

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

**MOLEKULÁRNO-GENETICKÉ METÓDY V HODNOTENÍ  
PRODUKCIE KRÁLIKOV  
(*ORYCTOLAGUS CUNICULUS*)**

**Dizertačná práca**

Študijný program:	Genetika
Študijný odbor:	4. 2. 4 Genetika
Školiace pracovisko:	Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Školiteľ:	Anna Trakovická, doc. Ing., CSc.
Konzultant:	Vladimír Parkányi, RNDr., CSc.

**Nitra, 2010**

**Alica Rafayová, Ing.**

## Čestné vyhlásenie

Podpísaná Alica Rafayová vyhlasujem, že som záverečnú prácu na tému „Molekulárno-genetické metódy v hodnotení produkcie králikov (*Oryctolagus cuniculus*)“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry.

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

V Nitre 16. júna 2010

Alica Rafayová

## **Pod'akovanie**

Ďakujem svojej školiteľke, doc. Ing. Anne Trakovickej, CSc. za vytvorenie optimálnych podmienok pre úspešné riešenie dizertačnej práce, konzultantovi RNDr. Vladimírovi Parkányimu, CSc. a Ing. Michalovi Gáborovi, PhD. za odborné rady a podnetné nápady a všetkým, ktorí sa podieľali na dokončení mojej dizertačnej práce.

## **Abstrakt**

Cieľom dizertačnej práce bola optimalizácia metód pre štúdium polymorfných génov kráľika, detekcia mutácii génov MSTN, PGR a ASIP v populácii králikov a štúdium vplyvu týchto génov na vybrané parametre úžitkovosti.

Optimalizovali sme PCR-RFLP, PCR-SSCP a HRM analýzu na detekciu mutácie v MSTN géne, PCR-RFLP a HRM metódu pre štúdium PGR génu a PCR - RFLP pre analýzu ASIP génu.

V rámci MSTN génu sme analyzovali fragment s veľkosťou 80 bp. V populácii zdobnelých plemien králikov bola frekvencia alely C 0, 69 a frekvencia alely T 0, 31. V populácii obrovitých plemien bola frekvencia alely C 0, 56 a frekvencia alely T 0, 44. V populácii brojlerových králikov sme zaznamenali prevahu mutovanej alely T (0, 67) nad alelou C (0, 33). Asociačnými štúdiami, v ktorých sme sa zamerali na sledovanie vplyvu genotypu CC a TT na rýchlosť rastu a priemerné denné prírastky mláďat, sme zistili signifikantné rozdiely v prospech zvierat s genotypom TT. Z výsledkov práce vyplýva, že myostatín je možný kandidátsky gén pre mäsovú úžitkovosť králikov.

V prípade génu PGR sme analýzou 558 bp úseku zistili miernu prevahu nemutovanej alely G (0, 54) nad alelou A (0, 45). Asociačnými štúdiami zameranými na vplyv genotypu AA, AG a GG na počet mláďat vo vrhu, sme zistili najvyššiu početnosť vrhu pri zvieratách s genotypom AG a GG, najmenšie vrhy mali zvieratá s genotypom AA. Rovnaké výsledky sme zistili pri sledovaní vplyvu genotypu na počet živonarodených mláďat. V počte mŕtvonarodených mláďat sme rozdiely medzi genotypmi nezaznamenali.

Pri vyhodnocovaní polymorfizmu ASIP génu PCR-RFLP metódou sme v populácii neidentifikovali rozdiely a bude potrebné tieto výsledky potvrdiť ďalšími analýzami.

Táto práca bola vytvorená realizáciou projektu „Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a projektu VEGA – 1/0061/10.

**Kľúčové slová:** králik, kandidátske gény, MSTN, PGR, ASIP

## **Abstract**

The aim of our work was to optimize molecular-genetic methods for analysing rabbit MSTN, PGR and ASIP gene polymorphism in a population of animals and to study effect of this genes to rabbit production and reproduction traits.

We optimized PCR-RFLP, PCR-SSCP and HRM analyses for MSTN gene, PCR-RFLP and HRM for PGR gene and PCR-RFLP for ASIP gene.

In terms of myostatine gene we analyzed fragment with length of 80 bp. In a population of dwarf rabbits was frequency of allele C 0,69 and frequency of allele T was 0, 31. In a population of giant rabbits was frequency of allele C 0, 56 and frequency of allele T was 0, 44. In a population of broyler rabbits we detected majority of mutated allele T (0, 67) over allele C (0, 33). Associated studies, where we focused on effect of MSTN gene (genotype CC and TT) on growth rate and average daily gains showed, that there were significant differences to behoof of genotype TT. On a basis of our results we assume, that myostatine gene can be a candidate gene for rabbit meat production.

In the case of PGR gene using molecular-genetics methods for analysing 558 bp fragment we noted slight majority of nonmutated allele G (0, 54) over allele A (0, 45). Associated studies aimed at the effect of genotype AA, AG and GG on litter size showed, that the highest litter size had does with genotype AG and GG. The same results we got for number of liveborn animals. In number of stillborn rabbits there were no significanat differences among genotypes.

Analysing of ASIP gene polymorphism using PCR-RFLP technique we did not identifie differences in our population adn it will be needed to confirm this results with other analyses.

This work has been supported by the project VEGA 1/0061/10 and by Excellence Center for Agrobiodiversity Conservation and Benefit project implemented under the Operational Programme Research and Development financed by European Fund for Regional Development.

**Key words:** rabbit, candidate genes, MSTN, PGR, ASIP

---

**OBSAH**

<b>ÚVOD.....</b>	<b>13</b>
<b>1 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY DOMA</b>	
<b>A V ZAHRANIČÍ.....</b>	<b>15</b>
1.1 História, taxonomické zaradenie a význam chovu králikov.....	15
1.2 Mäsová úžitkovosť králika.....	17
1.2.1 Charakteristika králičieho mäsa.....	17
1.2.2 Faktory ovplyvňujúce kvalitu mäsa a jatočnú výťažnosť.....	18
1.2.3 Ukazovatele jatočnej kvality králikov.....	19
1.2.4 Jatočná výťažnosť králikov a kvalita jatočného tela.....	20
1.3 Reprodukcia králikov.....	21
1.3.1 Pohlavné orgány králika.....	21
1.3.2 Pohlavný cyklus králika.....	21
1.4 Genóm králika.....	23
1.4.1 Molekulárne markery.....	24
1.4.2 mtDNA markery.....	25
1.4.3 RFLP markery.....	25
1.4.4 AFLP markery.....	25
1.4.5 Mikrosatelity.....	26
1.4.6 QTL.....	27
1.4.7 Mapovanie genómu králika.....	27
1.5 Prehľad kandidátskych génov králika pre mäsovú úžitkovosť.....	29
1.5.1 Melanokortínové receptory (MCR).....	29
1.5.2 Rastový hormón (GH) a receptor pre rastový hormón (GHR).....	31
1.5.3 Myostatín.....	32
1.6 Prehľad kandidátskych génov králika pre reprodukčné vlastnosti.....	36
1.6.1 Progesterón a progesterónový receptor.....	36
1.6.2 Tkanivový inhibítor metaloproteináz (TIMP – 1).....	41
1.6.3 Oviduktálny glykoproteín.....	42
1.6.4 Aromatáza.....	43
1.6.5 Gén pre agouti signálny proteín.....	45

---

1.7	Charakteristika najčastejšie používaných molekulárno-genetických metód pre analýzu kandidátskych génov .....	46
1.7.1	PCR (Polymerázová reťazová reakcia).....	46
1.7.2	RFLP (Polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov).....	47
1.7.3	PCR-RFLP .....	47
1.7.4	SSCP - Analýza jednovláknového konformačného polymorfizmu .....	47
1.7.5	Elektroforetické delenie látok .....	49
1.7.6	Sekvenačná analýza .....	52
1.7.7	HRM - High Resolution Melting .....	52
<b>2</b>	<b>CIEĽ .....</b>	<b>53</b>
<b>3</b>	<b>MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>54</b>
3.1	Biologický materiál .....	54
3.2	Izolácia DNA .....	55
3.2.1	Izolácia DNA komerčným kitom NucleoSpin Blood .....	55
3.2.2	Izolácia DNA vysol'ovacou metódou (Miller et al., 1988) .....	55
3.2.3	Izolácia DNA zo zrazenej krvi (podľa Salazar et al., 1998) .....	57
3.2.4	Izolácia DNA z tkaniva (podľa Laird et al., 1991) .....	58
3.2.5	Izolácia zo sterov z ústnej dutiny (podľa Raslera et al., 2006) .....	59
3.2.6	Izolácia DNA z chlpových cibuliek .....	60
3.2.7	Izolácia DNA z kvapky krvi (podľa Słomski et al., 2008) .....	61
3.2.8	Overenie prítomnosti DNA .....	61
3.2.9	Meranie koncentrácie a čistoty vzoriek .....	62
3.3	Polymerázová reťazová reakcia.....	63
3.3.1	Myostatín .....	63
3.3.2	Progesterónový receptor .....	64
3.3.3	ASIP gén .....	65
3.4	Analýza polymorfizmu dĺžky restričných fragmentov .....	67
3.4.1	MSTN .....	67
3.4.2	PGR.....	67
3.4.3	ASIP .....	67
3.5	Analýza jednovláknového konformačného polymorfizmu .....	68
3.6	HRM .....	68
3.7	Matematicko – štatistické vyhodnotenie výsledkov .....	70
3.8	Asociačné štúdie .....	72

---

---

<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSIA .....</b>	<b>75</b>
4.1	Izolácia DNA .....	75
4.2	Analýza MSTN génu .....	79
4.3	Analýza PGR génu .....	94
4.4	Analýza ASIP génu .....	105
<b>5</b>	<b>ZÁVER.....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV .....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY .....</b>	<b>112</b>



---

## Zoznam skratiek a značiek

μ	mikro 10 <sup>-6</sup>
A, G, T, C, U	dusíkaté bázy (adenín, guanín, tymín, cytozín, uracil)
A	ampér (jednotka elektrického prúdu)
ADG	priemerný denný prírastok
AF	aktivačná doména
AFLP	polymorfizmus dĺžky amplifikovaných fragmentov
APS	amonium persulfát
ASIP	agouti signalizačný proteín
Asn	kyselina asparágová
Asp	asparagín
ATP	adenozín trifosfát
BAC	bakteriálny klon
BO	belgický obor
BOA	belgický obor albín
bp	bázový pár
BSA	bovinne sérum (bovine serum albumin)
C	cytozín
c	koncentrácia
cAMP	cyklický adenzínmonofosfát
cDNA	komplementárna DNA
cm	centimeter
cM	centimorgan
DBD	DNA väzbová doména
DF	stupne voľnosti
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	nukleotid trifosfáty
EDTA	etyléndiamíntetraoctová kyselina
ELFO	elektroforéza

---

EMBL	Európske molekulárno-biologické laboratórium (databáza nukleotidových sekvencií)
ESR	estrogénový receptor
F	hodnota F – testu
FISH	fluorescenčná in situ hybridizácia
FSH	folikulostimulačný hormón
g	gram
g	preťaženie
GH	rastový hormón
GHR	receptor rastového hormónu
HCl	kyselina chlorovodíková
HRM	high resolution melting
IF	inhibičná doména
kb	kilobáza
l, dm <sup>3</sup>	liter
LBD	ligand väzbová doména
LH	luteinizačný hormón
LOH	strata hyterozygótnosti
m	meter
m	mili 10 <sup>-3</sup>
M	molarita
M	morgan
MAS	markermi asistovaná selekcia
MCR	melanokortínový receptor
mol	jednotka látkového množstva
mRNA	mediátorová ribonukleotidová kyselina
MS	stredné štvorce
MSH	melanodytový stimulačný hormón
MSTN	myostatín
mtDNA	mitochondriová DNA

---

---

n	nano $10^{-9}$
OVGP1	oviduktálny glykoproteín
p	piko $10^{-12}$
P	preukaznosť
p.n.l	pred naším letopočtom
PAGE	polyakrylamidový gel
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PG	progesterón
PGR	progesterónový receptor
PR-A	progesterónový receptor A
PR-B	progesterónový receptor B
PRAKO	knock-out PGR-A
PRBKO	knock-out PGR-B
PRKO	knock-out PGR
QTL	lokusy kvantitatívnych vlastností
RFLP	polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov
rRNA	ribozómová ribonukleotidová kyselina
SDS	sodium dodecylsulfat
SNP	jednonukleotidový polymorfizmus
SSCP	jednovláknový konformačný polymorfizmus
TAE	tris – kyselina octová – EDTA pufor
TBE	tris – borate – EDTA pufor
TGF	transformačný rastový faktor
TIMP	tkanivový inhibítor metaloproteináz
tRNA	transferová ribonukleotidová kyselina
U	jednotka (Unit)
V	volt (jednotka elektrického napätia)
W	watt (jednotka elektrického výkonu)
Z Rex	zdrobnelý rex

Z Rex b	zdrobnelý rex biely
Z Spa Rex	zdrobnelý slovenský pastelový rex

---

## ÚVOD

Produkcia mäsa má najväčší podiel z celkovej produkcie hospodárskych zvierat, pričom sa zohľadňuje nielen kvantita, ale aj kvalita mäsa. V chove a produkcii brojlerových králikov sa sústreďuje pozornosť hlavne na definovanie vzťahov medzi úžitkovosťou, ktorá je funkciou genetiky, reprodukcie a fyziológie (genotyp, počet mláďat vo vrhu, rast živej hmotnosti, jatočná výťažnosť, zdravotný stav) a chovným prostredím (výživa, technológia, ustajnenie). Z plemenárskeho hľadiska je chov brojlerových králikov zameraný na získavanie zvierat, ktoré majú dedične podmienenú vysokú mäsovú úžitkovosť, ktorá je ovplyvnená reprodukciou, rastom, výkrmnosťou, jatočnou výťažnosťou a odolnosťou voči chorobám a podmienkam prostredia. Princípom šľachtiteľskej práce zameranej na tvorbu vysokoúžitkových zvierat je výber vhodných plemien, ktoré sú nositeľmi znakov a vlastností spojených s intenzívnou mäsovou produkciou. Chov brojlerových králikov má pre relatívne malú náročnosť na chovný priestor, rýchly rast a schopnosť produkovať mäso s dietetickými vlastnosťami, s nízkym obsahom cholesterolu, vzrastajúcu tendenciu. To je hlavným dôvodom pokračujúcej intenzifikácie a racionalizácie chovu, ktorá si vyžaduje cieľavedomé plánovanie a regulovanie priebehu reprodukčného cyklu pri samiciach.

Hoci je králik širokospektrálne využívaným biologickým druhom, či už pre jeho úžitkové vlastnosti, alebo pre experimentálne účely, existuje pomerne málo štúdií zameraných na genóm králika a na genetické pozadie fenotypu a ochorení králika. V niekoľkých posledných rokoch sa objavili projekty, ktorých cieľom bolo sekvenovať gény, ktoré predstavujú pri iných druhoch hospodárskych zvierat kandidátske gény pre mäsovú úžitkovosť a reprodukciu (napr. MSTN, MC4R, PG, PGR, ESR). V mnohých prípadoch sa však ukázalo, že sekvencia týchto génov je vysoko konzervatívna. Pri ďalších génoch boli zistené jedno a viacnukleotidové polymorfizmy, o ktorých sa predpokladá, že by mohli byť spojené s produkciou alebo reprodukciou zvierat. Vzhľadom na to, že takýchto štúdií je do dnešného dňa pomerne málo, je potrebné systematicky pokračovať v experimentoch, ktoré by mohli viesť k odhaleniu kandidátskych génov králika a dopĺňať ich asociačnými štúdiami, ktoré by definitívne potvrdili prípadnú existenciu takýchto génov. Ak by sa podarilo objaviť genetické markery úžitkovosti, bolo by možné v chove králikov aplikovať MAS, ktorá by

umožňovala identifikáciu najkvalitnejších zvierat na základe ich genotypu. Tým by sa zefektívnila selekcia na vysokú úžitkovosť v rámci chovu.

V našej práci sme sa zamerali na analýzu troch génov kráľika, z čoho jeden súvisí s mäsovou úžitkovosťou, ďalší s reprodukciou a posledný so sfarbením srsti, čím sme pokryli prakticky všetky oblasti úžitkovosti kráľika. Pri všetkých týchto génoch boli identifikované jednonukleotidové polymorfizmy, ale ich spojenie s úžitkovosťou kráľika nebolo jednoznačne potvrdené, keďže do dnešného dňa bolo uskutočnených len veľmi málo asociačných štúdií.

# 1 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY DOMA A V ZAHRANIČÍ

## 1.1 História, taxonomické zaradenie a význam chovu králikov

Odborný názov králika, *Oryctolagus cuniculus*, pochádza pôvodne z gréckeho slova „*oructes*“ – hrabavý, „*lagos*“ – srst' a „*konisklos*“ - králik. Králik je malý bylinožravec z čeľade zajacovité (*Leporidae*), radu zajacotvaré (*Lagomorpha*) a triedy cicavce (*Mammalia*). Čeľaď *Lagomorpha* je fylogeneticky blízka čeľadi Rodenta na základe podobnosti usporiadania čeľuste a zubov.

Výskyt králika je úzko spojený so Španielskom, kde sa našli prvé fosílie rodu *Oryctolagus* už z obdobia 5 miliónov rokov p.n.l. V dnešnej dobe radíme do rodu *Oryctolagus* len druh *Oryctolagus cuniculus*, kde najstaršie fosílie pochádzajú z Andalúzie z obdobia 800 000 – 130 000 rokov p.n.l. Odtiaľ sa postupne králik rozšíril do Francúzska, západnej Európy a severozápadnej Afriky. Aj v dnešnej dobe sa divý králik vyskytuje v západnej Európe, od Švédska po Španielsko a severnú Afriku, nenachádza sa na území od Talianska po Švajčiarsko (Rogel- Gaillard et al., 2009).

Veľký pokrok v chove králikov nastal v 19. storočí v Európe vznikom nových stredných a veľkých plemien. Prvé pokusy o farmový chov zameraný na produkciu mäsa sa začali v šesťdesiatych rokoch 19. storočia. Na Slovensku sa chov králikov rozšíril v 19. storočí. V roku 1856 vzniklo v Malackách osem chovateľských krúžkov, kde sa chovatelia oboznamovali s poznatkami o králikoch (Rafay, 2002). Chovy s prvkami intenzívnej produkcie sa začali formovať na základe vyspelých európskych štátov a ich cieľom bola výroba špecializovaných jatočných brojlerov.

V chove a produkcii brojlerových králikov sa sústreďuje pozornosť hlavne na definovanie vzťahov medzi úžitkovosťou, ktorá je funkciou genetiky, reprodukcie a fyziológie (genotyp, počet mláďat vo vrhu, rast živej hmotnosti, jatočná výťažnosť, zdravotný stav) a chovným prostredím (výživa, technológia, ustajnenie). Točka (1992) uvádza nasledovné výhody chovu králikov v porovnaní s inými druhmi zvierat:

- nízke zriaďovacie náklady
- krátky generačný interval a vysoká reprodukčná schopnosť
- viacúčelová úžitkovosť (produkcia mäsa, kožíek, srsti a hnoja)

- dobré využitie podielu vlákniny z kŕmnej dávky
- vyvážená domáca spotreba a stabilný dopyt po králičom mäse v zahraničí.

Využitie králika je predovšetkým na mäsovú úžitkovosť, pričom vďaka vysokej plodnosti a vysokej konverzii krmiva je veľmi významným druhom z ekonomického hľadiska. Najčastejšie využívanými plemenami pre mäsovú úžitkovosť sú novozélandský a kalifornský králik pre vysokú plodnosť (Rogel-Gaillard et al., 2009). Mäsové plemená dosahujú pohlavnú dospelosť vo veku štyroch mesiacov, gravidita trvá 30 - 32 dní a priemerná veľkosť vrhu je viac než 9 mláďat. Metabolizmus králika umožňuje konverziu až 20% proteínov z krmiva na vysokokvalitné mäsové bielkoviny. Pri ošípaných je to len 16 – 18% a pri hovädzom dobytku len 8 – 12%. Porážkový vek králikov sa pohybuje v rozmedzí 10 – 12 týždňov.

Kedysi boli králiky využívané na kožu a srst, ale v dnešnej dobe sú tieto len vedľajšími produktmi získavanými popri mäse králikov. Králiky s vysokokvalitnou srstou sú chované obvykle len na malých farmách. Dôvodom je, že porážkový vek 10 – 12 týždňov je príliš nízky na získanie kvalitnej kožušiny, ktorá by bola vhodná na spracovanie. Vo všeobecnosti ale platí, že využitie králičej srsti vysoko prevyšuje využívanie srsti iných zvierat (Rogel – Gaillard, 2009).

Ďalšia možnosť využitia králika je pre laboratórne pokusy ako experimentálne zviera. Fyziológia králika je dostatočne podobná fyziológii človeka, preto má významnú úlohu pri biomedicínskych pokusoch, pre zlepšovanie diagnostických metód a liečenie rôznych ochorení, ktoré postihujú človeka. Aj v tomto prípade zohrávajú významnú úlohu vlastnosti ako malé rozmery králika, vysoká plodnosť a krátka gravidita. V neposlednom rade je skutočnosť, že napríklad bunky, tkanivá aj orgány králika sú dobre preštudované a v mnohých ohľadoch sa podobajú ľudským viac než potkanie alebo myšie (Rogel- Gaillard et al. et al., 2009). Keďže sú to malé zvieratá, práca s nimi je ekonomická a jednoduchšia než pri veľkých zvieratách, akými sú napr. ošípané, súčasne však poskytujú dostatok materiálu (krv, mlieko, tkanivo) pre experimenty.

Vo všeobecnosti možno konštatovať, že králik má rozhodujúci význam pre štúdium reprodukcie, embryológie, metabolizmu, imunity a rôznych ochorení (kardiovaskulárne ochorenia, rakovina, myopatie a pod.).



## 1.2 Mäsová úžitkovosť kráľíka

### 1.2.1 Charakteristika kráľíčieho mäsa

Mäso je pre výživu ľudského organizmu zdrojom nenahraditeľných bielkovín, vápnika, poskytuje ľahko vstrebateľné formy železa a vitamínu B12. Mäso kráľíkov predchádza hovädzie aj bravčové mäso a svojim zložením sa podobá mäsu kuraciemu. Kráľíčie mäso patrí medzi dietetické druhy mias s vysokým obsahom stráviteľných bielkovín, nízkym obsahom tuku a cholesterolu (Rafay, 1996, Alasnier - Gandemer, 1998, Dalle-Zotte, 2002) a menším množstvom kalórií než má mäso hovädzie, bravčové a dokonca aj kuracie. Obsah bielkovín v kráľíčom mäse sa s vekom zvierat zvyšuje. Novorodené mláďatá majú len 12 % bielkovín, pri desaťmesačných už táto hodnota prekračuje 21 %. Kvalita bielkovín mäsa z hľadiska ľudskej výživy je podmienená množstvom a vzájomným pomerom základných stavebných komponentov - aminokyselín. Vo veku 3 až 4 mesiace je optimálny podiel esenciálnych aminokyselín.

Kráľíčie mäso patrí medzi tzv. biele mäsa s jemnými svalovými vláknami, malým množstvom spojivového tkaniva, nízkym obsahom tuku a s dobrou stráviteľnosťou. Mäso z mladých zvierat je chutné a výživné. Vhodne upravené sa odporúča pri rôznych chorobách žalúdka, čriev, žlčníka, pečene (najmä pri žltacke), pri srdcových a obličkových chorobách, cukrovke, chudokrvnosti atď. Kráľíčie mäso obsahuje minimálne množstvo purínových látok, kvôli čomu je vhodnou potravinou pri chorobách akými sú dna a močové kamene, pri ktorých sa nedostatočne vylučuje z tela kyselina močová. Hladina cholesterolu je tiež nižšia v porovnaní s kuracím alebo teľacím mäsom, preto je významnou potravinou v boji proti ateroskleróze (Lukefahr et al., 1989). V 100 g mäsa sa nachádza priemerne 20 až 25 mg cholesterolu, v mäse hovädzom 45 až 50 mg, v teľacine 40 až 80 mg, v hydinovom mäse 30 až 100 mg a v bravčovom až 130 mg.

Nízka hladina tuku je dôvodom slabšej šťavnatosti kráľíčieho mäsa, čo potvrdzuje aj výskum Oliver et al. (1997), ktorý zároveň uvádza, že zvýšiť šťavnatosť mäsa kráľíkov je možné dosiahnuť zvýšeným príjmom tukov kráľíkmi. V jatočnom tele starších a dobre kŕmených kráľíkov môže intramuskulárny tuk dosahovať hodnotu až 15 %. Okrem toho sa tuk ukladá aj pod kožou, nad lopatkami, v slabinách a okolo vnútorných orgánov (obličky, srdce, črevá). Kvalita podkožného, vnútorného

---

a svalového tuku je relatívne rovnaká a prispieva k dobrým chuťovým vlastnostiam mäsa.

Významnou vlastnosťou králičieho tuku je aj jeho chemická skladba. Vyznačuje sa vysokým podielom nenasýtených mastných kyselín a priaznivým pomerom nenasýtených a nasýtených mastných kyselín. Na základe biochemickej analýzy králičieho mäsa možno objektívne posúdiť dietetické vlastnosti tejto suroviny. V porovnaní s najčastejšie konzumovanými druhmi mäsa sa vyznačuje vyšším obsahom plnohodnotných bielkovín, vitamínov skupiny B, makroprvkov, ako je fosfor, draslík, sodík a mikroprvkov, ako je zinok, meď a železo (Rogel – Gaillard, 2009).

Z dietetických vlastností je na prvom mieste stráviteľnosť mäsa. Podľa výsledkov rôznych pokusov sa strávi z čistej svaloviny 93 – 96 % bielkovín, 90 – 93 % tukov, 97 % glycidov a 81 % minerálnych látok. Na stráviteľnosť má vplyv hlavne obsah tuku a obsah neplnohodnotných bielkovín (Dalle-Zotte et al., 2002). Vysokú stráviteľnosť bielkovín králičieho mäsa podmieňuje rovnomernejšie rozloženie spojivových tkanív vo svaloch mladých zvierat. Mäso starých králikov je horšie stráviteľné, pretože obsahuje viac hrubších spojivových tkanív. Za stráviteľnejšie považujeme tuky s nižším bodom topenia. Do tejto skupiny patrí aj králičí tuk. Zložením sa podobá najmä tukom hydiny. Mäso mladých (desaťtýždňových) králikov obsahuje 1,5 – 1,8 % tuku, mäso starších zvierat podľa stupňa vykúrenosti 5 – 9 % tuku (Dalle-Zotte et al., 2002). Vďaka zreniu je mäso jemné, mäkké, krehké, šťavnaté a so špecifickou chuťou a vôňou. Napriek mnohým prednostiam králičieho mäsa vo výžive ľudí nie je na Slovensku zabezpečený pravidelný cyklus výkupu živých králikov, ich spracovania a distribúcie jatočných produktov z králičieho mäsa do spotrebiteľskej siete (Rafay, 1996).

### **1.2.2 Faktory ovplyvňujúce kvalitu mäsa a jatočnú výťažnosť**

Králiky chované pre mäsovú úžitkovosť sú získavané zo selekčných programov, ktoré sú založené na trojplemennom krížení, kde dosahujú dospelé jedince hmotnosť v rozmedzí 4 až 5 kg a ich porážková hmotnosť (vo veku 11 až 13 týždňov) sa obvykle líši len minimálne (Ouhayoun, 1998). Rozdiely medzi líniami v rámci mäsovej kvality sú slabé, čo znamená, že králičie mäso vykazuje stálosť v kvalite mäsa. Selekčné programy selektujú zvieratá na rýchly rast. Zároveň sa tieto programy snažia o zvýšenie efektivity kľmenia a skrátenie chovného času. Selekcia na rýchly rast ale môže

podporovať glykolýzu vo svaloch a následne znížiť kvalitu mäsa, napr. jemnosť (Piles et al., 2000), chuť a šťavnatosť stratou intramuskulárneho tuku (Ouhayoun, 1993).

Pokiaľ ide o hmotnosť jatočného tela, Ouhayoun et al. (1998) uvádzajú, že hmotnosť králikov pri porážke je ovplyvnená živou hmotnosťou králikov pri odstave. Zároveň zistili, že jedince s najväčšou hmotnosťou majú najväčší príjem krmiva a najvyššie priemerné denné prírastky, ale najhoršiu konverziu krmiva. Sledovali tiež vplyv ročného obdobia na rast králikov a zistili, že najnižšie priemerné denné prírastky mali králiky v lete, najvyššie v zime. Toto zistenie bolo v roku 2006 potvrdené v práci Argente et al. (2006). Uvádzajú, že počas letného obdobia poklesla intenzita rastu mladých králikov o 14% a po odstave až o 28%.

Ďalším faktorom ovplyvňujúcim intenzitu rastu je početnosť vrhu. Čím je menší počet mláďat vo vrhu, tým vyššie sú hodnoty individuálnej intezity rastu (Ouyed, Brun, 2008).

Bielanski et al. (2004) sa zaoberali vplyvom genetickej variability na rast králikov. Do výskumu zahrnuli niekoľko plemien králikov (novozélandský biely, kalifornský, činčila veľká, aljaška) a najrýchlejší rast zaznamenali pri plemene novozélandský biely (mäsová línia) a línii genia, kde bol priemerný denný prírastok 42 a 40g. Najhoršie výsledky zaznamenali pri plemenách kalifornský a aljaška. Rochambeau et al. (1996) zistili, že genetické faktory majú významný vplyv na konverziu krmiva a na rýchlosť rastu zvierat.

### **1.2.3 Ukazovatele jatočnej kvality králikov**

Hodnota jatočnej výťažnosti králikov je ovplyvnená mnohými faktormi. Mach et al. (2007) uvádza genotyp králika, výživu a vek. Zároveň tieto faktory rozdelil na genetické a negenetické. Ku genetickým zaradil genetický pôvod a zvolenú modifikáciu hybridizačných programov. Z negenetických faktorov, ktoré ovplyvňujú jatočné parametre, je to hlavne vplyv výživy, vek pri porážke, živá hmotnosť jedinca pri porážke a pohlavie. Rafay (2005) uvádza priamy alebo nepriamy vplyv prostredia na zvieratá. Gongret et al. (2005) zistili, že rozdiely v jatočnej kvalite sú nielen medzi líniami, ale dokonca aj medzi fenotypovo rozdielnymi jedincami toho istého genotypu v rovnakých chovateľských podmienkach. Využívaním obrovitých plemien dochádza k skracovaniu obdobia výkrmu, čo je pozitívny ekonomický prvok chovu. Vzhľadom k tomu, že porážková hmotnosť brojlerových králikov je limitovaná trhom, obrovité

králiky sú porázané v mladšom veku, to znamená že majú nižší stupeň telesnej vyspelosti. To spôsobuje pokles hodnôt jatočnej výťažnosti finálneho produktu. Hernández (2000) uvádza, že pri zvieratách s rovnakým genotypom boli dokázané vyššie hmotnosti jatočného tela jedincov porázaných vo vyššom veku v porovnaní s jedincami porázanými skôr. Okrem toho sa mení aj kompozícia jatočného tela, ktorá súvisí s nerovnomerným rastom – alometriou. Pascual et al. (2007) zistili, že pri selekcii zvierat na rýchlosť rastu bol dosiahnutý nárast hodnôt podielu pečene a obličiek na jatočnom tele a zároveň klesol podiel mäsa ku kosti na stehne králikov. To znamená, že mladšie zvieratá majú nižšie hodnoty jatočnej výťažnosti v porovnaní so staršími zvieratami. Zároveň platí, že stupeň vyspelosti jatočného tela je pri králikoch šľachtených na rýchlosť rastu nižší. Rýchlorastúce zvieratá majú vyšší podiel vnútorných jedlých orgánov a hlavy k celkovej hmotnosti tela. Pri menších línách uvádza Pla et al. (1996) najvyšší podiel zadnej časti na jatočnom tele. Podiel cenných častí jatočného tela králika (chrbát a stehná) je vyšší pri menších plemenách než pri obrovitých králikoch. S narastajúcim vekom klesá podiel vnútorných jedlých orgánov jatočného tela. Keďže vnútorné orgány sú rýchlorastúcim tkanivom, ich podiel je podstatne vyšší pri králikoch selektovaných na intenzívny rast (Piles et al., 2000).

#### **1.2.4 Jatočná výťažnosť králikov a kvalita jatočného tela**

Hmotnosť jatočného tela je významným ekonomickým ukazovateľom, pričom jatočnú výťažnosť je možné charakterizovať ako podiel konzumovateľných častí z celkovej živej hmotnosti zvieratá pred porážkou. Pri králikoch dosahuje jatočná výťažnosť 50-65%, odvodzuje sa od nej jatočná hodnota zvieratá. Súčasťou jatočného tela je hlava, pečeň, obličky a orgány hrudnej dutiny. Najhodnotnejšími časťami jatočného tela sú stehná a chrbát. Kvalita jatočného tela je ovplyvnená genetickými aj negenetickými faktormi. Radíme k nim genetickú hodnotu zvierat, hmotnosť tela pred porážkou, vek zvieratá pri porážke, výživu, zdravotný stav a technológiou chovu, ale aj pohlavie. Králičie mäso má veľmi priaznivý pomer aminokyselín a mastných kyselín. Zároveň má nízky obsah cholesterolu (Dalle, Zolte, 2002) a vysoký podiel polynenasýtených mastných kyselín. Vďaka tomu je králičie mäso porovnateľné s mäsom rýb. Patrí medzi najjemnejšie druhy mias. Vzhľadom na nízky obsah intramuskulárneho tuku je menej šťavnaté v porovnaní s inými druhmi mias a má aj najmenej výraznú vôňu.

## **1.3 Reprodukcia králikov**

### **1.3.1 Pohlavné orgány králika**

V prirodzených podmienkach sú divé králiky reprodukčne aktívne v období od apríla do septembra, čo je dané klimatickými podmienkami v našom geografickom pásme. Sezónnosť reprodukcie je daná dĺžkou slnečného svitu, ktorá stimuluje hormonálne systémy. V umelých podmienkach sa táto vlastnosť využíva na trvalé udržanie reprodukcie vo farmových chovoch (Rafay et al., 2009).

Samičie pohlavné orgány sú zložené z párových vaječníkov, vajcovodov, maternice a jednej vagíny. Maternica je dvojité, rohy maternice sa predlžujú do samostatného krčka maternice. Pohlavné bunky sa tvoria už počas vnútromaternicového vývoja, prvé folikuly sa vytvárajú 13. deň po okotení. Pohlavne dospievajú samice vo veku 4 – 8 mesiacov podľa plemena, chovných podmienok a výživy. Do reprodukcie bývajú zaradené vo veku 17 – 18 týždňov. Platí, že pri prvom párení by samica mala mať 80% z dospeljej živej hmotnosti. Urýchliť nástup pohlavnej dospelosti možno dostatočnou výživou.

Samčie pohlavné orgány sú tvorené semenníkmi, prísemenníkmi, mechúrikovitými žľazami, predstojnou žľazou, Cowperovými žľazami a pohlavným údom. Spermioγένéza začína medzi 40. – 50. dňom veku (Rafay, 1993) a spermie v ejakuláte je možné nájsť od 110. dňa veku. Pohlavná dospelosť samcov nastáva približne vo veku 30 týždňov a je charakterizovaná ako čas, kedy sa už nezvyšuje koncentrácia spermií v ejakuláte.

