

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 57 – 60

THE IDENTIFICATION OF DNA POLYMORPHISM AT THE 154 CODON OF THE OVINE PRNP GENE BY ALLELIC DISCRIMINATION USING A DUAL FLUORESCENT PROBE ASSAY

IDENTIFIKÁCIA DNA POLYMORFIZMU V KODÓNE 154 PRNP GÉNU OVIEC METÓDOU ALELICKEJ DISKRIMINÁCIE POUŽITÍM DUÁLNEJ FLUORESCENČNEJ PRÓBY

Martina MILUCHOVÁ, Michal GÁBOR, Anna TRAKOVICKÁ

Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovakia

The aim of this study was to investigate prion gene polymorphism at codon 154 of common breeds of sheep in Slovakia to provide information about their susceptibility to scrapie. The material involved 82 sheep. Genomic DNA was extracted from whole blood by salting out method. Genetic analysis of the PrP gene was realised by an allelic discrimination technique using the TaqMan assays. In sheep population the predominance of homozygote genotype RR was detected. Heterozygote genotype RH was present in breed Lacaune (1 animal) and crossbreeds Improved Valachian × Lacaune (2 animals) and Improved Valachian × Lacaune × East Friesian Sheep Breed (1 animal). Homozygote genotype HH was not observed.

Keywords: sheep, allelic discrimination, scrapie, PRNP, codon 154

Transmissible spongiform encephalopathies (TSE) or prion diseases represent a group of transmissible neurodegenerative diseases that includes Creutzfeldt-Jakob disease (CJD), variant CJD of man, bovine spongiform encephalopathy (BSE) of cattle, and scrapie of sheep and goats. The key event in TSE is the post-translational modification of a host-encoded cellular protein, named the prion protein (PrP), into a pathological isoform (PrP^{Sc}) that accumulates in the brain of affected subjects (Prusiner, 1982; Vaccari et al., 2009).

Scrapie is a disorder characterized by the deposition of the prion protein (PrP^{Sc}; associated with TSE) in the central nervous system and lymphoreticular system. Characteristic clinical signs of the disease are behavioural disturbances, pruritus and increased difficulty in locomotion. Studies of naturally and experimentally scrapie-affected sheep have shown that genetic susceptibility to the disease is modulated by allelic variation in the PrP gene (Hunter, 2000, Acín et al., 2004). In sheep, it is known that polymorphisms at codons 136 (A/V), 154 (R/H) and 171 (R/H/Q) of PRNP, the gene encoding PrP, are associated with TSE resistance/susceptibility (Poucke et al., 2005). Their combination gives five commonly detected alleles: ARR, ARH, ARQ, AHQ, VRQ [11]. The effect of the different alleles on scrapie susceptibility is complex: both the allelic frequency and the influence of each allelic variant vary among ovine breeds. Sheep carrying the VRQ/VRQ genotype are considered the most susceptible to the disease, whereas sheep of ARR/ARR genotype seem to be resistant (Vascellari et al., 2005). The association between the polymorphism at codon 154 (arginine R or histidine H) and susceptibility to scrapie is still unclear since some data suggest that a histidine at codon 154 offers some protection in certain breeds of sheep (L'Homme et al., 2007).

The diagnostic methods currently applied to detect a TSE infection (BSE rapid tests as well as confirmatory methods) are based on the detection of PrP^{Sc}. The four commonly used rapid tests as well as the confirmatory methods [SAF immunoblot and immunohistochemistry (IHC)] that have been recommended by the Office International des Epizooties

(OIE) apply polyclonal or monoclonal antibodies to detect PK-treated PrP^{Sc} accumulated in the brains of TSE-affected animals (Buschmann et al., 2004). Comparable haematologic status of sheep are not useful in diagnosis of scrapie (Williams, 2005; Rolinec et al., 2012). It is generally accepted that the susceptibility of sheep to scrapie is directly linked to particular allelic polymorphisms of PrP (Buschmann et al., 2004). Genotyping sheep for genes that appear to confer resistance to contracting classical scrapie has been used for several years in an attempt to eradicate scrapie through selective breeding. Currently, there are numerous methods for detecting single nucleotide polymorphisms (SNP) in genes. Many of these use real-time PCR methodologies for detecting the SNP (Johnson et al., 2007).

The aim of this study was to investigate prion gene polymorphism at codon 154 of interest in common breeds of sheep in Slovakia to provide information about their susceptibility to scrapie.

Material and methods

The material involved 82 sheep of two breeds (Lacaune and Tsigai) and four crossbreeds (Tsigai × Lacaune, Improved Valachian × Lacaune, Improved Valachian × Lacaune × East Friesian Sheep Breed and Lacaune × East Friesian Sheep Breed). Ovine genomic DNA was extracted from blood samples by salting out method (Miller et al., 1987). Genetic analysis of the PrP gene was realised by an allelic discrimination technique using hydrolysis probe TaqMan. The assay was set up for the analysis of codon 154 to discriminate between R (arginine – susceptibility to scrapie) and H (histidine – partially resistant to scrapie). Allelic discrimination technique consists in the amplification of specific regions of DNA using couples of primers not marked and fluorochromes-labelled TaqMan probes specific for the mutations relative to the interested loci. The sequences of primers and probes described by Vascellari et al. (2005) are shown in Table 1. The reaction

Table 1 Primers and probes used for the analysis of PrP polymorphism of codon 154 by the allelic discrimination assay

Name (1)	Position (2)	Sequence (5' to 3') (3)
Primers (4) 154-For 154-Rev	(503-523) (575-552)	TGGCAATGACTATGAGGACCG TGGTCTGTAGTACACTTGGTTGGG
TaqMan MGB probes (5) 154 – Arg (FAM) 154 – His (VIC)	(526-541) (525-542)	ACTATCgTGAAAACAT TACTATCaTGAAAACATG

Tabuľka 1 Primery a próby použité pre analýzu PrP polymorfizmu kodónu 154 použitím metódy alelickej diskriminácie (1) názov, (2) pozícia, (3) sekvencia (5'-3'), (4) primery, (5) TaqMan MGB próby

mixture in total volume 25 µl contained 2 × Maxima Probe qPCR Master Mix without ROX (Fermentas), 0.3 µM of each primer, 0.2 µM of each probe and 10 ng DNA template. The PCR amplification and allelic discrimination assay were carried out using the real-time thermocycler Rotor-Gene 6000® (Qiagen) following standard two step thermal profile by Vascellari et al. (2005). The fluorescence is measured at each amplification cycle by using Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7. Using two probes (one for each nucleotide) marked with two different fluorochromes, it is possible to discriminate at the same time the presence of the 2 alleles. The specificity of the probes allows only the perfect alignments between probe and filament to produce a fluorescent signal. In the case of mismatch (a different base of the DNA mould and sample) the hybridisation is strongly inhibited with a consequent negligible release of fluorescence. The result of this reading is the classification in 2 categories: homozygote (samples with one of the 2 alleles) and heterozygote (samples with both the alleles).

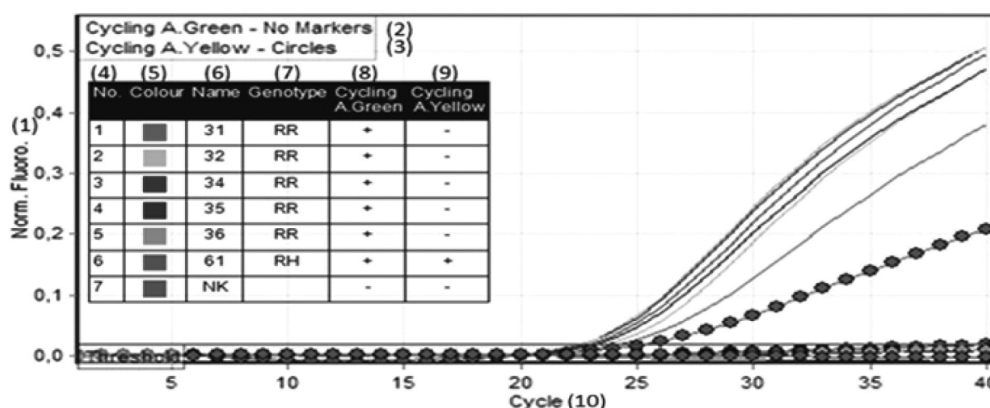
Results and discussion

The PrP gene variability at codon 154 in sheep was carried out by allelic discrimination assay. This technique uses two probes; the first, specific for the allele R is labelled with FAM and the second, specific for the allele H, is labelled with VIC. In either assay, a substantial increase in FAM fluorescence indicates

a homozygous RR, a substantial increase in VIC fluorescence indicates a homozygous HH, and intermediate increase in both signals usually indicates a heterozygote RH. The emitted fluorescence was collected during the step of annealing the PCR cycle. At the end of the amplification, a Rotor-Gene 6000 Series Software 1.7 identified the marker components and established the contribution of each one, allowing the identification of the genotypes. The patterns of results from the real-time allelic discrimination assay for the homozygous genotype RR and heterozygous genotype RH for codon 154 are shown in Figure 1. To help score the genotypes the Rotor-Gene software allows endpoint fluorescence values for the two dyes to be automatically corrected for background and plotted against each other in bi-directional scatter plots (Figure 2). The clustering of samples in scatter plots in addition to the real-time fluorescence traces gives easy and accurate genotype scoring.

The predominance of homozygote genotype RR was detected in sheep population. Heterozygote genotype RH was present in breed Lacaune (1 animal) and crossbreeds Improved Valachian × Lacaune (2 animals) and Improved Valachian × Lacaune × East Friesian Sheep Breed (1 animal). Homozygote genotype HH was not observed. Detailed genotype and gene frequencies per breed and crossbreed are presented in Table 2.

The allele R has been reported due to its high association with delayed onset of symptoms for classical scrapie strains. The effect of allele H on scrapie remains controversial, because

**Figure 1** The patterns of results from the real-time allelic discrimination assay for the homozygous genotype RR and heterozygous genotype RH for codon 154

— FAM labelled probe (R allele); -●-●- VIC labelled probe (H allele)

Obrázok 1 Schéma výsledkov z real-time analýzy alelickej diskriminácie pre homozygotný genotyp RR a heterozygotný genotyp HR kodónu 154

(1) normalizovaná fluorescencia, (2) cyklovanie zeleným kanálom – bez značky, (3) cyklovanie žltým kanálom – s krúžkom, (4) číslo, (5) farba, (6) názov, (7) genotyp, (8) cyklovanie zeleným kanálom, (9) cyklovanie žltým kanálom, (10) cyklus
— FAM značená próba (R alela); -●-●- VIC značená próba (H alela)

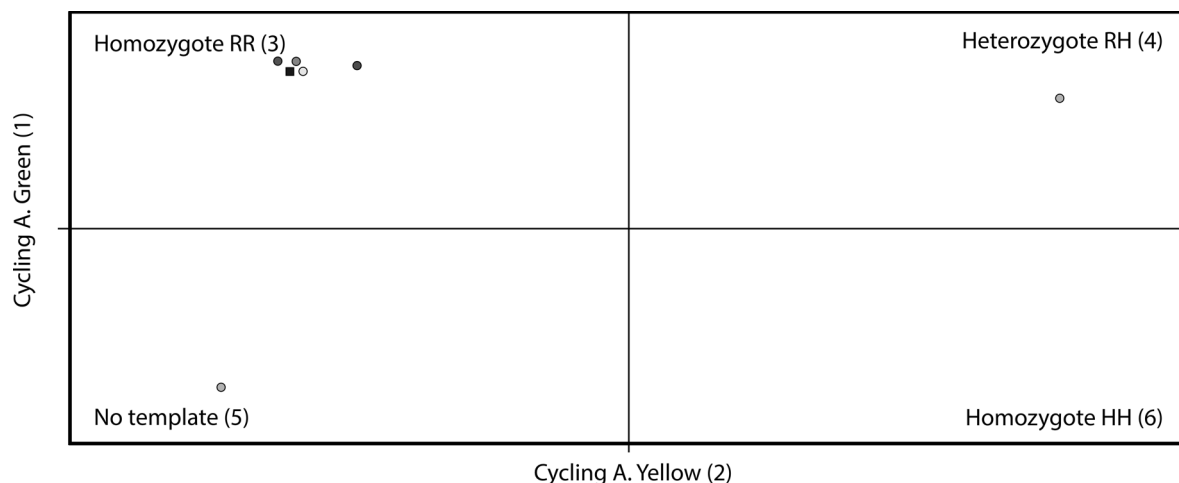


Figure 2 Representative results of scatter plot analysis of TaqMan assay

Obrázok 2 Reprezentatívne výsledky rozptylu TaqMan analýzou

(1) cyklovanie zeleným kanálom, (2) cyklovanie žltým kanálom, (3) homozygot RR, (4) heterozygot RH, (5) bez templátu, (6) homozygot HH

Table 2 Frequency of genotypes and alleles of 154 codon in the population of sheep breeds

Breed (1)	Total (2)	Genotype frequencies (3)			Allele frequencies (4)	
		RR	RH	HH	R	H
LC	36	0.9722	0.0278	0	0.9681	0.0139
T	15	1	0	0	1	0
T/LC	14	1	0	0	1	0
IV/LC	13	0.8462	0.1538	0	0.9231	0.0769
IV/LC/VF	3	0.6667	0.3333	0	0.8333	0.1667
LC/VF	1	1	0	0	1	0
TOTAL(5)	82	0.9512	0.0488	0	0.9756	0.0244

Breed: LC – Lacaune, T – Tsigai, IV – Improved Valachian, VF – East Friesian Sheep Breed

Plemeno: LC – lacon, C – cigaja, ZV – zošľachtená valaška, VF – východofrízská ovca

Tabuľka 2 Genotypové a alelové frekvencie kodónu 154 v populácii ovčích plemien

(1) plemeno, (2) celkom, (3) genotypové frekvencie, (4) alelové frekvencie, (5) celkom

it presented protection against scrapie in some breeds (Hunter, 1997), but it was susceptible in other breeds (Acutis et al., 2006) and even presented a positive risk to Nor98 scrapie (Colussi et al, 2008, Guan et al., 2011). The allele R was absolutely predominant (97.56%) in all breed sheep and only four heterozygotes with H were detected. RR and RH genotypes across all breeds were 0.9512 and 0.0488 respectively. These data were consistent with observations in other studies. In Spain, Acín et al. (2004), found the R allele the most common when analysing sheep from different breeds. The frequencies of allele R were predominated in the breeds of Rasa Aragonesa and Ansotana (97.3%, 97.8 %, respectively). In population of the Churra Tensina breed there was slight superiority of allele R (66.7 %). In the breeds of Ojinegra, Cartera, Maellana, Roya Bieblitana only allele R was found. The high superiority of the allele R (99.44 %) in population of Chines Hu sheep was reported by Guan et al. (2011). Analysing 358 sheep from 3 breed, Harrington et al. (2009) also found the RR genotype to be the most common. The second most observed genotype in all breeds was RH. The HH genotype was present only in one animal in Rambouillet breed.

Conclusion

It may be concluded that in the population of all sheep breeds codon 154 of PrP gene with a superiority of genotype RR and a superiority of allele R is present. It seems that Slovak sheep have a low risk to scrapie according to this allele distribution, which seems to delay the progression of scrapie. Genetic structure examined in population of all sheep breeds remained within the range quoted in literature for other cattle breeds.

Súhrn

Cieľom štúdie bolo preskúmať polymorfizmus prion proteínového génu v kodóne 154 plemien oviec bežne chovaných na Slovensku s cieľom poskytnúť informácie o ich vnímavosti ku scrapie. Materiál zahŕňal 82 oviec. Genomická DNA bola izolovaná zo vzoriek krvi vysolovacou metódou. Genetická analýza PrP génu bola realizovaná metódou alelickej diskriminácie použitím TaqMan próby. V populácii bola detegovaná prevaha homozygotného genotypu RR. Heterozygotný genotyp RH bol prítomný pri plemene lacaune (1 zvierat) a pri krížencoch

zošľachtená valaška × lacaune (2 zvieratá) a zošľachtená valaška × lacaune × východofrízka ovca (1 zviera). Homozygotný genotyp HH nebol pozorovaný.

Kľúčové slová: ovce, alelická diskriminácia, scrapie, PRNP, kodón 154

Acknowledgments

This work has been supported by the grants: The Slovak Research and Development Agency under the contract No. LPP-0220-09, No. APVV-0636-11 and the Excellence Center for Agrobiodiversity Conservation and Benefit project (ITMS: 26220120015) implemented under the Operational Programme Research and Development financed by the European Fund for Regional Development.

