

Acta fytotechnica et zootechnica 2
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2010, s. 49–54

GENOMICKÁ ANALÝZA A IDENTIFIKÁCIA RETROTRANSPOZÓNU *CASSANDRA* V KOLEKCII GENETICKÝCH ZDROJOV ĽANU SIATEHO

GENOMIC ANALYSIS AND IDENTIFICATION OF *CASSANDRA* RETROTRANSPOSON IN GERMLASM COLLECTION OF FLAX

Jana ŽIAROVSKÁ, Katarína RAŽNÁ, Milan BEŽO, Slavomíra SENKOVÁ

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

The aim of this study was to evaluate presence and variability of retrotransposon (RTN) in *Cassandra* genome in genetic collection of flax resources. *Cassandra* is nonautonomous retrotransposon Terminal Repeat in Miniature (TRIM). *Cassandra*, like other RTNs, is an active part of genome in dicotyledonous plants and their effective marker system. According NCBI database, the primers were proposed for identification of *Cassandra* and its diversity in PCR and qRT PCR. In a process of primer design, markers were chosen on the base of nucleotide sequence of conformity that is interrupted at least in two positions. RTN *Cassandra* was present in all tested 25 flax varieties. By comparison of threshold cycles (Ct) it is possible to assume 145-fold difference in RTN *Cassandra* presence status in genomes of varieties Albidum and Liral II. Varieties Liral II, Vera and Horan belong to a group with the lowest Ct values.

Key words: *Cassandra* retrotransposon, qRT PCR, genomic analysis, flax germplasm

Vzhľadom na to, že poznatky o genóme ľanu sú v súčasnosti tvorené rôznymi roztrúsenými informáciami, nie sú k dispozícii ani špecifické markérovacie systémy umožňujúce identifikáciu genotypov pri identifikácii genotypov na základe prítomnosti konkrétnych súčastí ich genómov je požadovaná znalosť poradia nukleotidov pre návrhy lokusovo špecifických prajmerov. Príkladom často analyzovaných a až na úroveň poradií nukleotidov preskúmaných súčastí medzigénového priestoru rastlín sú retrotranspozóny (RTN).

Počet chromozómov v diploidnom stave *Linum usitatissimum* je 30 a veľkosť genómu sa pohybuje v rozmedzí 381 Mb až do 575 Mb v závislosti od geografického pôvodu ľanu (Vrinten et al., 2005). Frakcie celkovej jadrovej DNA sa nachádzajú v mnohonásobne opakovaných a za sebou idúcich poradiach, ktoré sú v blokoch rôzne rozptýlené na chromozómoch a jadrovú DNA tiež tvoria aj poradia s nízkym počtom opakovaní. Týmto svojim usporiadaním sa ľan odlišuje od väčšiny rastlín s podobnou veľkosťou genómu. Mnohonásobne opakované a za sebou idúce poradia sú vytvorené z malého počtu blokov a pokrývajú približne 35 % celkovej jadrovej DNA. Stredne sa opakujúce úseky sú zastúpené len v 15 % celkovej jadrovej DNA, čo je o niečo menej ako vo väčšine vyšších rastlín. Zvyšok genómu je usporiadaný v poradiach s nízkym počtom opakovaní, čiže 50 % genómu. Z toho vyplýva, že ľan má väčšie množstvo celkového genómu jadra v poradiach s nižším počtom opakovaní v porovnaní s inými rastlinami s podobnou veľkosťou genómu. Ďalší rozdiel medzi ľanom a ostatnými vyššími rastlinami je v dlhej perióde distribúcie pôvodnej šablóny (pôvodného elementu) v týchto blokoch a poradiach (Cullis, 2005).

Genómy vyšších rastlín obsahujú množstvo transponovateľných elementov, v rozpätí od 15 % jadrovej DNA v *Arabidopsis thaliana* až viac ako 90 % pri niektorých z *Liliaceae*. Väčšina týchto elementov sú RTN I. triedy s LTR (s dlhými koncovými opakovaniami) (Sabot a Schulman, 2006). Retrotranspozón *Cassandra* patrí medzi TRIM elementy (Terminal Repeat Retrotransposons In Miniature – Minimalizované RTN s koncovými opakovaniami), ktoré patria do I. triedy LTR neautonómnych

RTN. TRIM sú zložené z 100–250 bp priamych koncových opakovaní, ktoré sa zdajú byť totožné s LTR, alebo sú odvodené od LTR. Sekvencia pre naviazanie prajmera sa dá nájsť spravidla vo vnútri LTR po celej dĺžke retrotranspozónov. Odhliadnuc od miesta naviazania prajmera a ďalších malých segmentov TRIM elementov takmer úplne chýbajú vnútorné oblasti. Z doterajšieho skúmania pohybu TRIM v genóme vyplýva, že TRIM sú aktívované cez komplementáciu proteínových produktov neporušených RTN (Kalendar et al., 2004).