### **1.3.2 Pohlavný cyklus králika**

Samice králika sú polyestrické zvieratá, je u nich teda predpoklad cyklickej ruje. Ovuľácia samíc je provokovaná, vajíčka ovulujú pri podráždení receptorov vo vagíne pri koite. Prirodzeným stimulom ovuľácie je párenie, alebo prítomnosť samca v blízkosti samice. Predpokladom spustenia fyziologických procesov vedúcich k ovuľácii je komplex vyhovujúcich podmienok chovného prostredia (mikroklíma, ustajňovacie zariadenia, organizácia práce). Pri samiciach, ktorým sa nedá stimulovať ovuľácia úpravou podmienok prostredia možno použiť sérový gonádotropný hormón –

---

PMSG. Podáva sa intramuskulárne v dávke 15 - 25 m.j. na zviera, prípadne intravaginálne, kedy sa mieša s insemináčnou dávkou (Ondruška, 2008). Po 48 - 50 hodinách po aplikácii Sergonu sú samice pripravené na párenie. Hormonálna stimulácia ovulácie sa najčastejšie používa pri samiciach, ktoré zároveň laktujú (na Slovensku sa najčastejšie používa analóg LHRH – Supergestran v dávke 0,2 ml bezprostredne po inseminácii. Produkcia mlieka (laktácia) je totiž udržiavaná hormónmi, ktoré pôsobia proti ovulácii a gravidite. Vzhľadom k tomu, že perspektívne bude potrebné v živočíšnej výrobe odstrániť všetky exogénne pridávané biologicky aktívne látky (rastové antibiotiká, hormóny, chemoterapeutiká), robia sa pokusy s biologickou stimuláciou samíc králikov, ktoré zároveň laktujú. Okrem spôsobov používaných pri prvôstkach (flushing, fotorežim) sa overujú aj ďalšie metódy. Jednou z nich je regulovaná laktácia, pri ktorej sa samiciam zabráni počas 24 - 36 hodín prístup na hniezdo. Ďalšou metódou na zvýšenie ovulačnej schopnosti je krátkotrvajúci stres spočívajúci v prenesení samice 1 - 2 dni pred párením (insemináciou) do inej kľetky.

Yamani et al (1991) študovali vplyv negenetických faktorov na reprodukčné vlastnosti samíc. Pokus uskutočnili na plemene novozélandský biely králik. Sledovali vplyv ročného obdobia, opakovaného párenia, hmotnosti samíc, parity a veľkosti vrhu pri narodení na produkčné a reprodukčné ukazovatele. Priemerná dĺžka gravidity, počty mŕtvo narodených mláďat a mortalita pred odstavom boli preukazne vyššie na jar a v lete v porovnaní s jeseňou a zimou. Veľkosť vrhu pri odstave, celková mliečnosť a hmotnosť mláďat preukazne stúpali počas jesene a zimy. Zároveň sa preukázalo, že ročné obdobie má vplyv aj na konverziu mlieka v druhom týždni laktácie. Najmenšia priemerná hmotnosť mláďat bola pozorovaná počas letného obdobia, zatiaľ čo na jar dosahovali zvieratá najvyššie priemerné hmotnosti počas celého obdobia pred odstavom (0 – 25 dní). V zime boli najvyššie priemerné hmotnosti mláďat pri narodení. Tieto výsledky potvrdili vo svojej práci aj Belhadi et al. (2004).

Dĺžka obdobia medzi dvomi páreniami preukázala signifikantný rozdiel v koncepcnom pomere, konverzii mlieka počas prvého týždňa a priemerný denný prírastok v období medzi 22 – 25 dňom. Tiež mliečnosť v treťom týždni bola preukázateľne vyššia. Samice pripustené 5 dní po pôrode zaznamenali vyššiu početnosť vrhu pri okotení a pri odstave, vyššiu mliečnosť a vyššie hmotnosti mláďat než samice pripustené 1 alebo 10 dní po pôrode. Zároveň samice pripustené 5 dní po pôrode

vykazovali nižšie percento mŕtvo narodených mláďat a nižšie percento úhynov pred odstavom.

Hmotnosť samíc tiež ovplyvnila reprodukčné vlastnosti. Samice vážiace viac ako 4 kg mali vyššie koncepčné pomery, celkovú mliečnosť, hmotnosť vrhu pri odstave a priemernú hmotnosť mláďat a zároveň bolo preukázateľne nižšie percento mŕtvonarodených mláďat a nižšia úmrtnosť pred odstavom v porovnaní so samicami, ktoré vážili menej ako 4 kg. Belhadi et al. (2004) uskutočnili podobný experiment a konštatovali, že na rozdiel od výsledkov, ktoré uverejnili Yamani et al. (1991), nezaznamenali signifikantné rozdiely vo veľkosti vrhu v závislosti od hmotnosti matky.

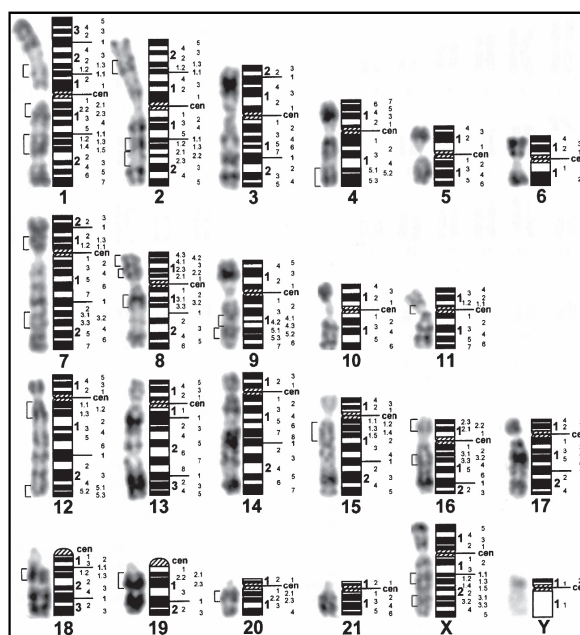
Aubote a Akinokun (1990) zistili, že parita signifikantne ovplyvňuje hmotnosť vrhu pri okotení. Gianola a Tyler (1974) uvádzajú ako dôvod vplyvu parity na reprodukciu kombináciu zvýšeného príjmu výživy embryami a zväčšenie placenty. Yamani et al. (1991) zistili, že parita samíc neovplyvňovala dĺžku gravidity, veľkosť pri narodení ani konverziu mlieka. So stúpajúcou paritou stúpala aj početnosť vrhu pri odstave, tiež bol preukázateľný rozdiel v hmotnosti vrhu a mliečnosti. Hmotnosť mláďat, počet mŕtvo narodených zvierat a mortalita pred odstavom boli signifikantne vyššie pri prvom, druhom a treťom kotení. Singh et al. (2004) nepozorovali signifikantný vplyv parity na početnosť vrhu.

Yamani et al. (1991) tiež zistili preukázateľný nárast početnosti vrhu pri odstave, hmotnosti vrhu pri okotení a nárast priemernej hmotnosti mláďat v závislosti od početnosti vrhu pri okotení. Vrhly, v ktorých bolo 5 až 7 mladých vykazovali nižšiu úmrtnosť pred odstavom v porovnaní s vrhmi, kde bolo viac ako 10 mláďat. Veľkosť vrhu preukázane ovplyvňovala aj výťažnosť mlieka. Na dĺžku gravidity, počet mŕtvo narodených mláďat, konverziu mlieka a hmotnosť zvierat v treťom týždni života nemala vplyv.

## 1.4 Genóm kráľika

Hoci je králik domestikovaným druhom a má široké využitie, existuje pomerne málo štúdií zameraných na genóm kráľika a na genetické pozadie fenotypu a ochorení kráľika. Painter (1926) zistil, že karyotyp kráľika obsahuje 44 chromozómov. Neskôr bolo toto zistenie potvrdené chromozómovou analýzou bunkových kultúr (Nichols et al., 1965). Presná identifikácia všetkých 22 chromozómov sa uskutočnila až po objavení

chromozómového bandingu. Prvýkrát sa farbením chromozómov zaoberal Echard (1973). Tieto štúdie ukázali, že chromozómy kráľika patria do štyroch skupín podľa uloženia centroméry. Dvanásť metacentrických, päť submetacentrických, šesť submetacentrických s kratším p ramenom a štyrmi akrocentrickými chromozómami. Piatu skupinu tvoria pohlavné chromozómy. X-chromozóm je jedným z najväčších submetacentrických chromozómov, Y-chromozóm je najmenším. Rozdelenie chromozómov do týchto piatich skupín sa uskutočnilo na základe merania relatívneho DNA obsahu, centromérového indexu a relatívneho obsahu DNA na krátkom a dlhom ramene. Zistilo sa, že chromozómy 13, 16 a 21 nesú jadrové regulačné úseky (Zijlstra et al. 2002). Do dnešného dňa neboli zistené žiadne spontánne chromozomálne abnormality, čo môže byť vysvetlené absenciou systematického cytogenetického skúmania v populácii kráľika.



Obrázok 1: Karyotyp a idiogram kráľika (Hayes et al., 2002)

#### 1.4.1 Molekulárne markery

Bolet et al. (2000) vypracoval správu, ktorá hodnotila genetické zdroje kráľika použiteľné pre zootecnickú prax a štúdium biodiverzity. Publikoval kompletný zoznam dostupných genetických markerov kráľika. Práca zahŕňala RFLP analýzy, sekvenačné analýzy mtDNA, genotypy 28 mikrosatelitov, stanovenie haplotypov hlavného histokompatibilného systému na základe RFLP analýzy a polymorfizmu kazeínu mlieka, proteínov červených krviniek a imunoglobulínov.



#### **1.4.2 mtDNA markery**

Mitochondriálna DNA vykazuje maternálnu dedičnosť a je vhodná na stanovenie materských línií. Gissi et al. (1998) sekvenovali mtDNA kráľika a určili jej veľkosť na 17,145 bp. Molekulárne markery boli navrhnuté z mtDNA na hodnotenie genetickej diverzity divých a domestikovaných plemien v Európe (Bolet et. al., 2000) a v Číne (Long et al., 2003), pre štúdium fylogeografie a na porovnanie dnešných zvierat s prehistorickými. Dve mtDNA sekvencie, označené ako B1 a B3-4 s 2% nukleotidovou divergenciou v nekódujúcom regióne môžu byť simultánne stanovené použitím dvoch RFLP markerov (Queney, 2002). Prvý marker zodpovedá úseku cytochrómu b s veľkosťou 565pb po štiepení AluI a druhý marker zodpovedá fragmentu 586bp nekódujúceho úseku po štiepení RsaI. Ďalšími metódami je priame sekvenovanie mtDNA fragmentu (Branco et al., 2002).

#### **1.4.3 RFLP markery**

Králik je hodnotným modelom pre transplantačné štúdie, veľký význam má predovšetkým určenie interakcie medzi donorom a recipientom pred transplantačnou operáciou. RFLP markery sa javia ako relevantné molekulárne nástroje pre identifikáciu haplotypov histokompatibilného systému triedy I a II králičích leukocytárnych antigénov (Boyer et al., 2005). Zároveň je možné ich použiť pre štúdium alelickej diverzity imunoglobulínov.

RFLP markery nachádzajú pri králikovi v posledných rokoch využitie aj pri určovaní polymorfizmov v génoch, ktoré sú zodpovedné za tvorbu úžitkových vlastností, ako napríklad rast králikov a kvalita mäsa, reprodukčné vlastnosti (prežívanie embryí, početnosť vrhov) a tiež kvalita a sfarbenie srsti (Fontanesi et al., 2008, Peiró et al., 2008). Na rozdiel od iných druhov hospodárskych zvierat však bolo zatiaľ potvrdených len veľmi málo RFLP markerov s asociáciou k úžitkovým vlastnostiam kráľika.

#### **1.4.4 AFLP markery**

Analýza dĺžky amplifikovaných fragmentov je pomerne jednoduchá metóda, ktorou je možné bez znalosti sekvencie stanoviť veľké množstvo markerov. Štúdiom

---

králičích AFLP markerov sa zaoberal van Haeringen et al. (2001, 2002), ktorý skonštruoval genetickú mapu obsahujúcu 103 AFLP markerov distribuovaných v 12 väzbových skupinách. Táto mapa zahŕňa približne 33% celého genómu králika (583cM).

#### 1.4.5 Mikrosatelity

Medzi najpoužívanejšie markery patria nekódujúce extragénové segmenty DNA – mikrosatelity, ktoré sú dostačujúce pre detekciu lokusov ekonomicky významných znakov (Čepica, 2002). Nepresnosť mikrosatelitov je podmienená neúplnou väzbou medzi mikrosatelitom a detegovaným QTL, v dôsledku ktorej dochádza k rekombináciám (Webb, 2000, Jakubec, 2002a). Preto sa uplatňujú predovšetkým pri určovaní genetických vzdialeností a genetickej diverzity populácií (Kolářová et al., 2000). Avšak pre podrobné mapovanie chromozómových úsekov obsahujúcich QTL je nevyhnutný vývoj ďalších genetických markerov (Webb, 2000, Čepica, 2002).

Mikrosatelity sú najpopulárnejšími genetickými markermi a objavil ich Miesfeld et al. (1981). Majú ubikvitárny výskyt, sú známe tým, že sú vysoko polymorfne s veľkým počtom alel a sú interpretované ako kodominantné markery. PCR metódy využívané na štúdium mikrosatelitov prispievali k rozsiahlemu pokroku v tejto oblasti. Eficiencia genetických máp založených na mikrosatelitoch pre QTL mapovanie je založená na počte a distribúcii mikrosatelitov na chromozóme. Využitie králičích mikrosatelitov pre genetické mapovanie bolo znemožnené nedostatkom dobre charakterizovaných markerov. Hoci do roku 2003 bolo uvedených viac ako 200 mikrosatelitov, väčšina z nich nebola vsadená do žiadnej existujúcej väzbovej skupiny alebo cytogenetickej mapy. Väčšina týchto mikrosatelitov bola obnovená nukleotidovou databázou EMBL a obsahovala prvú podskupinu 181 markerov (van Lith a van Zutphen, 1996), druhú podskupinu 3 markerov a tretiu podskupinu 23 markerov. V ďalšej skupine bolo 15 markerov (Rico et al., 1994, SurrIDGE et al. 1997). Tieto markery boli potom využité na štúdium biodiverzity (Bolet et al. 2000, Queney et al. 2001) a na genetické mapovanie (Korstanje et al., 2003). Napriek mnohým snahám o získanie mikrosatelitov, ktoré by boli vhodné na genetické mapovanie, mikrosatelitová genetická mapa celého genómu stále nebola zostavená. Bol spustený program na vytvorenie integrovanej genetickej a cytogenetickej mapy pre tento druh

s využitím mikrosatelitov so známou cytogenetickou pozíciou. V dnešnej dobe je počet králičích mikrosatelitov 400 a mnoho z nich už je lokalizovaných v konkrétnom géne.

#### **1.4.6 QTL**

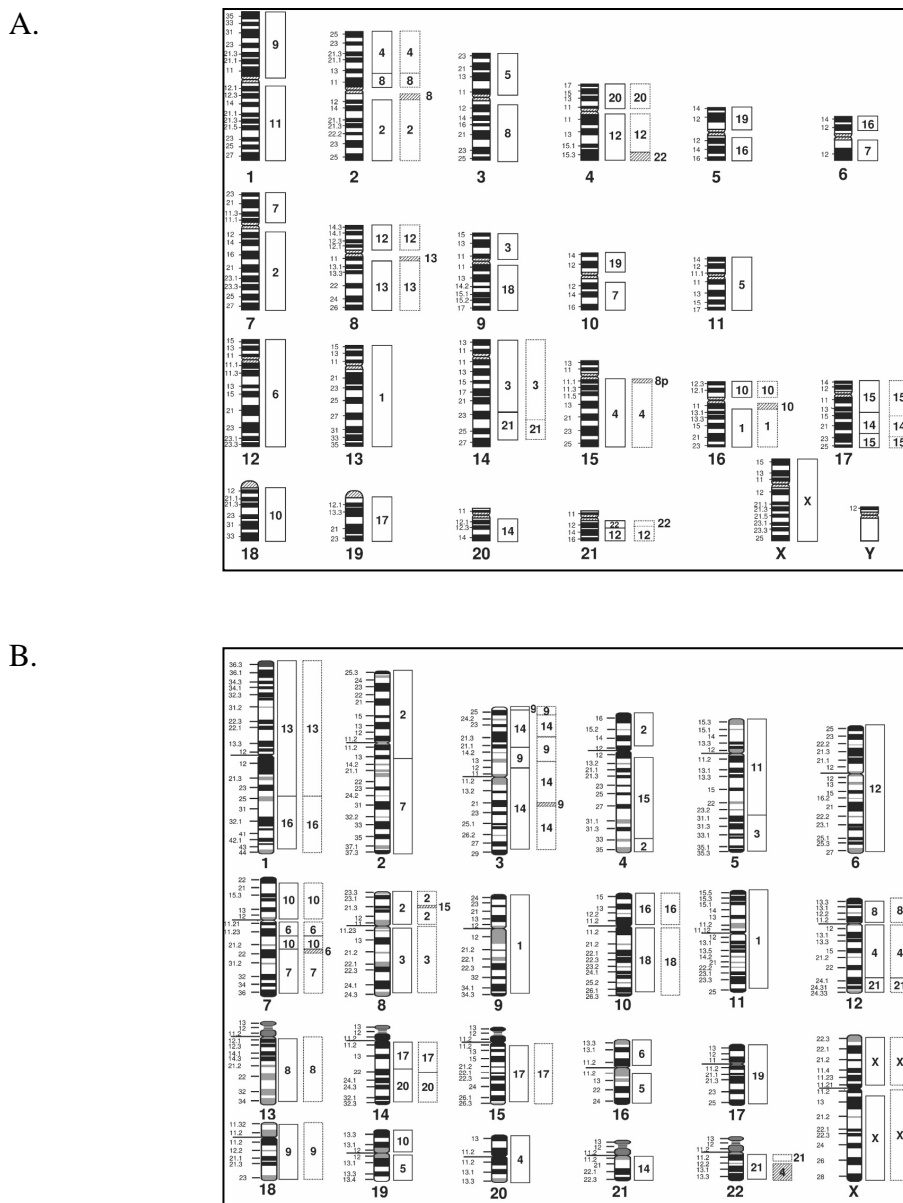
Lokusy kvantitatívnych znakov (QTL) sú molekulárno-genetické markery lokalizované mimo štruktúrneho génu úžitkovej vlastnosti, ktoré majú preukázateľnú asociáciu s úžitkovou vlastnosťou a boli preverené aj v iných rodinách zvierat a vo viacerých generáciách (Trakovická, 1999). Lokusy kvantitatívnych znakov sú súborom génov alebo alel génov, ktoré podmieňujú komplexnejší znak, často biochemickej alebo fyziologickej povahy. QTL pre jeden znak sa môžu nachádzať v jednom alebo v rôznych chromozómoch, pôsobia samostatne alebo súborne pomocou interakcií (Bežo, Bežová, 1998). V prípade králikov sa uskutočnilo viacero projektov zameraných na mapovanie QTL, ale do dnešného dňa nebola uverejnená práca, ktorá by sa zaoberala pozičným klonovaním.

#### **1.4.7 Mapovanie genómu králika**

Na rozdiel od mnohých iných hospodárskych zvierat, ako napríklad hovädzí dobytok, ošípané, kozy, ovce a pod., v prípade králika existuje len veľmi málo informácií týkajúcich sa mapovania genómu. Prvé mapovanie genómu králika zodpovedalo synténnym skupinám, čo sú lokusy patriace jednému chromozómu, s využitím tvorby panelov somatických hybridných buniek (hlodavce x králiky). Neskôr sa začali využívať na tvorbu genetickej mapy králika in situ hybridizácia s rádioaktívnou sondou. Veľkým prínosom pre cytogenetické mapovanie bolo využitie nerádioaktívnej DNA próby na začiatku 20. storočia pre FISH metódu, čo umožnilo presnejšie lokalizovať a ľahšie identifikovať hybridizované chromozómy. Využívala hybridizáciu a imunodetekciu biotínom značených prób. Táto metóda bola pôvodne objavená pre ľudské chromozómy, ale našla uplatnenie aj pre iné cicavce, aj králika. Použitie BAC klonov na vytvorenie genomickej DNA knižnice malo za následok vytvorenie veľkých DNA prób a silného hybridizačného signálu, ktorý môže byť ľahko detegovateľný fluorescenčným mikroskopom. S nástupom týchto metód králičia cytogenetická mapa rýchlo napredovala. Bolo zistených 301 nových génov. V novembri

2006 bolo zmapovaných 327 králičích génov, pričom pred rokom 2000 bolo známych len 26 génov (Gaillard et al., 2009).

Metódou používanou na analýzu genómu je napr. komparatívne mapovanie. Je to metóda, ktorou sa prenáša genomická informácia z jedného druhu na iný (Seres et al., 2006). Tým sa informácia platná pre dobre preštudovaný biologický druh, ako napríklad človek alebo myš, využije na objavenie genómovej mapy menej prebádaného druhu, akým je aj králik. Komparatívne mapovanie je založené na skutočnosti, že genómy sú evolúciou medzidruhovo konzervované. Komparatívne mapovanie je esenciálne pre nárast počtu markerov a identifikovanie kandidátskych génov pre rôzne úžitkové vlastnosti aj ochorenia. Existujú rôzne prístupy k porovnávaniu genómov, napríklad komparatívna cytogenetika, FISH metóda, sekvenovanie celého genómu a iné. Pri králikoch sa využíva najmä klasické zostavovanie a porovnávanie R-bandovaných chromozómov človeka a králika, alebo sa využíva FISH metóda, ktorá poskytuje viac informácií v porovnaní s klasickými metódami cytogenetiky. Do roku 1994 bol počet ortológnych génov zmapovaných pri ľuďoch a králikoch príliš nízky, aby bolo možné určiť celkovú zhodu medzi dvomi genómami. Korstanje (1999) uverejnil celkové porovnanie ľudského a králičieho genómu, pričom sa ukázalo, že existuje veľké množstvo konzervovaných chromozomálnych úsekov medzi týmito dvomi druhmi (obrázok 2). Úplná komparatívna mapa králika a človeka ešte stále nie je zostrojená.



**Obrázok 2: Komparatívna mapa kráľíka a človeka (Korstanje, 1994): A – králičí idiogram zobrazujúci zhodné úseky s ľudskými chromozómami. B – ľudský idiogram zobrazujúci zhodné úseky s králičími chromozómami.**

## 1.5 Prehľad kandidátskych génov kráľíka pre mäsovú úžitkovosť

### 1.5.1 Melanokortínové receptory (MCR)

Melanokortíny sú skupinou bioaktívnych peptidov derivovaných z propiomelanokortínov, ktoré majú veľmi výraznú štruktúrnú podobnosť. Tieto peptidy sú známe najmä pre svoj stimulačný vplyv na pigmentáciu a tvorbu steroidov, tiež

ovplyvňujú príjem potravy a energetický metabolizmus, sú endogénnymi antipyretickými (protihorúčkovými) a protizápalovými činiteľmi. Indukujú lipolýzu, regulujú sekréciu exokrinných žliaz, funkciu srdcovej a testikulárnej činnosti (Abdel-Malek et al., 2000). Melanokortínové peptidy sú syntetizované v rôznych častiach centrálného nervového systému a v periférnych tkanivách a podieľajú sa na regulácii mnohých fyziologických funkcií. Svoje funkcie nadobúdajú väzbou na receptory G-väzbových proteínov (Gs proteíny) so siedmimi transmembránovými doménami. Väzba MCR s Gs proteínmi indukuje zvýšenie koncentrácie cAMP v intracelulárnom prostredí (Nijunhuis et al., 2003). Do dnešného dňa bolo charakterizovaných 5 melanokortínových receptorov, pričom každý z nich je kódovaný vlastným génom. Líšia sa distribúciou medzi tkanivami a schopnosťou rozoznávať rôzne melanokortíny a fyziologické antagonisty, agouti signalizačný proteín a agouti príbuzný proteín. Na základe vyššie uvedených fyziologických funkcií sa predpokladá vplyv melanokortínových receptorov na obezitu, preto sú gény MCR rodiny považované za kandidátske gény pre mäsovú úžitkovosť (Haegeman et al., 2000). Tabuľka 1. uvádza prehľad MCR a hlavné miesta ich expresie (Malek et al., 2000).

**Tabuľka 1: Prehľad expresie MCR**

Typ MCR	Hlavné miesta expresie
MC1R	Melanocyty, imunitné bunky, endotelové bunky, Sertolihho bunky
MC2R	Adipocyty, zona glomerulosa a zona fasciculata
MC3R	Hypotalamus, talamus, hipokampus, kortex, placenta, žalúdok, dvanásťnik, pankreas
MC4R	Cortex, talamus, hypotalamus, bunky mozgu
MC5R	Exokrinné žľazy, adipocyty kostrových svalov

Štúdium myší s defektom v MC4R géne dokázalo, že MC4R proteín aktivuje zníženie príjmu potravy a zvýšenie spotreby energie (Seeley et al., 1997). Podobne Vaisse et al. (1998) uvádzajú vplyv nonsens mutácií génu MC4R na obezitu človeka. Kim et al. (2000a) lokalizovali substitúciu (G→A) v géne MC4R ošípanej, ktorá spôsobila zámenu Asp na Asn na 298. pozícii. PCR-RLFP metódou, použitím reštrikčného enzýmu TaqI detegovali Kim et al. (2000b) dve alely. Alela 1 (Asp298) tvorí dva fragmenty s veľkosťou 156 a 70 bp a alela 2 (Asn298) vytvára 226 bp

fragment. Kim et al. (2000b) zistili, že alela 2 je preukazne spojená s vyšším príjmom krmiva, vyšším obsahom tuku a väčšími priemernými dennými prírastkami.

Jiang et al. (2008) metódou PCR-SSCP a následnou sekvenačnou analýzou našli SNP v kódujúcom regióne MC4R génu rôznych plemien kráľika. V pozícii 237 bp zistili mutáciu, ktorá spôsobila zámenu adenínu za guanín. Alela A prevládala nad alelou G pri všetkých študovaných mäsových plemenách. Frekvencia genotypu AA bola vyššia v porovnaní s frekvenciou genotypu AG. Analýza pre stanovenie vplyvu genotypu na úžitkovosť zvierat potvrdila preukazný vzťah medzi genotypom AG, hmotnosťou tela a konverziou krmiva ( $P < 0,05$ ). Z výsledkov vyplynulo, že MC4R gén by mohol byť kandidátskym génom pre hmotnosť kráľika a jatočnú vzťažnosť.

### 1.5.2 Rastový hormón (GH) a receptor pre rastový hormón (GHR)

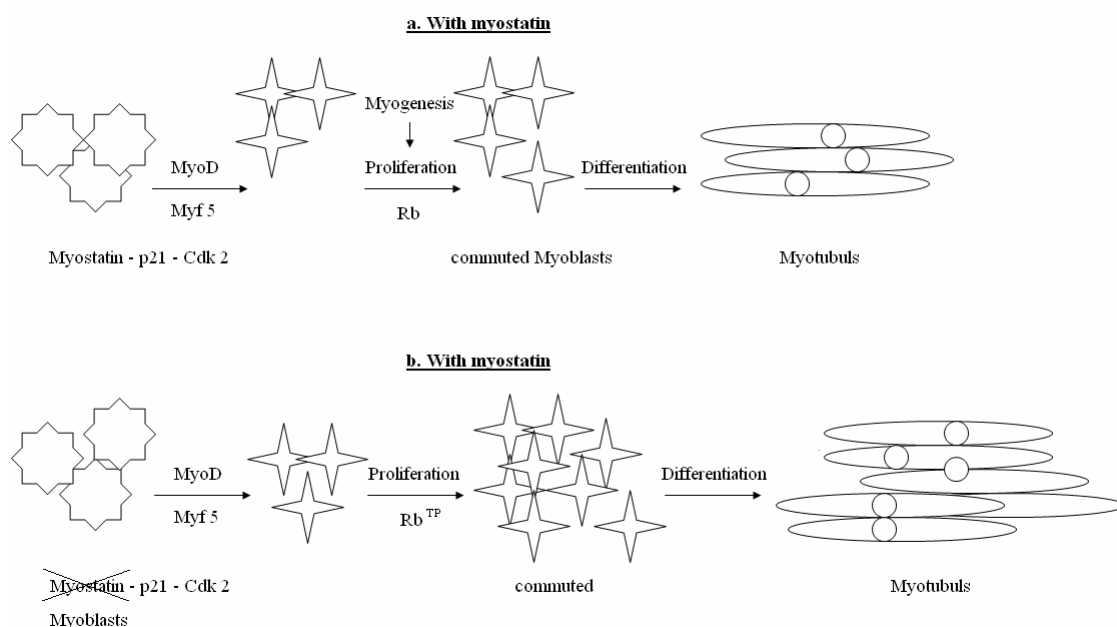
Rastový hormón je polypeptid, ktorého hlavnou úlohou je regulácia rastu a regenerácia buniek a organizmu. Králik má GH zložený z piatich exónov (Wallis and Wallis, 1995). Pôsobí prostredníctvom receptora pre rastový hormón, ktorý patrí do skupiny cytokínových/hematopoetínových receptorov. Väzbou rastového hormónu na receptor dochádza k dimerizácii receptora a tým dochádza k uvoľneniu intra a intercelulárnych signálov, ktoré vedú k rastu organizmu. GH aj GHR sú považované za kandidátske gény pre úžitkovosť hospodárskych zvierat. Etherton et al. (2009) konštatovali, že GH zvyšuje priemerné denné prírastky ošípaných, zvyšuje nárast proteínov a redukuje ukladanie tuku. Funkcia rastového hormónu je úzko spojená s ďalšími hormónmi a receptormi, napríklad hormón spúšťajúci sekréciu rastového hormónu (GHRH) alebo už spomenutý GHR. Gény kódujúce tieto hormóny sú potenciálnymi kandidátskymi génmi pre úžitkové vlastnosti vzhľadom na ich dôležitý fyziologický aspekt (Franco, 2005).

Deng et al. (2008) analyzovali 5 populácií kráľikov na prítomnosť polymorfizmu GHR metódou PCR-SSCP. Výsledky ukázali prítomnosť dvoch mutácií v pozícii 705C→T a 810C→T. Metódou analýzy najmenších štvorcov preukázali, že živá hmotnosť, hmotnosť po zabití a jatočná výťažnosť zvierat s genotypmi AA a MM bola preukázateľne nižšia než pri genotypoch BB a NN ( $P < 0,05$ ). Polymorfizmus GHR nepreukázal žiadne rozdiely v konverzii krmiva. V závere práce konštatovali, že GHR by mohol byť kandidátskym génom pre jatočné kráľiky.

Fontanesi et al. (2008) študovali GH polymorfizmus kráľika. Resekvenovali exón 2, 3 a 4, ale nenašli žiadnu mutáciu, ani rozdiely medzi ich získanou sekvenciou a sekvenciou, ktorú uvádzajú Wallis a Wallis (1995). Preto konštatovali, že gén pre rastový hormón je vysoko konzervovaný medzi druhmi a nenachádzajú sa tam žiadne mutácie.

### 1.5.3 Myostatín

Myostatín je negatívny regulačný faktor, ktorý determinuje maximálne množstvo svalovej hmoty typickej pre daný druh. Ak sa v myostatíne vyskytne mutácia, jeho negatívna regulačná funkcia je porušená. To vedie k zvýšenému svalovému rastu a k svalovej hypertrofii a hyperplázii. Prvá zmienka o dvojitom osvalení bola uverejnená v roku 1807 (Culley, 1807, Menissier, 1982). Menissier (1982) predpokladal, že sa jedná o monogénny, autozomálny a čiastočne recesívny znak. Genetické pozadie tohto javu bolo odhalené pri štúdiu TGF - beta skupiny (skupina transformačných rastových faktorov) pri myšiach. Použitím knock-out metódy bol odstránený gén pre myostatín, známy aj ako GDF-8, z ich genómu. Myši s takto upraveným genómom vykazovali muskulárnu hypertrofiu a hyperpláziu ako je uvedené na obrázku 3.



**Obrázok 3: Schématické znázornenie pôsobenia myostatínu na vznik nových svalových vlákien (Tsfaye et al., 2005).**



Neskôr sa uskutočnili výskumy na hovädzom dobytku, na plemenách belgický bielo-modrý dobytok, známy pre svoje dvojité osvalenie a piemontský dobytok, kde sa tiež dvojité osvalenie objavovalo. V roku 1995 bol predpokladaný gén objavený na krátkom ramene 2. chromozómu hovädzieho dobytká. Lokus bol nazvaný mh (muskulárna hypertrofia) (Charlier et al., 1995).

Sekvenovanie MSTN génu belgického bielo-modrého dobytká a asturianského dobytká odhalilo 11 delécií v kódujúcom regióne. Delécie viedli k posunovým mutáciám, čo spôsobilo zaradenie STOP kodónu po 287. aminokyseline. Tieto mutácie vyústili do skrátenia a inaktívácie proteínu (Grobet 1997, Kambadur 1997, McPherron a Lee 1997). V tom istom úseku proteínu, kde bola nájdená delécia pri belgickom bielo-modrom dobytku sa pri piemontskom dobytku našla G-A tranzícia. Tranzícia zmenila jeden z cysteínov na tyrozín a to bránilo normálnej funkcii proteínu. Aminokyselinová sekvencia tohto regiónu je vysoko konzervovaná v TGF-beta rodine transkripčných faktorov, tak ako aj pri iných plemenách (Kambadur 1997, McPherron a Lee 1997). V prvom experimente sa nedokázala mutácia nt821 (delécia11), neskôr ale Grobet et al. (1998) rozšírili svoj experiment na ďalšie mutácie aj plemená. McPherron a Lee (1997) skúmali, či daná mutácia je prítomná pri dobytku bez dvojitého osvalenia, ale boli nájdené len polymorfizmy, ktoré nemenili aminokyselinovú sekvenciu myostatínového proteínu. Tým sa dokázalo, že culardov fenotyp je spôsobený mutáciou myostatínového génu. Tento jav sa vyskytuje pri mäsových plemenách hovädzieho dobytká, napr. belgické bielo-modré plemeno, kde je dvojité osvalenie žiaduce v selekcii.



**Obrázok 4: Dvojité osvalenie plemena belgické bielo-modré (Simmons, 2008).**

V prehľade kvality mäsovej produkcie ide o výnimočný ukazovateľ, pretože takéto zvieratá produkujú nielen viac mäsa, ale aj kvalitnejšie – chudšie a jemnejšie mäso. Kríženie s belgickým bielo-modrým dobytkom ukazuje, že hoci je gén recesívny a monofaktoriálny, jeho vplyv je zjavný aj pri heterozygótoch vzhľadom k čiastočnej (neúplnej) dominancii. Mäso, pomer kostí a mäsová výťažnosť sú lepšie než pri ostatných plemenách. Pri týchto zvieratách sú kostrové svaly v dospelosti nadmerne veľké. Fenotyp zvierat je jasne rozoznateľný: obrovské, prerastené svaly na celom tele a preukazne vyššia telesná hmotnosť (obrázok 4). Pri zvieratách so svalovou hypertrofiou je pozorovaný 20% nárast kostrovej svalovej hmoty. Nadmerný rast sa týka všetkých kostrových svalov na celom tele. Podľa experimentov rast svalov nemôže byť vysvetľovaný len zvýšením priemeru filamentov (hypertrofia), ale aj zvýšením počtu mikrofilamentov v každom svale (hyperplázia) (Hanset et al., 1982).

