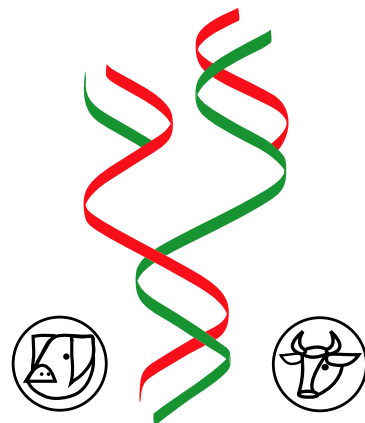


Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně
Mendel University of Agriculture and Forestry Brno

Sborník příspěvků z konference

Proceedings of the International Conference



VII. mezinárodní konferenci doktorandů a pregraduálních studentů
VIIth international Conference of PhD. and MSc. Students

„GENETIKA A ŠLECHTĚNÍ ZVÍŘAT“
„GENETICS AND ANIMAL BREEDING“

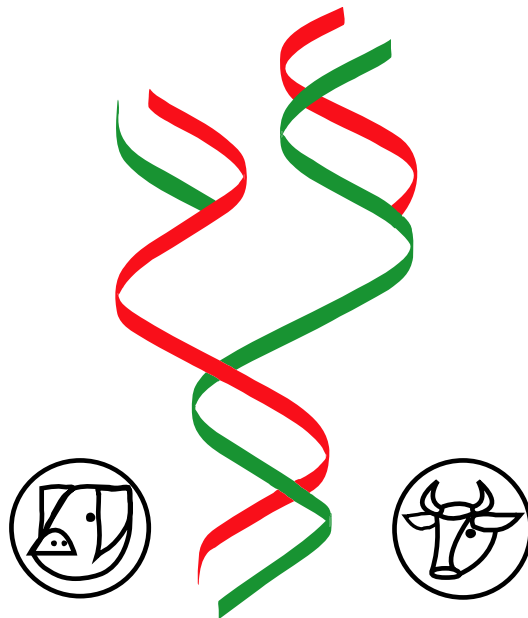
kolektiv autorů
collective of authors

17. - 18. květena 2007, Brno
May, 17th - 18th 2007, Brno

ISBN: 978-80-7375-053-4

Konference je pořádána:

- jako doprovodný odborný program „Mezinárodní výstavy hospodářských zvířat a zemědělské techniky“ v Přerově, 2007



Pořadatele odborného semináře:

Členové doktorského týmu projektu GAČR 523/03/H076,
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat,
Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně

OBSAH / CONTENT

GENETICS AND CATTLE AND PIG BREEDING..... 5

The influence of propylene glycol as a energy supplement in sows diets on piglets rearing results
Boruta O. *, Jasek S. 5

Effect of polymorphism in gene *DGAT1* on veal meat quality
Falta D. *, Chládek G. 6

Assessment of single nucleotid polymorphisms in *TG5*, *DGAT1* and *FABP4* genes for association with meat quality in cattle
Gazdová V., Filkuková J., Děduchová V., Humpolíček P. 11

Relation of porcine myogenin gene PCR/RFLP *MspI* and reproduction traits of the Czech Large White Sows
P. Humpolíček*, Urban T. 15

Study of gene expression during the development of porcine and bovine preimplantation embryos using microarray technique
Kepkova K. ^{1*}, Moravcova T. ¹, Dufort I. ², Kanka J. ¹, Sirard M.A. ² 21

Microsatellite analysis of variability of beef cattle in the Czech Republic
Kundrát R. *, Urban T. 22

Rýchla a efektívna konštrukcia multiplex PCR-RFLP
Manga I*, Dvořák J. 30

Validation of new porcine tetranucleotide microsatellite panel within the interlaboratory DNA comparison test
Putnová L. *, Civiňová K., Dvořák J. 39

Restriction analysis of CD 18 gene
Večerek L., Hosnedlová B., Čítek J. 44

Association between perilipin gene polymorphisms and growth and meat performance in Large White pigs
Vykoukalová Z. 50

Effect of the polymorphism of prolactin receptor gene (*PRLR*), follicle-stimulating hormone beta subunit gene (*FSHB*) and estrogen receptor gene (*ESR*) on litter size in Czech Large White sows
Filkuková J. *, Divácká L., Vrtková I. 54

GENETICS AND OTHER ANIMALS´ BREEDING..... 55

The Genetic Parameters for Reproduction Traits of Chinchilla (*Chinchilla laniger*)
Całka M. *, Gorajewska E., Filistowicz A. 55

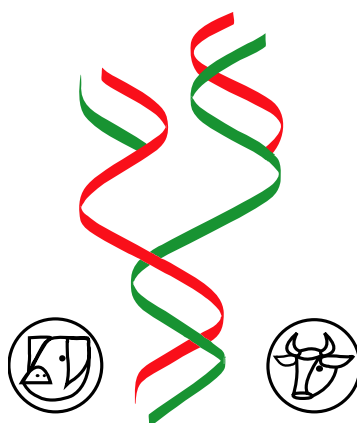
The Effect of Finnish Fox Genes on Reproduction and Production Traits in Polish Arctic Fox Population
Gorajewska E. ^{*1}, Przysiecki P. ², Całka M. ¹, Filistowicz A. ¹ 56

Detection of DNA fragments from feed containing genetically modified organisms in blood of broilers
Hanusová L. *, Vrabcová P., Řehout V. 57

Genetic Analyse of Disease and Evolutionary Defect in Hairless Breed Dogs
Nesvadbová M. * 63

Education expansion by a course of molecular isolation techniques for students of Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno Svobodová K.*, Bílek K.	72
The practical course of „Fish Genetics“ for students of Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno Zrůstová J. ^{1*} , Bílek K. ¹ , Baránek V. ²	75
MOLECULAR BIOLOGY AND ANIMAL GENETICS.....	78
Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of genes <i>CDK4</i> and <i>TP53BP1</i> in two pig breeds Bílek K.*, Svobodová K., Knoll A.	78

SPONZOŘI /SPONSORS



Section I: **GENETICS AND CATTLE AND PIG BREEDING**

THE INFLUENCE OF PROPYLENE GLYCOL AS A ENERGY SUPPLEMENT IN SOWS DIETS ON PIGLETS REARING RESULTS.

Boruta O. *, Jasek S.

*Wroclaw University of Environmental and Life Sciences, Institute of Animal Breeding,
Department of Pig Breeding. ul. Chelmonskiego 38c, 51 – 630 Wroclaw, Poland.
o.boruta@ozi.ar.wroc.pl*

Abstract

One of the most important productive value features is milk production. There are some possibilities to manipulate milk production e.g. by feeding and various kinds of additives supplementation contribute to change composition of milk and also influence on piglets quality.

The main aim of this study was to assess the effect of energy supplement propylene glycol, added to sows diets, on piglets rearing.

Twenty-seven gestating sows (22 Polish Landrace and 5 Duroc) and their 270 piglets were used in this study.

Energy supplement propylene glycol was used in sows' preparturient and lactation diets and influence on piglets rearing was studied. The experiment was performed with three groups of sows – one, control group, was fed without propylene glycol and two (experimental A and B) were fed on diets with propylene glycol. The difference was the time of propylene glycol supplemental - 3 days before delivery to 3 (A) or 21 (B) days after. During the experiment data like: number of piglets on 1, 14, 21 and 28th day of life, body weight and gains were collected. The best results were obtained in piglets body weight. There were observed the biggest differences in piglets body weight between control group and group B ($P \leq 0.01$) and between control group and group A ($P \leq 0.05$). On 21st day of lactation propylene glycol – treated sows had heavier piglets than control sows. Piglets of sows from group B grew the fastest ($P \leq 0.05$).

This study has shown that propylene glycol supplement seems promising and further investigation should be undertaken.

VLIV POLYMORFISMU V GENU *DGATI* NA KVALITU TELECÍHO MASA

EFFECT OF POLYMORPHISM IN GENE *DGATI* ON VEAL MEAT QUALITY

Falta D.*, Chládek G.

*Ústav chovu a šlechtění zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
Česká republika; Falta.Daniel@seznam.cz*

Abstract

The *DGATI* encodes diacylglycerol *O*-acyltransferase (EC 2.3.20), a microsomal enzyme that catalyzes the final step of triglyceride synthesis. It has been shown to be associated with milk fat content (percentage of lipid content of milk). Diacylglycerol *O*-acyltransferase became a functional candidate gene for milk fat content, based on the phenotype of *DGATI*-deficient mice and its position close to a milk fat QTL on bovine chromosome 14. In cattle, the lysine variant of *DGATI* was associated with elevated milk fat content and higher intramuscular fat content (IMF) in muscles.

The aim of this study was to assess an influence of polymorphism in gene *DGATI* on veal meat quality. Intramuscular fat content, hardness (as texture parameter) and veal meat colour were used as a meat quality factors. Object of this study were meat samples from the *longissimus dorsi* muscle, part *thoracis* of Holstein bull-calves (n=20). It has been found that the genotype of gene *DGATI* significantly ($p < 0,05$) influenced intramuscular fat content. Neither meat colour measured by system CIE Lab nor meat hardness was not significantly influenced.

Keywords DGAT1, Holstein, meat quality, colour, hardness, intramuscular fat content

Úvod

Textura masa a množství intramuskulárního tuku patří mezi nejdůležitější vlastnosti masa a navíc barva masa je prvním senzoričtým znakem, kterým maso upoutává zájem zákazníka (DENOYELLE et al., 2003). Z charakteristik textury se nejčastěji uvádějí tvrdost, soudržnost a šťavnatost. Tvrdost je definována jako odolnost proti deformaci a v ústech je vnímána stlačením masa mezi zuby (KRKOŠKOVÁ, 1986). Tvrdost masa je jedním z nejdůležitějších faktorů chutnosti masa. Obecně je uváděno, že pojivová tkáň, u které je převládající složkou kolagen, je hlavním faktorem ovlivňujícím tvrdost masa.

Na druhou stranu se až doposud neprokázalo, že množství kolagenu přímo ovlivňuje variabilitu v tuhosti masa (MAHER et al., 2005; RILEY et al., 2005).

Gen *DGATI* (*Diacylglycerol O-acyltransferaza*) se vyskytuje na 14. bovinním chromozomu. Je to gen s příčinnou mutací, jež ovlivňuje množství intramuskulárního tuku (THALLER et al., 2003). Ve vztahu k mléčné produkci má gen *DGATI* vliv na množství tuku v mléce (GRISART et al., 2004). Polymorfismus tohoto genu byl blíže popsán WINTEREM (2002). Celkový PCR produkt má 411 bp. Gen se vyskytuje ve dvou alelických obměnách a to *Q* (námi označovaná alela T- tuk) a *q* (alela M- množství mléka). Alela *Q* je původní, v celkové délce 174 bp je asociována s množstvím tuku v mléce a mase. Alela *q* je tvořena dvěma fragmenty - 174 bp a 237 bp a je spojována s množstvím mléka a bílkovin. V příčinné mutaci (*K 232A*) dochází k záměně aminokyseliny Lyzinu (*Q*) za Alanin (*q*).

Materiál a metodika

Cílem této práce bylo zhodnotit vliv polymorfismu v genu *DGATI* na kvalitu telecího masa. Mezi vybrané ukazatele kvality masa byly zařazeny: množství intramuskulárního tuku (IMT), tvrdost masa a barva masa. Objektem sledování byla skupina 20 telat býčků holštýnského plemene. Telata byla chována v naprosto shodných podmínkách ve skupinovém kotci a krmná dávka byla založena na bázi jadrné starterové směsi. Hmotnost jatečně upravených těl býčků byla 128,8 kg s variabilitou 6,93%. Pro laboratorní analýzu masa byly použity biologické vzorky odebrané na komerčních jatkách ze svalu *Musculus lonngisimus dorsi* části *thoracis* (MLLT) z pravé jatečně upravené poloviny.

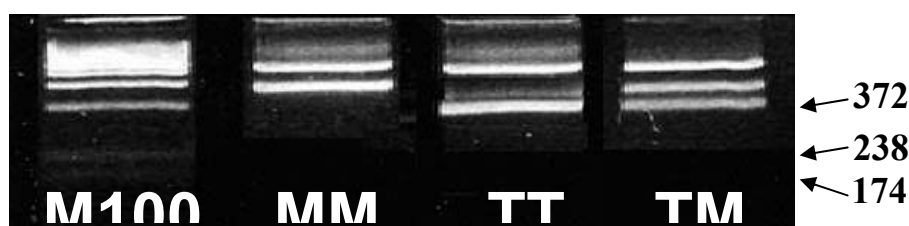
Ze vzorků masa byla izolována DNA pomocí komerční kit QIAMP MEAT KIT a zároveň byly vzorky podrobeny laboratorní analýze 48 h post-mortem. Objektívni měření textury bylo prováděno na přístroji INSTRON 5544, s použitím software Merlin. Vzorky masa byly před provedením analýzy tepelně opracovány ve vodní lázni po dobu 90 min, 70 °C v jádře vzorku. Po tepelné úpravě bylo maso uchováno při teplotě $4 \pm 2^\circ\text{C}$ po dobu 24 hodin a poté byla provedena analýza texturního profilu (TPA), kdy byly cylindrické vzorky masa o průměru 1,25 mm a výšce 10 mm stlačovány ve 2 cyklech na 50% deformaci kolmo na svalová vlákna mezi stlačovacími deskami přístroje. Rychlost příčnicku byla 50 mm/min. Analýzou texturního profilu byly zjištěny parametry tvrdosti v newtonech (N). Stanovení tuku bylo provedeno na aparatuře podle Soxhleta. Pro extrakci tuku byl použit diethylether. Barva masa byla zjištěna přístrojem Konica-

Minolta CM-2600d a výsledné hodnoty jsou udány v jednotkách $L^*a^*b^*$ (CIELAB) při nastavení D65, pozorovatel 10° a SCI/100. Popisné statistické charakteristiky byly provedeny v programu MS Excell a pro jednofaktorovou analýzu variance, pro určení průkaznosti rozdílů mezi sledovanými znaky, byl použit program Statistica 6.0 .

K detekci genotypu kandidátního genu *DGATI* byla použita metoda AS-PCR. Použité primery navržené dle GRISARTA et al. (2002) byly následující:

1A : 5'-GTAGCTTTGGCAGGTAAGAA -3'
 1B : 5'-GGGGCGAAGAGGAAGTAGTA -3'
 2A : 5'-TGGCCCTGATGGTCTACACC -3'
 2B : 5'-GGGCAGCTCCCCCGTTGGCCGC -3'

Obr.1 Výsledné produkty štěpení genu *DGATI*



Výsledky a diskuse

Byl získán AS-PCR produkt očekávané délky a byl ověřen na 2 % agarozovém gelu. Pro obě alely charakteristický proužek o délce 372 bp. U genotypu MM se vyskytuje navíc fragment 238 bp a u genotypu TT fragment 174 bp (**Obr. 1**). Ačkoli jsme neprováděli žádný předvýběr telat, frekvence genotypů u námi sledovaného souboru telat byly překvapivě rovnocenné: genotyp MM 50,0 % a genotyp TM 50,0 %. Genotyp TT jsme v námi sledovaném souboru telat nezaznamenali ani v jednom případě. Frekvence alel v námi sledovaném souboru telat byly 0,75 pro *alelu M* a 0,25 pro *alelu T* (**Tab. 1**).

Jak uvádějí GRISART et al. (2001), alela nesoucí označení T je původní a bývá spojována s množstvím tuku v mléce a v mase. Vzhledem k tomu, že Holštýnské plemeno bylo intenzivně šlechtěno na mléčnou produkci, vyskytuje se u většiny populace v USA a Holandsku větší frekvence výskytu alely M, která je spojována s množstvím mléka.

THALLER et al (2003) v pokusu na 28 ks holštýnských býčcích chovaných v Německu našli frekvence alely T okolo 0,446, a u plemene Charolais pouze 0,111.

Tab. 1 Frekvence genotypů a alel kandidátního genu *DGAT1* (n=20)

Genotyp	Četnost	n	Alela	Četnost
MM	50 %	10	M T	0,75 0,25
TM	50 %	10		
TT	0 %	0		

Asociace genotypu kandidátního genu *DGAT1* s parametry kvality telecího masa byly vyhodnoceny na základě procentuálního množství intramuskulárního tuku (% IMT), barvy a tvrdosti masa u námi sledovaných genotypů (**Tab. 2**). Pokud jde o procento intramuskulárního tuku u genotypu MT obsahujícího původní alelu M, vykazovalo maso těchto býčků statisticky průkazně ($p < 0,05$) vyšší podíl tuku.

Toto je v souladu s tvrzením autorů THALLERA et al. (2003), kteří porovnávali rozdíly v obsahu intramuskulárního tuku u svalů *m. longissimus dorsi* a *m. semitendinosus*, avšak našli statisticky průkazný rozdíl ($p < 0,05$) pouze mezi masem homozygotů a to jen u svalu *m. semitendinosus*. Tvrdost masa byla překvapivě vyšší u genotypu MT, avšak statisticky neprůkazně což mohlo být způsobeno vyšším množstvím kolagenu v mase, který v této práci sledován nebyl.

Tab. 2 Vliv polymorfismu v genu *DGAT1* na ukazatele kvality telecího masa (n=20)

Genotyp	IMT (%)		Tvrdost (N)		Barva					
					L*		a*		b*	
	\bar{X} ± Sx	P	\bar{X} ± Sx	P	\bar{X} ± Sx	P	\bar{X} ± Sx	P	\bar{X} ± Sx	P
MM	0,51 ±0,19	*	41,19 ±9,76	N.S.	43,48 ±1,94	N.S.	13,07 ±0,77	N.S.	11,40 ±1,05	N.S.
MT	0,77 ±0,27		44,03 ±9,37		42,63 ±1,61		12,98 ±1,27		11,15 ±1,15	

* $p < 0,05$

Rovněž RILEY et al. (2005) nenalezli vyšší korelační závislost mezi naměřeným množstvím intramuskulárního tuku a tuhostí masa. Stejně tak i PURCHAS (2004) udává, že vztah mezi tvrdostí masa a obsahem tuku stále není jednoznačný.

Barva masa nebyla rovněž genotypem statisticky průkazně ovlivněna. Nejpatrnější byl rozdíl ve světlosti masa (L^*) mezi genotypy. Maso pocházející z genotypu MM bylo překvapivě světlejší, i když bývá uváděno, že tuk může světlost barvy ovlivnit. U červenosti (a^*) ani u žlutosti (b^*) nebyly rozdíly příliš patrné.

Závěr

Byl získán AS-PCR produkt očekávané délky a byl ověřen na 2 % agarozovém gelu. Frekvence genotypů u námi sledovaného souboru telat byly pro genotyp MM 50,0 %, genotyp TM 50,0 %. Genotyp TT jsme v námi sledovaném souboru telat nezaznamenali. Frekvence alel byly 0,75 pro *alelu M* a 0,25 pro *alelu T*. Statistická analýza souboru prokázala průkazný vliv ($p < 0,05$) polymorfismu v genu *DGAT1* na obsah intramuskulárního tuku v mase. Textura masa reprezentovaná ukazatelem tvrdosti ani barva masa nebyla polymorfismem statisticky ovlivněna.

Acknowledgment

This study was supported by the Research plan No. MSM6215648905 “Biological and technological aspects of sustainability of controlled ecosystems and their adaptability to climate change“, which is financed by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

Literatura

- Denoyelle, C., Lebihan, E.: Intramuscular variation in beef tenderness. *Meat Science*, 66, 2003, 241 – 247.
- GRISART, B. et al.: Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine DGAT1 Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition. *Genome Research*, 2001, 12:222-231
- GRISART, B., et al.: Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *PNAS*, 2004, 101(8):2398-2403
- Krkošková B.: *Textúra potravin*, SNTL Bratislava, 1986
- Maher, S.,C. et al.: The influence of biochemical differences on the variation in tenderness of M. longissimus dorsi of Belgian Blue steers managed homogeneously pre and post-slaughter. *Meat Science*, 69, 2005, 215-224
- Riley, D.,G. et al.: Factors influencing tenderness in steak from Brahman cattle. *Meat Science*, 70 ,2005, 347-356
- THALLER, G., et al.: DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetic*, 2003, 34:354-357.
- Winter, A. et al.: Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content, *PNAS*, 2002, vol.99, no 4.

ASSESSMENT OF SINGLE NUCLEOTID POLYMORPHISMS IN TG5, DGAT1 AND FABP4 GENES FOR ASSOCIATION WITH MEAT QUALITY IN CATTLE

Gazdová V., Filkuková J., Déduchová V., Humpolíček P.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně

Abstract

Objective of this study was to assess the association of SNP in the thyroglobulin (TG5), diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) and fatty acid binding protein 4 (FABP4) genes with carcass composition and meat quality traits in *Bos taurus* cattle. A population of cross-breed cattle (Charolais, Galloway, Blonde d'Aquitaine, Simmental and Czech Flekvieh, n = 66) was developed in Research Institute for Cattle Breeding, Ltd. in Rapotín. Traits analyzed were LM area (LMA), average daily gain (ADG), remission and intramuscular fat content (IFC). Single nucleotide polymorphisms previously reported in the TG5, DGAT1 and FABP4 genes were used as markers on chromosome 14. No significant associations of the SNPs in the DGAT1 and FABP4 genes were observed for any traits. TG5 marker suggests only association with LM area ($P > 0,0741$).

Keywords thyroglobulin (TG5), diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*DGAT1*), fatty acid binding protein 4 (*FABP4*), meat quality, LM area, intramuscular fat content

Introduction

Genes located on the bovine chromosome 14 have been associated with production traits in cattle. All three thyroglobulin (*TG5*), diacylglycerol O-acyltransferase 1 (*DGAT1*) and fatty acid binding protein 4 (*FABP4*) genes have been mapped to the centromeric region of chromosome 14. The SNP reported in the *TG5* which encodes the glycoprotein precursor to the thyroid hormones and has been associated with marbling score in beef cattle (Barendse et al., 1999, 2001). Substitution in the *DGAT1* gene, which encodes an enzyme with a key role in triglyceride synthesis. It has shown association with increased milk yield and milk fat content in dairy cattle (Grisart et al., 2001; Thaller et al., 2003a; Larote et al., 2006). Otherwise, conflicting results on its effect on fat deposition in beef cattle have been reported (Moore et al, 2003; Thaller et al., 2003b). *FABP4* which is expressed in adipose tissue, interacts with peroxisome proliferator – activated receptor and binds to hormone – sensitive lipase and therefore, plays an important role in lipid metabolism and homeostasis in adipocytes. Analysis of SNP in

this gene showed that *FABP4* genotype significantly affected marbling score and subcutaneous depth (Michal et al., 2006). The objective of this study was to assess the association of reported SNPs in the *TG5*, *DGAT1* and *FABP4* genes with carcass composition and meat quality traits in cattle.

Materials and Methods

Animals:

The population of cross-breed cattle (Charolais, Galloway, Blonde d'Aquitaine, Simmental and Czech Flekvieh) was developed in Research Institute for Cattle Breeding, Ltd. in Rapotín.

Genotypes detection:

The genome DNA was isolated from meat using Jetquick Tissue DNA spin kit 250 (Genomed). The polymorphisms at all three genes was detected with multiplex PCR method. Primers were adopted from original papers (Barendse et al., 2004; Winter et al., 2002; Michal et al., 2006). The genotypes in *TG5*, *DGAT1* and *FABP4* genes were determined in 66 animals.

Traits definition:

The following traits were studied: LM area, average daily gain, remission and intramuscular fat content.

Statistical analysis:

The associations of studied polymorphisms with average daily gain (ADG), remission, LM area (LMA) and intramuscular fat content (IFC) were estimated using a general liner model (GLM) in SAS for Windows 9.1.3. The genotypes of relevant gene (Gen), gender (SEX) were used as fixed effects. Age of slaughter (AGE) was used as linear regression.

$$Y_{ijkl} = \mu + \text{GEN}_i + \text{SEX}_j + \text{AGE}_k + e_{ijkl}$$

Results and discussion

Frequency distribution of genotypes and alleles for *TG5*, *DGAT1* and *FABP4* in studied population are shown in Table 1. Observed frequencies are in agreement to studies of different authors (Michal et al., 2006; Thaller et al., 2003; Casas et al., 2005).

The *TG5*, *DGAT1* and *FABP4* markers were of particular interest due to recent reports of their effects in a variety of beef cattle populations. A QTL for fat deposition has been detected in the centromeric region of chromosome 14 in multiple population (Moore et

al., 2003, Casas et al., 2005). All three genes have been mapped to the region of the QTL and markers in these genes have been reported to be associated with intramuscular fat content and marbling (Barendse et al., 2001; Michal et al., 2006), LM area (Thaller et al., 2003b; Casas et al., 2005).

