bunkách ošípanej je 38 chromozómov. Odhaduje sa, že menej ako 10 % cicavčieho genómu tvoria kódujúce sekvencie génov. Zvyšok je tvorený nekódujúcou DNA na repetitívne a jedinečné sekvencie. V kódujúcich častiach je variabilita spôsobená zmenami v sekvenciách nukleotidov, polymorfizmus môže byť detekovaný po štiepení reštrikčnými enzýmami elektroforeticky. Táto variabilita môže vyvolať, okrem variability produktov, zmeny v sekundárnej štruktúre DNA. Nekódujúce sekvencie sa vyznačujú vysokým stupňom polymorfizmu (Wintero et al., 1992), pretože mutácie v týchto sekvenciách väčšinou neovplyvňuje funkčnosť organizmu a nie je preto prirodzeným výberom eliminovaná (Ferák a Sršeň, 1990).



Obrázok 1 Karyotyp ošípanej

(www.ri.bbsrc.ac.uk/pigmap/karyotype.html)

Pekingský ústav genomiky čínskej akadémie vied a kodaňský Výbor pre šľachtenie a chov ošípaných oznámili prečítanie genómu ošípanej v rámci spoločného projektu, ktorý bol spustený v roku 2001 pod názvom „Čínsko-dánsky projekt genómu ošípanej“. Doposiaľ bolo prečítaných celkom asi 2,1 miliard písmen genetického kódu. Stále však chýbajú predovšetkým opakujúce sa úseky, ktoré sú ťažko čitateľné. Ich rozlúštenie je nielen ťažké a zdĺhavé, ale aj drahé. V projekte bola použitá DNA ošípaných z plemien hampshire, yorkshire, landrace, duroc a čínskeho plemena ErHuaiLan. Genetici porovnávali zistené sekvencie genómu ošípaných s ľudským a myším genómom a dospeli k záveru, že človek a ošípaná majú mnoho spoločného. U

ošípanej sa našli dlhé konzervatívne nekódujúce sekvencie – teda časti genómu, kde sice nie sú gény, ale kde sa dedičná informácia väčšiny cicavcov prekvapivo zhoduje. Podľa všetkého sú tieto oblasti zodpovedné za reguláciu génov dôležitých pre správny vývoj zárodkov a plodov (www.osel.cz)

Od roku 2003 sa sekvenovaním zaoberá aj združenie SGSC (Swine Genome Sequencing Consortium (www.piggenome.org)).

1.3 Mapovanie genómu ošípanej

Dôležitým krokom v identifikácii génov, ktoré možno využiť pri zlepšovaní úrovne úžitkových vlastností je tvorba genetických máp, ktoré sú základným nástrojom štúdia genetickej podstaty úžitkových vlastností. V súčasnej dobe sú vytvorené mapy všetkých chromozómov ošípanej, ktoré zahŕňajú viac než 1000 mikrosatelitných lokusov a niekoľko tisíc génov. Tieto genetické markery sú využívané pre mapovanie QTL, ktorých bolo odhalených viac než 2400 (reprezentujúcich 387 znakov a vlastností) na všetkých chromozómoch ošípanej (Stratil, 2009).

Genetická mapa ošípaných je vytváraná v troch projektoch – švédsky Nordic collaboration (Markuland et al., 1996), americký USDA MARC map (Rohrer et al., 1994) a európsky PiGMAP consortium map (Archibald, 1994). Aktuálne informácie možno nájsť na nasledujúcich adresách:

<http://www.animalgenome.org>

<http://www-lgc.toulouse.inra.fr>

Pokiaľ možno identifikovať alternatívne alely v lokuse a použiť ich k štúdiu dedičnosti časti chromozómu v mapovacích štúdiách, lokusy budú označované ako genetické markéry.

Cieľom mapovania je poskytnúť poznatky o pôsobení jednotlivých génov a ich vzájomných interakciách a využívanie mapových informácií k pozičnému klonovaniu génov zodpovedných za určitý znak bez znalosti jeho biochemickej či molekulárnej podstaty (Womack, 1997). Jedná sa o tri kroky – lokalizácia QTL v chromozomálnej oblasti, výber možných kandidátnych génov a testovanie asociácie variability v týchto génoch s fenotypovým prejavom.

Snahy o zmapovanie genómu ošípanej začali v roku 1990 s vývojom európskeho projektu PiGMAP zahŕňajúceho laboratória v Európe, USA, Japonsku a Austrálii. V USA vznikli dva mapovacie projekty: USDA – ARS (US Department of Agriculture –

Agricultural Research Service) a národný program USDA – CSREES (Cooperative State Resea Education and Extension Service) (Rotchild, 2003), vo Švédsku program Scandinavian map (Andersson et al., 1994).

Veľmi rýchli vývoj v oblasti mapovania genómu ošípanej dokumentuje porovnanie publikovaných výsledkov. Napríklad v roku 1999 obsahovali väzbové mapy viac než 1800 lokusov (z nich 250 génov), fyzikálne genetické mapy obsahovali viac než 600 lokusov (Rotchild a Plastow, 1999). Rotchild (2004) zhrnul výsledky mapovania genómu v roku 2003: je evidovaných viac než 1381 génov a 2262 markerov, fyzická mapa obsahuje 1315 génov a anonymných markerov.

Zásluhou výskumných projektov mapovania genómu ošípaných bola doposiaľ identifikovaná celá rada génov a QTL lokusov. Boli nájdené mutácie spôsobujúce stresový syndróm ošípaných a pigmentáciu kože a preukazné asociácie medzi kandidátnymi génmi a veľkosťou vrhu, rastom, kvalitou mäsa, rezistenciou k ochoreniam a farbou. QTL pre reprodukciu boli lokalizované na chromozómoch 4, 6, 7 a 8 (Rotchild, 2003). Z hľadiska mapovania QTL pre reprodukčné vlastnosti považujú Rotchild a Plastow (1999) z publikovaných výsledkov mapovacích experimentov za sľubnú predovšetkým lokalizáciu QTL pre ovulačný pomer na chromozóme 8.

Kandidátnym prístupom boli identifikované gény s preukazným efektom na veľkosť vrhu: *ESR*, *FSHB*, *MTNR1A*, *OPN*, *PRLR*, *RBP4* (Van der Lende et al., 2002; Kirkpatrick, 2002) a celá rada ďalších génov. Pre žiadny z uvedených génov nie je doposiaľ jasné, či ich polymorfizmus priamo ovplyvňuje variabilitu veľkosti vrhu alebo je iba genetickým markerom tesne viazaným k iným polymorfným génom zapríčínujúcim zistené efekty na veľkosť vrhu (Van der Lende et al., 2002).

1.4 Genetické markery a ich využitie v selekčných programoch ošípaných

Genetický marker je polymorfný znak varianty, ktorý vykazuje genetickú dedičnosť, a ktorý je v asociácii s genetickou variabilitou selekčne úžitkového znaku (Dvořák et al., 1996).

Funkcia väčšiny doteraz identifikovaných génov je neznáma. Často sú však lokalizované v chromozómových oblastiach s vplyvom na úžitkové vlastnosti a môžu byť v genetickej väzbe so známym detekovateľným génom. V uvedenom prípade gén, detekovateľný DNA testom označujeme pojmom marker, pretože „značuje“ oblasť

chromozómu zodpovednú za konkrétny prejav úžitkového znaku. Gény, ktorých prítomnosť je markerovo značená, nazývame QTL (Webb, 2000).

Využitie markerov v šľachtiteľských programoch závisí do značnej miery na podmienkach vyplývajúcich z rozvoja technológií detekcie markerov, ktoré na jednej strane vedú k lacnému vytvoreniu vysokej hustoty genetických máp a na druhej strane umožnia rýchle a lacné testovanie jedincov v populáciách (Weller, 2001). Prvým sledovaným polymorfizmom bol RFLP polymorfizmus, dnes sú k dispozícii ďalšie typy markerov ako sú minisatelity, mikrosatelity, RAPD, AFLP, SSCP, jednonukleotidové polymorfizmy SNP (Haley, 1999) a ďalšie typy markerov (Knoll a Urban, 2002).

Tabuľka 1 Vlastnosti a typy genetických markerov

<p>Vlastnosti genetického markeru</p>	<ul style="list-style-type: none"> • môže, ale nemusí byť časťou génu • je tvorený sekvenciami báz na špecifickom fyzickom mieste genómu • kodominantný typ dedičnosti (bezpečne možno odlíšiť homozygota od heterozygota) • exaktne testovateľný • možno zachytiť najvyšší stupeň variability • jednotková heritabilita ($h^2 = 1$) • pre znaky alebo vlastnosti, ktoré sa realizujú iba u určitého pohlavia, možno stanoviť marker i u druhého pohlavia • pre znaky, ktoré sa určujú až po zabití, môže byť marker určený už u živých zvierat, (Dvořák et al., 1996; Knoll a Urban, 2002)
<p>Typy genetických markerov</p>	<ul style="list-style-type: none"> • <i>genetické polymorfné znaky</i> pri ktorých je, ale často aj nie je lokalizácia génov na chromozóme. Patria sem polymorfné bielkoviny, enzýmy, antigény a protilátky. • <i>molekulárno-genetické markery na úrovni DNA</i>, pri ktorých rozlišujeme kódujúce a nekódujúce sekvencie (Trakovická, 1999).

Uplatnenie genetických markerov v šľachtiteľských programoch je vzhľadom k ľahkosti ich určenia priamo z genómu jedinca veľmi široké. Markery môžu byť využité k akýmkoľvek identifikačným účelom, ak je overovaná totožnosť jedinca, pôvod, stanovená príslušnosť k určitej línii alebo sú identifikované produkty (Montaldo a Meza–Herrera, 1998).

Významá je predovšetkým možnosť sledovania premenlivosti a využívanie genetických markerov viazaných k príslušným génom zodpovedným za kvantitatívne znaky QTL (quantitative trait loci – lokusy kvantitatívnych znakov). Pokiaľ jeden alebo niekoľko týchto genetických markerov sú asociované s lokusmi pre kvantitatívne znaky (QTL), alebo s lokusmi pre ekonomicky významné znaky (ETL), môžu byť použité ako selekčné kritériá. Tento proces je označovaný ako selekcia s podporou markerov (MAS – Marker Assisted Selection) (Trakovická, 1999).

1.5 Selekcia s podporou markerov (MAS – Marker Assisted Selection)

Efekt MAS sa odhaduje predovšetkým počítačovými simuláciami a preto existuje iba niekoľko experimentálnych dôkazov využiteľnosti MAS u hospodárskych zvierat. Výsledky niekoľkých simulačných štúdií zaoberajúcimi sa MAS zverejnili Montaldo a Meza-Herrera (1998). Odhadovaný efekt MAS v porovnaní s efektom tradičných modelov bol v citovaných štúdiách odhadnutý na 2 – 64 %.

Flak (2002) uvádza, že prírastok genetického zisku pri použití MAS sa pohybuje od 2 do 30 %. Účinnosť a prospešnosť MAS je limitovaná počtom molekulárnych markerových lokusov, značnou potrebnou veľkosťou výberu pre detekciu QTL a výberovými chybami pri zostavení selekčného indexu.

Markerovo podporovaná selekcia sa uplatňuje predovšetkým pri úžitkových vlastnostiach s nízkym koeficientom heritability, ťažšie merateľnými, merateľnými v neskoršom veku a manifestovanými len u jedného pohlavia (Jakubec, 2002b).

Prínosom MAS je zvýšenie efektu selekcie oproti bežným selekčným programom. Zvyšuje sa presnosť odhadu súhrnnej plemennej hodnoty, pričom sa riziko predpovede znižuje. MAS nachádza uplatnenie aj v predselekcii mladých jedincov. Chybné haplotypovanie nezvyšuje riziko (efekt selekcie zostáva na úrovni tradičného selekčného programu) (Trakovická, 1999).

Tabuľka 2 Kritéria a postup MAS

Kritériá pre selekciu MAS	Markery pre MAS musia byť (Keatson et al., 1991): <ul style="list-style-type: none">ü Presne označenéü Vysoko polymorfnéü S presne známou fyzikálnou úlohouü Spoľahlivéü Zverejnenéü Heterozygotné
Postup MAS	<ul style="list-style-type: none">ü Vyhľadanie markeraü Konštrukcia mapy, z ktorej vyplýva sila väzby markera a QTLü Určenie podielu rozptylu QTLü Identifikácia zvierat s variantou markeru, ktorý je vo vzťahu s požadovaným prejavom znakuü Využitie vybraných zvierat v šľachtení (Příbyl, 1995).

1.6 Metódy detekcie genetických markerov

Hodnotiť genetické markery je možné celým radom molekulárno-genetických metód. Manipuláciu s nukleovými kyselinami uľahčuje existencia enzýmov, ktoré umožňujú špecifický zásah do ich štruktúry ale aj schopnosť hybridizácie ich reťazcov pri identifikácii špecifických nukleotidových sekvencií (Miluchová et al., 2009).

1.6.1 PCR (*Polymerase Chain Reaction – Polymerázová reťazová reakcia*)

Polymerázová reťazová reakcia (PCR – Polymerase Chain Reaction) je v súčasnosti jednou z najpoužívanějších techník v molekulárnej biológii a v molekulárnej genetike. Využíva sa na amplifikáciu t. j. namnoženie špecifických úsekov DNA pomocou enzymatickej syntézy in vitro (Pokorádi et al., 2005).

Analyzovaná DNA môže pochádzať z rôznych zdrojov, ako napríklad z kvapky zaschnutej krvi alebo z jedného ľudského vlasu. Metóda napodobňuje replikačný systém, ktorý existuje v každej bunke a realizuje sa pred bunkovým delením, keď dochádza ku zdvojeniu genetického materiálu (Bauerová et al., 2004).