Expresia myostatínu bola detegovaná najprv pri myšiach, a to hlavne v kostrových svaloch. Najskôr bola pozorovaná v 9,5 dni post coitum. McPherron a Lee (2002) vo svojej práci dokázali, že chýbajúci myostatín je prevenciou pred akumulovaním tukového tkaniva s pribúdajúcim vekom a čiastočne znižuje obezitu a diabetický fenotyp pri dvoch myších modeloch obezity a diabetes: agouti lethal yellow (Ay) a obese (Lep ob/ob). Autori naznačili, že inhibovanie myostatínu by mohlo byť prospešné aj v prevencii alebo liečbe obezity a diabetes mellitus. V predadipocytových kultúrach bola po pridaní myostatínu inhibovaná diferenciácia týchto buniek. Počas liečby bola aktivita glycerol-3-fosfatáza dehydrogenázy, CCAAT enhancer väzbového proteínu alfa a peroxizómového proliferáčného aktivačného receptora gamma redukovaná. Hoci mechanizmus nie je objasnený, mohol by vysvetliť zníženie tukovosti pri zvieratách nesúcich mutáciu myostatínu.

mRNA myostatínu bola detegovaná aj v ďalších tkanivách, v kardiomyocytoch a purkineho vláknach srdca, pri ošípaných v mliečnej žľaze. Tento jav zatiaľ nebol vysvetlený. Na konci posledných rokov Thomas et al. (2000) demonštrovali, že myostatín funguje ako inhibičný faktor pre proliferáciu svalových buniek. V ich experimente, kde inkuboval myoblastové kultúry s myostatínom, bola proliferácia buniek inhibovaná v závislosti od dávky myostatínu. Keď bol myostatínový proteín odstránený z kultivačného média, bunky začali opäť proliferovať. Študovali aj úlohu myostatínu v bunkovom cykle a zistili, že myostatín blokuje bunkový cyklus v G1 a G2/M fáze.

---

Krátko po objave myostatínu identifikoval McPherron (1997) myostatínový gén v niekoľkých ďalších plemenách, okrem belgického bielo-modrého. Publikovaná bola sekvencia myostatínu paviána, kuraťa, ovce, ošípanej, potkana, moriaka, ryby a ľudí. To ukázalo, že aminokyselinová sekvencia tohto génu je medzidruhovo vysoko konzervovaná. Len pri ovciach a hovädzom dobytku boli rozdiely v jednej až troch aminokyselinách.

Pri potkanovi bola úloha myostatínu v procese svalovej regenerácie skúmaná viacerými autormi. Výsledkom týchto štúdií bolo zistenie, že expresia myostatínu sa zvyšuje počas regenerácie (Kirk 2000, Mendler 2000, Sakuma 2000, Yamanouchi 2000). Pri potkanoch je tiež detegovaná selektívna expresia v svalových vláknach. Kirk (2000) uvádza, že v pomalých vláknach typu MyHC typ 1 absentovala mRNA myostatínu.

Pri ošípaných je myostatínový gén lokalizovaný na q ramene chromozómu 15. Bolo skúmaných niekoľko plemien a zistil len polymorfizmus génu, ktorý nespôsobuje žiadne zmeny v hladine proteínu. To znamená, že neexistuje spojitosť medzi myostatínom a produkčnými vlastnosťami tohto plemena (Sonstegard, 1998). Ye et al. (2007) sledovali vplyv diSNP v 5' regulačnom úseku na úžitkové vlastnosti yorkshirských ošípaných a zistili pozitívny vplyv mutácie na hmotnosť tela a priemerné denné prírastky.

Pri rybách bol gén nájdený v lososovi atlantickom (*Salmon salar*) a kaprovi rybníčnom (*Cyprinus caprio*), ale neboli nájdené žiadne mutácie. Aminokyselinová sekvencia je vysoko homologická so sekvenciou dania pruhovaného (*Danio rerio*). Rodger et al. (2001) izolovali myostatín z ďalších dvoch druhov rýb: tilapia mozambická (*Oreochromis mossambicus*) a *Morone chrysopsis*. Zistili, že sekvencia proteínu je vysoko homologická s druhmi, ktoré boli skúmané predtým.

MSTN gén bol sekvenovaný a boli nájdené mutácie aj pri ovciach (Marquez Mdo et al., 2006) a hydine (Kuhnlein et al., 1997). Ye et al. (2007) sledovali vplyv 13 SNP (11 v exóne, 2 v intróne) a zistili, že myostatín je preukazne spojený s rastom a mortalitou hydiny, oksyficiením krvi a titrom protilátok proti vírusovým ochoreniam.

Fontanesi et al. (2008) sekvenovali MSTN gén králika, exón 1, 2 a 3 a intrón 1 a 2. Výsledkom ich práce bolo zistenie, že tento gén neobsahuje žiadne mutácie. Našli len SNP v intróne 2, v pozícii 34. Keďže sa tento SNP nachádza v intróne, nemá táto zmena priamo dopad na expresiu. Niektoré predošlé pokusy na hydine (Zhang et al.,

2007) ale ukázali, že aj mutácia v intróne ovplyvňuje prejav znaku, hoci tento jav zatiaľ nie je presne objasnený.

Produkcija mäsa má stále najväčší podiel z celkovej produkcie hospodárskych zvierat. Nielen kvantita, ale aj kvalita je veľmi dôležitá. Nutričné a fyziologické experimenty skúmajúce vplyv jednotlivých mäsových komponentov (na makromolekulovej úrovni) sú čoraz dôležitejšie. Genetické faktory (dedičné znaky) majú významnú úlohu spomedzi faktorov, ktoré determinujú masovú kvalitu. Svalová hypertrofia je dokumentovaná u rôznych druhov, vrátane hovädzieho dobytku.

Svalová hypertrofia vzniká v dôsledku zväčšenia priemeru svalových vlákien a zvýšenia počtu vlákien vo svale (Hanset, 1982). Okrem nárastu svalovej hmoty získavajú tieto zvieratá aj ďalšie výhodné vlastnosti. O 50% je redukovaný celkový obsah lipidov a tiež spojovacích tkanív. Výsledkom je chudšie a jemnejšie mäso s výrazne vyššou konzumnou hodnotou. Pri myšiach s nulovou mutáciou bola pozorovaná hypertrofia špecifická pre niektoré typy svalov. Hladina mRNA meraná pri kontrolných zvieratách bola zhodná s meraniami pri hypertrofických zvieratách v rovnakom tkanive: hmotnosť svalových tkanív s nižšou hladinou expresie myostatínu bola vyššia než pri zvieratách so svalovou hypertrofiou so svalmi s normálne vyššou expresiou. Dokázalo sa, že expresia myostatínu je tkanivovo špecifická. Jej hladina je vyššia v rýchlych vláknach.

## **1.6 Prehľad kandidátskych génov kráľika pre reprodukčné vlastnosti**

### **1.6.1 Progesterón a progesterónový receptor**

Progesterón je steroidný hormón, ktorý je kľúčový pre normálne fungovanie reprodukčnej sústavy, to zahŕňa ovuláciu, vývoj mliečnych a maternicových žliaz a neurobehaviorálny prejav súvisiaci so sexuálnou vnímavosťou. Jeho prítomnosť je nevyhnutná pre nástup a udržanie gravidity (pre implantáciu a vývin embryí). Tiež súvisí s akrozómovou reakciou spermií, s dráždivosťou neurónov a predčasnými pôrodmi (Conneely et al., 2002).

Funkcie progesterónového receptora boli potvrdené fenotypovými štúdiami myší s knock-outovaným génom progesterónového receptora (PRKO). Myši, ktoré mali inhibované obe izoformy receptora, javili zhoršené sexuálne správanie

a neuroendokrinnú gonadotropínovú reguláciu, dysfunkciu maternice, neprebehla ovulácia a bola zhoršená morfogéniza mliečnych žliaz súvisiaca s graviditou (Mulac-Jericevic et al., 2000). Zároveň má dôležitú úlohu pri regulácii týmusovej involúcie počas gravidity a pri regulácii kardiovaskulárneho systému (Tibbets et al., 1999).

Viacero štúdií dokázalo, že príliš vysoká a tiež príliš nízka koncentrácia progesterónu je spojená s nízkou prežívateľnosťou embryí. Mann et al. (2006) konštatovali, že vývin embryí je možný len pri optimálnej hladine progesterónu a výkyvy jeho hladiny počas luteálnej fázy spôsobujú slabý vývin embryí, ktoré nie sú schopné produkovať dostatočné množstvo interferónu- $\tau$ , ktorý je nevyhnutný pre vývin. Aby bola fertilizácia ovplyvnená, musí byť PGR exprimovaný v spermiiach a oocytoch.

Donedávna nebolo známe, či PGR pôsobí priamo na embryo, alebo či pôsobí nepriamo cez reprodukčné orgány matky. Ying et al. (2000) uskutočnili pokus, pri ktorom sledovali hladinu PGR v embryách ošípaných. Zistili, že v dvoj bunkovom štádiu bola prítomná mRNA PGR, ale s narastajúcim počtom buniek táto hladina klesala a v štádiu od piatich buniek vyššie sa nepodarilo detegovať prítomnosť mRNA. Z toho vyvodili záver, že vplyv PGR na skorú embryogézu je len nepriamy.

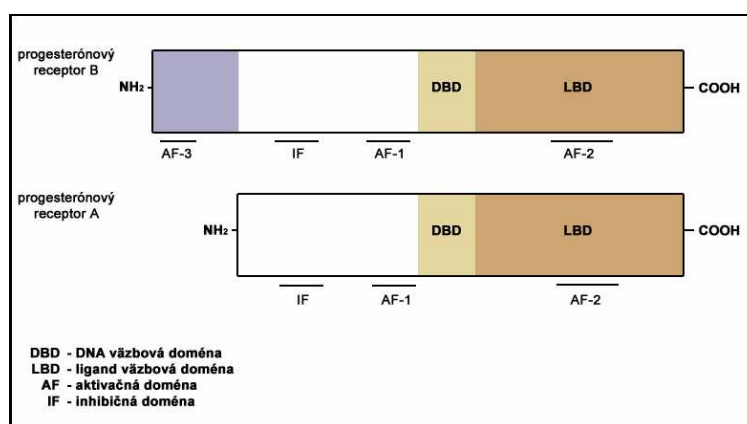
Progesterón sa syntetizuje v žltom teliesku vaječníkov. Počas gravidity sa tvorí v maternici a v placentе a v kôre nadobličiek. Z fyziologického hľadiska je najúčinnjší progesterón tvorený v žltom teliesku. Ten sa viaže na hypotalamus, kde inhibuje sekréciu gonadoliberínov, FSH a LH. Fyziologický účinok je sprostredkovaný interakciou hormónu s dvomi špecifickými intracelulárnymi progesterónovými receptormi označovanými ako PGR-A a PGR-B. Tieto receptory sú súčasťou veľkej skupiny nukleárných receptorov transkripčných faktorov. Nukleárne receptory regulujú génovú expresiu cez selektívne naviazanie sa na regulačný úsek DNA a tiež cez interakciu receptorov s koaktivátormi alebo korepresormi, následkom čoho dochádza k regulácii aktivity RNA-polymerázového komplexu (Kraus et al., 1993).

Oba progesterónové receptory sú kódované jediným génom. Ich expresia je výsledkom činnosti dvoch promótorov a ich translácia prebieha z dvoch iniciačných kodónov (AUG). Produkcia týchto izoforiem je konzervovaná medzi mnohými druhmi stavovcov, vrátane ľudí a hlodavcov. Rozdiel je v hladine jednotlivých izoforiem v rôznych tkanivách, čo je dôsledkom vývinových hormonálnych zmien, prípadne zmien, ktoré prebiehajú počas karcinogenézy. Vo všeobecnosti platí, že PGR-B je aktívnejší než PGR-A a aktivita PGR-B je na rozdiel od PGR-A bunkovo špecifická.

PR-A izoforma reprimuje transkripčnú aktivitu iných receptorov steroidných hormónov, vrátane PR-B a estrogénového receptora (Conneely et al., 2002).

Rozdiely v transkripčnej aktivite a koregulácii medzi PGR-A a PGR-B predpovedajú, že tieto dva proteíny sprostredkujú rôznu fyziologickú odpoveď na progesterón. Okrem toho, schopnosť PGR-A selektívne inhibovať transkripčnú odpoveď PGR-B a estrogénových receptorov ukazuje, že PGR-A má schopnosť znižovať celkovú progesterónovú vnímavosť v určitých tkanivách. Zároveň prispieva k antiestrogénovým aktivitám progesterónu, ktoré boli pôvodne pozorované v maternici (Conneely et al., 2000).

Väzbou progesterónu na progesterónový receptor dochádza k výrazným konformačným zmenám, čo má za následok dimerizáciu dvoch komplexov ligand-receptor. Zvyšuje sa fosforylácia, viaže sa receptorový dimér na špecifický úsek DNA v promótorovej oblasti a receptorový komplex interaguje so špecifickým koaktivátorom a transkripčným faktorom. Vytvára sa transkripčný iniciačný komplex pre promótor cieľového génu.



**Obrázok 5: Štruktúra progesterónového receptora**

Terminálny úsek A/B progesterónového receptora je najviac hypervariabilným regiónom medzi všetkými členmi skupiny. Tento úsek obsahuje transaktivačnú a inhibičnú doménu, ktoré regulujú aktivitu cieľového génu. Doména C je DNA-väzobná doména (DBD) tvorená 66 až 68 aminokyselinami. Na terminálnu časť DBD sa viaže ligand-väzobná doména, ktorej úlohou je viazať progesterón.

Driver et al. (2009) sledovali vplyv SNP G/C v treťom intróne PGR na reprodukčné vlastnosti (oplodnenie a prežívanie embryí) holštajnského dobytká. Zistili, že oocyty získané z vaječníkov s genotypom CC mali fertilizačnú kapacitu 61%. Fertilizačná kapacita oocytov získaných z vaječníkov s genotypom GC a GG bola 68 a 69%. Aj prežívateľnosť embryí bola v genotype GG o 5 a 6% vyššia v porovnaní s genotypom GC a CC. Tento výsledok indikuje, že PGR SNP môže byť použitý v markermi-asistovaných šľachtiteľských programoch holštajnského dobytká.

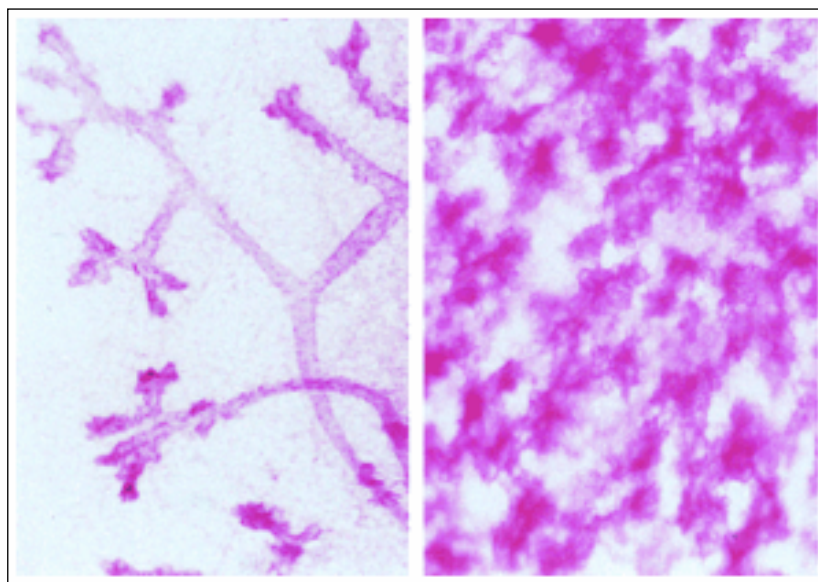
Progesterónový receptor kráľika analyzovali vo svojej práci Peiró et al. (2008) a konštatovali, že by sa mohlo jednať o kandidátsky gén pre reprodukciu tohto biologického druhu.

Luteinizačný hormón, primárny signál pre ovuláciu preovulačných folikulov, stimuluje krátkodobú expresiu mRNA PGR a tvorbu proteínov v bunkách granulózy a antiprogestín inhibuje ovuláciu. Definitívny dôkaz, že PGR je hlavným mediátorom ovulácie, priniesli pokusy s PRKO myšou. Analýzy tohto modelu odhalili, že PGR sú nevyhnutné najmä pre prasknutie folikulov, ktoré vedie k ovulácii. Nezohrávajú ale úlohu v diferenciácii buniek granulózy a v tvorbe corpus luteum. Odpoveďou na stimuláciu LH je syntéza PGR-A a PGR-B v preovulačných folikuloch. Analýzou PRKO myši s odstráneným PGR-A sa zistilo, že hoci bola ovulácia čiastočne inhibovaná, nebola úplne zastavená (Mulac – Jericevic, 2000). Po odstránení PGR-B ovulácia nebola ovplyvnená, čo indikuje, že PGR-A je nevyhnutným faktorom pre sprostredkovanie ovulácie ako reakcie na progesterón.

Progesterón má zásadnú úlohu aj v skorých štádiách gravidity pri príprave maternicového epitelu na prijatie oplodneného vajíčka a pri diferenciácii buniek endometria (deciduálne zmeny – zmeny endometria vplyvom vznikajúcej blastocysty), ktoré potom podporujú vývin implantovaného embrya. V prípade PRKO myši neprebehla implantácia embrya v maternici ani deciduálne zmeny (Lydon et al., 1995). PGR sú exprimované v epitelových bunkách, v bunkách strómy aj myometria a ich expresia je regulovaná progesterónom aj estrogénom. Tie zabezpečujú dynamické zmeny počas estrálneho cyklu a v rannom štádiu gravidity. PGR-A aj PGR-B majú veľký význam pre správne fungovanie maternice. Odstránenie PGR-A dokázalo, že má zásadnú úlohu pre decidualizáciu strómy pred implantáciou. Zároveň sa zistilo, že PGR-B nie je nevyhnutný pre implantáciu embrya, stačí aby bol exprimovaný PGR-A (Mulac – Jericevic, 2003).

Ďalším miestom pôsobenia PGR je mliečna žľaza. Vývin mliečnych žliaz nastáva hlavne postnatálne a je kontrolovaný komplexom endokrinných hormónov estrogénu, progesterónu a prolaktínu za spolupôsobenia rastových faktorov (Anderson, 2002). Zahŕňa dve fázy, ktoré sú iniciované na začiatku puberty a neskôr počas gravidity.

Nulová mutácia PRKO myši preukázala, že PGR sú nevyhnutné pre duktálnu proliferáciu a lobuloalveolárnu diferenciáciu v epiteli mliečnej žľazy počas gravidity. Seagroved et al. (2000) zistili, že PGR sa tvorí výlučne v epiteli mliečnej žľazy a jej vývoj z nezrelého štádia po zrelú mliečnu žľazu je spojený so zmenou expsie PGR. Zároveň zistili, že bunky mliečnej žľazy exprimujúce PGR sa líšia od normálnych proliferujúcich buniek. Proliferácia epitelu mliečnej žľazy ako odpoveď na prítomnosť progesterónu je spojená s lokálnou indukciou progesterón-závislých rastových faktorov, ktoré sa podieľajú na parakrinnej činnosti PGR-negatívnych buniek a tým regulujú ich proliferáciu (Briskin et al., 2000). Jericevic a Coonely (2000) uvádzajú, že hladina PGR-A v mliečnej žľaze vždy prevyšuje hladinu PGR-B.



**Obrázok 6: Tkanivo mliečnej žľazy myši  $PGR^{-/-}$  (vľavo) a  $PGR^{+/+}$  (vpravo) Briskin et al. (1998).**



**Tab.2 : Účinok odstránenia progesterónového receptora na pohlavné orgány myši**  
(Jericevic a M Conneely, 2004)

Typ orgánu	Genotyp	Fenotyp
Vaječníky	PRKO	Vaječníková nedostatočnosť
	PRAKO	Zhoršená ovulácia
	PRBKO	Normálna ovulácia
Maternica	PRKO	Zhoršená implantácia/decidualizácia/neplodnosť
	PRAKO	Zhoršená implantácia/decidualizácia/neplodnosť
	PRBKO	Normálna implantácia aj decidualizácia
Mliečna žľaza	PRKO	Zhoršený vývin mliečnych žliaz
	PRAKO	Normálna progesterónom indukovaná morfogénéza
	PRBKO	Slabšie rozvetvenie mliečnych žliaz a lobuloalveolárny vývin

### 1.6.2 Tkanivový inhibítor metaloproteináz (TIMP – 1)

Tkanivové inhibítory metaloproteináz sú špecifické inhibítory matrix metaloproteináz, ktoré sa podieľajú na prestavbe, embryogenéze, angiogenéze a mnohých ďalších biologických procesoch. Okrem inhibičnej funkcie je TIMP aj promótorom rastu, antiangiogénnym faktorom, modulátorom apoptózy a steroidogenézy. Estellé et al. (2006) zistili zvýšenú expresiu TIMP – 1 vo vajcovode pri samiciach selektovaných na vysokú kapacitu maternice. Argente et al. (2008) objavili SNP v pozícii 1423 TIMP – 1 génu (A>G) a uvádzajú, že tento polymorfizmus by mohol ovplyvňovať vývin embryí a ich prežívanie v 48. a 72. hodine po oplodnení.

TIMP – 1 je multifunkčný proteín exprimovaný vo vaječníkoch a maternici samíc viacerých druhov. Po odstránení génu pre TIMP – 1 pri myšiach vykazovali tieto mnohé poškodenia reprodukčných vlastností, čo viedlo k zníženej hladine progesterónu a abnormalitám v morfológii maternice. Nothnick (2001) študoval myši so zablokovaným TIMP – 1 a sledoval jeho účinok na reprodukčné schopnosti týchto myší. Počas jedného roka sledoval počet a početnosť vrhov samíc a zistil, že graviditu dosiahol preukazne menší počet myší s vyblokoványm génom v porovnaní

s normálnymi myšami. Zároveň zistil, že modifikované myši, ktoré vrhli mláďatá, mali podstatne menšie vrhy aj menšie mláďatá vo vrhoch v porovnaní s normálnymi myšami. Tým potvrdil, že absencia TIMP – 1 génu je spojená s reprodukčnými schopnosťami myší.

### 1.6.3 Oviduktálny glykoproteín

Oviduktálny glykoproteín 1 (OVGP1) je vysokomolekulový glykoproteín, ktorý je syntetizovaný a sekretovaný hlavne epitelom vajcovodov (Buhi, 2002). Pri ľudoch aj ostatných cicavcoch má pozitívny vplyv na spermie, penetráciu vajčeka, fertilizáciu a prežívanie ranných embryí.

Merchán et al. (2007) sekvenovali králičí OVGP1 gén, ktoré má 13 kb a je tvorený 11 exónmi a 10 intrónmi. Podarilo sa im identifikovať 5 SNP a jeden trojalelový mikrosatelit v promótoře a tri SNP a jeden dinukleotidový INDEL v intróne. Zistili tiež, že expresia OVGP1 vo vajcovodoch je 5,500 krát vyššia než expresia v maternici a vaječníkoch. Len veľmi slabá alebo žiadna expresia bola zistená v nereprodukčných orgánoch. Pri porovnaní expresie vo vajcovodoch v rôznych štádiách gravidity neboli zistené žiadne signifikantné rozdiely.

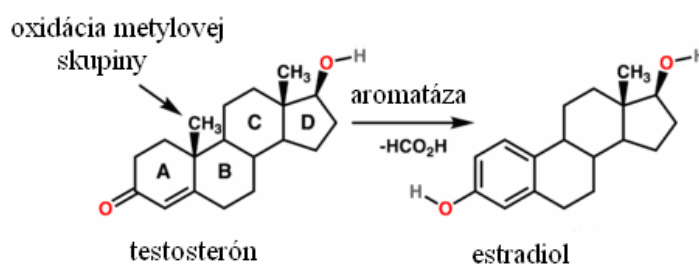
Merchán et al. (2009) sledovali vplyv OVGP1 a expresie mRNA na veľkosť vrhu, teda či OVGP1 má vplyv na fertilizáciu a vývin ranných embryí. V experimente použili králiky selektované na kapacitu maternice, ale nezaznamenali žiadne rozdiely v expresii mRNA medzi líniami. Tiež sekvenovali promótor a mRNA, pričom našli 17 polymorfných miest, ktoré tvorili 3 haplotypy (A, B a C). Uskutočnili asociačnú štúdiu medzi reprodukčnými ukazovateľmi a trojalelovým mikrosatelitom identifikovaným v promótoře a jedným SPP lokalizovaným v exóne 11 [12944C>G (p.Arg468Gly)]. Ďalej zistili, že alela 12944G a 325(GT)14T(G)5 B haplotypu má pozitívny vplyv na celkový počet mláďat vo vrhu, počty živonarodených mláďat, počet implantovaných embryí a prežívanie embryí.

Garcia et al. (2010) tiež sledovali rozdiely v prežívateľnosti a vývine embryí a SNP 12944C>G na exóne 11 a trialelovom microsatellite [(GT)15T(G)5, (GT)14T(G)5, a (GT)11T(G)7)] a konštatovali, že SNP v exóne 11 nemal vplyv na prežívanie embryí ani na vývin embryí v 48. hodine po oplodnení. V 72. hodine však genotyp GC vykazoval vyššiu prežívateľnosť embryí než CC genotyp. Analýza mikrosatelitu

potvrdila výsledky Merchána et al. (2009). Výskum Merchána et al. (2009) a Garcíu et al. (2010) bol uskutočnený na rovnakých líniách aj počtoch zvierat.

#### 1.6.4 Aromatáza

Aromatáza je enzým zodpovedný za kľúčový krok biosyntézy estrogénu. Estrogén má zásadnú úlohu v sexuálnej diferenciacii, vývine reprodukčného traktu a regulácii reprodukčných procesov viacerých druhov. Pri stavovcov prebieha tvorba estrogénu predovšetkým v pohlavných orgánoch a čiastočne aj v mozgu. V prípade mnohých cicavcov je biosyntéza estrogénu tkanivovo – špecifická: ľuďom, koňom a ošípaným sa tvorí v placente, tukovom tkanive, osteoblastoch a makrofágoch.

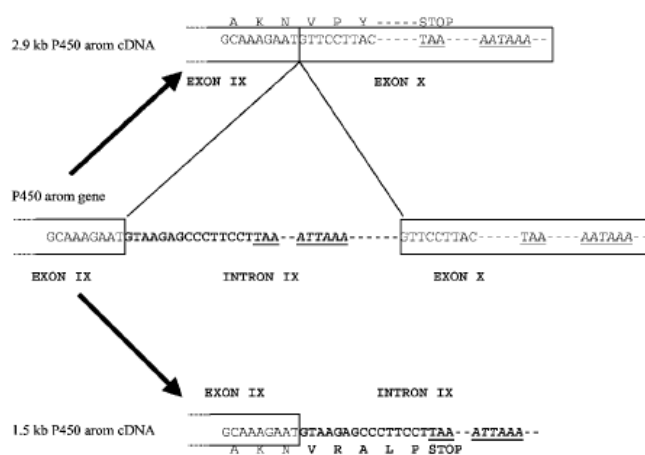


**Obrázok 7: Schéma pôsobenia aromatázy**

Aromatáza je členom cytochróm P450 skupiny, ktorých funkciou je premena androgénov na aromatické molekuly a produkcia estrogénov, má preto dôležitú funkciu v pohlavnom vývine (obrázok 7). Cytochróm P450 proteíny sú monooxygenázy, ktoré katalyzujú mnoho reakcií vrátane syntézy cholesterolu, steroidov a iných lipidových látok. Tento proteín, lokalizovaný v endoplazmatickom retikule, katalyzuje posledný krok biosyntézy estrogénov z androgénov. Výsledkom mutácie v géne kódujúcom aromatázu je buď zvýšenie alebo zníženie aromatázovej aktivity, čo súvisí s pohlavným vývinom, rastom a diferenciaciou. Cytochróm P450 aromatáza je kódovaná génom *cyp19*, ktorý je zložený z deviatich kódujúcich exónov (exón II – IX). Expresia tohto génu je tkanivovo – špecificky regulovaná s využitím ôsmich promótorov, pričom každý z nich je spojený so špecifickým neprepisovaným exónom I. Promótory II a I.3 sú zodpovedné za tvorbu aromatázy vo vaječníkoch, promótory I.4 a I.3 za tvorbu enzýmu v tukovom tkanive a promótor I.1 je zodpovedný za aktiváciu aromatázy

v placentе. Pri ovciach bolo objavených šesť promótorov, pri kravách päť. Potkan a myš majú analogické promótoary ako človek. Pri týchto druhoch je jeden gén riadený viacerými promótormi. Ošípané a niektoré druhy rýb majú viacero izoforiem génu. Delarue et al. (1996) získali sekvenciu králičej cDNA aromatázy. Bouraima et al. (2001) objavili nový promótor nazvaný I.r a sekvenovali králičí promótor II a I.r. Transkripty I.r promótoru našli v preovulačných bunkách granulózy, v corpus luteum, v placentе a tukových bunkách. Študovali tiež hladinu transkriptov promótoru pred ovuláciou a po nej. Zaznamenali výrazný pokles expresie promótoru II po ovulácii, zatiaľ čo expresia promótoru I.r zostala nezmenená. Tento duálny systém regulácie poskytuje možnosti štúdia tkanivovo – špecifickej regulácie aromatázy na králičích vaječníkoch.

Hanoux et al. (2003) lokalizovali v bunkách granulózy králika dva varianty cytochróm P450 aromatázy (53 a 36 kDa) a uvádzajú, že proteín kódovaný kratšou formou génu je pravdepodobne zapojený do regulácie reprodukčných vlastností králikov. Ďalej zistili, že obe formy proteínu sú regulované odlišne, pravdepodobne kvôli hormonálne riadenému alternatívnemu zostrihu (obrázok 8).



**Obrázok 8: Schéma alternatívneho zostrihu aromatázového promótoru (Hanoux et al., 2003)**

Lobo et al. (2009) sledovali polymorfizmus C242T aromatázového génu oviec (Cyp19), jeho alelové frekvencie a vplyv na produkčné a reprodukčné vlastnosti oviec. Zvieratá boli genotypované PCR-RFLP metódou a vplyv genotypu na výkonnosť zvierat analyzovali metódou najmenších štvorcov. Ďalším hodnoteným faktorom bol

vplyv genotypu na kvantitatívne plemenné hodnoty zvierat. Autori uvádzajú, že nenašli ani jedno zviera s genotypom AA, frekvencia genotypu AB bola 0,64 a genotypu BB 0,36. Ovce s genotypom AB vykazovali vyššie hmotnosti jahniat pri narodení než ovce s genotypom BB. Výsledky zovšeobecnilí do tvrdenia, že ovce s genotypom AB majú lepšie plemenné hodnoty v porovnaní s ovcami s genotypom BB.

### 1.6.5 Gén pre agouti signálny proteín

Pigmentácia cicavcov je determinovaná hlavne distribúciou pheomelanínových a eumelanínových pigmentov, ktoré produkujú červenožlté, alebo tmavé pigmenty. Relatívne množstvo eumelanínu a pheomelanínu v melanocytoch je kontrolované dvomi hlavnými lokusmi. Lokus extenzie a Agouti lokus (Searle, 1968). Okrem toho sú prítomné aj ďalšie lokusy, ktoré výsledné sfarbenie ovplyvňujú. Napríklad lokus pre zosilnenie tmavej farby, a pod.

Lokus extenzie kóduje receptor pre melanocytový – stimulačný hormón (Robbins et al., 1993), tiež známy ako melanokortínový 1 receptor (MC1R). Mutácie jednotlivých exónov MC1R génu spôsobujúce konštitutívnu aktivitu receptora sú dominantné a spôsobujú čierne zafarbenie kožušiny. Inaktivačné mutácie sú recesívne a ich výsledkom je červenožltá pigmentácia. MC1R mutácie sú určené na zmenu farby srsti a syntézu pigmentov pri rôznych druhoch cicavcov, napríklad myši (Robbins et al., 1993), dobytka (Klungland et al., 1995), koní (Marklund et al., 1996), líšok (Våge et al., 1997), ošípaných (Kijas et al., 1998), oviec (Våge et al., 1999) a ďalších druhov. Fontanesi et al. (2006, 2010) ako prvý sledoval expresiu, štruktúru a mutácie v králičom ASIP géne. Analýzou takmer celého kódujúceho úseku MC1R druhu *Oryctolagus cuniculus* identifikovali dve mutácie spojené s červeným (recesívna alela E extenzného lokusu) alebo čiernym zafarbením (ED, alebo ES, dominantne čierna farba) rôznych plemien európskeho králika. Tieto mutácie boli spôsobené deléciou 30 bp úseku a 6 bp úseku MC1R génu determinujúceho transmembránového receptora.

Agouti lokus kóduje agouti signálny proteín (ASIP), ktorý je parakrinnou signálnou molekulou s antagonistickým účinkom na MSH vo väzbe na MC1R a preto bráni interakcii MC1R – MSH, ktorá vyúsťuje do pheomelanínovej syntézy namiesto tmavého/hnedého eumelanínu. Pri myšiach, rovnako ako pri iných druhoch, strata funkcie agouti génu vplyvom mutácie determinuje len produkciu eumelanínu,

zatiaľčo mutácia, ktorá zvyšuje funkciu génu (dominantná mutácia) vedie k pheomelanínovej produkcii (Kuramoto et al., 2001; Kerns et al., 2004). Rôznorodosť vo farbe srsti je výsledkom týchto alterácií, ktoré vykazujú epistatickú, alebo čiastočne epistatickú interakciu s extenzným lokusom (Searle, 1968; Våge et al., 1997). Pri európskom králikovi štúdie potvrdili prítomnosť troch alel agouti lokusu: „A“ (divý typ alely), „a“ (čierny) a „a“ (nonagouti) (Robinson, 1958; Searle, 1968).

Gény zodpovedné za sfarbenie sú dôležité aj pre štúdium evolúcie, selekciu a adaptačné zmeny v divej populácii. Niekoľko štúdií uskutočnených na myšiach, primátoch, vtákoch a rybách sa už zmieňovalo o úlohu MC1R génu a ASIP génu v evolúcii pigmentácie a adaptácie (Mundy and Kelly, 2003; Nachman et al., 2003; Mundy, 2005; Hoekstra et al., 2006). Navyše, fylogenetické evolučné štúdie používali MC1R gén na zhodnotenie funkčného obmedzenia proteínových domén a na porovnanie fylogenetických stromov získaných z iných štúdií (Klungland et al., 1999; Li et al., 2007).

## **1.7 Charakteristika najčastejšie používaných molekulárno-genetických metód pre analýzu kandidátskych génov**

### **1.7.1 PCR (Polymerázová reťazová reakcia)**

Metóda PCR (Polymerase Chain Reaction) bola vyvinutá v roku 1986 K. B. Mullisom, za čo bol v roku 1993 ocenený Nobelovou cenou. Podstatou PCR metódy je in vitro syntéza cieľového úseku DNA vo veľkom množstve kópií.