Tab. 1: Absolute (n) and relative (r) frequencies of genotypes and relative frequencies of allele at *TG5*, *DGAT1* and *FABP4* locus

locus	n	<i>CC</i>		<i>TC</i>		<i>TT</i>	
		n	r	n	r	n	r
TG5	66	27	0.41	36	0.54	3	0.05
		<i>C</i>		<i>T</i>			
		0.68				0.32	
DGAT1	66	<i>qq</i>		<i>Qq</i>		<i>QQ</i>	
		n	r	n	r	n	r
		62	0.94	4	0.06	0	0
		<i>q</i>		<i>Q</i>			
		0.97				0.03	
FABP4	66	<i>CC</i>		<i>CG</i>		<i>GG</i>	
		n	r	n	r	n	r
		60	0.91	6	0.09	0	0
		<i>C</i>		<i>G</i>			
		0.95				0.05	

The first goal was to determine the genotype and allele frequencies in cross-breed population bred in the Czech Republic. Only the *TG5* marker was polymorphic and all three genotypes were detected. At both *DGAT1* and *FABP4* genes we detected only two types of genotypes with very low frequency (3 and 5%) of the favorable allele. In the present study, there was only a tendency ($P > 0,0741$) in the association between the *TG5* marker and LM area, but not with other tested traits. The association with LM area was not detected for favorable T allele, but for allele C. This result can be influenced by low number of tested animals. No significant associations of the SNP in the *DGAT1* and *FABP4* genes were observed for any trait. The Least-squares means and standart errors for selected traits by genotypes of this three genes are presented in the Table 2.

Tab. 2: Least-squares means and standard errors for selected traits and genotypes of *TG5*, *DGAT1* and *FABP4* genes

marker	Trait			
	ADG	LMA	remission	IFC
TG5				
CC	504.99 ± 16.72	101.23 ± 2.92*	4.84 ± 0.32	2.38 ± 0.29
TC	531.83 ± 14.38	94.37 ± 2.51	4.97 ± 0.28	2.68 ± 0.25
TT	484.73 ± 49.23	96.99 ± 8.62	4.81 ± 0.95	1.84 ± 0.85
DGAT1				
<i>qq</i>	522.54 ± 11.01	97.18 ± 1.99	4.96 ± 0.21	2.54 ± 0.19
<i>Qq</i>	451.28 ± 42.60	98.48 ± 7.69	4.00 ± 0.82	2.18 ± 0.74
FABP4				
CC	518.87 ± 11.65	96.21 ± 2.02	4.85 ± 0.22	2.46 ± 0.20
CG	520.49 ± 34.59	106.37 ± 5.99	5.39 ± 0.66	3.12 ± 0.59

- tendency in the association with LMA ($P > 0,0741$)

Conclusions

This report presents evidence that allele and genotype frequencies of molecular markers within genes previously associated with meat quality traits are different among populations. Our results can be influenced by low number of tested animals. Because of this we will continue with other populations.

Acknowledgments

This research was financially supported by the Czech Science Foundation project no. 523/03/H076 and project no. 1G58073 and QF3024

References

- Barendse, W., Bunch, R., Thomas, M., Armitage, S., Baud, S., Donaldson, N., 2001, www.beef.crc.org.au/Publications/MarblingSym/Day1/Tg5DNA, 12.3.2006
- Barendse W., 1997, International patent application PCT/AU98/00882, International patent publication WO 99/23248
- http://www.freepatentsonline.com/6383751.html?highlight=assess%20lipid%20metabol&s_id=c73cf119d6709807babf80dd487332cb, 12.12.2006
- Casas, E., et al, 2005, *J. Anim. Sci.*, 83, 13-19
- Michal, J., J., Zhang, Z. W., Gaskins, C., T., Jiang, Z., 2006, *Animal Genetics*, 37, 400-402
- Moore, S., S., et. al, 2003, *J. Anim. Sci.*, 81, 1919-1925
- Thaller, G., Krämer, W., Winter, A., Kaupe, B., Erhardt, G., Fries, R., 2003a, *J. Anim. Sci.*, 81, 1911-1918
- Thaller, G., Kühn, C., Winter, A., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., Zühlke, H., Fries, R., 2003b, *Animal Genetics*, 34, 354-357
- Winter, A., Krämer, W., Werner, F., A., O., Kollers, S., Kata, S., Dursterwitz G., Buitkamp, J., et al., 2002, *PNAS*, vol. 99, 14, 9300-9305

**VZTAH POLYMORFISMU *MSPI* GENU MYOGENINU A UKAZATELŮ
REPRODUKCE PRASNIC PLEMENE ČESKÉ BÍLÉ UŠLECHTILÉ**

**RELATION OF PORCINE MYOGENIN GENE PCR/RFLP *MSPI* AND
REPRODUCTION TRAITS OF THE CZECH LARGE WHITE SOWS**

P. Humpolíček*, Urban T*.

**Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics; Mendel University of
Agriculture and Forestry; Zemědělská 1; 61300 Brno; Czech Republic*

Abstract

Reproduction traits are highly important for pigs producers because of effect on economic efficiency. Hence, breeders as well as geneticists try to find the way to improve the reproduction traits. Because the protein coded by the myogenin gene (*MYOG*) is necessary for regulation of skeletal muscles development during embryogenesis, many authors have studied its influence on the meat traits of pigs. The aim of our study was to determine the effect of myogenin gene on the sows' reproduction traits. There were included 529 litters of 107 Czech Large White sows. Effect on the age of the first conception, service period, insemination index, average birth weight of piglets, average weights of litter at the age of 21 days, total number of born piglets, number of piglets born alive and number of weaned piglets were studied. For studying the influence of myogenin gene on chosen traits we used the mixed linear model procedure REML and in one case general linear model. Significant effects of myogenin gene on the age of the age of first conception, the insemination index and on the litter size were proved.

Keywords porcine myogenin gene (*MYOG*), reproduction traits, Czech Large White, pig

Introduction

Efficiency of production of livestock is highly influenced by reproductive success, especially in litterbearing species. The gene of myogenin (*MYOG*) is a member of a family of transcription factors that are specific to skeletal muscle (Wright et al. 1989). In the pig, primary muscle fibre formation takes place in the period around day 35, and secondary muscle fibre formation is taking place in the period at approximately day 65 of gestation (Wigmore and Stickland, 1983). The myogenin together with the *MYF3* gene induce the terminal transformation of myoblasts into myofibers (Te Pas and Visscher, 1994). Because of that, the myogenin gene is considered as candidate gene for meat

traits. The significant effect of the myogenin gene on the birth weight, growth rate and lean weight has been detected by Te Pas et al. (1999). By contrast, they did not find any differences for backfat thickness. An impact of the *MYOG* gene on reproductive traits was noticed only by Horák et al. (2004). They watched the influence of this gene in Přeštice Black-Pied sows which have been declared as the genetic resource in the Czech Republic. The aim of our study was to determine the impact of the myogenin gene on the reproduction traits of purebred Large White sows. The Czech Large White breed is used as maternal line in breeding schemes in the Czech Republic.

Material and Methods

Animals

The populations of tested sows were collected from three purebreds' herd of the Czech Large White pigs in this experiment. A total of 529 litters' records from 107 sows were included in the litter size analyses. The sows were bred in three independent herds; herd 1, 2 and 3 where the number of animals were 12, 29 and 66, respectively.

Detection of genotypes

To detect the genotype in the gene of myogenin, the PCR-RFLP method was used. To amplify DNA, primers designed by Te Pas et al. (1996) were used. Allele *A* possesses an *MspI* restriction site (EMBL accessed number X89209) so the PCR product was cut into fragments of length 219-bp and 134-bp while allele *B* did not included restriction site so the PCR product was not cleaved.

Analysed Traits

Following traits were analyzed in the 1st-7th litters, service period (SP), the insemination index (II) and the average weights of piglets after parturition (kg, AWP). AWP were probed at latest 24 hours after parturition in every analysed litter independently. The relations between age of first conception (AFC) of sows and genotype in *MYOG* gene was study too. The average weights of litter at the age of 21 days (kg, AWL) in the 1st, the 2nd and the 1st - 7th litters were analysed separately. Data for AWL was collected from 35 sows. The effect of the *MYOG* gene on the total number of born piglets (TNB), the number of piglets born alive (NBA) and the number of weaned piglets (NW) were studied in the 1st and the 1st - 5th litters.

Statistical Analysis

The statistical analyses were performed by the general linear model (GLM) and the mixed linear model (MLM) procedure REML, both by the SAS for Windows 9.1.3. The following factors were included: genotypes in the myogenin gene (*MYOG*), interaction of herd, year and months of birth of sows (HYMB), order litter (OL), number of piglets born alive (NBA), the boar (BOAR), the sire of sows (SIRE), the sows (SOWS), age of the first conception (AFC), weight of litter at 21 days (WL). Specification of particular models and type of included factors are shown in table 1.

Table 1 Used model and type of factors: F – fixed effect, R – random effect, L - linear regression

	Litters	Model	MYOG	HYMB	OL	TNB	NBA	BOAR	SIRE	SOWS	AFC	WL
AFC	1 st -7 th	GLM	F	F	-	-	-	-	-	-	-	-
SP	1 st -7 th	MLM	F	F	-	-	-	-	-	R	-	-
II	1 st -7 th	MLM	F	F	F	-	-	-	R	R	L	-
AWP	1 st -7 th	MLM	F	F	-	-	F	R	-	R	L	-
AWL	1 st , 2 nd , 1 st -7 th	MLM	F	F	F	F	-	R	-	R	-	-
TNB	1 st	MLM	F	F	-	-	-	R	-	-	F	-
	1 st -5 th	MLM	F	F	F	-	-	R	-	R	-	-
NBA	1 st	MLM	F	F	-	-	-	R	-	-	F	-
	1 st -5 th	MLM	F	F	F	-	-	R	-	R	-	-
NW	1 st	MLM	F	F	-	-	F	R	-	-	F	L
	1 st -5 th	MLM	F	F	F	-	F	R	-	R	-	L

AFC – age of the first conception; SP – service period; II – insemination index; AWP – average birth weight of piglets; AWL – average weights of litter at the age of 21 days; TNB – total number of born piglets; NBA – number of piglets born alive; NW – number of weaned piglets; MYOG - genotypes in the porcine myogenin gene; HYMB - herd*year*months of sows birth; OL –of order litter; BOAR - effect of the boar; SIRE - effect of the sire of sows; SOWS –effect of sows; AFC - age of the first conception; WL - weight of litter at 21 days; GLM – general linear model; MLM – mixed linear model

Results and discussion

Observed frequencies of *MYOG* genotypes are shown in table 2. With the exception of herd 2, the *AA* genotype was the most frequent. The least present genotype was the *BB* genotype (table 2). Similar result was described by Cieślak et al. (2000) in Polish Landrace (*AA* - 50 %, *AB* - 36.7 %, *BB* - 13.3 %) and Te Pas et al. (1999). On the other hand, as the most frequent genotype the *BB* was found by Anton et al. (2002), Soumilion et al. (1997) and Horák et al. (2004).

Table 2 Number of tested animals (n) and relative frequencies of genotypes and alleles in the myogenin gene

	n	Relative frequencies of genotypes			Relative frequencies of alleles	
		<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>A</i>	<i>B</i>
Herd 1	12	0.50	0.25	0.25	0.63	0.37
Herd 2	29	0.34	0.59	0.07	0.64	0.36
Herd 3	66	0.41	0.27	0.32	0.55	0.45
Σ		0.40	0.36	0.24	0.58	0.42

Sows with the *BB* genotype were observed to have shorter service period and significantly smaller age of the first conception than sows with the *AB* and *BB* genotypes (table 3). This can be in relation with the influence of *MYOG* gene on growth rate Te Pas et al. (1999), Anton et al. (2006). Likewise, the insemination index was significantly lower in sows with *BB* genotypes. No effects of the *MYOG* gene on average weights of litter at the age of 21 days in the 1st as well as in the 2nd and in the 1st – 7th litters were detected. Similarly, no effect on the average birth weight of piglets was observed so the effect found by Te Pas et al. (1999) was not confirmed in our study. The research revealed a remarkable effect of the myogenin gene on the litter size in the 1st litter. As is shown in table 3, there were evident differences between the total number of piglets born and the number of piglets born alive, primarily in the 1st litters. An effect of the *MYOG* gene in the 1st – 6th litter is not so unambiguous, there were observed the significant differences for number of piglets weaned only. Thus, the sows with the *BB* genotype had the lowest litter size in the 1st as well as in the 1st – 6th litters. This is in agreement with the shortest age of first conception and service period of *BB* sows. The relations between this and previously found influence of myogenin gene on the fat thickness should be considered in future study. Only Horák et al. (2004) studied the influence of myogenin gene on the reproductive traits of Přeštice Black-Pied sows. They found significant

differences between number of piglets weaned of sows with *AA* and *AB*, *BB* genotype in the 2nd – 6th litters and in the 1st – 6th litters. In their study the sows with biggest litter size were sows with genotype *AA*, conversely the lowest litter size had sows with heterozygous genotype.

Table 3 Relation between the gene of myogenin and reproduction traits of Czech Large white sows (Least square means and standard errors, LSM ± SE)

		<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>
		LSM ± SE	LSM ± SE	LSM ± SE
AFC		262.68 ± 7.78 ^a	262.56 ± 7.55 ^a	221.93 ± 12.84 ^b
SP	1 st -7 th litters	41.39 ± 2.99	48.21 ± 2.95 [*]	36.84 ± 5.15 ^{**}
II	1 st -7 th litters	1.18 ± 0.05 [*]	1.32 ± 0.05 ^{a**}	1.05 ± 0.09 ^b
AWP	1 st -7 th litters	1.62 ± 0.02	1.62 ± 0.02	1.65 ± 0.05
	1 st litters	55.89 ± 2.78	55.40 ± 2.52	64.53 ± 4.02
AWL	2 nd litters	54.64 ± 2.25	58.51 ± 2.94	55.37 ± 3.72
	1 st -7 th litters	57.78 ± 1.38	58.50 ± 1.42	56.59 ± 1.57
TNB		12.74 ± 0.45 [*]	13.49 ± 0.42 ^a	11.15 ± 0.72 ^{b**}
NBA	the 1 st litters	12.08 ± 0.45	13.01 ± 0.42 ^A	10.59 ± 0.72 ^B
NW		10.912 ± 0.28 ^A	10.69 ± 0.26 ^a	9.27 ± 0.46 ^{Bb}
TNB		11.70 ± 0.51	11.98 ± 0.50	11.98 ± 0.85
NBA	the 1 st -5 th litters	10.97 ± 0.49	11.33 ± 0.48	11.49 ± 0.82
NW		10.16 ± 0.12 ^a	10.10 ± 0.12 ^a	9.53 ± 0.20 ^b

Values with the different superscripts show significance level within rows: $P \leq 0.01$ (A, B), $P \leq 0.05$ (a, b), $P \leq 0.1$ (*, **). AFC - age of the first conception, SP – service period, II – insemination index, AWP – average birth weight of piglets, AWL - average weights of litter at the age of 21 days, TNB – total number of born piglets, NBA – number of piglets born alive, NW – number of weaned piglets.

Conclusion

The importance of observed differences remains unknown. Further investigation is required on the relations between myogenin and reproduction traits. The effects observed in our study can be caused by well known effect of the myogenin on the muscle development, lean meat contents and carcass traits. Nevertheless, the results imply that the myogenin gene is potentially useful for applications as supportive trait in pig breeding not only for meat traits but also for reproduction traits.

Acknowledgements

This work research was supported by the Czech Science Foundation no. 523/03/H076. The authors thank Genoservis, Co. Olomouc for a disclosure the reproduction data and Laboratory of Applied Molecular Genetics of the Mendel University of Agriculture and Forestry Brno for detection of genotypes.

References

- Anton, I., Fésűs, L.S., Zsolnai, A., 2002. Simultaneous identification of two MspI polymorphisms of the porcine myogenin gene in Hungarian breeds. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 119, 280–283.
- Anton, I., Zsolnai, A., Komlosi, I., Kiraly, A., Fesus, L., 2006. Effect of MYOG genotypes on growth rate and production traits in Hungarian large white pigs. *Acta Vet Hung*. 2006 54(3), 393-7.
- Horák, P., Urban, T., Dvořák, J., 2004. Genetics variability of the CRC and MYOG genes in genetic resource, Přeštice Black-Pied pig. *Archiv für Tierzucht*. 3, 231-238.
- Cieślak, D., Kapelański, W., Blicharski, T., Pierzchala, M.A., 2000. Restriction fragment length polymorphisms in myogenin and myf3 genes and their influence on lean meat content in pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 117, 43–55.
- Te Pas, M.F.W., Visscher, A.H. 1994., Genetic regulation of meat production by embryonic muscle formation – a review. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 111, 404-412.
- Te Pas, M.F.W., Soumilion, A., van den Bosch, T.J., Veninga, G., Meuwissen, T.H.E., 1996. Association between polymorphism in the porcine myogenin gene locus and growth traits. 47th Annual Meeting of EAAP, 26-29 August 1996, Lillehammer, Norway.
- Te Pas, M.F.W., Soumilion, A., Harders, F.L., Verburg, F.J., van den Bosch, T.J., Galesloot, P., Meuwissen, T.H.E., 1999. Influences of myogenin Genotypes on Birth Weight, Growth Rate, Carcass Weight, Backfat Thickness, and Lean Weight of Pigs. *Journal of Animal Science*. 77, 2352–2356.
- SAS Institute Inc. 2004. SAS 9.1.3. Cary, NC.
- Soumilion, A., Erkens, J.H.F., Lenstra, J.A., Rettenberger, G., Te Pas, M.F.W., 1997. Genetic variation in the porcine myogenin gene locus. *Mammalian Genome*. 8, 564-568.
- Wigmore, P.M.C., Tickland, N.C., 1983. Muscle development in large and small pig fetuses. *Journal of Anatomy*. 137, 235-245.
- Wright, W.E., Sasoon, D.A., Lin, V.K., 1989. Myogenin a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56, 607.

STUDY OF GENE EXPRESSION DURING THE DEVELOPMENT OF PORCINE AND BOVINE PREIMPLANTATION EMBRYOS USING MICROARRAY TECHNIQUE

Kepkova K.^{1*}, Moravcova T.¹, Dufort I.², Kanka J.¹, Sirard M.A.²

¹*Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., Rumburska 89, 277 21 Libechov, Czech Republic.*

²*Centre de Recherche en Biologie de la Reproduction, Département des Sciences Animales, Université Laval, Québec, G1K 7P4, Canada*

Abstract

The aim of the presented study was to identify candidate genes with different expression during porcine and bovine preimplantation development. Using the technique of microarray (bovine chip; oocyte MII-4c, 8c-4c, 4c-8c), we selected candidate genes with different expression profile between the porcine MII oocytes and 4-cell embryos. Candidate genes were identified by the help of Array Pro-Analyser and NIA microarray software, based on the fold change between different stages. 61 genes were identified as over-expressed in MII oocytes and 7 over-expressed in 4-cell embryos. We selected five of genes over-expressed in porcine MII oocytes (confirmed by real-time RT-PCR) which were identified by Blast search in GenBank as **Elongation factor 1 alpha** (binding of aminoacyl-tRNAs to 80S ribosomes), **14-3-3 protein** (activation of c-Raf, association with Cdc25C), **Casein kinase** (CSNK2B, phosphorylation of the p53 protein), **Nucleophosmin** (NPM, B23, essential for embryonic development, centrosome duplication and maintenance of genomic stability) and **Alcohol dehydrogenase**. The expression of selected genes was verified in bovine and porcine embryos and oocytes by a real-time RT-PCR. The amplified fragments were electrophoresed on a standard 1.2% agarose gel and quantified with a spectrophotometer. Real-time RT-PCR study of gene expression in bovine embryos showed the increase of mRNAs content during early 8-cell stage for nucleophosmin, 14-3-3 protein and alcohol dehydrogenase. The expression of casein kinase and elongation factor 1 alpha genes was increased in 4-cell stage.

All chosen candidate genes can play an important role in the embryonic genome activation and pre-implantation development of bovine and porcine embryos.

ANALÝZA VARIABILITY MIKROSATELITŮ U POPULACÍ MASNÝCH PLEMEN SKOTU V ČESKÉ REPUBLICE

MICROSATELLITE ANALYSIS OF VARIABILITY OF BEEF CATTLE IN THE CZECH REPUBLIC

Kundrát R.*, Urban T.

*Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
Česká republika; urban@mendelu.cz*

Abstract

The research was carried out on investigate the genetics structure some beef cattle in the Czech Republic. This study covered 7 breeds - Aberdeen Angus, Galloway, Gasconne, Hereford, Charolais, Limousine, and Beef Simental. The detection of genotypes of microsatellites was based on multiplex PCR reaction and electrophoresis separation. Ten markers of microsatellites were evaluated: BM 1824, BM 2113, ETH 3, ETH 10, ETH 225, INRA 023, SPS 115, TGLA 122, TGLA 126, and TGLA 227. The greatest values of genetics diversity were found in breed Gasconne (locus BM 2113) and the greatest average observed heterozygosity was in breed Limousine. The test for Hardy-Weinberg equilibrium revealed, that only population Gasconne and Charolais were in all loci in equilibrium. The breed Beef Simental was not in 4 microsatellites in HW equilibrium ($P \leq 0.01$). The dendrogram drawn based on Nei's unbiased genetics distance indicate, that closely are the breeds Aberdeen Angus and Limousine, and breeds Gasconne with Beef Simental. The breed Hereford is more distantly from the others, and Galloway is wholly different.

Keywords beef cattle, microsatellite, variability

Úvod

Chov skotu patří v České republice k základním pilířům živočišné výroby a v podhůří a na horách zabezpečuje převážnou část příjmů jednotlivých zemědělských podniků. Tradičně byl chov skotu u nás zaměřen na produkci mléka, hovězího masa a částečně byl skot využíván i k tahu. Produkce kvalitního hovězího masa přes chov specializovaných stád hraje významnou roli ve státech EU, kde jsou od roku 1980 poskytovány prémie na chov krav bez tržní produkce mléka. Tím je zdůrazněn význam tohoto nového zaměření chovu skotu. Pro produkci hovězího masa je využito značné diverzity mezi plemeny

a biologickými typy. Genetické zlepšení a vypracování šlechtitelských programů závisí na genetické proměnlivosti, které je využíváno mezi plemeny a uvnitř plemen.

Materiál a metodika

Vzorky krve byly odebrány od 7 masných plemen skotu chovaných v ČR. Celkem bylo analyzováno 341 vzorků (počty jedinců jednotlivých plemen jsou uvedeny v tabulce č. 1). Vzorky odebrané krve sloužily k ověřování paternity, která se provádí v souladu se zákonem č. 130/2006 Sb. Ověřování paternity provádí LAMGen (Laboratoř aplikované molekulární genetiky) na MZLU v Brně, Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat. Detekce jednotlivých genotypů byla založena na multiplexní PCR reakci a elektroforetické separaci.

PCR – polymerázová řetězová reakce: Amplifikace DNA byla prováděna pomocí kitu firmy Applied Biosystems u skotu - StockMarks[®] Bovine Paternity PCR Typing Kit. **Složení amplifikační směsi (11-plex):** 10× StockMarks[®] Pufr 3,0 μl, dNTP (1,25 mM každý) 4,0 μl, Mix primerů 5,5 μl, AmpliTaqGold[®] polymeráza 0,5 μl, Deionizovaná voda 1,0 μl, DNA 1,0 μl, Celkový objem 15 μl. **Podmínky cyklování** (GeneAmp[™] PCR System 9700 cycler, Applied Biosystems): Program **Skot kit** (ramp Max); počáteční denaturace 95°C 15 min; 31 cyklů: 94°C/ 45 s (100 % ramp), 61°C/ 45 s (50 % ramp), 72°C/ 60 s (80 % ramp); závěrečná elongace 72°C 60 min; ukončení 4°C / ∞. Elektroforetická separace - **Příprava vzorků na elektroforetickou separaci:** 0,5 μl produkt amplifikace, 0,5 μl GS ROX 500, DNA marker (Applied Biosystems) 11,5 μl Hi-Di[™] formamid, deionizovaný (Applied Biosystems), 12,5 μl celkový objem; denaturace 95°C po dobu 5 min, na 5 min vložit vzorky na led, vložit do zásobníku. **Kapilární elektroforéza na ABI PRISM[®] 310 Genetickém analyzátoru:** kapiláry 47cm / 50 μm, Polymer POP-4, Pufr 310 s EDTA (10x).

U sledovaných jedinců byla sledována genetická variabilita 10-ti mikrosatelitních markerů: TGLA 227, BM 2113, ETH 10, SPS 115, TGLA 126, TGLA 122, INRA 023, ETH 3, ETH 225, BM 1824. Laboratoř využívá ISAG (WILLIAMS, 2002; ANONYM 1, 2005) panel mikrosatelitů pro skot, plus jeden mikrosatelit (ETH 3) nad rámec panelu.