Amplifikácia DNA v PCR je cyklický proces, v ktorom sa 20-40 krát opakujú tri kroky:

1. **denaturácia** dvojláčkovej chromozomálnej DNA – zahriatie DNA na 90 – 95 °C kedy dochádza k oddeleniu vlákien. Vo väčšine prípadov sa osvedčila denaturácia pri 94 °C jednu minútu, prípadne 95 °C 30 sekúnd. Vyššia teplota sa odporúča pre DNA s vyšším obsahom C-G párov.
2. **hybridizácia** (annealing) – pripájanie primerov, hybridizácia primerov s komplementárnou jednovláčkovou DNA. Teplota hybridizácie závisí od nukleotidového zloženia primerov, ich dĺžky a koncentrácie. Mala by byť približne o 5 – 10 °C nižšia ako teplota topenia hybridu primer-templát.
3. **polymerizácia** – syntéza nových vlákien DNA na matrici, predĺženie reťazca *Taq* polymerázou pomocou nukleotidov. Prebieha pri teplote 60 – 75 °C, optimum je 72 °C.

V prvom kroku denaturácie sa pôvodná dvojláčková molekula DNA denaturuje na jednotlivé vlákna DNA. Znížením teploty v závislosti od použitých primerov (špecifické nukleotidové sekvencie s dĺžkou 17-30 bp), sa tieto selektívne hybridizujú podľa princípu komplementarity báz s denaturovanou jednovláčkovou DNA. Primery svojou polohou vymedzujú amplifikovaný úsek na molekule DNA, druhý sa viaže na druhé komplementárne vlákno denaturovanej DNA. Termostabilná DNA polymeráza potom predlžuje obidva primery a syntetizuje nové vlákna DNA. V jednom cykle sa teda počet zdvojnásobí. V každom nasledujúcom cykle slúži pôvodný templát a podľa neho nasyntetizované kópie ako predlohy pre vznik ďalších produktov reakcie, ktoré pribúdajú geometrickým radom. Výsledkom je zmnoženie pôvodného počtu kópií cieľového úseku DNA 2^n krát. Skutočnosť však úplne nezodpovedá matematickému modelu, empiricky zistená efektívnosť cyklu sa pohybuje medzi 60 % až 85 % (Saiki et al., 1988).

Tabuľka 3 Základné zložky PCR pre úspešnú amplifikáciu

templátová DNA	slúži ako vzor pre syntézu nových reťazcov DNA
oligonukleotidové primery	vymedzujú úsek, ktorý má byť amplifikovaný
Taq polymeráza	syntetizuje novú DNA v smere 5'→3'
zmes štyroch voľných deoxynukleotidov (dNTP)	stavebné jednotky pre syntézu novej DNA
horčíkové ióny	spolu s dNTP vytvárajú substrát, ktorý rozpoznáva DNA polymeráza
pH pufor (TAE, TBE)	zabezpečuje optimálne podmienky pre aktivitu DNA polymerázy
deionizovaná voda	ultračistá voda
termocyklér	zabezpečuje optimálne podmienky pre proces PCR reakcie

Identifikácia produktov PCR

Najjednoduchší spôsob kvalitatívnej analýzy sa robí prostredníctvom elektroforézi v agarózovom geli obsahujúcom etídium bromid. Vizualizácia pod UV žiarením umožňuje prvú orientáciu (na základe dĺžky očakávaného produktu). Špecifitu produktu je možné ďalej potvrdiť reštrikčnou analýzou alebo hybridizáciou so špecifickou sondou (Southern blott), či už rádioaktívne, alebo nerádioaktívne značenou (biotín, digoxigenín) (Kwok et al., 1987; Mullis a Faloona, 1987).

Modifikácie PCR

Tabuľka 4 Variácie PCR a ich princíp

Alelovo špecifická PCR (<i>Amplification Refractory Mutation System</i>)	na detekciu mutácií využíva alelovo špecifické primery a alely sú detekované priamo elektroforetickým	(Dvořák. Vrtková, 2001)
--	---	-------------------------

	delením PCR produktov	
RAPD <i>(Random Amplified Polymorphic DNA)</i>	založená na amplifikácii oblasti genómu použitím krátkych primerov	(Williams et al., 1990)
AFLP <i>(Amplified Fragment Length Polymorphism)</i>	detekcia DNA reštrikčných fragmentov PCR amplifikáciou, prebiehajúcou za pomoci ligácie sekvencií na konci reštrikčného miesta	(Knoll, Urban, 2002)
PCR v reálnom čase <i>(Real-Time PCR)</i>	sledovanie PCR reakcie v reálnom čase na základe sledovania intenzity fluorescenčného signálu	(Knoll, Urban, 2002)
Multiplex PCR	testovanie delécií a bodových mutácií v jednej amplifikačnej reakcii a v jednom elektroforetickom delení v agaróze	(Abbs et al., 1991)

1.6.2 PCR-RFLP

PCR – RFLP predstavuje kombináciu dvoch metód, ktorú po prvý krát popísal Bolstein et al., (1980). Metóda umožňuje detekciu mutácií v amplifikovanej DNA. Na rozdiel od klasickej RFLP sa však vhodným reštrikčným enzýmom štiepi len relatívne krátky úsek DNA – PCR produkt. Získané fragmenty, ktorých veľkosť a počet závisí od prítomnosti resp. neprítomnosti štiepneho miesta sa vizualizujú elektroforeticky (Miluchová et al., 2009).

Výhodou metódy je jej nenáročnosť a možnosť určenia miesta mutácie. Avšak nevýhodou je to, že pravdepodobnosť detekcie mutácie je relatívne nízka nakoľko závisí na počte použitých enzýmov. Podstata metódy spočíva v prvotnom namnožení (naamplifikovaní) dostatočného množstva PCR produktu, ktorý je skúmaný na prítomnosť mutácie a následnom poštiepení pomocou reštrikčnej endonukleázy, ktorá je schopná na základe špecifického rozpoznávacieho miesta poštiepiť respektíve v prípade neprítomnosti nepoštiepiť nasyntetizovaný PCR produkt. Výsledné fragmenty sa nazývajú štiepne produkty a ich veľkosť charakterizuje prítomnosť jednotlivých alel, ktoré sa líšia prítomnosťou hľadanej mutácie (Gábor, 2009).

1.6.3 Elektroforéza

Elektroforéza (skratka ELFO) využíva schopnosť nukleových kyselín putovať ku kladne nabitému pólu, t.j. k anóde. Elektroforéza prebieha v elektroforetickej aparátúre v gélovitých roztokoch., ktoré vytvárajú sieťovitú štruktúru a tým rozdeľujú molekuly odlišujúce sa tvarom a veľkosťou. Priamka v ktorej sa pohybujú DNA fragmenty od katódy k anóde pochádzajúce z jednej vzorky sa nazýva *dráha* a v nej sú jednotlivé DNA fragmenty viditeľné ako pružky. V prvej alebo v poslednej dráhe sú spravidla štandardy molekulových hmotností (tzv. DNA ladder), v ktorých sa separujú presne veľkostne definované DNA fragmenty umožňujúce odhadnúť neznáme veľkosti DNA fragmentov vo zvyšných dráhach. Keďže samotná DNA je počas separácie v gély neviditeľná, je potrebné urobiť vizualizáciu (www.bioweb.genezis.eu).

1.7 Kandidátne gény ovplyvňujúce reprodukciu ošípaných

Kandidátne gény sú gény (úseky molekúl DNA), pri ktorých je známy polymorfizmus (výskyt viacerých alel v populácii), a ktorých primárny produkt (hormón, proteín) sa nejakým spôsobom podieľa na prejave úžitkového znaku (Dvořák, Vrtková, 2001).

Pri šľachtení ošípaných pre optimálne reprodukčné vlastnosti sa do popredia dostáva celý rad génov, ktorých produkty tieto vlastnosti ovplyvňujú. Patria sem napr. gény pre hormóny a ich receptory, enzými, gény s regulačnou funkciou.

Ak je v oblasti QTL zistený gén ovplyvňujúci výraznou mierou určitú vlastnosť a jeho produkt sa prejaví vo výslednom fenotype, podieľa sa na fenotypovej variabilite, označuje sa tento gén ako kandidátny. Takýto gén má potenciálne veľký účinok na úžitkový znak. Kandidátny gén môže byť identifikovaný na základe databázy pre modelové zvieratá, kde už bol preštudovaný výskyt podobného fenotypu. Ak je kandidátny gén identifikovaný, je možné nájsť informácie o jeho funkcii. Môže byť skúmaný sekvenovaním a ak je nájdená mutácia urobí sa asociačná analýza (Berg, 2006).

Pri výbere kandidátnych génov sa vychádza (Knoll, 1998):

- zo známej fyziologickej a biochemickej funkcie génu
- z predpokladu, že ak poznáme účinok génu u jedného cicavčieho druhu, možno predpokladať obdobný účinok i pri inom druhu

Analýza kandidátnych génov môže byť prevedená iba v populácii, v ktorej sa nepredpokladá výskyt hlavného génu, ale výskyt QTL. Podľa Geldermanna (1996) je QTL taký mendelovsky lokus, kde jeho varianty na základe rozdielnych alel majú staticky signifikantný vplyv na fenotypový prejav určitého znaku či vlastnosti. Pokiaľ sa na chromozóme vyskytuje QTL, na ktorom bol identifikovaný kandidátny gén, sú priamo v tomto géne alebo v jeho bezprostrednej blízkosti vyhľadávané mutácie. Analýzou mikrosatelitných polymorfných genetických markerov a analýzou vzťahov medzi genotypom a fenotypom u vytvorených referenčných rodín boli získané informácie o tom, či určitý úsek chromozómu obsahuje QTL. Významné sú tiež gény, ktoré môžu predstavovať genetický marker vo väzbe s jedným z kandidátnych génov pre reprodukciu.

Génové štúdie u ošípaných identifikovali niekoľko QTL pre reprodukčné ukazovatele na rôznych chromozómoch. Rathje et al., (1997) sledovali 55 mikrosatelitov v F2 populácii ošípaných rozdelených na línie s vyššou a nižšou reprodukciou a identifikovali QTL pre ovulačný pomer na chromozóme 8. Bol zistený výskyt QTL na chromozóme 4, 13 a 15 ovplyvňujúci ovulačný pomer.

Multigeneračný experiment krížencov meishan (M) a large white (LW) odhalil QTL ovplyvňujúci vek pri prvej ruji na chromozóme 1 a 10. Počas týchto štúdií bol identifikovaný ďalší QTL na 8. chromozóme a to pre kapacitu maternice (Rohrer et al., 1999). U experimentálnej línie (meishan x dutch pig línie) boli objavené QTL pre počet strukov na chromozóme č. 2, 10 a 12 (Hirooka et al., 2001). Rotchild (1998) upozorňuje na QTL pre reprodukciu lokalizované na chromozómoch 4, 6, 7 a 8. V rovnakom roku preukázali Paszek et al., (1998) výskyt QTL spojených s počtom živo narodených ciciakov na chromozóme č. 4, s počtom ovulovaných vajíčok na chromozóme č. 8 a s dĺžkou gravidity na chromozóme č. 9.

V súčasnej dobe sa robí intenzívny výskum génov, ktorých produkty sú spojené s reprodukciou. Predovšetkým sa jedná o gén estrogénového receptora, hormónu FSH, prolaktínu, prolaktínového receptora, leptínu a leptínového receptora (Goliašová a Wolf, 2004).

Tabuľka 5 Prehľad vybraných génov ovplyvňujúcich reprodukciu ošípaných

Gén	charakteristika	lokalizácia na chromozóme	Knoll, Vykoukalová, 2002
ESR	veľkosť vrhu	1. p2.5-2.4	
FSHB	vývoj folikul a kvalita spermíí	2 p1.6-p1.2	
PRLR	veľkosť vrhu	16q1.4 alebo 16q2.2-2.3	
FOSB	materské chovanie prasníc	6q2.1	
CYP21	plodnosť	7	

1.7.1 Estrogénový receptor

Pri štúdiu tzv. kandidátnych génov, u ktorých sa predpokladá možný vplyv na reprodukčné vlastnosti, bol odhalený výrazný účinok génu pre estrogénový receptor (*ESR*) na plodnosť ošípaných. Gén pre *ESR* je lokalizovaný na chromozóme č. 1. Jeho expresiou vzniká proteín a ten umožňuje pôsobenie samičích pohlavných hormónov – estrogénov v bunkách cieľových tkanív (Omelka et al., 2001).

Gén pre estrogénový receptor (*ESR*) kóduje proteín patriaci ku skupine transkripčných faktorov, ktorý sprostredkováva pôsobenie samičích pohlavných hormónov estrogénov v rôznych tkanivách mozgu, mliečnej žľazy a reprodukčných orgánov. Polymorfizmy *ESR* génu u ošípanej ovplyvňujú plodnosť – počet narodených mláďat vo vrhu (Bauerová et al., 2004).

Do buniek cieľových tkanív sa estrogény dostávajú prostredníctvom lipofilných zložiek membrány a väzbou na receptory ovplyvňujú expresiu cieľových génov v bunkovom jadre (Brinkmann, 1994).

Receptory steroidných hormónov sú za neprítomnosti hormónov inaktívne. Väzba hormónu na receptor vyvolá sériu konformačných zmien receptorov a disociáciu týchto proteínov (Brinkmann, 1994). Dôsledkom týchto zmien je špecifická väzba na palindromické DNA sekvencie HRE – hormon responsive elements (v prípade estrogénového receptoru ERE – estrogen responsive elements). Komplex hormón-receptor rozpoznáva DNA sekvenciu upstream od transkripčného štartu a vyvoláva

transkripciu génov obsahujúcich HRE (Driscoll et al., 1998). Aktivácia receptoru vyžaduje pôsobenie koaktivátorov transkripcie, ktoré ovládajú aktivitu histónovej acetyltransferázy a spôsobujú zmeny chromatínu nutné k zapnutiu iniciácie transkripcie (Hoffman a Schuler, 2000).

Estrogénový receptor je polypeptid zložený z 595 aminokyselín s doménami A, B, C, D, E a F (Bokenkamp et al., 1994). Je translačným produktom génu estrogénového receptora (*ESR*) obsahujúceho 8 exónov. Bokenkamp et al., (1994) nezaznamenal u estrogénového receptora ošípanej žiadne post-translačné modifikácie.