References

- ACÍN, C. – MARTÍN-BURRIEL, I. – GOLDMANN, W. – LYAHYAI, J. – MONZÓN, M. – BOLEA, R. – SMITH, A. – RODELLAR, C. – BADIOLA, J. J. – ZARAGOZA, P. 2004 Prion protein gene polymorphisms in healthy and scrapie-affected Spanish sheep. In: *Journal of General Virology*, vol. 85, 2004, p. 2103 – 2110.
- ACUTIS, P. L. – BOSSERS, A. – PRIEM, J. – RIINA, M. V. – PELETTI, S. – MAZZA, M. – CASALONE, C. – FORLONI, G. – RU, G. – CARAMELLI, M. 2006. Identification of prion protein gene polymorphisms in goats from Italian scrapie outbreaks. In: *J. Gen. Virol.*, vol. 87, 2006, no. 4, p. 1029–1033.
- BUSCHMANN, A. – LÜHKEN, G. – SCHULTZ, J. – ERHARDT, G. – GROSCHUP, M. H. 2004 Neuronal accumulation of abnormal prion protein in sheep carrying a scrapie-resistant genotype (PrPARR/ARR). In: *Journal of General Virology*, vol. 85, 2004, p. 2727 – 2733.
- CAMBULI, C. – GALLI, A. – BONGIONI, G. 2005. PrP gene polymorphisms associated to scrapie susceptibility in Bergamasca breed sheep. In: *Italian Journal Animal Science*, 2005.
- COLUSSI, S. – VACCARI, G. – MAURELLA, C. – BONA, C. – LORENZETTI, R. – TROIANO, P. – CASALINUOVO, F. – DI SARNO, A. – MANIACI, M. G. – ZUCCON, F. – NONNO, R. – CASALONE, C. – MAZZA, M. – RU, G. – CARAMELLI, M. – AGRIMI, U. – ACUTIS, P. L. 2008. Histidine at codon 154 of the prion protein gene is a risk factor for Nor98 scrapie in goats. In: *J. Gen. Virol.*, vol. 89, 2008, p. 3173 – 3176.
- GUAN, F. – PAN, L. – LI, J. – TANG, H. – ZHU, CH. – SHI, G. 2011. Polymorphisms of the prion protein gene and their effects on litter size and risk evaluation for scrapie in Chinese Hu sheep. In: *Virus Genes*, vol. 43, 2011, p. 147 – 152.
- HARRINGTON, R. D. – HERRMANN-HOESING, L. M. – WHITE, S. N. – O'ROURKE, K. I. – KNOWLES, D. P. 2009. Ovine progressive pneumonia provirus levels are unaffected by the prion 171R allele in an Idaho sheep flock. In: *Genetics Selection Evolution*, vol. 41, 2009, no. 17, p. 1 – 7.
- HUNTER, N. 1997. PrP genetics in sheep and the implications for scrapie and BSE. In: *Trends Microbiol.*, vol. 5, 1997, no. 8, p. 331 – 334.
- HUNTER, N. 2000. Transmissible spongiform encephalopathies. In *Breeding for Disease Resistance in Farm Animals*, p. 325 – 339. Edited by R. F. E. Axford, S. C. Bishop, F. W. Nicholas & J. B. Owen. Wallingford, UK: CAB.
- JOHNSON, M. L. – EVONIUK, J. M. – STOLTENOW, CH. L. – O'ROURKE, K. I. – REDMER, D. A. 2007 Development of an assay to determine single nucleotide polymorphisms in the prion gene for the genetic diagnosis of relative susceptibility to classical scrapie in sheep. In: *J. Vet. Diagn. Invest.*, vol. 19, 2007, p. 73 – 77.
- MILLER, S. A. – DYKES, D. D. – POLESKY, H. F. 1987. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In: *Nucleic Acids Research*, vol. 16, 1987, p. 1215.
- PRUSINER, S. B. 1982. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. In: *Science*, vol. 216, 1982, p. 136 – 144.
- ROLINEC, M. – BÍRO, D. – ŠIMKO, M. – JURÁČEK, M. – GÁLIK, B. 2012. Analýza hematologických parametrov krvi oviec počas in vivo experimentu. In: *Lazarove dni výživy a veterinárnej dietiky X. Košice: Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie*, 2012, s. 238 – 242. ISBN 978-80-8077-282-6.
- VACCARI, G. – SCAVIA, G. – SALA, M. – COSSEDDU, G. – CHIAPPINI, B. – CONTE, M. – ESPOSITO, E. – LORENZETTI, R. – PERFETTI, G. – MARCONI, P. – SCHOLL, F. – BARBARO, K. – BELLA, A. – NONNO, R. – AGRIMI, U. 2009. Protective effect of the AT137RQ and ARQK176 PrP alleles against classical scrapie in Sarda breed sheep. In: *Vet. Res.*, vol. 40, 2009, p. 19.
- VAN POUCKE, M. – VANDESOMPELE, J. – MATTHEEUWS, M. – VAN ZEVEEREN, A. – PEELMAN, L. J. 2005. A dual fluorescent multiprobe assay for prion protein genotyping in sheep BMC. In: *Infectious Diseases*, vol. 5, 2005, p. 13.
- VASCELLARI, M. – AUFIERO, G. M. – NONNO, R. – AGRIMI, U. – VACCARI, G. – BASILICATA, L. – FALCARO, C. – MANCIN, M. – MARCONI, S. – MUTINELLI, F. 2005. Diagnosis and PrP genotype target of scrapie in clinically healthy sheep of Massese breed in the framework of a scrapie eradication programme. In: *Arch. Virol.*, vol. 150, 2005, p. 1959 – 976.
- WILLIAMS, E. S. 2005. Chronic Wasting Disease. In: *Vet. Pathol.*, vol. 42, 2005, p. 530 – 549.

Contact address:

Ing. Martina Miluchová, PhD., SUA in Nitra, Department of Animal Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: Martina.Miluchova@uniag.sk

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 61 – 64

KAPPA-CASEIN GENE POLYMORPHISM (CSN3) AND ITS EFFECT ON MILK PRODUCTION TRAITS

POLYMERFIZMUS GÉNU KAPPA-KAZEÍN (CSN3) A JEHO VPLYV NA UKAZOVATELE PRODUKCIE MLIIEKA

Anna TRAKOVICKÁ, Nina MORAVČÍKOVÁ, Alica NAVRÁTILOVÁ

Slovak University of Agriculture in Nitra, Slovakia

The aim of this study was to evaluate the relationship between the polymorphism in the kappa - casein gene and milk production traits in the crosses of Simmental and Holstein cattle breeds. A total of 80 hair roots samples were used to investigate how CSN3 gene polymorphisms affect milk production traits. The polymorphism of kappa - casein gene on bovine chromosome 6 was genotyped by using the polymerase chain restriction fragment length polymorphism. The digestion of PCR products with restriction enzyme *Hind*III revealed two alleles: the A allele gave one fragment, 443 bp in length and the B allele gave two fragments of 348 and 95 bp. The predominant allele was A with observed frequency 0.76. All three genotypes AA, AB and BB were detected in population. The most frequent genotype was AA with frequency 0.575. The results from the statistical association analysis between CSN3 genotypes and milk production parameters – milk, protein and fat yield (kg) in standard length of lactation were not significant.

Keywords: dairy cattle, kappa - casein gene, milk production, polymorphism

The increase of component contents in milk and improved quality of its technological properties are pressured through the use of main selection factor of the program for cattle milk performance improvement (Ziemiński et al., 2005). Milk components in cattle are quantitative traits, being influenced by environmental and genetic factors (allelic variations at many loci). The bovine milk specific proteins include four casein genes: α_{s1} -, β -, α_{s2} - and κ -casein (CSN1S1, CSN2, CSN1S2 and CSN3, respectively) producing approximately 80 % of the protein content of cow's milk (Farrel et al., 2004). The genes that are correlated with performance parameters explain a part of the genetic variance and can improve the estimation of breeding value. Therefore, they can be used as a suitable supplement to conventional breeding procedures (Příbyl, 1995). Their polymorphism, related to the differences in animal performance can be taken into account in the selection process. Casein genes of cattle are located in the q31 – 33 regions on chromosome 6. They form a cluster of four closely linked genes located in the following order: α_{s1} , β , α_{s2} and κ . The entire cluster is 200 kb in length (Rijnkels et al., 1997). The α_{s1} -, β - and α_{s2} -casein genes are linked most closely and form an evolutionary related family, whereas the κ -casein gene (CSN3) is at least 70 kb away from the others (Ferretti et al., 1990). Casein synthesis occurs at a definitive developmental stage, it is tissue specific and under complex multigene control. Genetic polymorphisms in the casein genes allow the determination of casein haplotypes. The relative concentration of caseins in the mammary gland is also affected by casein genetic variants and has a significant impact on micelle size and technological properties of milk (Juszczak et al., 2001). The α_{s1} - and α_{s2} -casein genes are the least polymorphic. Study of the β -casein polymorphism at the protein level showed that cattle had 11 allelic variants of the gene encoding it, A1, A2, and B alleles being the most frequent (Sulimova et al., 2007). Kappa-casein considerably differs from other caseins in structure and other properties. They are highly homologous to the γ chain of fibrinogen and fulfil a function similar to the function of this protein: they serve a stabilizing factor during the formation of

micelles structure in curdling milk (Grosclaude, 1988). Kappa-casein constitutes about 25% of the casein fraction of milk and several polymorphisms have been found for this protein. The CSN3 gene is located on chromosome 6q31 and consists of 5 exons (Martin et al., 2002). The overall length of the gene is close to 13 kb, but most of the coding sequences for the mature protein are contained in the fourth exon (Azevedo et al., 2008). Eleven genetic haplotypes of CSN3 that differ in the coding region have been identified to date (Farrell et al., 2004), the most frequent being the A and B alleles (Prizenberg et al., 1999). Kappa-casein variants A and B differ by two amino acid substitutions, Thr 136/Ile and Asp148/Ala (Lin et al., 1992). These two point mutations are located relatively close to several glycosylation sites and probably affect the structure of the protein and glycosylation patterns (Fox, 1992). These genetic variants are related to milk performance traits of cows, milk instability for processing, and to cheese production in particular. The B variant of CSN3 gene is associated with an increase in milk protein as well as cheese production because it plays an important role in preserving the other caseins from precipitation, with superior coagulation properties that give the milk higher properties for cheese production (Van, 1991). The B allele only promotes an increase in cheese yield and improves cheese quality, however, it also correlates with other valuable parameters of milk productivity and chemical composition of milk. The effect of the CSN3 allele on the milk performance traits has also been reported in many studies involving Kamiński (2004), Kučerová et al. (2006), Heck et al. (2009) or Bartoňová et al. (2012). The aim of this work was to evaluate the effect of SNP CSN3 genotype on milk production traits in standard length of lactation in crosses of Simmental and Holstein cattle breeds.

Material and methods

Animals and DNA extraction method

The total numbers of hair roots and blood samples were taken from 80 cows (Crosses of Simmental and Holstein). Genomic

DNA for genotyping was extracted from hair roots with isolation kit Extract-N-Amp™ Tissue PCR (Sigma-Aldrich) and from blood samples with standard phenol – chloroform extraction method (Miller et al., 1988). DNA concentrations were estimated by spectrophotometer measuring the optical density at wave length of 260 nm.

Analyses of polymorphisms

A 443 bp fragment containing analyzed polymorphic site of CSN3 gene was amplified by PCR using forward and reverse primers according to Schlieben et al. (1991). In case of blood samples PCR was carried into 25 µl final volume containing: 1 × PCR buffer with (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM of dNTPs, 0.5 µM of primers, 1 U Tag DNA polymerase and 50 ng genomic DNA template. The PCR reaction of genomic DNA isolated from hair roots was prepared according to protocol of isolation kit into 20 µl final volume containing: Extract-N-Amp reaction mixture, 0.5 µM of each primers and DNA extract. Thermal cycling conditions included: an initial denaturation step at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min, 72°C for 1 min and a final extension at 72 °C for 8 min. Genotype analyses were performed using PCR-RFLP method. The PCR products of CSN3 gene were digested with 1 µl of *Hind*III (Promega) restriction enzyme at 37 °C in time 3 hours. The digestion products were separated by horizontal electrophoresis in 2% agarose gels in 0.5 × TBE (130 V for 30 min) stained with GelRed (Biotium) prior to visualization under UV light.

Table 1 Primer sequences of CSN3 locus

Locus (1)	Primer sequence (2)
CSN31	F 5' - GCT GAG CAG GTA TCC TAG TTA T - 3'
	R 5' - CTT CTT TGA TGT CTC CTT AGA G - 3'

F = forward, R = reverse

Source: Schlieben et al., 1991

Tabuľka 1 Sekvencie primerov lokusu CSN3
(1) lokus, (2) sekvencia primeru

Statistical analysis

The allele and genotype frequencies of CSN3 polymorphism were examined for deviation from Hardy – Weinberg equilibrium using χ^2 test. The effect of CSN3 genotype on milk production traits in standard length of lactation – milk, protein and fat yield were analysed using SAS 9.1 software.

Results and discussion

A single nucleotide polymorphisms of the bovine CSN3 gene located on chromosome 6 based on the use of restriction fragment length polymorphism was detected. After digestion of 443 bp PCR products with restriction enzyme *Hind*III three genotypes were determined. The digested AA PCR product exhibited one fragment of 443 bp, whereas the BB genotype gave two fragments of 348 and 95 bp. Figure 1 shows PCR product size and restriction patterns of all the three genotypes AA, AB and BB.

On the basis of the Hardy-Weinberg equilibrium (law), the expected frequencies of A and B alleles were in population of 80 cows 0.76 and 0.24, respectively. The observed frequencies of genotypes were 0.575 ($n = 46$), 0.363 ($n = 29$), 0.062 ($n = 5$) for AA, AB and BB genotype, respectively. The expected

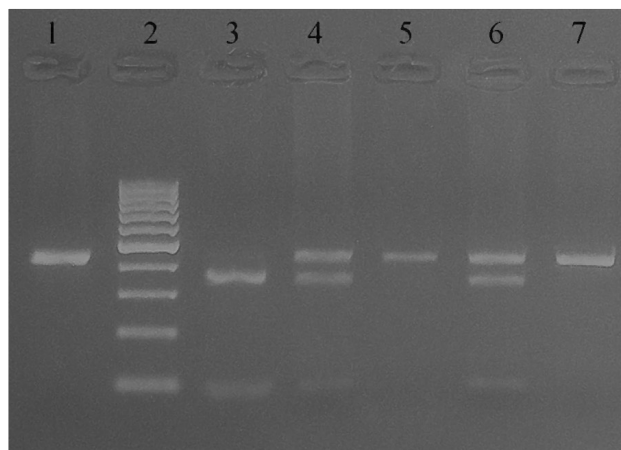


Figure 1 Representative results of PCR – RFLP analysis CSN3 on 2% agarose gel

1 – PCR product (443 bp), 2 – DNA ladder (100 bp), 3 – genotype BB (348 bp, 95 bp), 4 – genotype AB (443 bp, 348 bp, 95 bp), 5 – genotype AA (443 bp), 6 – genotype AB (443 bp, 348 bp, 95 bp)

Obrázok 1 Repräsentatívne výsledky PCR – RFLP analýzy CSN3 na 2% agarózovom géle

1 – PCR produkt (443 bp), 2 – DNA ladder (100 bp), 3 – genotyp BB (348 bp, 95 bp), 4 – genotyp AB (443 bp, 348 bp, 95 bp), 5 – genotyp AA (443 bp), 6 – genotyp AB (443 bp, 348 bp, 95 bp)

frequencies of the three genotypes were 0.572 (AA), 0.369 (AB) and 0.059 (BB). The most frequent genotype in population of crossbred cows was AA. Table 2 shows frequencies of the three detected genotypes. The calculated χ^2 test values indicate Hardy-Weinberg genetic equilibrium in populations.