Bioinformatické zpracování molekulárních dat bylo provedeno pomocí programu Popgen 32 (Yeh et al., 1999). Byly vypočítány frekvence alel, nevychýlené odhady pro pozorovanou (H_{etO}) a očekávanou (H_{etE}) heterozygotnost, Hardy-Weinbergova

rovnováha pro každý mikrosatelitní marker (χ^2 - test dobré shody). Diverzita mezi plemeny byla zjišťována na základě odhadu „neovlivněné“ genetické distance (Nei's „unbiased“ distance) podle Nei (1978) použitím UPGMA.

Výsledky a diskuse

Analýza mikrosatelitní variance 10 mikrosatelitů u 341 jedinců uvnitř populací sedmi plemen masného skotu v České republice je popsána pomocí frekvencí alel (Tabulka č. 1). Všechny lokusy byly polymorfní a počet alel detekovaných na lokus se pohyboval v rozmezí od 2 (ETH 10) do 11 (TGLA 122). Nejvíce alel (17) v lokusu TGLA 122 zjistili také Kim et al. (2002) u plemen holštýnského skotu.

Průměrná heterozygotnost u jednotlivých plemen se pohybovala v rozmezí od 0,6453 (Masný simentál) po 0,7457 (Limusine) (Tabulka č. 2). Kim et al. (2002) zjistili u holštýnského skotu očekávanou heterozygotnost rovněž vysokou ($Het_E = 0,693$) a naopak u japonského černého skotu zjistili nízkou genetickou diverzitu ($Het_E = 0,471$).

Tabulka č. 1: Frekvence alel pro každý lokus a plemeno masného skotu, velikost vzorku populace je v závorkách, velikost alely je označena v párech bází

<i>Lokus</i>	<i>AA</i>	<i>Gal</i>	<i>Gas</i>	<i>H</i>	<i>Ch</i>	<i>L</i>	<i>MS</i>
<i>BM 1824</i>	(77)	(12)	(7)	(37)	(56)	(69)	(79)
<i>178</i>	0,3243	0,4167	0,0833	0,2857	0,1964	0,3529	0,1218
<i>180</i>	0,1351	0,0833	0,4167	0,0571	0,2679	0,1544	0,2821
<i>182</i>	0,2905	0,5000	0,0833	0,5429	0,2679	0,0662	0,2564
<i>188</i>	0,2500	0	0,4167	0,1143	0,2679	0,4265	0,3141
<i>190</i>	0	0	0	0	0	0	0,0256
<i>BM 2113</i>	(77)	(12)	(7)	(36)	(56)	(69)	(80)
<i>121</i>	0	0	0	0	0	0	0,0064
<i>125</i>	0,1645	0,3333	0,0714	0,1765	0,1786	0,0149	0,0256
<i>127</i>	0,0395	0	0,0714	0	0,0625	0,0448	0,1603
<i>131</i>	0,0395	0	0,3571	0,0294	0,2500	0,2463	0,4423
<i>133</i>	0,1447	0,5417	0,0714	0,1324	0,1071	0,1119	0,0321
<i>135</i>	0,2632	0,0833	0,1429	0,2794	0,1786	0,2388	0,0769
<i>137</i>	0,0789	0	0,0714	0,0441	0,1518	0,1716	0,0577
<i>139</i>	0,1974	0,0417	0,1429	0,2647	0,0714	0,1493	0,1795
<i>141</i>	0,0724	0	0	0,0735	0	0	0,0064
<i>143</i>	0	0	0,0714	0	0	0,0149	0,0128
<i>138</i>	0	0	0	0	0	0,0075	0
<i>ETH 3</i>	(78)	(12)	(7)	(38)	(56)	(69)	(80)
<i>109</i>	0	0	0	0	0	0	0,0127
<i>117</i>	0,4054	0,6667	0,4286	0,3429	0,5893	0,4632	0,5759

<i>Lokus</i>	<i>AA</i>	<i>Gal</i>	<i>Gas</i>	<i>H</i>	<i>Ch</i>	<i>L</i>	<i>MS</i>
<i>119</i>	0,1284	0,0833	0	0,5857	0,0625	0,3529	0,1076
<i>121</i>	0,1419	0,2500	0	0	0,0089	0	0
<i>123</i>	0	0	0	0	0,0268	0,0074	0
<i>125</i>	0,3041	0	0,5000	0,0714	0,2589	0,1250	0,1582
<i>127</i>	0,0203	0	0	0	0,0536	0,0411	0,1329
<i>129</i>	0	0	0,0714	0	0	0	0,0127
<i>131</i>	0	0	0	0	0	0,0074	0
<i>ETH 10</i>	(78)	(11)	(6)	(36)	(56)	(62)	(75)
<i>127</i>	0	0	0	0	0	0	0,0067
<i>213</i>	0,0064	0	0,0833	0	0	0,0082	0,0467
<i>215</i>	0,0192	0	0	0,0857	0	0,0492	0,0067
<i>217</i>	0,4551	0,3636	0,7500	0,3143	0,8571	0,1230	0,6733
<i>219</i>	0,3141	0,6364	0,1667	0,1429	0,1339	0,2459	0,1333
<i>221</i>	0,2051	0	0	0,0714	0	0,3689	0,0933
<i>223</i>	0	0	0	0	0,0089	0,1557	0,0400
<i>225</i>	0	0	0	0	0	0,0492	0
<i>ETH 225</i>	(78)	(12)	(7)	(37)	(56)	(69)	(80)
<i>140</i>	0,0395	0,1250	0,3571	0,0946	0,0893	0,3971	0,3987
<i>144</i>	0,2763	0,2083	0	0,1622	0,0268	0,1176	0,0380
<i>146</i>	0,0789	0,3750	0,0714	0,0946	0	0,0147	0,1266
<i>148</i>	0,3947	0,2083	0,1429	0,4054	0,4464	0,1618	0,1203
<i>150</i>	0,2105	0,0833	0,4286	0,2432	0,4375	0,3088	0,3165
<i>INRA 023</i>	(76)	(12)	(6)	(37)	(56)	(64)	(78)
<i>198</i>	0	0,5417	0	0	0,0536	0	0,0067
<i>200</i>	0,0733	0	0	0	0,1071	0,1613	0,0400
<i>202</i>	0,1533	0	0	0	0,1786	0,0242	0
<i>206</i>	0,5800	0,1250	0,4167	0,0417	0,2768	0,4677	0,2267
<i>208</i>	0,1267	0,3333	0,0833	0,1389	0,0893	0,1935	0,2200
<i>210</i>	0	0	0,0833	0	0	0	0,1267
<i>212</i>	0	0	0	0	0,0714	0,0161	0
<i>214</i>	0,0667	0	0,3333	0,8194	0,0804	0,1048	0,3800
<i>216</i>	0	0	0	0	0,0089	0,0161	0
<i>218</i>	0	0	0,0833	0	0,1339	0,0161	0
<i>SPS 115</i>	(76)	(11)	(6)	(36)	(56)	(61)	(75)
<i>248</i>	0,5347	0,0455	0,5000	0,2941	0,5273	0,4831	0,6622
<i>250</i>	0	0	0	0	0,0182	0	0
<i>252</i>	0,1250	0	0,0833	0,1471	0,0545	0,1780	0,0203
<i>254</i>	0,2708	0,5455	0	0,0441	0,1364	0,0254	0,0405
<i>256</i>	0,0208	0,2273	0,0833	0,0882	0,2364	0,0424	0,1757
<i>260</i>	0,0486	0,1818	0,3333	0,4265	0,0273	0,2712	0,1014
<i>TGLA 122</i>	(77)	(12)	(7)	(37)	(56)	(68)	(77)
<i>141</i>	0,0135	0,2083	0	0,0571	0,0446	0,0149	0
<i>143</i>	0,1419	0,0417	0,1429	0,6571	0,3125	0,1343	0,1753
<i>147</i>	0	0	0	0,0143	0,0446	0,1343	0,0065

<i>Lokus</i>	<i>AA</i>	<i>Gal</i>	<i>Gas</i>	<i>H</i>	<i>Ch</i>	<i>L</i>	<i>MS</i>
149	0,0135	0	0,0714	0	0,1250	0,0448	0,0195
151	0,6351	0,5833	0,5000	0,1000	0,3036	0,3284	0,4675
153	0	0	0,2143	0,0143	0,0357	0,1716	0,2403
155	0,0608	0	0	0	0,0268	0	0,0260
157	0,0405	0	0	0	0,0714	0	0
159	0	0	0	0	0,0089	0	0
161	0,0676	0,1667	0,0714	0,1143	0	0,0597	0,0455
169	0	0	0	0,0286	0	0	0
173	0	0	0	0	0	0,0299	0
177	0	0	0	0	0,0089	0,0075	0
179	0	0	0	0	0,0179	0,0746	0
183	0,0270	0	0	0,0143	0	0	0,0195
TGLA 126	(77)	(12)	(7)	(38)	(56)	(68)	(79)
113	0,0855	0	0	0,0143	0	0,1194	0,0203
115	0,4671	0,2500	0,3571	0,2714	0,6346	0,4925	0,5000
117	0,3092	0,4167	0,5714	0,6000	0,0577	0,0224	0,3716
119	0	0	0	0	0,0096	0	0,0135
121	0,0132	0	0	0,0571	0,0481	0,1194	0
123	0,1184	0,3333	0,0714	0,0571	0,2500	0,2090	0,0946
125	0,0066	0	0	0	0	0,0373	0
TGLA 227	(77)	(12)	(7)	(38)	(56)	(69)	(80)
77	0,0068	0	0	0	0,0893	0,0662	0
79	0	0	0	0,0132	0,0357	0	0,1169
81	0,2770	0,0455	0,2500	0,0921	0,1250	0,2794	0,3831
83	0	0,1364	0	0,0921	0,1429	0,0735	0,0065
85	0	0	0	0	0,0179	0,0368	0
87	0,1284	0,1364	0	0,0395	0,0268	0,0515	0,0065
89	0,2027	0,3182	0,2500	0,2632	0,3036	0,2941	0,1039
91	0,0473	0,0455	0,3333	0,3421	0,1429	0,0956	0,1234
93	0,1216	0	0	0,1053	0,0089	0,0588	0,0519
95	0	0,1818	0,0833	0	0	0	0,0455
97	0,2162	0,1364	0,0833	0,0526	0,1071	0,0441	0,1623

Note: AA - Aberdeen Angus; Gal – Galloway; Gas – Gasconne; H – Hereford; Ch – Charolais; L – Limousine; MS – Masný simentál

Největší hodnoty genetické diverzity byly zjištěny u plemene Gasconne pro lokus BM 2113 s hodnotou 0,8681. Pozorovaná heterozygotnost (HO) u plemene Charolais byla zjištěna 0,6786 a heterozygotnost očekávaná (HE) 0,6687. Podobné výsledky uvádí ve své práci i Maudet et al. (2002), který uvádí heterozygotnost pozorovanou (HO) 0,640 a heterozygotnost očekávanou (HE) 0,661. U plemene Limousin byla vypočtena heterozygotnost pozorovaná 0,7457 a heterozygotnost očekávaná 0,7315. Maudet et al. (2002) pro plemeno Limousin uvádí heterozygotnost pozorovanou 0,674 a heterozygotnost očekávanou 0,675. V těchto výsledcích se poněkud lišíme. U plemene Gasconne byla zjištěna heterozygotnost pozorovaná 0,7238 a heterozygotnost očekávaná

0,6888. Cañón et al. (2001) uvádí pro plemeno Gasconne heterozygotnost pozorovanou 0,630 a heterozygotnost očekávanou 0,708. Zde se naše výsledky u heterozygotnosti pozorované značně liší, u heterozygotnosti očekávané jsou výsledky bližší. U plemene Aberdeen angus byla vypočtena heterozygotnost pozorovaná 0,7012 a heterozygotnost očekávaná 0,6947. Tyto výsledky se liší od výsledků Wiener et al. (2004), který uvádí heterozygotnost pozorovanou 0,61 a heterozygotnost očekávanou také 0,61. Naše výsledky se však shodují u plemene Hereford, kde Wiener et al. (2004) uvádí heterozygotnost pozorovanou 0,63 a heterozygotnost očekávanou také 0,63. My jsme u plemene Hereford vypočetili heterozygotnost pozorovanou 0,6486 a heterozygotnost očekávanou 0,6312.

Při hodnocení Hardy-Weinbergerovy rovnováhy bylo zjištěno, že plemena Gasconne a Charolais mají všechny pozorované polymorfismy v HW rovnováze. U plemen Galloway, Hereford, Limousin jsme zjistili, že pouze v jednom polymorfismu nesplňují HW rovnováhu. A to Galloway v mikrosatelitu ETH 225, Hereford ETH 10, Limousin BM 2113. U plemene Masný simental jsme zjistili dokonce 4 mikrosatelity které nejsou v HW rovnováze, z toho tři s vysokou průkazností (tj. $P \leq 0,01$) a to BM 1824, SPS 115, TGLA 122 a TGLA 126 s průkazností $P \leq 0,05$.

Tabulka č. 2: Pozorované a očekávané heterozygotnosti s X^2 testem genetické rovnováhy, signifikantní rozdíl ($P \leq 0,05$) je vyznačen **tučně**

Lokus	<i>Aberdeen Angus</i>			<i>Galloway</i>			<i>Gasconne</i>		
	<i>Het_O</i>	<i>Het_E</i>	<i>X²</i>	<i>Het_O</i>	<i>Het_E</i>	<i>X²</i>	<i>Het_O</i>	<i>Het_E</i>	<i>X²</i>
<i>BM 1824</i>	0,7568	0,7346	9,1487	0,8333	0,5942	6,2606	1,0000	0,6970	5,4400
<i>BM 2113</i>	0,8158	0,8347	42,6638	0,6667	0,6123	11,8214	0,5714	0,8681	41,1000
<i>ETH 3</i>	0,7568	0,7110	5,1260	0,6667	0,5072	2,5666	0,5714	0,6044	1,2952
<i>ETH 10</i>	0,7051	0,6559	13,3772	0,3636	0,4848	0,7692	0,3333	0,4394	5,0000
<i>ETH 225</i>	0,6447	0,7205	12,8943	0,6667	0,7826	25,8051	1,0000	0,7143	4,4833
<i>INRA 023</i>	0,6533	0,6183	8,8357	0,6667	0,6051	6,8717	0,8333	0,7576	5,0000
<i>SPS 115</i>	0,7500	0,6267	17,9742	0,6364	0,6450	7,1284	0,5000	0,6818	3,8083
<i>TGLA 122</i>	0,5676	0,5693	172,3226	0,6667	0,6123	4,4475	0,5714	0,7253	13,4285
<i>TGLA 126</i>	0,6184	0,6690	22,1589	0,7500	0,6812	1,9825	0,8571	0,5824	3,2142
<i>TGLA 227</i>	0,7432	0,8073	30,0295	0,9091	0,8442	11,6666	1,0000	0,8182	6,2222
<i>Průměr</i>	0,7012	0,6947	32,5478	0,6826	0,6369	7,5948	0,7238	0,6888	8,720002

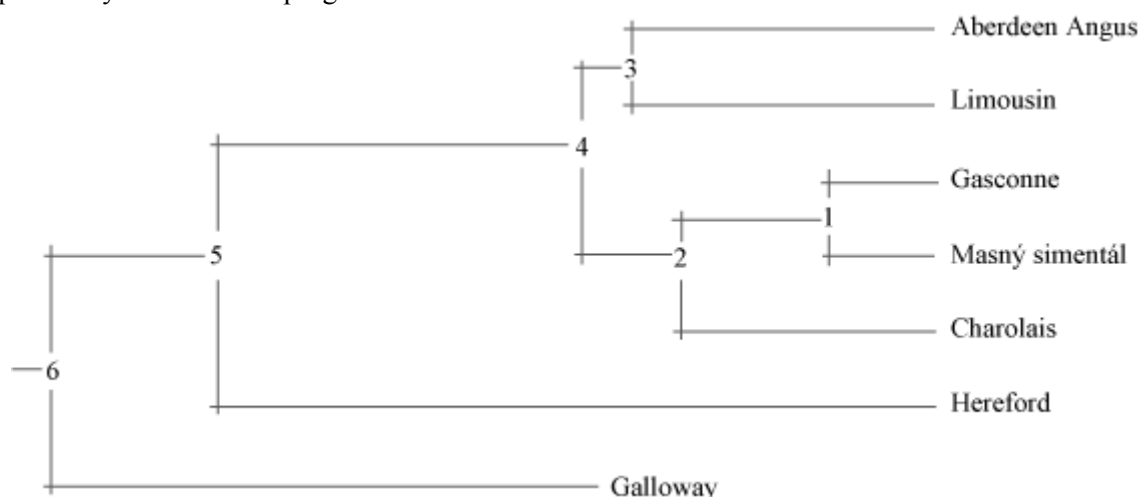
Note: *Het_O* – pozorovaná heterozygotnost; *Het_E* – očekávaná heterozygotnost; *X²* – Chí kvadrát test

<i>Lokus</i>	<i>Hereford</i>			<i>Charolais</i>			<i>Limousine</i>		
	<i>Het_O</i>	<i>Het_E</i>	<i>X²</i>	<i>Het_O</i>	<i>Het_E</i>	<i>X²</i>	<i>Het_O</i>	<i>Het_E</i>	<i>X²</i>
<i>BM 1824</i>	0,5714	0,6161	4,8854	0,7500	0,7529	2,5873	0,7500	0,6703	3,8775
BM 2113	0,7991	0,8068	20,5186	0,8750	0,8377	22,9073	0,8209	0,8217	51,2641
<i>ETH 3</i>	0,6000	0,5420	3,7804	0,5536	0,5833	9,6154	0,7059	0,6479	7,5545
<i>ETH 10</i>	0,6571	0,6741	14,6844	0,2857	0,2495	1,4473	0,7869	0,7655	13,2557
<i>ETH 225</i>	0,7568	0,7423	11,6371	0,6429	0,6060	1,8438	0,6618	0,7120	15,4137
<i>INRA 023</i>	0,3056	0,3118	0,7914	0,7857	0,8472	37,7809	0,6613	0,7111	14,0936
<i>SPS 115</i>	0,7353	0,7107	5,2116	0,6364	0,6494	11,4768	0,6949	0,6646	5,9475
<i>TGLA 122</i>	0,5429	0,5482	27,7321	0,7679	0,7901	53,9526	0,8209	0,8204	33,9643
<i>TGLA 126</i>	0,6286	0,5677	1,7751	0,5962	0,5342	13,0900	0,7164	0,6885	18,1362
<i>TGLA 227</i>	0,8947	0,7916	29,9611	0,8929	0,8370	60,9382	0,8382	0,8131	27,2411
<i>Průměr</i>	0,6486	0,6312	9,9223	0,6786	0,6687	17,2272	0,7457	0,7315	17,2178

<i>Masný simentál</i>			
<i>Lokus</i>	<i>Het_O</i>	<i>Het_E</i>	<i>X²</i>
<i>BM 1824</i>	0,6667	0,7553	36,1227
BM 2113	0,6667	0,7400	31,1710
<i>ETH 3</i>	0,6709	0,6176	8,4027
<i>ETH 10</i>	0,5867	0,5197	6,9035
<i>ETH 225</i>	0,7089	0,7135	6,1543
<i>INRA 023</i>	0,8133	0,7431	14,6121
<i>SPS 115</i>	0,5135	0,5219	52,4165
<i>TGLA 122</i>	0,5714	0,6939	116,3164
<i>TGLA 126</i>	0,5405	0,6065	20,6413
<i>TGLA 227</i>	0,7143	0,7875	40,0418
<i>Průměr</i>	0,6453	0,6689	34,9161

Na základě Neiovy genetické distanci byl vytvořen dendrogram (Obr. č. 1), který ukazuje, že nejbližší jsou si plemena Aberdeen Angus s Limousinem a plemeno Gasconne s Masným simentálem, poněkud vzdálenější je plemeno Hereford a zcela nejvzdálenější je plemeno Galloway.

Obr. č. 1 Dendrogram založený na genetické distanci (Nei, 1978): Metoda = UPGMA – modifikovaná z procedury NEIGHBOR programu PHILIP verze 3.5



Závěr

Bylo analyzováno 341 vzorků a určeno 10 mikrosatelitních lokusů u sedmi populací masných plemen skotu. Tato práce podává informace o genetické struktuře některých masných plemen skotu chovaných v České republice. Tato znalost genetické struktury je důležitá především pro další šlechtitelskou činnost.

Poděkování

Tento výzkum byl podpořen projektem GAČR č. 523/03/H076.

Literatura

- Anonym 1. ISAG, [on line] 2005, [cit. 2007-3-26]: <<http://www.isag.org.uk/journal/comparisonguide.asp> >
- Cañón, J. et al., Genet. Sel. Evol., 2001, 33, 311-332.
- Kim, K.S., Yeo, J.S., Choi, C.B. Animal Genetics, 2002, 33, 201-204.
- Maudet, C. et al., J. Animal Science, 2002, 80, 942-950.
- Nei, M. Genetics, 1978, 89: 583-590.
- Wiener, P. et al., Heredity, 2004, 93, 597-602.
- Williams, J. [on line] 2002, [cit.2007-3-26]: <<http://www.projects.roslin.ac.uk/cdiv/markers.html> >
- Yeh. F. C., Yang. R. C., Boyle. T. Quick user guide, popgene version 1.31. Centre for International Forestry Research, August 1999.

RÝCHLA A EFEKTÍVNA KONŠTRUKCIA MULTIPLEX PCR-RFLP

Manga I*., Dvořák J.

MZLU Brno, Faculty of Agriculture, Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Zemedelska 1, 61300 Brno, CR

Abstract

Multiplex PCR-RFLP represents an effective and technically modest method of the gene polymorphism detection. In contrast to individual gene testing, amplification of several products in one PCR reaction followed with specific restriction endonucleases cleaving in optimal buffer medium highly reduces time and cost of the genes analyse. The aim of our work was to show an effective and high-speed strategy, how to create and optimise multiplex PCR-RFLP method for detection several known single nucleotide polymorphism (SNPs). To present this, we developed a new multiplex PCR-RFLP method for testing known SNPs of the *CSN3*, *DGAT1* and *Pit-1* genes by *Bos taurus*.

Key words multiplex PCR-RFLP, SNP polymorphism

Úvod

V laboratóriách s aplikovaným výskumom je značný záujem na tvorbe nových multiplex metód, ktoré sú efektívnejšie a zároveň stále jednoduché. Multiplex PCR-RFLP umožňuje otestovať viaceré SNP polymorfizmy v jednej reakcii, čím sa redukuje čas a množstvo chemikálií, nutných k analýze skúmaných génov. Samotná multiplex reakcia sa aplikuje do mnohých oblastí. Môže slúžiť na zvýšenie rýchlosti DNA sekvenovania (Carvalho, Pena, 2005), často sa používa pri detekcii mutácií zapríčiňujúcich rôzne ochorenia, pri génovej expresii, forenznej analýze, testovaní paternity či pri dekodovaní genetického kódu. Informácie získané pri konštrukcii multiplex PCR možno aplikovať aj pri používaní iných metód ako je multiplex-QEXT (Rudi, 2006), fragmentačná analýza, multiplex genotypovanie a podobne. Poznatky o konštrukcii multiplex PCR sú teda z dôvodu jej masového rozšírenia cenné a v súčasnosti často vyhľadávané.

Kľúčový faktor, umožňujúci zaviesť účinnú a bezproblémovú multiplex PCR-RFLP spočíva v použití optimálne navrhnutých primerov. Liang, Lee, 2006, zkonštruovali matematický algoritmus, ktorý je schopný efektívne vyhľadať set vhodných primerov. Tzv. MAP modelom zároveň urýchlili odstránenie špecifických PCR obmedzení, vyžadujúcich experimentálne testovanie. Autorom sa pomocou spomínaného algoritmu

podarilo nadesignovať primery rešpektujúce klasické požiadavky na design, primery zároveň vykazovali značnú špecifitu. Design primerov musí spĺňať mnoho kritérií, ako je špecifita, dĺžka primerov, teplota denaturácie, obsah GC párov, stabilita 3' konca, tvorba slučky, dimérov a podobne. Výber vhodného páru primerov je značne komplikovaný, nakoľko menované kritéria výberu spolu súvisia. Existuje mnoho programov určených na design primerov, väčšina je však určená na konštrukciu individuálneho páru primerov. Designom setu primerov na multiplex PCR sa zaoberá iba málo programov (Lincoln et al., 1991, Singh, V. et al., 1998). Nicodème et al, 1997, navrhol dvojkrovový algoritmus na design primerov určených pre multiplex PCR. V prvom kroku využívajú program PRIMER designoval individuálne dvojice primerov podľa klasických atribútov a požiadaviek. Následne použil program MULTI PCR na určenie vhodného setu primerov porovnávaním teploty denaturácie a komplementarity jednotlivých dvojíc primerov, nájdených v prvom kroku. Podobne Schoske et al, 2003, predstavil stratégiu zahŕňajúcu design, testovanie a optimalizáciu zmesi PCR primerov. Pomocou programu Primer 3 najskôr selektoval dvojice primerov pre individuálne PCR reakcie. Z týchto vybral vhodných kandidátov na multiplex PCR prísnu selekciou podľa teploty topenia a celkovej komplementarity. Zvolené primery nakoniec otestoval použitím vhodného špecifického algoritmu. Akokoľvek, uvedené postupy sú náročné z časového hľadiska, keďže nezohľadňujú paralelne všetky parametre, potrebné k navrhnutiu vhodných multiplex PCR primerov.