RTN, ako molekulárne markéry, sa ukázali vhodným systémom pre svoju nenáročnosť, reprodukovateľnosť a cenovú dostupnosť. Pri vyhľadávaní genetických vzťahov medzi genotypmi rastlín poskytujú výhodu, pretože včlenenie RTN je nezvratný proces odzrkadľujúci sa aj na potomstve, pričom ich stabilné začlenenia sa na nové miesta v genóme sú dedené mendelisticke (Kalendar et al., 1999).

Identifikácia jednotlivých skupín RTN alebo samotných RTN v cieľových populáciách alebo odrodách je prvým z krokov umožňujúcich následné analýzy zamerané na vzťahy medzi genotypmi založené na včleneniach a polymorfizme medzi RTN.

Práca bola zameraná na genomické zhodnotenie nukleotidových vzťahov RTN *Cassandra* ľanu siateho s variantmi tohto RTN nachádzajúcich sa v genómoch vyšších dvojklíčnolistových rastlín, následnom návrhu markérov špecifických pre *Cassandru* ľanu, identifikáciu príslušného produktu PCR zodpovedajúcemu *Cassandre* v 25 genotypoch ľanu siateho PCR a vizuálnou kontrolou a qRT PCR a kontrolou na základe bodu topenia získaného produktu ako objektívneho dôkazu syntézy špecifického produktu zodpovedajúceho sekvencii RTN *Cassandra* ľanu siateho.

Materiál a metódy

Genomická analýza nukleotidov RTN *Cassandra* prístupných v NCBI (The National Center for Biotechnology Information) databáze pod číslom DQ767972.1 bola uskutočnená v dvoch

Table 1 Prajmery identifikujúce RTN *Cassandra* lanu siete

Prajmer (1)	Poradie nukleotidov v smere 5' → 3' (2)
Lan 01_10 priamy (3)	TGTAATGTAACACGTTAGGC
Lan 02_10 spätný (4)	TGTAACACCCCGTACTTTTC

Tabuľka 1 Primers for RTN *Cassandra* identification in flax (1) primer, (2) nucleotide sequence direction 5' → 3', (3) forward primer, (4) reverse primer

základných rovinách. Metódou Mega-BLAST (Zhang et al., 2000) boli porovnané nukleotidy *Cassandry* so všetkými sekvenciami existujúcimi v tejto databáze. Následne boli v databáze identifikované všetky varianty RTN *Cassandra* a vyselektované nukleotidové sekvencie variantov vyskytujúcich sa v dvojkľúčových rastlinách, ktoré boli použité v module Align-BLAST (Stephen et al., 1997) ako vstupné dáta k vzájomnému porovnaniu a zostrojeniu vetvového členenia odlišností variant RTN *Cassandra*.

Na základe výsledkov získaných genomickými analýzami bolo možné navrhnúť prajmery (tabuľka 1) tak, aby PCR reakcia zabezpečovala amplifikáciu celého RTN a zároveň poskytovala špecifický a pre lan jedinečný produkt.

Na základe známeho poradia nukleotidov produktu, ktorý ohraničujú v práci navrhnuté prajmery sme softvérom OligoCalc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligo.html>) stanovili jeho predpokladanú teplotu topenia, ktorá bola vypočítaná v rozpätí 82–84 °C.

K identifikácii RTN *Cassandra* bolo použitých 25 odrôd lanu siete rôzneho pôvodu a hospodárskeho typu: Albidum, Albocoeuleum, Usitatissimum, Deubgrc 28197, Svaloeif, Norfolk Princess, Krasnoder, Otofte 15/47, Horan, Lilas, Hohehnheim, Hor Nr 048, PRFGL 25, Vera, Liral II, Flanders, Renodlat oljelín, La Plata 1938, L.C.S.D., Red Wing USA, Ilona, Rembrant, Gisa, Escalina, Marina.