Table 2 Frequency of alleles and genotypes of CSN3 locus

Cows (n = 80) (1)	Genotype (2)			Allele (3)		χ^2
	AA	AB	BB	A	B	
Number (4)	46	29	5	121	39	0.0226-
Frequency (5)	0.575	0.3625	0.0625	0.7563	0.2437	

$P > 0,05$

Tabuľka 2 Frekvencie alel a genotypov lokusu CSN3
(1) kravy, (2) genotyp, (3) alely, (4) počet, (5) frekvencia

Our findings were similar to results reported in other studies. Miluchová et al. (2009) identified high frequency of the A allele by using multiplex PCR – RFLP method in population of Pinzgau cattle. In evaluation of Czech Simmental cattle, Kučerová et al. (2006) reported frequency of the A allele 0.60 and the B allele 0.38, but in this study the E allele (0.02) was also detected. Similar results of allele and genotype frequencies in Czech Fleckvieh cattle reported Bartoňová et al. (2012). By using 9 different primer pairs, Keating et al. (2007) identified high dominance of the A allele (0.80) in various dairy cattle population. The PCR – RFLP method and restriction enzyme *Hind*III was also used in study of Simmental and Aberdeen Angus cattle (Curi et al., 2005), when the A allele was dominant. In contrary, Jann et al. (2004) reported in population of British Jersey cattle predominance of the B allele (0.71). The prevalence of the A allele in dairy cattle breeds is very frequent, because the A allele is associated with higher milk yield.

Table 3 shows the average values of milk, protein and fat yield in standard length of lactation. Differences between the average values of analyzed traits in comparison with cows with

Table 3 Basic statistical measurements of milk production in standard length of lactation

Trait (1)	\bar{x}	s	x_{\min}	x_{\max}	n
Milk yield in kg (2)	5042.45	1386.49	1840	7604	80
Fat yield in kg (3)	221.025	67.4516	78	374	80
Protein yield in kg (4)	161.1	42.7346	56	235	80

Tabuľka 3 Základné štatistické ukazovatele produkcie mlieka za obdobie normovanej laktácie (1) ukazovateľ, (2) produkcia mlieka v kg, (3) produkcia tuku v kg, (4) produkcia bielkovín v kg**Table 4** Means and standard deviations of milk production traits in cows of different CSN3 genotypes

Genotype (1)	n	Traits (means \pm SD) (2)			
		Milk yield in kg (3)	Fat yield in kg (4)	Protein yield in kg (5)	N
CSN3					
AA	46	5 114.2 \pm 1 308.3	222.8 \pm 67.3090	162.6 \pm 40.5443	46
AB	29	4 972.9 \pm 1 464.4	218.8 \pm 65.7365	159.4 \pm 44.5064	29
BB	5	4 786.0 \pm 1 877.1	217.8 \pm 92.5051	157.0 \pm 60.3448	5

Tabuľka 4 Priemerná hodnota a smerodajná odchýlka ukazovateľov produkcie mlieka v závislosti od CSN3 genotypu (1) genotyp, (2) ukazovateľ (priemerná hodnota \pm smerodajná odchýlka), (3) produkcia mlieka v kg, (4) produkcia tuku v kg, (5) obsah bielkovín v kg

AA, AB and BB genotype were lower and non-significant (Table 4). Significance of observed differences was also affected by number of data available for particular trait. However, based on the analysis it can be concluded that the A allele had in observed population potential positive effect on milk production traits. Milk, protein and fat yield were not significantly higher in cows with AA genotype. Similar results, but statistically significant were reported by Sitkowska et al. (2008) in population of Holstein cows. Higher milk production in cows with AA genotype was also detected in other studies (Tsiaras et al., 2005, Curi et al., 2005, Neubauerová et al., 2001). Heck et al. (2009) reported positive statistically significant effect of the B allele on protein content in milk of Holstein cows. Similar associations with the B allele have been reported in studies by Kučerová et al. (2006), Tsiaras et al. (2005) and Žitný et al. (2001); they suggest the positive effect of this allele on protein and fat contents in milk. The main influence of CSN3 gene on protein content was reported by Matejičková et al. (2010). Generally, it can be said that the A allele has positive effect on milk yield and the B allele on protein and fat yield. Testing the A and B alleles is of practical importance, because the milk of cows that carry the B allele of CSN3 has a better thermal resistance and shorter coagulation time, better curdles, and contains micelles of different size, which is preferable for cheese - making (Grosclaude et al., 1988). The cheese yield from the milk of cows with genotype BB is higher compared to the milk of AA cows (Sulimova et al., 2007). Selection for the B allele of CSN3 can be used as a part of cattle breeding programs in farms with tradition of cheese production. In the future, this association between CSN3 gene polymorphism and production traits in larger cattle population can be validated. That would increase the significance of the statistical analysis and the reliability of the obtained results.

Conclusions

By using PCR-RFLP method, single nucleotide polymorphism in the CSN3 gene was detected. In the studied population of 80 cows (crosses of Simmental and Holstein) all three genotypes AA, AB and BB were detected. The majority of cows (57.5 %) were dominant homozygous with genotype

AA. The Allele A was more frequent than the B allele (0.7563 vs. 0.2437). The observed population was in Hardy-Weinberg genetic equilibrium. Based on the statistical analysis CSN3 polymorphism had no significant effect on evaluated milk production parameters, but the results indicate positive effect of genotype AA on milk, protein and fat yield. This finding was contrary to other studies which reported that the A allele had a significant positive effect on milk production but a negative one for the yield of fat and protein. Genotyping the alleles A and B of CSN3 gene is of practical importance, because the allele B is correlated with commercially valuable parameters of milk productivity and improves the cheese yielding capacity.

Súhrn

Cieľom práce bolo zistiť vzťah medzi polymorfizmom génu kódujúceho kappa - kazeín a ukazovateľmi mliekovej úžitkovosti v skupine kríženiak simentálskeho a holštajnského plemena. Na hodnotenie vplyvu polymorfizmu génu CSN3 na ukazovatele produkcie mlieka bolo použitých celkovo 80 vzoriek pozostávajúcich z chlповých cibúl. Genotypovanie na základe polymorfizmu tohto génu lokalizovaného na bovinom chromozóme 6 bolo uskutočnené s využitím polymorfizmu dĺžky reštrikčných fragmentov. Vplyv polymorfizmu bol analyzovaný pomocou softvéru SAS 9.1. Štiepením produktu PCR reakcie reštrikčným enzýmom *HindIII* sme zistili prítomnosť dvoch alel: alely A na základe štiepneho fragmentu s veľkosťou 443 bp a alely B s dvoma fragmentmi veľkými 348 a 95 bp. Prevládajúcou bola alela A s frekvenciou výskytu 0,76. V populácii sme zistili prítomnosť troch genotypov AA, AB a BB. Najčastejšie sa vyskytoval genotyp AA s frekvenciou 0,575. Výsledky štatistickej analýzy vzťahov medzi genotypmi CSN3 a ukazovateľmi produkcie mlieka za obdobie normovanej laktácie boli nepreukazné.

Kľúčové slová: mliekový dobytok, gén kappa - kazeín, produkcia mlieka, polymorfizmus

Acknowledgments

This work was supported by the Slovak Research and Development Agency under the contract No. APVV-0636-11 and Centre of excellence for preservation and utilization of genetic resources ECOVA No. 26220120015.

References

- AZEVEDO, A. L. – NASCIMENTO, C. S. – STEINBERG, R. S. – CARVALHO, M. R. – PEIXOTO, M. G. – TEODORO, R. L. – VERNEQUE, R. S. – GEIMARÃES, S. E. – MACHADO, M. A. 2008. Genetic polymorphism of the kappa – casein gene in Brazilian cattle. In: Genetics and molecular research, vol. 7, 2008, p. 623 – 630.
- BARTOŇOVÁ, P. – VRTKOVÁ, I. – KAPLANOVÁ, K. – URBAN, T. 2012. Association between CSN3 and BCO2 gene polymorphisms and milk performance traits in the Czech Fleckvieh cattle breed. In: Genetic and Molecular Research, vol. 11, 2012, p. 1058 – 1063.
- CURI, R. A. – OLIVEIRA, H. N. D. – GIMENES, M. A. – SILVEIRA, A. C. – LOPES, C. R. 2005. Effects of CSN3 and LGB gene polymorphisms on production traits in beef cattle. In: Genetics and Molecular Biology, vol. 28, 2005, p. 262 – 266.
- FARREL, H. M. – JIMENEZ – FLORES, R. – BLECK, G. T. – BROWN, E. M. – BUTLER, J. E. – CREAMER, L. K. – HICKS, C. L. – HOLLAR, C. M. – NG – KWAI – HANG, F. – SWAISGOOD, H. E. 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk – Sixth Revision. In: Journal of Dairy Science, vol. 87, 2004, p. 1641 – 1674.
- FERRETTI, L. – LEONE, P. – SAGARMELLA, V. 1990. Long Range restriction Analysis of the Bovine Casein Genes. In: Nucleic Acids Research, vol. 18, 1990, p. 6829 – 6833.
- FOX, P. F. 1992. Advanced Dairy Chemistry Proteins. London : Elsevier Science Publishing, 1992
- GROSCLAUDE, F. 1988. Genetic Polymorphism of the Main Bovine Lactoproteins: Relationship with Milk Yield, Composition, and Cheese Yielding Capacity. In: INRA Prod. Anim., vol. 1, 1988, p. 5 – 17.
- HECK, J. M. L. – SCHENNINK, A. – VAN VALENBERG, H. J. F. – BOVENHIUS, H. – VISKER, M. H. P. W. – VAN ARENDONK, J. A. M. – VAN HOOIJDONK, A. C. M. 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. In: Journal of Dairy Science, vol. 92, 2009, p. 1192 – 1202.
- JANN, O. C. – IBEAGHA – AWEMU, E. M. – ÖZBEYAZ, C. – ZARAGOZA, P. – WILLIAMS, J. L. – AJMONE – MARSAN, P. – LENSTRA, J. A. – MOAZAMI GOUDARZI, K. – ERHARDT, G. 2004. Geographic distribution of haplotype diversity at the bovine casein locus. In: Genetics Selection Evolution, vol. 36, 2004, p. 243 – 257.
- JUSZCZAK, J. – ERHARDT, G. – KUCZAJ, M. – ZIEMINSKI, R. – PANICKE, L. 2001. Zusammenhang zwischen κ -casein und β -Lactoglobulin-Varianten mit der Milchleistung und der Nutzungsdauer von Rindern der Schwarzbuntes Rind und Polnisches Rotvieh. In: Archiv Tierzucht Dummerstorf, vol. 44, 2001, p. 239 – 249.
- KAMIŃSKI, S. 2004. Polymorphism of milk protein genes in cosiny and regulatory regions and their effects on gene expression and milk performance traits. In: Animal Science Papers and Reports, vol. 22, 2004, p. 109 – 113.
- KEATING, A. F. – DAVOREN, P. – SMITH, T. J. – ROSS, R. P. – CAIRUS, M. T. 2007. Bovine κ -casein Gene Promoter Haplotypes with Potential Implications for Milk Protein Expression. In: Journal of Dairy Science, vol. 90, 2007, p. 4092 – 4099.
- KUČEROVÁ, J. – METĚJČKOVÁ, A. – JANDUROVÁ, O. M. – SØRENSEN, P. – NĚMCOVÁ, E. – ŠTÍPKOVÁ, M. – KOTT, T. – BOUŠKA, J. – FRELICH, J. 2006. Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. In: Czech journal of animal science, vol. 51, 2006, p. 241 – 247.
- LIN, C. Y. – SABOUR, M. P. – LEE, A. J. 1992. Direct typing of milk proteins as an aid for genetic improvement of dairy bulls and cows: A review. In: Animal Breeding Abstract, vol. 60, 1992, p. 1 – 10.
- MARTIN, P. – SZYMANOWSKA, M. – ZWIERZCOWSKI, L. – LEROUX, C. 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. In: Reproduction Nutrition Development, vol. 42, 2002, p. 433 – 459.
- MATĚJČKOVÁ, Z. – ŠTÍPKOVÁ, M. – KYSELOVÁ, J. – RYCHTÁŘOVÁ, J. – BOLEČKOVÁ, J. 2010. Geny mléčných bílkovin a kvalita mléka u českého strakatého skotu. In: náš chov, roč. 70, 2010, s. 72 – 74.
- MILLER, S. A. – DYKES, D. D. – POLESKY, F. H. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In: Nucleic Acids Research, vol. 16, 1988, p. 1215.
- MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – GÁBOR, M. 2009. Molekulárno-genetická detekcia génov CSN3 a LGB v populácii slovenského pinzgauského plemena metódou MULTIPLEX PCR – RFLP. In: Acta fytotechnica et zootechnica – Mimoriadne číslo, 2009, s. 450 – 454.
- NEUBAUEROVÁ, V. 2001. Detekce genetických markerů a možnosti jejich využití u skotu a dalších kopytníků (Thesis). České Budějovice : ZFJU, 2001, 211 s.
- PRIZENBERG, E. M. – KRAUSE, I. – ERHARDT, G. 1999. SSCP Analysis et the Bovine CSN3 Locus Discriminates Six Alleles Corresponding to Known Protein Variants (A, B, C, E, F, and G) and Three New DNA Polymorphisms (H, I, A (1)). In: Animal Biotechnology, vol. 10, 1999, p. 49 – 62.
- PŘIBYL, J. 1995. A way of using markers for farm animal selection. In: Czech Journal of Animal Science, vol. 77, 1995, p. 1106 – 1113.
- RJUNKELS, M. – KOOIMAN, P. M. – DEBOER, H. A. – PIEPER, F. R. 1997. Organization of the Bovine Casein Gene Locus. In: Mammalian Genome, vol. 8, 1997, p. 148 – 152.
- SCHLIEBEN, S. – ERHARDT, G. – SENFT, B. 1991. Genotyping of bovine kappa – casein following DNA sequence amplification and direkt sequencing of kappa-CNE PCR produkt. In: Animal Genetics, vol. 22, 1991, p. 333 – 342.
- SITKOWSKA, B. – WOJCIECH, N. – WIŚNIEWSKA E. 2008. Relations between kappa-casein polymorphism (CSN3) and milk performance traits in heifer cows. In: Journal Central European Agriculture, vol. 9, 2008, p. 641 – 644.
- SULIMOVA, G. E. – AHANI – AZARI, M. – ROSTAMZADEH, J. – MOHAMMAD – ABADI, M. R. – LAZEBNY, O. E. 2007. κ -casein Gene (CSN3) Allelic Polymorphism in Russian Cattle Breeds and Its Information Value as a Genetic Marker. In: Russian Journal of Genetics, vol. 43, 2007, p. 73 – 79.
- TSIARAS, A. M. – BARGOULI, G. G. – BANOS, G. – BOSCO, C. M. 2005. Effect of Kappa – Casein and Beta – Lactoglobulin Loci on Milk Production Traits and Reproductive Performance of Holstein Cows. In: Journal of Dairy Science, vol. 88, 2005, p. 327 – 334.
- ZIEMIŃSKI, R. – JUSZCZAK, J. – CZARNIK, U. – ĆWIKŁA, A. – ZABOLEWICZ, T. – WALAWSKI, K. 2005. Związek między polimorfizmem białek mleka i zróżnicowaniem wydajności oraz składu mleka krów utrzymywanych w stadzie bydła rasy czarno-białej Kombinatu Rolnego Kietrz. In: Acta Scient. Pol., Zoot., vol. 4, 2005, p. 163 – 170.
- ŽITNÝ, J. – KÚBEK, A. – TRAKOVICKÁ, A. – OSTERTÁG, I. 2001. Štruktúra genotypových variantov kapa – kazeínu mlieka v chránených chovoch slovenského strakatého plemena. In: Slovenský chov, roč. 6, 2001, s. 36 – 37.

Contact address:

Ing. Nina Moravčíková, SUA in Nitra, Department of Animal Genetics and Breeding Biology, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: nina.moravcikova1@gmail.com

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 65 – 68

**VARIABILITA RASTU VRECKOVÉHO PLÔDIKA PSTRUHA POTOČNÉHO
(*SALMO TRUTTA MORPHA FARIO* LINNAEUS, 1758) VPLYVOM DIFERENCOVANEJ
VÝŽIVY POČAS POČIATOČNÉHO ODCHOVU
GROWTH VARIABILITY OF BROWN TROUT FRY
(*SALMO TRUTTA MORPHA FARIO* LINNAEUS, 1758)
AFFECTED BY DIFFERENTIATED DIET DURING INITIAL REARING**

Jaroslav ANDREJÍ,¹ Petr DVOŘÁK,² Milan ŠIMKO,¹ Miroslav JURÁČEK,¹ Michal PETIJA¹

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Slovenská republika¹

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Česká republika²

The aim of this study was to assess the effect of differentiated nutrition on the sac-fry growth intensity of brown trout (*Salmo trutta m. fario*). In this experiment, two dry feed mixtures with different feeding program were used. Sac-fry rearing was realized in troughs with volume of 700 l during 113 days. During the rearing period, the feed mixture was fed *ad libitum*. The first tested group of fish (group A) was fed by mixture with different nutrient composition (crude proteins 56 % and 50 %, fat 12 % and 20 %) for individual rearing stages. The second tested group of fish (group B) was fed by mixtures with constant nutrient composition (crude proteins 57 %, fat 15 %) for the whole rearing period. It was found that the group A had better results for estimated growth parameters ($Lt = 48.37 \pm 2.41$ mm; $w = 1.32 \pm 0.30$ g; $CF = 0.84$; $SLGR = 0.63$ %·d⁻¹; $SWGR = 2.12$ ·l) in comparison to the group B ($Lt = 42.90 \pm 2.23$ mm; $w = 1.20 \pm 0.32$ g; $CF = 0.83$; $SLGR = 0.52$ %·d⁻¹; $SWGR = 2.04$ %·d⁻¹). The attained results confirm that the application of mixture with different nutrient composition has a positive effect on the growth parameters of brown trout sac-fry rearing.