Multiplex PCR-RFLP umožňuje paralelne amplifikovať a genotypovať vysoký počet produktov (Lin, 1996). So stúpajúcim počtom produktov reakcie však klesá pravdepodobnosť nájdenia kompatibilných primerov (Rachlin, 2004, 2005). Reakcia má rovnako limitovaný počet komponentov. Dôkazom tohoto tvrdenia je pozorovanie, kedy primery s vysokou intenzitou amplifikácie príslušného produktu potlačovali amplifikáciu pri použití menej efektívnych primerov (Henegariu J., 1996).

Materiál a metódy

Skonštruovali sme metodiku multiplex PCR-RFLP na detekciu alel *A,B* génu *CSN3*, *A,B* génu *Pit-1* a alel *Q, q* génu *DGATI* u skotu. Genómová DNA slúžiaca k vývinu metodiky bola na porovnanie izolovaná zo somatických buniek obsiahnutých v mlieku skotu a z chlupov a krvi skotu použitím Jet quick blood and cell culture DNA spin kitu (Genomed). Všetky použité primery boli designované programom eprimer3

(<http://bioweb.pasteur.fr>). Požadovaný priebeh reakcie sme dosiahli použitím HotStarTaq DNA polymerázy v kombinácii s Q pufrom, 1U/25 μ l (Qiagen), 2mM MgCl₂, 2,5 μ l 10xPCR buffer/25 μ l, 0,4 μ M primery pre CSN3, 0,3 μ M pre Pit-1 a 0,2 μ M pre DGAT1. Podmienky amplifikácie boli nasledovné: 94°C/15min; 94°C/30sec; 53°C/45sec; 72°C/2min; 40x, 72°C/10min. PCR produkty sme štiepili spoločne restriktčnými endonukleázami *HinfI* a *CfrI* (Fermentas) v prostredí pufru 1X Tango (Fermentas) pri 37°C počas noci. PCR-RFLP produkty boli následne separované na 3,5 % agarózovom gély s EtBr elektroforézou pri 90V. Výsledok bol vizualizovaný UV svetlom a fotograficky dokumentovaný (Canon Ultra Cam.)

Výsledky a diskusia

Konštrukcii panelu multiplex PCR-RFLP predchádzalo niekoľko krokov. Prvým krokom bola voľba cieľovej skupiny skúmaných SNP (naš panel pozostával zo známych SNP génov *CSN3*, *DGAT1* a *Pit-1*, ovplyvňujúcich parametre mliečnej úžitkovosti u skotu). V ďalšom kroku sme overili jednotnosť optimálneho typu pufru pre restriktčné enzýmy umožňujúce RFLP analýzu cieľových SNP. V prípade že pre restriktázy sú optimálne rozdielne typy pufru je nevyhnutné pristúpiť k eliminácii príslušného SNP z panelu multiplex PCR. Možné riešenie predstavuje viackroková RFLP analýza (Obr.1).

Ďalší krok pozostával z vyhodnotenia modelu multiplex PCR-RFLP podľa veľkosti vznikajúcich RFLP produktov pri využití individuálnych PCR-RFLP analýz prebratých z publikovaných vedeckých štúdií. V blízkosti testovaného *A/B* polymorfizmu génu *CSN3* bolo detekované nežiadúce restriktčné *CfrI* miesto, ktoré by pri použití primerov známych z publikácií znemožnilo vyhodnotiť výsledky RFLP analýzy. Na základe tejto skutočnosti sme pristúpili k designu vlastných primerov, čím sme zároveň získali možnosť eliminovať prípadnú inkompatibilitu použitých primerov. Sekvencie analyzovaných génov (podľa www.ncbi.nlm.nih.gov) obsahujúce cieľové SNPs sme najskôr otestovali programom Webcutter 2.0 na prítomnosť restriktčných miest všetkých enzýmov, ktoré sme plánovali použiť pri RFLP analýze produktov multiplex PCR. Pomocou programu eprimer3 pri jeho nastavených optimálnych (default) parametroch sme nadesignovali primery tak, aby interpretácia PCR-RFLP produktov na elektroforetickom gély bola jednoznačná. Získali sme niekoľko variánt, u ktorých sme opätovne analyzovali tvorbu dimérov, slučky, teplotu denaturácie (T_m) či stabilitu 3' konca pomocou programu Oligo 2.0. Tým sme vyseletovali panel multiplex PCR s teoreticky najvyššou efektivitou. Pri

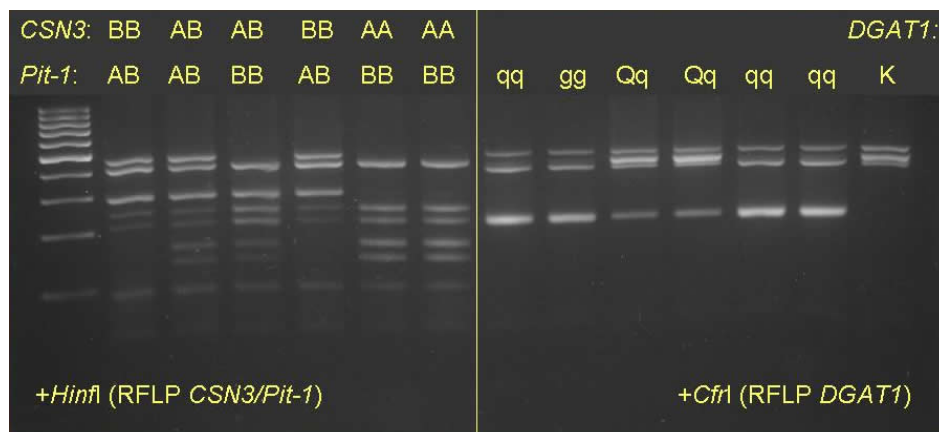
neskoršom individuálnom testovaní primerov sa ukázalo, že design primerov programom eprimer3 zaručoval dostatočne vysokú špecifitu a efektivitu (cca 80% úspešnosť), dodatočná analýza primerov programom Oligo 2.0 teda nie je nevyhnutná (Tab.1).

Tab.1.: Návrh panelu multiplex PCR-RFLP: parametre primerov v programe eprimer3, Oligo 2.0, vznikajúce PCR-RFLP produkty génov *CSN3*, *DGAT1* a *Pit-1*u skotu.

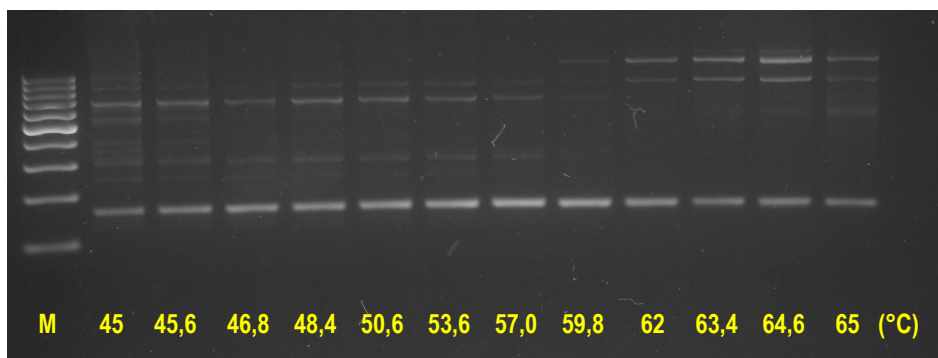
gén	primery eprimer3	n nukleotidy	GC (%)	Tm (°C) eprimer3	Tm(°C) Oligo 2.0	alela	enzym	RFLP multiplex (bp)
<i>CSN3</i>	forward	20	40	59,92	51,8	A	<i>HinfI</i>	124, 35
	reverse	20	55	60,35	51,4	B		159
<i>DGAT1</i>	forward	20	55	59,94	51,3	Q	<i>CfrI</i>	254
	reverse	20	55	60,37	51,9	q		200, 54
<i>Pit-1</i>	forward	20	55	59,68	51,4	A	<i>HinfI</i>	288
	reverse	20	50	60,06	51,4	B		180, 108

Pri individuálnom testovaní vybraných primerov sme použili funkciu teplotného gradientu PCR termocyklera. Jednou PCR reakciou s klasickou Taq polymerázou (MBI Fermentas) sme identifikovali optimálnu teplotu annealingu pre danú dvojicu primerov (Obr.2). Na základe získaných experimentálnych údajov sme zvolili vhodnú optimálnu teplotu annealingu, spoločnú pre všetky primery a zostavili základný teplotný a časový profil pre multiplex PCR. Primery so slabou či nešpecifickou amplifikáciou PCR produktu boli v tomto kroku eliminované, keďže ich prípadné zaradenie do panelu multiplex PCR by nakoniec spôsobilo značné materiálne, finančné a časové straty.

Obr.1 Multiplex PCR-RFLP génov *CSN3*, *Pit-1* a *DGAT1* – varianta s klasickými primermi známymi z publikácií (HotStar Taq DNA Polymeráza + Q buffer), dvojkroková RFLP analýza



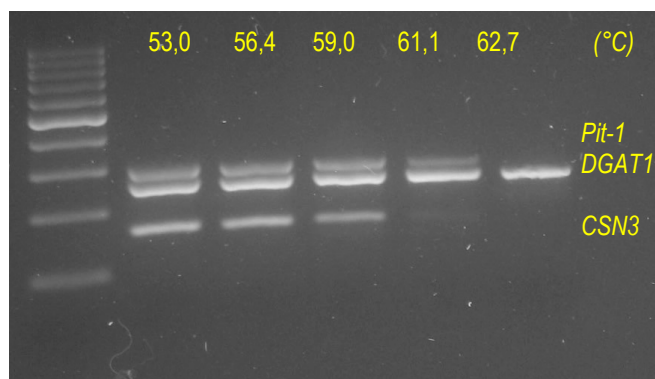
Obr.2 PCR: *CSN3*, 159 bp - teplotný gradient annealingu primerov, eprimer3, Taq DNA Polymeráza



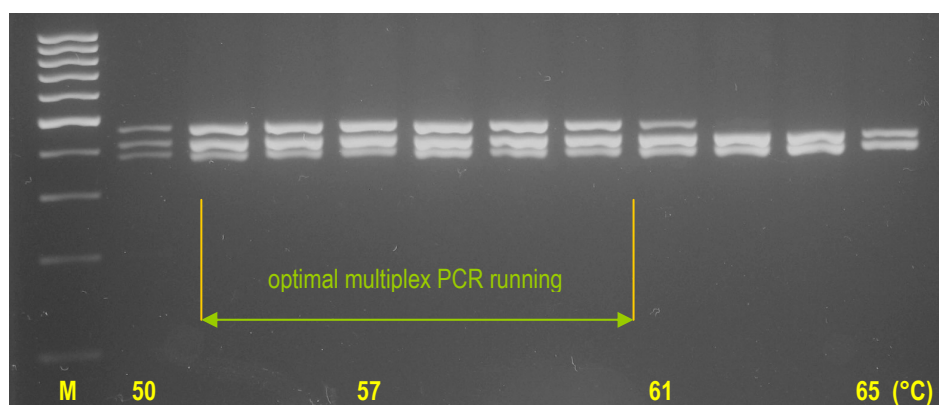
Vhodná teplota annealingu, stanovená experimentálne pre jednotlivé primery sa stotožňovala s teplotou denaturácie, určenou programom eprimer3, čo pri jeho optimálne nastavených parametroch predstavovalo približne 60°C pre všetky primery. Pri paralelnej amplifikácii produktov v multiplex reakcii však táto hodnota klesla približne na 53°C (Obr.3).

Testáciou rôznych reakčných podmienok sme zistili, že jednoznačne najvyššiu špecifitu a mierne zvýšenie výťažnosti produktov poskytovalo použitie HotStar*Taq* DNA polymerázy v kombinácii s Q pufrom (Qiagen), ktorý modifikoval priebeh denaturácie templátovej DNA. Alternatívou bola varianta s HotStar*Taq* polymerázou bez Q pufru, kedy sme zaznamenali prítomnosť slabých nešpecifických PCR produktov. Multiplex PCR profil využívajúci klasickú *Taq* polymerázu nedokázal ani v jednom prípade zabezpečiť dostatočnú amplifikáciu žiadaných produktov, nešpecifita dosahovala extrémny rozmer. V ďalšej modifikácii reakčného ako aj časového a teplotného profilu sme preto využívali vždy len variantu s HotStar*Taq* DNA polymerázou a Q pufrom. Táto nám zároveň poskytovala značné možnosti úpravy teplotného režimu PCR (teploty annealingu) pri konštantne vysoko efektívnej multiplex reakcii (Obr.4). Tento špecifický parameter bol nevyhnutný pre reálnu rutinnú aplikáciu metodiky a umožňoval testovať aj DNA materiál nižšej kvality (koncentrácie). Pri aplikácii Q pufru výrobca doporučuje paralelne testovať aj PCR reakciu bez jeho použitia, nakoľko efekt pufru nie je univerzálny pre každý templát. Akokoľvek, pri analýze fragmentov *CSN3*, *Pit-1* a *DGAT1* obsahujúcich cieľové SNP jeho použitie odstránilo tvorbu nežiadúcich produktov tak pri multiplex PCR reakcii s klasickými primermi, ako aj pri reakcii s primermi designovanými programom eprimer3.

Obr.3. Multiplex PCR génov *CSN3*, *Pit-1* a *DGAT1*: teplotný gradient annealingu primerov (eprimer3), (HotStar *Taq* DNA polymeráza + Q buffer, ekvimolárne množstvá primerov (0,2 μ M)



Obr.4 Demonštrácia vysokej efektivity a špecifity multiplex PCR pri rôznych teplotných podmienkach za použitia HotStar *Taq* DNA Polymerázy a Q pufru. (Multiplex PCR génov *CSN3*, *Pit-1* a *DGAT1* - teplotný gradient annealingu klasických primerov známych z publikácií, dvojkroková RFLP analýza

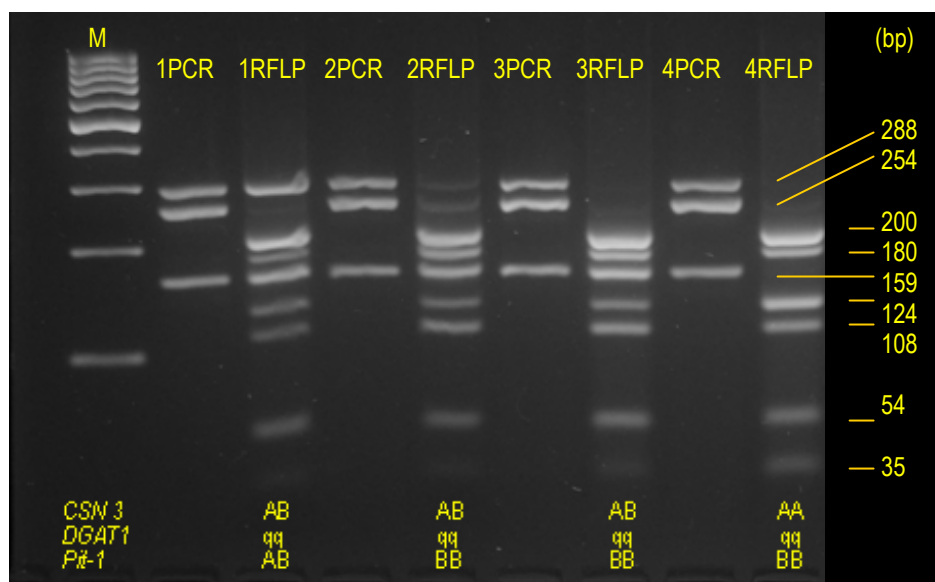


Pri porovnaní výťažnosti reakcie za použitia rôznych zdrojov DNA sme zistili najvyšší zisk PCR produktov pri DNA izolovanej z krvi. DNA izolovaná zo somatických buniek mlieka ako aj DNA získaná z chlpových cibuliek poskytla rapídne nižšiu výťažnosť produktov, ktoré však bolo možné analyzovať za rovnakých reakčných podmienok. Vo vzorkách s minimálnou koncentráciou DNA bolo nutné pristúpiť k úprave PCR profilu. Táto spočívala vo zvýšení koncentrácie primerov, DNA polymerázy a predĺžení polymerizačnej fázy. Kľúčové bolo najmä výrazné zníženie teploty annealingu primerov (8 - 10°C).

Pri snahe o optimalizáciu multiplex PCR-RFLP metódy sme detekovali niektoré rozhodujúce závislosti. (Fig.1, G, H). Tieto zistenia sú v súlade s poznatkami Henegariu, O., 1997. Podľa uvedeného autora môže ďalšiu alternatívu v snahe o optimalizáciu multiplex PCR predstavovať zmena koncentrácie KCl pufru či použitie špecifických aditív (0,1 – 0,8 μ g/ μ l BSA, 5% DMSO, glycerol). HotStar*Taq* DNA polymeráza v kombinácii so špecifickým Q pufrom, zvyšujúcim špecifitu a intenzitu reakcie však

zabezpečila dosiahnutie vysokého štandardu reakcie, ďalšia modifikácia chemizmu multiplex PCR preto nebola nutná. K dosiahnutiu rovnomerne intenzívnej amplifikácie všetkých PCR produktov bolo nevyhnutné experimentálne optimalizovať koncentráciu jednotlivých primerov v reakcii (Obr.5), nakoľko primery s masívnou amplifikáciou produktu evidentne redukovali výťažok produktu primerov s nižšou mierou amplifikácie. Uvedené zistenia sa opäť zhodujú s výsledkami štúdie citovaného autora (Henegariu, O., 1997).

Obr.5 Optimalizovaná multiplex PCR-RFLP génov *CSN3*, *Pit-1* a *DGAT1* – eprimer3; HotStarTaq DNA pol. (1U/25 μ l) + Q buffer; 2 mM MgCl₂; optimalizovaná konc. primerov; podmienky amplifikácie: 94°C/ 15min; 94°C/30sec; 53°C/45sec; 72°C/2min; 40x; 72°C/10min; 3,5% agarózový gel; DNA izolovaná z krvi;



Záver

Multiplex PCR-RFLP predstavuje technicky jednoduchú efektívnejšiu detekčnú metódu SNP polymorfizmov génov. Pre jej úspešnosť je rozhodujúci najmä design vhodných primerov, voľba správneho teplotného a časového PCR profilu. Zrejme nevyhnutnou podmienkou je i použitie HotStar polymerázy, redukujúcej možnosť vzniku nešpecifických produktov. Štúdia sa prostredníctvom riešenia konkrétnej situácie snaží poskytnúť optimálnu všeobecnú stratégiu, ktorej cieľom je dosiahnutie zjednodušenia a urýchlenia konštrukcie multiplex PCR či multiplex PCR-RFLP.

PodĎakovanie

Táto práca bola podporená projektami GAČR 523/03/H076 a MZeČR 1G58073.

Prehľad literatúry

- Carvalho C.M., Pena S.D., Optimization of a multiplex minisequencing protocol for population studies and medical genetics. *Genet Mol Res.* 2005, Jun 30;4(2):115-25.
- Henegariu, O., et al., Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques* 1997 Sep;23(3):504-11.
- Liang, H.L., Lee, Ch., Multiplex PCR Primer Design for Gene Family Using Genetic Algorithm, *Appl. Bioinformatics* 2006;5(2):99-109.
- Lincoln, S. E. et al, A Computer Program for Automatically Selecting PCR Primers. MIT Center for Genome Research and Whitehead Institute for Biomedical Research, Cambridge, Massachusetts, 1991.
- Lin,Z., Cui, X., Li, H., Multiplex genotype determination at a large number of gene loci. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 1996, Mar 19;93(6):2582-7.
- Nicodème, P. and Steyaert, J. Selecting optimal oligonucleotide primers for multiplex PCR. *Intelligent Syst. Mol. Biol.*, 1997, Vol. 51, 210-213.
- Rachlin, J. et al., Computational tradeoffs in multiplex PCR assay design for SNP genotyping. *BMC Genomics*, 2005, Jul 25;6:102.
- Rachlin, J., *The Limits of Multiplex PCR*, 2004, Boston University, 24 Cummington Ave., Boston, MA, USA
- Rudi, K. et al., Multiplex real-time single nucleotide polymorphism detection and quantification by quencher extension. *Biotechniques*, 2006 Mar, 40(3):323-9.
- Singh, V. K., Mangalam, A. K., Dwived, S. and Naik, S. Primer premier Program for design of degenerate primers form a protein sequence. *BioTechniques*, 24, 1998, 318-319.
- Schoske, R. , et al., Multiplex PCR design strategy used for the simultaneous amplification of 10 Y chromosome short tandem repeat (STR) loci. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 375, 333-343.

Effective multiplex PCR-RFLP strategy

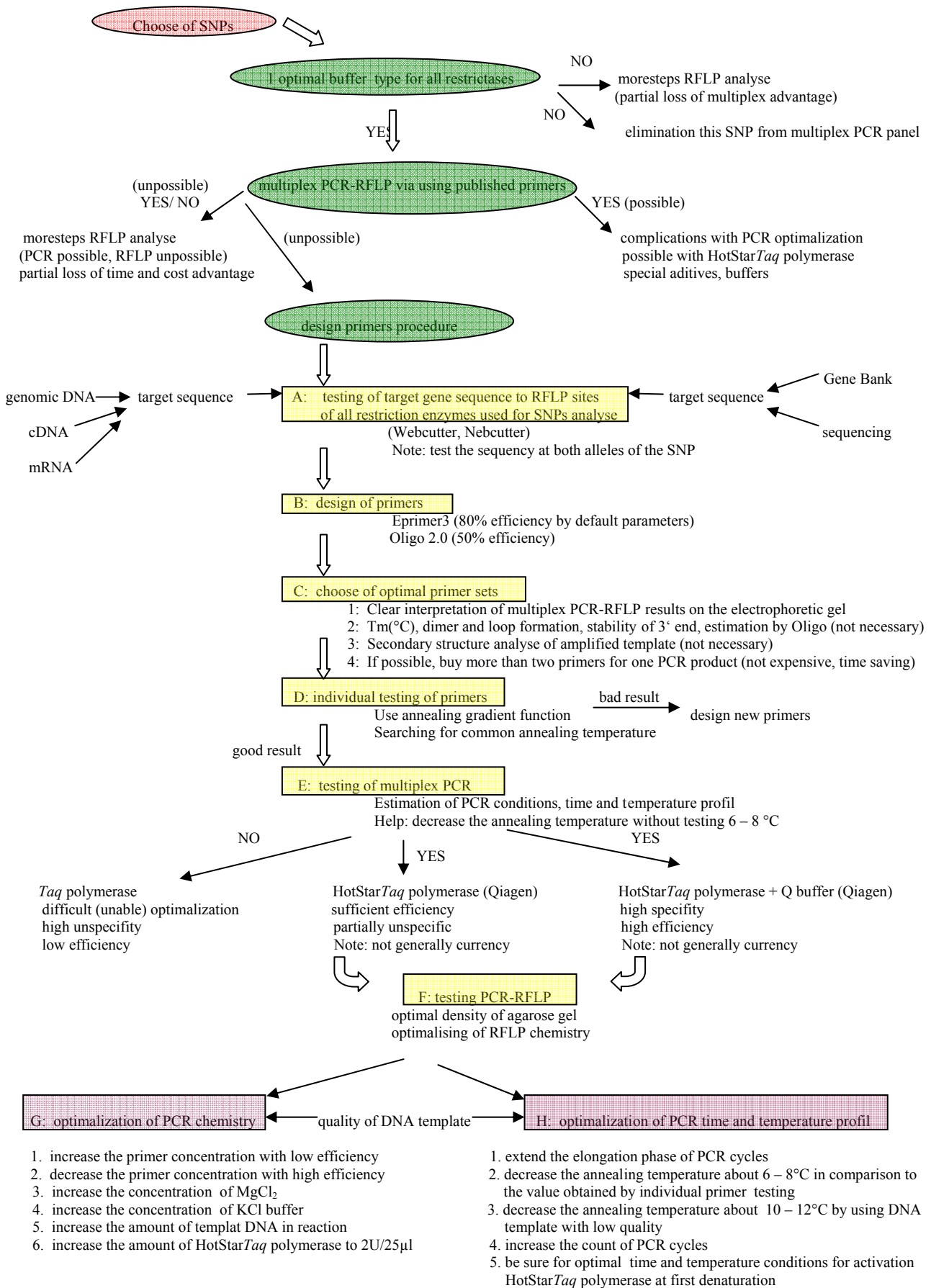


Fig.1 Stratégia konštrukcie multiplex PCR-RFLP

VALIDATION OF NEW PORCINE TETRANUCLEOTIDE MICROSATELLITE PANEL WITHIN THE INTERLABORATORY DNA COMPARISON TEST

Putnová L.*, Civaňová K., Dvořák J.

*Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, MZLU in Brno,
Zemědělska 1, 613 00 Brno, Czech Republic; putnova@email.cz*

Abstract

For the identification of individuals and parentage control performed by pig breeders a new porcine tetranucleotide microsatellite typing prototype kit was analysed. Validation and evaluation was done in terms of interlaboratory DNA Comparison test 2006 organised by Association of German Pig Production and Institute of Animal Science of Bonn University. Animaltype Pig PCR Amplification Kit offers a multiplex-application for kinship testing and determination of the gender. In one PCR reaction, the eleven polymorphic tetranucleotide short tandem repeats loci (S0655, SBH18, SBH2, SBH4, SBH1, SBH10, SBH20, 387A12F, SBH13, SBH19 and SBH22) as well as the gender-specific marker SBH23 were amplified simultaneously. The length polymorphisms of this 12 STRs of chromosomes 1, 3, 6, 7, 9, 12, 13, 16-18, X and Y were examined by multiplex PCR amplification followed by fragment DNA analysis of the amplified products. The investigated probative population consisted of 20 anonymous individuals of undefined breed from Germany. Research data certified the possibility of using this kit of twelve microsatellites markers due to a well-balanced intensity of all signals elaborated for the primer mix. We observed an efficiency of the new prototype kit for polymorphic DNA microsatellite loci genotyping and we confirm its good detection limits. From December 2006 Animaltype Pig Kit is the sole commercially available test kit for fast and reliable genotyping of pigs.

Keywords Microsatellites; pig; validation; kit

Introduction

Analysis of microsatellite markers as useful polymorphic genetic variations helps to characterize different animal species and breeds. There are some microsatellite panels available for porcine microsatellite genotyping. The first multiplex PCR system is composed of 10 and 5-plex (Set A: S0005, S0090, S0101, S0155, S0355, S0386, SW24, SW240, SW857, SW951 and Set B: SW72, SW936, SW911, S0228, S0227) generated by

Nechtelberger *et al.* (2001) for use in both German and Austrian herd-book breeding. The second 10-plex PCR system (SW24, S0386, S0355, SW353, SW936, SW72, S0068, S0070, S0107 and TNFB) was designed by Putnová *et al.* (2003) for the individual identification and parentage control in the Czech Republic and Slovak Republic. From December 2006 another test kit (S0655, SBH18, SBH2, SBH4, SBH1, SBH10, SBH20, SBH23, 387A12F, SBH13, SBH19 and SBH22) is commercially available. The chemical package Animaltype Pig PCR Amplification Kit was projected by German biotechnology company Biotype[®] AG (Dresden, Germany; <http://www.biotype.de>).

Association of German Pig Production and Institute of Animal Science of Bonn University turn to our laboratory to take part in “The comparison DNA test 2006” aimed at prototype test analysing. To extend our previously described parentage control studies in pigs it was necessary to analyse the utility of this new Animaltype Pig Kit prototype.

Due to participation in the Germany interlaboratory DNA comparison test, for now, all 32 microsatellite markers mentioned above are routinely tested in our laboratory (the fluorescent-labelled sonds are required).

Material and methods

Animal samples

The efficiency of the method was evaluated in 20 anonymous individuals of undefined breed provided by Association of German Pig Production and by Bonn University (Germany).

Sample preparation

Porcine genomic DNA was isolated from delivered blood using JETQUICK kit (Genomed GmbH, Germany), following the instructions of manufacturer.

Microsatellite analysis

A total of 12 microsatellite markers (S0655, SBH18, SBH2, SBH4, SBH1, SBH10, SBH20, SBH23, 387A12F, SBH13, SBH19, SBH22) were tested in one multiplex reaction. The PCR amplification (reaction mixture composition, primer mixture composition, and cycling conditions) was done according the protocols (Biotype AG, Dresden, Germany). Validation and evaluation of the prototype kit have been performed for GeneAmp PCR 9700 thermal cycler and ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). PCR products were mixed with GeneScan ROX 550

Size Standard and Hi-Di formamide. Alleles were assigned using GeneScan and Genotyper Software v. 3.7 NT. Allele sizes were adjusted and reported according to the comparison test control DNA (DL157, positive amplification control). For the negative amplification control, nuclease-free water instead of template DNA was added into reaction tube containing the PCR master mix. An allelic ladder provided together with Animaltype Pig Kit and allowing standardisation of different laboratories was applied as internal size control of each run.

Results and discussion

We take part in porcine interlaboratory “DNA comparison test 2006” for purpose of analysing a new available prototype kit for tetranucleotide microsatellite genotyping. The test was organized by the Umbrella Association of German Pig Production (ZDS - Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion e.V., <http://www.zds-bonn.de>) in cooperation with Bonn University (ITW – Institut für Tierwissenschaften - Institute of Animal Science, Animal Breeding&Husbandry; <http://www.itw.uni-bonn.de>).

For comprehensive kit information see Table 1. The highest number of alleles (n=17) and the highest heterozygosity (over 80 %) was indicated for locus SBH2. Locus-specific characterization is summarized in Table 2. Information about repeat motif of the reference allele and alleles ranges are at disposal.

The amplification conditions of the multiplex were optimised successfully and the analysis of assembled panel was done in 20 samples of pigs and one sample of control DNA.

Tab. 1. Animaltype pig tetranucleotide STR markers

Locus	Mapping	Heterozygosity	Number of Alleles	PE
387A12F	12p14-15	0.710	10	0.445
S0655	7p11	0.726	15	0.469
SBH1	1p13	0.622	9	0.318
SBH2	3p16-17	0.838	17	0.671
SBH4	6q35	0.776	14	0.555
SBH10	9p11-13	0.788	14	0.576
SBH13	13q46-47	0.744	10	0.500
SBH18	16q23	0.717	12	0.455
SBH19	17q12-14	0.611	7	0.304
SBH20	18q13-23	0.758	15	0.524
SBH22	Xp24 (pseudoautosomal)	0.625	12	0.322
SBH23	X, Y (gonosomal)	sex specific	2	-

Tab. 2. Locus-specific information of Animaltype pig

Locus	Repeat Motif of the Reference Allele	Reference Allele	Allele Range
387A12F	[TTCT] ₂ CT [TTCT] ₁₉	21	9-21
S0655	[GGAA] ₁₂	12	5-22
SBH1	[CTTT] ₁₃	13	7-18
SBH2	[AGAA] ₂₄ AA [AGAA]	25	6-34
SBH4	[GAAA] ₂ GGAA [GAAA] ₂ A [GAAG] ₇ [GAAA] [GAAG] [AAAG] [AGAG] ₅ [AAAG] ₆ AA [AAAG] ₄ A [AAAG] ₃ AA [AAAG] ₄ A [AAAG] ₂₁ AG [AAAG] ₃ AGAG [AAAG] ₂	64	47.3-66.1
SBH10	[TAGA] ₁₅ [CAGA] ₁₂ [TAGA] ₇ TACA [TAGA] TACA [TAGA] TACA [TAGA] ₂ TACA [TAGA] ₂ TACA [TAGA] ₂ CAAA	48	31-50
SBH13	[TATC] ₁₅	15	8-18
SBH18	[AGGA] ₁₅	15	9-23
SBH19	[GTCT] ₄ [ATCT] ₁₀	14	10-16
SBH20	[CTTT] ₁₄ CTTC [CTTT] ₂ CTTC [CTTT] ₂ CTTC [CTTT] ₃	24	19-49
SBH22	[ATAG] ₆ ATG [ATAG] ₁₁ ATG [ATAG] ₃	20	18-28

Tab. 3. Alleles identified in Animaltype pig Comparison test 2006

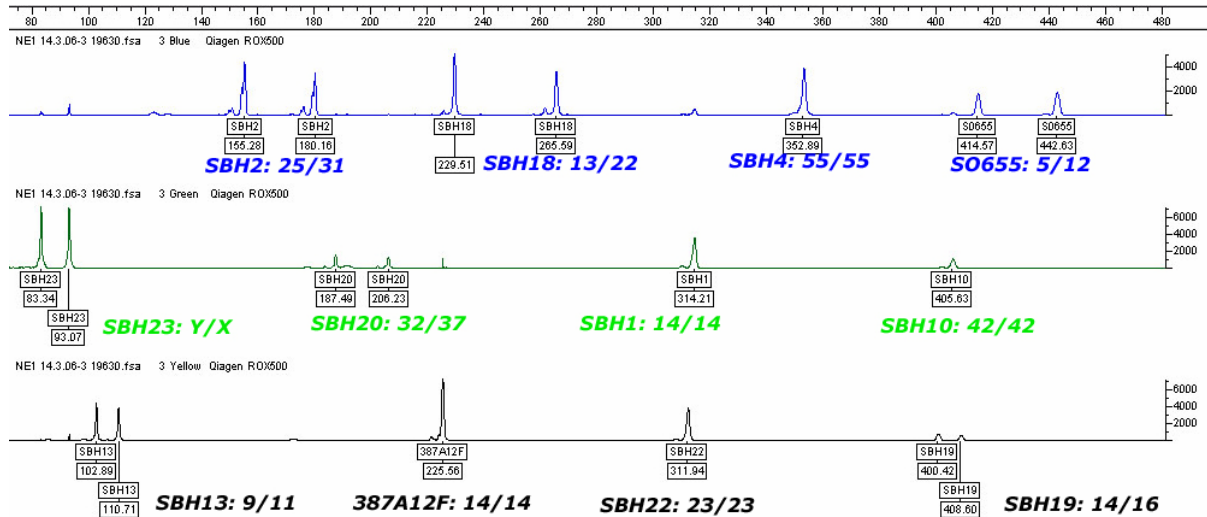
Locus	Fluorescent label	Color	Number of Alleles	Alleles obtained in Comparison test 2006
S0655	6-FAM	Blue	7	5, 10, 12, 12.1, 13, 17, 22
SBH18	6-FAM	Blue	7	11, 12, 13, 14, 16, 17, 22
SBH2	6-FAM	Blue	9	6, 22, 23, 24, 25, 26, 28, 29, 31
SBH4	6-FAM	Blue	10	50, 50.2, 55, 55.1, 56, 57, 60, 63.1, 64, 64.1
SBH1	HEX	Green	10	10.1, 12, 12.1, 13.1, 14, 14.2, 16, 16.1, 18, 18.1
SBH10	HEX	Green	6	34, 42, 44, 45, 48, 49
SBH20	HEX	Green	8	20, 22, 23, 32, 35, 37, 39, 40
SBH23	HEX	Green	2	X, Y
387A12F	NED	Black	7	13, 14, 14.1, 15, 15.1, 17, 18
SBH13	NED	Black	5	9, 11, 14, 15, 16
SBH19	NED	Black	5	10, 13, 14, 15, 16
SBH22	NED	Black	6	22, 23, 23.3, 24, 25, 28

All microsatellites show polymorphic variability across the studied samples. Table 3 shows specific alleles identified in the animals. Total numbers of 9 animals were of male origin (SBH23: X/Y) and 11 were female (SBH23: X/X). A total number of 82 different alleles were obtained. The number of alleles at individual loci ranged from 5 (SBH13 and SBH19) to 10 (SBH1 and SBH4).

Research data certified the possibility of using this kit of twelve microsatellites markers due to a well-balanced intensity of all signals elaborated for the primer mix (see Figure 1). We observed an efficiency of the new prototype kit for polymorphic DNA microsatellite loci genotyping and we confirm its good detection limits.

Based on the comparison interlaboratory test results, from December 2006 the Animaltype Pig Kit became the sole commercially available test kit for fast and reliable genotyping of pigs.

Fig. 1. The electropherogram displays the Testprobe 1 of the Comparison test



Acknowledgements

This study is supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic by project 1G58073.

References

- Nechtelberger, D. et al. Anim. Biotech. 12, 2001: 141-144.
 Putnová, L. et al. Czech J. Anim. Sci. 48, 2003: 307-314.
<http://www.biotype.de> - Biotype® AG (Dresden, Germany; Animaltype Pig Kit)
<http://www.zds-bonn.de> - ZDS (Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion e.V.)
<http://www.itw.uni-bonn.de> - Bonn University (ITW - Institute of Animal Science)

RESTRIKČNÍ ANALÝZA GENU PRO BLAD

RESTRICTION ANALYSIS OF CD 18 GENE

Večerek L., Hosnedlová B., Čítek J.

*Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat, JU v Českých Budějovicích, Studentská 13,
370 05 České Budějovice, Česká republika; vecerek@zf.jcu.cz*

Abstract

Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) in Holstein cattle is a lethal autosomal recessive genetic disease manifested by disturbance of immunity and high mortality in calves (recessive homozygotes) during first months of life as a consequence of infection complications. The molecular causation of disease is a site mutation at position 383 of the CD18 gene of chromosome 1. The aim of this study was determination of occurrence polymorphisms in the part of CD 18 locus in dominant homozygotes. DNA was isolated from blood of 10 Holstein cows. PCR/RFLP method was used with 10 restriction endonucleases. In 3 from 9 amplicates were identified polymorphisms. Two polymorphisms were identified for *Taq* I (T/CGA), one polymorphism for *Tru* I (*Mse* I) (T/TAA). Presented results indicate the possibility of multiple polymorphisms occurrence in monitored sequences of locus CD18 of chromosome 1 in Holstein cattle. Further, the whole chromosome sequence of CD 18 locus will be analysed.

Key words BLAD; CD 18; PCR/RFLP; Holstein; cows

Úvod

BLAD (bovine leukocyte adhesion deficiency) je letální autozomálně recesivní genetická porucha, vyskytující se u holštýnského plemene skotu a projevující se zejména u telat (recesivní homozygoti) narušenou imunitou a vysokou mortalitou během prvních měsíců života v důsledku banálních infekcí.

BLAD byl zejména v 90. letech jedním z velkých problémů genetiky zdraví tohoto plemene skotu. Recesivní alela, jejíž výskyt byl zjištěn u některých vynikajících plemenů, byla šířena v černostrakaté populaci holštýnského plemene obchodem s plemenným materiálem. V současné době již BLAD není tak závažným problémem, přesto je důležité pokračovat v detailním výzkumu tohoto genu a jeho polymorfismů.

Klinické projevy BLAD: Postižená telata a mladší zvířata trpí opakovanými infekcemi, např. pneumonií (Kehrli; Johnson, 1994; Ackermann, 1996), papilomatózou a dermatofytózou (Johnson, 1994), bolestivými vředy v ústní sliznici, záněty ozubice, ztrátou zubů, chronickým zápalem plic a chronickými průjmy. Telata brzy umírají na infekční komplikace (Nagahata, 2004). Z imunologického hlediska dochází u postižených zvířat k výraznému snížení exprese $\beta 2$ heterodimerického integrinu (Cox et al., 1997).

Molekulární příčinou BLAD je jednoduchá bodová mutace (A→G) na pozici 383 genu CD18 chromozómu 1, která vede k záměně glycinu za aspartamovou kyselinu na pozici 128 (Nagahata, 2004). Kód pro BLAD nosiče je „BL“, pro zvířata bez BLAD alely „TL“ (Boichard et al., 1994 in Tainturier et al., 1995; Grzybowski et al., 1999). Další mutací je záměna C→T na 775 nukleotidu (tichá mutace - bez fenotypového projevu) (Shuster et al., 1992 in Ribeiro, 2000).

Materiál a metodika

Cílem této molekulárně genetické analýzy je detekce výskytu polymorfismů u analyzovaných sekvencí DNA genu CD 18 u krav holštýnského plemene skotu. V této části výzkumného úkolu byla analyzována chromozomální sekvence o délce 4020 bp z celkově analyzované délky 11238 bp z lokusu CD18 chromozómu 1 u zvířat s alelou „TL“. Vzorky DNA byly izolovány z krve (metody lyzátová nebo kit) deseti krav holštýnského plemene. K amplifikaci úseků ze sledované chromozomální sekvence bylo dosud použito 9 párů (tab. č. 1) z celkově 22 připravených dvojic primerů. Takto bylo vyčleněno požadovaných 9 amplifikátů DNA ze sledovaného lokusu za použití metody PCR (polymerase chain reaction). Kvalita PCR produktů byla ověřována elektroforetickou metodou na 2,5% agarózovém gelu.

Každým párem primerů bylo 10x amplifikováno vždy po 10 vzorcích DNA – celkem tak bylo analyzováno 900 variant vzorků. Výskyt polymorfismů u připravených amplifikátů DNA (způsobený pravděpodobně bodovými mutacemi) byl zjišťován aplikací 10 restričních endonukleáz třídy II (tab. č. 2). Výskyt cílových sekvencí pro jednotlivé restriktázy byl detekován metodou RFLP (Restriction fragment length polymorphism) a elektroforetickou metodou na 3,5% agarózovém gelu.

Velikosti vzniklých fragmentů byly odhadnuty porovnáním s komerčními velikostními markery a náležitými kontrolními nerestrigovanými amplifikáty.

Výsledky a diskuse

Vyhodnocení dílčí části pokusu: Metodou RFLP byly zjištěny cílové sekvence u 470 (52 %) z celkových 900 analýz vzorků (viz tab. č. 2). U 48 % vzorků cílové sekvence zjištěny nebyly.

Pro amplifikáty DNA všech použitých primerů byly vždy zjištěny cílové sekvence pro restriktázy *Alu* I, *Hae* III, *Dde* I.

Pro amplifikáty DNA některých použitých primerů byly zjištěny cílové sekvence pro restriktázy *Sty* I, *Tag* I, *Ava* II, *Mse* I, *Ava* I.

Pro amplifikáty DNA všech použitých primerů nebyly zjištěny cílové frekvence pro restriktázy *Hind* III, *Cla* I.

Polymorfismus zkoumaných amplifikátů sledované sekvence lokusu (tab. č. 2) byl u sledovaných vzorků zaznamenán při použití:

- sedmé dvojice primerů (od 2064; od 2594) s velikostí amplifikátu 530 bp a restriktázy *Taq* I (T/CGA). Z výsledků vyplývají 2 restriční modely (obr. č. 1): a) o délce fragmentů přibližně 400 a 105 bp (pro 8 z 10 vzorků) a b) o délce fragmentů přibližně 500, 400 a 105 bp (pro 2 z 10 vzorků);

- osmé dvojice primerů (od 3097; od 3496) s velikostí amplifikátu 399 bp a restriktázy *Taq* I (T/CGA). Z výsledků vyplývá 1 restriční model o délce fragmentů přibližně 399, 255 a 144 bp (pro všech deset vzorků);

- deváté dvojice primerů (od 3438; od 4020) s velikostí amplifikátu 582 bp a restriktázy *Tru* I (*Mse* I) (T/TAA). Z výsledků vyplývají 2 restriční modely: a) o délce fragmentů přibližně 500 a 82 bp (pro 2 z 10 vzorků) a b) o délce fragmentů přibližně 500 a 100 a 82 bp (pro 8 z 10 vzorků).

Vyjma výše uvedených případů nebyl u ostatních variant zkoumaných amplifikátů (tab. č. 2) zjištěn polymorfismus. Ostatní prověřované amplifikáty vykazují homozygotní založení stejného typu pro všech deset zkoumaných vzorků DNA.

Použitá metoda ELFO na agarózovém gelu v některých případech zřejmě detekčně nepostihla menší části restričních fragmentů, proto v některých případech bývá jejich součet menší než celková délka amplifikátu (tab. č. 2). Délky restričních fragmentů byly odhadovány srovnáním s velikostními markery. Vzhledem k celkovému rozsahu prováděné studie by bylo použití exaktní fragmentové analýzy ekonomicky nákladné,

proto nebylo provedeno. Použitá metoda hodnocení zcela postačuje záměrům studie. Lze předpokládat, že po plánované analýze zbývajících částí úseku chromozomální sekvence počet detekovaných polymorfismů dále vzroste.

Závěr

Z celkového počtu 22 připravených dvojic primerů bylo použito k amplifikaci požadovaných úseků ze sledované chromozomální sekvence devět párů primerů.

K provedení molekulárně genetické analýzy bylo využito 10 typů vybraných restričních endonukleáz třídy II: *Alu* I, *Hae* III, *Hind* III, *Hpy* F31 (*Dde* I), *Eco* 130 I (*Sty* I), *Taq* I, *Bsu* 15 I (*Cla* I), *Eco* 47 I (*Ava* II), *Tru* I (*Mse* I), *Eco* 88 I (*Ava* I).

Z dílčí provedené molekulárně genetické analýzy DNA chromozomální sekvence o délce 4020 bp z lokusu CD18 u deseti TL krav holštýnského plemene (homozygoti dominantní) vyplývá, že u 3 z 9 vytvořených amplifikátů byl identifikován polymorfismus:

- u primerové dvojice od 2064, od 2594 s velikostí amplifikátu 530 bp s využitím restriktázy *Taq* I (T/CGA) - byly zjištěny dva restriční modely s fragmenty cca 400 a 105 bp; cca 500, 400 a 105 bp;

- u primerového páru od 3097, od 3496 s velikostí amplifikátu 399 bp a s využitím restriktázy *Taq* I (T/CGA) - byl zjištěn restriční model - fragmenty cca 399, 255 a 144 bp;

- u dvojice primerů od 3438, od 4020 s velikostí amplifikátu 582 bp a s využitím restriktázy *Tru* I (*Mse* I) (T/TAA) - byly zjištěny dva restriční modely s fragmenty cca 500 a 82 bp; cca 500 a 100 a 82 bp.

Uvedené výsledky naznačují možnost výskytu vícečetných polymorfismů na sledovaných sekvencích lokusu CD18 chromozomu 1 u holštýnského skotu.

Výzkum byl podpořen projekty MSM 6007665806, GAČR 523/03/H076 a NAZV QF 3012.

Literatura

Ackermann M.R. et al. Vet. Pathology, Vol 33, Issue 3, 1996: 273–281.

Boichard et al. Renc. Rech. Ruminants, 1994 in Tainturier et al. Revue de Medicine Veterinaire. Mar 1995, v. 146 (3).

Cox et al. Veterinary Immunology and Immunopathology 58 (1997): 249–263.

Grzybowski et al. Animal Science Papers and Reports vol. 17 (1999) no. 4, 195–207.

Johnson, L.K. WSC Conference, 1994–1995, 1994.

Kehrli. Dostupný z WWW:

<http://www.extension.iastate.edu/Pages/dairy/report95/health/dsl-44.pdf>

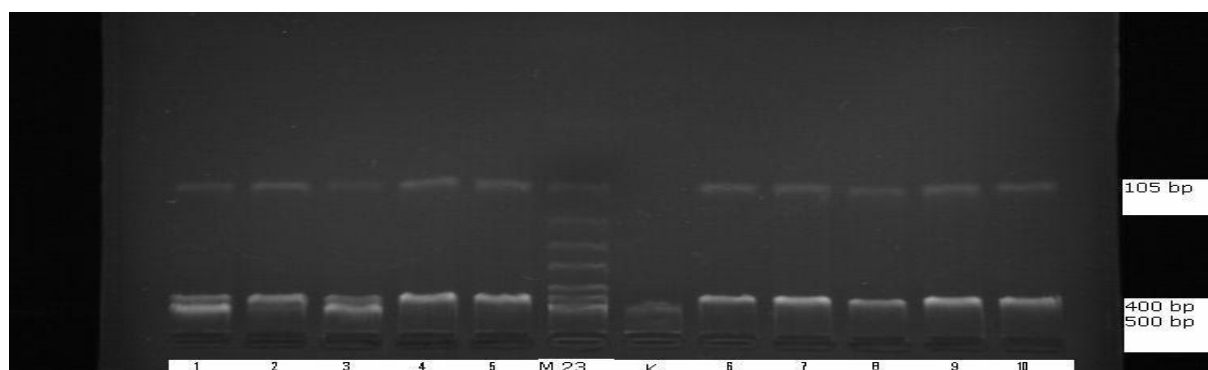
Nagahata, H.J. Vet. Med. Sci. 66, 2004: 1475–1482.

Shuster, D.E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9225–9229. In: Ribeiro L.A. et al. Genet. Mol. Biol. Vol. 23 No. 4 São Paulo Dec. 2000.