V ováriách ošípanej sú exprimované obidva typy estrogénového receptoru. Slomczynska a Wozniak (2001) našli s využitím protilátok väčší výskyt ER β ako ER α . ER β bol exprimovaný cyklicky vo všetkých typoch folikul, jeho expresia sa znížila v žltých telieskach po jeho regresii. ER α bol zistený iba vo veľkých folikuloch pred ovuláciou a v skorých štádiách žltých teliesok.

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

1.7.2 Estrogény a ich funkcia v organizme

Estrogény sú pohlavné steroidné hormóny cicavcov. Ich názov je odvodený od ovulačného cyklu, v ktorom hrajú dôležitú úlohu. Najdôležitejšími estrogénmi u domácich zvierat sú 17 β estradiol a estron. Estrogény sú produkované predovšetkým dozrievajúcimi terciálnymi folikulami (granulóznymi bunkami a bunkami theca folliculi interna), ku koncu gravidity placentou, žltými telieskami, kôrou nadobličiek, bunkami intersticia a mozgu (Reece, 1998; Bayer, 1999). Syntetizované estrogény sú odvádzané krvou, približne 60 % estrogénov sa viaže na albumín a asi 38 % na glykoprotein SHBG (Sex hormone-binding globulin). Všeobecne sa akceptuje, že iba voľná frakcia estradiolu je schopná preniknúť do buniek a uplatniť svoje biologické účinky (Smith, 1999).

Estrogény podmieňujú rast a vývoj samičích pohlavných orgánov, vo folikulárnej fáze vaječníkov podporujú delenie buniek sliznice maternice a zvyšujú jej motoriku, stimulujú rast a sekrečnú aktivitu žliaz endometria, podporujú delenie buniek vaginálneho epitelu a rohovatenie ich povrchovej vrstvy a stimulujú rast vajcovodov. Na konci folikulárnej fázy vaječníkov sa vplyvom estrogénov rozširuje kanál krčka

maternice. Estrogény navodzujú sexuálne chovanie, stimulujú rast vývodných ciest mliečnej žľazy a ovplyvňujú ukončenie rastu dlhých kostí (Reece, 1998).

Estrogény hrajú dôležitú úlohu vo folikulárnom vývoji a zrení oocytov (Sundarrajan et al., 1999), vplyv estrogénov na vývoj folikulu je úzko spojený s účinkami FSH a LH. Pod vplyvom LH sú bunkami theca folliculi interna produkované androgény, ktoré difundujú do granulóznych buniek. FSH pôsobí na aromatizáciu androgénov na estrogény a podporuje tvorbu FSH a LH receptorov na granulóznych bunkách (Sundarrajan et al., 1999).

Estrogény pôsobia na vývoj sekundárnych pohlavných znakov za embryonálneho a fetálneho vývoja, ovplyvňujú reprodukčný cyklus, plodnosť a udržiavanie gravidity (George a Wilson, 1988, cit. Sundarrajan et al., 1999). Prítomnosť estrogénov 9. a 10. deň mení maternicový epitel, ktorý je pokrytý glykokalyxom (Geisert et al., 1990). V období medzi 11. a 12. dňom gravidity dochádza k rýchlemu predlžovaniu trofoblastu zárodka, čo je dôležité pre tvorbu placentárneho spojenia a vymedzenia priestoru pre každé embryo a tiež pre transport syntetizovaných estrogénov do uteru (Pomp a Geisert, 1998). V tejto dobe dochádza k výraznému zvýšeniu syntézy estrogénov zárodkom (Geisert et al., 1990). Nerovnomerný vývoj blastocyst v tomto období prispieva k následným embryonálnym stratám v dôsledku súťaženia o obmedzený uterinný priestor nutný pre placentáciu. Podľa Popeho (1994) je vysoká nesynchronnosť vo vývoji embryí v preimplantačnom období zodpovedná u amerických a európskych plemien za 30 – 40 % strát.

Po dokončení elongácie trofoblastu sekrécia dramaticky klesá a druhého vrcholu dosahuje v 16. dni gravidity. Dvojfázové uvoľňovanie estrogénu zárodkom je dôležité pre zachovanie funkčnosti žltého telieska (Pomp a Geisert, 1998).

Estrogény tvorené zárodkom sa viažu na sliznicu maternice. Geisert et al., (1990) poukázali, že sa u gravidných a jalových prasníc nelíši počet miest na endometriu, kde sa nachádzajú receptory pre väzbu estrogénov. V oboch prípadoch stúpa absolútny počet týchto receptorov do 5. dňa a zostáva zvýšený aj napriek klesajúcej koncentrácii estrogénov až do 15. dňa. U gravidných prasníc dochádza k druhému nárastu počtu receptorov po 15. dni gravidity, u jalových prasníc sa tento nárast už neobjavuje.

Estrogény ovplyvňujú transkripciu génov pre oxytocín a oxytocínový receptor (Ivell a Walther, 1999). Pri ruji a ku koncu gravidity inhibíciou enzýmov histaminázy a

cholinesterázy zabraňujú inaktivácii histamínu a acetylcholinu, ktoré spôsobia opuchnutie pohlavných orgánov.

1.7.3 Polymorfizmus génu estrogénového receptoru

Polymorfizmus (z gréckeho poly „mnoho“ a morph „forma, tvar“) môže byť definovaný ako „výskyt dvoch a viac foriem či variant znakov v takom počte, že tá vzácnejšia varianta nemôže byť spôsobená samotnou náhodnou mutáciou (Ford, 1940).

O polymorfizme môžeme hovoriť vtedy, ak je výskyt menej početnej alely v populácii aspoň 1 % (Kwok, 2003).

Rohrer et al., (1996) lokalizovali estrogénový receptor α na 1. chromozóme v oblasti 1p24-25.

V géne boli identifikované tri polymorfne miesta detekovateľné reštrikčnými enzýmami *AvaI*, *MspAI* a *PvuII*. K testovaniu polymorfizmu *PvuII* u veľkého počtu zvierat rozpracoval Rothschild et al., (1995) genetický test založený na kombinácii PCR a polymorfizmu reštrikčných fragmentov (RFLP). Modifikovanú metodiku pomocou PCR-RFLP popísal Short et al., (1997).

Ďalšie dva polymorfizmy na 3' konci kódujúceho regiónu (exon 8) popísal Drögemüller et al., (1997). Pomocou metódy PCR-RFLP s použitím reštrikčných endonukleáz *AvaI* a *MspAII* zistili dve mutácie na pozícii 1665 (T-C mutácia – *AvaI*) a na pozícii 1754 (A-G mutácia *MspAII*).

Dvořák a Vrtková (2001) robili testovanie genotypov génu *ESR* u plemien biela ušľachtilá a landras. Zverejnili získané frekvencie jednotlivých genotypov vo vybraných populáciách oboch plemien: u plemena biela ušľachtilá CC 43,2 %, CD 44,2 % a DD 12,6 % (frekvencia alely D 0,35), u plemena landras: CC 82,4 %, CD 16,5 % a DD 1,1 % (frekvencia alely D 0,09).

Kmiec et al., (2002) študovali vzťah estrogénového receptoru na reprodukčné vlastností prasníc plemena polish landrace. Polymorfizmus *ESR* génu stanovili metódou PCR-RFLP. Ako reštrikčný enzým použili *PvuII*. Frekvencia genotypu AA bola 0,8837, genotypu AB 0,1163 a genotyp BB nebol detekovaný. U alely A bola zistená výrazne vyššia frekvencia (0,9419), ako u alely B (0,0581).

Tóthová et al., (2002) previedli analýzu polymorfizmu génu *ESR* u prasníc slovenskej populácie plemena large white a podarilo sa im stanoviť nasledovné frekvencie genotypov: 26,81 % CC, 50,32 % CD a 22,87 % DD (Omelka, 2003).

Goliášová a Wolf (2004) zisťovali frekvencie genotypov a alel *ESR* u plemenníc biela ušľachtilá a landras. Použitím reštrikčného enzýmu *PvuII* dospela k nasledujúcim výsledkom: u plemena biela ušľachtilá bolo percentuálne zastúpenie genotypu AA 24,24 %, genotypu AB 46,84 % a genotypu BB 28,91 %. Frekvencia alely A bola 0,477 a alely B 0,523. U plemena landras bol genotyp AA zastúpený 93,30 %, genotyp AB 6,70 % a genotyp BB nebol zistený. Frekvencia alely A bola 0,967 a alely B 0,033.

Terman et al., (2006) zisťovali frekvencie *ESR/AvaI* genotypov a alel. U prevažnej väčšiny sledovaných plemien zistili jednoznačne vyššiu frekvenciu genotypu AA oproti genotypu AB a genotyp BB bol zastúpený najnižšou frekvenciou. U plemien pietrain a polish syntetic line dokonca genotyp BB nebol ani zistený.

Santana et al., (2006) sledovali populáciu pozostávajúcu z 362 ks plemena landras, 331 ks plemena large white a 136 ks plemena pietrain. U plemena landras bol najfrekventovanejší genotyp AA 0,6547. Genotyp AB mal frekvenciu 0,3094 a najmenšiu frekvenciu mal genotyp BB 0,0359. Alela A mala výrazne vyššiu frekvenciu (0,8094) oproti alele B (0,1906). U plemena large white boli frekvencie genotypov AA a AB veľmi podobné (0,4562 a 0,4532). U plemena pietrain bol detekovaný len genotyp AA.

1.7.4 Vzťah génu ESR k úžitkovosti a fyziologickým znakom reprodukcie

Existuje mnoho štúdií potvrdzujúcich významný efekt *ESR* génu nielen na početnosť vrhu, ale aj na ďalšie reprodukčné ukazovatele. Výsledky jednotlivých štúdií sú však často protikladné. Nejednotnosťou výsledku sa zaberá napr. Alfonso (2005).

Van Rens et al., (2000) u 79 prasníc syntetickej línie meishan x landras nezistili žiadne rozdiely v počte žltých teliesok, ani v počte vitálnych 35 – 36 denných embryí. Rozdielna bola veľkosť placenty – embrya prasníc s genotypom BB mali väčšiu placentu v porovnaní s placentou embryí prasníc s genotypom AA. Tieto poznatky viedli autorov k záveru, že rozdiely v počte narodených prasiatok sú závislé na mortalite plodov prasníc rôznych genotypov *ESR*. Zatiaľ čo počet žltých teliesok a prežiteľnosť embryí bola pre homozygotné genotypy rovnaká, percento implantačných miest bolo vyššie u prasníc s genotypom AA. Tento poznatok viedol k domnienke, že embryonálna mortalita je vyššia u prasníc genotypu BB. Autori ďalej zistili, že rozdielne genotypy

nemajú vplyv na dĺžku estru, parametre hladín lutropínu, estradiolu a progesteronu, hmotnosť ovarií ani na hmotnosť a dĺžku embryí.

Leeds et al., (2002) analyzovali vzťah *ESR* k počtu strukov, individuálnej pôrodnej hmotnosti prasiatok, hmotnosti vrhu pri odstave, priemernému dennému prírastku a výške chrbtového tuku u 724 prasničiek a kančiekov plemien large white, yorkshire a ich recipročných kombinácií. *ESR* genotyp mal preukázaný vplyv na výšku chrbtového tuku, ktorý bol u zvierat s jednou kópiou alely B o 0,155 cm vyšší. Efekt *ESR* na individuálnu hmotnosť prasiat bol blízko tejto hladiny preukaznosti.

Vplyvom *ESR* génu na hmotnosť vrhu sa zaoberal Isler et al., (2002), ktorý sledovaním 46 samíc plemena yorkshire, 31 large white a 70 krížencov týchto dvoch plemien zistil, že *ESR* gén je významne asociovaný aj s celkovou hmotnosťou vrhu a celkovou hmotnosťou živo narodených prasiat. Pri genotype AA bola výrazne väčšia hmotnosť vrhu ako pri genotype BB.

Noguera et al., (2003) u 287 prasnic dvoch línií landrase v Španielsku našiel obidve alely *ESR-PvuII* vrátane prasnic genotypov BB. Nájdenny polymorfizmus preukázane neovplyvňoval hodnotené vlastnosti veľkosti vrhu.

Omelka (2003) našiel u menších súborov plemena biele ušľachtilé preukazné rozdiely počtu všetkých narodených prasiatok medzi prasnicami genotypu AB a AA, s vyššou úžitkovosťou u prasnic genotypu AB. U plemena landrase bola pozorovaná u všetkých reprodukčných ukazovateľov vyššia úžitkovosť prasnic genotypu AB. Je však treba poznamenať, že početnosť vyhodnocovaných vrhov u zvierat genotypu AB bola ale relatívne nízka ($n = 88$) v porovnaní s početnosťou vrhov prasnic genotypu AA ($n = 447$).

Štúdiom *ESR2* génu sa zaoberali Muñoz et al., (2004). Cieľom štúdia bolo lokalizovať polohu *ESR2* génu vo fyzickej mape ošípaných a identifikovať polymorfizmy tohto génu, ktoré majú vplyv na veľkosť vrhu u dvoch populácií plemena iberian. Väčšina *ESR2* cDNA bola sekvenovaná zo vzoriek RNA vaječníkov ošípaných. Bol objavený jeden A/G SNP (single nucleotide polymorphism) v exóne 5, ktorý je asociovaný so substitúciou Met/Val v pozícii 949. Tento SNP bol analyzovaný pomocou PCR-RFLP (*Hsp92II*) a jeho možný efekt na veľkosť vrhu bol hodnotený u dvoch populácií plemena iberian. Štatisticky preukázateľný vplyv tohoto polymorfizmu na veľkosť vrhu však nebol dokázaný.

Goliášová a Wolf (2004) hodnotili vplyv polymorfizmu *PvuII* estrogénového receptora na veľkosť vrhu a znaky produkcie ošípaných pri plemene česká large white.