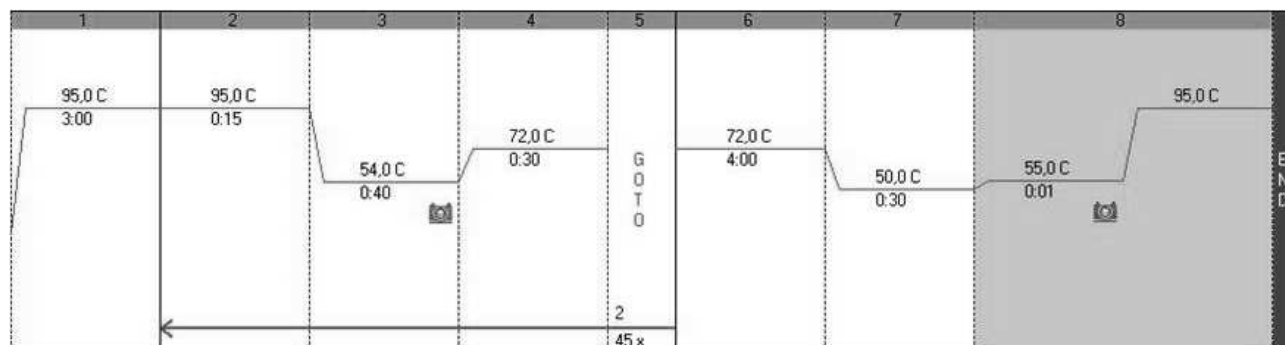
Materiál na izoláciu DNA bol odobraný z rastlín pestovaných v poľných podmienkach. Izolácia DNA bola uskutočnená súpravou Invisorb® Spin Plant Mini Kit, INVITEK podľa návodu výrobcu a kvalita a kvantita DNA bola stanovená prístrojom Quibit™ Fluorometer Invitrogen.

Pre PCR reakciu bol pripravený roztok pozostávajúci z 20 mmol Tris-HCl, 50 mmol KCl, 1,5 mmol MgCl₂, 0,3 mmol dNTP, 1 U Taq polymeráza a 400 nmol prajmerov. PCR reakcia sa uskutočnila v prístroji MyCycler™. Časový a teplotný profil PCR bol nasledovný, úvodná denaturácia DNA 3 min . 95 °C, (denaturácia DNA 15 s . 95 °C, naviazanie prajmerov 40 s . 54 °C, syntéza refazcov DNA 2 min . 72 °C) 45-krát a záverečná syntéza DNA 7 min . 72 °C.

Analýzy qRT PCR sa uskutočnili v roztokoch obsahujúcich iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-rad) a rovnako 400 nmol prajmerov v prístroji CFX96 Real-time detection system.

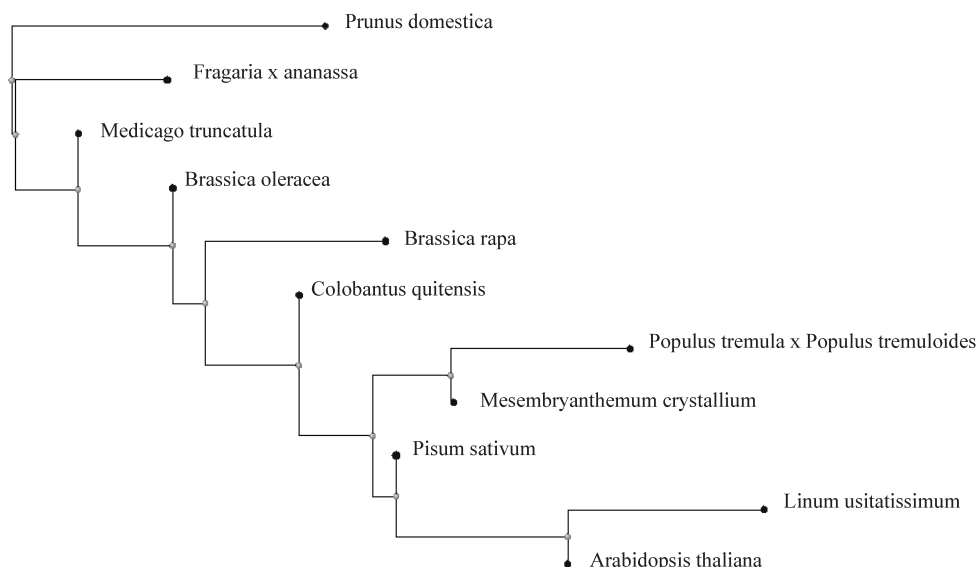
Časový a teplotný profil PCR reakcie ako aj následnej analýzy teploty topenia amplifikovaného produktu znázorňuje obr. 1.