Tab. č. 1 Použité dvojice primerů

1.pár	od 3 od 831	5'- CTGAA CAGTG GAGCA GATGA-3' 5'- CACCT GCACT TGTAAC CGACT-3'
2.pár	od 485 od 1153	5'- TTGGC TGAGT GAAGG CTCTG-3' 5'- TCTGA GGCTG GTGGA TAGGA-3'
3.pár	od 936 od 1690	5'- TTGCT TAGCA GCTGG TGGTA-3' 5'- TGGCA CTCCT TCTCC TTGTT-3'
4.pár	od 1671 od 2065	5'- AACAA GGAGA AGGAG TGCCA-3' 5'- ACGTC ACAGA TACAG CGCAG-3'
5.pár	od 2 od 581	5'- CCTGA ACAGT GGAGC AGATG-3' 5'- ATCAG AGCCT TCACT CAGCC-3'
6.pár	od 2758 od 3236	5'- GCTGC CACCT GGAAG ACAAC-3' 5'- CCGTG TCTCC TGTGT CTCCT-3'
7.pár	od 2064 od 2594	5'- GTCAG TGTTA CAGCG CGTCG-3' 5'- CCACA GACTG CAGGA GCCAA-3'
8.pár	od 3097 od 3496	5'- AAGGT GACAT CTGAG GTTCC-3' 5'- AGAAG TCCAG TGGCA AGTAA-3'
9.pár	od 3438 od 4020	5'- TGCTG CTCAC TCATC TCCAC-3' 5'- CACGA TCACT GAGCC ACAGG-3'

Obr. č. 1 Polymorfismus Taq I, amplifikát č. 7, vzorky 1 až 10, vzorky č. 1, 3 – restriční model B; vzorky č. 2, 4 až 10 restriční model A (K – kontrolní vzorek - PCR; M23 – velikostní marker)



Tab. č. 2 Délky amplifikátů a restrikčních fragmentů

Restriktáza	<i>Alu I</i>	<i>Hae III</i>	<i>Hind III</i>	<i>Hpy F31 (Dde I)</i>	<i>Eco 1301 (Sly I)</i>
Cílová sekvence	AG/CT	GG/CC	A/AAGCTT	C/TNA G	C/C TT GG
Název primerů délka amplifikátu	Délka fragmentů bp	délka fragmentů bp	délka fragmentů bp	délka fragmentů bp	délka fragmentů bp
3, 831; 828 bp	225+168+150+135+80+70	300+200+170+158	bez cílové sekvence	300+248+150+70+60	660+168
485, 1153; 668 bp	230+110+90+80	240+195+160	bez cílové sekvence	280+218+170	490+178
936, 1690; 754 bp	500+254	240+120+100	bez cílové sekvence	529+225	395+190+169
1671, 2065; 394 bp	320+40+34	175+104+60+55	bez cílové sekvence	130+90	bez cílové sekvence
2, 581; 579 bp	160+140+70+50	310+200+69	bez cílové sekvence	215+135	bez cílové sekvence
2758, 3236; 478 bp	245+90+80+63	170+155+120+33	bez cílové sekvence	330+90+58	250+228
2064, 2594; 530 bp	280+175+75	230+210	bez cílové sekvence	250+125+75	320+210
3097, 3496; 399 bp	290+85+24	250+149	bez cílové sekvence	210+90+55+44	175+150+74
3438, 4020; 582 bp	350+120	270+180+70+62	bez cílové sekvence	275+200+107	500+82
Restriktáza	<i>Taq I</i>	<i>Bsu 15 I (Cla I)</i>	<i>Eco 47 I (Ava II)</i>	<i>Tru I (Mse I)</i>	<i>Eco 88 I (Ava I)</i>
Cílová sekvence	T/CG A	AT/CG AT	G/GAC C	T/TA A	C/PyCG Pu G
Název primerů délka amplifikátu	délka fragmentů bp	délka fragmentů bp	délka fragmentů bp	délka fragmentů bp	délka fragmentů bp
3, 831; 828 bp	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	570+258	608+220
485, 1153; 668 bp	400+268	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	315+280+73	bez cílové sekvence
936, 1690; 754 bp	390	bez cílové sekvence	405+150+125+74	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence
1671, 2065; 394 bp	315+79	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	294+100
2, 581; 579 bp	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	305+215+59
2758, 3236; 478 bp	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	243+235	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence
2064, 2594; 530 bp	A nebo B*	bez cílové sekvence	330+120+80	bez cílové sekvence	400+130
3097, 3496; 399 bp	399+255+144	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence
3438, 4020; 582 bp	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	bez cílové sekvence	C nebo D**	bez cílové sekvence

* restrikční model A 400+105 bp; restrikční model B 500+400+105

** restrikční model C 500+82 bp; restrikční model D 500+100+82

ASSOCIATION BETWEEN PERILIPIN GENE POLYMORPHISMS AND GROWTH AND MEAT PERFORMANCE IN LARGE WHITE PIGS

Vykoukalová Z.

Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic
zuzana.vykoukalova@o2active.cz

Abstract

Association between two polymorphisms in coding sequence of the porcine *perilipin* gene and meat performance in pigs was performed. The analyzed traits were average daily gain, backfat thickness and lean meat content. 95 Large White gilts were genotyped for *PLIN-Hin1I* and *PLIN-BspLI*. Complete linkage disequilibrium between analyzed polymorphisms was observed; only two haplotypes were found in this population: *PLIN-Hin1I-A - PLIN-BspLI-T (A-T)* and *PLIN-Hin1I-G - PLIN-BspLI-C (G-C)*. Nearby significant difference ($p = 0.0516$) between genotypes *G-C/G-C* and *A-T/A-T* was observed for average daily gain. No significant differences between genotypes were found for backfat thickness and lean meat content.

Key words *perilipin* gene, pig, polymorphism, growth and meat performance

Introduction

Perilipins are the most abundant proteins at the surface of lipid droplets in adipocytes (Egan *et al.*, 1990, Greenberg *et al.*, 1991) and serve important functions in regulating triacylglycerol storage and hydrolysis (Souza *et al.*, 1998; Brasaemle *et al.*, 2000). Perilipin knockout mice are lean and resistant to diet-induced obesity (Martinez-Botas *et al.*, 2000; Tansey *et al.*, 2001). In human, several single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with body weight, obesity risk (Qi *et al.*, 2004a,b) and total cholesterol levels (Yan *et al.*, 2004) were described. Based on these studies, *perilipin* may be a candidate gene for human obesity.

Comparative mapping with human suggests a localization of porcine *perilipin* gene on chromosome 7q12-15, where QTLs for backfat thickness (Malek *et al.*, 2001), ham weight (Milan *et al.*, 2002) and average daily gain (Nezer *et al.*, 2002, Kim *et al.*, 2006) were localized. Due to this fact, *perilipin* gene can be considered as a candidate gene for these traits. Structure and variability of porcine *perilipin* gene was recently analyzed and

a number of SNPs in the coding and non-coding sequence were identified (Vykoukalová and Knoll, 2006). The aim of this study was to determine association between polymorphisms in the coding sequence and growth and meat performance in the Large White pigs.

Material and methods

SNPs analysed in this study were genotyped by PCR-RFLP method according to the standard conditions for the corresponding restriction endonucleases (Table 1). Frequencies of alleles of studied polymorphism were determined in 42 pigs of 4 different breeds: Landrace (13 animals), Large White (14 animals), Duroc (12 animals) and Hampshire (3 animals).

The association between *PLIN-Hin1I* and *PLIN-BspLI* genotypes and meat performance was studied in 95 Large White gilts with records for average daily gain (ADG), backfat thickness (BFT) and lean meat content (LMC). Computation was performed using a mixed linear model in SAS for Windows 8.02 (procedure REML):

$$y_{ijklm} = \mu + PLIN_i + MB_j + YB_k + F_l + M_m + e_{ijklm},$$

where y_{ijklm} is phenotypic value of analyzed trait, μ is a population mean, $PLIN_i$ is the fixed effect of the i^{th} genotype, MB_j is fixed effect of the month of gilt birth, YB_k is fixed effect of the year of gilt birth, F_l and M_m are random effects of the gilt's father and the gilt's mother, respectively. e_{ijklm} is random error effect of each observation. The analyzed traits were ADG, BFT and LMC.

Results and discussion

Six SNPs of the eight formerly described polymorphisms in the coding sequence of the porcine *perilipin* gene (Vykoukalová and Knoll, 2006) are simply tested by the PCR-RFLP method (Table 1). A total of 42 pigs of 4 different breeds were tested for *PLIN-HincII*, *PLIN-Hin1I*, *PLIN-PstI*, *PLIN-MvaI* and *PLIN-BspLI* polymorphisms. Frequencies of alleles are summarized in the Table 2.

Table 1 Polymorphisms detected in the coding sequence of the porcine perilipin gene and restriction endonucleases suitable for their testing by PCR-RFLP method.

exon	polymorphism	feature	RE
2	A/G	Val-Ile	HincII
3	A/G	silent	Hin1I
5	A/C	silent	-
5	A/G	silent	PstI
5	A/G	silent	BfaI
5	C/T	silent	MvaI
6	C/T	silent	BspLI
7	C/T	silent	-

RE – restriction nucleases

Val-Ile - mutation that represents a constitutive substitution of amino acids (Val-Ile) in the protein

Table 2 Frequencies of alleles of PLIN-HincII, PLIN-Hin1I, PLIN-PstI, PLIN-MvaI and PLIN-BspLI polymorphisms in 42 pigs of 4 different breeds.

locus	allele	breed			
		L n = 13	LW n = 14	D n = 12	H n = 3
PLIN-HincII	A	0,00	0,00	0,00	0,00
	G	1,00	1,00	1,00	1,00
PLIN-Hin1I	A	0,5	0,82	0,88	0,67
	G	0,5	0,18	0,12	0,33
PLIN-PstI	A	0,00	0,00	0,00	0,00
	G	1,00	1,00	1,00	1,00
PLIN-MvaI	C	1,00	1,00	1,00	1,00
	T	0,00	0,00	0,00	0,00
PLIN-BspLI	C	0,5	0,18	0,12	0,33
	T	0,5	0,82	0,88	0,67

breed: L – Landrace, LW – Large White, D – Duroc, H – Hampshire; n – number of animals

The *PLIN-HincII*, *PLIN-PstI* and *PLIN-MvaI* polymorphisms were monomorphic in all tested breeds; only alleles *PLIN-HincII-G*, *PLIN-PstI-G* and *PLIN-MvaI-C* were represented. Alleles *PLIN-HincII-A*, *PLIN-PstI-A* and *PLIN-MvaI-T* were detected only in Meishan breed (data not shown). In all tested breeds complete disequilibrium between *PLIN-Hin1I* polymorphism and *PLIN-BspLI* polymorphism was observed; two following haplotypes were detected: *PLIN-Hin1I-A - PLIN-BspLI-T (A-T)* and *PLIN-Hin1I-G - PLIN-BspLI-C (G-C)*. For the association analysis, 95 Large White gilts were genotyped for *PLIN-Hin1I* and *PLIN-BspLI* polymorphisms. Complete linkage disequilibrium was observed also in this population and therefore only two haplotypes were found in following combinations: *G-C/G-C* (44 animals), *G-C/A-T* (40 animals) and *A-T/A-T* (11 animals). Nearby significant difference ($p = 0.0516$) between genotypes *G-C/G-C* and *A-*

T/A-T was observed for ADG. No significant differences between genotypes were found for BFT and LMC. The results of the association analysis are given in Table 3.

Table 3 Association between the *PLIN-Hin1I* - *PLIN-BspLI* genotypes and the growth and meat performance in Large White gilts

trait	<i>PLIN-Hin1I</i> - <i>PLIN-BspLI</i>		
	<i>G-C/G-C</i>	<i>G-C/A-T</i>	<i>A-T/A-T</i>
ADG (g)	494.39 ± 15.45	524.22 ± 10.62	528.59 ± 9.85
BFT (mm)	10.34 ± 0.32	10.02 ± 0.38	9.85 ± 0.60
LMC (%)	59.44 ± 0.60	59.45 ± 0.38	59.08 ± 0.32

ADG – average daily gain, BFT – backfat thickness, LMC – lean meat content; Data are given in LMS ± SE (least-square mean ± standard error)

Conclusion

In this study, two polymorphisms in the coding sequence of the *perilipin* gene in relation to the growth and meat performance in Large White pigs were analyzed and nearby significant association to average daily gain was observed. This result is in a good agreement with the hypothesis, that the porcine *perilipin* gene is a candidate gene for this trait. Subsequent association studies with larger sample sizes or another breed will be necessary to confirm the association between the *perilipin* gene and ADG.

Acknowledgements

This work is supported by the Czech Science Foundation No 523/06/P395.

References

- Brasaemle, D. L., Rubin, B., Harten, I. A. et al. (2000) *J. Biol. Chem.* 275(49):38486-38493
- Egan, J. J., Greenberg, A. S., Chang M.-K. & Londos, C. (1990) *J. Biol. Chem.* 263(31): 18769-18775
- Greenberg, A. S., Egan, J. J., Wek, S. A. et al. (1991) *J. Biol. Chem.* 266(17): 11341-11346
- Kim, Ch.W., Hong, Y. H., Yun, S. et al. (2006) *J. Reprod. Dev.* 52(2): 229-237
- Malek, M., Dekkers, J. C. M., Lee, H. K. et al. (2001) *Mamm. Genome* 12: 630-636
- Martinez-Botas, J., Anderson, J. B., Tessier, D. et al. (2000) *Nature Genet.* 26: 474-479
- Milan, D., Bidanel, J. P., Iannuccelli, N. et al. (2002) *Genet. Sel. Evol.* 34(6): 705-728
- Nezer, C., Moreau, L., Wagenaar, D., Georges, M. (2002) *Genet. Sel. Evol.* 34(3): 371-387
- Qi, L., Corella, D., Sorlí, J. V. et al. (2004a) *Clin. Genet.* 66: 299-310
- Qi, L., Haiqing, S., Larson, I. et al. (2004b) *Obesity Res.* 12(11): 1758-1765
- Souza, S. C., Moitoso de Vargas, L., Yamamoto, M. T. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273(38): 24665-24669
- Tansey, J. T., Sztalryd, C., Gruia-Gray, J. et al. (2001) *PNAS* 98(11): 6494-6499
- Vykoukalová, Z., Knoll, A. (2006) *Acta Fyotech. Zootech.* 9(suppl): 77-80
- Yan, W., Chen, S., Huang, J. et al. (2004) *Obes. Res.* 12(11): 1733-1737

EFFECT OF THE POLYMORPHISM OF PROLACTIN RECEPTOR GENE (*PRLR*), FOLLICLE-STIMULATING HORMONE BETA SUBUNIT GENE (*FSHB*) AND ESTROGEN RECEPTOR GENE (*ESR*) ON LITTER SIZE IN CZECH LARGE WHITE SOWS

Filkuková J.*, Divácká L., Vrtková I.

*Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Mendel University of Agriculture and Forestry Brno, Zemedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic
irevav@mendelu.cz*

The effect of the candidate genes for reproduction, the prolactin receptor gene (*PRLR*), the follicle-stimulating hormone beta subunit gene (*FSHB*) and the estrogen receptor gene (*ESR*), on litter size in Czech Large White sows have been investigated. For a total number of 219 sows, the polymorphism in *PRLR*, *FSHB* and *ESR* genes was detected using PCR-RFLP method. These reproductive traits were investigated: total number of piglets born (TNB), number of piglets born alive (NBA) and number of piglets weaned (NW). In the studied population, the favorable allele for litter size in *PRLR*, *FSHB* and *ESR* genes was *A* allele, *B* allele and *C* allele, respectively.

Section II: **GENETICS AND OTHER ANIMALS' BREEDING**

THE GENETIC PARAMETERS FOR REPRODUCTION TRAITS OF CHINCHILLA (CHINCHILLA LANIGER)

Całka M.*, Gorajewska E., Filistowicz A.

*Institute of Animal Breeding, Wrocław University of Environmental and Life Sciences,
Poland*

Abstract

The aim of the study was to analyze the chosen traits of reproductive performance of chinchilla (number of born alive and number of reared in the studied population). The material for study was derived from A.C.F. Centrum Hodowli Zarodowej Szynszyli in Nowogard and Chinchilla farm in Myślenice. The data studied were collected in 1991-2001. The statistical analyses of the data were done using the SAS system. The number of chinchilla born alive was satisfactory, reaching on average more than 2 pupils per female. In the years 1992, 1994, 1996 the number of born alive was lower. The number of born alive was comparable to the number of chinchilla reared. The number of born alive and the number of chinchilla reared were compared. 90% of chinchilla's offspring survived in the rearing period. The number of born alive and the number of reared in the nursing period per female, was lower in autumn months (since September to November). The influence of daylight on chinchilla reproduction was confirmed.

Key words chinchilla, reproduction, genetic parameters for reproduction

THE EFFECT OF FINNISH FOX GENES ON REPRODUCTION AND PRODUCTION TRAITS IN POLISH ARCTIC FOX POPULATION

Gorajewska E.*¹, Przysiecki P.², Całka M.¹, Filistowicz A.¹

¹*Institute of Animal Breeding, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland*

²*Institute of Agricultural, State School of Higher Vocational Education in Leszno, Poland*

Abstract

The aim of research was evaluating the finnish fox genes effects on reproductive and productive traits in national arctic foxes population. Information about reproductive and coat characteristics was collected from 1072 foxes kept in commercial farms laying in Wielkopolska province during 2000-2005 years. There were considered such traits as age-season, year of birth, sex and finnish fox genes influence in statistical analysis. Reproduction traits in group of males were duration of mating season and number of mates during it, in females group main traits were number of birth and weaned progeny. Evaluation of coat traits was performed by judge, according to accepted grading model in 20-grade scale.

In both groups (males, females) age-season and year of birth substantially influenced reproductive and productive traits. 2 – 3 years old females were more prolific than older animals. During mating season males from group containing over 50% of finnish foxes genes mated females more often. Females with over 50% of finnish fox genes gave more progeny. Body size and conformation, colour purity, coat quality and total score in animal group containing over 50% of finnish fox genes (both males and females) were higher than in group containing rest of animals. The differences were statistically significant.

Key words arctic fox, finnish fox genes, reproductive and productive traits

DETEKCE FRAGMENTŮ DNA Z KRMIV OBSAHUJÍCÍCH GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY V KRVÍ BROJLERŮ

DETECTION OF DNA FRAGMENTS FROM FEED CONTAINING GENETICALLY MODIFIED ORGANISMS IN BLOOD OF BROILERS.

Hanusová L.*, Vrabcová P., Řehout V.

*Katedra genetiky, výživy a šlechtění zvířat, ZF, Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika,
hanusova@zf.jcu.cz*

Abstract

The aim of this study is to confirm or to refute possible transfer of transgene from diet containing genetically modified organism in blood of broilers. Broilers were fed with diets containing Roundup Ready soybean and Bt maize (MON810). DNA was isolated from the whole blood of these broilers. PCR using primers for growth hormone was performed as control of isolation. Then samples were submitted to PCR for detection of fragments of lectin genes from soya and HMG gene from maize. Fragments of soya DNA and maize DNA in the blood were detected. Subsequently, the detection of specific transgene of RoundupReady soya and Bt maize (MON810) in blood samples will be carried out.

Key words broilers, Roundup Ready soya, Bt maize, DNA

Introduction

Recently, the need for more and better feed and food is getting important question for researchers. It has led to development of new techniques, which improve properties of plants. Genetically modified organisms (GMO) are results one of these techniques - genetic modification.

Genetically modified organisms (GMO) are understood to be plants, microorganisms or animals into which foreign deoxyribonucleic acid (DNA) coding one or more new genes has been integrated (Flachowsky et al., 2004). It means, it goes about target change of genetic material (structure) in a way that is unavailable by natural recombination. This provides to produce organism with required properties, e. g. tolerance to herbicides, insect or conformation to unfavourable environmental conditions.

Extension of GMO in world bears questions of their safety. Potential risks suggested to be associated with use of GM are unexpected gene effects, allergenic potential, antibiotic resistance, gene flow (Bertoni and Marsan, 2005). The last named, gene flow, belongs to one of the most discussed topics in this sphere. It is necessary to recommend, that intake of DNA or DNA fragments is usual for millions of years. Flachowsky et al. (2004) observe that the amount of DNA absorbed with food varies between 0,1 and 1 gram per day by humans and includes fragments of plant and animal genes, degraded to different degrees, as well as bacterial DNA. However, DNA and DNA fragments are degraded by gastric acid and various enzymes in digestive tract. Of course, the possibility of absorption intact fragments cannot be excluded (Bertoni and Marsan, 2005). Jonas et al. (2001) confirm that the likelihood of transfer and functional integration of DNA from ingested food by gut microflora and/or human cells is minimal. The same findings put Aumaitre (2004), who reviewed transgene transmission in animal through gut in low amount. In his opinion, the behavior and destiny of the exogenous gene (recombinant DNA) closely parallels that of plant single copy genes introduced with feed. Their destiny is degradation in gut (Chowdbury et al., 2003). Einspanier et al. (2001) describes transfer of nontransgenic plant genomic DNA into organs of broilers, whereas sequences of the transgene were not identified. Some studies proved presence of recombinant DNA in gut content of pigs fed by Bt maize (Reuter and Aulrich, 2002) or in ruminal fluid of sheep fed maize grains (Duggan et al., 2003).

Among the most important GM crops, grown in the Czech Republic, belong Roundup Ready soybean and Bt maize. Roundup Ready soybean is GMO tolerant to herbicide, especially herbicides with active substance glyphosphate. Glyphosphate blocks enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) from plants. After treatment with glyphosphate-herbicide, plant isn't able to produce shikimate and perish. Roundup Ready soybean has incorporated 5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from *Agrobacterium* sp., which has low ability to bind glyphosphate. So plants remain able to produce shikimate in presence of glyphosphate and are tolerant to herbicide with glyphosphate (Petr, 2005).

Bt maize represent insect-tolerant GMO. Reason is incorporation of Bt gene from common soil bacterium *Bacillus thuringiensis* in it's genome. Bt gene is coding a crystalline protein (Cry1A)b)). This protein has a specific activity against pests, especially from *Lepidoptera* and *Coleoptera* sp. The insecticidal action of the Cry1A(b)

protein is due to the presence of a special binding site in the epithelial membrane of the digestive tract of susceptible insects. After uptake of Cry1A(b), the gut membrane is damaged with severe physiological alternations, especially in the main transport mechanisms. In other organisms, endotoxins produced by *Bacillus thuringiensis* are normally digested like all other proteins and, therefore, do not induce damage (Rossi et al., 2005).

Material and methods

Material

For studies of transfer of genes from GMO to blood of broilers Roundup Ready soybean line GTS 40 - 3 - 2 and Bt maize line MON810 were used. The broilers were assigned to 4 treatment groups, fed by different diet. Diet for the first group contained Bt maize MON810, for the second group Roundup Ready soybean and for the third group both, Roundup Ready soybean and Bt maize MON 810. The fourth group was control with GMO free diet. Ten broilers were selected from each group and blood samples of these broilers were collected. Experiment was repeated threetimes.

Isolation of DNA

Genomic DNA was isolated from whole blood following NucleoSpin Blood (50 prep.) kit (Macherey-Nagel), according to manufacturer's protocols. Two controls of isolation were carried out - by electrophoresis and by PCR. Standard electrophoresis for genome DNA was used, in 1,5% agarose gel containing ethidium bromide. Second control was performed by PCR for chicken growth hormone gene. Primers used to control PCR were: 5'-ATC CCC AGG CAA ACA TCC TC-3'(forward) (GCH1F) and 5'-CCT CGA CAT CCA GCT CAC AT-3'(reverse) (GCH1R). After presoaking 4 min. at 94°C, 35 PCR cycles were carried out each consisting of 30 s at 94°C, 120 s at 60°C, and 90 s at 72°C (Kuhlein et al., 1997).

Detection of fragments of DNA

Commercial kits for detection of GMO *GMOIdent* Roundup Ready™ Soy and *GMOIdent* MON810™ Corn (Eurofins - Gene Scan) were used. Each kit contains premastermix for specific transgene, RRS for Roundup Ready soybean and YG-IR for Bt maize, and premastermix for control genes, lectin by soya and HMG gene by maize.

First, PCR for control genes was performed. Reaction mixture was allowing: 19,9 μ l premastermix with primers for control genes, 1 μ l primers GCH1R and GCH1F each, 2 μ l dNTP's, 2 μ l Taq and 2 μ l DNA. PCR consists of 2 min. presoaking at 94°C and 50 cycles: 25 s at 94°C, 30 s at 62°C and 45 s at 60°C, following by 3 min. at 72 °C. PCR products were analysed by electrophoresis in 2% agarose gel containing ethidium bromide. Positive and negative control were carried out.

There was used premastermix for specific transgene in PCR reaction mixture for detection of specific transgene. All others conditions were the same like by PCR for control genes.

Results

The DNA isolation from blood gave good yield and quality. No difference in genomic DNA isolation were observe between samples from control and other three groups.

The genomic DNA isolated from the samples was used as template in PCR reactions. The first PCR was control reaction_with primers for chicken growth hormone. This PCR was used for confirmation of ability of isolated DNA to produce PCR product. PCR product has length about 1500 bp. All 120 samples of genomic DNA react positive on PCR with primers GCH1R and GCH1F (Fig. 1).