Keywords: *Salmo trutta morpha fario*, fry, specific growth rate, condition factor, growth, initial rearing

Pstruh potočný je naša pôvodná ryba vyskytujúca sa v tečúcich vodách horskej a podhorskej zóny. Pstruh potočný nie je druh, ale forma, ktorú v tečúcich vodách vytvára pstruh atlantický (*Salmo trutta* Linnaeus, 1758), resp. pstruh čiernomorský (*Salmo labrax* Pallas, 1811). Morfologicky sú to veľmi podobné druhy, ktoré osídľujú rieky kontinentálnej Európy (Holčík, 1998; Movchan, 2011). Z dôvodu vysádzania násad pstruha, resp. manažmentu voľných vôd zo strany Slovenského rybárskeho zväzu došlo k masívnej hybridizácii medzi oboma druhmi a strate medzipopulačnej divergencie (Kohout et al., 2012). Do určitej miery k tomu prispeli aj povojnové dovozy pstruha z Dánska, v 70. rokoch minulého storočia z Rakúska a v 90. rokoch z Talianska (Pokorný et al., 1998).

Aj keď je pstruh potočný pomerne rozšírenou a každoročne vysádzanou rybou na Slovensku, jeho produkcia ani zďaleka nedosahuje úroveň ďalšieho, ale nepôvodného druhu – pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). Je to najmä kvôli jeho rastovým vlastnostiam, za ktorými výrazne zaostáva (Randák et al., 2009). Obrat nastal po roku 2008 v súvislosti s prepuknutím ochorenia vírusovej hemoragickej septikémie, ktoré postihlo chovy pstruha dúhového až do takej miery, že mnohé z nich museli byť eradikované (Vankúšová et al., 2010). Voči tomuto ochoreniu je však pstruh potočný rezistentný a tak sa viacerí chovatelia preorientovali na chov pstruha potočného.

Cieľom práce bolo zistiť vplyv skrmovania nutrične rozdielných krmných zmesí na rastové parametre vreckového plôdika pstruha potočného počas počiatočného odchovu. V dôsledku absencie komerčne vyrábaných krmných zmesí pre pstruha potočného, sme v experimente otestovali krmné zmesi vyrábané pre pstruha dúhového.

Materiál a metódy

Krmy pokus sa realizoval v prevádzkových podmienkach v odchovnom zariadení Slovenského rybárskeho zväzu, miestna organizácia Martin, prevádzka Hruškov mlyn. Pokusný materiál pstruha potočného pochádzal z firmy Rybárstvo Brčná, s. r. o., odkiaľ bol vyliahnutý plôdik pstruha potočného po strávení približne 2/3 žltkového vrecka, t. j. vo veku 18 dní prevezený do vyššie spomínaného odchovného zariadenia. Tu sa plôdik umiestnil do štyroch prietochných žlabov s objemom 700 l po 15 000 ks na jeden žlab a od tohto termínu sa začalo s jeho rozkrmovaním. Odchov prebiehal počas celej doby pri teplote vody $8,5 \pm 0,1$ °C, pH 7,1, nasýtenie vody O₂ na prítoku 110 %, na odtoku 80 % a trval 113 dní. Po tomto termíne bol odchovávaný plôdik presadený na ďalší odchov do zemných rybníčkov.

Pre účely tohto pokusu boli vytvorené dve skupiny rýb v duplikáte. Prvej skupine rýb (skupina A) bola podávaná zmes od spoločnosti Dibaq, ktorá má krmný program založený na rozdielnom nutričnom a veľkostnom zložení krmiva v procese rozkrmovania. Použitá bola krmná zmes Microbaq 1 (od 1. do 63. dňa), Microbaq 8 (od 64. do 105. dňa) a Microbaq 10 (od 106. do 113. dňa), v súlade s odporúčaním daného výrobcu krmiva. Krmné zmesi boli podávané *ad libitum*, 8 – 4-krát denne počas celej doby odchovu, pričom na začiatku sa podávala častejšie a v menších množstvách, neskôr sa frekvencia krmenia znížila, ale súčasne sa zvýšil objem krmnej dávky. Aplikácia jednotlivých krmných zmesí a ich podrobnejšia charakteristika je uvedená v grafe 1 a tabuľke 1. Druhej skupine rýb (skupina B) bola podávaná zmes *ad libitum* (8 – 4-krát denne) od spoločnosti

Tabuľka 1 Výrobcom deklarovaný obsah živín a energie v skrmovaných krmných zmesiach

Krmivo (1)	Veľkosť častíc v mm (2)	SE v MJ (3)	NL v % (4)	Tuk v % (5)	Vláknina v % (6)	Popol v % (7)	BNLV v % (8)
Microbaq 1	0,4 – 0,8	19,6	56	12	0,5	11	14
Microbaq 8	1,0	20,8	50	20	0,5	10	13
Microbaq 10	1,45	20,8	50	20	0,5	10	13
Brutfutter F-0,5GR	0,5	20,8	57	15	0,4	11	6,7
Brutfutter F-0,7GR	0,7						
Brutfutter F-1,0MP	1,0						

SE – stráviteľná energia, NL – dusíkaté látky, BNLV – bezdusíkaté látky výtazkové

Table 1 Nutrient and energy content in used feed mixtures declared by producer

(1) feed, (2) size of particles, (3) digestible energy, (4) crude proteins, (5) fat, (6) crude fibre, (7) ash, (8) nitrogen free extract

Skretting, ktorej krmný program rozkrmovania plôdika pstruha je založený iba na rozdielnej veľkosti častíc, t. j. nutričné zloženie je počas celej doby rozkrmovania rovnaké. Použitá bola krmná zmes Brutfutter F-0,5GR (od 1. do 49. dňa), Brutfutter F-0,7GR (od 50. do 105. dňa) a Brutfutter F-1,0MP (od 106. do 113. dňa) opäť v súlade s odporúčaním daného výrobcu. Podrobnejšia charakteristika, ako aj aplikácia jednotlivých krmív, je uvedená v tabuľke 1 a na obr. 1.

Za účelom vyhodnotenia rastových parametrov sa týždenne odoberalo z každej skupiny 10 náhodne ulovených jedincov, ktorí sa do doby analýz konzervovali v 4 % roztoku formaldehydu (Spurný et al., 2004). Celkovo sa odoberalo 340 rýb, ktorým sa po osušení determinovala celková dĺžka

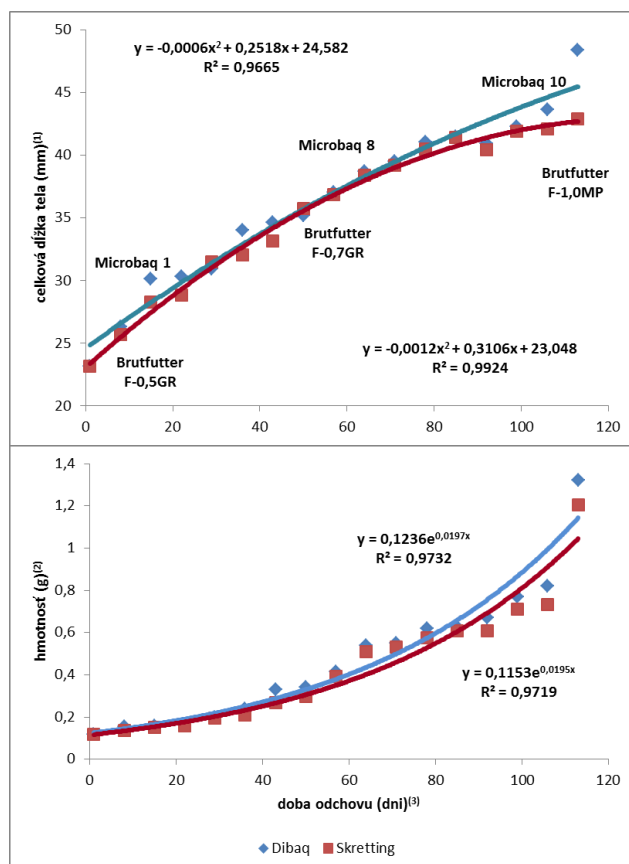
tela (*Lt*) pomocou analýzy digitálneho obrazu na stereomikroskope Olympus SZX-16 (Olympus Corporation, Japonsko) za použitia softvéru QuickPhoto Micro (v. 2.3, Promicra s.r.o., Česká Repulika) s presnosťou na 0,01 mm. Hmotnosť (*w*) sme zisťovali pomocou digitálnej váhy Radwag PS 3500/C/2 s presnosťou na 0,01 g. Na základe týchto údajov sme následne vyhodnotili špecifickú rýchlosť rastu dĺžkového (*SLGR*) aj hmotnostného (*SWGR*) a koeficient kondície (*CF*) podľa Fultona (Spurný et al., 2004; Twibell et al., 2009). Získané údaje boli štatisticky vyhodnotené v programe Statgraphic Centurion XV (StatPoint, Inc., USA) metódou párového t-testu a regresnou analýzou.

Výsledky a diskusia

S rozkrmovaním plôdika pstruha sa začalo vo veku 18 dní od vyliahnutia, pri počiatočnej priemernej hmotnosti 0,12 g a celkovej dĺžke tela 23,12 mm. Na konci odchovu dosiahla skupina A krmená zmesou Dibaq Microbaq priemernú hmotnosť 1,32 g a celkovú dĺžku tela 48,37 mm. Skupina B krmená zmesou Skretting Brutfutter s rovnakým nutričným zložením počas celej doby rozkrmovania, len s rozdielnou veľkosťou podávaných častíc, dosiahla za rovnaké obdobie priemernú hmotnosť 1,2 g a celkovú dĺžku tela 42,90 mm (tabuľka 2). V skupine A boli zaznamenané štatisticky významné ($P < 0,01$) vyššie hodnoty rastových parametrov rýb. Priemerný koeficient kondície dosiahol pri skupine A hodnotu 0,84; pri skupine B sa zaznamenala hodnota 0,83, bez štatistickej významnosti rozdielov ($P > 0,05$). Špecifická rýchlosť dĺžkového i hmotnostného rastu dosiahla vyššiu hodnotu pri rybách skupiny A. Podobne tomu bolo aj pri denných prírastkoch (tabuľka 2).

Chov pstruha potočného má u nás dlhoročnú tradíciu. Jeho začiatky sú známe ešte z čias Rakúsko-Uhorskej monarchie a siahajú až do 19. storočia. Hoci má chov pstruha potočného na Slovensku dlhšiu históriu, jeho produkcia ani zďaleka nedosahuje úroveň pstruha dúhového. Je to spôsobené najmä jeho pomalším rastom (Stráňai, 2000; Randák et al., 2009). Pstruh potočný dosahuje tržnú veľkosť koncom tretieho až začiatkom štvrtého roku života pri celkovej dĺžke tela 250 – 300 mm. Naproti tomu pstruh dúhový dosahuje tržnú veľkosť 250 – 300 mm v druhom roku (Holčík, 1998) a v optimálnych podmienkach intenzívneho chovu je schopný dosiahnuť túto veľkosť už za 14 – 16 mesiacov (Pokorný et al., 1998).

Najproblematickejšie obdobie odchovu pstruha potočného je prechod z endogénnej na exogénnu výživu. Je to rozhodujúce obdobie, od ktorého závisí budúca plánovaná produkcia. Tieto fázy odchovu sa venuje najväčšia starostlivosť, pretože



Obrázok 1 Intenzita rastu a schéma krmenia počas experimentu
Figure 1 Growth rate and feeding scheme during the experiment
 (1) total length, (2) weight, (3) rearing time (day)

Tabuľka 2 Dosiiahnuté rastové parametre v realizovanom experimente

Parameter (1)	Počiatočný stav (2)	Konečný stav (3)	
		A	B
Lt v mm (4)	23,12 ±1,45	48,37 ±2,41**	42,90 ±2,23
W v g (5)	0,12 ±0,08	1,32 ±0,30**	1,20 ±0,32
CF (6)	0,92	0,84	0,83
SLGR v %.d ⁻¹ (7)		0,63	0,52
SWGR v %.d ⁻¹ (8)		2,12	2,04
Denný dĺžkový prírastok v mm.d ⁻¹ (9)		0,22	0,18
Denný hmotnostný prírastok v g.d ⁻¹ (10)		0,011	0,010

Lt – celková dĺžka tela, W – hmotnosť, CF – koeficient kondície, SLGR – špecifická rýchlosť dĺžkového rastu, SWGR – špecifická rýchlosť hmotnostného rastu, **P < 0,01

Table 2 Attained growth parameters in the performed experiment

(1) parameter, (2) initial status, (3) final status, (4) total length, (5) body weight, (6) condition factor, (7) specific length growth rate, (8) specific weight growth rate, (9) daily length increment, (10) daily weight increment

pri prechode plôdika na exogénnu potravu je uňho potrebné čo najrýchlejšie rozvinúť potravný reflex. Vo všeobecnosti sa v záujme eliminácie strát odporúča počiatočný prechod zabezpečiť prirodzenou potravou alebo tzv. mokrym kŕmením (Pokorný et al., 1992, 1998; Stráňai, 2000). Tento spôsob však zvyšuje riziko zavlečenia ochorenia do chovu a spomaluje návyk rýb na náhradné krmivo, na ktorom je postavená takmer celá produkcia lososovitých druhov rýb. Z tohto dôvodu sa pri odchove lososovitých druhov rýb odporúča použitie náhradných kŕmnych zmesí aj za cenu vyšších počiatočných strát. Použitie prirodzenej potravy vo fáze rozkrmovania plôdika by malo byť výnimočné a krátkodobé, aplikované len pri problémoch s príjmom kŕmnych zmesí. Ale aj v tomto prípade sa odporúča podávať obe krmivá súčasne (Randák et al., 2009; Twibell et al., 2009; Alp et al., 2010).

Z hľadiska podávania suchých zmesí pre plôdik je dôležité zabezpečiť také živinové zloženie kŕmnej zmesi, ktoré zabezpečí energetické výdavky jednak na bazálny metabolizmus a umožní aj optimálny vývoj a maximálny rast mladého jedinca (Halver and Hardy, 2002; Hopher, 2009). Potreba dusíkatých látok (NL) s narastajúcou veľkosťou a vekom klesá. Najmladšie vekové kategórie majú najvyššie požiadavky na obsah NL a ich obsah v kŕmnej zmesi pre plôdik lososovitých druhov rýb by sa mal pohybovať podľa viacerých autorov v rozpätí 47 – 64 % (Halver and Hardy, 2002; Kouřil et al., 2008; Twibell et al., 2009). Pre plôdik pstruha potočného je odporúčaný obsah NL 54 %, pričom jeho zdroje by mali tvoriť rybia múčka, poprípade kazeín a rybí bielkovinový koncentrát (Arzel et al., 1995). Keďže sa komerčne nevyrábajú kŕmne zmesi pre pstruha potočného, použili sme v našom experimente kŕmne zmesi vyrábané pre pstruha dúhového, pričom obsah NL bol vo všetkých vo vyššie uvedenom rozpätí (tabuľka 1).