Princípom PCR metódy je syntéza DNA rýchlou zmenou teploty reakčnej zmesi cyklickým opakovaním. Jeden cyklus sa skladá z nasledovných krokov: denaturácia DNA, aneling (hybridizácia oligoprimeroov), polymerizácia (syntéza DNA na matrici).

Nevyhnutnými zložkami PCR reakčnej zmesi sú: templátová DNA, oligonukleotidové primery, Taq DNA polymeráza, zmes voľných deoxyribonukleotidov (dNTP), horčíkové ióny a tlmivý roztok. V prípade slabého výsledku je možné do reakčnej zmesi pridať špecifické enhancery, napr. BSA, glycerol, DMSO, formamid, alebo PEG, ktoré zvyšujú špecifitu reakcie (Mullis, 1990).

V dnešnej dobe je PCR považovaná za základnú metódu pre takmer všetky molekulárno-genetické analýzy, napr. RFLP, RAPD, AFLP, SSCP, DGGE, HRM a iné.

### **1.7.2 RFLP (Polymorfizmus dĺžky restričných fragmentov)**

Metóda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) využíva existenciu reštrikčných endonukleáz, ktoré štiepia polynukleotidový reťazec prerušením fosfodiesterových väzieb v určitých špecifických sekvenciách. V dôsledku uvedeného sa DNA rozpadne na fragmenty rôznej dĺžky. Ak na štiepnom mieste dôjde k zámene báz, enzým neštiepi, alebo vzniká nové štiepne miesto, čím dochádza k zmene dĺžky fragmentov. Fragmenty DNA možno podľa veľkosti rozdeliť pomocou elektroforézy na agarózovom géle a vizualizovať etídium bromidom pod UV svetlom (Sambrook et al., 1989).

Klasickou RFLP je genomická DNA štiepená endonukleázou a vzniknuté fragmenty sa po elektroforetickej separácii blottingom prenášajú na pevnú membránu (Southern blotting). Polymorfizmus vo veľkosti fragmentov možno zistiť po hybridizácií značenou sondou.

Štiepením PCR produktu RFLP metódou a následným elektroforetickým delením fragmentov môžeme alely skúmaného génu, ako v homozygotnom, tak aj v heterozygotnom stave identifikovať.

### **1.7.3 PCR-RFLP**

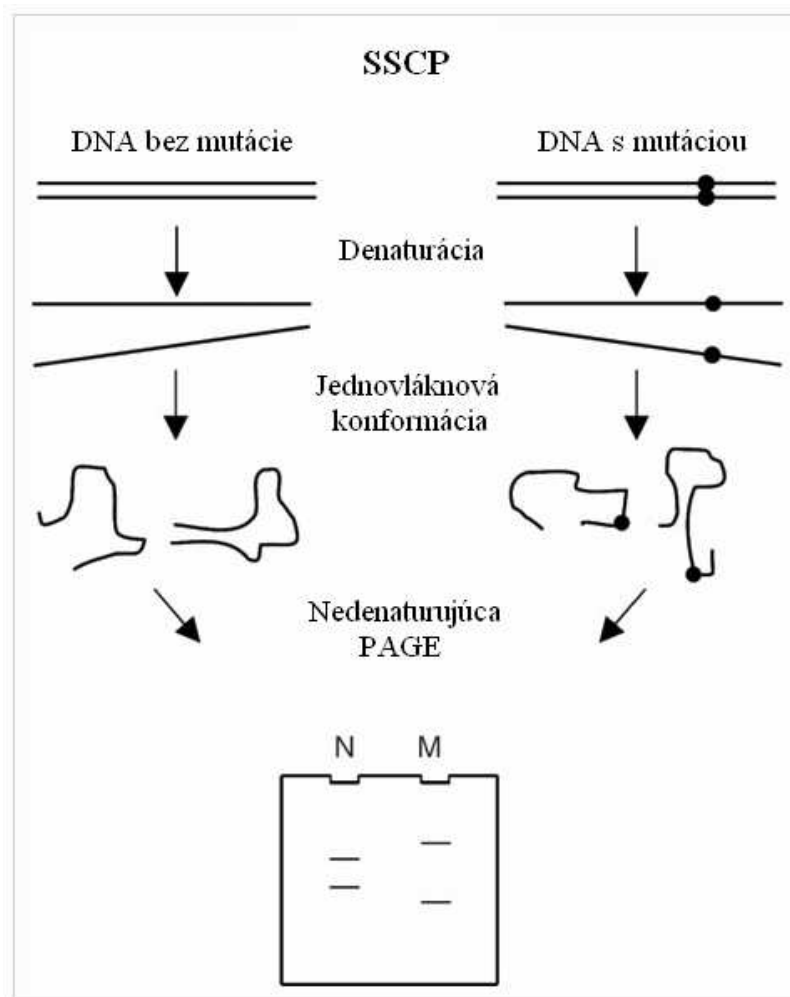
PCR-RFLP predstavuje kombináciu dvoch metód. Metóda umožňuje detekciu mutácií v amplifikovanej DNA, to znamená, že sa vhodným reštrikčným enzýmom štiepi len krátky úsek DNA-PCR produkt. Získané fragmenty, ktorých veľkosť a počet závisí od prítomnosti resp. neprítomnosti štiepneho miesta sa potom elektroforeticky vizualizujú.

PCR-RFLP metóda sa využíva napríklad na analýzu geneticky podmienených chorôb v humánnej i veterinárnej medicíne, na detekciu onkogénov, pri mapovaní génov, pri štúdiu asociačných vzťahov kandidátnych génov k ukazovateľom úžitkovosti.

### **1.7.4 SSCP - Analýza jednovláknového konformačného polymorfizmu**

SSCP bola prvýkrát popísaná v roku 1989 ako účinná metóda na detekciu SNP (Orita, 1989). Ide o pomerne nenáročnú techniku na odhaľovanie neznámych a detekciu

známych mutácií. Princípom tejto metódy je amplifikácia konkrétneho úseku DNA a následná denaturácia PCR produktu účinkom tepla a formamidu. Po elektroforetickej separácii v prostredí nendenaturujúceho polyakrylamidového gélu sa mutácia prejaví zmenou pohyblivosti v géle v dôsledku zmenenej jednovláknovej konformácie v porovnaní s nemutovanou DNA.



**Obrázok 9: Schéma priebehu SSCP analýzy (Gasser et al., 2007).**

Vzhľadom na veľké množstvo faktorov, ktoré ovplyvňujú úspešnosť metódy, je nevyhnutná optimalizácia pre každú mutáciu. K hlavným faktorom radíme:

1. Veľkosť PCR produktu a obsah GC párov – SSCP metóda je najvhodnejšia na analýzu fragmentov s dĺžkou 130 – 250 bp. Sheffield et al. (1993) uvádzajú, že optimálna dĺžka PCR produktu je 150 bp a že percento detegovaných mutácií



klesá s narastajúcou dĺžkou PCR fragmentov. Autori uvádzajú pri spomínanej dĺžke fragmentov senzitivitu metódy 70 – 100%.

2. Teplota – Highsmith et al. (1999) uvádzajú, že senzitivitu SSCP analýzy je možné zvýšiť znížením teploty, ale v prípade vyššieho obsahu GC párov je senzitivita vyššia pri izbovej teplote.
3. Zloženie gélu (koncentrácia, pomer akrylamidu a bisakrylamidu) – súvisí s veľkosťou PCR produktu.
4. Prítomnosť aditív (glycerol, urea, formamide, polyetylén glykol, DMSO) (Orita et al., 1989, Haiashi a Yandell, 1993, Fujita et al., 1994, Markoff et al., 1997, Kukita et al., 1997) – tieto látky upravujú pH v systéme a tým zvyšujú senzitivitu analýzy.
5. Koncentrácia primerov v PCR produkte – Cia et al. (1993) zistili, že nadbytok primerov v PCR reakcii ovplyvňuje negatívne výsledok SSCP analýzy v dôsledku toho, že primery menia konformáciu DNA vláken.

### **1.7.5 Elektroforetické delenie látok**

Začiatky elektroforetického delenia látok siahajú do roku 1942, kedy Coleman a Miller (1942) zistili, že neutrálna hexóza migrovala k anóde v roztoku boraxu. Elektroforetické delenie nukleových kyselín sa uskutočnilo v roku 1971, v tzv. zlatej ére molekulárnej biológie. Do dnešných čias je významnou a relatívne nenáročnou metódou v molekulárnej biológii a genetike. Princípom gélovej elektroforézy je separácia nukleových kyselín a proteínov v géle v poli jednosmerného elektrického prúdu. Zloženie elektroforetického gélu závisí od veľkosti deliacich sa látok, najčastejšie sa používa agarózový a polyakrylamidový gél.

#### **Agarózový gél**

Na delenie väčších molekúl sa používa agarózový gél s rôznou koncentráciou (Tabuľka 3). Ide o najjednoduchší z používaných gélov, poskytuje ale menej kvalitné rozlíšenie fragmentov. K faktorom, ktoré ovplyvňujú delenie látok patrí použitý pufor, veľkosť elektrického prúdu, odporu a napätia a čas trvania elektroforézy. Veľkosť použitého elektrického prúdu, odporu a napätia ovplyvňuje časovú náročnosť separácie látok. Pri vyššom prúde prebieha delenie molekúl rýchlejšie, ale v niektorých prípadoch

môže dochádzať k prehrievaniu gélu a následne k nekvalitnému výsledku delenia (nezreteľné, rozmazané fragmenty). Tento problém je možné vyriešiť voľbou vhodného pufru.

**Tabuľka 3: Vzťah koncentrácie agarózového gélu a veľkosti separovanej molekuly** (Sambrook, 2001).

Koncentrácia agarózového gélu (% [w/v])	Veľkosť separovanej molekuly DNA (kb)
0.3	5-60
0.6	1-20
0.7	0.8-10
0.9	0.5-7
1.2	0.4-6
1.5	0-2-3
2.0	0.1-2

V dnešnej dobe existuje niekoľko všeobecne používaných pufov. Ich hlavnou funkciou je udržiavanie stabilnej hodnoty pH, čo si vyžaduje určitú pufracnú kapacitu. Čím je sila iónov v pufrí nižšia, prípadne čím je nižší objem pufru, tým vyššia musí byť pufracná kapacita. Aby sa predišlo prehrievaniu elektroforetickej sústavy, optimálna je vysoká pufracná kapacita a nízka vodivosť.

Najčastejšie používanými puframi sú TBE (Tris – Borate - EDTA) a TAE (Tris – Acetate – EDTA) puFRE. TAE má nižšiu pufracnú kapacitu, ale poskytuje lepšiu vizualizáciu väčších DNA úsekov. Vyžaduje si použitie nižšieho elektrického prúdu a dlhší čas. TBE poskytuje zase lepšie rozlíšenie kratších úsekov. Okrem týchto dvoch všeobecne uznávaných pufov je možné použiť aj SB (sodium - borate) puFOR. Hlavnou výhodou tohto pufru je fakt, že má nižšiu vodivosť a pri vysokom napätí sa zahrieva menej než TAE a TBE puFRE. Brody a Kern (2004) uvádzajú, že je možné použiť ho pri napätí 5 – 35 V/cm, čím sa výrazne skrúti čas potrebný na separáciu látok. Tiež konštatujú výrazne nižšiu cenu v porovnaní s TBE a TAE puFRAMI. Obdobným puFROM je LB (lítium borate) puFOR, jeho nevýhodou je vyššia cena.

### Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)

Polyakrylamidová elektroforéza bola predstavená v roku 1959 (Ornstein a Davissa, 1959). Využíva sa na delenie veľmi malých fragmentov DNA v prípadoch, kedy je potrebné kvalitnejšie rozlíšenie fragmentov, než aké je možné dosiahnuť použitím agarózovej elektroforézy a tiež na analýzu proteínov. V dnešnej dobe poznáme denaturujúcu PAGE s použitím SDS a močoviny, alebo nedenaturujúcu (natívnu) PAGE bez pridania SDS. Na prípravu gélu sa používa zmes akrylamidu a bisakrylamidu (najčastejšie v pomere 19:1, 29:1, 37,5:1, 39:1). Podľa veľkosti separovaných molekúl sa volí vhodná koncentrácia gélu (tabuľka 4).

**Tabuľka 4: Vzťah koncentrácie polyakrylamidového gélu a veľkosti separovaných molekúl (Sambrook, 2001).**

Koncentrácia akrylamidu (%)	Veľkosť DNA fragmentov (bp)
3,5	1000 – 2000
5,0	80 – 500
8,0	60 – 400
12,0	40 – 200
15,0	25 – 150
20,0	6 - 100

K zmesi akrylamidu a bisakrylamidu je potrebné pridať APS (10% w/v), ktorý sa používa ako katalyzačné činidlo pre polymerizáciu gélu. Polymerizácia prebieha pomocou voľných radikálov, ktoré sú poskytované oxidačno-redukčnou reakciou. Do reakcie sa pridáva aj TEMED, katalyzačné činidlo urýchľujúce tvorbu voľných radikálov.

Polyakrylamidový gél sa používa vo vertikálnych elektroforetických aparátúrach. Pri nedenaturujúcich géloch sa využíva napätie v rozmedzí 1 V/cm – 8 V/cm. Pri vyššom elektrickom napätí by rozdielna teplota v strede gélu mohla spôsobiť ohýbanie DNA bendov alebo aj rozpad DNA vlákna na krátke fragmenty.

### **1.7.6 Sekvenačná analýza**

Podstatou sekvenačnej analýzy je stanovenie sekvencie nukleotidov DNA. Pri sekvenovaní sa využívajú automatické sekvenátory, založené na gélovej alebo kapilárnej elektroforéze. Namiesto rádioaktívneho značenia sa používa fluorescenčné značenie. Namiesto značenia primerov sa používa značenie terminátorov reakcie tzv. dideonukleotidy (ddNTP), ktoré nemajú koncovú OH skupinu pre naviazanie ďalšieho nukleotidu, čím sa zastaví reakcia. Laserová detekcia štyroch rôznych fluorescenčných farieb (značenie 4 druhov nukleotidov) sa vykonáva pomocou fotonásobiča a veľmi citlivého detektoru priamo na géle. K dispozícii je špecializovaný software (Dvořák, Vrtková, 2001).

Sekvenovaním sa môžu detegovať polymorfizmy mikrosatelitov (markery II. Typu) napríklad pre určovanie parentity, paternity, či identifikácia konkrétneho jedinca (Dvořák, Vrtková, 2001).

### **1.7.7 HRM - High Resolution Melting**

HRM analýza bola po prvýkrát predstavená v roku 2002 a našla svoje uplatnenie pri genotypovaní a detekcii známych aj neznámych mutácií prevažne v humánnej medicíne. Ide o časovo nenáročnú, rýchlu a pomerne jednoduchú metódu vhodnú pre identifikáciu SNP, DNA fingerprinting, analýzu DNA metylácie, DNA mapovanie alebo skrining LOH. Vzorky sú analyzované na základe ich správania sa počas denaturácie pri vysokej teplote, kedy sa dvojláknová DNA mení na jednoláknovú. Využívajú sa pri tom rôzne fluorescenčné farbivá (SYBER green, EvaGreen, ...), ktoré vysielajú signál v prostredí jednoláknovej DNA. Pri zvyšujúcej sa teplote, kedy DNA denaturuje a rozpadá sa dvojláknová štruktúra, farbivo je postupne uvoľňované z DNA a HRM prístroj s vysokou presnosťou zachytáva uvoľnený signál a generuje krivku. Keďže každá genetická sekvencia reaguje mierne odlišne, vznikajú rôzne krivky, ktoré sú medzi sebou porovnávané a tým sú detegované mutácie.

## 2 CIEĽ

Produkcia mäsa má najväčší podiel z celkovej produkcie hospodárskych zvierat, pričom sa zohľadňuje nielen kvantita, ale aj kvalita mäsa. Vzhľadom na to, že úžitkovosť brojlerových králikov úzko súvisí s genetikou, reprodukciou a fyziológiou zvierat, bolo cieľom našej práce analyzovať polymorfizmus génov zodpovedných za tvorbu znakov a vlastností spojených s už spomínanou úžitkovosťou zvierat.

Práca bola riešená v nasledovných krokoch:

1. Optimalizácia molekulárno - genetických metód pre analýzu MSTN, PGR a ASIP génov (PCR-RFLP, PCR-SSCP a HRM).
2. Sledovanie vplyvu polymorfných génov MSTN a PGR na vybrané ukazovatele úžitkovosti (početnosť vrhu, živá hmotnosť mláďat a priemerné denné prírastky).
3. Analyzovanie variability markerov v populácii zdrobnelých, obrovitých a brojlerových králikov.

### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Biologický materiál

Pre molekulárno-genetickú analýzu génov PGR, MSTN a ASIP bol použitý biologický materiál získaný od materských a otcovských línií (M91 a P91) králikov z Centra výskumu živočíšnej výroby v Nitre, Ústavu malých hospodárskych zvierat. Pre analýzu MSTN génu bol zároveň použitý biologický materiál získaný na 26. Európskej výstave zvierat v Nitre. Konkrétne boli odobraté vzorky zdobnelých a obrovitých plemien, ktoré boli použité pre štúdium vplyvu polymorfizmu MSTN génu na veľkosť zvierat. Celkové počty zvierat použité pre analýzy uvádza tabuľka 5.

**Tabuľka 5: Počty zvierat použité v experimente**

Sledovaný gén	Počty zvierat
MSTN	127 materských a otcovských línií (M91 a P91) králikov z Centra výskumu živočíšnej výroby Nitra. 108 zdobnelých králikov (Hermelín modrooký Z Rex b, Z Rex, Z Spa Rex) (Supuka et al., 2009). 120 obrovitých králikov (BO, BOA, Nemecký obrovitý strakáč) (Supuka et al., 2009).
PGR	179 materských a otcovských línií (M91 a P91) králikov z Centra výskumu živočíšnej výroby Nitra.
ASIP	30 materských a otcovských línií (M91 a P91) králikov z Centra výskumu živočíšnej výroby Nitra.

Králikom bola odoberaná periférna krv do skúmavky s antikoagulačným roztokom ACD (0,48 % kyselina citrónová, 1,32 % citrát sodný, 1,47 % glukóza), v pomere 1:6 (ACD: krv). Zároveň bolo odobraté ušné tkanivo jednodňových mláďat. Králikom z 26. Európskej výstavy zvierat boli odoberané chlpy a stery z ústnej dutiny.

## **3.2 Izolácia DNA**

### **3.2.1 Izolácia DNA komerčným kitom NucleoSpin Blood**

DNA bola izolovaná z periférnej krvi pomocou izolačného kitu NucleoSpin Blood od firmy Macherey – Nagel podľa priloženého protokolu. Ten zahŕňa lýzu buniek pomocou proteínázy K, naviazanie DNA na silikátovú membránu, premytie DNA, krátke sušenie a uvoľnenie DNA zo siliky do 1, 5 ml skúmavky. Bola potrebná len malá úprava postupu, ktorá spočívala v predĺžení sušenia vzoriek až na 30 minút pri izbovej teplote, aby sa odparil prebytočný alkohol.

### **3.2.2 Izolácia DNA vysol'ovacou metódou (Miller et al., 1988)**

Vysol'ovacia metóda izolácie DNA sa skladá z lýzy buniek a odstránenia hemoglobínu zo vzorky, precipitácie proteínov, precipitácie DNA, premývania DNA, sušenia a rozpustenia DNA v elučnom roztoku.

#### **Lýza buniek:**

1. 500µl krvi + 1000µl RBC sme inkubovali 1-3 minúty pri laboratórnej teplote.
2. Centrifugovali sme pri 9000 g 2 minúty a odstránili supernatant.
3. Vzorky sme vortexovali 10-20 sekúnd, kým sme nezískali homogénny roztok.
4. Pridali sme 600 µl lyzačného roztoku a pipetovaním lyzovali.

#### **Precipitácia (zrážanie) proteínov:**

1. Pridali sme 200 µl roztoku na precipitáciu proteínov a vortexovali.
2. Centrifugovali sme vzorky pri 9000 g. pri teplote 20-25°C, po dobu 20 minút, čím precipitované proteíny vytvorili na dne pevný tmavohnedý pelet.

#### **Precipitácia DNA:**

1. Supernatant s DNA sme odliali do čistej skúmavky, v ktorej bolo 600µl 100% izopropanolu a premiešali sme.

2. Vzorky sme centrifugovali 5 minút pri 8000 g, DNA bola viditeľná ako malý biely pelet.
3. Odpipetovali sme supernatant a pridali 600  $\mu$ l 70% etanolu.
4. Po 5 minút centrifugovaní pri 8000 g sme odpipetovali etanol.
5. Vzorky sme vysušili v termostate pri 37 °C po dobu 10-15 minút.

#### **Rozpustenie DNA:**

Pridali sme 30  $\mu$ l 10nM Tris-HCl pH 8,5 a následne sme inkubovali po dobu 30-60 minút pri 65 °C.

#### **Roztok na lýzu červených krviniek - 5x RBC roztok**

0,77M  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
0,046M  $\text{KHCO}_3$   
0,01M EDTA pH 8.0  
Sterilizované filtráciou

#### **Lyzačný roztok**

50mM Tris-HCl pH 8,0  
100mM EDTA pH 8,0  
100mM NaCl  
1% SDS  
 $\text{H}_2\text{O}$  MiliQ

#### **Roztok na precipitáciu proteínov:**

10M  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$

#### **Roztok na rozpúšťanie DNA:**

10mM Tris- HCl pH 8,5



---

**3.2.3 Izolácia DNA zo zrazenej krvi (podľa Salazar et al., 1998)**

1. Krvnú zrazeninu sme zriedili 1 ml NaCl ( $9\text{g.l}^{-1}$ ) a homogenizovali ultrazvukovým sonikátorom (Biotec) po dobu 2-5 minút.
2. 1 ml homogenizátu sme centrifugovali 5 minút pri 1200 g.
3. Supernatant sme odstránili a pridali sme 1ml Tris pufru I, čím sme pelet lyzovali.
4. Lyzát sme opäť centrifugovali a pelet 2x premyli Tris pufrom I.
5. Následne sme premytý pelet lyzovali v 220 $\mu\text{l}$  Tris pufruII a 15 minút inkubovali pri teplote 56 °C.
6. Proteíny sme vyzrážali 100  $\mu\text{l}$  5M NaCl.
7. Precipitácia DNA prebehla v 500  $\mu\text{l}$  96% etanolu.
8. DNA sme rozpúšťali v TE roztoku prípadne v destilovanej vode.

**Použité roztoky:****Tris Pufor I**

10 mM Tris HCl, pH 8,0

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

2 mM EDTA, pH 8,0

2, 5 % TRITON – X 100

**Tris Pufor II**

10 mM Tris HCl, pH 8,0

10 mM KCl

10 mM MgCl<sub>2</sub>

2 mM EDTA, pH 8,0

0, 4 M NaCl

0, 2% SDS

### **TE pufor**

10 mM Tris HCl, pH 8,0

0, 1 mM EDTA

### **3.2.4 Izolácia DNA z tkaniva (podľa Laird et al., 1991)**

#### **Lyzácia**

1. Kúsok tkaniva z ušnice jednodňového kráľika sme vložili do 1, 5 ml skúmavky a pridali 1ml lyzačného roztoku. Inkubovali sme cez noc pri 55 °C.
2. Na druhý deň sme vzorky centrifugovali 5 minút pri 7000 g. Supernatant sme preniesli do novej 1, 5 ml skúmavky.

#### **Precipitácia**

1. Po centrifugácii sme pridali 600µl izopropanolu, vzorky sme premiešali pomalým otáčaním, čím sa vyvrážala DNA, ktorá bola viditeľná ako jemné biele vlákno
2. K vyvrážanej DNA sme pridali 70 % etanol, vzorku sme centrifugovali po dobu 10 minút pri 8000 g a odstránili sme supernatant. DNA sme sušili približne 15 – 30 minút pri teplote 37°C, aby sme odstránili prebytočný etanol.

#### **Rozpúšťanie DNA**

Vysušenú DNA sme riedili TE roztokom, prípadne sme použili 5 mM Tris – HCl, pH 8, 5.

### **Použité roztoky**

#### **Lyzačný roztok:**

100 mM Tris – HCl, pH 8,5

5 mM EDTA, pH 8,0

0, 2 % SDS

200 mM NaCl

20 mg/ml Proteináza K

#### **TE pufor:**

10 mM Tris HCl, pH 8,0

0, 1 mM EDTA

### **3.2.5 Izolácia zo sterov z ústnej dutiny (podľa Rasler et al., 2006)**

1. Vatový tampón, ktorým sme vytreli bukálnu sliznicu králik, sme vložili do 1, 5 ml skúmavky s destilovanou vodou a premiešali, aby sa bunky z tampónu uvoľnili.
2. Následne sme vzorku centrifugovali 5 minút pri 7000 g.
3. Supernatant sme odstránili, k peletu sme pridali 400 µl lyzačného roztoku a inkubovali sme 5 – 10 minút pri 65°C.
4. Pridali sme 250 µl 4.5 M NaCl a premiešali.
5. Po centrifugácii po dobu 5 minút pri 9000 g sme odstránili pelet. DNA zo supernatantu sme vyžrážali 650 µl izopropanolu a opäť sme centrifugovali 5 minút pri 9000 g.
6. Vzorku sme vysušili pri izbovej teplote (20 minút) a DNA sme rozpustili v 10 mM Tris – HCl, pH 8,5

#### **Použitý lyzačný roztok:**

50 mM TRIS - HCl pH 8

10 mM EDTA

2% SDS

### 3.2.6 Izolácia DNA z chlповých cibuliek

#### A.

Na izoláciu DNA z tmavých chlпов kráľika sme použili metódu podľa Gábora (2009).

1. 15 – 20 králičích chlпов sme skrátili na 0,5 – 1 cm a vložili sme ich do 1,5 ml skúmavky.
2. K vzorke sme pridali 500  $\mu$ l lyzačného roztoku, 5  $\mu$ l Proteinázy K (20mg/ml) a inkubovali sme pri laboratórnej teplote 3 hodiny.
3. Následne sme vzorky centrifugovali pri 10000 g.
4. Supernatant sme odpipetovali do novej skúmavky, pridali sme k nemu 3  $\mu$ l LPA (lineárny polykrylamid) a niekoľkokrát sme vzorku premiešali prevrátením skúmavky.
5. Pridali sme precipitačný roztok (300  $\mu$ l) a cez noc inkubovali pri teplote 20°C.
6. Potom sme vzorky centrifugovali pre 4000 g pri teplote 4 °C po dobu 10 minút.
7. Supernatant sme odpipetovali a pelet sme premyli v 1000  $\mu$ l premývacieho roztoku, vzorku sme vysušili pri teplote 37 °C po dobu 10 – 15 minút.
8. DNA sme rozpustili v 30  $\mu$ l TE pufru.

#### Použité roztoky

##### Lyzačný roztok

##### V DNazole rozpustený:

100 mM NaCl

100 mM Tris – HCl, pH 8,0

3 mM CaCl<sub>2</sub>

40 mM DTT

##### Precipitačný roztok

50  $\mu$ l 3M CH<sub>3</sub>COONa, pH 5,2

250  $\mu$ l 96% etanol

### **Premývací roztok**

75% etanol

### **TE pufor**

10 mM Tris HCl, pH 8,0

0, 1 mM EDTA

### **B**

1. Zo vzoriek bielych chlfov sme pripravovali bunkové lyzáty podľa metodiky Drissing et al. (1996).
2. 15 – 20 králičích chlfov s cibulkami sme vložili do 1, 5 ml skúmavky a zastrihli sme ich na dĺžku približne 0,5 – 1 cm.
3. Pridali sme 50 µl 200 mM NaOH a vzorku sme inkubovali pri 94°C po dobu 10 minút.
4. Následne sme vzorku vortexovali a schladili na izbovú teplotu.
5. Potom sme pridali 50 µl 200mM HCl a 100mM Tris-HCl, pH 8.5. Takto vyizolovanú DNA sme použili do PCR reakcie.

#### **3.2.7 Izolácia DNA z kvapky krvi (podľa Słomski et al., 2008)**

1. Kvapku čerstvej krvi sme kvapli na filtračný papier a nechali sme uschnúť pri izbovej teplote.
2. Z filtračného papiera so zaschnutou krvou sme vystrihli približne 2x2 mm a vložili sme ich do 1,5 ml skúmavky.
3. K vzorke sme pridali 20 µl 0,2M NaOH a inkubovali sme pri 75°C 5 – 10 minút
4. Následne sme k vzorke pridali 180 µl 0,04M Tris – HCl, pH 7,5 a získaný lyzáat sme použili na PCR reakciu

#### **3.2.8 Overenie prítomnosti DNA**

Po skončení izolácie DNA z rôznych biologických materiálov sme úspešnosť izolácie overili elektroforeticky. Vzorky (3 µl) sme zmiešali s brómfenolovou modrou a nanášali ich na 1% agarózový gél s prídavkom interkalačného činidla GelRed

(Biotium). Elektroforéza prebiehala v prostredí 0,5 x TBE pufru, pri elektrickom napätí 130V, po dobu 20 – 30 minút.

### 3.2.9 Meranie koncentrácie a čistoty vzoriek

Princípom spektrofotometrického merania koncentrácie a čistoty DNA je prechod UV žiarenia meranou vzorkou, pričom časť je absorbovaná nukleovými kyselinami. Detektor meria množstvo svetla, ktoré prejde vzorkou. Čím viac UV svetla sa vo vzorke zachytí, tým je vyššia koncentrácia nukleových kyselín. Absorpcia sa meria pri vlnovej dĺžke 260/280nm (DNA absorbuje svetlo s vlnovou dĺžkou 260nm, proteíny svetlo s vlnovou dĺžkou 280nm). V tabuľke 6 sú uvedené pomery absorbancie a množstvo DNA a proteínov po meraní na spektrofotometri (NanoPhotometer, Biotech).

**Tabuľka 6: Vzťah absorbancie (A 260/280) k čistote vzorky (Sambrook and Russel, 2001).**

A (260/280)	% nukleových kyselín	% proteínov
2	100	0
1,98	90	10
1,91	60	40
1,81	60	40

Platí, že ak sa hodnoty A(260/280) rovnajú dvom, vo vzorke sa nachádza RNA. Ak dosahuje A(260/280) hodnotu 1,80, vo vzorke je čistá DNA. Ak hodnota klesne pod 1,8, vzorka je kontaminovaná proteínmi a je potrebné ju purifikovať.

### 3.3 Polymerázová reťazová reakcia

#### 3.3.1 Myostatín

Po vyizolovaní DNA zo všetkých vzoriek prebehla optimalizácia PCR reakcie. Použili sme primery navrhnuté v práci Fontanesi et al. (2008). PCR reakcia prebiehala v objeme 25 µl, v prístroji C1000 ThermalCycler (Bio-Rad).

MSTN primery (Fontanesi et al., 2008):

MSTN FOR: 5'- TAACTGAAAAGAACCCTCTAGTAGC – 3'

MSTN REV: 5'- TCGGTAGTTGTTTCCCACTTT – 3'

Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke 7. Teplotný a časový profil PCR, použitý pre optimalizáciu analýzy s použitím DNA izolovanej z krvi a z tkaniva bol nasledovný:

95 °C – 5 minút  
 95 °C – 30 sekúnd  
 56 - 62 °C – 30 sekúnd  
 72°C - 30 sekúnd  
 72 °C – 10 minút  
 4 °C - schladenie

} 35 cyklov

**Tabuľka 7: Zloženie reakčnej zmesi PCR reakcie MSTN génu**

Zložka PCR zmesi	Koncentrácia	Množstvo na 1 vzorku
2x PCR Master Mix (Fermentas)	1x	12,5 µl
primer FOR (KRD)	10 pmol	1 µl
primer REV (KRD)	10 pmol	1 µl
superčistá voda	do objemu 25 µl	9,5 µl
DNA	50 – 100 ng.µl <sup>-1</sup>	1 µl

V prípade použitia DNA izolovanej z chlpov, bola PCR zmes odlišná, nebol použitý PCR MasterMix a do zmesi bol pridaný vhodný enhancer. Táto úprava bola nevyhnutná vzhľadom na nízku koncentráciu aj čistotu DNA. Koncentrácie jednotlivých zložiek PCR reakčnej zmesi sú uvedené v tabuľke 8. Prítomnosť PCR produktu bola overená elektroforeticky na 2% agarózovom géli s prídavkom etídium bromidu.

**Tabuľka 8: Zloženie reakčnej zmesi PCR reakcie MSTN génu**

Zložka PCR zmesi	Koncentrácia	Množstvo na 1 vzorku
10X PCR pufor (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1x	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub> (Fermentas)	1,5mM	1,5 µl
dNTP Mix (Fermentas)	10 mM	0,5 µl
primer FOR (KRD)	10pmol	1 µl
primer REV (KRD)	10pmol	1 µl
BSA	10mg.ml <sup>-1</sup>	0, 6 µl
Taq polymeráza (Fermentas)	1U	0,2 µl
DNA	20 ng/ µl	2 µl
Superčistá voda	do objemu 25 µl	

### 3.3.2 Progesterónový receptor

DNA získaná z krvi a tkaniva králikov bola použitá pre PCR reakciu s celkovým objemom 25 µl. Boli použité nasledovné primery (Peiró et al., 2008):

PGR FOR: 5´- GAAGCAGGTCATGTCGATTGGAG – 3´

PGR REV: 5´- CGCCTCTGGTGCCAAGTCTC – 3´

Zloženie reakčnej zmesi uvádza tabuľka 9, teplotný a časový profil reakcie bol nasledovný:



95 °C - 3 minúty	}	30 cyklov
95 °C - 30 sekúnd		
55 - 65 °C - 60 sekúnd		
72 °C - 90 sekúnd		
72 °C - 15 minút		
4 °C - schladenie		

**Tabuľka 9: Zloženie reakčnej zmesi PCR reakcie PGR génu**

Zložka PCR zmesi	Koncentrácia	Množstvo na 1 vzorku
10X PCR pufor (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Fermentas)	1x	2, 5 µl
MgCl <sub>2</sub> Fermenta)	1, 5	1, 5 µl
dNTP (Fermenta)	10mM	0, 5 µl
primer FOR (KRD)	2, 5 pmol	0, 5 µl
primer REV (KRD)	2, 5 pmol	0, 5 µl
Taq polymeráza (Fermentas)	1U	0, 2 µl
DNA	50 ng.µl <sup>-1</sup>	2 µl
Superčistá voda	do objemu 25 µl	

Prítomnosť PCR produktu bola overená elektroforeticky na 2% agarózovom géle s prídavkom etídium bromidu.

### 3.3.3 ASIP gén

Pre analýzu ASIP génu bola použitá DNA izolovaná k krvi, chlpu, aj srsti a v PCR reakcii boli použité nasledovné primery (Peiró et al., 2008):

ASIP FOR: 5'- CAGGAAGGCACATCCTCTTT - 3'

ASIP REV: 5'- TTCCCAAACCAAAGAAGTCAA - 3'

Teplotný a časový profil bol nasledovný:

95 °C – 5 minút  
 95 °C – 30 sekúnd  
 55 - 65°C – 30 sekúnd  
 72°C - 30 sekúnd  
 72 °C – 10 minút  
 4°C – schladenie

} 35 cyklov

Koncentrácia jednotlivých zložiek reakčnej zmesi PCR reakcie sú uvedené v tabuľke 10.