Estrogénový receptor (*ESR*) významne ovplyvnil výskyt potratov v prvom vrhu a priemerne aj u ďalších vrhov ($P > 0,05$) u prasníc s výskytom alely B. U prasníc genotypu AA bolo zistených približne o 0,55 viac živo narodených prasiatok ako u prasníc genotypu BB. V priemere u všetkých testovaných prasníc bol tento rozdiel 0,25 prasiatok. Výsledky celkového počtu živo narodených prasiatok a odchovaných prasiatok boli podobné.

Horogh et al., (2005) analyzovali 869 vrhov od 226 jedincov plemena hungarian large white s cieľom určiť možnosť použitia génu pre *ESR* ako markera na zlepšenie veľkosti vrhu. Prvé, druhé a neskoršie vrhy boli hodnotené oddelene. Boli vyčíslené frekvencie pre dve *ESR* alely A = 0,55 a B = 0,45 zistili nasledovné pozorované / očakávané hodnoty troch genotypov: AA: 71/69,1; AB: 108/111,8 a BB: 47/45,1. V prvých a neskorších vrhoch bol genotyp BB nadradený genotypom AB a AA pre počet živo narodených (number born alive, NBA) a celkový počet narodených (total number of born, TNB).

Omelka et al., (2005) skúmali vplyv estrogénového receptora (*ESR*) na celkový počet narodených (TNB), počet živo narodených (NBA) a počet odchovaných (SZ) prasiatok plemena large white (LW), white meaty (WM) a landrace (L) od šiestich slovenských chovateľských staníc. Detekcia *ESR* (*PVUII*) genotypov bola vykonaná metódou PCR-RFLP. Našli významný vplyv *ESR* lokusu na NW ($P \leq 0,01$) v LW však pozorovali negatívny vplyv genotypu BB na znak. Vo WM boli nájdené pozitívne asociované alely B s TNB, NBA a NW, ale rozdiely neboli štatisticky potvrdené. Veľmi významný vplyv *ESR* lokusu na TNB, NBA a NW ($P \leq 0,01$) bol zistený len v chove LW. Našli nárast o $+ 0,62 \pm 0,18$ (TNB), $+ 0,65 \pm 0,18$ (NBA) a $+ 0,51 \pm 0,16$ (SZ) u ošípaných s alelou B.

Cieľom štúdie Kaminského et al., (2003) bolo vyhodnotiť prípadné vzťahy medzi *ESR* / *AvaI* polymorfizmu so znakmi jatočného teľa u kancov plemena polish large white. Použili 103 kancov pochádzajúcich z jedného stáda. Genotypy boli stanovené metódou PCR-RFLP. Pomocou testu Duncan zistili významné rozdiely ($P < 0,01$) medzi WW a MW genotypmi, ako aj významné rozdiely medzi WW a MM genotypmi pri mäsitosti. Pre priemerný denný prírastok významné rozdiely zistené neboli.

Zhen Fang et al., (2006) študoval potenciálne využitie génu estrogénového receptora (*ESR*) ako genetického markeru s cieľom zlepšiť reprodukčné vlastnosti ošípaných. Sledované bolo plemeno landrace v Číne. U 612 prasníc bolo hodnotených

2239 vrhov. Samostatne boli sledované údaje o prvom, druhom a neskorších vrhoch. Účinky *ESR* rôznych vrhov neboli rovnaké. Autor v súhrne skonštatoval, že prasnice s genotypom BB ukázali lepší výkon na celkový počet narodených prasiatok a počet živo narodených prasiatok, ale nižšie priemerné hmotnosti prasiatok pri narodení. Urobili záver, že *ESR* by mohol byť použitý ako indikátor pre výber veľkosti vrhu v populácii landras.

Humpolíček et al., (2007) sledoval asociácie medzi *ESR* a reprodukčnými znakmi. Od 246 prasníc plemena large white, ktoré pochádzali z elitného chovu, nazbieral informácie o 915 vrhoch. Veľkosť vrhu sledoval u prvého, druhého a prvého až šiesteho vrhu. Medzi genotypmi AB a AA nebol na 1. a 1.- 6. vrhu zistený žiadny významný vplyv. Naopak v druhom vrhu bol zistený vplyv na počet všetkých a živo narodených aj na počet dochovaných prasiatok.

Rempel et al., (2010) testoval pridružené kandidátne SNP s reprodukčnými vlastnosťami prasníc plemena landras-duroc-yorkshire kompozitnej populácie. *ESR1*, *ESR2*, PPAR gama koaktivátor 1 a IGFBP3 SNP boli významne spojené s oddialením intervalu ruje a s počtom mŕtvo narodených prasiatok. Mnohé zo SNP analyzovaných v tejto štúdii sú z génov zapojených v regulácii metabolizmu, čo naznačuje, že existuje významná súvislosť medzi fyziologickými udalosťami spojenými s reprodukciou. Okrem toho môže táto produkcia a rast črty SNP slúžiť na pomoc pri výbere mladých prasničiek pre vynikajúcu reprodukčnú schopnosť.

2 Cieľ práce

Cieľom predkladanej diplomovej práce je:

1. sústrediť literárne informácie o polymorfizme vybraného kandidátneho génu *ESR* a jeho vzťahu k reprodukčným ukazovateľom úžitkovosti ošípaných
2. optimalizovať podmienky PCR – RFLP metódy pre analýzu vybraného kandidátneho génu (*ESR*)
3. identifikovať polymorfizmus génu *ESR* metódou PCR-RFLP
4. vyhodnotiť genotypovú štruktúru sledovanej populácie ošípaných

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Biologický materiál

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

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

Plemenné zloženie a počty ošípaných testovaných plemien:

biela ušľachtilá (BU) - 51

biela ušľachtilá x landras (BUxL) - 38

landras x biela ušľachtilá (LxBU) - 47

duroc (D) - 75

3.1.1 Charakteristika plemien

Biela ušľachtilá (BU)

Plemeno biela ušľachtilá je stredného až väčšieho telesného rámca, pokožka je nepigmentovaná a vyrastajú z nej biele štetiny. Hlava je strednej veľkosti, ľahká a suchá, uši sú vzpriamené, krk je dostatočne osvalený, chrbát je široký mierne oblúkovitý až rovný, končatiny pevné a suché. Je kombinovaného až mäsového úžitkového typu. Kance v dospelosti dosahujú hmotnosť 300 – 320 kg, prasnice 220 – 250 kg.

Plemeno BU dosiahlo na Slovensku tieto reprodukčné parametre: 10,8 ks všetkých narodených prasiat, 9,4 ks dochovaných prasiat pri hmotnosti vrhu v 21. dňoch

(mliekovosti) 53,4 kg a pôrodnosti 2,05. V mäsovej úžitkovosti plemeno BU dosahuje nasledovné parametre: 48,5 % cenných mäsových častí (CMČ), hrúbka slaniny 2,33 cm a percento mäsa zo stehna z hmotnosti jatočnej polovičky 18,92.

Landras (L)

Slovenský landras vznikol na základe importovaného plemena landras z Poľska, Kanady a Švédska v rokoch 1961 – 1966. Je typický bielym sfarbením, ľahkou hlavou, uši sú sklopené, telesný rámec je stredný až veľký s typickým lichobežníkovým trupom. Živá hmotnosť dospelých kancov je 270 – 290 kg, výška v kohútiku u kancov 85 – 90 cm. U prasníc sa živá hmotnosť pohybuje v rozmedzí 230 – 250 kg, výška v kohútiku 80 – 85 cm, dlhé a veľmi dobre osvalené stredotrupie. Je to plemeno reprodukčné až univerzálne.

Dosiahnuté reprodukčné a produkčné vlastnosti: 9,5 dochovaných prasiat na prasnicu, 18,7 prasiat do roka pri počte vrhov 1,93 a mliekovosti 53,6 kg. V mäsovej úžitkovosti plemeno L dosahuje nasledovné parametre: podiel CMČ 50 %, hrúbka slaniny 2,37 cm a percento mäsa v stehne z hmotnosti jatočnej polovičky 18,93 %.

Duroc (DU)

Je to univerzálne plemeno s genetickou a fenotypovou variabilitou od kombinovaného až po úžitkový typ. Plemeno je charakteristické hrdzavočerveným sfarbením, hlava je pomerne ľahká, krátka s výrazne čiernou pigmentovanou sliznicou rypáka, uši sú polosklopené, chrbtová línia, stehno a mäsové partie sú dobre vyvinuté. Dosahujú 50 – 53 % CMČ a hrúbku slaniny 1,67 cm.

3.2 Chemikálie, roztoky a ich príprava

3.2.1 Použité chemikálie

Tabuľka 6 Použité chemikálie

EDTA Kyselina etyléndiamíntetraoctová, $C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2 H_2O$	$M = 372,24 \text{ g/mol}$
Tris Hydroxymethyl – aminomethane, $C_4H_{11}NO_3$	$M = 121,14 \text{ g/mol}$
SDS Sodná soľ dodecylsulfátu, $C_{12}H_{25}O_4S \cdot Na$	$M = 288,4 \text{ g/mol}$
Chlorid amonný NH_4Cl	$M = 53,49 \text{ g/mol}$
Hydrogénuhličitan draselný $KHCO_3$	$M = 262,89 \text{ g/mol}$
Octan amonný $C_2H_7O_2$	$M = 77,08 \text{ g/mol}$

3.2.2 Použité roztoky

Roztok na lýzu červených krviniek - 5x RBC roztok

Zloženie:	250 ml
0.77 M NH_4Cl	10,2968 g
0.046 M $KHCO_3$	1,1514 g

0.01 M EDTA pH 8.0

5 ml 0,5M EDTA

Sterilizované filtráciou.

Použili sme 1x RBC

Lyzačný roztok

Zloženie:

100ml

50 mM Tris-HCl pH 8,0

5 ml 1 M Tris-HCl pH 8,0

100 mM EDTA pH 8,0

20 ml 0.5 M EDTA pH 8,0

100 mM NaCl

2 ml 5 M NaCl

1% SDS

10 ml 10% SDS

H₂O MiliQ

do 100 ml

Roztok na precipitáciu proteínov:

Zloženie:

10 M octan amónny

Roztok na rozpúšťanie DNA:

Zloženie:

10 mM Tris- HCl pH 8,5

Roztok pre elektroforézu:

Zloženie:

50 x TAE

Pre elektroforézu sme použili 1 x TAE.

3.2.3 Príprava roztokov

EDTA 0,5 M pH 8,0

Di-natrium EDTA x 2 H₂O

93,05 g

Pridať H₂O

400 ml

Upraviť na pH 8,0 konc. NaOH

10 g

H₂O

doplniť do 500 ml

EDTA 0,01M pH 8,0

Nariedené z 0,5M EDTA.

Tris-HCl 1M pH 7,5

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

Tris-HCl 1M pH 8,0

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

Etídium bromid

Ethidiumbromid	1 g
H ₂ O	100 ml

Etanol 70 %

96 % etanol	87,5 ml
H ₂ O	30 ml

Izopropanol 100 %

100% izopropanol (2-propanol)

10 x TBE

0.5 M EDTA pH 8.0	40 ml
Kyselina bórová	55 g
Tris	108 g

3.3 Prístrojové vybavenie

Pri izolácií DNA a PCR-RFLP sme použili nasledovné prístroje:

- analytické váhy, centrifuga, elektroforéza, pipety, spektrofotometer, vodný kúpeľ, vortex, termostat, termocykler, UV transiluminátor.

3.4 Použité metódy

3.4.1 Izolácia genómovej DNA z krvi

Lýza buniek

1. Rozmrazenú krv sme premiešali pipetou a napipetovali 500 μ l celkovej krvi do 1,5 ml eppendorfky s 1000 μ l 1x RBC roztokom. Inkubovali sme vzorku 1-3 minúty pri laboratórnej teplote a premiešali 3 x obracáním hore dnom.
2. Eppendorfky sme centrifugovali pri 13 000 otáčkach 2 min. Odstránili sme supernatant, ale nechali 10-20 μ l roztoku nad peletom bielych krviniek.
3. Vzorky sme vortexovali 10-20 sekúnd. Po vortexovaní by pelet bielych krviniek nemal byť viditeľný
4. Pridali sme 600 μ l lyzačného roztoku a pipetovaním hore a dole 3-5 krát sme lyzovali bunky. Obyčajne nie je potrebná inkubácia, avšak v niektorých vzorkách, v ktorých bolo vidieť zhluky buniek po premiešaní, sme inkubovali pri 37 °C vo vodnom kúpeli pokiaľ nebol roztok homogénny.

Precipitácia (zrážanie) proteínov

1. Vzorky sme ochladili na laboratórnu teplotu.
2. K lyzovaným vzorkám sme pridali 200 μ l roztoku na precipitáciu proteínov.
3. Vortexovali sme pri najvyššej rýchlosti 20 sekúnd, aby sa roztok na precipitátu proteínov dôkladne premiešal s bunkovým lyzátom.
4. Vzorky sme centrifugovali pri maximálnych otáčkach (13 000) pri teplote 20-25 °C 20 minút. Precipitované proteíny vytvorili pevný tmavo-hnedý pelet na dne eppendorfky. Ak nebolo vidieť na dne eppendorfiek proteínový pelet, zopakovali sme krok 3, inkubovali vzorku 5 minút na ľade a potom zopakovali krok 4.

Precipitácia DNA

1. Supernatant obsahujúci DNA sme odliali (pelet precipitovaných proteínov zostal v eppendorfke) do čistej 1,5 ml eppendorfky obsahujúcej 600 μ l 100 % izopropanolu (2-propanol).
2. Vzorky sme premiešali obratením 50-krát.
3. Centrifugovali sme ich pri 13 000 otáčkach 5 min. DNA bolo viditeľné ako malý biely pelet.
4. Dôkladne sme odpipetovali supernatant. Pridali sme 600 μ l 70 % etanolu a premyli pelet DNA obratením uzatvorenej eppendorfky niekoľko krát hore-dole.
5. Eppendorfky sme centrifugovali pri 13 000 rpm 5 minút. Potom sme veľmi dôkladne odpipetovali etanol. Museli sme dávať pozor na pelet ktorý plával aby sme ho neodsali.
6. Vzorky sme dali vysušiť do termostatu pri teplote 37 °C 10-15 minút, alebo dlhšie, podľa potreby v závislosti od veľkosti peletu.