Odčítania fluorescencie vznikajúceho produktu prebehli po amplifikačnej fáze a analýzy teploty topenia boli odčítavané počas 1 sekundy a v teplotných nárastoch 0,2 °C.

**Obrázok 1** Profil qRT PCR identifikácie RTN *Cassandra*
Figure 1 Profil of qRT PCR identification of RTN *Cassandra*

Query	3	TAATGTAACACGTTAGGCATATCCCATATTGACAAAGTACAAGAGAGACT-TATGGGCTAGAAGGAACAATCCGTCCTTAACATAACAAGACGCATTTTCGAGGTGAAATGGAGGAAATCT	121
Sbjct	126	TAATATAACACTTTAGGCATATCCCATATTGACAAAGTACGTGAGAGA-TACATGGGCCATAAGGAACAATCCGTCCTTAACATAACAAGATGCATTTTGGGGTGAATGGAGGAGTTAT	244
Query	122	GCTAAGAACACTGATGTTAATCGCGCTCGGGTGGGAGCAGTGCATAAATGGGTGACCTCCTAGGAAGTCACT-ATTCTGCATCCAAAATAAATCTGTGAGGGAT-TAGTTATGCCCAAAC	239
Sbjct	245	TCTAAGAACACTGATGTTAATCGCGCTCGGGTGGGAGCAGTGCAGAA-TGGCCGACCTCTT-GGAA---ACTGATTGTT-ATACACCC-AAATCTTTGAGAG-TCTAG--A-CCCAAAG	352
Query	240	CGGACAATATCTTGTTCGAAAAG-TACGGGGTGTACAAAGTGGTATCCGAGCCT	292
Sbjct	353	CGGACAATACCTTGTCAAAAAGGT-CGAGATGTTACAAGTGGTATCAGAGCCT	405
Query	359	TAATGTAACACGTTAGGCATATCCCATATTGACAAAGTACAAGAGAGACT-TATGGGCTAGAAGGAACAATCCGTCCTTAACATAACAAGACGCATTTTCGAGGTGAAATGGAGGAAATCT	477
Sbjct	126	TAATATAACACTTTAGGCATATCCCATATTGACAAAGTACGTGAGAGA-TACATGGGCCATAAGGAACAATCCGTCCTTAACATAACAAGATGCATTTTGGGGTGAATGGAGGAGTTAT	244
Query	478	GCTAAGAACACTGATGTTAATCGCGCTCGGGTGGGAGCAGTGCATAAATGGGTGACCTCCTAGGAAGTCACT-ATTCTGCATCCAAAATAAATCTGTGAGGGAT-TAGTTATGCCCAAAC	595
Sbjct	245	TCTAAGAACACTGATGTTAATCGCGCTCGGGTGGGAGCAGTGCAGAA-TGGCCGACCTCTT-GGAA---ACTGATTGTT-ATACACCC-AAATCTTTGAGAG-TCTAG--A-CCCAAAG	352
Query	596	CGGACAATATCTTGTTCGAAAAG-TACGGGGTGTACA	632
Sbjct	353	CGGACAATACCTTGTCAAAAAGGT-CGAGATGTTACA	389

Obrázok 2 Nukleotidová zhoda RTN *Cassandra* a FL1a, spracované v NCBI (2010)
Figure 2 Nucleotides similarity of RTNs *Cassandra* and FL1a, processed in NCBI (2010)



Obrázok 5 Dendrogram (minimum evolution tree) vzdialeností zhodnosti genomických údajov RTN *Cassandra* dvojkľúčolistových v databáze NCBI vytvorené modulom Align-BLAST