**Tabuľka 10: Zloženie reakčnej zmesi PCR reakcie**

<b>Zložka PCR zmesi</b>	<b>Koncentrácia</b>	<b>Množstvo na 1 vzorku</b>
2x PCR Master Mix (Fermentas)	1x	12,5 µl
primer FOR	10 pmol	1 µl
primer REV	10 pmol	1 µl
DNA	50 ng.µl <sup>-1</sup>	1 µl
superčistá voda	do objemu 25 µl	superčistá voda

### 3.4 Analýza polymorfizmu dĺžky restriktčných fragmentov

#### 3.4.1 MSTN

Po úspešnom získaní PCR produktu, sme tento štiepili 3U restriktčného enzýmu AluI (Fermentas) pri teplote 37°C, cez noc. Charakteristika enzýmu je uvedená v tabuľke 11. Následne sme štiepenú DNA vizualizovali na 4% agarózovom géli.

**Tabuľka 11: Charakteristika enzýmu AluI**

Enzým	Zdroj	Rozoznávaná sekvencia	Štiepne miesto
AluI	Arthrobacter luteus	5'AGCT 3'TCGA	5'---AG ↓ CT---3' 3'---TC ↓ GA---5'

#### 3.4.2 PGR

Gén pre progesterónový receptor, ktorý sme získali po PCR reakcii, sme štiepili 5U enzýmu Eco31I (Fermentas) pri teplote 37 °C, cez noc. V prípade enzýmu vo forme FastDigest bol PCR produkt štiepený po dobu 5 minút pri teplote 37 °C a následnej 10 minútovej inhibícii enzýmu pri teplote 65 °C. Charakteristika enzýmu je uvedená v tabuľke 12. Produkty štiepenia sme vizualizovali na 2% agarózovom géle s prídavkom etídium bromidu.

**Tabuľka 12: Charakteristika enzýmu Eco31I**

Enzým	Zdroj	Rozoznávaná sekvencia	Štiepne miesto
Eco31I	Escherichia coli RFLP31	5' GGTCTC 3' CCAGAG	5' ---GGTCTCN ↓ NNNN--- 3' 3' ---CCAGAGNNNN --- 5'

#### 3.4.3 ASIP

Pre restriktčnú analýzu ASIP génu boli použité 3U enzýmu EcoRI (Fermentas), štiepenie prebiehalo pri teplote 37°C, cez noc a výsledok štiepenia bol vizualizovaný na

2% agarózovom géle s prídavkom etídiu bromidu. Charakteristika enzýmu je uvedená v tabuľke 13.

**Tabuľka 13: Charakteristika enzýmu EcoRI**

Enzým	Zdroj	Rozoznávaná sekvencia	Štiepne miesto
EcoRI	Escherichia coli	5'GAATTC 3'CTTAAG	5'---G ↓ AATTC---3' 3'---CTTAA ↓ G---5'

### 3.5 Analýza jednovláknového konformačného polymorfizmu

Princípom SSCP analýzy je detekcia mutácií sekvencie na základe zmenenej pohyblivosti v polyakrylamidovom géli, ktorá je spôsobená zmenou štruktúry cieľovej sekvencie.

Pre analýzu MSTN bol použitý 14% polyakrylamidový gél s prídavkom glycerolu. Vzorky (2µl) boli pred nanášaním na gél zmiešané s 8 µl farbiva (0.05% brómfenolová modrá, 0.05% xylene cyanol, 95% formamid, 20 mM EDTA), 10 minút denaturované v termocykleri pri 95°C a následne boli na 10 minút uložené v mrazničke pri teplote -20°C. Elektroforetická separácia sa uskutočnila pri teplote 20°C, elektrickým napätím 400V, po dobu 6 hodín. Polyakrylamidový gél bol potom farbený striebrom podľa metodiky Byuna et al. (2008). SSCP gél bol fixovaný a farbený približne 2 minúty v roztoku s obsahom 10% etanolu, 0,5% kyseliny octovej a 0,2% AgNO<sub>3</sub>. Následne bol gél krátko premytý destilovanou vodou a bol prenesený do vyvíjacieho roztoku, ktorý bol zložený z 3% NaOH a 0,1% HCOH zahriateho na 55 °C. Po tom, ako sa objavili bendy bol gél vložený do STOP roztoku (10% etanol, 0,5% kyselina octová).

### 3.6 HRM

Okrem PCR-RFLP a PCR-SSCP sme optimalizovali HRM analýzu. Princípom analýzy je rozdielne správanie sa DNA pri vysokej teplote, kedy sa denaturuje, rozpadá sa jej dvojitá štruktúra a uvoľňuje sa fluorescenčné farbivo. Fluorescenčný signál

je vyhodnotený HRM prístroj, porovnáva sa s referenčnými vzorkami a na základe toho je určený genotyp neznámych vzoriek. Pre amplifikáciu cieľového úseku DNA sme použili SensiMix HRM (Quantance) a fluorescenčné farbivo EvaGreen. Pre MSTN aj PGR gén boli použité rovnaké primery ako pri bežnej PCR reakcii. Teplotný aj časový profil boli optimalizované podľa HRM manuálu. Zloženie reakčnej zmesi pre analýzu MSTN génu HRM analýzou je v tabuľke 14.

**Tabuľka 14: Zloženie reakčnej zmesi HRM analýzy MSTN génu**

Zložka HRM zmesi	Koncentrácia	Množstvo na 1 reakciu
HRM SensiMix	1x	12,5 µl
EvaGreen	-	1 µl
Primer mix	10 pmol	1 µl
DNA	50 ng.µl <sup>-1</sup>	1 µl
Voda	Do objemu 25 µl	

Teplotné a časové podmienky reakcie boli nasledovné:

Preamplifikácia:

95°C – 10 minút	}	40 cyklov
95°C – 30 sekúnd		
59°C – 30 sekúnd		
70°C – 30 sekúnd		

HRM: 65 – 80 °C, fluorescencia bola meraná po 0, 1°C

Pri optimalizácii HRM analýzy pre identifikáciu polymorfizmu PGR génu sme vychádzali z manuálu HRM analýzy. Zloženie reakčnej zmesi je uvedené v tabuľke.

**Tabuľka 15: Zloženie reakčnej zmesi HRM analýzy PGR génu**

Zložka HRM zmesi	Koncentrácia	Množstvo na 1 reakciu
HRM SensiMix	1x	12,5 $\mu$ l
EvaGreen	-	1 $\mu$ l
Primer mix	5 pmol	0,5 $\mu$ l
DNA	50 ng. $\mu$ l <sup>-1</sup>	1 $\mu$ l
Voda	Do objemu 25 $\mu$ l	

Teplotný a časový profil reakcie bol nasledovný:

Preamplifikácia:

95°C – 10 minút	}	40 cyklov
95°C – 10 sekúnd		
59°C – 20 sekúnd		
70°C – 15 sekúnd		

HRM: 75 – 90 °C, fluorescencia bola meraná po 0, 1°C.

### 3.7 Matematicko – štatistické vyhodnotenie výsledkov

Na základe PCR-RFLP a SSCP analýz sme stanovili genotypovú štruktúru populácií králikov a vypočítali sme frekvenciu alel. Signifikantnosť rozdielov medzi experimentálnou a teoreticky očakávanou frekvenciou genotypov sme overili  $\chi^2$ -testom. Efektivitu rozptylu alel a genetickú diverzitu sme hodnotili nasledovnými parametrami: stupeň teoretickej heterozygótnosti ( $H_{exp}$ ), stupeň experimentálnej heterozygótnosti ( $H_{obs}$ ), polymorfný informačný obsah (PIC) a efektívny počet alel (EA) (Trakovická et al., 2005) podľa nasledovných vzorcov:

Výpočet génových frekvencií podľa Hardy – Weinbergovho zákona:

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

$p_A, q_B$  – frekvenci jednotlivých alel

$N$  – počet jedincov v populácii

Výpočet genotypovej rovnováhy overenej  $\chi^2$ - testom:

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

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

$e$  - pozorovaný počet genotypov

$t$  - teoretický počet genotypov

$n$  - počet genotypových tried

Výpočet heterozygotnosti očakávanej  $H_e$  (Nei, 1978):

$$H_{exp} = 1 - \sum (p^2 + q^2)$$

Výpočet heterozygotnosti pozorovanej  $H_o$  (Nei, 1978):

$$H_{obs} = \frac{N_H}{N}$$

$N_H$  počet pozorovaných heterozygotov

$N$  počet jedincov v populácii

Efektívny počet alel EA (Crow Kimura, 1970)

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

Výpočet polymorfného informačného obsahu (Botstein et al., 1980):

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

### 3.8 Asociačné štúdie

Na základe vyššie uvedených molekulárno-genetických analýz a matematicko-štatistických výpočtov sme uskutočnili asociačné štúdie v prípade dvoch génov. Pri MSTN sme sledovali prírastky hmotností mláďat s genotypom CC a TT. Pre experiment sme vybrali samice v približne rovnakom veku, s dobrým zdravotným stavom, ktoré už boli dvakrát párené. Vrhly boli upravované na 8 zvierat. Novonarodené králiky boli označené zástrihmi do uší, čím sme zároveň získali materiál pre izoláciu DNA. Vážené boli v týždňových intervaloch od narodenia po odstav. Do štatistického vyhodnotenia získaných výsledkov boli zahrnuté len tie vrhy, v ktorých nedošlo k úhynu mláďat, aby sa zachovala objektivita vyhodnotenia.

Živú hmotnosť a priemerné denné prírastky dvoch genotypov (CC a TT) sme vyhodnotili matematicko-štatisticky nasledovne:

- vypočítali sme základné variačno-štatistické charakteristiky,  $\bar{y}$ ,  $s$ ,  $s_{\bar{y}}$ ,  $v$  %, asymetriu  $A$  a exces  $E$
- vzhľadom na štruktúru experimentálneho materiálu genotypy CC a TT, v rámci nich samice a ich potomkovia, sme živú hmotnosť a priemerné denné prírastky hodnotili pomocou modelu dvojfaktorovej analýzy rozptylu s pevnými efektami:



$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_{ij} + e_{ijk}, \text{ kde}$$

$y_{ijk}$   $k$  - te pozorovanie  $j$  - tej matky  $i$  – tého genotypu

$\alpha_i$  pevný efekt genotypu,  $i = 1, 2$

$\beta_{ij}$  pevný efekt  $j$  – tej matky  $i$  – tého genotypu a

$e_{ijk}$  náhodné nezávislé normálne rozdelené chyby pozorovaní, teda  $e_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$ ,

Pre priemerné denné prírastky a živé hmotnosti králikov sme vypočítali Pearsonové korelácie, rast živej hmotnosti sme pre genotypy vzhľadom na vek zvierat v dňoch hodnotili pomocou lineárnej a nelineárnej regresie. Pre vlastné výpočty sme použili štatistické balíky programov SPSS for Widows, Release 6 a Statistix for Windows, Version 8.

V prípade asociačných štúdií PGR génu sme hodnotili súbor 46 samíc králikov, ktoré sme rozdelili podľa počtu vrhov do troch skupín na základe aritmetického priemeru a smerodajnej odchýlky (1. skupina : počet vrhov  $< \bar{x} - 0,5 \text{ sx}$ ; 2. skupina :  $\bar{x} - 0,5 \text{ sx} \leq \text{počet vrhov} \leq \bar{x} + 0,5 \text{ sx}$ ; 3. skupina : počet vrhov  $> \bar{x} + 0,5 \text{ sx}$ ). Rozdelenie sme upravili na celý vrh.

1. skupina – 1 – 4 vrhy

2. skupina – 5 – 8 vrhov

3. skupina – 9 – 12 vrhov

V hodnotenom súbore boli zastúpené tri genotypy: AA, AG a GG. Pre objektívnejšie zhodnotenie vplyvu genotypu sme použili dvojfaktorovú analýzu rozptylu samostatne pre každý hodnotený ukazovateľ:

$$Y_{ij} = \mu + G_i + S_j + e_{ij}$$

$Y_{ij}$  - počet zvierat vo vrhoch, počet mŕtvonarodených a počet živonarodených mláďat

$G_i$  - efekt genotypu (AA, AG, GG)

$S_j$  - efekt skupiny podľa počtu vrhov ( $j = 1, 2, 3$ )

$\mu$  - priemer

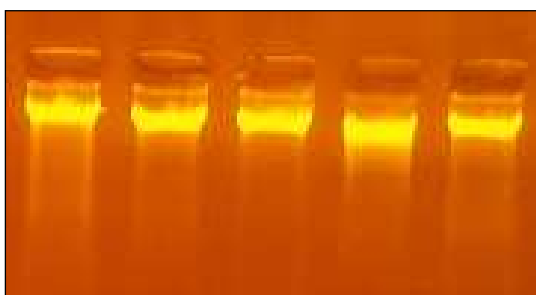
Základné štatistické analýzy, testovanie normality, analýza činiteľov a príprava údajov bola uskutočnená pomocou programového balíka SAS 9.1, nadstavby SAS Enterprise Guide 3.0. Sledovali sme početnosť vrhov samíc s AA, AB a BB genotypom. Pre experiment sme vybrali zvieratá v dobrom zdravotnom stave, ktoré mali minimálne 3 úspešné vrhy za sebou. Vyhodnocovali sme celkový počet mláďat a počty živonarodených a mŕtvonarodených zvierat.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

### 4.1 Izolácia DNA

Na izoláciu genómovej DNA sme použili deväť rôznych metód, v závislosti od typu a kvality biologického materiálu, ktorý bol zdrojom DNA.

Optimálne výsledky sme dosiahli pri izolácii DNA z tkaniva. Použili sme dve metódy: izoláciu pomocou komerčného kitu NucleoSpin Tissue od firmy Macherey Nagel a izoláciu podľa metodiky Laird et al. (1991) na izoláciu DNA z myších chvostov. V oboch prípadoch bola koncentrácia DNA v rozmedzí 150 – 320 ng.µl<sup>-1</sup>, čo zodpovedalo hodnotám, ktoré uvádza výrobca komerčného kitu a autor izolačnej metódy (Obrázok 10). Čistota DNA, ktorá bola meraná spektrofotometricky prístrojom NanoPhotometer (Biotech) pri vlnovej dĺžke 260/280nm, sa pohybovala v rozmedzí 1,5 – 2,1. Tieto hodnoty vyjadrujú množstvo zbytkových proteínov vo vzorkách. V niektorých prípadoch bola potrebná dodatočná purifikácia DNA. Rozdiel medzi uvedenými metódami je najmä vo finančnej náročnosti izolácií, cena izolácie komerčným kitom je vyššia než cena izolácie podľa Laird et al. (1991). Vo výťažnosti a čistote medzi metódami rozdiely neboli.



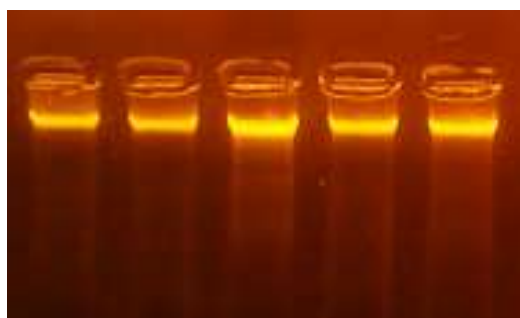
**Obrázok 10: DNA z tkaniva vizualizovaná na 1% agarózovom géle**

Na izoláciu DNA z krvi sme použili štyri metódy, ktoré sú podrobne popísané v kapitole „Materiál a metódy“. Najrýchlejšia a najjednoduchšia bola izolácia pomocou komerčného kitu NucleoSpin Blood od firmy Macherey Nagel. Potrebné množstvo čerstvej alebo zmrazenej krvi bolo 250 µl. Postup izolácie sa zhodoval s manuálom kitu,

zmenili sme len posledný krok izolácie, kedy bolo potrebné vzorky sušiť pri izbovej teplote až 30 minút, aby sme odstránili zostatkový alkohol. Výťažnosť DNA sa pohybovala v rozmedzí 10 – 67 ng. $\mu\text{l}^{-1}$  a čistota v rozmedzí hodnôt 1,5 až 1,74 pri spektrofotometrickom meraní s vlnovou dĺžkou 260/280nm (NanoPhotometer, Biotech). Vzhľadom na finančnú náročnosť tejto izolácie sme neskôr pristúpili k izolácii vysolovacou metódou podľa metodiky Miller et al (1998). Na izoláciu sme použili 250 – 500  $\mu\text{l}$  čerstvej alebo zmrazenej krvi. Z tohto množstva sme získali DNA s koncentráciou 6 – 56 ng. $\mu\text{l}^{-1}$ . Čistota sa pohybovala medzi 1,4 až 1,86.

Ďalšou použitou metódou bola izolácia DNA zo zrazenej krvi podľa protokolu uvedeného v práci Salazar et al. (1998). Táto metóda umožňovala vyizolovať DNA s koncentráciou 5 – 80 ng. $\mu\text{l}^{-1}$  a s čistotou 1,3 – 1,78.

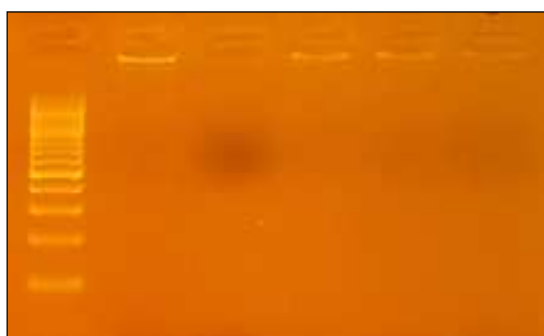
Poslednou z použitých metód izolácie DNA z krvi bola extrakcia z kvapky krvi zaschnutej na filtračnom papieri podľa Słomski et al. (2008). Bežne sa v metodikách používajú špeciálne filtračné papiere, napríklad Watmann. My sme na izoláciu použili obyčajný filtračný papier. Reprezentatívne výsledky izolácie sú znázornené na obrázku 11. Metódu sme použili pri vzorkách, kde sme nemali dostatočné množstvo krvi potrebné pre použitie ostatných metód. Koncentrácia získanej DNA bola približne 3 – 10 ng. $\mu\text{l}^{-1}$ , čistota nebola merateľná, keďže sme pripravovali len bunkový lyzát. Ten sme pre účely bežnej PCR reakcie nepurifikovali.



**Obrázok 11: DNA izolovaná z krvi vizualizovaná na 1% agarózovom géle**

V prípade králikov z 26. Európskej výstavy zvierat v Nitre, od ktorých nebolo možné z výstavných dôvodov odobrať materiál invazívnym spôsobom, sme odobrali len chlpy a stery bukálnej sliznice. Pre izoláciu DNA z chlpov boli použité dve metódy. Pri prvej z nich sme vychádzali z práce Drissing et al. (1998), ktorej princípom je príprava bunkového lyzátu. Preto sme tento spôsob použili len pri izolácii z bielych

chlпов. Koncentrácia DNA bola do  $20\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Pri použití týchto vzoriek pre ďalšie analýzy sme pridávali do reakcií PCR enhancery, alebo sme vzorky pred analýzou dodatočne purifikovali. Pri izolácii DNA z tmavých chlпов bolo potrebné odstrániť zo vzorky melanín, ktorý je inhibítorom PCR reakcie (Suenaga and Nakamura, 2004). Preto sme DNA izolovali časovo aj materiálovo náročnejšou metódou podľa Gábora (2009), v ktorej bol použitý lineárny polyakrylamid ako nosič pre malé množstvo DNA. Získali sme približne  $15\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  DNA s čistotou 1,6 – 1,8 (Obrázok 12).



**Obrázok 12: DNA izolovaná z chlпов vizualizovaná na 1% agarózovom géle**

Niekoľkým zvieratám sme odobrali stery z bukálnej sliznice a DNA sme izolovali podľa metódy Ralser et al. (2006). Koncentrácia DNA po tejto izolácii bola  $10 - 25\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  a čistota 1,5. Jednou z podmienok úspešnej izolácie DNA touto metódou je čistá bukálna sliznica, aby bol zabezpečený odber buniek bez zvyškov potravy. Vzhľadom na to, že králiky mali nepretržitý prístup ku krmivu a vo viacerých prípadoch boli na odberovom vatovom tampóne zvyšky krmiva a len malé množstvo buniek, nebola táto metóda dostatočne spoľahlivá. Preto sme ju používali len v prípadoch, kedy sme nezískali žiadny iný biologický materiál. Na obrázku 13 je znázornená vyextrahovaná DNA po vizualizácii na 1% agarózovom géle. Tabuľka 16 sumarizuje výsledky jednotlivých spôsobov izolácie.



**Obrázok 13: DNA zo sterov bukálnej sliznice vizualizovaná na 1% agarózovom géle**

**Tab. 16: Prehľad koncentrácií a čistoty DNA z rôznych typov izolácie – čistota nie je uvedená pri lyzátoch, pri ktorých vzorky neboli po izolácii purifikované.**

Typ izolácie	Zdroj DNA	Množstvo materiálu	Priemerná koncentrácia DNA	Celkový objem	Priemerná čistota DNA (260/280nm)
NucleoSpinBlood	Krv	200 $\mu$ l	55 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	100 $\mu$ l	1,7
Vyšľovacia metóda (Miller et al., 1988)	Krv	250 $\mu$ l	40 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	100 $\mu$ l	1,7
Izolácia zo zrazenej krvi (Salazar et al., 1998)	Krv	500 $\mu$ l	74 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	100 $\mu$ l	1,7
Izolácia z kvapky krvi (Slomski et al., 2008)	Krv	cca 20 $\mu$ l	5 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	50 $\mu$ l	-
NucleoSpin Tissue	Tkanivo	2x2 mm	230 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	100 $\mu$ l	1,8
Izolácia z tkaniva (Laird et al., 1991)	Tkanivo	2x2 mm	170 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	100 $\mu$ l	1,75
Izolácia z chlpy (Drissing et al., 1998)	Chlpy	10-15 chlpy	10 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	100 $\mu$ l	-
Izolácia s chlpy (Gábor, 2009)	Chlpy	10-15 chlpy	12 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	30 $\mu$ l	1,8
Izolácia z buniek bukálnej sliznice (Ralser et al., 2006)	Ster	-	15 $\text{ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$	30 $\mu$ l	1,7

---

Najvyššiu koncentráciu a čistotu DNA sme získali izoláciou z tkaniva. Manipulácia s tkanivom bola v porovnaní s ostatnými typmi použitého biologického materiálu najjednoduchšia a najspoľahlivejšia. Izolácia DNA z krvi je limitovaná viacerými faktormi, napríklad množstvom a kvalitou krvi. Vzhľadom na to, že sme pracovali s malými zvieratami, nebolo vždy možné odobrať potrebný objem krvi.

Ďalšie metódy izolácie, ktorými sme nezískavali čistú DNA, ale bunkové lyzáty, boli použité len pre bežnú PCR analýzu. Pre HRM analýzu, kde majú rozhodujúci vplyv na úspešnosť metódy koncentrácia a čistota vzoriek, lyzáty vhodné neboli, resp. ich bolo treba dodatočne purifikovať.

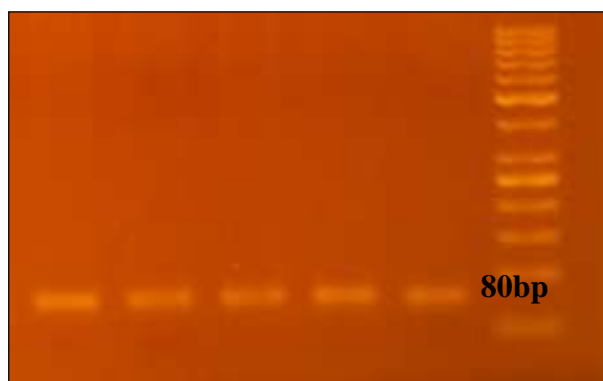
## 4.2 Analýza MSTN génu

Analýzu MSTN génu sme uskutočnili tromi metódami: PCR-RFLP, SSCP a HRM.

Pri prvej z nich, PCR-RFLP, sme vychádzali z práce Fontanesi et al. (2008), ktorý identifikoval SNP (tranzíciu C → T) v intróne génu pre myostatín kráľika. Použili sme ním navrhnuté primery (uvedené v kapitole „Materiál a metodika“) a uskutočnili optimalizáciu metódy. Teplotný a časový profil, rovnako aj zloženie reakčnej zmesi záviseli od kvality použitej DNA. V prípade použitia DNA izolovanej z krvi alebo tkaniva, kedy bola dostatočne vysoká koncentrácia aj čistota, bol teplotný a časový profil nasledovný: aktivácia polymerázy - 95°C po dobu 5 minút, denaturácia - 95 °C po dobu 30 sekúnd, annealing - 56,2°C po dobu 30 sekúnd, polymerizácia - 70°C po dobu 30 sekúnd, elongácia - 72°C po dobu 10 minút. Reakcia prebiehala v 30 cykloch.

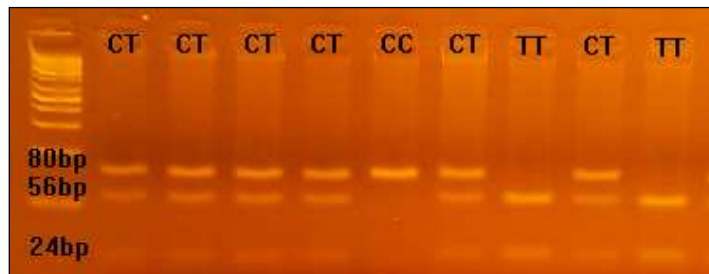
V prípade použitia lyzátu z chlpových cibuliek a buniek bukálnej sliznice sme do reakčnej zmesi pridávali PCR enhancery, 5% glycerol a 5µg.µl<sup>-1</sup> BSA, ktoré zvýšili výťažnosť aj špecifitu reakcie. Teplotný a časový profil reakcie bol upravený nasledovne: aktivácia polymerázy - 95°C počas 3 minút, denaturácia - 95 °C počas 30 sekúnd, annealing - 60 °C počas 30 sekúnd, polymerizácia - 72 °C počas 30 sekúnd a elongácia 70 °C počas 15 minút. Počet cyklov sme zvýšili na 40.

Získaný PCR produkt s veľkosťou 80 bp bol vizualizovaný na 2% agarózovom géle (Obrázok 14) a následne štiepený 3U restriktívnej endonukleázy AluI, cez noc a pri teplote 37 °C.

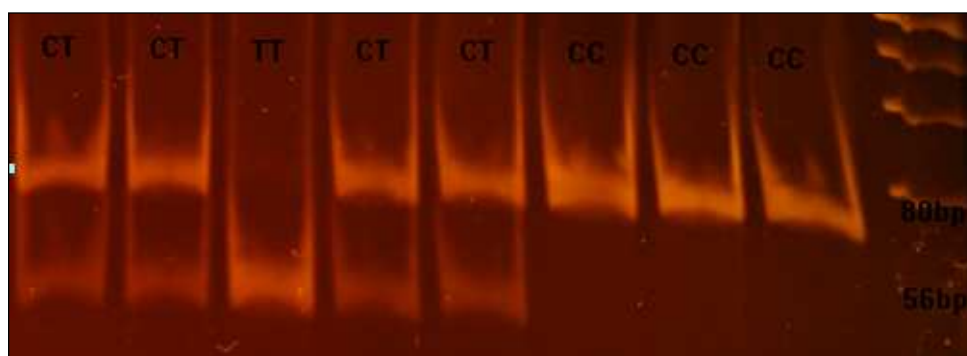


**Obrázok 14: Reprezentatívne výsledky PCR analýzy MSTN génu.**

Na základe tejto analýzy sme identifikovali všetky tri genotypy (CC, CT, TT) v populácii zdobnelých, obrovitých aj brojlerových králikov. V prípade genotypu CT sme restričnou analýzou získali 3 fragmenty s veľkosťou 80 bp, 56 bp a 24 bp, pri genotype TT vznikli dva fragmenty s veľkosťou 56 bp a 24 bp a genotyp CC nebol štiepený, preto bola jeho veľkosť zhodná s veľkosťou PCR produktu (Obrázok 15, 16, 17).

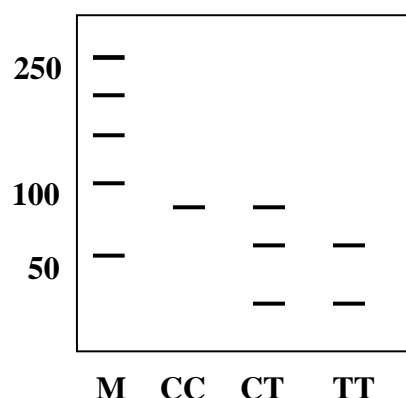


**Obrázok 15: Reprezentatívne výsledky štiepenia MSTN génu vizualizované na agarózovom géle.**



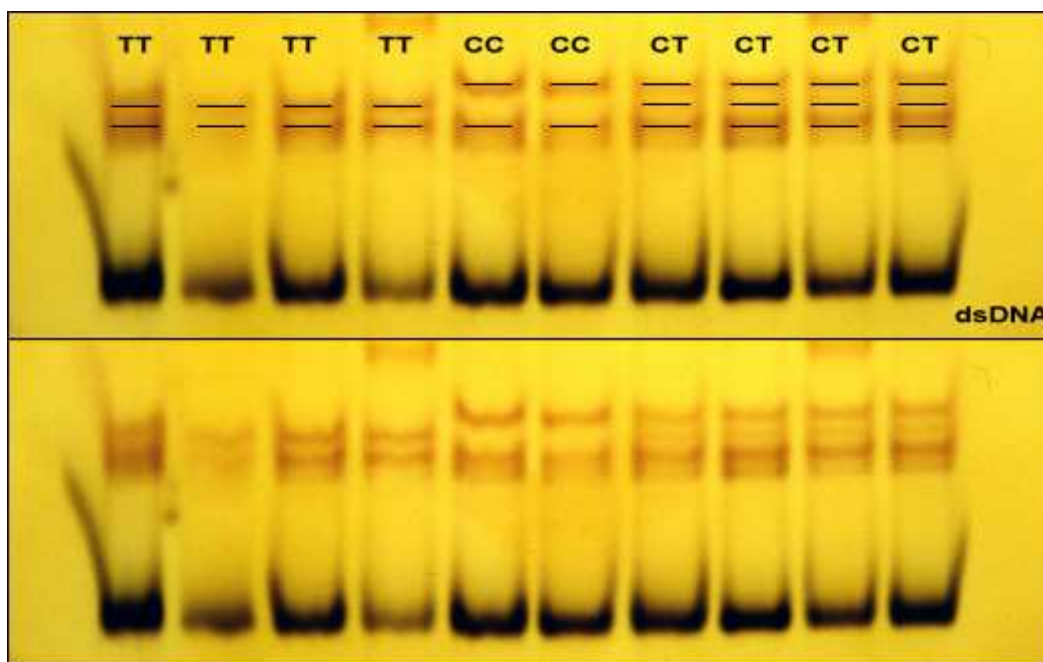
**Obrázok 16: Reprezentatívne výsledky štiepenia MSTN génu vizualizované na polyakrylamidovom géle.**





**Obrázok 17: Schéma štiepenia MSTN génu**

Na vizualizáciu štiepných produktov sme na začiatku použili 12% polyakrylamidový gél . Keďže ale jeho príprava bola časovo náročná a okrem použitia karcinogénneho etídium bromidu vyžadovala aj manipuláciu s toxickým akrylamidom a bisakrylamidom, vo väčšine prípadov sme nakoniec používali 4% agarózový gél. Okrem PCR-RFLP sme optimalizovali aj SSCP metódu na analýzu polymorfizmu MSTN génu. V rámci optimalizácie sme použili 10%, 12%, 14% a 16% polyakrylamidový gél bez prídavku glycerolu a s prídavkom 5% a 10% glycerolu. Dĺžka trvania elektroforézy bola 5, 6, 7 a 8 hodín, teplota elektroforetickej aparatúry bola 20°C, elektrické napätie bolo 400V. Po ukončení elektroforetickej separácie bol gél farbený striebrom podľa metodiky uvedenej v kapitole „Materiál a metódy“. Pre PCR produkt s veľosťou 80 bp boli optimálne nasledovné výsledky: 6 hodinová separácia, 14% gél, prídavok 5% glycerolu. Na obrázku 18 sú reprezentatívne výsledky SSCP analýzy.



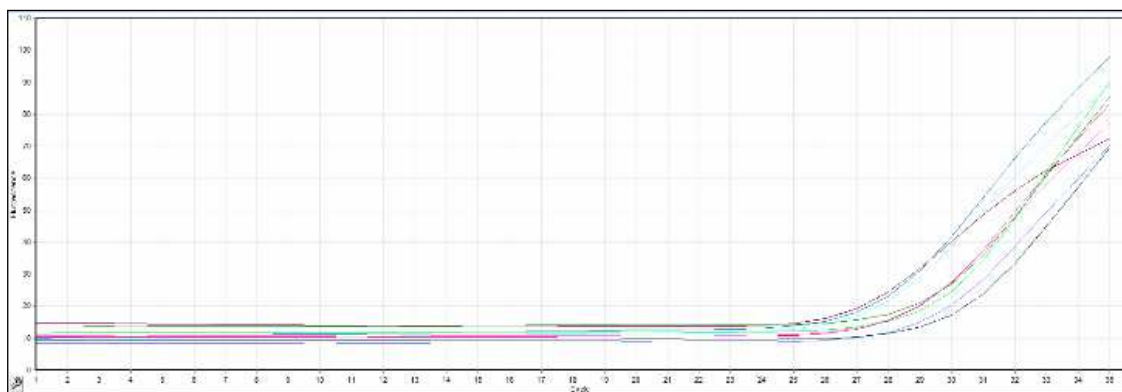
**Obrázok 18: Reprezentatívne výsledky SSCP analýzy MSTN génu.**

Táto metóda je vhodná na detekciu SNP v MSTN géne, aj keď je v porovnaní s restrikčnou analýzou časovo náročnejšia. Polyakrylamidový gél tuhne niekoľko hodín, najlepšie cez noc, vlastná separácia trvá 6 hodín a farbenie gélu približne 30 minút.

Poslednou optimalizovanou metódou bola HRM analýza. Použili sme rovnaké primery ako pri bežnej PCR analýze, čím sme získali PCR produkt s dĺžkou 80 bp, čo je optimálna veľkosť pre HRM analýzu. Analýza prebiehala v HRM analyzátoch Rotor Gene 6000 a LightCycler (Roche). Analýza pozostávala z preamplifikácie a vlastnej HRM analýzy.