Na druhej strane, aby bol obsah NL efektívne využitý, je potrebné zabezpečiť dostatočné množstvo energie v kŕmnej zmesi, pretože v opačnom prípade je časť bielkovín využitá na energetické účely. Ako zdroj energie sa využívajú lipidy, konkrétne masťné kyseliny, resp. polynenasýtené masťné kyseliny (Halver and Hardy, 2002; Hopher, 2009). Názory na celkový obsah tuku v kŕmnej zmesi pre lososovité ryby sa dosť rôznia. Kým jedni autori odporúčajú celkový obsah tuku na úrovni 6 – 7 %, iní až do 20 % a niektorí výrobcovia ho deklarujú až na úrovni takmer 23 %. Významnú úlohu v tomto zohrávajú samotné zdroje tukov, resp. zastúpenie a vzájomný pomer nasýtených a nenasýtených masťných

kyselín (Wirth et al., 1997; Stráňai, 2000; Kouřil et al., 2008; Twibell et al., 2009). V našom experimente sa testované kŕmne zmesi obsahom tuku pohybovali na úrovni 12 a 20, resp. 15 % (tabuľka 1).

Pri samotnom hodnotení intenzity rastu boli signifikantne vyššie hodnoty zaznamenané pri rybách, ktorým bola podávaná KZ Dibaq Microbaq (skupina A), t. j. KZ s rôznym obsahom živín počas odchovu. Celkové hmotnostné aj dĺžkové prírastky boli pri oboch skupinách rýb takmer identické až do polovice experimentu. Od tohto termínu sa skupine A začala podávať KZ s nižším obsahom NL a vyšším obsahom tuku, čo spôsobilo, že sa tieto prírastky začali zvyšovať a rozdiely medzi pokusnými skupinami rýb prehľbovať. Nepriamo sa tak potvrdilo tvrdenie autorov Halver and Hardy (2002), že významnejšie ako obsah NL v krmive je správne vybalancovanie esenciálnych a neesenciálnych aminokyselín.

Záver

Porovnaním testovaných kŕmnych zmesí na základe rastových parametrov plôdika pstruha potočného počas odchovu sme zistili štatisticky lepšie výsledky pri podávaní KZ Dibaq Microbaq v porovnaní s KZ Skretting Brutfutter. Diferencované nutričné zloženie KZ v procese rozkrmovania plôdika pstruha potočného malo signifikantný vplyv na intenzitu dĺžkového, ako aj hmotnostného rastu. Celkovým zhodnotením intenzity rastu možno konštatovať, že kŕmne zmesi používané pri rozkrmovaní pstruha dúhového je možné použiť aj pri pstruhovi potočnom.

Súhrn

Cieľom tejto práce bolo posúdiť vplyv diferencovanej výživy na rýchlosť rastu vreckového plôdika pstruha potočného (*Salmo trutta m. fario*). V experimente boli použité dve komerčne vyrábané suché kŕmne zmesi s rozdielnym kŕmnym programom. Experiment bol realizovaný v laminátových žlaboch s objemom 700 l počas 113 dní. Počas celej doby odchovu bola kŕmna zmes podávaná *ad libitum*. Prvej testovanej skupine rýb (skupina A) sme podávali kŕmnu zmes s rozdielnym nutričným zložením (bielkoviny 56 % a 50 %, tuk 12 % a 20 %) v jednotlivých fázach odchovu. Druhej testovanej skupine rýb (skupina B) sme podávali kŕmnu zmes s rovnakým nutričným zložením (bielkoviny 57 %, tuk 15 %) počas celej doby odchovu. Analýzou rastu

sme zistili, že skupina A dosiahla lepšie výsledky vo všetkých sledovaných ukazovateľoch ($Lt = 48,37 \pm 2,41$ mm; $w = 1,32 \pm 0,30$ g; $CF = 0,84$; $SLGR = 0,63$ % \cdot d $^{-1}$; $SWGR = 2,12$ % \cdot d $^{-1}$) v porovnaní so skupinou B ($Lt = 42,90 \pm 2,23$ mm; $w = 1,20 \pm 0,32$ g; $CF = 0,83$; $SLGR = 0,52$ % \cdot d $^{-1}$; $SWGR = 2,04$ % \cdot d $^{-1}$). Dosiagnuté výsledky poukazujú na to, že diferencovaná výživa s rozdielnym nutričným zložením má priaznivejší vplyv na všetky sledované ukazovatele odchovávaného vreckového plôdika pstruha potočného.

Kľúčové slová: *Salmo trutta morpha fario*, plôdik, špecifická rýchlosť rastu, koeficient kondície, rast, počiatočný odchov

Podakovanie

Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu „Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity“ na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.

Literatúra

- ALP, A. – ERER, M. – KAMALAK, A. 2010. Eggs incubation, early development and growth in fry of brown trout (*Salmo trutta macrostigma*) and Black Sea trout (*Salmo trutta labrax*). In: Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 10, 2010, p. 387 – 394.
- ARZEL, J. – METAILLER, R. – KERLEGUER, C. – Le DELLIOU, H. – GUILLAUME, J. 1995. The protein requirement of brown trout (*Salmo trutta*) fry. In: Aquaculture, vol. 130, 1995, no. 1, p. 67 – 78.
- HALVER, J. E. – HARDY, R. W. 2002. Fish nutrition. Amsterdam, Boston, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo : Academic press, 2002, 824 p.
- HEPHER, B. 2009. Nutrition of pond fishes. Cambridge, New York, New Rochelle, Melbourne, Sydney : Cambridge University Press, 2009, 404 p.
- HOLČÍK, J. 1998. Ichtyológia. Bratislava : Príroda, 1998, 320 s.
- KOHOUT, J. – JAŠKOVÁ, I. – PAPOUŠEK, I. – ŠEDIVÁ, A. – ŠLECHTA, V. 2012. Effect of stocking on the genetic structure of brown trout *Salmo trutta*, in Central Europe inferred from mitochondrial and nuclear DNA markers. In: Fisheries Management and Ecology, vol. 19, 2012, p. 252 – 263.
- KOUŘIL, J. 2008. Chov lososovitých druhů ryb, lipana a síhů. Vodňany : VÚRH FROV JU v Českých Budějovicích, 2008, 142 s.
- POKORNÝ, J. – DVOŘÁK, J. – ŠRÁMEK, V. 1992. Umělý chov ryb. Praha : Informatorium, 1992, 262 s.
- POKORNÝ, J. – ADÁMEK, Z. – DVOŘÁK, J. – ŠRÁMEK, V. 1998. Pstruhařství. Praha : Informatorium, 1998, 244 s.
- MOVCHAN, YU. V. 2011. Ryby Ukrajiny. Kyev : Natsionalna Akademiya Nauk Ukrainy, 2011, 420 p.
- RANDÁK, T. – TUREK, J. – KOLÁŘOVÁ, J. – KOCOUR, M. – HANÁK, R. – VELÍŠEK, J. – ŽLÁBEK, V. 2009. Technologie chovu pstruha obecného v kontrolovaných podmínkách za účelem produkce násadového materiálu pro zarybňování volných vod. Edice metodik č. 96. Vodňany : VÚRH FROV JU v Českých Budějovicích, 2009, 20 s.
- VANKÚŠOVÁ, M. – JANČEKOVÁ, J. – BŘEZINOVÁ, N. – ČERVENSKÁ, M. 2010. Výskyt vírusovej hemoragickej septikémie VHS v chovoch lososovitých rýb na Slovensku. In XII. Česká ichtyologická konference. Vodňany : VÚRH FROV JU v Českých Budějovicích, 2010, s. 35 – 36.
- SPURNÝ, P. – FIALA, J. – MAREŠ, J. 2004. Intensive rearing of the nase *Chondrostoma nasus* (L.) larvae using dry starter feeds and natural diet under controlled conditions. In: Czech Journal of Animal Science, vol. 49, 2004, no. 10, p. 444 – 449.
- STRÁŇAL, I. 2000. Chov rýb. Nitra : SPU, 2000, 195 s.
- TWIBELL, R. G. – GANNAM, A. L. – OSTRAND, S. L. – HOLMES, J. S. A. – POOL, J. B. 2009. Evaluation of commercial diets for first-feeding spring chinook salmon. In: North American Journal of Aquaculture, vol. 71, 2009, p. 116 – 121.
- WIRTH, M. – STEFFENS, W. – MEINELT, T. – STEINBERG, C. 1997. Significance of docosahexaenoic acid for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae. In: European Journal of Lipid Science and Technology, vol. 99, 1997, no. 1, p. 251 – 253.

Kontaktná adresa:

Ing. Jaroslav Andreji, PhD., Katedra hydínárstva a malých hospodárskych zvierat, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
 ☎ 037 641 47 00, e-mail: Jaroslav.Andreji@uniag.sk

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 69 – 72

VPLYV MECHANICKEJ ÚPRAVY SEMENA LUPINY BIELEJ NA STRÁVITEĽNOSŤ ŽIVÍN OVCAMI

THE INFLUENCE OF MECHANICAL PROCESSING OF WHITE LUPINE SEEDS ON NUTRIENTS DIGESTIBILITY IN SHEEP

Milan ŠIMKO, Daniel BÍRO, Miroslav JURÁČEK, Branislav GÁLIK, Michal ROLINEC, Ondrej PASTIERIK

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

The effects of mechanical processing of white lupine seeds (*Lupinus albus* L.) on nutrients digestibility and nitrogen balance in sheep were investigated. The basis of the diets was meadow hay supplemented with lupine seed, barley grain and oat grain. The first diet contained whole lupine, ground barley and ground oat (diet *a*). In the second diet the lupine seed was grounded (diet *b*). The experiment was performed on six castrated male cigaja sheep with mean live weight of 45.8 kg. They had been castrated at about one month of age. Animals were fed twice a day – at 6.30 a.m. and 6.30 p.m. The 11-day adaptation period was followed by the 5-day experimental period. Diet samples were taken and analyzed for nutrient contents according to the Regulation of the Ministry of Agriculture of the Slovak Republic no. 2145/2004-100. During the experimental period, feces and urine were collected. From the amounts collected per 24 hour, average samples were taken for chemical analysis. Significance of differences between the diets was evaluated by Fischer's LSD test using the program Statgraphics, ver. 5.0. The high digestibility of dry matter (77%), crude protein (76%), crude fat (83%), crude fibre (71%), nitrogen free extract (83%) and organic matter (79%) was detected for the diet *b*. The higher nitrogen excretion (21.81 g) was recorded in the diet *a* ($P < 0.05$). It resulted in low percentage nitrogen intake retained as well as low percentage digested nitrogen retained. Retention of nitrogen did differ significantly between the diets *a* and *b* ($P < 0.01$). Mechanical processing of lupine seed altered the nutrients digestibility of and nitrogen balance.

Keywords: lupine seed, barley grain, oat grain, mechanical processing, nutrients digestibility, nitrogen balance, sheep

Vysoké využitie živín z objemových a jadrových krmív je možné dosiahnuť použitím vhodnej technológie pre ich úpravu. Úprava krmív si vyžaduje nemalé ekonomické náklady. Zrná obilnín sú bez poškodenia perikarpu veľmi odolné voči bakteriálnemu tráveniu v bachore a živiny, ktoré obsahuje endosperm sú prístupné pre bachorové mikroorganizmy a enzýmy až po ich rozdrvení (Dehghan, 2007; Kopčeková et al., 2008). Zníženie veľkosti častíc jadrových krmív zvyšuje plochu prístupnú mikroorganizmom exponenciálne, čím sa zvyšuje ich stráviteľnosť (Moe and Tyrrell, 1977). Na skrmovanie celých mechanicky neupravených semien strukovín prežúvavcom existujú rozporuplné názory. Moss et al. (2001) uvádzajú, že semená lupiny je nutné pred skrmovaním upraviť šrotovaním, drvením, mletím, resp. vločkovaním.

Lupina biela (*Lupinus albus* L.) patrí medzi krmivá bielkovinového charakteru a obsahuje 36 – 40 % dusíkatých látok. Ich stráviteľnosť je vysoká, preto je lupina krmivo s vysokou nutričnou hodnotou (Pettersson, 2000; Straková et al., 2006). Hlavnou zložkou sacharidov v semenách sú β -galaktány. Semeno lupiny obsahuje približne 40 % neškrobových polysacharidov a malé množstvo škrobu, čo má význam v krmných dávkach prežúvavcov, pretože riziko acidózy je veľmi nízke (Homolka a Kudrna, 2007). Využitím semena lupiny vo výžive oviec sa zaoberali Paduano et al. (1995). V troch pokusoch skrmovali celé, nespracované semeno lupiny (*Lupinus angustifolius*, var. *uniharvest*), v množstve 10, 20 a 40 g na kg metabolickej veľkosti tela pokusných zvierat. Z výsledkov vyplýva, že prídavkom semena lupiny sa progresívne zvyšoval celkový príjem sušiny, prírastok živej hmotnosti a rast vlny, ale príjem objemového krmiva sa znižoval o 19 % a 48 % pri skrmovaní 20 a 40 g lupiny na kg metabolickej veľkosti tela zvierat.

Cieľom experimentu bolo zistiť vplyv skrmovania celého a šrotovaním upraveného semena lupiny na bilančnú látkovú stráviteľnosť živín a bilanciú dusíka ovcami.

Materiál a metódy

Do pokusu sme zaradili šesť škopov plemena cigája s priemerou živou hmotnosťou 45,8 kg na začiatku pokusu. Pokusné zvieratá sa krmili v bilančných kliečkach individuálne dvakrát denne v čase o 6,30 a 18,30 hodine. Voda bola k dispozícii *ad libitum*. Prípravné obdobie pred každým variantom trvalo jedenásť dní a pokusné obdobie päť dní. Základ krmnej dávky tvorilo lúčne seno, ku ktorému sa pridávali lupina, šrotovaný jačmeň a šrotovaný ovos. Vo variante *a* sa skrmovalo celé mechanicky neupravené semeno lupiny a vo variante *b* bola lupina upravená šrotovaním. Pokusným zvieratám sa najskôr podávalo seno a potom zmiešané jadrové krmivá. Množstvo skrmovaných krmív je uvedené v tabuľke 1. Z každého variantu

Tabuľka 1 Zloženie krmných dávok v sušine v kg

Krmivo (1)	Variant (2)	
	<i>a</i>	<i>b</i>
Seno lúčne (3)	0,36	0,36
Lupina semeno (4)	0,25	0,25
Jačmeň zrno (5)	0,23	0,23
Ovos zrno (6)	0,18	0,18

Table 1 Components of diets in kg dry mater per day (1) feed, (2) diet, (3) meadow hay, (4) lupine seed, (5) barley grain, (6) oat grain

Tabuľka 2 Obsah sušiny, energie a živín v krmivách

Krmivo (1) n = 9	S	NEL*	NEV*	PDI*	N-látky (2)	Tuk (3)	BNLV	Škrob (4)	Vláknina (5)	OH	Popol (6)
	g.kg ⁻¹ PH	MJ.kg ⁻¹ S		g.kg ⁻¹ S							
Seno lúčne (7)	903,2	5,41	5,21	78	122,7	19,3	457,4	6,0	308,3	907,6	92,5
Lupina semeno (8)	874,8	8,78	9,30	115	235,8	90,9	424,8	390,9	203,7	955,2	44,8
Jačmeň zrno (9)	868,3	8,47	8,26	82	114,4	21,5	771,6	585,6	52,7	960,2	39,8
Ovos zrno (10)	890,2	8,26	8,87	84	115,1	40,9	724,9	519,9	91,2	972,1	27,9

S – sušina, PH – pôvodná hmota, NEL – netto energia laktácie, NEV – netto energia výkrmu, PDI – skutočne stráviteľné dusíkaté látky v tenkom čreve prežúvavcov, BNLV – bezdusíkaté látky výťažkové, OH – organická hmota

* obsah NEL, NEV a PDI vypočítaný na základe koeficientov stráviteľnosti živín uvedených v publikácii Výživná hodnota krmív (Petrikovič et al., 2000)

S – dry matter, PH – fresh matter, NEL – net energy of lactation, NEV – net energy of gain, PDI – protein digestible in intestine, BNLV – nitrogen-free extract, OH – organic matter

* – content of NEL, NEV, PDI calculated by coefficients of nutrient digestibility (Petrikovič et al., 2000)

Table 2 Content of dry matter, energy and nutrients in feeds

(1) feed, (2) crude protein, (3) fat, (4) starch, (5) crude fibre, (6) ash, (7) meadow hay, (8) lupine seed, (9) barley grain, (10) oat grain

krmenia sme odoberali vzorky skrmovaných krmív ($n = 9$ pre každé krmivo), ktoré sme uskladnili v hlboko mraziacom boxe pri teplote -40 °C. Vo vzorkách krmív sme urobili základný organický rozbor (výnos MP SR č. 2145/2004-100) a stanovili obsah škrobu polarimetricky. Obsah živín a výživná hodnota krmív sú uvedené v tabuľke 2. Energetickú hodnotu a skutočne stráviteľné dusíkaté látky v tenkom čreve prežúvavcov sme vypočítali podľa Sommera et al. (1994). Pre výpočet NEL, NEV a PDI sme použili koeficienty stráviteľnosti živín z tabuliek výživnej hodnoty krmív (Petrikovič et al., 2000). Počas bilančných pokusov sme kvantitatívne zachytávali vylúčené výkaly a moč. Zo zhromaždeného množstva za 24 hodín sme pred ranným kŕmením po odvážení a homogenizácii odobrali priemerné vzorky výkalov a moču na chemické analýzy. Výkaly a moč boli denne analyzované na obsah dusíka. Zostávajúca časť výkalov sa lyofilizovala. V lyofilizovaných vzorkách bol urobený základný organický rozbor (výnos MP SR č. 2145/2004-100). Obsah škrobu bol stanovený polarimetricky. Štatistickú významnosť rozdielov medzi jednotlivými variantmi kŕmenia sme vyhod-

notili pomocou programu Statgraphics verzia 5,0 a použili sme Fischerov LSD test.