Rozpustenie DNA

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

3.4.2 PCR génu *ESR*

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

Primery:

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

***ESR* FOR 20-mer:**

5' - CCC TCT ATG ACC TGC TGC TG - 3'

ESR REV 22-mer:

5'- TCA GAT TGT GGT GGG GAA GTT C- 3'

Tabuľka 7 Zloženie reakčnej zmesi s objemom 25 µl

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

Tabuľka 8 Teplotný a časový režim PCR reakcie

Krok y	Cyklus	teplota	čas
1.	„štart“	95 °C	3 min.
2.	Denaturácia	95 °C	30 sekúnd
3.	Anneling	58 °C	30 sekúnd
4.	Polymerizácia	72 °C	50 sekúnd
5.	Elongácia	72 °C	10 min.
6.	Schladienie	4 °C	uskladnenie

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

3.4.3 PCR - RFLP

Pre RFLP analýzu bol vybraný reštrikčný enzým FastDigest *Ava*I (Fermentas), ktorý štiepil získané PCR produkty so známou sekvenciou.

Tabuľka 9 Zloženie štiepiacej zmesi RFLP s objemom 15 µl

Komponent	Výsledná koncentrácia	Množstvo na 1 vzorku
Sterilná voda (MiliQ)	-----	12 µl

10x Tango buffer	1x	2 μ l
Enzým <i>Ava I</i>	10U/ul	1 μ l

Postup štiepenia:

Do pripravenej štiepiacej reakčnej zmesi sme pridali PCR produkty.

ESR (*AvaI*): - celkový objem 25 μ l
- štiepiaca zmes 15 μ l
- PCR produkt 10 μ l

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

Tabuľka 10 Priebeh štiepenia reštrikčným enzýmom

Názov	RE miesto	Teplota štiepenia	Doba inkubácie
<i>AvaI</i>	C↓BCGRG	37 °C	5 minút

3.4.4 Elektroforéza v agarózovom géli

Na prípravu agarózových gélov (Sambrook et al., 1989) sme použili agarózu (Invitrogen) a 0,5 x TBE roztok, pričom výsledná koncentrácia gélu závisela od veľkosti fragmentu DNA. Pri kontrole PCR produktov sme použili 2 % géľ. Géľ obsahoval interkalačné činidlo etídium bromid (0,5 μ g/ml). Vzorky boli nanášané spolu s farbiacim roztokom (Blue orange). Pri elektroforetickej identifikácii štiepných fragmentov sme nanášali celý objem štiepnej zmesi 25 μ l spolu s 5 μ l xylenciánovo modrým farbiacim roztokom s obsahom EDTA. Elektroforéza prebiehala v 0,5 x TBE roztoku pri napätí max. 130 V po dobu 30 minút. Po skončení elektroforézy sme nadelené fragmenty DNA detekovali UV transiluminátorom. Pre presné určenie veľkosti fragmentov sme používali DNA markéry (Gene Ruler 100 bp, Fermentas).

3.5 Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry, efektívnosti pôsobenia alel a genetickej diverzity

Na základe PCR analýz sme stanovili genotypovú štruktúru sledovanej populácie a vypočítali frekvencie alel v jednotlivých polymorfných génoch sledovanej populácie ošípaných. Významnosť rozdielov medzi experimentálne pozorovanou a teoreticky očakávanou frekvenciou sme overili χ^2 testom.

1. frekvencie alel podľa Hardy-Weinbergovho zákona

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

p_A je frekvencia alely A

q_B je frekvencia alely B

N je počet jedincov v populácii

2. frekvencia genotypov podľa Hardy-Weinbergovho zákona

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

3. smerodajná odchýlka pre frekvenciu génov „s“

$$S = \frac{p_A \cdot q_B}{2N}$$

4. genotypová rovnováha overená χ^2 testom

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

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

e – pozorovaný počet genotypov

t – teoretický počet genotypov

n – počet genotypových tried

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

$p > 0,05$ = štatisticky nepreukazné

$p < 0,05$ = štatisticky preukazné

$p < 0,001$ = štatisticky vysoko preukazné

5. koeficient homozygotnosti

$$C_a = \sum p_i^2$$

6. koeficient heterozygotnosti

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

7. úroveň polymorfizmu lokusov „Na“

$$Na = \frac{1}{p + q}$$

8. polymorfný informačný obsah

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

4 VÝSLEDKY

4.1 *ESR*

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

4.1.1 *Izolácia génómovej DNA*

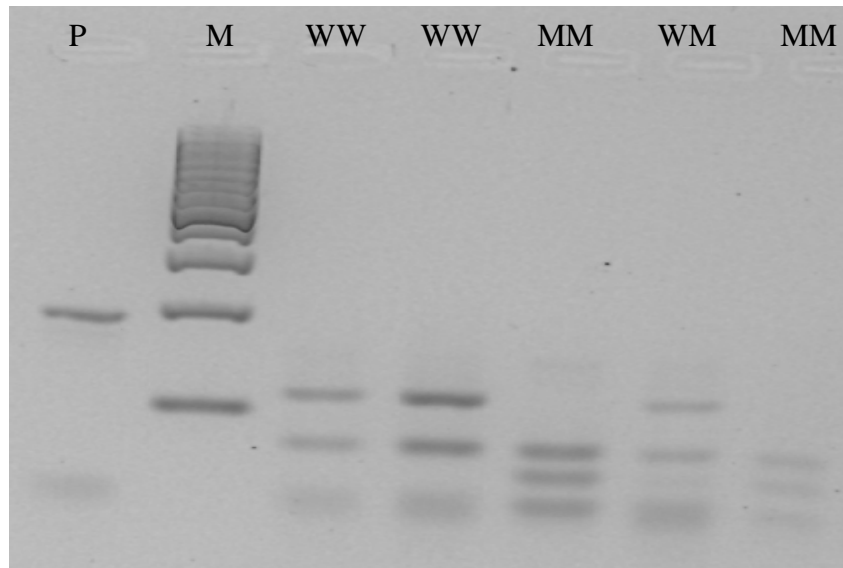
Genómová DNA bola izolovaná z krvi 211 ošípaných metódou vysoľovania podľa Millera et al., (1987). Presný postup izolácie je uvedený v kapitole Materiál a metódy.

4.1.2 *PCR – RFLP*

Štúdium polymorfizmu génu *ESR* sa uskutočnilo podľa Drögemüllera et al. (1997). Na amplifikáciu špecifických úsekov génu *ESR* sme použili nasledovné oligonukleotidové primery FOR 5' - CCC TCT ATG CAA TGC TGC TG – 3' a REV 5' - TCA GAT TGT GGT GGG GAA GTT C – 3'.

Reakcia prebiehala v celkovom objeme 25 µl v termocykleri (obrázok 6). Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v predchádzajúcej kapitole Materiál a metódy. PCR program obsahoval úvodnú denaturáciu pri teplote 95 °C počas 3 minút. Ďalej nasledovalo 30 cyklov tvorených denaturáciou počas 30 sekúnd pri 95 °C, annelingom počas 30 sekúnd pri 58 °C a polymerizáciou počas 50 sekúnd pri 72 °C. Posledný krok polymerizácie prebiehal pri 72 °C počas 10 minút a po skončení boli vzorky schladené na 4 °C.

Pre RFLP analýzu sme vybrali reštrikčný enzým FastDigest *AvaI* (*Fermentas*), ktorý štiepil PCR produkt veľkosti 185 bp v mieste C↓BCGRG.



Obrázok 2 Reprezentatívne výsledky analýzy PCR-RFLP pre gén *ESR*

M – marker 100 – 1000 bp,

WW – dominantný homozygot (109 bp + 76 bp),

WM – heterozygot (109 bp + 76 bp + 62 bp + 47 bp),

MM – recesívny homozygot (76 bp + 62 bp + 47 bp)

P – PCR produkt (185 bp), *AvaI* - reštrikčný enzým

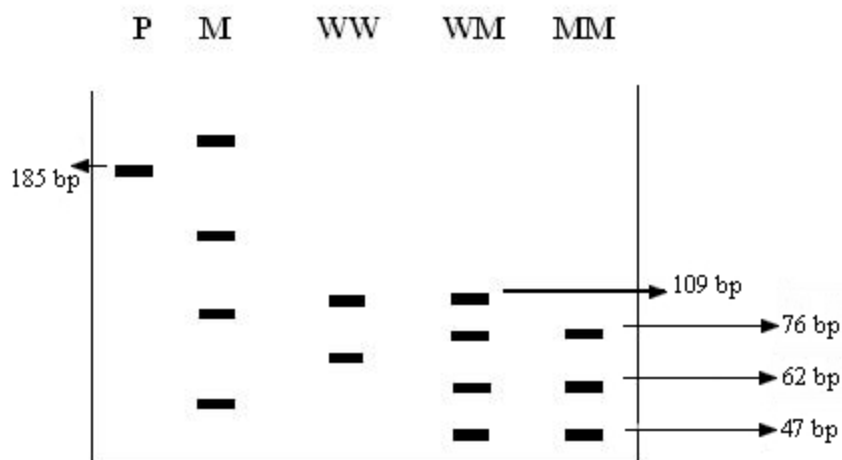


Schéma 1 Schématické znázornenie PCR produktu *ESR* pomocou *AvaI*

PCR produkt (185 bp)

DNA ladder 50 bp,

genotyp WW (109 bp + 76 bp),

genotyp WM (109 bp + 76 bp + 62 bp + 47 bp),

genotyp MM (76 bp + 62 bp + 47 bp)

V populácii ošípaných v celkovom počte 211 zvierat boli zistené všetky tri genotypy a to homozygotný genotyp WW (109 bp, 76 bp) 118 zvierat, heterozygotný genotyp WM (109 bp, 76 bp, 62 bp, 47 bp) 58 zvierat a homozygotný genotyp MM (76 bp, 62 bp, 47 bp) 45 zvierat.

4.1.3 Genetická štruktúra a efektívnosť pôsobenia alel *ESR* génu

V sledovanej populácii ošípaných plemena BUXL (tabuľka 11) bol gén *ESR* najpočetnejšie zastúpený genotypom WW s frekvenciou výskytu 57,89 %, s nižšou frekvenciou 26,32 % nasleduje genotyp WM a najmenej zastúpený v tejto populácii bol genotyp MM s frekvenciou výskytu 15,79 %. Výsledky poukazujú na to, že percentuálny podiel alely W je vysoký a v populácii tvorí 71,05 %, zatiaľ čo percentuálny podiel alely M je len 28,95 %. Platí: WW>WM>MM

Tabuľka 11 Genotypová štruktúra populácie BUXL

Plemeno	Genotyp	Počet	Frekvencie			S _p	χ^2 d.f. = 2
			Genotyp	Alela			
				W	M		
	WW	22	19,1842				

BUxL (N=38)	WM	10	15,6315	0,7105	0,2895	±0,052	4,932 ⁺⁺
	MM	16	3,1843				

P>0,05⁺, P>0,01⁺⁺, P>0,001⁺⁺⁺

V nami sledovanej populácii ošípaných plemena LxBU (tabuľka 12) bol najpočetnejší genotyp WW s frekvenciou výskytu 40,43 %. Genotypy WM a MM mali rovnakú frekvenciu výskytu a to 29,97 %. Výsledky poukazujú na to, že alela W (0,5531) a alela M (0,4469) majú podobnú frekvenciu. Platí: WW>WM=MM

Tabuľka 12 Genotypová štruktúra populácie LxBU

Plemeno	Genotyp	Počet	Frekvencie		S _p	χ^2 d.f. = 2	
			Genotyp	Alela			
				W			M
LxBU (N=47)	WW	19	14,3829	0,5531	0,4469	±0,052 7,4238 ⁺	
	WM	14	23,2342				
	MM	14	9,3829				

P>0,05⁺, P>0,01⁺⁺, P>0,001⁺⁺⁺

V populácii ošípaných plemena BU (tabuľka 13) mal najväčšie zastúpenie genotyp WW s frekvenciou výskytu 47,06 %, s len o niečo nižšou frekvenciou nasleduje genotyp WM a to 33,33 % a najmenej zastúpený bol genotyp MM, ktorého frekvencia výskytu bola 19,61%. Percentuálny podiel alely W v sledovanej populácii bol 63,72 % a alely M len 36,28 %. Platí: WW>WM>MM.

Tabuľka 13 Genotypová štruktúra populácie BU

Plemeno	Genotyp	Počet	Frekvencie		S _p	χ^2 d.f. = 2	
			Genotyp	Alela			
				W			M
BU (N=51)	WW	24	20,7107	0,6372	0,3628	±0,048 3,9699 ⁺	
	WM	17	23,5785				
	MM	10	6,7108				

P>0,05⁺, P>0,01⁺⁺, P>0,001⁺⁺⁺

V sledovanej populácii ošípaných plemena DU (tabuľka 14) mal najväčšie zastúpenie genotyp WW s frekvenciou výskytu 70,66 %, menej zastúpený bol genotyp WM = 22,66 % a s len o niečo nižšou frekvenciou výskytu nasledoval genotyp MM = 20,00 %. Alela W mala výrazne vyšší percentuálny podiel (81,99 %) oproti alele M 18,01 %. Platí: WW>WM>MM.