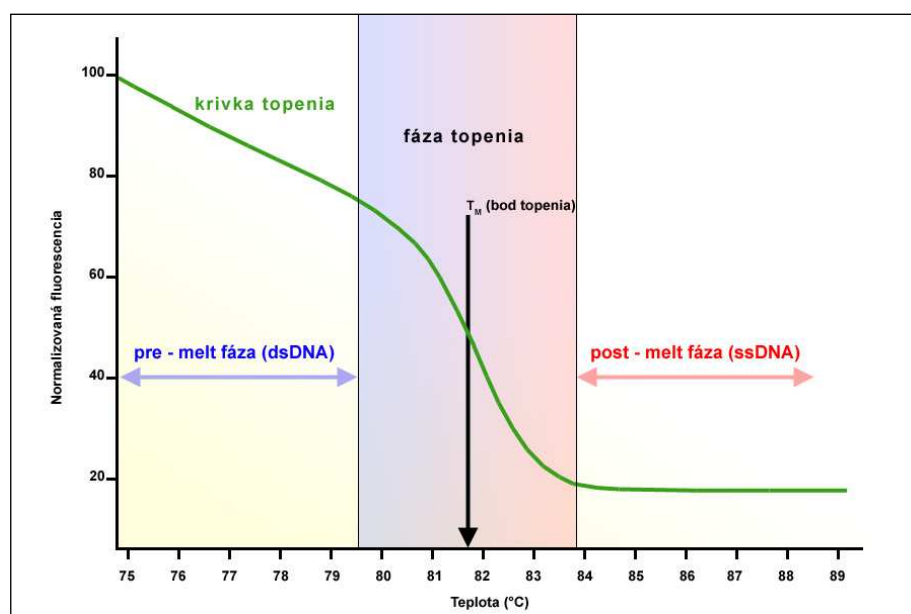
Pri optimalizácii preamplifikácie sme vychádzali z manuálu prístroja, kde je odporúčaná dĺžka jednotlivých krokov cyklovania maximálne 20 sekúnd, koncentrácia DNA 10 – 50 ng a koncentrácia primerov 200 nM. Pri týchto podmienkach ale nenastala amplifikácia. Preto sme spravili koncentračný gradient DNA (25 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng) aj primerov (2,5 pmol, 5 pmol, 10 pmol), aby sme určili ich optimálne koncentrácie. Zároveň sme upravili teplotný a časový profil podľa PCR reakcie použitej pri PCR-RFLP a PCR-SSCP. Konečná koncentrácia DNA bola 50 ng a primerov 10 pmolov na vzorku. Profil reakcie bol nasledovný: počiatočná denaturácia pri 95°C – 10 minút, následne sa v 45 cykloch striedali tri kroky – denaturácia pri 95°C – 30 sekúnd, annealing pri 62°C – 30 sekúnd a polymerizácia pri 70°C – 30 sekúnd. Konečná elongácia bola vynechaná, pretože nemala vplyv na intenzitu amplifikácie. Pri

uvedenom profile sme dosiahli dostatočnú amplifikáciu od 30. cyklu, čo je znázornené na obrázku 19.

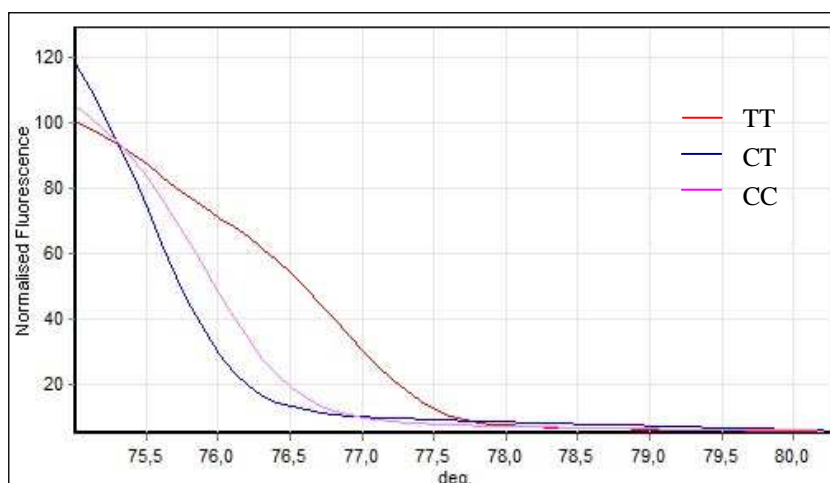


**Obrázok 19: Amplifikácia PCR produktu**

Následne prebehla HRM analýza. Odporúčané rozmedzie teplôt podľa manuálu je 75 – 90°C. Vzhľadom na veľkosť PCR produktu a obsah A-T párov, bolo potrebné teplotné rozmedzie znížiť na 65 – 85 °C, keďže k topeniu PCR produktu dochádzalo už pri teplote 75 °C. Na obrázku 21 je znázornená normalizovaná krivka HRM analýzy troch vzoriek s rôznym genotypom. Vyhodnocovaný úsek krivky bol ohraničený normalizačnými regiónmi, ktoré vymedzujú oblasť s fluorescenciou dvojláčkovej DNA, bod topenia produktu a fluorescenciu jednovláčkovej DNA (Obrázok 20, 21).

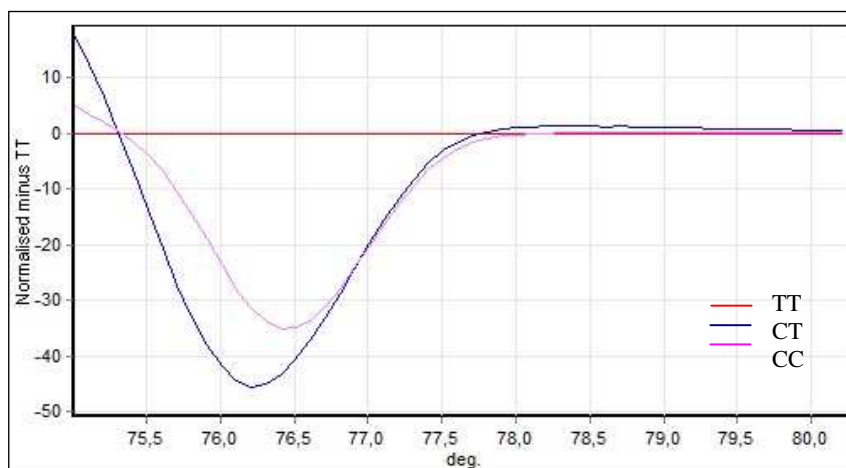


**Obrázok 20: Schématické znázornenie normalizovanej HRM krivky.**

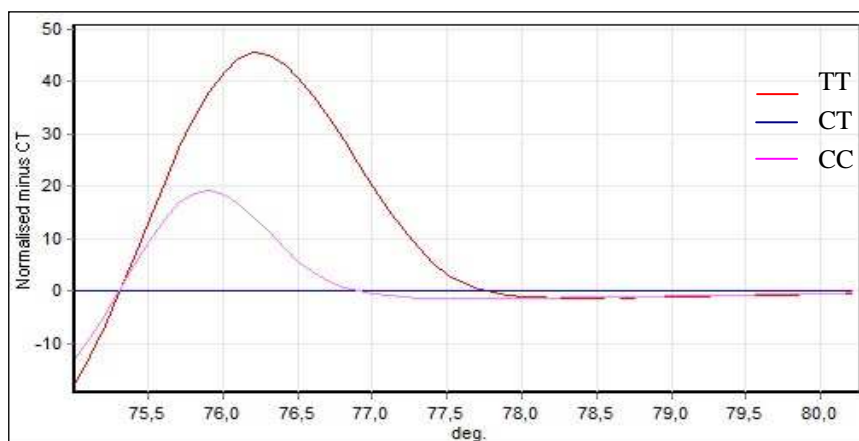


**Obrázok 21: Reprezentatívne výsledky HRM analýzy MSTN génu**

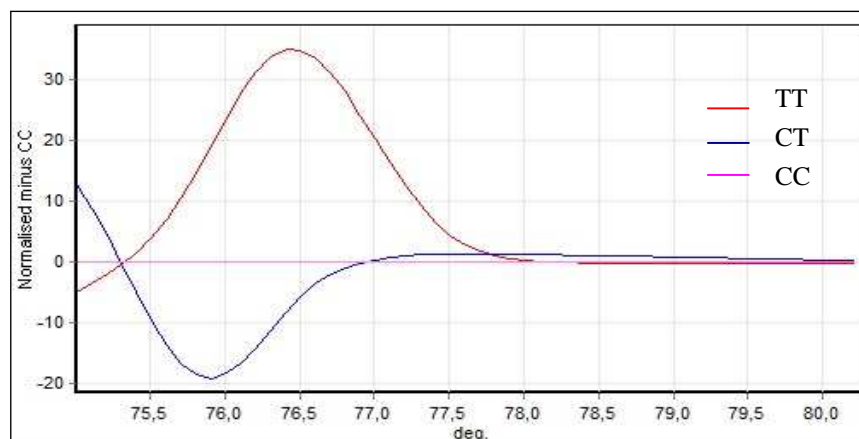
Diferenciačné grafy, zobrazené na obrázkoch 22 – 24, porovnávajú fluorescenciu jednotlivých vzoriek, pričom jedna vzorka je vždy zobrazená s nulovou fluorescenciou vzhľadom na ostatné vzorky.



**Obrázok 22: Diferenciačný graf porovnávajúci v rovine usporiadaný genotyp CC s ostatnými genotypmi**

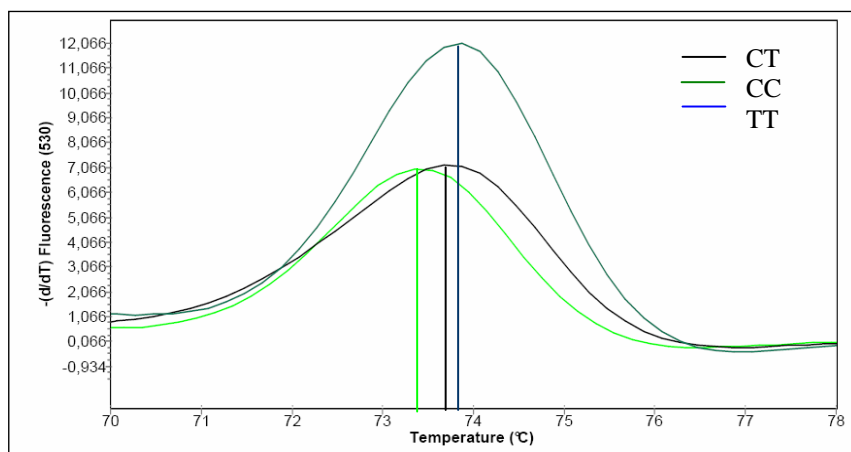


**Obrázok 23: Diferenciačný graf porovnávajúci v rovine usporiadaný genotyp CT s ostatnými genotypmi**



**Obrázok 24: Diferenciačný graf porovnávajúci v rovine usporiadaný genotyp CC s ostatnými genotypmi**

Stanovenie všetkých troch genotypov vzoriek touto metódou nebolo úspešné, nakoľko HRM software bol schopný identifikovať len vzorky s genotypom TT, vzorky s genotypom CC a CT od seba vo väčšine prípadov nebol schopný odlíšiť. Dôvodom boli takmer identické teploty topenia týchto vzoriek, čo sme potvrdili aj melt analýzou na prístroji LightCycler (Roche) (Obrázok 25).



**Obrázok 25: Krivka melt analýzy zobrazujúca minimálne rozdiely v teplote topenia vzoriek s genotypom CC a CT**

Úspešnosť genotypovania vzoriek HRM analýzou bola ovplyvnená aj náhodnými zmenami v sekvencii génu, ktoré sme odhalili v niektorých vzorkách SSCP metódou. Za týchto podmienok nie je zvolená metóda optimálna na určenie genotypov zvierat. Bude potrebné navrhnúť iný pár primerov, ktorý by ohraničil úsek MSTN s dĺžkou približne 150bp a nanovo optimalizovať metodiku.

### Matematicko – štatistické vyhodnotenie výsledkov

Po identifikácii genotypov získaných vzoriek, sme vyhodnotili genotypovú štruktúru populácií králikov. Vyhodnocovali sme tri populácie: populáciu zdrobnelých, obrovitých králikov a následne aj brojlerových králikov.

V rámci populácie zdrobnelých králikov s celkovým počtom zvierat 108 sme identifikovali 42 zvierat s genotypom CC, 64 zvierat s genotypom CT a len 2 zvieratá s genotypom TT. Zistili sme prevahu genotypu CT (0,51) nad genotypom CC (0,47) a len nízku frekvenciu genotypu TT (0,11). Z toho vyplýva aj vyššia frekvencia alely C (0,69) nad alelou T (0,31), čo je prehľadne uvedené v tabuľke 16. Rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov sme overili  $\chi^2$  testom, kde výsledná hodnota 15,07 dokazuje štatistickú preukaznosť rozdielu na hladine významnosti 0,01. To potvrdzuje, že populácia nebola v genetickej rovnováhe.

**Tabuľka 16: Genotypová štruktúra populácie zdrobnelých plemien králikov podľa génu MSTN**

Lokus	Genotyp	Počet genotypov	Alely	Frekvencia alel	s	$\chi^2$
MSTN	CC	42	C	0,69	±0,01	15,07+++
	CT	64				
	TT	2	T	0,31		
	Σ	108				

\*P < 0,05

-P > 0,05

Aj z rozdielu hodnôt očakávanej (0,4314) a pozorovanej heterozygótnosti (0,6274) vyplýva, že sledovaná populácia králikov nebola v rovnováhe. Túto nerovnováhu je možné vysvetliť rozdielnou frekvenciou alel, aj ich nerovnovážnou distribúciou, pričom vznikali najmä heterozygótné jedince. Hodnota polymorfného informačného obsahu lokusu (PIC) nedosahuje hraničnú hodnotu 0,5. V dôsledku rozdielu vo frekvencii výskytu alel bola zaznamenaná nižšia hodnota úrovne polymorfности lokusu (1,76) (Tabuľka 17).

**Tabuľka 17: Efektívnosť pôsobenia alel lokusu MSTN v populácii zdrobnelých králikov**

Lokus	He	Ho	Ca	EA	PIC
MSTN	0,43	0,63	0,57	1,76	0,37

Pozn.: Počet alel v lokuse = 2

V prípade populácie obrovitých králikov s celkovým počtom zvierat 120 sme identifikovali 20 zvierat s genotypom CC, 94 zvierat s genotypom CT a 6 zvierat s genotypom TT. Z toho vyplýva prevaha frekvencie genotypu CT (0,78) nad

genotypom CC (0,17) a nad genotypom TT (0,05). Z toho ďalej vyplýva prevaha frekvencie alely C (0,56) nad alelou T (0,44). Rozdiel medzi očakávaným a pozorovaným počtom genotypov bol testovaný  $\chi^2$  testom a z výsledku vyplýva (41,52), že medzi testovanými skupinami je štatisticky významný rozdiel na hladine významnosti 0,01 (Tabuľka 18), a teda sledovaná populácia tiež nebola v genetickej rovnováhe.

**Tabuľka 18: Genotypová štruktúra populácie obrovitých plemien králikov podľa MSTN génu**

Lokus	Genotyp	Počet genotypov	Alely	Frekvencia alel	s	$\chi^2$
MSTN	CC	20	C	0,56	$\pm 0,59$	41,52+++
	CT	94				
	TT	6	T	0,44		
	$\Sigma$	120				

\*P < 0,05

-P > 0,05

Rozdiel hodnôt očakávanej (0,4932) a pozorovanej heterozygótnosti (0,7833) taktiež dokazuje, že sledovaná populácia králikov nebola v rovnováhe. Rovnako ako v prípade populácie zdobnelých králikov bol tento stav očakávaný, keďže sa jednalo o selektovanú populáciu. Hodnota polymorfného informačného obsahu lokusu (PIC) nedosahuje hraničnú hodnotu 0,5. Z hodnôt frekvencie alel vyplýva úroveň polymorfности lokusu, ktorá dosahovala hodnotu 1,97. Na základe hodnôt PIC a EA môžeme skonštatovať, že genetická diverzita lokusu MSTN nie je znížená (Tabuľka 19).



**Tabuľka 19: Efektívnosť pôsobenia alel lokusu MSTN v populácii obrovitých králikov**

Lokus	He	Ho	Ca	EA	PIC
MSTN	0,49	0,78	0,51	1,97	0,37

Pozn.: Počet alel v lokuse = 2

Keďže rozdiely v štruktúre populácie zdobnelých a obrovitých plemien králikov neboli významné, testovali sme aj populáciu brojlerových králikov. V súbore 127 zvierat sme zaznamenali miernu prevahu genotypu CT (0,46) nad genotypom TT (0,44) a nízku frekvenciu výskytu genotypu CC (0,10). Z uvedených výsledkov vyplýva aj vyššie zastúpenie alely T, ktorá dosiahla frekvenciu 0,67. Odchýlku medzi očakávanými a pozorovanými genotypovými frekvenciami  $\chi^2$  test nepotvrdil a teda sa v hodnotenej skupine realizoval rovnovážny stav. Zhoda experimentálneho a teoreticky očakávaného štiepneho pomeru je na dolnej hranici preukaznosti 5 –10 % (Tabuľka 20).

**Tabuľka 20: Genotypová štruktúra brojlerových králikov podľa génu MSTN**

Lokus	Genotyp	Počet genotypov	Alely	Frekvencia alel	s	$\chi^2$
MSTN	CC	13	C	0,33	0,03	0,13 <sup>-</sup>
	CT	58				
	TT	56	T	0,67		
	$\Sigma$	127				

\*P < 0,05

-P > 0,05

Efektívnosť pôsobenia alel a genetická diverzita génu je uvedená v tabuľke 21. Pozorovaná heterozygótnosť (0,47) bola mierne vyššia ako očakávaná (0,44). Hodnota polymorfného informačného obsahu lokusu (PIC) nedosahuje hraničnú hodnotu 0,5.

V dôsledku rozdielu vo frekvencii výskytu alel bola zaznamenaná nižšia hodnota úrovne polymorfnosti lokusu (1,79). Na základe hodnôt PIC a EA môžeme skonštatovať, že genetická diverzita lokusu MSTN nie je znížená.

**Tabuľka 21: Efektívnosť pôsobenia alel lokusu MSTN v populácii brojlerových králikov**

Lokus	He	Ho	Ca	EA	PIC
MSTN	0,47	0,44	0,5573	1,79	0,34

Pozn.: Počet alel v lokuse = 2

Vzhľadom k tomu, že myostatín je negatívny regulačný faktor zodpovedný za tvorbu svalovej hmoty a pri viacerých biologických druhoch spôsobuje mutácie tohto génu tzv. dvojité osvalenie, analyzovali sme vplyv tranzície C→T na pozícii 34 v intróne myostatínu králika na rast králikov. Pre experiment sme vybrali zvieratá v dobrom zdravotnom stave a v približne rovnakom veku. Samice aj samce sme genotypovali a následne sme krížili samice s genotypom CC so samcami s rovnakým genotypom a samice s genotypom TT so samcami s rovnakým genotypom. Po okotení samíc sme vrhy upravili na 8 mláďat, ktoré sme označili zástrihmi do ušnic a vážili sme ich v týždňových intervaloch. Na konci experimentu sme získali údaje o 40 mláďatách s genotypom CC a 40 mláďatách s genotypom TT. V tabuľke 22 je vyjadrený vzťah genotypu a vplyvu matky x genotypu na živú hmotnosť a priemerné denné prírastky mláďat. Zaznamenali sme štatisticky preukazný vplyv genotypu na hmotnosť vrhu s výnimkou 3. týždňa vo všetkých ostatných týždňoch. Vplyv matky x genotypu bol tiež preukazný, len v 5. týždni boli výsledky na hranici preukaznosti.

**Tabuľka 22: Dvojfaktorová analýza rozptylu hierarchického triedenia živej hmotnosti a priemerného denného prírastku**

<b>Ukazovateľ</b>		Genotyp fG = 1	Matky x genotyp fM:G = 8	Chyba pokusu fe = 79
<b>Hmotnosť</b>	MS	1732,6	721,5	46,9
<b>1.t</b>	F	36,95****	15,39****	
<b>Hmotnosť</b>	MS	4343,9	4280,6	212,3
<b>2.t</b>	F	20,46****	20,16****	
<b>Hmotnosť</b>	MS	765,7	15502,2	614,3
<b>3.t</b>	F	1,25	25,24****	
<b>Hmotnosť</b>	MS	18030,0	6009,9	677,3
<b>4.t</b>	F	26,62****	8,87****	
<b>Hmotnosť</b>	MS	267730,0	7080,0	3501,0
<b>5.t</b>	F	76,46****	2,02	
<b>Hmotnosť</b>	MS	30537,1	16144,5	3599,4
<b>6.t</b>	F	8,48**	4,49****	
<b>ADG</b>	MS	38,3	10,6	2,8
	F	13,46****	3,76****	

V tabuľke 23 a 24 sú uvedené základné štatisticko-variačné ukazovatele, aritmetický priemer, smerodajná odchýlka, stredná chyba priemeru a variačný koeficient pre genotypy CC a TT.

**Tabuľka 23: Živá hmotnosť králikov a priemerná denné prírastky zvierat s genotypom CC (g)**

<b>N = 40</b>	$\bar{x}$	s	sx	V%
<b>1.t</b>	73,44	11,70	1,85	15,93
<b>2.t</b>	196,64	31,79	5,03	16,17
<b>3.t</b>	316,40	43,33	6,85	13,69
<b>4.t</b>	424,93	35,43	5,60	8,34
<b>5.t</b>	561,40	69,83	11,04	12,44
<b>6.t</b>	954,50	60,50	9,57	6,34
<b>ADG</b>	25,17	1,67	0,26	6,63

**Tabuľka 24: Živá hmotnosť králikov a priemerné denné prírastky zvierat s genotypom TT (g).**

<b>N = 40</b>	$\bar{x}$	s	sx	V%
<b>1.t</b>	64,13	9,76	1,54	15,22
<b>2.t</b>	181,90	15,76	2,49	8,67
<b>3.t</b>	310,21	49,04	7,75	15,81
<b>4.t</b>	454,95	34,54	5,46	7,59
<b>5.t</b>	677,10	53,49	8,46	7,90
<b>6.t</b>	993,58	78,18	12,36	7,87
<b>ADG</b>	26,56	2,12	0,33	7,97

Na základe aritmetických priemerov a priemernej živej hmotnosti sme vypočítali preukaznosť rozdielov medzi genotypmi. Ako vidno v tabuľke 25, v prvých dvoch týždňoch boli rozdiely v hmotnosti mláďat v prospech genotypu CC. V treťom týždni bol zaznamenaný rozdiel v hmotnosti zvierat, ale nebol štatisticky preukazný a od štvrtého týždňa boli rozdiely v hmotnosti zvierat v prospech mutovaného genotypu TT.

**Tabuľka 25: Preukaznosť rozdielov aritmetických priemerov živej hmotnosti a ADG sledovaných genotypov**

Ukazovateľ	Genotyp CC	Genotyp TT	Rozdiel
1.t	73,44	64,13	9,308*
2.t	196,64	181,90	14,74*
3.t	316,40	310,21	6,19
4.t	424,93	454,95	30,02*
5.t	561,40	677,10	115,70*
6.t	954,50	993,58	39,07*
ADG	25,17	26,56	1,383*

Myostatín je dobre preskúmaným génom pri mnohých biologických druhoch a je potvrdeným kandidátskym génom pre mäsovú úžitkovosť zvierat. Kambadur et al. (1997) sledovali polymorfizmus MSTN génu pri dvojito osvalenom hovädzom dobytku plemien Belgický bielo-modrý a Piedmontský. Sekvenačnou analýzou odhalili mutácie pri oboch dvojito osvalených plemenách. Pri belgickom bielo-modrom identifikovali 11 bp deléciu a pri plemene Piedmontese tranzíciu G→C, ktoré sa nenašli pri normálnych zvieratách. Ďalšími mutáciami zodpovednými za dvojité osvalenie sú 419 (del7 – ins10), 610 (C→T), 676 (G→T), 821 (del11), 874 (G→T) a 938 (G→A), ktoré potvrdili viacerí autori vo svojich prácach (Grobet et al., 1998, McPherron a Lee et al., 1997, Shibata et al. 2003, Grisolia et al., 2009).

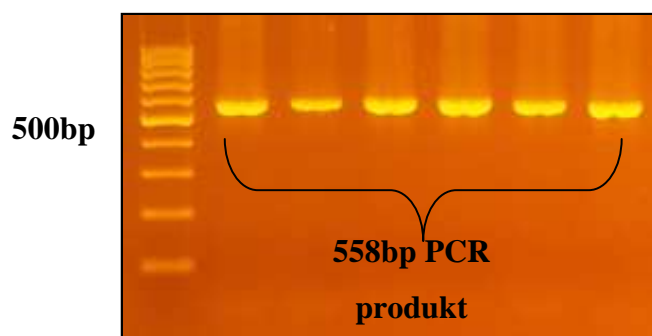
Marcq et al. (1998) študovali polymorfizmus kódujúcich oblastí myostatínu oviec, ale nenašli žiadne zmeny. Yang et al. (2008) sa zamerali na štúdium nekódujúcich oblastí MSTN génu oviec a odhalili 4 SNP v 5'-UTR a 3'-UTR, tiež objavili niekoľko nových SNP v intrónoch génu ale asociačné štúdie neuskutočnili. Hickford et al. (2009) identifikovali 5 variant MSTN génu oviec a previedli aj asociačné štúdie, ktoré potvrdili vplyv alely A aj alely B MSTN génu na mäsovú úžitkovosť zvierat.

Štúdiom králičieho MSTN génu sa zaoberal doteraz len Fontanesi et al. (2008), ktorí sekvenovali MSTN gén a objavil na 34. pozícii 2. intrónu jednonukleotidový polymorfizmus (C→T). Na základe výskumov myostatínu na iných druhoch predpokladali, že by táto mutácia mohla ovplyvňovať produkciu králičieho mäsa.

Uskutočnili experimenty so zdrobnelými a obrovitými plemenami králikov, ktoré genotypovali a zistili, že frekvencia alely C = 0,51 a alely T = 0,49. Koeficient heterozygotnosti v populácii 90 králikov bol 0,50 a PIC dosahoval hodnotu 0,37. Frekvencia alely C zdrobnelých králikov bola 0,83 a pri obrovitých plemenách len 0,56. My sme pozorovali frekvenciu alely C v populácii 108 zdrobnelých plemien 0,69 a frekvenciu alely C pri obrovitých plemenách s celkovým počtom sledovaných zvierat 120 bola 0,55. Pri brojlerových králikoch bola frekvencia alely C len 0,33, to znamená, že alela T bola v prevahe (0,67). Zároveň sme uskutočnili asociačné štúdie zamerané na intenzitu rastu mláďat králikov a z výsledkov štatistického vyhodnotenia vyplýva, že zvieratá s genotypom TT mali preukazne vyššie hmotnosti a rýchlejší rast oproti zvieratám s genotypom CC. Vzhľadom na to, že pri králikoch zatiaľ neboli uskutočnené asociačné štúdie, nemáme naše výsledky s čím porovnávať.

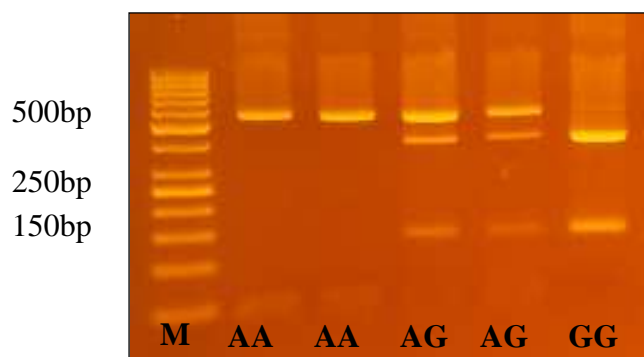
### 4.3 Analýza PGR génu

Pre štúdium polymorfizmu PGR génu sme zvolili PCR-RFLP metódu a HRM analýzu. Pri optimalizácii PCR reakcie sme vychádzali z práce Peiro et al. (2008), použili sme nimi navrhnuté primery, aj počiatočný teplotný a časový profil, ktorý sme následne optimalizovali na naše podmienky. V porovnaní s prácou Peiró et al. (2008) sme skrátili počiatočnú denaturáciu z 10 minút na 3 minúty, v 35. cykloch sa striedali nasledovné kroky: denaturácia pri 95°C po dobu 30 sekúnd, teplota annealingu bola znížená zo 66°C na 62°C po dobu 60 sekúnd, polymerizácia pri 72°C po dobu 90 sekúnd a koncová elongácia 72°C po dobu 15 minút. PCR prebiehala v prístroji C1000 ThermalCycler (Biorad), v celkovom objeme 25µl. Presné zloženie reakčnej zmesi je uvedené v kapitole „Materiál a metodika“. V porovnaní s prácou Peiró et al. (2008) sme znížili koncentráciu primerov na 2,5 pmolov, čím sme eliminovali tvorbu primerových dimérov (Obrázok 26).

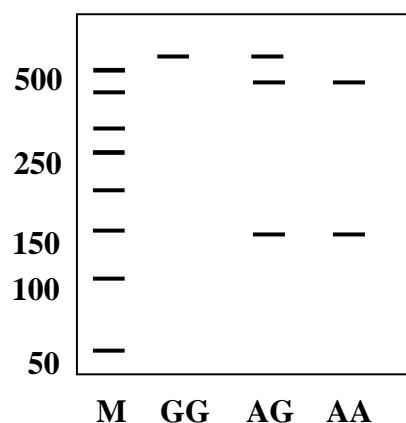


**Obrázok 26: Reprezentatívne výsledky PCR analýzy PGR génu**

Po PCR analýze sme získaný PCR produkt štiepili 5U špecifického enzýmu Eco31I. V analyzovanej populácii zvierat sme identifikovali všetky tri genotypy: AA, AG aj GG. V prípade genotypu GG vznikli po štiepení dva fragmenty s dĺžkou 416 bp a 142 bp, pri genotype AG sme detegovali tri fragmenty s veľkosťou 558 bp, 416 bp a 142 bp a posledný z pozorovaných genotypov, AA, nebol štiepený enzýmom, preto vznikol len jeden fragment s dĺžkou 588 bp (Obrázok 27, 28).

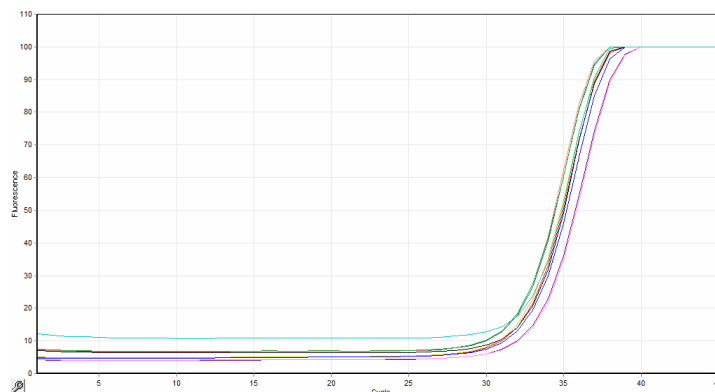


**Obrázok 27: Reprezentatívne výsledky restričnej analýzy PGR génu**



**Obrázok 28: Schéma štiepenia PGR génu – M (50 bp marker),  
GG, AG, AA – detegované genotypy**

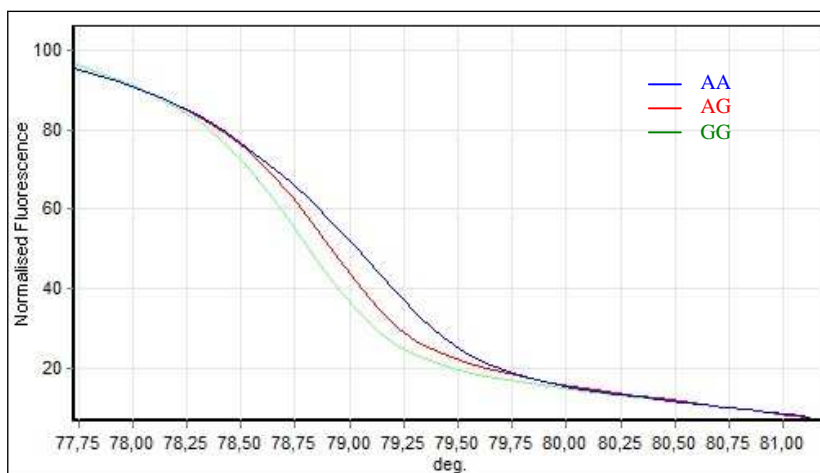
Ďalšou metódou, ktorou sme študovali polymorfizmus PGR génu bola HRM analýza. Prebiehala v prístroji Corbet RotorGene. V rámci optimalizácie sme použili koncentračný gradient DNA (250, 200, 100, 50 a 30 ng.μl<sup>-1</sup>) a primerov (15, 10, 5 a 2,5 pmol na vzorku) a upravili sme teplotný a časový profil v porovnaní s bežnou PCR reakciou. Optimálne výsledky sme dosiahli pri použití 50 ng DNA, 2,5 pmolov primerov a nasledovnom teplotnom a časovom režime: 95°C po dobu 3 minút, v 40 cykloch sa striedali teploty 95°C po dobu 15 sekúnd, 62°C po dobu 10 sekúnd a 72°C po dobu 10 sekúnd. Na obrázku 29 je znázornená amplifikácia PCR produktu analyzovaných vzoriek. Jednotlivé krivky zobrazujú nárast fluorescence počas amplifikácie vzoriek. Rovnomerný nárast všetkých vzoriek od 30. cyklu amplifikácie vypovedá o vhodnosti zvoleného teplotného a časového profilu preamplifikácie.



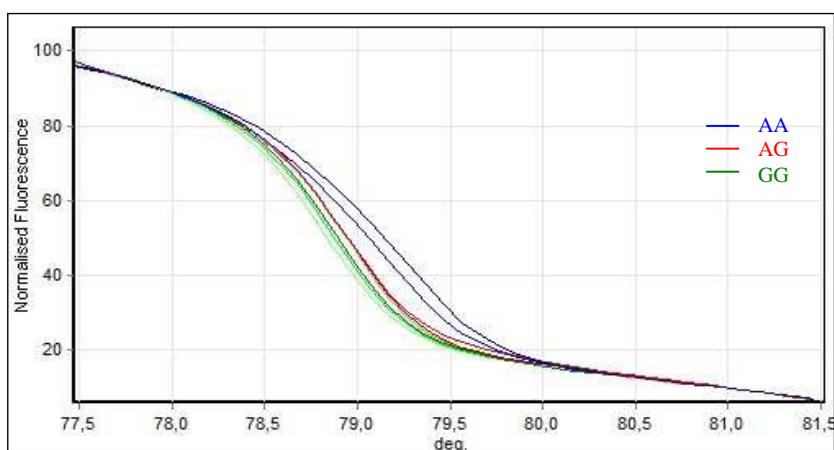
**Obrázok 29: Nárast fluorescence vzoriek počas amplifikácie**



Následne prebehla HRM analýza v rozmedzí teplôt 75 – 90°C. Na základe pozorovanej krivky sme toto rozmedzie neskôr upravili na 75 – 85°C, s meraním fluorescence po 0,1°C, 2 sekundy. Na obrázku 30 je zobrazená normalizovaná HRM krivka troch vzoriek v rozličným genotypom, na osi x je zobrazený nárast teploty pri HRM analýze, os Y zobrazuje pozorovanú fluorescenciu. Obrázok 31 zobrazuje HRM analýzu náhodných vzoriek. Normalizačné regióny pre výpočet normalizačnej krivky boli nasledovné: normalizačný región 1: 77,73 – 78,43 °C a normalizačný región 2: 80,55 – 81,25 °C.