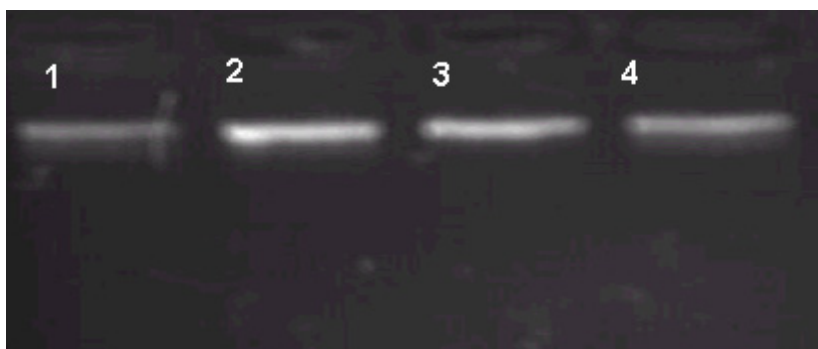


Fig.1. PCR with primers for chicken growth hormone gene (GCH1R and GCH1F) - lines 1, 2, 3 and 4. PCR product was detected by all samples.

As mentioned above, the possibility of transfer of plant genes from feed into blood of broilers exists. We also needs to distinguish plant PCR product and PCR product from chicken DNA. So-called PCR with dual pairs of primers was used like control PCR. Difference between classical PCR and applied PCR is in composition of reaction mixture. Reaction mixture for PCR with dual pairs contains one pair of primers more then

classical PCR. Here, it has consisted from mastermix with primers for control genes (lectin for soybean and HMG gene for maize) and primers for chicken growth hormone gene for detection of chicken DNA. Control PCR for lectin gene from soybean and HMG gene from maize were performed by fifty-seven samples since yet. Fragments of DNA from soybean in blood of broilers was found in eleven samples. Control PCR assigned to four possible transfers of DNA fragments from maize into blood of broilers (Fig. 2). These results corresponded to Einspanier et al. (2001). Transfer of nontransgenic plant genomic DNA is usual phenomenon.

Further experiments will be done. First, it is necessary to end screening of all 120 blood samples on occurrence of plant DNA from feed. Then possible transfer of transgenes from Roundup Ready soybean and Bt maize from feed into blood and other organs of broilers will be studied.

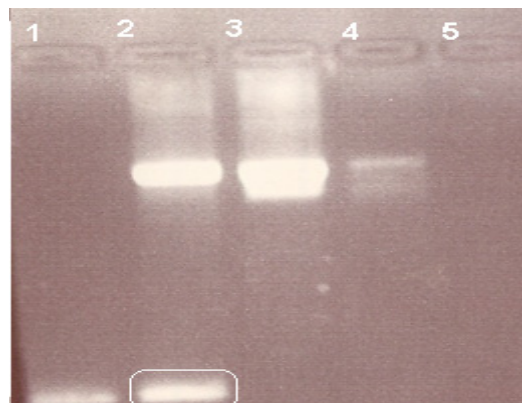


Fig.2. Control PCR with dual pairs of primers. Line 1 (sample GK2) is positive control (with genomic DNA from soybean), line 5 is negative control (without DNA), lines 2, 3 and 4 are PCR products with DNA from blood. Marked band is PCR product with DNA fragment of soybean. The other bands represent PCR product of chicken growth hormone gene.

Conclusion

Blood samples from 120 broilers, fed with feed containing GMO, were collected. Fifty-seven samples were subjected to PCR for control of transfer of genes to blood. Eleven samples were positive to transfer of lectin gene from Roundup Ready soybean and four samples to transfer of HMG gene from Bt maize. Possible transfer of transgenes from Roundup Ready soybean and Bt maize from feed into blood and other organs of broilers will be studied.

Acknowledgements

This work was financially supported by MSM 06/3/2.

Literature

- Aumaitre, L.A. *Italian Journal of Animal Science* 3, 2004: 107 - 121.
- Bertoni, G., Marsan, J.A. *Veterinary Research Communications* 29 (Suppl. 2), 2005: 13 - 18.
- Chowdbury, E.H. et al. *Journal of Animal Science* 81, (2003): 2546 - 2551.
- Duggan, P.S. et al. *British Journal of Nutrition* 89, 2003: 159 - 166.
- Einspanier, R., et al. *European Food Research and Technology* 212, 2001: 129 - 134.
- Flachowsky, G. et al. *Archives of Animal Nutrition* 59 (1), 2005: 1 - 40.
- Jonas, D.A. et al. *Annals of Nutrition and Metabolism* 45, 2001: 235 - 254.
- Petr, J. *Úroda* 53 (1), 2005: 34 - 37.
- Reuter, T., Aulrich, K. *European Food Research and Technology* 216, 2002: 185 - 192.
- Rossi, F. et al. *Poultry Science* 84 (7), 2004: 1022 - 1030.

**GENETICKÁ ANALÝZA ONEMOCNĚNÍ A VÝVOJOVÝCH VAD
U BEZSRSTÝCH PLEMEN PSU**

**GENETIC ANALYSE OF DISEASE AND EVOLUTIONARY DEFECT IN
HAIRLESS BREED DOGS**

Nesvadbová M.*

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika; michi.m@seznam.cz

Abstract

Content of this work is genetic anylse of disorders and evolutionary diseases in hairless breeds that are bred in Czech Republic and that in Peruvian hairless dog and Chinese crested dog. There were determined occlusion disorders, oligodontia, individuals with dry eye, umbilical and inguinal hernia, stillborn puppies and postnatal mortality in both breeds. In Peruvian hairless dog there were further determined evolutionary anomalies of anus and degenerative disorders cerebelum and in Chinese crested dog blue eye coloring, opened fontanell, congenital deafness and missing auditory passage.

Klíčová slova Psi, dědičnost, onemocnění, vývojové vady, peruánský naháč, čínský chocholatý pes.

Úvod

Dědičná a onemocnění a vývojové vady jsou problémem všech plemen psů současnosti, který sebou přinesl proces domestikace. Oberbauer a Sampson (2001) uvádí, že u psa existuje více než 370 různých onemocnění, které vznikají jako následek dědičnosti mutovaných genů nebo se u nich věří, že dědičnost zde hraje významnou roli. U více než 200 genetických onemocnění psa je předpokládána jednoduchá mendelistická dědičnost a z toho přibližně 70% je zděděno autozomálně recesivně (Brooks a Sargan, 2001).

V České republice jsou chována dvě bezsrstá plemena: peruánský naháč a čínský chocholatý pes. Mezinárodní kynologická organizace (FCI) v současné době uznává ještě jedno bezsrsté plemeno, a to mexického naháče. Tito psi se vyskytují ve dvou varietách: osrstěné a bezsrsté. Jedince osrstěné variety povoluje standard používat pouze v chovu čínského chocholatého psa. Chybění srsti u těchto plemen je zděděna jako autozomální dominantní vlastnost označena jako Hr. U homozygota je alela Hr prenatalně letální,

proto je neosrstěná varieta heterozygot Hrhr (Mecklenburg, 2006), osrstěný jedinec je recesivní homozygot hrhr. Gen, který je zodpovědný za chybění srsti u těchto psů, nebyl doposud objeven, prokázána je pouze souvislost chudozubosti s dominantním genem pro lysost (Brychtová, 1999).

U obou plemen byly zjištěny vady skusu, oligodoncie, jedinci se suchým okem, pupeční a tříselná kýla, mrtvě narozená štěňata a postnatální mortalita. U peruánského naháče byly dále zjištěny vývojové anomálie anu a degenerativní onemocnění mozečku, u čínského chocholatého psa modré zbarvení oka, otevřená fontanela, vrozená hluchota a chybějící zvukovod.

Materiál a metodika

Základním zdrojem dat, pro sledování výskytu vrozených vývojových vad a onemocnění, byly kontroly vrhů a údaje, které byly poskytnuty chovateli. Kontroly vrhů jsou pro chovatele povinné, jsou evidovány poradci chovů daného plemene a pravidelně zveřejňovány ve Zpravodajích, které vydává Klub chovatelů naháčů. Analýza zahrnuje data od roku 1999 do roku 2006. U plemene peruánský naháč bylo posouzeno celkem 307 a u plemene čínský chocholatý pes 1776 narozených štěňat.

Základem pro studium výskytu dědičného defektu nebo choroby v populaci byla metoda genealogického studia a kreslení genealogického schématu, kterou popisuje Dostál (1995). Sledování má být co nejúplnější, což znamená, že se musí sledovat všichni příbuzní postiženého jedince bez ohledu na to, zda byli používáni k další reprodukci nebo ne.

Posuzovat způsob dědičnosti daného onemocnění lze podle charakteristické rysů, které má dědičné onemocnění a vývojová vada.

Autozomální recesivní dědičnost

- Mutovaný gen je ne jednom z 38 párů autozómů.
- Postižení psi musí být homozygotní pro tento mutovaný gen.
- Každý rodič postiženého potomstva musí být heterozygotní.
- Předpoklad inklinuje k přeskokování generací, dokud nejsou spáření dva heterozygoti, kteří produkují postižené jedince.

- Heterozygoti budou plodit v průměru 25% postižených, 50% heterozygotních a 25% zdravých jedinců.
- Samice i samci jsou postiženi stejně.

Autozomální dominantní dědičnost

- Mutovaný gen je ne jednom z 38 párů autozómů.
- Mutovaný gen je zpravidla přítomen v heterozygotním stavu, méně běžný je ve stavu homozygotním.
- Alespoň jeden rodič postiženého potomstva musí být postižen onemocněním (pokud není, předpokládá se neúplná penetrace nebo nová mutace).
- Zpravidla jsou postiženy všechny generace.
- Za předpokladu, že postižená samice nebo samec je heterozygotní, bude v průměru postiženo 50% potomstva.
- Samice i samci jsou postiženi stejně.

Recesivní dědičnost vázaných na pohlaví

- Přibližně 50% samčího potomstva bude postižena, samice jsou přenašečkami onemocnění.
- Charakteristický je přenos onemocnění: klinicky normální samice produkují postižené samce, kteří postupně produkují klinicky normální samice přenašečky.
- Klinicky postižení samci předávají mutovaný gen všem svým dcerám, ale žádnému synovi.
- Pokud jsou postiženi oba rodiče, budou postiženi všichni potomci.

Polygenní dědičnost

- K postižení potomstva musí přispět jedním nebo více geny samice i samec, ale tato účast nemusí být bezpodmínečně stejná.
- Neexistují žádná procenta v rodokmenech, které můžeme předpovědět, protože nevíme, kolik je zapojenu genů.
- Postižená jsou obě pohlaví, ale čísla se nemusí rovnat.

- Stav se obvykle jeví jako dědičný z matčiny strany (Oberbauer a Sampson, 2001).
- Obvyklá je nízká dědičnost onemocnění (Brooks a Sargan, 2001).

Ke statistickému zhodnocení rodokmenů byla využita segregáční analýza. Počet postižených potomků značíme n_d a n značí celkový počet potomků. Pravděpodobnost Θ postižení potomka pro daný rodičovský pár se nazývá segregáční pravděpodobnost. Odhad Θ spočteme jako $\Theta = n_d / n$ (Zvárová, 2002).

Výsledky a diskuse

Vady skusu

Dostál (1995) uvádí, že předkus se vyskytuje jen zřídka a jeho genetická kontrola není podrobně prozkoumána. U peruánského naháče byl zjištěn předkus u 8,14% populace narozených štěňat. Určená segregáční pravděpodobnost 0,25 a stejné postižení psů a fen (12 psů, 12 fen) odpovídá autozomálně recesivnímu způsobu dědičnosti. Vysoké procento postižení je dáno faktem, že první pár peruánského naháče v ČR, na kterém stojí náš chov, byli sourozenci a oba měli předkus. Tato vada se objevuje také v chovu čínského chocholátého psa, postiženo je 3,04% narozených štěňat. Ovšem zde neodpovídá segregáční pravděpodobnost (0,1888) a nestejně postižení psů a fen (25 psů, 29 fen) autozomálně recesivnímu způsobu dědičnosti. Nízký segregáční koeficient lze vysvětlit skutečností, že předkus není vždy vrozené vada, ale chovatelé ho objeví v některých případech až v pozdějším věku a po ukončeném růstu lebky psa. A pokud chovatelé nepřiznají předkus ve svém chovu, jsou data neúplná a zkreslující.

U plemene čínský chocholatý pes se u 13 štěňat objevil podkus a celkové postižení populace narozených štěňat je 0,73%. Výskyt podkusu je podmíněn homozygotním stavem recesivní alely genu, která je označována „sm“, podle anglického názvu short mandible (Dostál, 1995). Stejně tak Šiler a Fiedler (1978) uvádějí, že zkrácení spodní čelisti vyvolává gen recesivního charakteru. Ve sledované populaci mělo předkus 9 psů a 4 feny a určená segregáční pravděpodobnost je 0,2955. Důvod vyšší segregáční četnosti a různé postižení obou pohlaví je zřejmě dáno skutečností, že polovina rodičů postižených jedinců jsou importováni, a tak není výskyt podkusu u jejich příbuzných znám.

Jak s výskytem předkusu, tak podkusu má spojitost skus klešťový. Objevuje se v liniích, kde jsou postiženi jedinci předkusem i podkusem, ale také se jedinci s tímto

skusem objevují jako rodiče postižených potomků, protože standard povoluje bonitovat jedince s klešťovým skusem. Způsob dědičnosti nelze určit, protože často chovatelé neznají stav chrupu u jedinců, kteří nebyli zbonitováni a ačkoliv se tento typ skusu objeví u štěněte, není pravidlem, že po výměně mléčných zubů za trvalé zůstane nadále skus klešťový.

Oligodontie (chudozubost)

U bezsrstých plemen se předpokládá spojitost chudozubosti s dominantním genem pro lysost. Od roku 2002 je při bonitaci zaznamenáván počet řezáků a špičáků v čelisti. Standard plemen požaduje všechny špičáky a řezáky a povoluje absenci premolárů a molárů.

U peruánského naháče odpovídá standardu 6 jedinců, což je 10,71% zbonitovaných bezsrstých jedinců. U čínského chocholatého psa nechybí řezáky ani špičáky 63,72% zbonitovaných jedinců, z nichž 21,24% je bezsrsté a 42,48% osrstěné variety, což dokazuje pozitivní vliv na používání osrstěné variety v chovu.

Suché oko

Ačkoliv Herreda (2006) uvádí, že u naháčů je výrazná liniová incidence (nemocnost) suchého oka, ve vrzích peruánského naháče se tato vada vyskytla pouze jednou, a to v roce 2004. Tento jedinec je samec variety bezsrsté. Ve vrzích čínského chocholatého psa se tato vada vyskytla pouze dvakrát, a to v roce 1999. Tito jedinci jsou samci variety bezsrsté, kteří nejsou příbuzní. V chovatelských stanicích, odkud tito psi pochází, se suché oko později neobjevilo, nelze tedy považovat tuto vadu za dědičnou.

Kýla

Pupeční kýla se objevuje u obou plemen, avšak nejedná se o kýlu vrozenou. Kýla se objevuje ve většině případů 3-6 týden po narození štěněte. V populaci štěňat peruánského naháče bylo takto postiženo 14,77%, v populaci čínského chocholatého psa 2,82%. Dostál (1995) uvádí, že břišní kýla je kontrolována několika recesivními polygeny, čemuž ale neodpovídá určená segregáční pravděpodobnost (peruánský naháč 0,3488; čínský chocholatý pes 0,1974). Pupeční kýlou jsou častěji postiženi bezsrstí jedinci (peruánský naháč: 34 bezsrstých, 5 osrstěných jedinců; čínský chocholatý pes: 39 osrstěných, 11 bezsrstých jedinců). Výskyt pupeční kýly lze pozorovat v určitých liniích, ale na jejím vzniku se výrazně podílí prostředí. Možný důvod vzniku kýly po porodu, je poškození pevnosti břišní stěny matkou štěňat při překousnutí pupeční šňůry, které je zkomplikováno chudozubostí. Chovatelé uvádí, že pokud pupeční šňůru odstraňují sami,

je výrazně snížen výskyt kýly v jejich vrzích. Druhý možný důvod poškození pevnosti břišní stěny štěňat je v období, kdy začínají prozkoumávat své okolí a překonávají různé překážky. Lze tedy předpokládat dědičnost kvality a dostatečnosti obnovy kolagenu, který je zodpovědný za kvalitou pojivových vrstev břišní stěny, jak uvádí Novotný (2004) a potvrdit nesporný vliv kombinace genetických faktorů s vlivem prostředí (Svoboda *et al.*, 2001).

Tříselná kýla se objevila u peruánského naháče jednou, u čínského chocholatého psa ve třech případech. Příbuznost mezi jedinci není žádná a ani v dalších vrzích rodičů postižených potomků se neobjevila, proto tříselnou kýlu nelze považovat za dědičnou vadu.

Vývojové anomálie anu

U peruánského naháče byla zjištěna čtyři štěňata s uzavřeným konečníkem. Tito jedinci jsou příbuzní, bohužel informace, zda se u ostatních příbuzných vrhů také tato vada objevila, nebyla chovateli poskytnuta. Určená segregační pravděpodobnost 0,2352 neurčuje jednoznačně způsob dědičnosti a při neúplném počtu zjištěných jedinců nelze tyto data považovat za prokazatelná.

Degenerativní onemocnění mozečku

U jedné feny byly zjištěny poruchy koordinace, celotělový třes, mírná ataxie hrudních končetin. Tento stav se projevil až ve stáří jednoho roku. Ošetřující veterinář určil jako diagnózu degenerativní onemocnění mozečku, jejíž přesné určení je možné pouze histopatologickým vyšetřením. Podobné onemocnění bylo zjištěno i u jiných plemen psů, O'Brien (2005) popsal onemocnění s podobnými symptomy u čínského chocholatého psa. Toto onemocnění však nebylo potvrzeno u příbuzných jedinců této feny, proto se pravděpodobně jedná o náhodnou mutaci.

Modré zbarvení oka

Modře zbarvená duhovka se objevuje u plemene čínský chocholatý pes. Projev této vady je velmi variabilní. Modře zbarveno může být jak jedno oko, tak oči obě. Lze se také setkat pouze s modrým okružím oka, které může být zbarveno zcela nebo z určité části. Dále se objevují modré výseče v oku nebo je duhovka zcela modrá. Modré zbarvení očí se vyskytuje v určitých liniích, což dokazuje dědičnost této vady. Vypočítaná segregační pravděpodobnost je 14,18%. Vzhledem k těmto skutečnostem a vzhledem k vysoké variabilitě znaku lze usuzovat na vadu, která je kontrolována více recesivními geny. Podle chovatelů se u takto postižených jedinců neobjevují žádné jiné vady, jako například

hluchota. Výskyt sterility nelze posoudit, jelikož chovatelé požadují od budoucích majitelů kastraci těchto jedinců, aby bylo zamezeno další šíření vady v chovu. Jedná se tedy pouze o heterochromii (nestejně zbarvení oka), které je způsobeno nižším obsahem melaninu v duhovce oka. Studie ukazují, že hnědá duhovka obsahuje více melaninu než duhovka modrá (Wielgus a Sarna, 2005).

Otevřená fontanela

Fontanela (lupínek) je vazivová destička mezi lebečními kostmi. Umožňuje pohyblivost příslušných kostí a změnu tvaru hlavičky během porodu (Vokurka a Hogo, 2005). Svoboda *et al.* (2001) řadí perzistující fontanelu mezi nejčastější vrozené vývojové vady, která postihuje nejčastěji brachycefalická trpasličí plemena. Pulling (1952) popisuje u štěňat kokršpaněla nesrostlé lebeční kosti. Měkká místa na lebce avšak nesrostla, ale postupně se zvětšovala a štěně nakonec uhynulo. Dědičnost tohoto defektu lebky je považována za recesivní.

Otevřená fontanela u štěňat je různě velká, většinou se velikost pohybuje v rozmezí 0,1-1 cm. Během vývinu fontanela zcela sroste a nezpůsobuje žádné zdravotní problémy. Ve sledovaném období se tato vada vyskytla u 4,11% narozených štěňat. Vypočítaná segregáční pravděpodobnost 0,2536 (25,36%) odpovídá autozomálně recesivní dědičnosti. Postižení jsou častěji bezsrstí jedinci a u samic se otevřená fontanela vyskytuje častěji než u samců (40 fen a 30 psů), ale v těchto vrzích je procentuální poměr pohlaví samců k samicím narozených štěňat 47:53.

Vrozená hluchota a chybějící zvukovod

Vrozená hluchota, která má spojitost s bílým osrstěním byla zjištěna u dvou fen. Tyto feny byly po narození bílé s černým znakem a hluchota je jednostranná. Ve vrhu, kde se narodila jedna z postižených fen, bylo zjištěno také modré zbarvení oka, což dokazuje spojitost s nedostatkem melanocytů, způsobující hluchotu a které tvoří melanin důležitý k pigmentaci oka, kůže i srsti. Lze předpokládat, že tato vada bude v populaci rozšířenější, protože u jednostranné hluchoty často chovatelé netuší, že jejich pes je touto vadou postižen.

U dvou bezsrstých psů byl zjištěn chybějící zvukovod a málo vyvinutý boltec pravého ucha. Tito jedinci jsou postiženi hluchotou jednostranně. Zbarvení prvního psa je šedočernobílé, druhý pes má bílou srst s plavými znaky. Tito jedinci jsou příbuzní. Prarodiče jak ze strany matky, tak ze strany otce u prvního psa, se objevují jako

praparodiče u druhého postiženého jedince, postižení v těchto liniích není známo. Lze tedy předpokládat dědičnost této vady. Vypočítaná segregační pravděpodobnost 9,09% naznačuje polygenní dědičnost této vady.

Mrtvě narozená štěňata a postnatální mortalita

Mrtvě narozená štěňata a jejich úhyn po porodu není ojedinělý jev u bezsrstých plemen. Avšak sledování, popř. zjištění nějakého způsobu dědičnosti je nemožné, protože většina chovatelů tyto úhyny nepřiznávají u kontrol vrhů a většinou ani sami nemají dokonalý přehled o úmrtích ve vrzích jejich chovatelské stanice.

Příčinou mrtvě narozeného štěněte nebo jeho úhynu po porodu, může být dominantní alela lysosti Hr, která je letální a je spojena s abnormalitami jícnu a lebky (Sponenberg, 1988). Ale nelze takto vysvětlit úhyn osrstěných jedinců a úhyn bez zjevných příčin, což napovídá i o jiném důvodu této mortality. Podle chovatelů štěňata po porodu přestanou sát mléko, schoulí na kraji a po krátké době uhynou. Příčina těchto úmrtí veterinárním lékařem nebyla určena. Může být spojena se sníženou imunitní odpovědí a lymfatickou vyčerpaností brzlíku a sleziny, jak uvádí Gough a Elison (2004), ale nelze vyloučit ani herpesvirovou infekci, díky které hynou sající štěňata, ačkoliv jejich rodiče jsou klinicky zdraví. Protože důvod úhynu štěňat nebyl chovateli nikdy zjištěn, tato otázka zůstává otevřena, stejně jako otázka dědičné predispozice.

Závěr

Zvířata v zajetí jsou selektována člověkem, a to podle kritérií, které jsou nejžádanější a nejpřitažlivější z lidského pohledu. Do chovu jsou pak psi zařazováni především podle exteriérových znaků. Ovšem krásný pes nemusí vždy znamenat zdravý pes. A je-li takový jedinec nositelem nějaké dědičné vady nebo onemocnění, následuje její rozšíření v populaci. Přes veškeré přednosti v určitých znacích, není jedinec s jakýmkoliv dědičným onemocněním správným představitelem plemene a neměl by být využíván v chovu. V neposlední řadě by se nemělo opomíjet na evidenci výskytu vrozených vývojových vad a onemocnění u plemenných zvířat a jejich potomků, který je součástí kontroly a dědičnosti zdraví.