Tabuľka 14 Genotypová štruktúra plemena DU

			Frekvencie		
--	--	--	------------	--	--

Plemeno	Genotyp	Počet	Genotyp	Alela		S _p	χ^2 d.f. = 2
				W	M		
DU (N=75)	WW	53	50,4301	0,8199	0,1801	±0,031	4,0402 3 ⁺
	WM	17	22,1400				
	MM	15	2,4299				

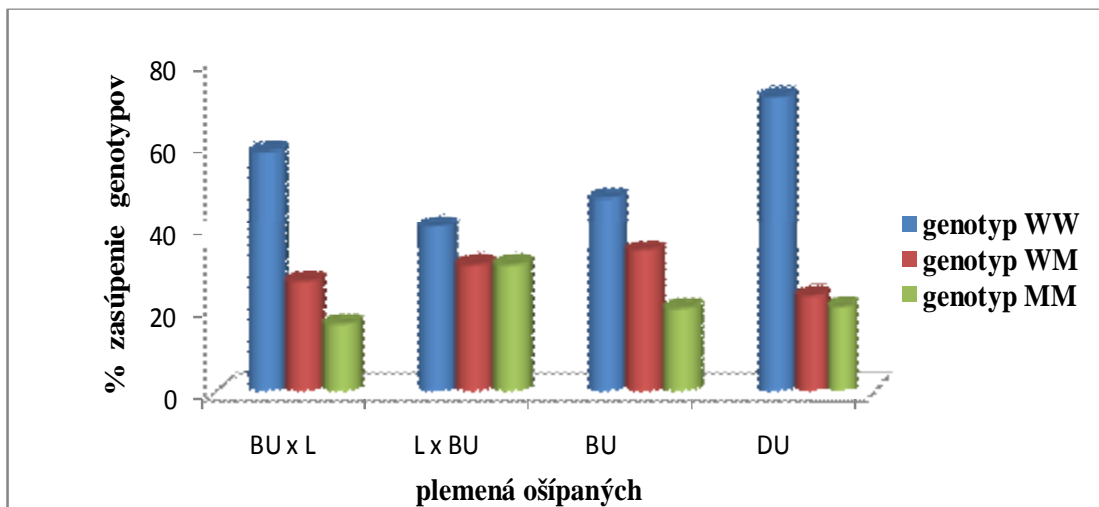
P>0,05⁺, P>0,01⁺⁺, P>0,001⁺⁺⁺

Identifikovali sme tri genotypové kombinácie *ESR* génu. Z hľadiska frekvencií alel bola u všetkých štyroch sledovaných plemien najfrekventovanejšia alela W. V populácii BUxL tvorila alela W 75,05 % a alela M 28,95 %. Takmer vyrovnané zastúpenie alel bolo v populácii LxBU a to W 55,31 % a M 44,69 %. U plemena BU bol percentuálny podiel alely W 63,72 % a alely M 36,28 %. V populácii plemena DU sme zaznamenali výrazný rozdiel medzi percentuálnym zastúpením alel, kde alela W tvorila 81,99 % a alela M len 18,01 %..

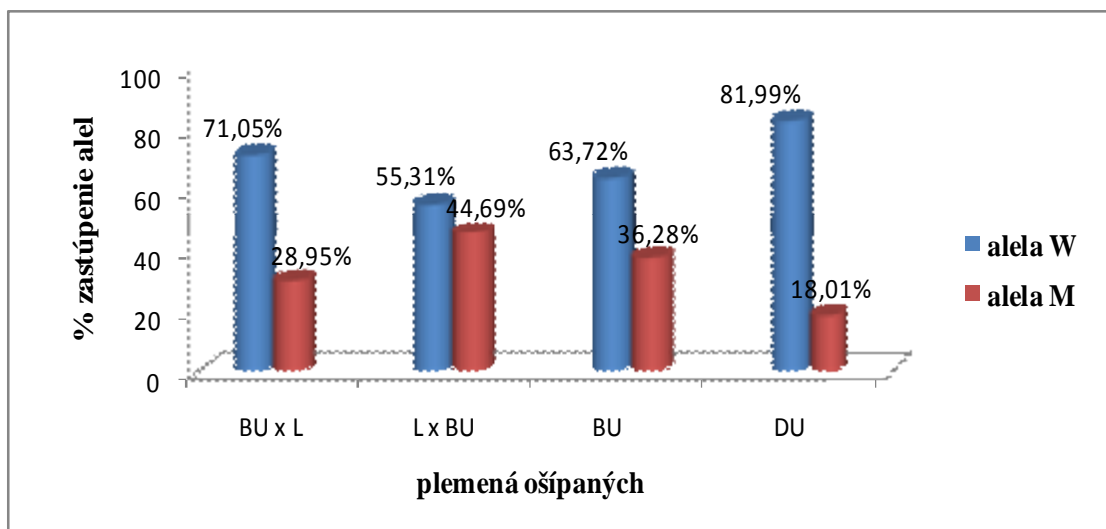
V sledovaných populáciách vybraných plemien ošípaných bol *ESR* gén najpočetnejšie zastúpený genotypom WW, pričom najvyššia frekvencia výskytu tohto genotypu bola zistená v populácii plemena DU a to 70,66 %. O niečo nižšia frekvencia výskytu genotypu WW bola v populácii ošípaných BUxL a to 57,89 %. U plemien LxBU a BU bol genotyp WW zastúpený podobnou frekvenciou výskytu (40,43 % a 47,06 %). Platí DU>BUxL>BU>LxBU.

V populácii plemien BUxL, BU a DU mal najnižšie zastúpenie genotyp MM. V populácii LxBU mal genotyp MM rovnaké zastúpenie ako genotyp WM t.j. 29,79 %. Platí BUxL<BU<DU<LxBU. Čo sa týka genotypu WM tak jeho zastúpenie u sledovaných plemien ošípaných bolo podobné a jeho frekvencia výskytu sa pohybovala v rozmedzí 22,66 % (DU) až 33,33 % (BU). Platí BU>LxBU>BUxL>DU.

Graf 1 Percentuálne zastúpenie genotypov v sledovaných populáciách ošípaných



Graf 2 Percentuálny podiel alel v sledovaných populáciách ošípaných



Na základe χ^2 - testu sme zistili preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov a to v populáciách všetkých sledovaných plemien.

Efektívnosť pôsobenia alel a genetická diverzita *ESR* génu je uvedená v tabuľke 15. V populácii plemena DU je pozorovaná homozygotnosť spomedzi všetkých sledovaných plemien najvyššia (0,7048), čo bolo spôsobené vysokým podielom homozygotného genotypu WW. V populáciách ostatných sledovaných plemien je prevaha homozygotov nad heterozygotmi len minimálna.

Hodnoty efektívnosti pôsobenia alel N_a sú najbližšie k hraničnej hodnote 2 v populáciách plemien LxBU a BU. U plemena DU je úroveň polymorfности lokusu

najnižšia a to 1,4190, rovnako hodnota PIC (0,2515) je znížená v porovnaní s hraničnými hodnotami čo značí o zníženej úrovni polymorfizmu lokusu.

Tabuľka 15 Efektívnosť pôsobenia alel ESR génu u jednotlivých plemien ošípaných

Plemeno	C_a	H_e	N_a	PIC
BU x L	0,5886	0,4114	1,6989	0,3268
BU x LD	0,5056	0,4944	1,9777	0,3722
BU	0,5376	0,4624	1,8601	0,3555
DU	0,7048	0,2952	1,4190	0,2515

P>0,05[†], P>0,01^{††}, P>0,001^{†††}

5 Diskusia

Gén estrogénového receptora patrí medzi najznámejšie gény sledované vo vzťahu k plodnosti prasníc a jeho variabilita je asociovaná s počtom narodených prasiat. Gén *ESR* bol lokalizovaný na 1. chromozóme ošípaných.

Detekovali sme tri genotypové kombinácie *ESR* génu. U všetkých sledovaných plemien bol najviac zastúpený genotyp WW (DU>BUxL>BU>BUxLD). Genotyp WM a MM boli rovnako zastúpené u plemena LxBU (29,79 %). U ostatných plemien bol genotyp MM zastúpený najmenej (BUxL<BU<DU<LxBU). Horogh et al., (2005) však

zaznamenal najvyššiu frekvenciu genotypu WM a to u populácie plemena hungarian large white

Z hľadiska génovej frekvencie bola najfrekventovanejšia alela W u všetkých sledovaných plemien: DU (0,8199), BUxL (0,7150), BU (0,6372) a LxBU (0,5531). Percentuálny podiel alely M u plemena DU bol 18,01 %, u plemena BUxL bol 28,95 %, u plemena LxBU 44,69 % a u plemena BU 36,28 %.

Dvořák a Jasek (1998) robili analýzu molekulárnej variability génu *ESR* a detekovali bodovú mutáciu metódou PCR-RFLP. Ako reštrikčné enzýmy použili *AvaI*, *PvuI* a *MspI*. Testovali 227 jedincov plemena biela ušľachtilá. Použitím reštrikčného enzýmu *AvaI* dosiahli nasledovne výsledky: AA 66,9 %, AB 21,6 % a BB 11,5 %. Podobné frekvencie genotypov stanovili aj Terman a Kmiec (2006), ktorí pomocou enzýmu *AvaI* testovali populáciu 41 kancov plemena poľský landras.

Dvořák et al., (1999) pri štúdiu 114 prasníc plemena poľská landrace zistili použitím *ESR/PvuII* taktiež najvyššiu frekvenciu genotypu AA 0,862, frekvencia genotypu AB bola 0,128 a genotypu BB 0,010. Podobne Santana et al., (2006) zistili najvyššiu frekvenciu genotypu AA 0,6547, nižšiu frekvenciu mal genotyp AB 0,3094 a najmenšiu frekvenciu mal genotyp BB 0,0359.

Horog et al., (2005) analyzovali 869 vrhov od 226 jedincov plemena hungarian large white s cieľom určiť možnosť použitia génu pre *ESR* ako markera na zlepšenie veľkosti vrhu. Prvé, druhé a neskoršie vrhy boli hodnotené oddelene. Boli vyčíslené frekvencie pre dve *ESR* alely A 0,55 a B 0,45 zistili nasledovné pozorované / očakávané hodnoty troch genotypov: AA:71/69,1; AB: 108/111,8 a BB: 47/45,1. V prvých a neskorších vrhoch bol genotyp BB nadradený genotypom AB a AA pre počet živo narodených (number born alive, NBA) a celkový počet narodených total number of born, TNB).

Drögemüller et al., (2001) sledovali u plemien nemecký landras a duroc polymorfizmus *ESR* génu. Všetky pozorované zvieratá boli homozygotné AA, genotypy AB a BB neboli v tejto populácii nájdené. Genotyp BB sa nepodarilo nájsť ani Kmiecovi et al., (2002) u plemena poľské landras a rovnako ani Santana et al., (2006) nenašli genotypy AB a BB u plemena pietrain.

Niekoľko autorov uvádza, že zaznamenali veľmi nízku frekvenciu alely B u plemena landras. Drogemuller et al., (1999) a (2001) dokonca nenašli žiadnu alelu B u nemeckého landrase, takže nemohol byť žiadny vplyv polymorfizmu zistený.

Isler et al., (2002) sledovali populáciu, ktorá pozostávala zo 70 kusov krížencov (LWxY, YxLW), 31 kusov plemena large white (LW) a 46 kusov plemena yorkshire (Y). Bola zistená celková frekvencia alely A 0,56 a alely B 0,44. Zo všetkých sledovaných skupín mala najvyššiu frekvenciu alela A (0,61) a najnižšiu alela B (0,48) u krížencov plemena YxLW.

Matoušek et al., (2003) sledovali vplyv *ESR* genotypov na plodnosť prasníc plemena biele ušľachtilé v dvoch stádach. Genotypy boli detekované pomocou PCR-RFLP. V stáde A (n=137) zistil nasledovné zastúpenie genotypov: CC 39,42 %, CD 51,82 %, DD 8,76 %. Frekvencia alely C bola 0,653 a alely D 0,346. V stáde B (n=82) bol genotyp CC zastúpený najviac (53,66 %), nasledoval genotyp CD 37,80 % a genotyp DD 8,54 %. Frekvencia alely C bola vyššia (0,726) ako frekvencia alely D (0,274). Podobné poradie a frekvencie genotypov získali aj Vrtková a Dvořák (2001) u plemena landras: CC 82,4 %, CD 16,5 % a DD 1,1 % (frekvencia alely D 0,09) rovnako aj Terman et al., (2006) u plemien polish landrace, polish synthetic line a pietrain.

Omelka et al., (2004) sa u a plemien landrace (L), large white (LW) a white meaty (WM) zaoberali analýzou *ESR* génu. Štúdiom zistili frekvenciu preferovanej alely B *ESR* génu u plemena white meaty 0,26, zatiaľ čo u plemena large white len 0,06. Naopak Terman et al., (2006) zistili podstatne vyššiu frekvenciu alely A (0,80) oproti alele B (0,20) u plemena polish landrace.

Trakovická et al., (2006) analýzou *ESR* (*PvuII*) génu identifikovali jeho tri genotypové kombinácie. Najfrekventovanejším genotypom bol genotyp AA a genotyp BB bol najmenej častý na rozdiel od výsledkov Horogha et al., (2005), ktorí pozorovali najvyššiu frekvenciu genotypu AB u populácie plemena hungarian large white.

Tischlerová (2007) identifikovala tri genotypové kombinácie *ESR* génu. Pri použití reštrikčného enzýmu *AvaI*, ktorý sme použili aj my, dosiahla nasledovné výsledky: u plemena duroc a slovenské mäsové plemeno bol najfrekventovanejší genotyp WW (DU 42,86 %, SM 59,66 %). U plemena pietrain zistila najfrekventovanejší genotyp MM (PN 50 %) a frekvencia genotypu WM bola najvyššia u plemena biela ušľachtilá (BUxL 37,58 %). Najvyššiu frekvenciu tohto genotypu zaznamenal aj Horogh et al., (2005) a to u populácie hungarian large white. Z hľadiska frekvencií alel zistila najfrekventovanejšiu alelu M u plemena pietrain a BUxL a alela W bola najfrekventovanejšia u plemien slovenské mäsové a duroc.

V prípade génu *ESR* sme nezistili významné vychýlenie z genotypovej rovnováhy.

6 Návrh na využitie výsledkov

Výsledky uvedené v diplomovej práci predstavujú informácie o genetickom polymorfizme detekovaného kandidátneho génu *ESR*.