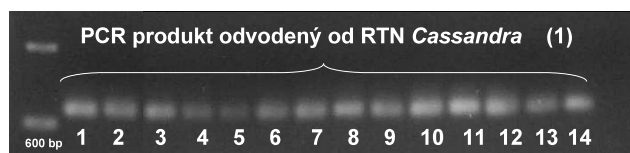
Figure 5 Dendrogram (minimum evolution tree) of genetic distance of *Cassandra* retrotransposon sequences in dicotyledonous present in NCBI database created by modul Align-BLAST

Absolútna zhoda všetkých nukleotidov RTN *Cassandra* ľanu siateho s ostatnými variantmi tohto RTN bola genomickou analýzou vylúčená (obrázok 4), čo umožnilo návrh špecifického prajmeru v oblasti 5' LTR úseku (ktorý nevykazuje zhodu s ani jedným variantom vyskytujúcim sa v iných rastlinách) zabezpečujúcim cieleňú amplifikáciu príslušného variantu *Cassandry*.

Cassandra RTN boli doteraz izolované vo viac ako 50 druhoch pokrývajúcich celú šírku ríše rastlín. Majú dĺžku 565–860 bp a dĺžka LTR úsekov je rovnako variabilná v závislosti od druhu, a to 240–350 bp. LTR oblasti doteraz sekvenovaných *Cassandra* RTN obsahujú konzervatívne ukončenia s univerzálnou 5' TG ... CA 3' štruktúrou a koncovými obrátenými opakovaniami varirujúcimi medzi 6–12 bp, typickými pre LTR RTN (Kalendar et al., 2008).

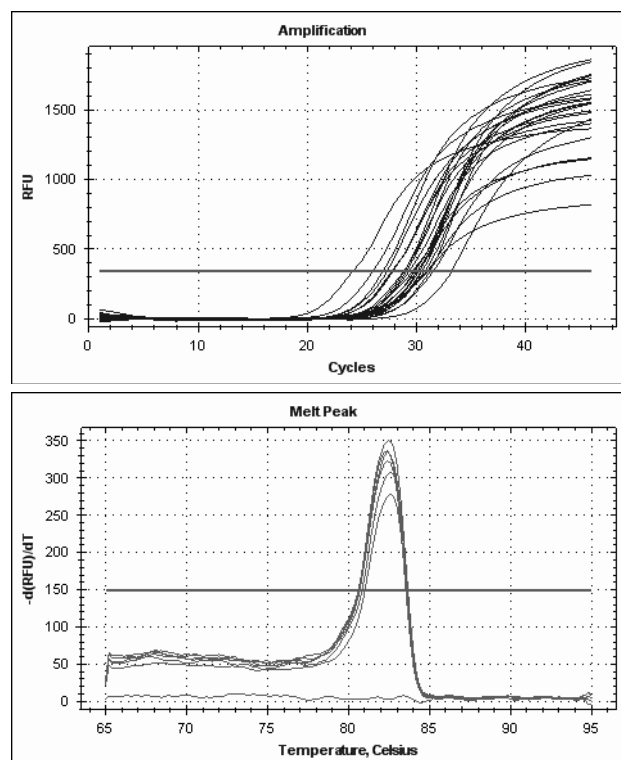
Vyhodnotením výsledkov porovnania nukleotidov boli získané vstupné údaje umožňujúce v BLAST analýze zostrojenie dendrogramu vzdialeností jednotlivých variantov RTN *Cassandra* vyskytujúcich sa v dvojkľúčolistových rastlinách. Najvyššiu zhodnosť v úsekoch *Cassandry* vyhodnotených ako podobné (obrázok 5) vykazujú k ľanu RTN *Cassandra* dvoch druhov – arábkovky tálovej a hrachu siateho. Najvzdialenejšími sú varianty *Cassandry* čelade ružovité.