Literatura

- BROOKS, M., SARGAN, D., R. Genetics Aspect of Disease in Dogs. In *The Genetics of the Dog*. CABI Publishing, 2001. s.191-266. ISBN 0 85199 520 9.
- DOSTÁL, J. Chov psů. *Genetika v kynologické praxi*. České Budějovice: DONA, 1995. s. 206. ISBN 80-85463-58-X.
- GOUGH, A., ALISON, T. *Breed Predispositions to Disease in Dog and Cats*. Blackwell Publishing, 2004. s. 235. ISBN 1-4051-0748-0.
- HERRERA, D. Keratokonjunktivitis sicca psů. *Přel. D. Lonský. Pes přítel člověka*, 2006, roč. 51, č.5, s. 10. ISSN 0031-5074.
- OBERBAUER, A., M., SAMPSON, J. Pedigree Analysis, Genotype Testing and Genetics Counselling. In *The Genetics of the Dog*. CABI Publishing, 2001. s.461-485.
- O'BRIEN, D.,P., JOHNSON, G., S., ROBERT, D., S., SHAHNAWAZ, K., COATES, J., R., GAYLE, C., J., TAYLOR, J., F. Genetic Mapping of Canine Multiple System Degeneration and Ectodermal Dysplasia Loci. *Journal of Heredity*, 2005, vol. 96, no. 7, s. 727-734.
- PULLING, T. Inheritance of a skull defect in Cocker Spaniels. *The Journal of Heredity*, 1952, vol. 43, s.97-99.
- SPONENBERG, D.P., SCOTT, E., SCOTT, W. American Hairless Terriers: A Recessive Gene Causing Hairlessness in Dog. *The Journal of Heredity*, 1998, vol. 79, no. 1, s.1.
- SVOBODA, M., SENIOR, D. F., DOUBEK, J., KLIMEŠ, J. *Nemoci psa a kočky. II.díl*. Brno: Noviko, a.s., 2001. s. 1019-2038. ISBN 80-902595-3-7.
- ŠILER, R., FIEDLER, J. *ABC genetiky drobných zvířat*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství, 1978. s. 311. ISBN 07-048-78.
- VOKURKA, M., HUGO, J. *Velký lékařský slovník – 5.vydání*. Nakladatelství MAXDORF, 2005. s. 1024. ISBN: 80-7345-058-5.
- WIELGUS, A. R., SARNA, T. Melanin in human irides of different color and age of donors. *Pigment Cell Research*, 2005, vol.18, no. 6, s.454-464.
- ZVÁROVÁ, J. *Základy statistiky pro biomedicínské obory*. Praha : Karolinum, 2002. 218 s. ISBN 80-7184-786-0.

**ROZŠIŘOVÁNÍ VÝUKY V RÁMCI FONDU ROZVOJE VYSOKÝCH ŠKOL –
SEMINÁŘ IZOLAČNÍCH TECHNOLOGIÍ**

**EDUCATION EXPANSION BY A COURSE OF MOLECULAR ISOLATION
TECHNIQUES FOR STUDENTS OF MENDEL UNIVERSITY OF
AGRICULTURE AND FORESTRY IN BRNO**

Svobodová K.*, Bílek K.

*Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, MZLU v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno,
Česká republika; kat.svobodova@centrum.cz*

Abstrakt

V roce 2006 byl na grantovou agenturu Fondu rozvoje vysokých škol (FRVŠ) podán projekt s názvem: „Rozšíření výuky o seminář izolačních technologií pro studenty Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně“, který byl na počátku roku 2007 schválen k financování. Cílem tohoto projektu je seznámit studenty bakalářských, magisterských a doktorských studijních programů s nejnovějšími poznatky z oblasti izolace nukleových kyselin, a to nejen zpracováním a zpřístupněním studijních materiálů, ale především možností osvojit si praktické dovednosti. Seminář, pořádaný za tímto účelem, bude koncipován tak, aby studenti získali ucelené informace o této problematice a mohli si izolaci nukleových kyselin z různých tkání sami vyzkoušet.

Klíčová slova izolace, nukleové kyseliny, výuka, FRVŠ

Tato práce je podpořena FRVŠ 2385/2007 a GAČR 523/03/H076

Abstract

In 2006 we filed a project „Education expansion by a course of molecular isolation techniques for students of Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno“ to grant agency of Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MEYS CR). This project was accepted and is supported by MEYS CR from the beginning of year 2007. The aim of this project is to familiarize the students of bachelor, master and Ph.D. degree at MUAF with the recent knowledge from the field of molecular isolation techniques. Students will gain comprehensive information about this issue and will have an opportunity to gain some practical experience in the laboratories.

Key words molecular isolation, nucleic acids, education

Úvod

Jedním z hlavních cílů všech stupňů vysokoškolského vzdělání je seznamovat studenty s nejnovějšími technikami a technologiemi používanými v praxi. Řešené téma naplňuje nejen tuto podmínku, ale také vizi vyššího zapojení postgraduálních studentů do výuky, čímž jim umožňuje přijímat odpovědnost, pracovat iniciativně a tvůrčím způsobem, a to samostatně i v týmech. Při řešení projektu zpracuje realizační tým velké množství aktuálních informací, které budou, z důvodu přístupnosti studentům i případným zájemcům z praxe, vystaveny na webových stránkách. Studenti budou seznámeni nad rámec běžné výuky se způsoby izolace nukleových kyselin a s kontrolou jejich kvality.

Materiál a metodika

Seminář je primárně určen studentům akreditovaných studijních programů Zootechnika a Všeobecné zemědělství v bakalářském, magisterském i doktorském typu studia, a to pro presenční i kombinovanou formu. Dále bude zpřístupněn také studentům, kteří si vyberou některý z volitelných předmětů vyučovaných na pracovišti genetiky živočichů, a všem doktorandům MZLU v Brně. Kurz bude probíhat v moderních laboratořích molekulární genetiky, kde je k dispozici veškeré potřebné materiální vybavení pro tento seminář (centrifuga, PCR boxy, hlubokomrazicí box, gelová elektroforéza apod.).

Na základě nejnovějších poznatků získaných z literatury a také za pomoci konzultací s odborníky v daném oboru vypracujeme přednášky pro teoretickou část výuky. Vybrali jsme a testujeme reprezentativní vzorek kitů nabízených v České republice. Z dodaných materiálů k jednotlivým kitům vytvoříme přehled a metodiky jejich využití. Ze tkáňových zdrojů pracoviště genetiky živočichů budou použity tkáňové vzorky (krev, svalovina, plicní a jaterní tkáň a dále např. chlupové cibulky, sperma, stěry bukalní sliznice).

Každý účastník semináře obdrží v předstihu soubor návodů pro jednotlivé izolace. Tento soubor bude obsahovat modifikace a využití použitých metodik a praktické zkušenosti realizačního týmu s jednotlivými izolačními kity. Z důvodu zpětné vazby připravíme pro absolventy semináře dotazníky o kvalitě výuky.

Výsledky a diskuze

V tomto projektu je řešena problematika izolačních postupů využívaných v molekulární biologii. Kvalitně izolované nukleové kyseliny jsou totiž základním předpokladem správného vyhodnocení výsledků molekulárně-genetických analýz. Proto bude pro

studenty bakalářských, magisterských a doktorských studijních programů na MZLU v Brně uspořádán seminář, jehož účastníci získají nejen teoretické vědomosti z této oblasti, ale osvojí si také tolik důležité praktické dovednosti. Pro teoretickou část kurzu připravíme přednášku s podrobnými informacemi z oblasti izolace nukleových kyselin a pro praktická cvičení vypracujeme návody, které budou obsahovat přehled a metodiky využití jednotlivých izolačních kitů pro konkrétní tkáň. Všechny materiály budou průběžně aktualizovány a použity pro semináře konané i v následujících letech. Zpracované informace, učební texty a protokoly do cvičení budou z důvodu nutnosti volného přístupu vystaveny na webových stránkách pracoviště genetiky živočichů a budou volně ke stažení pro studenty, případně i pro zájemce z praxe.

Závěr

Řešený projekt umožní studentům detailnější pohled na danou problematiku. Protože seminář bude zahrnovat i praktickou část, umožní každému zúčastněnému samostatně si celý postup laboratorní práce vyzkoušet a také ověřit si kvalitu svých vlastních výsledků.

Snahou řešitelského kolektivu bude opakovat tento seminář, a tím rozšiřovat výuku, i v dalších letech.

This work is supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic FRVŠ no. 2385/2007 and by the Czech Science Foundation no. 523/03/H076

THE PRACTICAL COURSE OF „FISH GENETICS“ FOR STUDENTS OF MENDEL UNIVERSITY OF AGRICULTURE AND FORESTRY IN BRNO

Zrůstová J.^{1*}, Bílek K.¹, Baránek V.²

¹*Department of Morphology, Physiology and Genetics of Animals, ²Department of Zoology, Fishery, Hydrobiology and Apidology at MUAf in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno Czech Republic; xzrustov@node.mendelu.cz*

Abstract

The practical course of „Fish Genetics“ for students of Mendel University of Agriculture and Forestry in Brno“ is a project supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic. The aim of this project is to familiarize the students of bachelor, master and Ph.D. degree at MUAf in Brno with the recent knowledge from research in the field of Fish Genetics. The rationale for the proposed course of Fish Genetics is to make lectures based on the recent knowledge and methods for practical laboratory research as DNA extraction, polymerase chain reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), electrophoresis and DNA sequencing.

Key words fish genetics, practical course, education

Introduction

In accordance with National programme of education development in the Czech republic, strategy of academic education developing to the year 2010, and statute n. 111/1998 about universities, long-lasting object of MUAf in Brno is to interconnect laboratories with other workplaces and to make conditions for growing up specialists in particular field of agriculture. Department of Genetics and Department of Fishery and Hydrobiology maintain the same opinion.

However, the collaboration between these departments was not generated; Fish Genetics has been taught just marginally in subject called Aquaculture at the Department of Fishery and Hydrobiology. Regarding the rapid progress and development of molecular genetics it is important to introduce the recent knowledge to the students and to provide the knowledge in the common operations. Department of Animal Genetics has modern molecular-genetic laboratories for research and education as well. Nowadays the knowledge of fish genetics is very important for future graduates in fishery field because of necessary to maintain competitive advantage of the czech fishery on european market.

Participants of this course will gain comprehensive overview about exploitation of genetics in the fish breeding.

Materials and methods

Fish species are grown up in accredited experimental recirculation system at Department of Fishery and Hydrobiology. As a biological material will be used blood, muscle and parts of fins of followed species: zander (*Sander lucioperca*), tench (*Tinca tinca*) and sturgeon (*Acipenser baerii*), which are perspective and wanted in european aquaculture.

DNA of these fish species will be isolated via the phenol-chloroform extraction from scales and via Isolation Kits from muscle and blood.

We will design sets of primers for zander, tench and sturgeon, using the comparative mapping of known sequence of *Danio rerio*. We will analyse these genes: growth hormone (GH) from sequence AJ937858, myostatin (MSTN) from sequence AF019626, insulin-like growth factor 2 precursor (igf2) from sequence NM_131433, myogenic factor 5 (myf5) from sequence NM_131576, eventually other genes will be analysed. Furthermore we will design sets of primers for known sequences of tench GH (DQ980027), zander mitochondrial cytochrome b gene (AY572407) and sturgeon mitochondrial cytochrome b (AF238654). The gained PCR products will be verified on the sequencer. The gained sequences will be compared among them and found differences will be tested using PCR-RFLP.

Results and discussion

We would like to utilize this course to expand knowledge of students at bachelor, master and Ph.D. degree at MUAF. The course will bring students comprehensive overview about exploitation of fish genetics in the fish breeding and students will gain practical lab experience. For this course we will prepare the lectures for theoretical part and protocols for practical lab work. Elaborate lectures and protocols will be accessible for students, perhaps even for interested or professional people, on the web sites of both departments.

Conclusion

The long-range goal of this project is to propose theoretical and practical background about „Fish Genetics“ for university students. Students will gain theoretical knowledge and basic laboratory experience during their studies. We expect after completing the proposed grant that students have filled out a question form with suggestions and improvements of the course. Our future research directions will be to repeat this course of Fish Genetics during the next years.

Acknowledgements

This work is supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic no. FRVŠ 2030/2007 and by the Czech Science Foundation no. 523/03/H076.

Section III:

MOLECULAR BIOLOGY AND ANIMAL GENETICS

COMPARISON OF PRENATAL MUSCLE TISSUE EXPRESSION PROFILES OF GENES *CDK4* AND *TP53BP1* IN TWO PIG BREEDS

Bílek K.*, Svobodová K., Knoll A.

. Department of Animal Morphology, Physiology and Genetics, Mendel University of Agriculture and Forestry, Zememedelska 1, 613 00 Brno, Czech Republic; Kontakt: xbilek@node.mendelu.cz

Abstract

This research was focused on investigation of gene expression of selected genes via the real-time quantitative PCR. Specific primers for *CDK4* and *TP53BP1* were designed on the basis of the sequences clones obtained from the subtractive hybridization and gene expression was analysed. Two groups of samples isolated skeletal muscle-specific RNA were compared, the first one was obtained from the Pietrain adult sows and their fetuses, the second one was obtained from Large White, respectively. The stability values of candidate reference genes (*ACTB*, *EEF1A1*, *EEF2*, *GAPDH*, *H3F*, *HPRT1*, *PPIA* and *TOP2B*) were made for both breeds. The expression levels of the investigated genes were varying by adult sows used as control samples. The higher or lower expression level was found out in few samples; one of the samples of gene *CDK4* was expressed near to 0.001-fold, and two of samples of gene *TP53BP1* were expressed higher then 18-fold, 52-fold respectively. The long-range goal of this research is to provide a new knowledge of genes playing role in muscle development and growth in pigs, with the prospect of their application in marker assisted selection.

(This work was supported by the Czech Science Foundation 523/06/1302 and 523/03/H076)

Keywords: gene expression, real time PCR, skeletal muscle.

Introduction

Gene expression analyses have become increasingly important in biological research where e.g. gene expression profiles from muscle is compared with meat production. Skeletal muscle growth depends on the number of prenatally formed fibres and on the degree of their postnatal hypertrophy; i.e. prenatal development may influence the postnatal growth (te Pas *et al.*, 2005; Cagnazzo *et al.*, 2006; Erkens *et al.*, 2006). Genes

regulating cell cycle pertain to these functions. There were chosen two genes involved in regulation of cell cycle; *CDK4* is gene regulating a turn from G1 to S phase and from G2 to M phase cell cycle. The second one is *TP53BP1*; Iwabuchi *et al.* (1994) assigned that *TP53BP1* binds to the conformationally sensitive central domain of wildtype p53. *TP53BP1* was required for p53 accumulation, G2/M checkpoint arrest. *TP53BP1* plays main role in a hierarchical branched pathway for the recruitment of repair and signaling proteins to sites of DNA damage. One of the most useful tools in this area is real-time quantitative PCR (RT-QPCR) (Bustin, 2002). Sensitivity of this method has some pitfalls as RNA preparation, RNA quality and cDNA synthesis, etc. (Bustin and Nolan, 2004). Next critical step in gene expression validation is accurate normalization of RT-QPCR data (Vandesompele *et al.*, 2002), it is usually made via comparing expression profiles of the genes of interest against constitutively expressed genes known as: reference or housekeeping genes. Since the 21th century many papers which trace a suitable reference gene for comparison of gene expression have started via microarray assays (Warrington *et al.*, 2000; Hsiao *et al.*, 2001). Last step is choice of the most convenient quantification of gene expression (e.g. <http://www.gene-quantification.info/>).

Material and methods

There were analysed two groups of samples - group "a": RNA samples from the hind limb muscles of the Pietrain fetuses (44 days of gestation - aa1, aa2, ab1, ab2) and from adult sows (m. biceps femoris - aa, ab). The second - group "b": RNA samples from the hind limb muscles of the Large White fetuses (50 days of gestation hind limbs - ba1, ba2, bb1, bb2) and from adult sows (m. biceps femoris - ba, bb). The samples were collected and stored in RNeasy (QIAGEN, Hilden, Germany) at -20 °C. Homogenizations of samples were carried out in FastPrep FP 120 (ThermoSavant, Holbrook, NY, USA) and total RNA was isolated using FastRNA Pro Green Kit (Q-BIOgene, Solon, OH, USA). cDNA was synthesized from the total RNA with Omniscript Reverse Transcriptase (QIAGEN, Hilden, Germany) and oligo(dT)20 primers (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR primers were designed (Table 2) using the Primer Express software v2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the exception of *GAPDH* and *PPIA* (Vallee *et al.*, 2003). Real-time PCR was performed in the 7500 Real-Time PCR System using Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). The real-time PCR program started with 2 min UNG incubation step at 50 °C, 10 min at 95 °C, followed by 50 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. Amplification was performed in duplicate

and a blank was incorporated for each gene. For normalization of gene expression levels in our experiment we compared 8 candidate reference genes (Table 1): *ACTB*, *EEF1A1*, *EEF2*, *GAPDH*, *H3F*, *HPRT1*, *PPIA* and *TOP2B* using the geNorm application (Vandesompele *et al.*, 2002). For each study there were used two of them, two of the most stable reference housekeeping genes respectively. The raw data from real-time PCR were analyzed with the qBase application (Hellemans *et al.*, 2007).

Table 1: Name and function of investigation genes

Symbol	Gene name	Function
<i>ACTB</i> *	actin, alpha, cardiac muscle	Cytoskeletal structural protein
<i>CDK4</i>	cyclin-dependent kinase 4	Regulation protein involved in the cell cycle
<i>EEF1A1</i> *	eukaryotic translation elongation factor 1, alpha-1	Promoter-directed siRNA
<i>EEF2</i> *	eukaryotic translation elongation factor 2	Regulation enzyme
<i>H3F</i> *	histone 1	Structural protein
<i>GAPDH</i> *	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Glycolytic enzyme
<i>HPRT1</i> *	hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase 1	Purine synthesis in salvage pathway
<i>PPIA</i> *	peptidyl-prolyl isomerase A	Transport protein
<i>TOP2B</i> *	topoisomerase, DNA, II, beta	Regulation enzyme
<i>TP53BP1</i>	tumor protein p53-binding protein 1	Regulation enzyme

Table 2: Primer sequences

Gene	Primer sequence (5' - 3')	Amplicon size (bp)
<i>ACTB</i> *	CATCAGGAAGGACCTCTACGC GCGATGATCTTGATCTTCATGG	129
<i>CDK4</i>	TTGGCTGTATCTTCGCAGAGA CAGCCCAATCAGGTCAAAGAT	98
<i>EEF1A1</i> *	TCATTGATGCTCCAGGACACA CCGTTCTTGAAATACCTGCTT	128
<i>EEF2</i> *	AACGTGTCAGTCAAGGACATCC CGGGTGGTTCAGAATGATGA	111
<i>H3F</i> *	AAGAAACCTCATCGTTACAGGC TTTGAAGTCCTGAGCAATTTCC	132
<i>GAPDH</i> *	CAGCAATGCCTCCTGTACCA GATGCCGAAGTTGTCATGGA	70
<i>HPRT1</i> *	AAGGACCCCTCGAAGTGTTG CACAAACATGATTCAAGTCCCTG	122
<i>PPIA</i> *	GCACTGGTGGCAAGTCCAT AGGACCCGTATGCTTCAGGA	71
<i>TOP2B</i> *	CTAATGATGCTGGTGGCAAAC CCGATCACTCCTAGCCCAG	100
<i>TP53BP1</i>	GCATCAGACAGGGAGGGAAG TGAAATGTCCTCTATGCCCAAG	128

Table 3: Stability of candidate reference genes (see Vandesompele *et al.*, 2002).

a						
EEF2	GAPDH	ACTB	EEF1A1	TOP2B	HPRT1	PPIA/H3F
4.053854	3.083928	2.450331	1.603953	1.399684	0.95261	0.699963
b						
TOP2B	EEF1A1	EEF2	H3F	GAPDH	HPRT1	ACTB/PPIA
1.590261	1.406269	1.193271	0.816862	0.716431	0.606233	0.201512

Table 4: Relative quantification of investigated genes

Sample	CDK4	1 SD	TP53BP1	1 SD
aa	1	0.153075	1	0.11958
aa1	2.596496	0.741966	0.074267	0.007699
aa2	0.468822	0.085475	0.025082	0.002671
ab	1	0.227737	1	0.162308
ab1	1.248641	0.227303	2.99839	0.367509
ab2	0.001587	0.000314	0.253857	0.050373
ba	1	0.364933	1	0.876785
ba1	0.037172	0.015642	18.87013	8.132248
ba2	0.062549	0.023923	51.59595	27.45372
bb	1	0.068707	1	0.53235
bb1	1.165797	0.094067	3.059486	0.645662
bb2	1.984412	0.200224	0.090466	0.020652

Results and discussion

The aim of this research was to verify and quantify differential expression profile of selected genes in the porcine fetal skeletal muscles using RT-QPCR. The first specific primers for investigated genes *CDK4* and *TP53BP1* were designed on the basis of the sequences clones obtained from the subtractive hybridization (Table 2). The second sets of primers were designed for panel of candidate reference genes, especially for *ACTB*, *EEF1A1*, *EEF2*, *H3F*, *HPRT1*, and for *TOP2B* (Table 2). Furthermore, there were evaluated 8 candidate reference genes for this study and two of them were chosen as the most stable (*H3F/PPIA* for group “a” and *ACTB/PPIA* for group “b”, see Table 3). These results partially agree with Erkens’ *et al.* (2006). Relative quantification of gene expression was calculated by qBase (Hellemans *et al.*, 2007). Figure 4 visualizes gene expression differences between samples. The results suggest that only few samples were further from control samples (adult saws). In this research there was not found any relation between observed samples. Nevertheless, there was an exception, one of the samples at gene *CDK4* was expressed near to 0.001-fold, and two of samples at gene *TP53BP1* were expressed higher than 18-fold, 52-fold respectively. The differences could be caused by different age of samples, genotypes, and especially individual variability of

gene expression etc. Samples with very different gene expression require more detailed analyses. These results partially agree with Cagnazzo *et al.* (2005) who compared expression of the myogenesis-related genes in early Duroc and Pietrain embryos (14 to 49 d of gestation). Te Pas *et al.* (2005) suggest that the expression levels of genes affecting proliferation stimulating/inhibiting were in low level of gene expression (49 to 63 d of gestation) that our results accordant with.

Conclusions

There was made assay of gene expression for two of genes involved in regulation of cell cycle. For investigated genes: *CDK4* and *TP53BP1* were chosen the best set of reference genes. The expression levels of the investigated genes were varying by adult sows used as control samples. This research led to similar results as recent study focused on gene expression. The genes with very down- or up-regulation of gene expression require more detailed analyses. The long-range goal of this research is to provide a new knowledge of genes playing role in muscle development and growth in pigs, with the prospect of their application in marker assisted selection.

Literature

Bustin, S. A., Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. 2002: J Mol Endocrinol. Aug;29(1):23-39.

Bustin S. A., Nolan T., Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. 2004: J Biomol Tech. Sep;15(3):155-166.

Cagnazzo M., te Pas M. F. W., Priem J., de Wit A. A. C., Pool M. H., Davoli R., Russo V. Comparison of prenatal muscle tissue expression profiles of two pig breeds differing in muscle characteristics. 2006: Journal of Animal Science 84, 1-10.

Erkens T., Van Poucke M., Vandesompele J., Goossens K., Van Zeveren A., Peelman L. J., Development of a new set of reference genes for normalization of real-time RT-PCR data of porcine backfat and longissimus dorsi muscle, and evaluation with *PPARGC1A*. 2006: BMC Biotechnol. 2006 Oct 9;6:41.

Hellemans J., Mortier G., De Paepe A., Speleman F., Vandesompele J. (2007) qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. Genome Biology 8, R19.

Hsiao Li-Li, Dangond F. *et al.*, A compendium of gene expression in normal human tissues. 2001: *Physiol Genomics* 7: 97–104.

Iwabuchi K, Bartel P. L., Li B., Marraccino R., Fields S., Two cellular proteins that bind to wild-type but not mutant p53. 1994: *Proc Natl Acad Sci USA*. Jun 21;91(13):6098-6102.

Te Pas M. F., De Wit A. A., Priem J., Cagnazzo M., Davoli R., Russo V., Pool M. H. Transcriptome expression profiles in prenatal pigs in relation to myogenesis. 2005: *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 26:157–165.

Vallee M., Beaudry D., Roberge C., Matte J.J., Blouin R. & Palin M.F. (2003) Isolation of differentially expressed genes in conceptuses and endometrial tissue of sows in early gestation. *Biology of Reproduction* 69, 1697-706.

Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A. & Speleman F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034.1-0034.11.

Warrington J. A., Nair A., Mahadevappa M., Tsyganskaya M., Comparison of human adult and fetal expression and identification of 535 housekeeping/maintenance genes. 2000: *Physiol Genomics*, 2: 143–147.

<http://www.gene-quantification.info/>

Název/Title:	Sborník z conference VII. mezinárodní konferenci doktorandů a pregraduálních studentů "GENETIKA A ŠLECHTĚNÍ ZVÍŘAT" Collection of the conference VII th International Conference of PhD. and MSc. Students "GENETICS AND ANIMAL BREEDING"
Autor/Author:	Kolektiv autorů Collective of authors
Vydal/Publisher:	Ediční středisko MZLU v Brně
Vydání/Issue:	první / first 2007
Počet stran / No. of pages:	83
Náklad/Printing:	45 výtisků/copies

Publikace neprošla jazykovou úpravou.

Za věcnou a jazykovou úpravu odpovídají autoři jednotlivých příspěvků.

Sborník z konference je samostatně neprodejný.

OLYMPUS



Vaše Představy, Naše Budoucnost

www.olympus.cz

| **STUDENT** | **AGENCY** |

www.studentagency.cz



www.genoservis.cz