Výsledky a diskusia

Príjem sušiny, energie a živín v jednotlivých variantoch kŕmenia je uvedený v tabuľke 3. V oboch variantoch prijímali pokusné zvieratá kŕmnu dávku bez zvyškov. Pri výpočte príjmu energie (NEL, NEV) a skutočne stráviteľných dusíkatých látok v tenkom čreve prežúvavcov (PDI) na základe koeficientov stráviteľnosti zistených v bilančných pokusoch sme zaznamenali nižší príjem energie a PDI vo variante *a*. Toto bolo spôsobené nižšími koeficientmi stráviteľnosti v tomto variante, čiže pokusné zvieratá pri skrmovaní celej mechanicky neupravenej lupiny nedokázali využívať živiny, ako keď bola lupina šrotovaná (Hoseney, 1994; Dehghan, 2007). Mechanická úprava výrazne zlepšuje trávenie živín, no stráviteľnosť živín závisí od spôsobu a od veľkosti častíc mechanicky upravených jadrových krmív (Čerešňáková et al., 2004).

Tabuľka 3 Príjem sušiny, energie a živín z kŕmnych dávok

Ukazovateľ (1)	Variant (2)			
	<i>a</i>	<i>b</i>		
Sušina (3)	g	1 020	1 020	
Energia (4)	NEL *	MJ	7,28	7,84
	NEV *	MJ	7,39	7,98
Živiny (5)	PDI *	g	91	98
	N-látky (6)	g	150,1	150,1
	tuk (7)	g	41,9	41,9
	BNLV	g	577,9	577,9
	škrob (8)	g	324,5	324,5
	vláknina (9)	g	190,6	190,6
	OH	g	960,5	960,5

NEL – netto energia laktácie, NEV – netto energia výkrmu, PDI – skutočne stráviteľné dusíkaté látky v tenkom čreve prežúvavcov, BNLV – bezdusíkaté látky výťažkové, OH – organická hmota

* príjem NEL, NEV a PDI vypočítaný na základe zistených koeficientov stráviteľnosti živín v bilančných pokusoch

NEL – net energy of lactation, NEV – net energy of gain, PDI – protein digestible in intestine, BNLV – nitrogen-free extract, OH – organic matter

* – intake of NEL, NEV, PDI calculated by digestibility coefficients of nutrients in balance experiments

Table 3 Daily intake of dry matter, energy and nutrients from the diets

(1) indicator, (2) diet, (3) dry matter, (4) energy, (5) nutrients, (6) crude protein, (7) fat, (8) starch, (9) crude fibre

Tabuľka 4 Stráviteľnosť živín v %

Živiny (1)	Variant (2)						P
	a			b			
	\bar{x}	s	v in %	\bar{x}	s	v in %	
Sušina (3)	73	3,26	4,47	77	3,64	4,73	++
N-látky (4)	72	2,84	3,94	76	3,12	4,11	++
Tuk (5)	80	3,17	3,96	83	2,78	3,35	+
BNLV	80	2,32	2,90	83	3,19	3,84	+
Škrob (6)	96	0,67	0,70	99	0,56	0,57	+
Vláknina (7)	62	2,98	4,81	71	3,37	4,75	++
OH	74	3,43	4,64	79	3,69	4,67	++

*P < 0,05, **P < 0,01

BNLV – bezdusikaté látky výťažkové, OH – organická hmota, \bar{x} – aritmetický priemer, s – smerodajná odchýlka, v – variačný koeficient, P – preukazné rozdiely medzi variantmi na hladine významnosti $\alpha = 0,05$ alebo $\alpha = 0,01$ BNLV – nitrogen-free extract, OH – organic matter, \bar{x} – average, s – standard deviation, v – coefficient of variance, P – difference between variants significant at the level $\alpha = 0.05$ or $\alpha = 0.01$

Table 4 Digestibility of nutrients

(1) nutrients, (2) diet, (3) dry matter, (4) crude protein, (5) fat, (6) starch, (7) crude fibre

Tabuľka 5 Bilancia dusíka

Ukazovateľ (1)		Variant (2)						P		
		a			b					
		\bar{x}	s	v	\bar{x}	s	v			
Prijatý dusík v g (3)		24,01	0,00	0,00	24,01	0,00	0,00	-		
Dusík (4)	vylúčený v g (5)	vo výkaloch (6)	6,74	0,36	5,34	5,71	0,32	5,60	++	
		v moči (7)	15,07	1,14	7,56	14,72	1,23	8,36	+	
		spolu (8)	21,81	1,26	5,78	20,43	1,28	6,27	+	
	strávený v g (9)		17,27	0,68	3,94	18,30	0,78	4,26	++	
	zadržaný (10)	z prijatého (11)	g	2,20	0,16	7,27	3,58	0,24	6,70	++
			%	9,16	0,65	7,10	14,91	0,78	5,23	++
zo stráveného (12)		%	12,74	0,77	6,04	19,56	0,86	4,40	++	

*P < 0,05, **P < 0,01

 \bar{x} – aritmetický priemer, s – smerodajná odchýlka, v – variačný koeficient, P – preukazné rozdiely medzi variantmi na hladine významnosti $\alpha = 0,05$ alebo $\alpha = 0,01$ \bar{x} – average, s – standard deviation, v – coefficient of variance, P – difference between variants significant at the level $\alpha = 0.05$ or $\alpha = 0.01$

Table 5 Nitrogen balance

(1) indicator, (2) diet, (3) nitrogen intake, (4) nitrogen, (5) excreted, (6) in feces, (7) in urine, (8) total, (9) digested, (10) retained, (11) from received, (12) from digested

Vplyv mechanickej úpravy jadrových krmív na stráviteľnosť živín, sušiny a organickej hmoty uvádzame v tabuľke 4. Preukazne nižšia stráviteľnosť sušiny (73 %), organickej hmoty (74 %) a všetkých živín sme zistili pri skrmovaní celej, mechanicky neupravenej lupiny (variant a). To dokumentuje, že bez mechanického spracovania obilnín, ako je valcovanie a šrotovanie nie je zabezpečené narušenie oplodia, čím sa znižuje využitie živín z krmív (Beauchemin et al., 1994). Skrmovanie mechanicky upravených jadrových krmív zlepšuje stráviteľnosť organickej hmoty v porovnaní so skrmovaním celých zrn (Tolland, 1976). Ørskov et al. (1978), Mathison et al. (1991) a Yaremco et al. (1991), uvádzajú nižšiu stráviteľnosť sušiny pri skrmovaní celých jadrových krmív v porovnaní so šrotovanými. Vo variante a bolo 72 % strávených dusíkatých látok, čo bolo preukazne menej (P < 0,01) v porovnaní s variantom b (šrotovaná lupina), kde zvieratá strávili 76 % dusíkatých látok. Vyššiu (83%) stráviteľnosť tuku sme zistili pri skrmovaní krmnej dávky variantu b. Nižšiu (96 %) stráviteľnosť škrobu sme zistili, keď sa skrmovala mechanicky neupravená lupina, no vo vylúčených

výkaloch sa nenachádzalo ani jedno celé nestrávené semeno lupiny. Stráviteľnosť BNLV bola vo variante a 80 % a vo variante b 83 %, čo bolo preukazne viac (P < 0,05). Pri skrmovaní krmnej dávky, ktorej súčasťou bola šrotovaná lupina sme zistili preukazne vyššiu (P < 0,01) stráviteľnosť vlákniny (71 %). Rozdiel v porovnaní s variantom a predstavoval až 9 %.

Vplyv pokusných krmných dávok na bilanciu dusíka uvádzame v tabuľke 5. Pri skrmovaní celej mechanicky neupravenej lupiny sme zaznamenali preukazne vyššie (P < 0,05) množstvo vylúčeného dusíka (21,81 g), čo spôsobilo že ho pokusné zvieratá preukazne menej zadržali, jednak z dusíka prijatého a taktiež z dusíka stráveného. Rozdiel v množstve vylúčeného dusíka medzi variantom a a b predstavoval 1,38 g. Pri skrmovaní šrotovanej lupiny bolo percento zadržaného dusíka z prijatého 14,91 % a zo stráveného 19,56 %. Tieto hodnoty boli preukazne vyššie (P < 0,01) v porovnaní s variantom a, kde bol percentuálny podiel zadržaného dusíka z prijatého 9,16 % a zo stráveného 12,74 %.

Záver

Pri skrmovaní kŕmnej dávky, kde bola lupina mechanicky upravená šrotovaním sme zistili preukazne vyššiu stráviteľnosť sušiny a živín. Zároveň sme zistili menej vylúčeného dusíka vo výkaloch a vyššie percento zadržaného dusíka z prijatého a zo stráveného. Pri skrmovaní celej lupiny sme zaznamenali nižšie využitie živín a taktiež horšie využitie dusíka z kŕmnej dávky.

Súhrn

V bilančných pokusoch na šiestich škopoch plemena cigája s priemernou živou hmotnosťou 45,8 kg sme zisťovali vplyv skrmovania celej a šrotovaním upravenej lupiny na bilančnú látkovú stráviteľnosť živín a bilanciú dusíka. Základ kŕmnej dávky tvorilo lúčne seno, ku ktorému sa pridávali lupina, jačmeň a ovos. Vo variante *a* sa skrmovalo celé mechanicky neupravené semeno lupiny a vo variante *b* bola lupina upravená šrotovaním. Pokusné zvieratá sa kŕmili individuálne dvakrát denne. Vylúčené výkaly a moč sa zhromažďovali kvantitatívne a v priemerných vzorkách sa chemickou analýzou stanovil obsah vylúčených živín. Z rozdielu medzi prijatými a vylúčenými živinami boli vypočítané strávené živiny. Pri skrmovaní kŕmnej dávky, kde bola lupina mechanicky upravená šrotovaním sme zistili preukazne vyššiu stráviteľnosť sušiny a živín (stráviteľnosť sušiny bola 77 %, N-látok 76 %, tuku 83 %, vlákniny 71 %, BNLV 83 % a OH 79 %). V porovnaní s variantom *a*, kde sa skrmovala celá lupina boli rozdiely v stráviteľnosti preukazne vyššie ($P < 0,05$). Preukazne vyššie množstvo vylúčeného dusíka (21,81 g) sme zaznamenali pri skrmovaní celej lupiny. Zároveň sme v tomto variante zistili nižšie percento zadržaného dusíka z prijatého (9,16 %) a zo stráveného (12,74 %), čiže v tomto variante bolo využitie dusíka z kŕmnej dávky nižšie.

Kľúčové slová: lupina, jačmeň, ovos, mechanická úprava, stráviteľnosť živín, bilancia dusíka, ovce

Tento príspevok vznikol s podporou grantových projektov ECOVA, ECOVA PLUS, VEGA č. 1/0662/11.

Literatúra

- ALLEN, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle, In: J. Dairy Sci., vol. 83, 2000, p. 1598 – 1624.
- BEAUCHEMIN, K. A. – MCALLISTER, T. A. – DONG, Y. – FARR, B. I. – CHENG, K. J. 1994. Effects of mastication on digestion of whole cereal grains by cattle. In: J. Anim. Sci., vol. 72, 1994, p. 236 – 246.
- ČEREŠŇÁKOVÁ, Z. – CHRENKOVÁ, M. – SOMMER, A. 2004. Passage of nutrients into the duodenum and their postprandial digestion in cows fed crushed and ground maize. In: Czech J. Anim. Sci., vol. 49, 2004, p. 190 – 198.
- DEGHAN-BANADAKY, M. – CORBETT, R. – OBA, M. 2007. Effects of barley grain processing on productivity of cattle. In: Anim. Feed Sci. Technology, vol. 137, 2007, p. 1 – 24.

HOMOLKA, P. – KUDRNA, V. 2007. Uplatnění lupiny ve výživě přežvýkavců. Praha – Uhřetěves : VÚŽV, 2007, 43 s.

HOSENEY, C. R. 1994. Principles of Cereal Science and Technology (2nd ed.), American Association of Cereal Chemists Inc., St. Paul, MN, USA, 1994, p. 378.

KOPČEKOVÁ, J. – ČEREŠŇÁKOVÁ, Z. – ŠIMKO, M. – FĽAK, P. – MLYNEKOVÁ, Z. 2008. Effect of physical processing of cereals on rumen crude protein degradability. In: Slovak J. Anim. Sci., vol. 41, 2008, no. 4, p. 160 – 165.

MATHISON, G. W. – ENGSTROM, D. F. – MACLEOD, D. D. 1991. Effect of feeding whole and rolled barley to steers in the morning or afternoon in diets containing differing proportions of hay and grain. In: Anim. Prod. vol. 53, 1991, p. 321 – 330.

MOE, P. W. – TYRELL, H. F. 1977. Effects of feed intake and physical form on energy value of corn in timothy hay diets for lactating cows. In: J. Dairy Sci., vol. 60, 1977, no. 5, p. 752 – 758.

MOSS, A. R. – DEAVILLE, E. R. – GIVENS, D. I. 2001. The nutritive value for ruminants of lupin seeds from determinate and dwarf determinate plants. In: Anim. Feed Sci. Technol., 94, 2001, p. 187 – 198.

ØRSKOV, E. R. – SOLIMAN, H. S. – MACDEARMID, A. 1978. Intake of hay by cattle given supplements of barley subjected to various forms of physical treatment or treatment with alkali. In: J. Agric. Sci., vol. 90, 1978, p. 611 – 615.

PADUANO, D. C. – DIXON, R. M. – DOMINO, J. A. – HOLME, J. H. G. 1995. Lupin (*Lupinus angustifolius*), cowpea (*Vigna unguiculata*) and navy bean (*Phaseolus vulgaris*) seeds as supplements for sheep fed low duality roughage. In: J. Anim. Feed Sci., 53, 1995, p. 55 – 69.

PETTERSON, D. S. 2000. The use of Lupins in feeding systems. In: Asian-Aus. J. Anim. Sci., 13, 2000, p. 861 – 882.

PETRIKOVIČ, P. – SOMMER, A. – ČEREŠŇÁKOVÁ, Z. et al. 2000. Výživná hodnota krmív. 1. vyd. Nitra : VÚŽV, 2000. ISBN 80-88872-12-X.

SOMMER, A. – ČEREŠŇÁKOVÁ, Z. – FRYDRYCH, Z. et al. 1994. Potreba živín a výživná hodnota krmív pre hovädzí dobytok, ovce a kozy. 1. vyd. Nitra : VÚŽV, 1994. 116 s. ISBN 80-967057-1-7.

STRAKOVÁ, E. – SUCHÝ, P. – VEČEREK, V. – ŠERMAN, V. – MAS, N. – JŮZL, M. 2006. Nutritional composition of seeds of the genus *Lupinus*. In: Acta Veterinaria, vol. 75, 2006, p. 489 – 493.

TOLLAND, P. C. 1976. The digestibility of wheat, barley or oat grain fed either whole or rolled at restricted levels with hay to steers. In: Aust. J. Exp. Agric. Anim. Husb., vol. 16, 1976, p. 71 – 75.

VÝNOS MP SR č. 2145/2004-100, ktorým sa mení a dopĺňa výnos MP SR č. 1497/4/1997-100 o úradnom odbere vzoriek a o laboratórnom skúšaní a hodnotení krmív v znení výnosu MP SR č. 149/2/2003-100.