Vyhodnotenie polymorfizmu génu estrogénového receptora a jeho vplyvu na plodnosť ošípaných možno využiť v šľachtiteľských programoch, pri selekcii a pripravovacích plánoch, čo je v konečnom dôsledku prínosom pre akýkoľvek poľnohospodársky podnik.

Výsledky takéhoto vyhodnotenia sa potom môžu využiť pri zlepšovaní genofondu stáda a vylepšení reprodukčnej produktivity, vďaka čomu je potom možné dosahovať aj lepšie ekonomické výsledky.

Odporúčame tiež získavať ďalšie informácie o vplyve génu estrogénového receptora na veľkosť vrhu prasníc, rovnako ako je nutné získavať aj ďalšie informácie o iných génoch, ktoré majú na veľkosť vrhu vplyv.

Ovplyvnenie veľkosti vrhu takouto genetickou cestou môže byť náročnejšie ako pri použití negenetických vplyvov, ale aj tak môže priniesť vyšší genetický zisk.

7 Záver

V predkladanej diplomovej práci sme v súlade s vytýčenými cieľmi optimalizovali a aplikovali PCR-RFLP metódu pre identifikovanie a genotypovanie ESR génu.

Na analýzu sme použili biologický materiál odobratý od 51 ošípaných populácie biela ušľachtilá, 38 ošípaných hybridnej populácie biela ušľachtilá x landras, 47 ošípaných hybridnej populácie landras x biela ušľachtilá a 75 ošípaných plemena duroc.

Gén *ESR* bol štiepený pomocou reštrikčnej endonukleázy FastDigest *AvaI* (Fermentas). Pomocou PCR-RFLP metódy sme určili dĺžky vzniknutých reštrikčných fragmentov.

Analyzovali sme polymorfizmy kandidátneho génu *ESR* a na základe výsledkov molekulárno-genetickej detekcie sme vyhodnotili genetickú štruktúru sledovanej populácie.

Gén *ESR* má vplyv na plodnosť ošípaných a aj na počet živo narodených mláďat a na základe genetickej analýzy sme dospeli k nasledovným záverom:

1. U všetkých sledovaných plemien ošípaných bol najviac zastúpený genotyp WW a najvyššiu hodnotu frekvencie výskytu dosahoval u plemena duroc (0,7066). U krížencov landras x biela ušľachtilá dosahoval genotyp WW najnižšiu frekvenciu výskytu (0,4043) spomedzi ostatných sledovaných plemien.
2. U hybridného plemena biela ušľachtilá x landras bol najviac zastúpený genotyp WW (0,5789), hneď za ním genotyp WM (0,26) a najmenej zastúpený bol genotyp MM (0,16). Frekvencia alely W (0,7105) bola výrazne vyššia ako frekvencia alely M (0,2895).
3. Aj v populácii hybridného plemena landras x biela ušľachtilá bol genotyp WW zastúpený najviac a to frekvenciou 0,5531, a genotypy WM a MM mali rovnaké frekvencie výskytu 0,2979. Frekvencia alely W (0,5531) bola len o niečo vyššia ako frakvencia alely M (0,4469).
4. U plemien biela ušľachtilá a duroc mali genotypy WW najvyššiu frekvenciu výskytu (BU 0,4706 a DU 0,7066), nasledoval genotyp WM (BU 0,3333 a DU 0,2266) a genotyp MM bol zastúpený o obidvoch plemien najmenej (BU 0,1961 a DU 0,20). Alela W mala u obidvoch plemien výrazne vyššiu frekvenciu, ako alela M.

8 Zoznam použitej literatúry

1. ABBS, S. et al. 1991. Aconvenient multiplex PCR system for the detection of dystrophin gene deletions: a comparative analysis with cDNA hybridisation shows mystipings by both methods. In *J. Med. Genet.*, 1991, vol. 28, 304-311 s.
2. ALFONSO, L. 2005. Use of meta-analysis to combine candidate gene association studies: application to study the relationship between the *ESR* Pvu

- Pvu*II polymorphism and sow litter size. In *Genet. Sel. Evol.* 2005, 37, 417-435 s.
3. ANDERSSON, L. et al., 1994. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pig. In *Science*, 263, 1771 – 1774 s.
 4. ARCHIBALD, A. L. 1994. Mapping of the pig genome. In *Current Opinion in Genetics and Development* 4, 1994, 395-400 s.
 5. BAUEROVÁ, M. et al. 2004. Polymerázová reťazová reakcia. Vysokoškolský učebný text, FPV UKF v Nitre, 2004.
 6. BAYER, C. 1999. Estrogen and the developing mammalian brain. In *Anat. Embryol.*, 1999, 379-390 s.
 7. BERG, F. 2006. Genetic analysis of fat metabolism in domestic pigs and their wild ancestor, In *Acta Universitatis Upsaliensis, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations*, 2006, 164, ISBN 91-554-6623, 40 s.
 8. BOKENKAMP, D. et al. 1994. The C-terminal half of the porcine estradiol receptor contains no post-translational modification: determination of the primary structure. In *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1994, 104, 163-72 s.
 9. BOLSTEIN, D. et al. 1980 Construction of a genetic linkage map in using restriction fragment length polymorphism. In *Amer. J. Hum. Genet.*, vol. 32, 1980, 314-331 s.
 10. BRINKMANN, A. O. 1994. Steroid hormone receptors: activators of gene transcription. In *J. Pediatr. Endocrinol.*, 1994, 7, 275-282 s.
 11. DRISCOLL, M. D. et al., 1998. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements. In *J. Biol. Chem.*, 1998, 273 s.
 12. DRISCOLL, M. et al. 1998. Sequence requirements for estrogen receptor binding to estrogen response elements In *J. Biol. Chem.*, 273, 29321-30.
 13. DROGEMULLER, C. et. al. 1997. An *Aval* and *Msp AII* polymorphism at the porcine oestrogen receptor (*ESR*) gene. In *Animal Genetics*, 1997, 28, 58-71 s.
 14. DROGEMULLER, C. et al. 1999. Influence of the genome region surrounding the estrogen receptor (*ESR*) gene on litter size in German Landrace population. *Archiv fur Tierzucht*, 1999, 42, NS, 175-177 s., ISBN 0003-9438.
 15. DROGEMULLER, C. et al. 2001. Candidate gene markers for litter size in different German pig lines. In *Journal of Animal Science*, 2001, 79, 2565-70 s.
 16. DVOŘÁK, J. et al. 1996. Uplatnění molekulární genetiky ve šlechtění zvířat. In *Sb. XVII. Genetické dny, 1.-3.-7.*, Brno: MZLU, 1996, 11-15 s.

17. DVOŘÁK, J. – JASEK, S. et al. 1998. Molecular variability of *ESR* lokus in pigs. In *Czech Journal Animal Science*, vol. 43, 1998, č. 9, 390-439 s.
18. DVOŘÁK, J.- VRTKOVÁ, I. 2001. *Malá genetika prasat*. Brno: MZLU, 2001, 91 s. ISBN 80-7157-521-6.
19. FERÁK, V. – SRŠEŇ, Š. 1990. *Genetika člověka*. SPN Bratislava, 1990.
20. FLÁK, P. 2002. Niektoré problémy odhadu plemennej hodnoty pri MAS. In *Sborník referátů z mezinárodní vědecké konference „XX. Genetické dny“*, 12. – 13. Září, Brno, 2002, 121-125 s.
21. FORD, E. B. 1940. Polymorphism in Plants, Animals and Man. In *The New Systematic*, Oxford, 1940, 493 s.
22. GÁBOR, M. 2009. Genetické markery kvality mäsa hovädzieho dobytka a oviec. Dizertačná práca, Katedra genetiky a plemenárskej biológie, 2009, Nitra: SPU.
23. GEISERT, R. D. et al. 1990. Embryonic steroids and the establishment of pregnancy in pigs. In *Journal of Reproduction and Fertility*, 40, 293-305 s.
24. GELDERMANN, H. 1996. Analyse von Genwirkungen auf Leistungsmerkmale. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 1996, 103, 369-448 s.
25. GOLIAŠOVÁ, E. – WOLF, J. 2004. Vplyv génu *ESR* na veľkosť vrhu a znaky produkcie ošípaných u Českej Large White, In *Animal Genetics*, 2004, číslo 35, 293-297 s., International Society for Animal Genetics.
26. HALEY, C. S. 1999. Advances in quantitative trait locus mapping. In *From Jay Lush to genomics: visions for animal breeding and genetics* [ed. J. C. M. Dekkers, S. J. Lamont and M. F. Rotchild] *AgBiotechNet Proceedings*, May 16. – 18. [on line], [november 2009].
Dostupné na: http://www.agrobiotech.net/proceedings/3_haley.pdf.
27. HIROOKA, H. et. al. 2001. A whole-genome scan for quantitative trait loci affecting teat number in oigs. In *Journal of Animal Science*, 2001, 79, 2320-2326 s.
28. HOFFMAN, B. - SCHULER, G. 2000. Receptor blockers – general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. In *Animal Reproduction Science*, 2000, 60-61, 295-312 s.
29. HOROGH, G. et al. 2005. Oestrogen receptor genotypes and litter size in Hungarian Large White pigs, In *Journal of Animal Breeding and Genetics*, Volume 122, Issue 1, Pages 56 – 61 s., 2005 Blackwell Verlag, Berlin.

30. HUMPOLÍČEK et al. 2007. Effect of estrogen receptor, follicle stimulating hormone and myogenin genes on the performance of Large White sows. In *Czech Journal of Animal Science.*, 52, 2007 (10), 334-340 s.
31. ISLER, B. J. et al. 2002. Examination of the Relationship Between the Estrogen Receptor Gene and Reproductive Tract Components in Swine. In *Ohio State University Extension Bulletin* [on line], [marec 2010].
Dostupné na: <http://ohioline.osu.edu/sc171/sc171_8.html>
32. IVELL, R. - WALTHER, N., 1999. The role of steroids in the oxytocin hormone system. In *Mol. Cell. Endocrinol.*, 1999, 71, 95-101 s.
33. JAKUBEC, V. 2002b. Molekulární genetik a ve šlechtění IV. – uplatnění přímých a nepřímých markeru. In *Náš chov*, 2002b, vol. 10, 42-44 s.
34. KAMINSKI, S. et al. 2003. Relation between *Ava I* polymorphism within the estrogen receptor gene (ESR) and meatiness in Polish Large White Landras, In : *Journal off Applled Genetics*, 44, 4, 2003, 521-524 s., Poland.
35. KEATSON, B. J. B. et al. 1991. Guidelines for human linkage maps: An international system for human linkage maps (ISLM, 1990). In *Genomics*, vol. 1991, 9, 557-560 s.
36. KIRKPATRICK, B. W. 2002. QTL and candidate gene effects on reproduction in livestock: progress and prospects. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2002, 19.- 23. 8., Montpellier, France.
37. KMIEC, M. et al., 2002. Study on a relation between estrogen receptor (*ESR*) gene polymorphism and some pig reproduction performance characters in Polish Landrace breed. In *Czech Journal of Animal Science*, 2002, 47, 189-193 s.
38. KŘENKOVÁ, L. 1999. Vztah polymorfizmu kandidačních genu k proměnlivosti produkce a kvality masa prasat. Dizertační práce. Brno: MZLU, 1999, 139 s.
39. KNOLL, A. 1998. Detekce polymorfizmu DNA ve vztahu k mapování QTL u prasat, Dizertační práce, MZLU Brno, 1998, 117 s.
40. KNOLL, A. – URBAN, T. 2002. Aktuální metody používané v molekulární genetice zvířat. In: *Sb. XX Genetické dny*, Brno: MZLU, 2002, 12-18 s. ISBN 80-7157-607-7.

41. KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z. 2002. Molekulární genetiky zvířat, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 51-85 s., ISBN 80-7157-616-6.
42. KWOK, S. et al. 1987. Identifacation of human immunodeficiency virus sequences by using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. In *J. Virol.*, 1987, vol. 61, 1690-1694 s.
43. KWOK, P. Y. 2003. Single Nucleotide Polymorphisms Methods and Protocols, Humana Press Inc., 2003, 269 s.
44. LEEDS, T. D. et al., 2002. The association between the estrogen receptor locus and growth, carcass and developmental traits in pigs. In: *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (CD-ROM)*, Montpellier, 2002, Communication 03-26 s.
45. MARKULAND, L. et al. 1996. A comprehensive linkage map of the pig based on a wold pig-Large White intercross. In *Animal Genetics*, 27, 1996, 255-269 s.
46. MATOUŠEK, V. et al., 2003. Effect of *RYR1* and *ESR* genotypes on the fertility of sows of Large White breed in elite herds. Brno: MZLU, In *Czech Journal of Animal Science*, 48, 2003 (3), 129-133 s.
47. MILLER, S. et. al. 1987. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In *Nucleic Acids Research*, 16, 3, 1987, 1215 s.
48. MILUCHOVÁ, M. et al. 2009. Genetické markéry kvality mlieka a zdravia hovädzieho dobytky. Nitra: SPU. 2005, 71 s. ISBN 80-88778-73-5.
49. MONTALDO, H. H. - MEZA-HERRERA, C. A. 1998. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. In *Electronic Journal of Biotechnology* [on line], vol.1, no 2 [marec 2009]
50. Dostupné na : <<http://ejb.ucv.cl/content/vol1/issue2/full/4/index.html>>
51. MULLIS, K. B. - FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalysed chain reaction. In *Methods in Enzymol.*, vol. 155, 1987, 335-350 s.
52. MUÑOZ G. et al. 2004. Mapping of the porcine estrogen receptor 2 gene and association study with litter size in Iberian pigs. In: *Animal Genetics*, vol. 35, 2004, 242-244 s.