Identifikácia RTN *Cassandra* bola uskutočnená celkovo v 25 genotypoch (tabuľka 3), pričom vo všetkých bola identifikácia pozitívna, a to v oboch kontrolných sériách reakcií. Pri iden-



Obrázok 6 Elektroforeogram PCR identifikácie RTN *Cassandra* retrotranspozónu v genotypoch 1–14. Genotypy sú uvedené v Tabuľke 3

Figure 6 Electrophoreogram of PCR identification of *Cassandra* retrotransposon in genotypes 1 to 14. Genotypes are listed in Table 3
(1) PCR product derived from *Cassandra* RTN



Obrázok 7 Identifikácia RTN *Cassandra* v genóme ľanu siateho pomocou qRT PCR

a) kde na osi x je zobrazený počet cyklov a osi y relatívne fluorescenčné jednotky, b) analýzy teploty topenia, kde je na osi x zachytená teplota v °C a os y odráža negatívny pomer zmeny fluorescencie voči teplote

Figure 7 RTN *Cassandra* identification in flax genome by qRT PCR, on the axis x number of cycles and on the axis y relative fluorescence unit are depicted
a) and melting curve analysis, b) on the axis x temperature and on the axis y negative ratio of change of fluorescence to temperature are depicted

Table 3 Hodnotenie výsledkov identifikácie RTN *Cassandra* qRT PCR

Číslo vzorky (1)	Názov genotypu (2)	Ct (3)	Tm (4) produktu	Identifikácia produktu (5)
1	Albidum	33,22	82,4–82,6 °C	pozitívna (6)
2	Albocoeruleum	27,30		
3	Usitatissimum	31,54		
4	Deubgrc 28197	29,33		
5	Svaloef	31,01		
6	Norfolk Princess	29,67		
7	Krasnodor	30,07		
8	Otofte 15/47	31,06		
9	Horan	26,94		
10	Lilas	30,09		
11	Hohehnheim	29,85		
12	Hor Nr 048	27,83		
13	PRFGL 25	27,82		
14	Vera	24,19		
15	Liral II	26,04		
16	Flanders	28,86		
17	Renodlat oljelin	31,21		
18	La Plata 1938	30,47		
19	L.C.S.D.	29,10		
20	Red Wing USA	28,91		
21	Ilona	30,23		
22	Rembrant	30,76		
23	Gisa	29,81		
24	Escalina	27,76		
25	Marina	30,50		

Ct – prahový cyklus, Tm – teplota topenia

Tabuľka 3 Results evaluation of *Cassandra* retrotransposon identification by qRT PCR

(1) number of sample, (2) name of genotyp, (3) Ct – Threshold cycle, (4) Tm of product – melting temperature of product, (5) identification of product, (6) positive

tifikácii klasickým PCR protokolom a po optimalizovaní reakcie bola syntéza výsledného produktu kontrolovaná na 2% agarózovom géle (obrázok 6).

Optimalizovaný protokol PCR reakcie v podmienkach real-time potvrdil amplifikáciu sekvencie *Cassandry* bez nešpecifických produktov (obrázok 7), či tvorby dimérov prajmerov. Kontrola špecifickosti reakcie prebehla analýzou teploty topenia zmoženého produktu, pričom konkrétne hodnoty dosahovali rozpätie 82,4–82,6 °C, čo zodpovedá vypočítanej Tm cieľového produktu stanovenej na 82–84 °C.

Porovnaním prahových cyklov je možné predpokladať približne 145 násobný rozdiel zastúpenia RTN *Cassandra* v genómoch odrôd Albidum a Liral II. Do skupiny s najnižšími Ct hodnotami okrem Liral II patria aj odrody Vera a Horan.

Ako už bolo naznačené, vývoj molekulárných markérov poskytujúcich spoľahlivé určenie prítomnosti niektorého z transponovateľných prvkov je prvým zo série krokov vedúcich k charakterizovaniu genotypov na úrovni medzigénovej DNA. Spoľahlivá identifikácia jednotlivých oblastí DNA s potenciálom markérov umožňuje následnú komplexnejšiu analýzu genómov. Antonius-Klemola a i. (2006) charakterizujú vo svojej práci triedu RTN TRIM ako plnohodnotný nástroj pre výskum

genetického mapovania, evolúcie a genetickej rozmanitosti rastlín. Pri analyzovaných genotypoch jabloní uvádzajú, že jediný TRIM prajmer v PCR reakcii je schopný amplifikovať množstvo polymorfnych fragmentov, čo naznačuje pomerne vysoký počet kópií týchto prvkov, ktoré môžu byť zhlukované alebo roztrúsené v genóme. Rovnako sú TRIM markéry využiteľné aj ako IRAP a REMAP markéry identifikácie, pretože poskytujú unikátne a reprodukovateľné profily.