YAREMCIO, B. J. – MATHISON, G. W. – ENGSTROM, D. F. – ROTH, L. A. – CAINE, W. R. 1991. Effect of ammoniation on the preservation and feeding value of barley grain for growing-finishing cattle. In: Can. J. Anim. Sci., vol. 71, 1991, p. 439 – 455.

Kontaktná adresa:

doc. Ing. Milan Šimko, PhD., Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Katedra výživy zvierat, Tr. Andreja Hlinku 2, 949 76, Nitra, e-mail: Milan.Simko@uniag.sk

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 73 – 80

VYUŽITIE METÓDY CAPS NA DETEKCIU POLYMORFIZMU REŠTRIKČNÝCH MIEST GBSSI GÉNU MUTANTNÝCH LÍNIÍ LÁSKAVCA

THE USE OF CAPS METHOD TO DETECT POLYMORPHISMS OF RESTRICTION SITES IN GBSSI GENE OF AMARANTH MUTANT LINES

Mária LABAJOVÁ,¹ Katarína RAŽNÁ,¹ Alena GAJDOŠOVÁ,² Andrea HRICOVÁ²

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre¹
Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre²

The aim of presented paper was to detect the *GBSSI* gene. Concretely, the detection of polymorphisms in restriction sites using restriction endonuclease *HpaII* was performed. Firstly, four parts of the *GBSSI* gene were amplified in PCR reactions, and then the amplified parts of the *GBSSI* gene were digested using restriction endonuclease *HpaII*. The presence of the restriction site 5'CCGG 3' was confirmed in control genotypes, and in the lines of amaranth exposed to radiation-induced mutagenesis as well. The cleavage in all amaranth mutant lines and their controls, two fragments were cleaved. In the part of the *GBSSI* gene with the size of 1255 bp – 2 725 bp (primer *GBSSI* 1) there were two fragments with the size of 1 261 bp and 229 bp; in the part of the *GBSSI* gene with the size of 1 bp – 1 098 bp (primer *GBSSI* 3) there were two fragments with the size of 797 bp and 301 bp; and in the part of the *GBSSI* gene with the size of 2548 bp – 3461 bp (primer *GBSSI* 4) there were two fragments with the size of 215 bp and 692 bp.

Keywords: amaranth *GBSSI* gene, PCR, restriction cleavage, mutant lines

Prístupy a techniky molekulárnych analýz v súčasnosti poskytujú metodickú oporu najširšiemu spektru hodnotenia biologického materiálu cez sledovanie a popisovanie epidemiologických zmien v ľudskej populácii (Zeleňáková et al., 2011, 2012a,b), vyhodnocovanie pravosti a autentifikácie potravín (Revák et al., 2011; Židek et al., 2012) až po hodnotenie rozmanitosti genofondu kultúrnych či voľne rastúcich rastlín (Bežo et al., 2005; Hrubíková et al., 2007; Oslovičová et al., 2010; Vívodík et al., 2011; Žiarovská, 2003).

Techniky molekulárnej genetiky umožňujú aj priamu analýzu konkrétnych génov rastlinného organizmu zodpovedných za hospodársky významné vlastnosti. Jedným z predmetov molekulárnych analýz láskavca je *GBSSI* gén (granule bound starch synthetase I) – *waxy* gén. Štruktúra génu *GBSSI* pre láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.), ktorý je v databáze NCBI evidovaný pod kódom AB456685, je uvedená na obrázku

1. *GBSSI* gén má 3492 bp, 12 intrónov a 13 exónov. Tento gén bol zaznamenaný aj v genóme iných druhov napr. pšenica letná (*Triticum aestivum* L.) v databáze NCBI uvedený pod kódom AF286320, ryža siata (*Oryza sativa* L.) AF141955 a i., kukurica siata (*Zea mays* L.) HQ423245, a iné. Zaznamenaný bol aj v genómoch iných druhov rodu láskavec, ako napr. láskavec chvostnatý (*Amaranthus caudatus* L.) a láskavec smutný (*Amaranthus hypochondriacus* L.).

Pomocou BLAST analýzy bol v *GBSSI* géne zaznamenaný vysoký stupeň podobnosti na základe aminokyselinových sekvencií medzi láskavcom a ostatnými rastlinnými druhmi (Park et al., 2009).

GBSSI gén, tiež známy ako *waxy* bielkovina, je zodpovedný za syntézu amylozy v amyloplastoch rastlinných zásobných orgánoch (James et al., 2003; Tsai 1974). Produkcia amylozy je kontrolovaná len jedným hlavným štruktúrnym génom *waxy*



Obrázok 1 Schematické znázornenie *GBSSI* génu. Obdĺžniky reprezentujú exóny a čiary medzi nimi intróny. CDS – kódujúce oblasti génu sú nasledujúce (bp) 1–330, 503–423, 596–694, 873–784, 1238–1301, 1416–1516, 1598–1707, 1784–2027, 2116–2292, 2422–2613, 2707–2793, 2899–3027, 3121–3237

Zdroj: Park et al., 2009

Figure 1 Schematic depiction of the *GBSSI* gene. The rectangles represent exons, and lines between them represent introns. CDS – coding regions of the gene are as follows (bp) 1–330, 503–423, 596–694, 873–784, 1238–1301, 1416–1516, 1598–1707, 1784–2027, 2116–2292, 2422–2613, 2707–2793, 2899–3027, 3121–3237

Source: Park et al., 2009

(GBSSI) s waxy recesívnou alelou k dominantnej waxy alele (Konishi et al., 1985; Okuno a Sakaguchi 1981; Park et al., 2009; Sugimoto et al., 1981). Nachádza sa na waxy lokuse (Park et al., 2009). Škrob je lokalizovaný v bunkách perispermu, v ktorých sa tvoria veľmi malé škrobové zrná s priemerom 1–2 µm (Macone, 2001). V súčasnosti je známych len málo dostupných informácií, ktoré poukazujú na genetickú kontrolu veľkosti zŕn (Lindeboom, Chang and Tyler, 2004). V *Amaranthus cruentus* L. podobne ako aj v *Amaranthus hypochondriacus* L. boli pozorované dva typy škrobu nevoskový typ (non-waxy) s obsahom amylozy 19,4 – 27,8 %, teda perisperm tohto typu obsahuje aktívny GBSSI gén a voskový (waxy) s obsahom 0 % amylozy neaktívny (Inouchi et al. 1999; Park et al., 2009).

Park et al. (2010) sledovali variabilitu waxy génu v troch rozdielnych druhoch rodu láskavec (*Amaranthus caudatus* L., *Amaranthus cruentus* L. a *Amaranthus hypochondriacus* L.), pričom porovnaním ich nukleotidovej sekvencie bol zaznamenaný vysoký stupeň podobnosti. Mutácie GBSSI génu v podstate vylučujú alebo redukovujú obsah amylozy v škrobe narušením expresie alebo znížením funkcie GBSSI génu (Park et al., 2011). Nakurama et al. (1998) ukázal významné rozdiely v aktivite GBSSI génu medzi endospermom waxy a non-waxy typom pšenice. Fujita et al. (1998) zistili, že nebola detegovaná žiadna aktivita GBSSI génu vo waxy mutantoch pšenice jednozrná (*Triticum monococum* L.). Tento gén a pochopenie jeho expresie predstavuje hlavnú úlohu v stanovovaní funkcie v potravinárskom a nepotravinárskom priemysle. Preto zlepšovanie kvality škrobu a funkcie závisí na pochopení činnosti a účinkov tohto génu. Pre efektívne využívanie genetických zdrojov, tvorbu nových kmeňov s rozdielnym zložením škrobu, je potrebná analýza genetickej diverzity z rozličných regiónov (Park et al., 2009; Park et al., 2011).

Cieľom práce bolo vypracovanie protokolu identifikácie a detekcie génu GBSSI pri krokovom zmožnení pomocou PCR reakcie a analýza prítomnosti reštrikčných miest štiepenia

enzýmom HpaI deviatich mutantných línií láskavca a dvoch kontrolných genotypov.

Materiál a metódy

Použitý biologický materiál (tabuľka 1) rodu láskavec *Amaranthus* L. bol reprezentovaný genotypom Fica druhu *Amaranthus cruentus* L. a hybridom K-433, ktorý je výsledkom medzidruhového kríženia druhov láskavec hybridný (*Amaranthus hybridus* L.) a láskavec smutný (*Amaranthus hypochondriacus* L.). Semenný biologický materiál je výsledkom indukovanej mutagenézy 8 generácia (radiálneho – γ žiarenia v dávke 175 Gy), pričom jednotlivé línie sa vyznačujú štatisticky preukazne zvýšeným hmotnosť tisíc semien (HTS) (Gajdošová, 2008). Biologický materiál bol poskytnutý Ústavom genetiky a biotechnológií rastlín SAV v Nitre.

Genotyp Fica je charakterizovaný ako poloskorá odroda s veľkými semenami, svetlej farby s hmotnosťou tisícich zŕn 0,85 g. Hybrid K-433 bol vytvorený v Rodalo Research Centre v Pensylvánii v USA ako produkt medzidruhového kríženia druhov *Amaranthus hybridus* L. a *Amaranthus hypochondriacus* L. Charakterizovaný je ako poloskorá odroda s veľkými semenami, svetlej farby s hmotnosťou tisícich zŕn 0,73 g.

Pre účely amplifikácie GBSSI génu boli zo semenného materiálu dopestované rastliny v *in vitro* podmienkach na kultivačnom médiu. DNA bola izolovaná zo zelených častí 7-dňových klíčencov izolačnou súpravou Invisorb Spin Plant Mini Kit (Invitex).

Prajmery pre zmožnenie génu (tabuľka 2) boli navrhnuté autormi Park et al. (2009) a na základe sekvencie génu GBSSI pre *Amaranthus cruentus* L. s veľkosťou 3 492 bp, ktorý je v databáze NCBI uložený pod prístupovým kódom AB456685.

Dvojica prajmerov GBSSI 1 zabezpečuje zmožnenie úseku 1 255 – 2 725 bp, poradia nukleotidov GBSSI génu, dvojica

Tabuľka 1 Charakteristika použitého biologického materiálu láskavca

Mutantná línia (1)	Pôvod mutantných línií (2)
C 15/1; C 26/2; C 26/3; C 27/5 C 82/1; C 236/1 Kontrola A	genotyp Fica, láskavec metlinatý (<i>Amaranthus cruentus</i> L.)
D 54/1; D 279/1; D 282/1 Kontrola B	hybrid K-433, ktorý je výsledkom interšpecifickej hybridizácie druhov láskavec smutný (<i>Amaranthus hypochondriacus</i> L.) × láskavec hybridný (<i>Amaranthus hybridus</i> Lindl.)

Table 1 Characteristics of amaranth biological material used in the work
(1) mutant line, (2) origin of mutant lines

Tabuľka 2 Sekvencie prajmerov a teplota naväzovania jednotlivých dvojíc

Označenie prajmera (1)	Sekvencia prajmera (2)	Teplota naväzovania (3)
GBSSI 1 F	CAGGCAGCTTTGGAGGCACCA	68 °C
GBSSI 1 R	TGGAGGCTACCACAGGCACCT	68 °C
GBSSI 2 F	TTCAGGCCAGGGGACACCGT	65 °C
GBSSI 2 R	CGTGGGTAGTCCGCCAAGGC	65 °C
GBSSI 3 F	ATGGAAACAGTAACATCTTCTCACT	61 °C
GBSSI 3 R	CATCTTTTCATAGAATAGCCAAGTCA	61 °C
GBSSI 4 F	ATGTTAATCTAGCAGATTGGA	57 °C
GBSSI 4 R	CTTTGTGAATTTGTTGTTGAATA	57 °C

Table 2 The sequences of primers and their annealing temperature
(1) name of primer, (2) sequence of primer, (3) annealing temperature of primer

Tabuľka 3 Časový a teplotný profil PCR zmoženia úsekov *GBSSI* génu

Fáza CAPS reakcie (1)	Časový interval (2)	Teplota (3)	Počet opakovaní (4)
Úvodná denaturácia (5)	3 minúty	95 °C	–
Denaturácia (6)	15 sekúnd	95 °C	32
Naviazanie prajmera (7)	40 sekúnd	57–68 °C	
Polymerizácia (8)	2 minúty	72 °C	
Polymerizácia (8)	7 minút	72 °C	–
Chladienie (9)	10 minút	4 °C	–

Table 3 Time and temperature profile of PCR for amplification of the *GBSSI* gene (1) steps of *GBSSI* reaction, (2) time profile, (3) temperature profile, (4) number of cycle, (5) initial denaturation, (6) denaturation, (7) annealing, (8) extension, (8) final extension, (9) cooling

GBSSI 2 úseku 437 – 1 659 bp, dvojica *GBSSI* 3 úsek 1 – 1 098 bp a dvojica prajmerov *GBSSI* 4 zabezpečuje zmoženie úseku 2548bp – 3461 bp poradia nukleotidov *GBSSI* génu láskavca.

PCR reakcie prebiehali v tlmivom ustálenom roztoku 1× PCR obsahujúcom: 100 mmol.dm⁻³ Tris-HCl (pH 8,8), 500 mmol.dm⁻³ KCl a 1,5 mmol.dm⁻³ MgCl₂ (Applichem), spolu s 0,2 mmol.dm⁻³ d NTP (InvitrogenTM, Life Technologies), prajmerom 450 nmol.dm⁻³ prajmer (Microsynth), 1 U *Taq* polymerázy (Applichem) a 50 ng.µl⁻¹ DNA v celkovom objeme 15 µl za podmienok uvedených v tabuľke 3.

PCR produkty boli vystavené štiepeniu pomocou reštrikčnej endonukleázy *Hpa*II. Štiepenie prebiehalo v tlmivom ustálenom roztoku 1× Buffer Tango™ obsahujúcom 33 mmol.dm⁻³ Tris-acetát (pH 7,9), 10 mmol.dm⁻³ octan horečnatý, 66 mmol.dm⁻³ draselný acetát, 0,1 mg.ml⁻¹ BSA (Fermentas – Life science), spolu s 10 U.µl⁻¹ *Hpa*II dodávaný v 10mmol Tris-HCl (pH 7,4; 25 °C), 100 mmol.dm⁻³ NaCl, 1 mmol.dm⁻³ DTT, EDTA, 0,2 mg.ml⁻¹ BSA a 50 % glycerol), DNA a vodou. Štiepenie prebehlo pri teplote 37 °C počas 14 hodín v termoboxe. Štiepne produkty boli ďalej elektroforeticky spracované a vyhodnocované. Štiepne fragmenty pre stanovenie prítomnosti alebo absencie ampflikovanej časti génu boli elektroforeticky rozdeľované v 2% agarózovom géli 1× TBE. Pre určenie veľkosti štiepných fragmentov bol použitý markér Lonza 50 – 2 500 bp. Elektroforéza prebiehala pri konštantnom napätí 65 V. Fotodokumentácia elektroforeogramov bola realizovaná zariadením G.Box. Elektroforeogramy boli spracované pomocou GeneSnap – verzia: 7.09 (Syngene) a GeneTools – verzia: 4.01 (Syngene). Profily boli vyhodnocované z hľadiska prítomnosti alebo neprítomnosti žiadaných štiepných produktov.

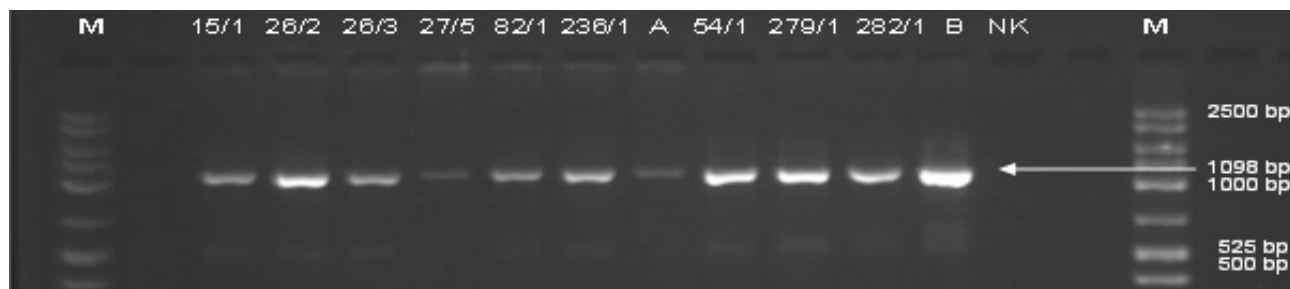
Výsledky a diskusia

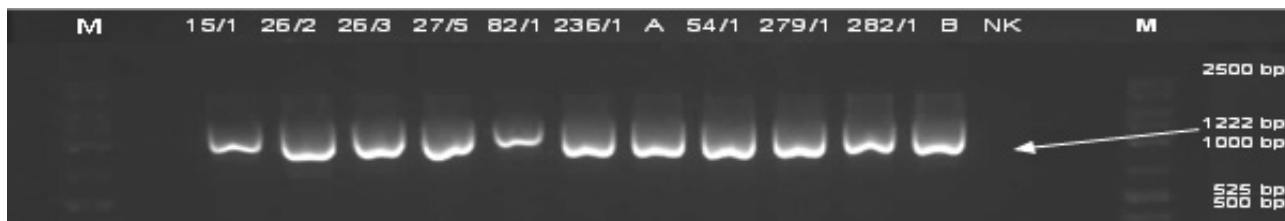
Poznatky o genetickej rozmanitosti a vzťahoch medzi a v rámci kultúrnych druhov a ich voľne rastúcich príbuzných sú nevyhnutné najmä z hľadiska efektívneho budovania a využívania jednotlivých kolektív genetických zdrojov rastlín (Chan and Sun, 1997).