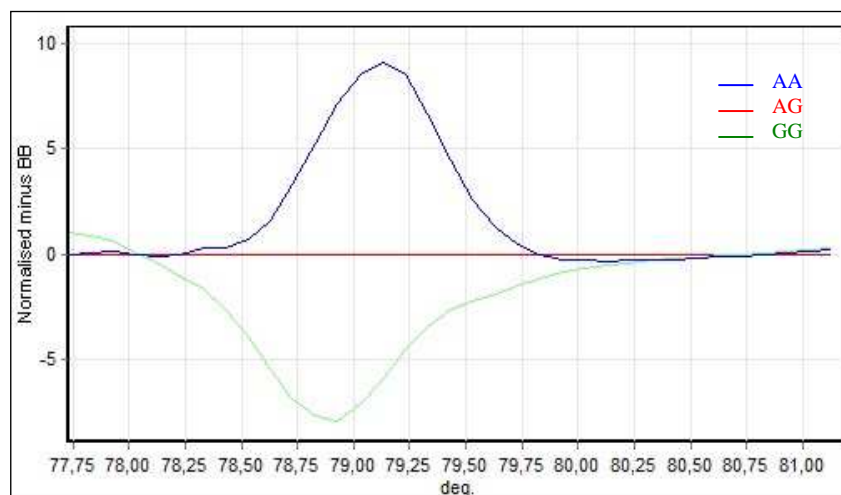


**Obrázok 30: Graf znázorňujúci HRM analýzu troch vzoriek s rôznymi genotypmi**

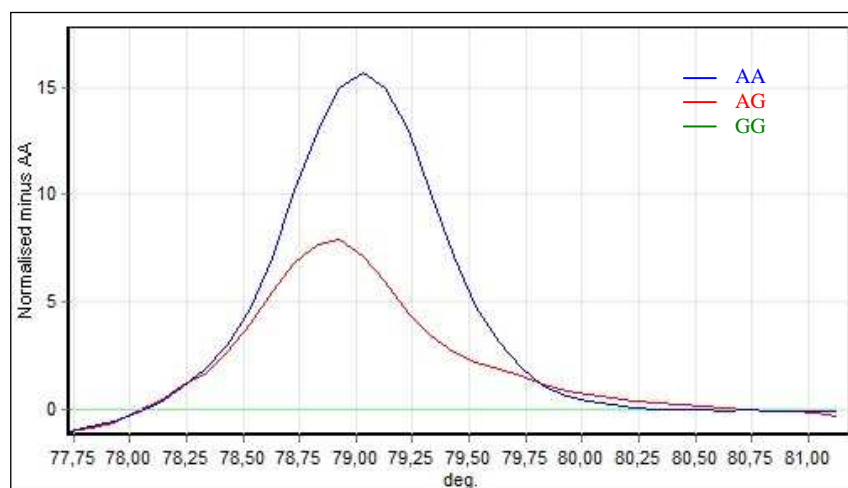


**Obrázok 31: Graf znázorňujúci priebeh HRM analýzy pri viacerých vzorkách s rôznymi genotypmi.**

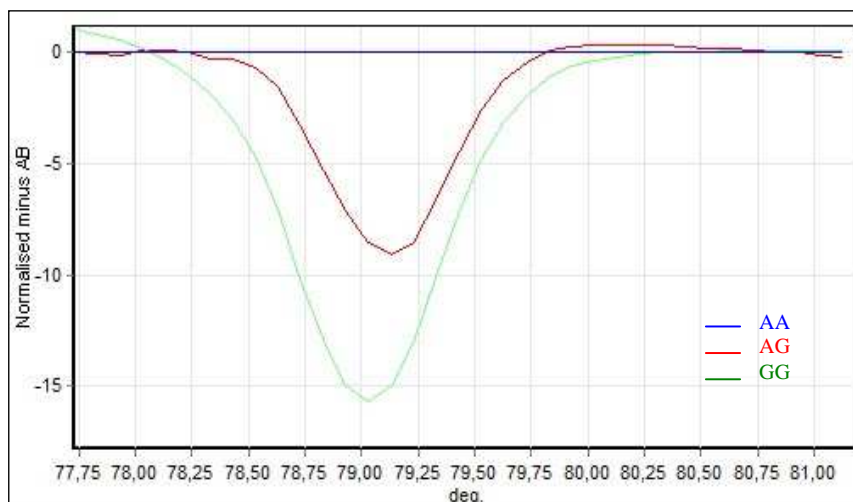
Na diferenciačných grafoch (Obrázok 32 – 34) sú porovnané rozdiely vo fluorescencii pri jednotlivých genotypoch, kde v rovine je vždy jeden z vybraných genotypov a k nemu sú porovnané ostatné dva genotypy. Získané výsledky poukazujú na to, že HRM analýza je vhodná na určenie prítomnosti SNP v PGR géne a je vhodné ju používať na genotypovanie zvierat.



**Obrázok 32: Diferenciačný graf pre genotyp GG**



**Obrázok 33: Diferenciačný graf pre genotyp AG**



**Obrázok 34: Diferenciačný graf pre genotyp AA**

V tabuľke 26 sú uvedené reprezentatívne výsledky genotypovania ôsmich vzoriek DNA kráľika pomocou HRM analýzy. Vzorky 1, 4 a 10 boli referenčnými vzorkami, na základe ktorých, boli určené genotypy ostatných zvierat.

**Tabuľka 26: Reprezentatívne výsledky genotypovania zvierat**

Č.	Farba	Názov	Genotyp	Spoľahlivosť %
1	■	mutácia	AA	100,00
2	■	F45	AA	96,91
3	■	J10	AA	98,23
4	■	divý typ	GG	100,00
5	■	G9	GG	95,20
6	■	F14	GG	89,74
10	■	heterozygót	AG	100,00
11	■	F23	AG	83,19

Výsledky analýzy zodpovedajú použitým optimalizačným krokom. Pre zlepšenie reprodukovateľnosti analýzy je potrebné získať nové vzorky DNA s rovnakou čistotou a koncentráciou, navrhnúť primery, ktoré budú vymezovať kratší úsek DNA (do 200 bp).

### Matematicko – štatistické vyhodnotenie výsledkov analýzy PGR génu

Na základe molekulárno-genetických analýz sme v sledovanej skupine zvierat detegovali všetky tri genotypy: AA, AG aj GG. Najvyššiu frekvenciu dosiahol genotyp AG (0,44), potom genotyp GG (0,33) a najnižšiu frekvenciu dosiahol genotyp AA (0,24). Z toho vyplývajú aj frekvencie alel, medzi ktorými neboli veľké rozdiely. Frekvencia alely G bola 0,54 a frekvencia alely A dosahovala hodnotu 0,46. Pri porovnaní pozorovaných a očakávaných frekvencií genotypov  $\chi^2$  testom boli výsledky štatisticky nepreukazné, to znamená, že testovaná populácia králikov bola v rovnováhe (Tabuľka 27).

**Tabuľka 27: Genetická štruktúra sledovanej populácie**

Lokus	Genotyp	Počet genotypov	Alely	Frekvencia alel	s	$\chi^2$
ASIP	GG	55	G	0,54	±0,01	2,33 <sup>-</sup>
	AG	74				
	AA	50	A	0,46		
	$\Sigma$	179				

\*P < 0,05

-P > 0,05

Pozorovaná heterozygótnosť populácie (0,44) nedosahovala hodnotu očakávanej heterozygótnosti. Koeficient homozygótnosti dosiahol priemernú hodnotu (0,50). Polymorfny informačný obsah bol 0,37, čo znamená, že nedosahoval hraničnú hodnotu 0,5. Efektívny počet alel nadobudol takmer hraničnú hodnotu 2, ktorá je typická pre

dvojalelové systémy, v ktorých sa obidve alely efektívne podieľajú na tvorbe genotypov (Tabuľka 28).

**Tabuľka 28: Efektívnosť pôsobenia alel lokusu v populácii králikov**

Lokus	He	Ho	Ca	EA	PIC
ASIP	0,49	0,44	0,50	1,98	0,37

Pozn.: Počet alel v lokuse = 2

V populácii králikov sme tiež sledovali vplyv genotypu na početnosť vrhov a zistili sme, že jedince s genotypom AG majú štatisticky preukazne vyššiu početnosť vrhu v porovnaní s genotypmi AA a GG (Tabuľka 29). Rovnako preukazne vyšší počet živonarodených zvierat vo vrhu sme zistili pri genotype AG (Tabuľka 30). Pri hodnotení mŕtvonarodených mláďat sme nezistili štatisticky preukazné rozdiely medzi genotypmi (Tabuľka 31).

V danom súbore sme zistili vysoko štatisticky preukazné korelácie ( $P < 0,0001$ ) medzi priemernou početnosťou vrhu a priemerným počtom živonarodených králikov (Tabuľka 32).

**Tabuľka 29: Štatistické vyhodnotenie početnosti vrhov na základe genotypov**

Faktor	DF	Typ I SS	MS	F	Pr > F
SKUPINA	2	18,45	9,22	0,48	0,62
GENOTYP	2	124,57	62,28	3,21	0,04*

Parameter	Odhad		Štandardná chyba	t hodnota	Pr >  t
Intercept	5,93	B	0,65	9,07	<,0001
SKUPINA 1	0,17	B	0,74	0,24	0,81
SKUPINA 2	-0,03	B	0,62	-0,04	0,97
SKUPINA 3	0,00	B	-	-	-
GENOTYP GG	0,38	B	0,82	0,47	0,64
GENOTYP AG	1,62	B	0,73	2,21	0,03*
GENOTYP AA	0,00	B	-	-	-

**Tabuľka 30: Štatistické vyhodnotenie počtu mŕtvonarodených mláďat podľa genotypu.**

Faktor	DF	Typ I SS	MS	F	Pr > F
SKUPINA	2	3,09	1,55	3,02	0,05
GENOTYP	2	0,56	0,28	0,55	0,58

Parameter	Odhad		Štandardná chyba	t hodnota	Pr >  t
Intercept	0,13	B	0,11	1,21	0,23
SKUPINA 1	-,057	B	0,12	-0,47	0,64
SKUPINA 2	0,19	B	0,10	1,92	0,06
SKUPINA 3	0,00	B	-	-	-
GENOTYP GG	-,134	B	0,134	-1,00	0,32
GENOTYP AG	-,049	B	0,12	-0,41	0,68

Parameter	Odhad		Štandardná chyba	t hodnota	Pr >  t
GENOTYP AA	0,00	B	-	-	-

**Tabuľka 31: Štatistické vyhodnotenie počtu živonarodených mláďat podľa genotypu.**

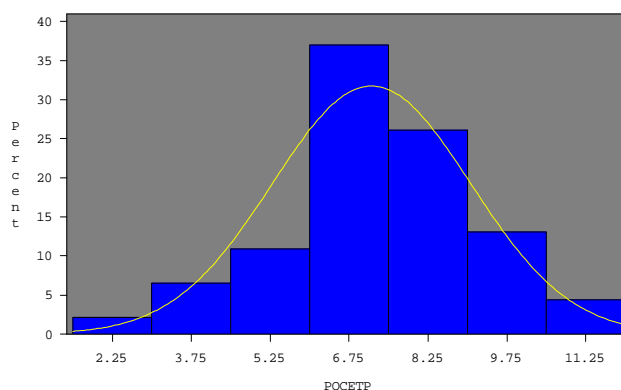
Faktor	DF	Typ I SS	MS	F	Pr > F
SKUPINA	2	21,15	10,58	0,55	0,58
GENOTYP	2	125,18	62,59	3,25	0,04

Parameter	Odhad		Štandardná chyba	t Hodnota	Pr >  t
Intercept	5,79	B	0,65	8,90	<,0001
SKUPINA 1	0,23	B	0,73	0,31	0,76
SKUPINA 2	-0,20	B	0,62	-0,33	0,74
SKUPINA 3	0,00	B	-	-	-
GENOTYP GG	0,52	B	0,82	0,63	0,53
GENOTYP AG	1,68	B	0,73	2,30	0,02
GENOTYP AA	0,00	B	-	-	-

**Tabuľka 32: Korelácie medzi priemerom počtosti vrhu a priemerným počtom živonarodených králikov.**

Pearsonove korelačné koeficienty, N = 46			
Prob >  r  under H0: Rho=0			
	POCETP	ZIVOP	MRTVOP
POČETNOSŤ	1,00	0,99 <,0001	0,24 0,12
ŽIVONARODENÉ	0,99 <,0001	1,00	0,07 0,65
MŔTVONARODENÉ	0,24 0,12	0,07 0,65	1,00

Z grafu 1 vyplýva, že ukazovateľ priemerný počet zvierat vo vrhu má normálne rozdelenie.



**Graf 1: Normalita priemernej počtosti vrhov**

Hoci je známe, že progesterón a progesterónový receptor sú dôležitými faktormi ovplyvňujúcimi reprodukciu zvierat, doteraz neboli uskutočnené asociačné štúdie na iných druhoch hospodárskych zvierat okrem králikov.

Argente et al. (2000) uskutočnili experiment zameraný na selekciu zvierat veľkosť maternice, pričom sledovali veľkosť vrhu zvierat s veľkou a malou kapacitou maternice. Konštatovali, že medzi veľkosťou vrhu a kapacitou maternice je vysoká korelácia.



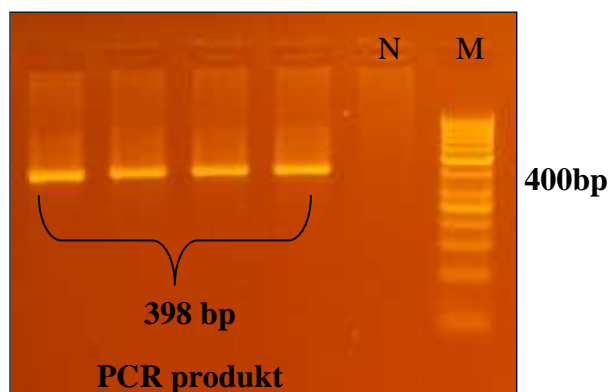
---

Anzaldúa et al. (2007) sledovali hladinu mRNA a progesterónového receptora v maternici a vajcovodoch a zistili, že PGR je exprimovaný v prvých dňoch gestácie, čím ovplyvňuje implantáciu embryí, ich prežívanie a vývin.

Peiró et al. (2008) sledovali 589 samíc selektovaných na veľkosť maternice počas desiatich generácií. Sledovali PGR ako možný kandidátsky gén ovplyvňujúci rozdiely vo veľkosti vrhu a súvisiace faktory (počet a prežívateľnosť embryí, vývojové štádium). Vo svojej práci sa zamerali na analýzu SNP na pozícii 2464 G→A. Alelu G identifikovali pri 75% zvierat s veľkou kapacitou maternice a len pri 25% zvierat s menšou kapacitou maternice. Zvieratá s genotypom GG mali zároveň vo vrhu o 0,5 potomka viac než zvieratá s genotypom AA a také isté výsledky získali pri pozorovaní počtu implantovaných embryí. Zároveň zistili, že v 48 hodine gravidity sú rozdiely v počte a stupni vývinu embryí zanedbateľné, ale v 72. hodine mal genotyp GG prevahu 0,36 embrya nad genotypom AA. Naše výsledky potvrdzujú, že zvieratá s genotypom GG majú lepšie reprodukčné vlastnosti v porovnaní so zvieratami s genotypom AA. Najlepšie výsledky sme zistili pri genotype AG. Zvieratá s týmto genotypom Peiró et al. (2008) nesledovali.

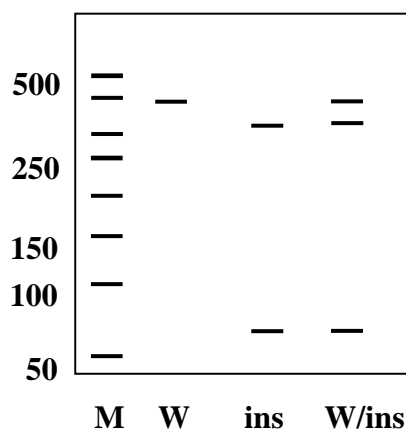
#### 4.4 Analýza ASIP génu

Pri analýze polymorfizmu ASIP génu sme vychádzali z práce Fontanesi et al. (2008). V PCR reakcii boli použité nimi navrhnuté primery, ktoré ohraničujú úsek s dĺžkou 398 bp v exóne 2 a intróne 1 a 2. Teplotný a časový profil bol nasledovný: počiatková denaturácia – 95°C, 3 minúty, denaturácia – 95°C, 30 sekúnd, annealing – 58,5 °C, 30 sekúnd, polymerizácia – 72 °C, 30 sekúnd, elongácia – 72 °C, 10 minút. Reakcia bola optimalizovaná na 30 cyklov. PCR produkt vizualizovaný na 2% agarózovom géli s prídavkom etídiumbromidu je na obrázku 36. Veľkosť produktu bola 393 bp.



**Obrázok 36: Reprezentívne výsledky PCR reakcie ASIP génu: N - negatívna kontrola, M – 50 bp ladder**

Po PCR reakcii sme produkt štiepili enzýmom Eco3I, ktorý navrhli Fontanesi et al. (2008) vo svojej práci na detekciu inzerčnej mutácie. Pri žiadnej z testovaných vzoriek sme mutáciu neidentifikovali. Na obrázku 37 je znázornená schéma štiepenia všetkých troch genotypov.



**Obrázok 37: Schéma štiepenia ASIP génu enzýmom EcoRI: M – 50 bp ladder, W – wild type, ins – genotyp s mutáciou na oboch alelách, W/ins – heterozygótny genotyp**

Vzhľadom k tomu, že naše výsledky sa nezhodujú s výsledkami Fontanesi et al. (2008), ktorí vo svojej práci uvádzajú, že uvedený SNP identifikovali pri všetkých zvieratách s tmavou srstou PCR-RFLP a sekvenačnou metódou, bude správnosť našich výsledkov potrebné overiť SSCP, prípadne HRM analýzou. Zároveň je potrebné rozšíriť súbor zvierat s tmavým sfarbením. Fontanesi et al. (2010) uverejnili zatiaľ ako jediní informácie o králičom ASIP géne. Odhalili viacero mutácií v kódujúcich aj

nekódujúcich oblastiach, ktoré sú zodpovedné za farebný prejav zvierat. Vzťah týchto mutácií k produkčným a reprodukčným vlastnostiam zvierat zatiaľ neštudovali.

## 5 ZÁVER

V súlade so stanovenými cieľmi dizertačnej práce sme optimalizovali PCR-RFLP, PCR-SSCP a HRM metódy a použili sme ich pre analýzu MSTN, PGR a ASIP génov kráľika. Pre štúdium polymorfizmu jednotlivých génov sme použili periférnu krv, tkanivo, chlповé cibulky a stery bukálnej sliznice rôznych plemien králikov. Celkový počet analyzovaných zvierat bol 500ks. Z Centra výskumu živočíšnej výroby v Nitre sme získali vzorky krvi a tkaniva brojlerových králikov, vzorky zdobnelých a obrovitých plemien sme odoberali na 26. Európskej výstave zvierat v Nitre.

Na základe molekulárno-genetických analýz sme vyhodnotili genetickú štruktúru jednotlivých populácií zvierat a v prípade génov MSTN a PGR sme uskutočnili aj asociačné štúdie zamerané na sledovanie vplyvu genotypu na vybrané úžitkové vlastnosti.

Pri MSTN géne sme vyhodnocovali populáciu zdobnelých a obrovitých plemien králikov a brojlerových hybridných líní. Výsledky boli nasledovné:

- V populácii zdobnelých plemien sme zaznamenali prevahu heterozygótného genotypu CT nad ostatnými genotypmi, najnižšie zastúpenie mal genotyp TT. Z toho vyplýva aj prevaha frekvencie alely C nad mutovanou alelou T. Na základe štatisticky preukazných rozdielov medzi teoretickými a pozorovanými počtami genotypov, ktoré sme overili  $\chi^2$  testom sme zistili, že populácia zvierat nebola v genetickej rovnováhe.
- V populácii obrovitých plemien sme tiež zaznamenali prevahu heterozygótnej formy génu nad homozygótnymi a najnižší výskyt genotypu TT. Z toho vyplýva mierna prevaha alely C nad alelou T. Populácia nebola v genetickej rovnováhe, čo sme zistili overením rozdielov medzi teoretickými a pozorovanými počtami genotypov  $\chi^2$  testom. Nerovnováha bola spôsobená nerovnomernou distribúciou alel, ktoré vytvárali predovšetkým heterozygótné genotypy.
- V populácii brojlerových králikov sme na rozdiel od predchádzajúcich populácií detegovali len miernu prevahu genotypu CT nad genotypom TT, najmenšie zastúpenie mal genotyp CC. Frekvencia alely T bola

---

v prevahe nad frekvenciou alely C. Na základe výsledkov  $\chi^2$  testu, ktorým sme overili rozdiely medzi teoretickými a pozorovanými počtami genotypov bola populácia v genetickej rovnováhe.

- Na základe asociačných štúdií, v ktorých sme sledovali vplyv genotypu CC a TT na priemernú živú hmotnosť mláďat a priemerné denné prírastky sme matematicko – štatistickými metódami zistili preukazný rozdiel v hmotnosti a priemerných denných prírastkoch zvierat v prospech genotypu TT. Výsledky poukazujú na to, že MSTN gén je potenciálnym kandidátskym génom pre mäsovú úžitkovosť králikov.

Druhým analyzovaným génom bol PGR, ktorý sme študovali na populácii 150 králikov. Na základe molekulárno-genetických analýz sme stanovili genotypovú štruktúru skupiny zvierat s nasledovnými výsledkami:

- Zistili sme prevahu heterozygótného genotypu AG nad genotypmi AA a GG. Najmenšie zastúpenie mal mutovaný genotyp AA. Z toho vyplývajú frekvencie alel. Alela G je v miernej prevahe nad alelou A. Na základe  $\chi^2$  testu, ktorým sme hodnotili rozdiely medzi teoretickými a pozorovanými počtami genotypov, sme vypočítali, že je populácia v genetickej rovnováhe.
- Asociačnými štúdiami zameranými na vplyv genotypu AA, GG a AG na početnosť vrhov sme matematicko-štatistickými metódami zistili signifikantné rozdiely. Najvyšší počet mláďat vo vrhu dosahovali samice s genotypom AG, hneď za nimi boli samice s genotypom GG a najmenší počet mláďat mali samice s genotypom AA. Rovnaké výsledky sme zistili pri hodnotení živonarodených mláďat. Pri hodnotení počtu mŕtvonarodených zvierat sme nezaznamenali rozdiely medzi genotypmi.

Pre analýzu ASIP génu sme použili PCR-RFLP, ale v populácii králikov, ktoré sme sledovali, sme neidentifikovali cieľovú mutáciu.

Z pohľadu vhodnosti zvolených metód pre analýzu vybraných polymorfizmov konštatujeme:

- PCR-RFLP technika bola najjednoduchšou z optimalizovaných metód a bolo možné ňou jednoznačne identifikovať známe polymorfizmy.

- PCR-SSCP metóda bola náročnejšia na optimalizáciu, ale podobne ako v prípade prvej metódy ňou bolo možné detegovať známe mutácie. Navyše je to vhodná metóda na identifikáciu neznámych mutácií v sledovanej sekvencii.
- HRM analýza bola vhodná na identifikáciu známych aj na objavovanie neznámych mutácií. V porovnaní s predchádzajúcimi metódami bola časovo aj finančne najmenej náročná.

## 6 NÁVRH NA VYUŽITIE VÝSLEDKOV

Výsledky dizertačnej práce poskytujú prvú informáciu o polymorfizme a genetickej štruktúre slovenskej populácie králikov v rámci génov MSTN, PGR a ASIP. V prípade prvých dvoch génov zároveň získané informácie poukazujú na to, že vybrané gény sú potenciálnymi kandidátskymi génmi pre produkčné a reprodukčné vlastnosti králikov. Na základe získaných výsledkov odporúčame pomocou optimalizovaných molekulárno-genetických metód:

1. Zopakovať experimenty na rozšírenej populácii králikov a zamerať sa v práci na štúdium viacerých plemien.
2. Rozšíriť asociačné štúdie MSTN génu a zamerať sa nielen na rýchlosť rastu a priemerné denné prírastky králikov od narodenia po odstav, ale sledovať aj rozdiely v jatočnej výťažnosti zvierat s rôznymi genotypmi. Zároveň navrhujeme porovnať hladinu expície myostatínu s mutáciou a bez nej.
3. Rozšíriť asociačné štúdie PGR génu a okrem početnosti vrhu sa zamerať aj na prežívanie embryí, ich počet a stupeň vývinu v jednotlivých stanovených časových obdobiach.
4. V prípade ASIP génu uskutočniť PCR-SSCP a HRM analýzu, na overenie získaných výsledkov.
5. V prípade všetkých troch analyzovaných génov môžu výsledky slúžiť pre štúdium biodiverzity v populácii králikov.
6. Výsledky použiť pri riešení výskumných projektov podobného charakteru a pri praktickom riešení cvičení v rámci predmetu molekulová genetika a imunogenetika.

---

## 7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. ABDEL-MALEK, Z. – SCOTT, M. C. - SUZUKI, I. - TADA, A. – IM, S. – LAMOREUX, L. – ITO, S. – BARSH, G. –HEARING, V. J. 2000. The Melanocortin-1 Receptor is a Key Regulator of Human Cutaneous Pigmentation. In *Pigment Cell Res.*, roč. 13, 2000, č. 8, s.156-162
2. ALASNIER, C. – GENDEMER, G. 1998. Fatty acid and aldehyde composition of individual phospholipid classes of rabbit skeletal muscles is related to the metabolic type of the fibre. In *Meat Science*. 1998, vol. 48, iss. (3 – 4), pp. 225 – 235. ISSN 0309-1740
3. ANDERSON, E. 2002. Progesterone receptors - animal models and cell signaling in breast cancer: The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. In *Breast Cancer Res.*, roč. 4, 2002, č. 5, s. 197 – 201.
4. ANZALDÚA, S. R. - CAMACHO-ARROYO, I. - REYNA-NEYRA, A. - PÉREZ-MARTÍNEZ, M. - CERBÓN, M. 2007 Regional in expression of progesterone receptor in oviduct and uterus of rabbit during early pregnancy. In *Comp. Biochem. Physiol.*, roč. 147, 2007, č. 3, s. 685–690.
5. ARGENTE, M. J. - SANTACREAU, M. A. - CLIMENT, A. - BLASCO, A. 2008. Effects of intrauterine crowding on available uterine space per fetus in rabbits. In *Liv.Sci.*, roč. 114, 2008, č. 2 – 3, s. 211 – 219.
6. ARGENTE, M. J. – SANTACREU, M. A. – CLIMENT, A. – BLASCO, A. 2006. Influence of uterine available space per fetus on fetal development and prenatal survival in rabbits selected on uterine capacity. In *Liv.Sci.*, roč. 102, 2006, č. 1 – 2, s. 83-91.
7. ARGENTE, M.J. – SANTACREAU, M. A. – CLIMENT, A. – BLASCO, A. 2000. Genetic correlations between litter size and uterine capacity. In *Proc. 7th World Rabbit Congress, 2000 July, Valencia, Spain*, roč. A, 2000, s. 333-338.
8. BELHADY, S. 2004. Characterisation of local rabbit performances in Algeria: Environmental variation of litter size and weights. In *Proceedings of the 8th World Rabbit Congress, Puebla (Mexico), Sept. 2004, WRSA ed.*, s. 218-223.



- 
9. BEŽO, M. – BEŽOVÁ, K. 1998. Genetický slovník. Nitra: SPU, 1998, s. 152. ISBN 80-7137-556-X.
  10. BIELANSKI, P. 2004. Effect of breed and management system on productive traits of broiler rabbits. In *Rocz Nauk Zoot*, roč. 18, s. 1-86.
  11. BOLET, G. – BRUN, J. M. – MONNEROT, M. – ABENI, F. – ARNAL, C. – ARNOLD, J. – BELL, D. – BERGOGLIO, G. – BESENFELDER, U. – BOSZE, S. – BOUCHER, S. – CHANTELOUP, N. – DUCOUROUBLE, M. C. – DURAND-TARDIF, M. – ESTEVES, P. J. – FERRAND, N. – GAUTIER, A. – HAAS, C. – HEWITT, G. – JEHL, N. – JOLY, T. – KOELH, P. F. – LAUBE, T. – LECHEVESTRIER, S. – LOPEZ, M. – MASOERO, G. – MENIGOZ, J. J. – PICINNIN, R. – QUENEY, G. – SALEIL, G. – SURRIDGE, A. – VAN DER LOO, W. – VICENTE, J. S. – VIUDES DE CASTRO, M. P. – VIRAG, G. Y. – ZIMMERMANN, J. M. 2000. Evaluation and conservation of European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) genetic resources. First results and inferences. 7th World Rabbit Conf, Valencia, Spain, July 4–7, s. 281–316.
  12. BOTSTEIN, D. – WHITE, R. L. – SKOLNIK, M. – DAVIS, R. W. 1995. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. In: *Amer. J. Hum. Genet.*, vol. 32, 1980, p. 314-331.
  13. BOURAIMA, H. – HANOUX, V. – MITTRE, H. – FÉRAL, C. – BENHAIM, A. – LEYMARIE, P. 2001. Expression of the rabbit cytochrome P450 aromatase encoding gene uses alternative tissue-specific promoters. In *Eur. J. Biochem*, roč. 268, 2001, č. 16, s. 4506–4512.
  14. BOYER, M. I. – BOWEN, C. V. – DANSKA, J. S. 1995. Restriction fragment length polymorphism analysis of the major histocompatibility complex in New Zealand white rabbits. In *Transplantation*, roč. 59, 1995, č. 7, s. 1043–1046.
  15. BRANCO, M. – MONNEROT, M. – FERRAND, N. – TEMPLETON, A. 2002. Postglacial dispersal of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) on the Iberian Peninsula reconstructed by nested clade and mismatch analyses of mitochondrial DNA genetic variation. In *Evolution*, roč. 56, 2002, č. 4, s. 792–803.
  16. BRISKEN, C. – HEINEMAN, A. – CHAVARRIA, T. – ELENBAAS, B. – TAN, J. – DEY, S. K. – McMAHON, J. A. – McMAHON, A. P. – WEINBERG, R. A. 2000. Essential function of Wnt-4 in mammary gland development
-

- downstream of progesterone signaling. In *Genes Dev*, roč. 14, 2000, č. 6, s. 650–654.
17. BRISKEN, C. – PARK, S. – VASS, T. - LYDON, J. P. - O'MALLEY, B. W. - WEINBERG, R. A. 1998. A paracrine role for the epithelial progesterone receptor in mammary gland development. In *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 1998, č. 9, s. 5076–5081.
  18. BRODY, J. R. - KERN, S. E. 2004. Sodium boric acid: a tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. In *Biotechniques*, roč. 36, 2004, č. 2, s. 214-215.
  19. BUHI, W. C. 2002. Characterization and biological roles of oviduct-specific oestrogen-dependent glycoprotein. In *Reproduction*, roč. 123, 2002, č. 3, s. 355–362.
  20. CAI, Q. Q. – TOUITOI, I. 1993. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. In *Nucl. Acids Res.*, roč. 21, 1993, s. 3909–3910.
  21. COLEMAN, G. – MILLER A. 1942. Electrodialysis of sugar borates. In *Proc. Iowa Acad. Sci.*, roč. 49, 1942, s. 257–261.
  22. CONNEELY, O. M. – KETTELBERG, D. M. – TSAI, M. J. – SCHRADER, W. T. - O'MALLEY, B. W. 1989. The chicken progesterone receptor A and B isoforms are products of an alternate translation initiation event. In *J Biol Chem*, roč. 264, 1989, č. 24, s.14062–14064.
  23. CONNEELY, O. M. – MULAC-JERICEVIC, B. - DEMAYO, F. - LYDON, J. P. – BERT, W. 2002. Reproductive Functions of Progesterone Receptors. In *Recent Progress in Hormone Research*, roč. 57, 2002, s. 339-355.
  24. CROW, J. F. – KIMURA, M. 1970. *An Introduction to Population Genetic Theory*. In New York: Harper and Row, 1970.
  25. CULLEY, G. 1807: *Observations on Livestock*. 4<sup>th</sup> ed., G. WOODFALL, London, U. K. 1807.
  26. ČEPICA, S. 2002. Současná genomika hospodářských zvířat. In: *Sb. XX Genetické dny*, Brno: MZLU, 2002, s.12–18. ISBN 80-7157-607-7.
  27. DALLE ZOTTE, A. 2002. Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. In *Livestock Production Science*, roč. 75, 2002, č. 1, s. 11–32.

- 
28. DAVIS, B. J. – ORNSTIEN, L. 1959. "A new high resolution electrophoresis method.". In Society for the Study of Blood at the New York Academy of Medicine. 1959.
  29. DELARUE, B. – MITTRE, H. – FÉRAL, C. – BENHAIM, A. – LEYMARIE, P. 1996. Rapid sequencing of rabbit aromatase cDNA using RACE PCR. In *C R Acad Sci III*, roč. 319, 1996, č. 8, s. 663-70. Dostupné na:
  30. DENG, X.S. – WAN, J. – CHEN, S. Y. – WANG, Y. - LAI, S. J. – JIANG, M. S. - XU M. 2008. The correlations between polymorphism of growth hormone receptor gene and butcher traits in rabbit. In *Yi Chuan*, roč. 30, 2008, č. 11, s-1427 – 1732.
  31. DRISSING J. – RUDBECK, L. – MARCHER, H. 1996. A five minute procedure for extraction of genome DNA from whole blood, semen and forensic stain for PCR. In: Carracedo A. (ed.): *Advances in Forensic Haemogenetics*. In Springer- Verlag, New York., 1996, s. 269–271.
  32. DRIVER, A. M. - HUANG, W. - GAJIC, S. - MONSON, R. L. - ROSA, G. J. M. – KHATIB, H. 2009. Effects of the progesterone receptor variants on fertility traits in cattle. In *J. Dairy Sci.*, roč. 92, 2009, č. 8, s. 4082-4085.
  33. DVOŘÁK, J. – VRTKOVÁ, I. 2001. *Malá genetika prasat*. Brno: MZLU, 2001, s. 91. ISBN 80-7157-521-6.
  34. ECHARD, G. 1973. Bandes chromosomiques de type G chez le lapin domestique (*Oryctolagus cuniculus*). In *Ann Genet*, roč. 5, 1973, č. 4, s. 425–434.
  35. ESTELLÉ, J. – SASTRE, Y. – MERCHÁN, M. – PEIRÓ, R. – SANTACREU, M. A. – FOLCH, J. M. 2006. TIMP-1 as candidate gene for embryo survival in two divergent lines selected for uterine capacity in rabbits. In *Mol Reprod Dev.*, roč. 73, 2006, č. 6, s. 678 - 684.
  36. ETHERTON, T. D. 2009. Animal growth and development research: Historical perspectives. In *J. Anim Sci*, roč. 87, 2009, s. 3060-3064.
  37. FONTANESI, L. – FORESTIER, L. – ALLAIN, D. – SCOTTI, E. – BERETTI, F. – DERETZ – PICOULET, S. – PECCHIOLI, E. – VERNESI, C. – ROBINSON, T.J. – MALANEY, J. L. – RUSSO, V. – OULMOUDEN, A. 2010. Characterization of the rabbit agouti signaling protein (ASIP) gene:
-

- transcripts and phylogenetic analyses and identification of the causativemutation of the nonagouti black coat colour. In *Genomics*, roč. 95, 2010, č.3, s. 166-175.
38. FONTANESI, L. – TAZZOLI, M. – BERETTI, F. – RUSSO, V. 2006. Mutations in the melanocortin 1 receptor (MC1R) gene are associate with coat colours in the domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). In *Anim Genet*, roč. 37, 2006, č. 6, s. 489–493.
39. FONTANESI, L. – TAZZOLI, M. – SCOTTI, E. – RUSSO, V. 2008. Analysis of candidate genes for meat production traits in domestic rabbit breeds. 9th World Rabbit congressm, Verona, Italy. 2008
40. FRANCO, M. M. – ANTUNES, R. C. – SILVA, H. D. GOULARD, L. R. 2005. Association of PIT1, GH and GHRH polymorphisms with performance and carcass traits in Landrace pigs. In *J Appl Genet.*, roč. 46, 2005, č.2, s. 195-200.
41. FUJITA, K. – SILVER J. 1994. Single-strand conformational polymorphism. In *Genome Res.*, roč. 4, 1994, s. 137-S140.
42. GÁBOR, M. 2009. Genetické markery kvality mäsa hovädziho dobytka a oviec. Nitra, Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2009. Dizertačná práca, s. 71.
43. GARCIA, M. L. - PEIRO, R. - ARGENTE, M. J. - MERCHAN, M. - FOLCH, J. M. – BLASCO, A. – SANTACREU, M. A. 2010. In *J. Anim Sci.*, roč. 88, 2010, s. 1597-1602.
44. GASSER, R. B. - HU, M. - CHILTON, N. B. - CAMPBELL, B. E. - JEX, A. J. - OTRANTO, D. - CAFARCHIA, C. - BEVERIDGE, I. - ZHU, X.. 2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. In *Nature Protocol 1*, 2007, s. 3121 – 3128.
45. GIANOLA, L.C. - TYLER, W. J. 1974. Effect of some genetic and maternal environmental variations on birth weight and gestation length in Holstein. In *Journal of Dairy Science*, roč. 42, 1974, s. 305.
46. GISSI, C. – GULLBERG, A. – ARNASON, U. 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. In *Genomics*, roč. 50, 1998, s. 161–169.
47. GONGRET, F. – LARZUL, C. – COMBES, S. – ROCHAMBEAU, H. 2005. Carcass composition, bone mechanical properties, and meat quality traits in relation to growth rate in rabbits, In *J Anim Sci*, roč. 83, 2005, s. 1526-1535.