53. NOGUERA, J. L. et al. 2003. Estrogen receptor polymorphism in Landrace pigs and its association with litter size performance. In *Livestock Production Science*, 2003, 82, 53-9 s.
54. OMELKA, R. et al. 2001. Estrogénový receptor – genetický marker plodnosti ošípanej. In: *Genetika a šľachtenie hospodárskych zvierat*. IV. Odborný seminár doktorandů a studentů. 14. září 2001. Brno: MZLU, 2001, 55-56 s. ISBN 80-7157-532-1.
55. OMELKA, R. 2003. Analýza vybraných genetických polymorfizmov vo vzťahu k reprodukčným vlastnostiam ošípaných [PhD. Thesis], Univerzita Konštantína Filozofa, Nitra, 2003, 130 s.
56. OMELKA, R. et al. 2004. Simultaneous Detection of Malignant Hyperthermia and Genetic Predisposition for Improved Litter Size in Pigs by Multiplex PCR-RFLP. In *Folia biologica*, Krakow, 2004, vol. 52, 1-2 s.
57. OMELKA, R. et al. 2005. Effect of the oestrogen receptor (ESR) gene on reproductive traits of Large White, White Meaty and Landrace pigs. In *Czech Journal of Animal Science*. 50, 2005, 249-253 s.
58. PASZEK, A. A. et al. 1998. Genomic scan for quantitative trait loci in swine. In *Proceeding of 6th World International Congress of Genetics Applied to Livestock Production*, 1998, 30, 13-15 s.
59. POKORÁDI, J. et al. 2005. Genetické markéry a stanovenie DNA profilu chránených druhov živočíchov . In: *Genetické markéry a kvalita produktov špeciálnych odvetví živočíšnej výroby*. Nitra : SPU, 2005, 149 –170 s. ISBN 80-8069-633-0.
60. POMP, D. - GEISERT, R. 1998. Developmental Genetics. In Rotchild M. F., Ruvinski A: *The genetics of the pig*. 1998, Cab International, New York, 375-403 s.
61. POPE, et. al. 1994. Embryonic mortality in swine. In *M. T. Zavy and R. D. Geisert (ed). Embryonic Mortality in Domestic Species*, 1994, pp. 53-77. CRC Press, Boca Raton, FL.
62. PRAŽÁK, I. 2002. Šľachtenie prasat v praktických podmínkach. In *Asociace chovateľú masných plemen*, Rapotín, 2002, s. 164-208 s.
63. PŘIBYL, J. 1995. Využití pri selekci zvierat. In *Živoč. výr.*, roč. 1995, 40, s. 375-382.

64. RATHJE, T. A. et al. 1997. Evidence of quantitative trait loci affecting ovulation rate in pigs. In *Journal of Animal Science*. 1997, 75, 1486-1494 s.
65. REECE, W. O. 1998. Fyziologie domácich zvířat. Granada Publishing, 1998, spol. s.r.o.
66. REMPEL, J. et al. 2010. Association analyses of candidate single nucleotide polymorphisms on reproductive traits in swine, In *Journal of Animal Science*, 88, 2010, 1-15 s.
67. ROHRER, G. A. et al. 1994. A microsatellite linkage map of the porcine genome. In *Genetics*, 136, 1994, 231-245.
68. ROHRER, G. A. et al. 1996. A comprehensive map of the porcine genome. In *Genome Res.*, 6, 1996, 371 s.
69. ROHRER, G. A. et al. 1999. Identification of quantitative trait loci affecting female reproductive traits in a multigeneration Meishan-White composite swine population. In *Journal of Animal Science*, vol 77, Issue 1385-1391.
70. ROTCHILD, M. F. et al. 1995. Estrogen receptor locus is a major gene for litter size in the pig. In *46th Annual Meeting of the EAAP*, Prague, 1995, 53-53 s.
71. ROTCHILD, M. F. 1998. Identification of quantitative trait loci and interesting candidate genes in the pig: progress and prospects. CD ROM from 6th WCGALP, Amirdale, Australia, 1998, 11-16th Januar: 26-403 s.
72. ROTCHILD, M. F. 2003. Advances in pig genomics and functional gene discovery. In *Comparative and Functional Genomics* [on line], [september 2002]. Dostupné na: <<http://www3.interscience.wiley.com>>
73. ROTCHILD, M. F. 2004. Brief summary of the pig genome coordination program for 2003. Swine Genome map. U. S. Pig Gene Mapping Coordination program [on line], [máj 2008].
Dostupné na: <<http://www.genome.iastate.edu/newsletter/update2003.html>>.
74. ROTCHILD, M. F. - PLASTOW, G. S., 1999. Advances in pig genomics and industry applications AgBiotechNet [on line], paper ABN007.
Dostupné na: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/home>>
75. SAIKI, R. K. et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. In *Science*, 1988, vol. 239, 487-491 s.
76. SAMBROOK, J. et al. 1989. Molecular cloning: Laboratory manual, 2nd ed., In *Cold springs Harb*, 1989, Harb. Lab. Press, USA.

77. SANTANA, B.A.A. et al. 2006. Association of the estrogen receptor gene Pvu II restriction polymorphism with expected progeny differences for reproductive and performance traits in swine herds in Brazil. In *Genetics and molecular biology*. 2006, 29: 273-277 s.
78. SHORT, T. et al. 1997. Effect of Estrogen Receptor locus on Reproduction and Production Traits in Four Commercial Pig Lines. In *Journal of Animal Science.*, 1997, 75, 3138-3142 s.
79. SLOMCZYNSKA, M. – WOZNIAK, J. 2001. Differential distribution of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the porcine ovary. In *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*, 2001, 109 (4), 238-244 s.
80. SMITH, C.L. 1999. Estrogens overview. In *Encyclopedia of reproduction*, 2, Academic Press, 1999, 199-126 s.
81. STRATIL, A. 2009. Genomika prasete – současný stav poznání, aplikace a perspektivy. In *Aktuální poznatky z chovu a šlechtění prasat* : Sborník z mezinárodní vědecké konference konané při příležitosti 99. Výročí založení MZLU v Brně. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009, 55-56 s. ISBN 978-80-7375-303-0.
82. SUNDARRAJAN, C. et al. 1999. Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. In *Molecular human reproduction*, 1999, 9, 797-802 s.
83. TERMAN, A. – KMIEC, M. – POLASIK, D. 2006. Estrogen receptor gene (*ESR*) and semen characteristic of boars. In *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 49, 2006, 71-76.
84. TISCHLEROVÁ, M. 2007. Hodnotenie polymorfizmu vybraných kandidátskych génov *ESR* a *RYR1* mäsovej úžitkovosti ošípaných, Diplomová práca, 2007, Nitra: SPU.
85. TOTHOVÁ, K. 2002. Štúdium genetickej determinácie vybraných produkčných a reprodukčných vlastností ošípaných na úrovni DNA. Písomná práca k dizertačnej skúške. Nitra: SPU 2002, 57.
86. TRAKOVICKÁ, A. 1999. Genetické polymorfné znaky a ich využitie pri hodnotení hospodárskych zvierat: habilitačná práca. Nitra: SPU, 1999, 120 s.
87. TRAKOVICKÁ, A et al. 2006. Analýza polymorfizmu *ESR (PvuII)* génu ošípanej metódou PCR-RFLP. In *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra: SPU, 2006, 18 s.

88. USDA-MARC. Swine genome map, U. S. Pig Gene Mapping Coordination Program.
Dostupné na: <<http://www.marc.usda.gov/genome/swine/htmls/Chromosome01.html> [január 2010].
- VAN ARENDONK et al. 1999. Use of Phenotypic nad Molecular data of genetic evaluation of livestock. In From Jay Lush to genomics: visions for animal breeding and genetics [ed J. C. M. Dekkers, S. J. Lamont and M. F. Rotchild] AgBiotechNet Proceedings [on line], maj 16-18, 2002.
89. VAN DER LENDE, T. et al. 2002. New developments in genetic selection for litter size and piglet survival. In *Thai Journal of Veterinary Medicine*, 2002, 32, 33-46 s.
90. VAN RENS, B. T. T. M. et al., 2000. Periovulatory hormone profiles and components of litter size in gilts with different estrogen receptor (*ESR*) genotypes. In *Theriogenology*, 2000, 53, 1375-1387 s.
91. VISSCHER, P. - HALEY, 2002. Strategies for marker-assisted selection in pig breeding programmes [január 2008]. Dostupné na: <http://elib.tiho-hannover.de/publications/6wcgalp/papers/23503.pdf>
92. WEBB, J. 2000. Swine Genetics for the Next 25 Years. NSIF Proceedings.
93. WELLER, J. I. 2001. Quantitative trait loci analysis in animals. CABI Publishing, Oxon, UK, 2001, 253 s. ISBN 0 85199.
94. WILLIAMS, J.G. et al. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. In: *Nucleic. Acids. Res.*, vol. 18, 1990, n.22, p. 6531 – 6535.
95. WINTERO, A. K. et al. 1992. Variable (dG-dT)_n- (dC-dA)_n sequences in the porcine genome. In *Genomics*, 12, 1992, 281-288 s.
96. WOLFOVÁ, M. - WOLF, J. 1999. Současný mezinárodní stav odhadu plemenné hodnoty prasat. In *Czech Journal of Animal Science.*, 1999, n. 44, 555-560 s.
97. WOMACK, J. E. 1997. Mapping Animal Genomes. In *Advance in veterinary medicine*, 1997, 40, 157-188 s.
98. ZHEN-FANG, W. et al. 2006. Study on the Association Between Estrogen Receptor Gene (*ESR*) and Reproduction Traits in Landrace Pigs. In *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33 (8), 711-716 s.

Internetové odkazy:

<http://www.animalgenome.org/pigs/maps/cytomap/chrom1.html>

<http://www.bioweb.genezis.eu>

<http://www-lgc.toulouse.inra.fr/pig/cyto/genmar/htm/1GM.HTM>

<http://www.osel.cz/index.php?clanek=1319>

<http://www.piggenome.org>

<http://www.ri.bbsrc.ac.uk/pigmap/karyotype.html>

http://www.thepigsite.com/focus/contents/breedsofswine/du_sow.jpg

<http://union-mz.com/images/gallery/svinjarstvo/landras.jpg>

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

Prílohy

Príloha 1 Plemená ošípaných



Obrázok 3 plemeno biela ušľachtilá
(www.zootechnika.estranky.cz)



Obrázok 4 plemeno landras
(www.union-mz.com)



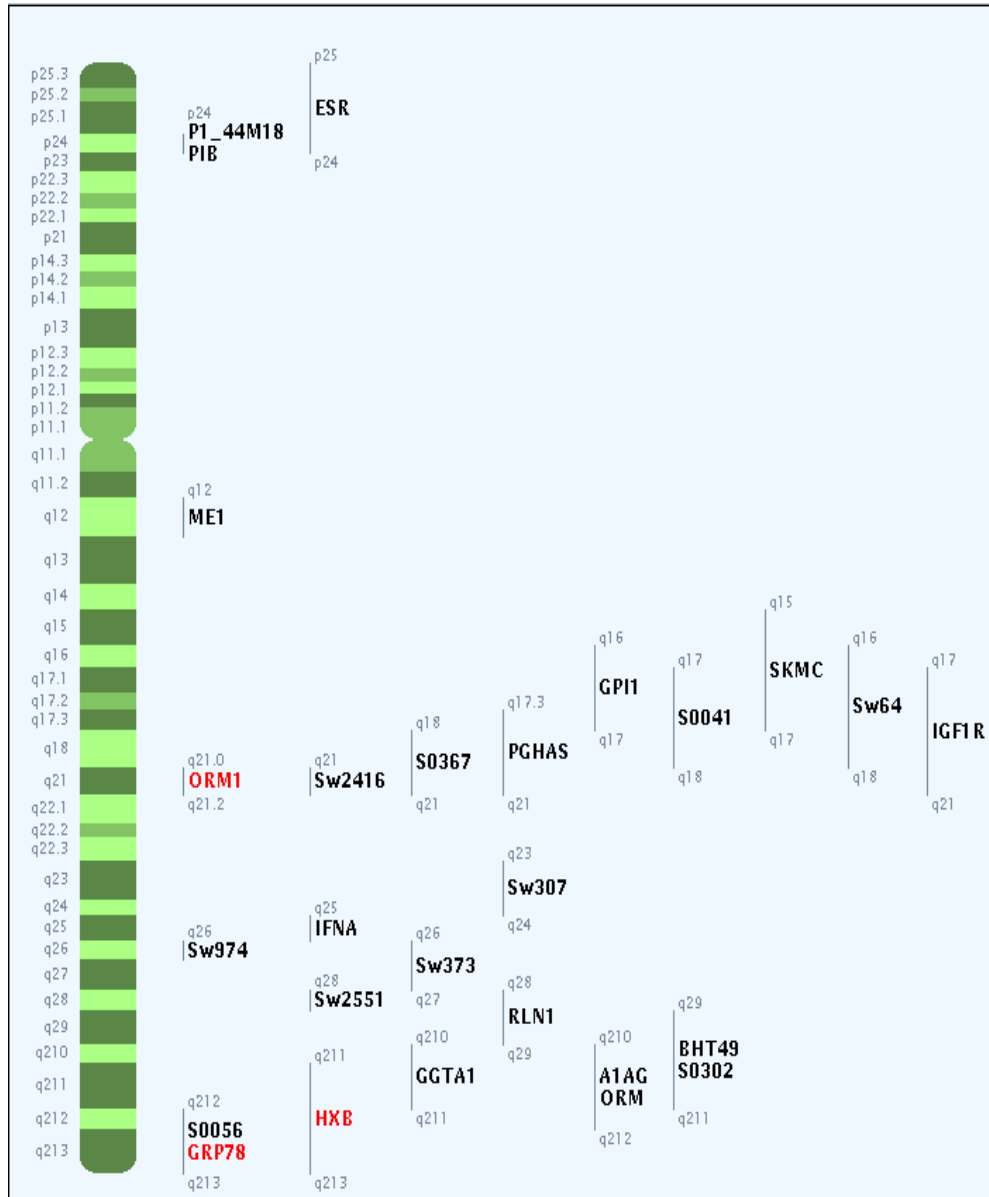
Obrázok 5 plemeno duroc
(www.thepigsite.com)

Príloha 2



Obrázok 6 Termocykler

Príloha 3



Obrázok 7 Cytogenetická mapa chromozómu 1
(www.animalgenome.org)