Súhrn

Cieľom práce bolo zhodnotenie prítomnosti a variability retrotranspozónu (RTN) *Cassandra* v genóme zbierky genetických zdrojov ľanu siateho. *Cassandra* je nesamostatný miniatúrny retrotranspozón s koncovými opakovaniami (TRIM), ktorý podobne ako iné RTN tvorí aktívnu súčasť genómu dvojkľúčolisto-vých rastlín a je efektívny markérovací systém. Podľa databázy NCBI boli navrhnuté prajmery pre identifikáciu a rozmanitosť RTN *Cassandra* v PCR a qRT PCR. Pri návrhu prajmerov boli ako markéry určené také 20-méry, pri ktorých bola nukleotidová zhoda prerušená aspoň na dvoch miestach. RTN *Cassandra* ľanu siateho bol prítomný vo všetkých sledovaných 25 genetických zdrojoch ľanu siateho. Porovnaním prahových cyklov (Ct) je možné predpokladať približne 145 násobný rozdiel zastúpenia RTN *Cassandra* v genómoch odrôd Albidum a Liral II. Do skupiny z najnižšími Ct hodnotami okrem Liral II patria aj odrody Vera a Horan.

Kľúčové slová: retrotranspozón *Cassandra*, qRT PCR, genomická analýza, genetické zdroje ľanu

Podakovanie

Tento článok bol vytvorený realizáciou projektu Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja (0,5) a VEGA 1/0112/08 Vývoj molekulových markérov odvodených od tandemovo a rozptýlene sa opakujúcich poradí nukleotidov v genóme ľanu siateho (0,5).

Literatúra

- ANTONIUS-KLEMOLA, K. – KALENDAR, R. – SCHULMAN, A.H. 2006. TRIM retrotransposons occur in apple and are polymorphic between varieties but not sports. In: Theoretical and Applied Genetics, 2006, no. 112, p. 999–1008.
- CULLIS, C. 2005. Mechanisms and control of rapid genomic changes in flax. In: Annals of botany, 2005, no. 95, p. 201–206.
- CULLIS, C. 2010 Using the flax genome sequence to identify rapidly evolving regions. In: Flax Genomics Workshop. [online]. 2010 [cit. 2010-29-06]. Dostupné na internete: < http://cfgi.tufgen.ca/minutes/workshop_2010/cullis.pdf >.
- KALENDAR, R. – GROB, T. – REGINA, M. – SUONIEMI, A. – SCHULMAN, A. 1999. IRAP and REMAP: two retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. In: Theoretical and Applied Genetics, vol. 98, 1999, no. 5, p. 704–711.
- KALENDAR, R. – VICIENT, C. M. – PELEG, O. – ANAMTHAWAT-JONSSON, K. – BOLSHOY, A. – SCHULMANN, A. H. 2004. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but nonautonomous retroelements of barley and related genomes. In: Genetics, 2004, no. 166, p. 1437–1450.
- KALENDAR, R. – TRANSCANEN, J. – CHANG, W. – ANTONIUS, K. – SELA, H. – PELEG, O. – SCHULMAN, A.H. 2008. *Cassandra* retrotransposons carry independently transcribed 5S RNA. In: Proceedings of the National Academy of vol. 105, 2008, no. 15, p. 5833–5838.

SABOT, F. – SCHULMAN, A. H. 2006. Parasitism and the retrotransposon life cycle in plants: a hitchhiker's guide to the genome. In: *Heredity*, 2006, no. 97, p. 381–388.

STEPHEN, F.A. – MADDEN, T.L. – SCHAFFER, A.A. – ZHANG, J. – ZHANG, Z. – MILLER, W. – LIPPMAN, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. In: *Nucleic Acids Research*, 1997, no. 25, p. 3389–3402.

YANG, T.J. – KWON, S.J. – CHOI, B.S. et al. 2007. Characterization of terminal repeat retrotransposon in miniature (TRIM) in *Brassica* relatives. In: *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, no. 114, p. 627–636.

VRINTEN, P. – HU, Z. – MUNCHINSKY, M. A. – ROWLAND, G. – QIU, X. 2005. Two FAD3 Desaturase Genes Control the Level of Linolenic Acid in Flax Seed. In: *Plant Physiology*, 2005, no. 139, p. 79–87.