- 
48. GRISOLIA, A. B. - D'ANGELO, G. T. - PORTO NETO, L. R. - SIQUEIRA, F. - GARCIA, J. F. 2009. Myostatin (GDF8) single nucleotide polymorphisms in Nellore cattle Genet. In Mol. Res. , roč.8, 2009, č.2, č. 822-830.
  49. GROBET, L. - MARTIN, L. J. R. - PONCELET, D. - PIROTTIN, D. – BROUWERS, B. – RIQURT J. 1997. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle. In Nature Genetics, roč.17, 1997, č. 1, s. 71-74.
  50. GROBET, L. – PONCELET, D. – ROYO, L. J. – BROUWERS, B. – PIROTTIN, D. - MICHAUX, C. – MÉNISSIER, F. – ZANOTTI, M. – DUNNER, S. – GEORGES, M. 1998. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. In Mamm Genome, roč. 9, 1998, s. 210-213.
  51. HAEGEMAN, A. – JACOBS, K. – Van ZEVEREN, A. – PEELMAN, L. J. C. 2000 Characterization of the porcine and bovine melanocortin receptor gene family. In: Plant and Animal Genome VIII conference, San Diego, January 9-12, 2000.
  52. HANOUX, V. - BOURAIMA, H. - MITTRE, H. - FÉRAL, C. - BENHAIM, A. 2003. Differential Regulation of Two 3' End Variants of P450 Aromatase Transcripts and of a New Truncated Aromatase Protein in Rabbit Preovulatory Granulosa Cells. In Endocrinology, roč. 144, 2003, č. 11, s. 4790-4798.
  53. HANSET, R. - MICHAUX, C. - DESSY-DOIZE, C. - BURTONBOY, G. 1982. Studies on the 7<sup>th</sup> rib in double muscled and conventional cattle. In: Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, roč. 16, 1982, s. 341-349.
  54. HAYASHI, W. YANDELL. 1993. How sensitive is PCR-SSCP? In Human Mutation, roč. 2, 1993, č. 5, s. 400 – 407.
  55. HERNANDEZ, P. - PLA, M. - OLIVER, M. A. - BLASCO, A. 2000. Relationships between meat quality measurements in rabbits fed with three diets with different fat type and content In Meat Sci., roč. 55, 2000, s. 379-384.
  56. HICKFORD, J. G. H. - FORREST, R. H. - ZHOU, H. - FANG, Q. - HAN, J. – FRAMPTON, C. M. – HORREL, A. L. 2009. Polymorphisms in the ovine myostatin gene (MSTN) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. In Animal Genetics, roč. 41, 2009, č. 1, s. 64 – 72.
-

- 
57. HIGHSMITH, W. E. – NATARAJ, A. J. – JIN, Q. 1999. Use of DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. II: Evaluation of single-strand conformation polymorphism analysis. In *Electrophoresis*, roč. 20, 1999, č. 6, s.1195–1203.
58. HOEKSTRA, H. E. – HIRSCHMANN, R. J. – BUNDEY, R. A. – INSEL, P. A. – CROSSLAND, J. P. 2006. A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. In *Science*, roč. 313,2006, č. 5783, s. 101-104. Dostupné na:  
<http://www.noble.org/MedicagoHandbook/pdf/ComparativeMapping.pdf>
59. CHARLIER, C. - COPPIETERS, W. - FARNIR, F. - GROBET, L. - LEROY, P. L. - MICHAUX, C. - MNI, M. - SCHWERS, A. - VANMANSHOVEN, P. - HANSET, R. - GEORGES, M. 1995. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2.Mamm. In *Genome*, roč. 6, 1995, č. 11, s. 788–792.
60. JAKUBEC, V. 2002. Molekulární genetika ve šlechtění III. – využití markeru ve šlechtění. In: *Náš chov*, roč. 9, 2002, s. 45–46.
61. JIANG, Z. H. – GIBSON, J. P. 1999. Genetic polymorphism in the leptin gene and their association with fatness in four pig breeds. In: *Mammal. Genome*, roč. 10, 1999, č. 2, s. 191–193.
62. KAMBADUR, R. - SHARMA, M. - SMITH, T. P. - BASS, J. J. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian White-Blue and Piedmontese cattle. In *Genome Res.*, roč. 7, 1997, č. 9, s. 910-916.
63. KERNS, J. A. – NEWTON, J. – BERRYERE, T. G. – RUBIN, E. M. – CHENG, J. F. – SCHMUTZ, S. M. – BARSH, G. S. 2004. Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd dogs. In *Mamm. Genome*, roč.15, 2004, č. 10, s.798-808.
64. KIJAS, J. M. H. – WALES, R. – TORNSTEN, A. – CHARDON, P. – MOLLER, M. – ANDERSON, L. 1998. Melanocortin Receptor 1 (MC1R) mutations and coat color in pigs. In *Genetics*, roč.150, 1998,s. 1177-85.
65. KIM, K. S. – LARSEN, N. – ROTHSCCHILD, M. F. 2000a. Rapid communication: linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R). In: *J. Anim. Sci.*, roč. 78, 2000, s. 791-792.
66. KIM, K. S. – LARSEN, N. – SHORT, T. 2000b. A missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness,
-

- 
- growth, and feed intake traits. In: *Mammalian Genome*, roč. 11, 2000, č. 2, s. 131-135.
67. KIRK, S. - OLDHAM, J. - KAMBADUR, R. - SHARMA, M. - DOBBIE, P. - BASS J. 2000. Myostatin regulation during skeletal muscle regeneration. In *J. Cell Physiol.*, roč. 184, 2000, č.3, s. 356-363.
68. KLUNGLAND, H. – ROED, K. H. – NESBO, C. L. – JAKOBSEN, K. S. – VAGE, D. I. 1999. The melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1-R) gene as a tool in evolutionary studies of Artiodactyles. In *Hereditas*, roč. 131, 1999, č. 1, s. 39-46.
69. KLUNGLAND, H. – VAGE, D. I. – GOMEZ – RAYA, L. – ADALSTEINSSON, S. – LIEN, S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone(MSH) receptor in bovine coat color determination. In *Mamm. Genome*, roč. 6, 1995, č. 9, s. 636-639.
70. KOLÁŘOVÁ, S. – NEUBAUEROVÁ, V. – ČÍTEK, J. – ŘEHOUT, V. 2000. In: *Acta fytotechnica et zootechnica*, Nitra: SPU, 2000, s. 25 - 26. ISBN 80-7137-748-1.
71. KORSTANJE, R. – GILLISEN, G. F. – VERSTEEG, S. A. - VAN OOST, B. A. – BOSMA, A. A. – ROGEL – GAILLARD, C. - VAN ZUTPHEN, L. F. - VAN LITH, H. A. 2003. Mapping of rabbit microsatellite markers using chromosomespecific libraries. In *J Hered*, roč. 94, 2003, č. 2, s. 161–169.
72. KORSTANJE, R. - O'BRIEN, P. C. – YANG, F. – RENS, W. – BOSMA, A. A. - VAN LITH, H. A. - VAN ZUTPHEN, L. F. - FERGUSON–SMITH, M. A. 1999. Complete homology maps of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) and human by reciprocal chromosome painting. In *Cytogenet Cell Genet*, roč. 86, 1999, č. 3 – 4, s. 317–322.
73. KRAUS, W. L. - MONTANO, M. M. - KATZENELLEBOGEN, B. S. 1993. Cloning of the rat progesterone receptor gene 5'-region and identification of two functionally distinct promoters. In *Mol Endocrinol* , roč.7, 1993, s. 1603-16.
74. KUHNLEIN, U. – NI, L. – WEIGEND, S. – GAVORA, J. S. – FAIRFULL, W. – ZADWORNÝ, D. 1997. DNA polymorphism in the chicken growth hormone gene: response to selection for disease resistance and association with egg production. In. *Anim.Genet.*, roč. 28, 1997,č. 2, s. 116-123.
-

- 
75. KUKITA, Y. - TAHIRA, T. - S. SOMMER, S. S. - HAYASHI, K. 1997. SSCP analysis of long DNA fragments in low pH gel. In *Human Mutation*, roč. 10, 1997, č. 5, s. 400 – 407.
  76. KURAMOTO, T. – NOMOTO, T. – SUGIMURA, T. – USHIJIMA, T. 2001. Cloning of the rat agouti gene and identification of the rat nonagouti mutation. In *Mamm. Genome*, roč. 12, 2001, č. 6, s. 469-471.
  77. LAIRD, P. W. Simplified Mammalian DNA Isolation Procedure. In *NAR*, roč. 19, 1991, s. 4293.
  78. LI, X. L. – ZHENG, G. R. – ZHOU, R. Y. – LI, L. H. 2007. Evolution and differentiation of MSHR gene in different species. In *J. Hered.*, roč. 98, 2007, č. 2, s.165-168.
  79. LITH, H. A. - VAN ZUTPHEN, L. F. 1996. Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. In *Anim Genet*, roč. 27, 1996, č. 6, s. 387–395.
  80. LOBO, A. M. B. O. - LOBO, R. N. B. – PAIVA, S. R. 2009. Aromatase gene and its effects on growth, reproductive and maternal ability traits in a multibreed sheep population from Brazil *Genetics and Molecular Biology*. In *Genet. Mol. Biol.*, roč.32, 2009, č. 3.
  81. LONG, J. R. – QIU, X. P. – ZENG, F. T. – TANG, L. M. – ZHANG, Y. P. 2003. Origin of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in China: evidence from mitochondrial DNA control region sequence analysis. In *Anim Genet*, roč. 34, 2003, č. 2, s. 82–87.
  82. LUKEFAHR, S. D. - NWOSU, C. V. - RAO, D. R. 1989. Cholesterol Level of Rabbit Meat and Trait Relationships Among Growth, Carcass and Lean Yield Performances. In *J. Anim Sci.*, roč. 67, 1989, s. 2009-2017.
  83. LYDON, J. P. – DeMAYO, F. J. – FUNK, C. R. – MANI, S. K. – HUGHES, A. R. – MONTGOMERY, C. A. Jr – SHYAMALA, G. – CONNEELY, O. M. - O'MALLEY, B. W. 1995. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. In *Genes Dev*, roč. 9, 1995, č. 18, s. 2266–2278.
  84. MACH, K. – MAJZLÍK, I. – DOKOUPILOVÁ, A. – VOSTRÝ, L. 2007. Spotřeba krmiva a jatečná hodnota brojlerových králíků v závislosti na intenzitě
-



- 
- rustu během výkrmu. In *Nové směry v chovu brojlerových králiků – IX celostátní seminář*. Praha, 14. 11. 2007. s. 80 – 84. ISBN 978-80-86454-87-0.
85. MANN, G. E. - FRAY, M. D. - LAMMING, G. E. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-tau production in the cow. In *Vet. J.*, roč. 171, 2006, č. 3, s.500–503.
86. MARCQ, F. - BARKOUKI, S. - ELSSEN, J.M. - GROBET, L. - ROYA, L. - LEROY, P.L. - GEORGES, M. 1998. Investigating the role of myostatin in the determinism of double muscling characterizing Belgian Texel sheep. In *Proceedings of the XXVIth International Conference of Animal Genetics*, roč. 75, 1998.
87. MARKLUND, L. - JOHANSSON MOLLER, M. – HOYHEIM, B. – DAVIES, W. – FREDHOLM, M. – JUNEJA, R. K. – MARIANI, P. – COPPIETERS, W., ELLEGREN, H. – ANDERSSON, L. 1996. A comprehensive linkage map of the pig based on a wild pig – Large White intercross. In *Animal Genetics*, roč. 27, s. 255 - 269.
88. MARKOFF, A. - SAVOV, A. - VLADIMIROV, V. - BOGDANOVA, N. - KREMENSKY, I. – GANEV, V. 1997. Optimization of single-strand conformation polymorphism analysis in the presence of polyethylene glycol. In *Clinical Chemistry*, roč. 43, 1997, č. 1, s. 30-33.
89. MARQUEZ, M. R. – SANTOS, I. C. – CAROLINO, N. – BELO, C. C. – RENAVILLE, R. – CRAVADOR, A. 2006. Effects of genetic polymorphisms at the growth hormone gene on milk yield in Serra da Estrela sheep. In *J. Dairy Res.*, roč.73, 2006, č. 4, s. 394-405.
90. MCPHERRON, A. C. - LAWLER, A. M. - LEE, S. J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- $\beta$  superfamily member. In *Nature*, roč. 387, 1997, č. 6628, s. 83-90.
91. MCPHERRON, A. C. - LEE, S. J. 1996. The transforming growth factor  $\beta$  superfamily in Growth Factors and Cytokines in Health and Disease. In *Growth Factors and Cytokines in Health and Disease*, roč. 1, 1996, č. 2, s. 357-393.
92. MENDLER, L. - ZADOR, E. - VERHEYEN, M. - DUX, L. - WUYTACK, F. 2000. Myostatin levels in regenerating rat muscles and in myogenic cell cultures. In *J. Muscle Res. Cell. Motil.*, roč. 21, 2000, č. 6, s. 551-563.
-

- 
93. MÉNISSIER, F. 1982. Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle. In: *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, roč. 16, s. 387-428.
  94. MERCHÁN M., PEIRÓ R., ARGENTE M.J., SANTACREU M.A., GARCÍA M.L., BLASCO A., FOLCH J.M. 2009. Effects of the rabbit oviductal glycoprotein 1 (OVGP1) gene on components of litter size. *Anim. Genet.* 40: 756 -758.
  95. MERCHÁN, M. - PEIRÓ, R. - SANTACREU, A. M. - FRANCINO, O. - FOLCH M. J. 2007. Rabbit oviductal glycoprotein 1 gene: Genomic Organisation polymorphism analysis and mRNA expression. In *Molecular reproduction and development*, roč. 74, 2007, č. 6, s. 687-693.
  96. MIESFELD, R. – KRYSTAL, M. – ARNHEIM, N. 1981. A member of a new repeated sequence family, which is conserved throughout eucaryotic evolution, is found between the human delta and beta globin genes. In *Nucl Acids Res*, roč. 9, 1981, 4. 22, s. 5931–5947.
  97. MILLER, S. - DYKES, D. – POLESKY, H.. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In *Nucleic Acids Res.*, roč. 16, 1988, s. 1215.
  98. MULAC – JERICEVIC, B. – LYDON, J. P. – DeMAYO, F. J. - CONNEELY M. O. 2003. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesteron receptor B isoform. In *PNAS*, roč. 100, 2003, č. 17, s. 9744 – 9749.
  99. MULAC – JERICEVIC, B. – MULLINAX, R. A. – DeMAYO, F. J. – LYDON, J. P. – CONNEELY, O. M. 2000. Subgroup of reproductive function of progesteron mediated by progesteron receptor-B isoform. In *Science*, roč. 289, 2000, č. 5485, s. 1751-1754.
  100. MULAC-JERICEVIC, B. - CONNEELY M. O. 2004. Reproductive tissue selective action of progesteron receptors. In *Reproduction*, roč. 128, 2004, č. 4, s. 139 – 146.
  101. MULLIS, K. – FALLONA, F. – SCHARF, S. – SAIKI, R. – HORN, G. – ERLICH, H. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.*, roč. 51, 1986, s. 263–273.
  102. MULLIS, K. B. 1990. The unusual origin of the Polymerase Chain Reaction. In *Scientific American*, roč. 262, 1990, č. 4, s. 36-43.
-

- 
103. MUNDY N.I. - Kelly J. 2003. Evolution of a pigmentation gene, the melanocortin-1 receptor, in primates. In *Am. J. Physical Anthropol.*, roč. 121, 2003, č. 1, s. 67-80.
  104. MUNDY N.I. 2005. A window on the genetics of evolution: MC1R and plumage colouration in birds. In *Proc. Biol. Sci.*, roč. 272, 2005, s. 633-1640.
  105. NACHMAN, M. W. – HOEKSTRA, H. E. - D'AGOSTINO, S. L. 2003. The genetic basis of adaptive melanism in pocket mice. In *Proc. Natl. Acad. Sci.*, roč. 100, 2003, č. 9, s. 5268-5273.
  106. NEI, M.: 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. In: *Genetics*, roč. 89, 1978, s. 132.
  107. NICHOLS, W. W. - LEVAN, A. - HANSEN-MELANDER, E. - MELANDER, Y. 1965. The idiogram of the rabbit. In *Hereditas*, roč. 53, 1965, č. 1, s. 63-76.
  108. NIJENHIUS, W. A. J. – WANDERS, N. – KRUIJTZER, J. A. W. – LISKAMP, R. M. – GISPEN, W. H. – ADAN, R. A. H. 2003. Evidence that the enhancing effects of melanocortin ligands on sensory recovery after sciatic nerve crush are not mediated by melanocortin 4 receptor. <http://www.library.uu.nl/digiarchief/dip/diss/2003-0414-153325/c3.pdf>, 2003.
  109. NOTHNICK, W. B. 2001. Reduction in reproductive lifespan of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1)-deficient female mice. In *Reproduction*, roč. 122, 2001, s. 923–927.
  110. ODUOBOTE, I. K. - AKINOKUM, J. O. 1990. Reproduction and body weight performance of the New Zealand white rabbits in the humid tropics of Nigerian. Nigeria. In *J. Animal prod.*, roč. 18, 1990, s. 61-65.
  111. OLIVER, M. A. - GUERRERO, L. - DIAZ, I. - GISPERT, M. - PLA, M. - BLASCO, A. The effect of fat-enriched diets on the perirenal fat quality and sensory characteristics of meat from rabbits. *Meat Sci.* **47** 1–2 (1997), pp. 95–103.
  112. ONDRUŠKA, Ľ. - PARKANYI, V. - RAFAY, J. 2008. Intravaginálna aplikácia superanalógu GnRH v inseminačnej dávke kráľika. XXIV. konferencia Aktuálne smery v chove brojlerových kráľikov. Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Výskumný ústav živočíšnej výroby, OMHZ, Hlohovská 2, 949 92 Nitra, Zborník, CD-ROM, ISBN 978-80-88872-81-8, Nečíslované, p.s. 3.
-

- 
113. ORITA, M. - SUZUKI, Y. - SEKIYA, T. - HAYASHI, K. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphism using the polymerase chain reaction. In *Genomics*, roč. 5, 1989, s. 874-879.
  114. OUHAYOUN, J. - DALLE ZOTTE, A. 1993. Muscular energy metabolism della carcassa e della carne cunicola. 2. Composizione chimica and related traits in rabbit. In *World Rabbit Sci.*, roč. 1, 1993, č. 3, s. 96-107.
  115. OUHAYOUN, J. 1998. Influence of the diet on rabbit meat quality. In: De Blas, C, Wisemann, J. (Eds), *The Nutrition of the Rabbit*. CABI Publishing, Oxon, UK.
  116. OUYED, A. – BRUN, J. M. 2008. Comparison of growth performance and carcass qualities of crossbred rabbits from four sire lines in Quebec. 9th World Rabbit Congress – June 10-13, 2008 – Verona – Italy.
  117. PAINTER, T. S. 1926. Studies in Mammalian Spermatogenesis. VI. The Chromosomes of the Rabbit. In *J Morph. Physio*, roč. 43, 1926, s.1-44.
  118. PASCUAL, M. – PLA, M. 2007. Changes in carcass composition and meat quality when selecting rabbits for growth rate. In *Meat Science*, roč. 77, 2007, č. 4, s. 474 – 481.
  119. PEIRÓ, M. - MERCHAN, M. A. – SANTACREU, M. J. – ARGENTE, M. L. – GARCIA, J. – FOLCH - BLASCO, A. 2008. Identification of Single-Nucleotide Polymorphism in the Progesterone Receptor Gene and Its Association With Reproductive Traits in Rabbits R. In *Genetics*, roč. 180, 2008, s. 1699 – 1705.
  120. PEIRÓ, R. - SANTACREU, M. A. – CLIMENT, A. - BLASCO, A. 2007. Early embryonic survival and embryo development in two divergent lines selected for uterine capacity. In *J. Anim. Sci.*, roč. 85, 2007, č. 7, s. 1634-1639.
  121. PILES, M. - BLASCO, A. - PLA, M. 2000. The effect of selection for growth rate on carcass composition and meat characteristics of rabbits. In *Meat Sci.*, roč. 54, 2000, č. 4, s. 347-355.
  122. PLA, M. - HERNANDEZ, P. - BLASCO, A. 1996. Carcass composition and maturity. In *Meat Sci.*, roč. 44, 1996, č. 1-2, s. 75-83.
  123. QUENEY, G. – FERRAND, N. – WEISS, S. – MOUGEL, F. – MONNEROT, M. 2001. Stationary distributions of microsatellite loci between divergent population groups of the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). In *Mol Biol Evol*, roč. 18, č. 12 s. 2169-2178.
-

- 
124. QUENEY, G. – VACHOT, A. M. – BRUN, J. M. – DENNEBOUY, N. – MULSANT, P. – MONNEROT, M. 2002. Different levels of human intervention in domestic rabbits: effects on genetic diversity. In *J Hered*, roč. 93, 2002, č. 3, s. 205–209.
125. RAFAY, J. – SLAMEČKA, J. - ĽAHUČKÝ, R. – ČERMÁKOVÁ, T. 2005. Efektívnejšie využitie doplnkových primárnych potravinových zdrojov živočíšneho pôvodu. In *Kvalita, bezpečnosť a funkčnosť primárnych potravinových zdrojov*. Piešťany : VÚRV, 2005, s. 55. ISBN 80-88790-41-7
126. RAFAY, J. 1993. Intenzívny chov brojlerových králikov. Povoda: Animapres, 1993, s. 134. ISBN 80-95576 – 01-6.
127. RAFAY, J. 1996. Marketing a ekonomika výroby králičieho mäsa. Výskumná úloha, Nitra, 1996.
128. RAFAY, J. 2002. Chov brojlerových králikov. Levice: ZCHBK, 2002, 52. s
129. RAFAY, J. 2009. Chov králikov. 1. vyd. Lužianky : Centrum výskumu živočíšnej výroby, 2009, 67 s. ISBN 978-80-89418-00-8.
130. RASLER, M. - QUERFURTH, R. - WARNATZ, H. J. - LEHRACH, H. - YASPO, M. L. - KROBITSCH, S. 2006. An efficient and economic enhancer mix for PCR. In *BBRC*, 2006.
131. RICO, C. – RICO, I. – WEBB, N. – SMITH, S. – BELL, D. 1994. Four polymorphic microsatellite loci for the European wild rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. In *Anim Genet*, roč. 25, 1994, č. 5, s. 367.
132. ROBBINS, L.S. – NADEAU, J.H. – JOHNSON, K.R. – KELLY, M.A. – ROSELLI - REHFUSS, L. – BAACK, E. – MOUNTJOY, K.G. – CONE, R.D. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. In *Cell*, roč. 72, 1993, č. 6, s. 827–834.
133. ROBINSON, T. J. 1980. Comparative chromosome studies in the family Leporidae (Lagomorpha, Mammalia). In *Cytogenet Cell Genet*, roč. 28, 1980, č. 1 – 2, s. 64–70.
134. RODGERS, B. D. - WEBER, G. M. - SULLIVAN, C. V. - LEVINE, M. A. 2001. Isolation and Characterization of Myostatin Complementary Deoxyribonucleic Acid Clones from Two Commercially Important Fish: *Oreochromis mossambicus* and *Morone chrysops*. In *Endocrinology*, roč. 142, 2001, č. 4, s. 1412-1418.
-

- 
135. ROGEL – GAILLARD, C. - FERRAND, N. - HAYES, H. 2009. Rabbit. In: Genome Mapping and Genomics in Animals, roč. 3, 2009,
136. ROCHAMBEAU, H. – OUHAYOUN, J. – CAVAILLE, D. – LACOSTE, J. L. – LERICHE, J. L. – PONCEAU, J. – RETAILLEAU, B. 1996. Comparison of the commercial strains of terminal bucks: II carcass traits. In: Proc. 6th World Rabbit Congress, roč. 3, s. 247-250.
137. SAKUMA, K. – WATANABE, K. – SANO, M. – URAMOTO, I. – TOTSUKA, T. 2000. Differential adaptation of growth and differentiation factor 8/myostatin, fibroblast growth factor 6 and leukemia inhibitory factor in overloaded, regenerating and denervated rat muscles. In Biochim. Biophys. Acta, Molecular Cell Research, roč. 1497, 2000, s. 77-88.
138. SALAZAR, L. A. - HIRATA, M. H. - CAVALLI, S. A. - MACHADO, M. O. - HIRATA, D. C. 1998. Optimized Procedure for DNA Isolation from Fresh and Cryopreserved Clotted Human Blood Useful in Clinical Molecular Testing. In Clinical Chemistry, roč. 44, 1998, s. 1748-1750.
139. SAMBROOK, J. – FRITZ, E. F. – MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, USA
140. SAMBROOK, J. - RUSSEL, D. W. 2001. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA, 2001.
141. SEAGROVES, T. N. – LYDON, J. P. - HOVEY, R. C. - VONDERHAAR, B. K.- ROSEN, J. M. (2000). C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein) controls cell fate determination during mammary gland development. In Mol. Endocrinol., roč. 14, 2000, č. 4, s. 359 - 368.
142. SEARLE, A. G. 1968. Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals. In Science, roč. 161, 1968, č. 3842, s. 677 – 678.
143. SEELEY, R. J. – YAGALOFF, K. A. – FISHER, S. L. – BURN, P. – THIELE, T. E. - VAN DIJK, G. – BASKIN, D. G. – SCHWARTS, M. W. 1997. Melanocortin receptors in leptin effects. In Nature, roč. 390, 1997, č. 6658, s. 349.
144. SEREK, A. - DEÁK, G. - TÓTH, G. - AUBERT, G. - BURSTIN, J. - ELLIS, N. KISS, G. B. 2006. Comparative mapping. In Medicago truncatula handbook. 2006. s 2.
145. SHEFFIELD, V. – BECK, J. – KWITEK, A. – SANDSTROM, D. – STONE, E. 1993. The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for
-

- the detection of single base substitutions. In *Genomics*, roč. 16, 1993, č. 2, s. 325-332.
146. SHIBATA, M. – OHSHIMA, K. – KOJIMA, T. – MURAMOTO, T. 2003. Nucleotide sequence of myostatin gene and its developmental expression in skeletal muscles of Japanese Black cattle. In *Anim. Sci. J.*, roč. 74, 2003, s. 383-390.
147. SIMMONS, D. 2008. Genetic inequality: Human genetic engineering. In *Nature Education*, roč. 1, 2008, č. 1.
148. SINGH, U. - UMESH, S. - SHARMA, S. R.- KUMAR, D. - BHATT, R. S. - RISAM, K. S. - DAVENDRA, K. – SAWAL, R. K. - SWAIN, N. 2004. Effect of parity on reproductive performance of German Angora rabbits. In *Indian Journal of Animal Sciences*, roč. 75, 2004, č. 5, s. 547-549.
149. SLOMSKI, R. 2008. In *Analiza DNA teoria I praktyka*. 2008, s. 49-50.
150. SONSTEGARD, T.S. – ROHRER, G.A. – SMITH, T. P. L. 1998. Myostatin maps to porcine chromosome 15 by linkage and physical analyses. In *Anim. Genet.*, roč. 29, 1998, č. 1, s. 19–22.
151. SUPUKA, P. – SUPUKA, M. – ADAMEC, Š. 2009. *Vzorník plemien králikov. Slovenský zväz chovateľov*. 2009.
152. SURRIDGE, A. K. – BELL, D. J. – RICO, C. – HEWITT, G. M. 1997. Polymorphic microsatellite loci in the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) are also amplified in other Lagomorph species. In *Anim Genet*, roč. 28, 1997, č. 4, s. 302–305.
153. TEFAYE, A. - TKÁČIKOVÁ, L. - MIKULA, I. 2005. Factors affecting Morphology of Skeletal Muscles. In *Acta Vet.*, roč. 74, 2005, s. 153-159.
154. THOMAS, M. - LANGLEY, B. - BERRY, B. - SHARMA, M. - KIRK, S. - BASS, J. - KAMBADUR, R. 2000. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. In *The Journal of Biological Chemistry*, roč. 275, 2000, č. 51, s. 40235-40243.
155. TOČKA, I. 1992. *Chov kožušinových zvierat*. Nitra: VŠP, 1992. 120 s. ISBN 80-7137-041-X.
156. TODD, A. - TIBBETS, M. - DEMAYO, F. - RICH, S. - CONNEELY, O. M. - BERT W. 1999. Progesterone Receptors in the Thymus Are Required for Thymic Involution during Pregnancy and for Normal Fertility. In *Proceedings of*

- 
- the National Academy of Sciences of the United States of America, roč. 96, 1999, č. 21, s. 12021-12026.
157. TRAKOVICKÁ A. 2005. Genetické markéry a kvalita produktov špeciálnych odvetví živočíšnej výroby. Nitra: SPU 2005, s. 53-54. ISBN 80-8069-633-0.
158. VAGE, D. I. – KLUNGLAND, H. – LU, D. – CONE, R. D. 1999. Molecular and pharmacological characterization of dominant black coatcolor in sheep. In *Mamm. Genome*, roč. 10, 1999, č. 1, s. 39-43.
159. VAGE, D. I. – LU, D. S. – KLUNGLAND, H. – LIEN, S. – ADALSTEINSSON, S. – CONE, R. D. 1997. A non-epistatic interaction of agouti and extension in the fox, *Vulpes vulpes*. In *Nature Genet.*, roč. 15, 1997, č. 3, s. 311-315.
160. VAISSE, C. – CLEMENT, K. – GUY – GRAND, B. – FROGUEL, P. 1998. A frameshift mutation in human MC4R is associated with a dominant form of obesity. In *Nat Genet.*, roč. 20, 1998, č. 2, s. 113 - 4.
161. VAN HAERINGEN, W. A. - DEN BIEMAN, M. G. – LANKHORST, A. E. - VAN LITH, H. A. - VAN ZUTPHEN, L. F. 2002 Application of AFLP markers for QTL mapping in the rabbit. In *Genome*, roč. 45, 2002, č. 5, s. 914–921.
162. VAN HAERINGEN, W. A. - DEN BIEMAN, M. – GILLISEN, G. F. – LANKHORST, A. E. – KUIPER, M. T. - VAN ZUTPHEN, L. F. – VAN LITH, H. A. 2001. Mapping of a QTL for serum HDL cholesterol in the rabbit using AFLP technology. In *J Hered*, roč. 92, 2001, č. 4, s. 322–326.
163. VAN ZUTPHEN - L. F. - FOX, R. R. 1977. Strain differences in response to dietary cholesterol by JAX rabbits: correlation with esterase patterns. In *Atherosclerosis*, roč. 28, 1977, č. 4, s. 435–446.
164. WALLIS, O. C. – WALLIS, M. 1995. Cloning and characterisation of the rabbit growth hormone-encoding gene. In *Gene*, roč. 163, 1995, č. 2 – 3, s. 253-256.
165. WEBB, J. 2000. New Opportunities for Genetic Change in Pigs. In: *Advances in Pork Production*, roč. 11, 2000, s. 83–95.
166. XIANGHAI, Y. - BROWN, S. B. - NONES, K. - COUTINHO, L. L. - DEKKERS, J. C. M. - LAMONT, S. J. 2007. Associations of myostatin gene polymorphisms with performance and mortality traits in broiler chickens. In *Genet Sel Evol.*, roč. 39, 2007, č. 1, s. 73–89.
-



- 
167. YAMANI, K. A. O. - DAADER A. H. - ASKAR A. A. 1991. Non-genetic factors affecting rabbit production in Egypt. *Options Méditerranéennes – Séries Séminaires*, č.17, 1991, s. 159-172.
168. YAMANOUCHI, K. - SOETA, C. - NAITO, K. - TOJO, H. 2000: Expression of myostatin gene in regenerating skeletal muscle of the rat and its localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Academic Press, roč. 270, 2000, č. 2, s. 510-516.
169. YING, C. - YANG, Y. C. - HONG, W. F. - CHENG, W. T. – HSU, W. L. 2000. Progesterone receptor gene expression in preimplantation pig embryos European In *Journal of Endocrinology*, roč. 143, 2000, č. 5, s. 697-703.
170. ZHANG, X. L. – JIANG, X. - LIU, Y. P. - DU, H. R. - ZHU, Q. 2007. Identification of AvaI Polymorphisms in the Third Intron of GH Gene and Their Associations with Abdominal Fat in Chickens. In *Poult Sci*, roč. 86, 2007, č. 6, s. 1079-1083 .
171. ZIJLSTRA, C. - DE HAAN, N. A. – KORSTANJE, R. – ROGEL – GAILLARD, C. PIUMI, F. - VAN LITH H. A. - VAN ZUTPHEN L. F. M. – BOSMA, A. A. 2002. Fourteen chromosomal localizations and an update of the cytogenetic map of the rabbit. In *Cytogenet Genom Res*, roč. 97, 2002, č. 3-4, s. 191–199.