WITTE, C.P. – HIEN-LE, Q. – BUREAU, T. – KUMAR, A. 2001. Terminal – repeat retrotransposons in miniature (TRIM) are involved in restructuring plant genomes. [online] 2001 [cit. 2010-29-06]. Dostupné na internete: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.241341898>.

ZHANG, Z. – SCHWARTZ, S. – WAGNER, L. – MILLER, W. 2000. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. In: *Journal of Computational Biology*, 2000, no. 7, p. 203–214.

Kontaktná adresa:

Ing. PaedDr. Jana Žiarovská, PhD., SPU v Nitre, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, tel.: 037/641 42 44, e-mail: jana.ziarovska@uniag.sk

Acta fytotechnica et zootecnica 2
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2010, s. 54–56

STANOVENIE SKUTOČNE STRÁVITELNÝCH DUSÍKATÝCH LÁTKOV V TENKOM ČREVE METÓDOU NIRS V KRMIVE PRE PREŽÚVAVCE

DETERMINATION OF PROTEIN DIGESTIBLE IN INTESTINE BY NIRS-METHOD IN FORAGES FOR RUMINANTS

Stela JENDRIŠÁKOVÁ

Plant Production Research Centre Piešťany, Grassland and Mountain Agriculture Research Institute

The aim of the work was to find the possibility for using the methods of near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) to analyse bulky feedstuff from permanent (PG), oversown (OG) and temporary grassland (TG) in the treatments at different fertilization rates (0 NPK, P30K60, N90PK, N180PK) in the three-regim cuts. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) method of analysis was used to determine protein digestible in intestine (PDI) when energy is limiting (PDIE) and when nitrogen is limiting (PDIN) in forage for ruminants. Herbage samples were taken from permanent (PG), oversown (OG) and temporary (TG) grasslands managed at different NPK fertiliser application and under three-cut utilisation system. The samples were analysed by reference methods and their spectra were measured by NIRS. A correlation between the reference method data and the collected spectra was used to develop an equation "FORAGE.EQA" for forage analysis. An identification of samples with NIRS was conducted by the analysis of main components. Parameters of quality FORAGE.EQA are determined by the standard error of calibration (SEC), $SEC_{PDIE} = 1.93 \text{ g kg}^{-1}$, $SEC_{PDIN} = 2.09 \text{ g kg}^{-1}$; the standard error of cross validation (SECV), $SECV_{PDIE} = 2.60 \text{ g kg}^{-1}$, $SECV_{PDIN} = 2.52 \text{ g kg}^{-1}$, and the coefficient of correlation (RSQ) $RSQ_{PDIN} = 0.99$ showed a very strong dependence. A strong dependence was found at $RSQ_{PDIE} = 0.91$. The quality of calibration model was tested in the validation file VFORAGE.CAL.

Key words: forage, grasslands, NIRS, PDIE, PDIN

Improvement in animal performance enhances the requirements for nutrients and their effective utilization by animals. Effective nutrients degradability in rumen is an important characteristic of forage quality for ruminants and indicates supplementation of animal and ruminal microorganisms with energy and nitrogen. Much research has been conducted on the effective nutrient utilization by ruminants (Čerešňáková et al., 2003; Pozdíšek and Bjelka, 2002) and rumen degradability of plants protein supplements (Šimko et al., 2006; Čerešňáková et al., 2002). Grasslands are an important source of forage in the diet of ruminants mainly in upland and mountain regions. Forage quality is affected by many factors, including the characteristics of the environments (soil, temperature, precipitation, light conditions), grassland management (fertilization, cutting, grazing) and preservation techniques (Juráček et al., 2001; Gallo et al., 2006; Bíro et al.,

2002; Gálik, 2007). The profitable production and the improvement in animal performance from grassland – based systems depend on both the botanical composition and the plant maturity stage. Botanical diversity of meadows and pastures affects the crude protein content of forage and is directly related to growth potential of the animals (Pozdíšek and Bjelka, 2002). The crude protein content is an important limiting nutritional factor. Therefore, in order to adequately supply the nutritional needs of the ruminants, the evaluation of crude protein content of forage is needed. The evaluation of crude protein (CP) according to the protein digestible in intestine (PDI) system is based on utilisable nitrogen sources in the small intestine of ruminants. These sources consist of microbial protein synthesised in forestomachs and of non-degradable CP of forage and their proportions – according to van Soest (Sommer, 1994) – depend on an extent of degradation and on