V prípade zrnových typov láskavca sú až po súčasnosť stále platné dve hypotézy ich evolučného vývinu (Sauer, 1967). Prvou je hypotéza, že všetky tri zrnové typy láskavca boli domestikované z voľne rastúcich druhov nezávisle od seba na troch odlišných územiach – *Amaranthus caudatus* L. z láskavca ecuadorský (*Amaranthus quitensis* Kunth. in H., B. et. K.) v Južnej Amerike, *Amaranthus cruentus* L. z *Amaranthus hybridus* L. v Strednej Amerike a *Amaranthus hypochondriacus* L. z láskavca zelenoklasý (*Amaranthus powellii* S. Watson) v Mexiku.

Molekulárne analýzy jednotlivých zložiek genómu láskavca sú teda žiaducim nástrojom s potenciálom objasniť niektorú z platných hypotéz. Bližšia charakteristika evolučných vzťahov jednotlivých druhov rodu láskavec so zameraním sa na stanovenie vzťahov medzi jednotlivými kultivovanými aj voľne rastúcimi druhmi bola uskutočnená pomocou RAPD markérov a izoenzymov (Chan and Sun, 1997), AFLP a ISSR markérov (Xu and Sun, 2001), ako aj metodikami mikromorfológie (Costea et al., 2006).

Gén *GBSSI* pre *Amaranthus cruentus* L. s veľkosťou 3 492 bp je v databáze NCBI evidovaný pod prístupovým kódom AB456685.1. *GBSSI* gén je zodpovedný za syntézu škrobu. Patrí medzi intenzívne študovaný gén láskavca podieľajúcich

**Obrázok 2** Zmoženie úseku génu *GBSSI* v rozsahu 1 – 1 098 bp prajmerom *GBSSI* 3 M – markér Lonza 50 – 2 500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavca metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola**Figure 2** Amplification of part of the *GBSSI* gene 1 – 1 098 bp with primer *GBSSI* 3 M – Marker Lonza 50–2500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control

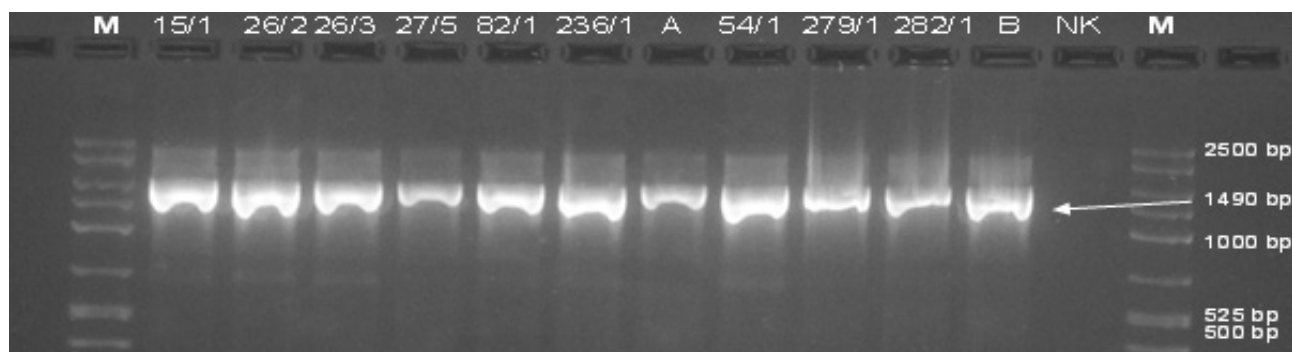


Obrázok 3 Zmnoženie úseku génu *GBSSI* v rozsahu 437 – 1 659 bp prajmerom *GBSSI* 2

M – markér Lonza 50–2500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola

Figure 3 Amplification of part of the *GBSSI* gene 437 – 1 659 bp with primer *GBSSI* 2

M – Marker Lonza 50–2500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control

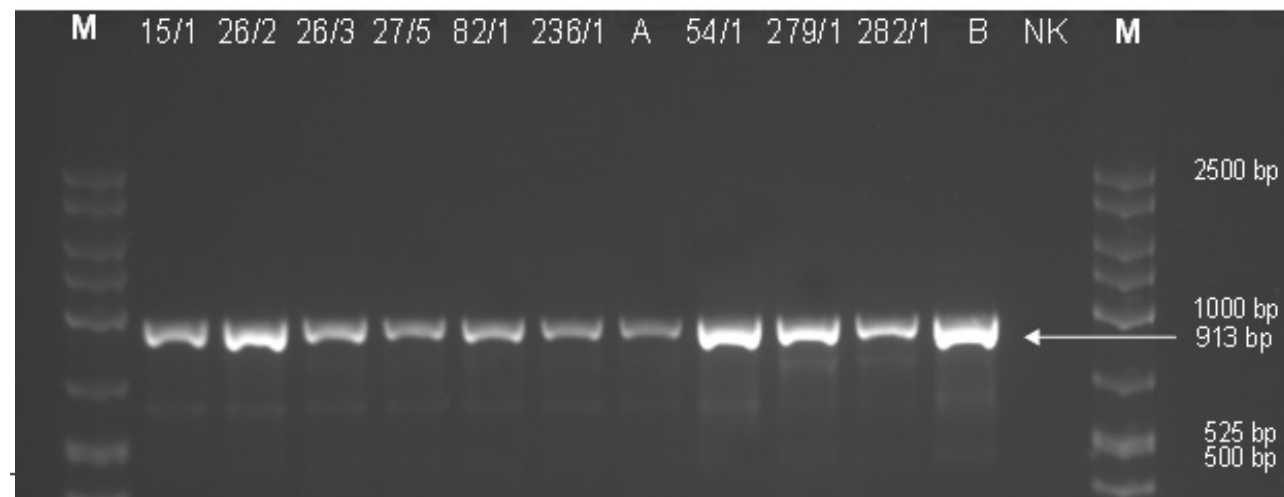


Obrázok 4 Zmnoženie úseku génu *GBSSI* v rozsahu 1255 – 2 725 bp prajmerom *GBSSI* 1

M – markér Lonza 50–2500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola

Figure 4 Amplification of part of the *GBSSI* gene 1 255 – 2 725 bp with primer *GBSSI* 1

M – Marker Lonza 50–2500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control



Obrázok 5 Zmnoženie úseku génu *GBSSI* v rozsahu 2 548 – 3 461 bp prajmerom *GBSSI* 4

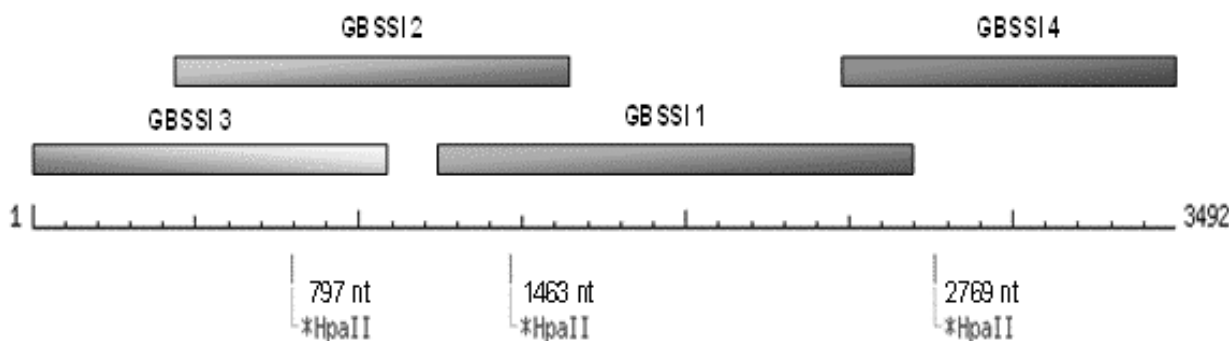
M – markér Lonza 50–2500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavec metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola

Figure 5 Amplification of part of the *GBSSI* gene 2 792 – 3 461 bp with primer *GBSSI* 4

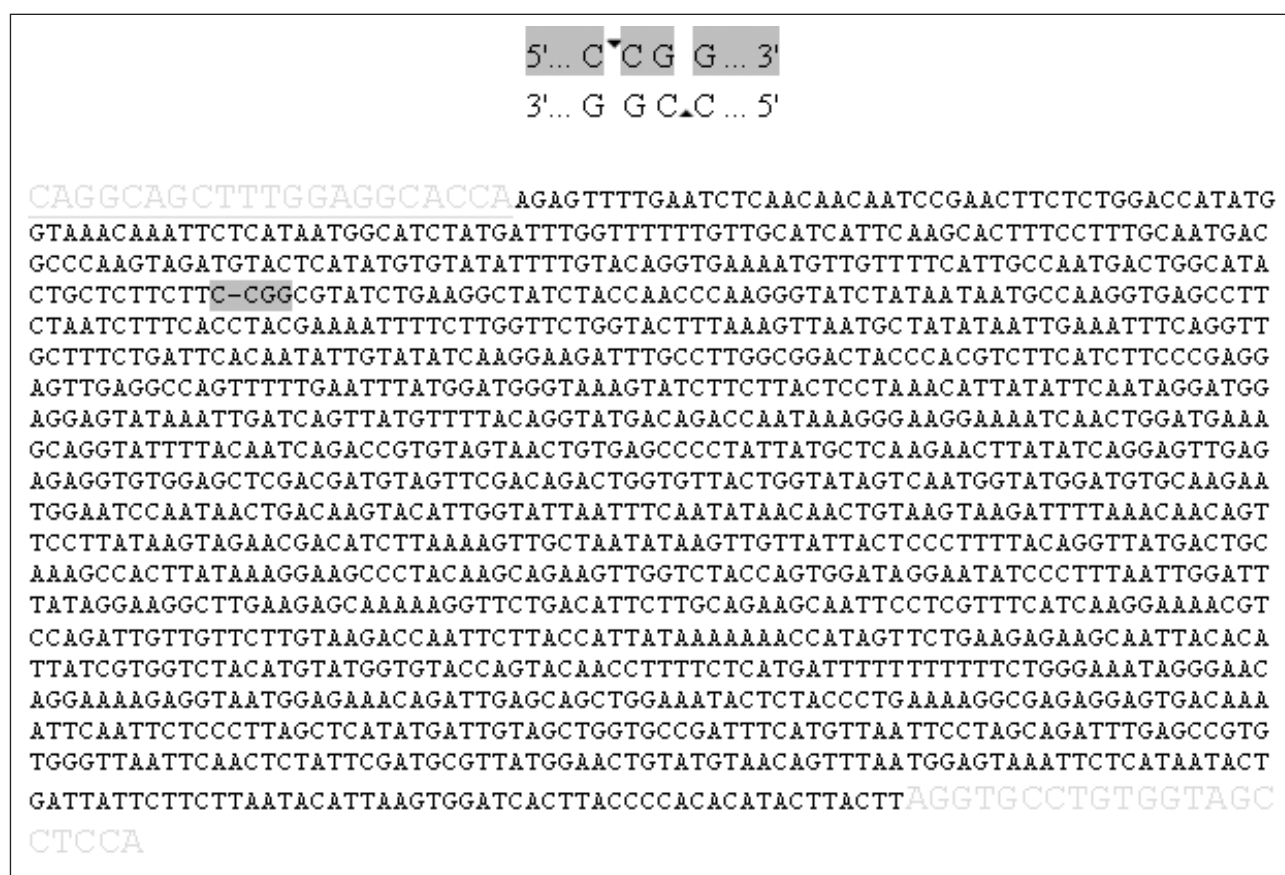
M – Marker Lonza 50–2500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control

sa na tvorbe zásobných látok (škrobu). Práve zmena poradia nukleotidov v tomto géne môže podmieňovať zvýšenie HTS, napríklad v dôsledku zmeny syntézy škrobu, za ktorý je daný gén zodpovedný.

Pre zmnoženie celého *GBSSI* génu boli použité prajmery s označením: *GBSSI* 1, *GBSSI* 2, *GBSSI* 3, *GBSSI* 4. Sekvencia s veľkosťou a vyznačením jednotlivých prajmerov je znázornená na obrázku 6.



Obrázok 6 Mapa reštrikčných miest použitej endonukleázy *HpaII* na *GBSSI* géne láskavca
Figure 6 Map of restriction sites with used endonuclease *HpaII* for the amaranth *GBSSI* gene



Obrázok 7 Reštrikčné miesto štiepenia úseku 1 255 – 2 725 bp *GBSSI* génu RE *HpaII*
Figure 7 Restriction site for cleavage of 1 255 – 2 725 bp segment of the *GBSSI* gene RE *HpaII*

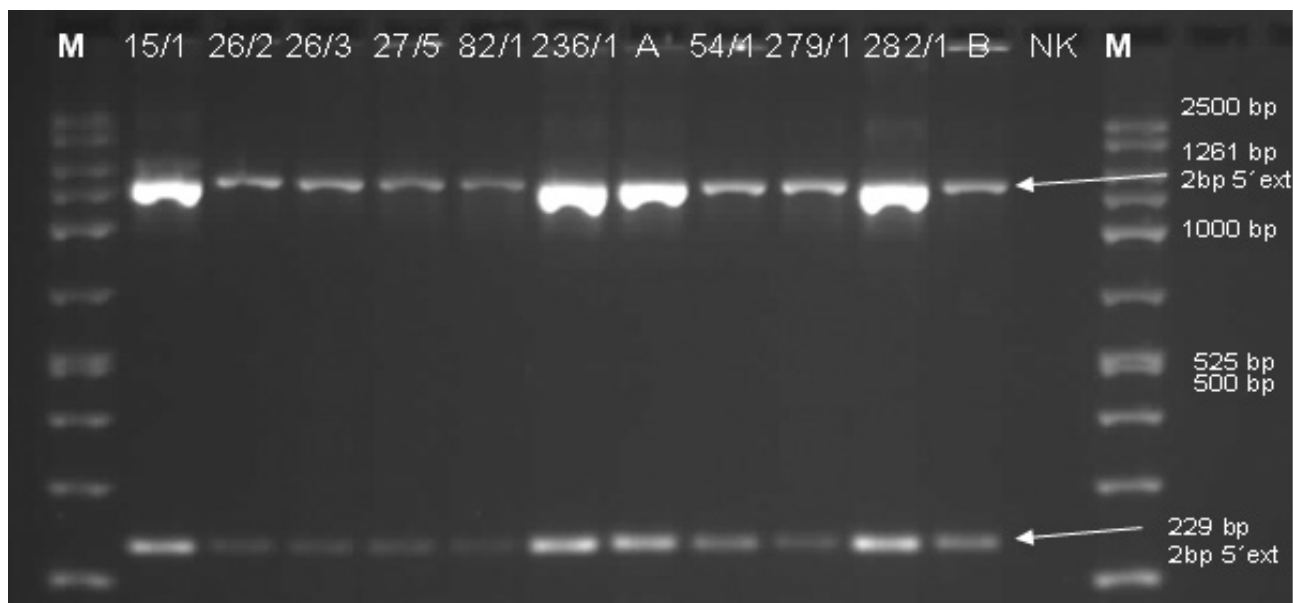
Na analýzu potenciálnych zmien v géne *GBSSI* láskavca genotypu Fichta – *Amaranthus cruentus* L. a hybridu K-433 (*Amaranthus hybridus* L. × *Amaranthus hypochondriacus* L.) bola použitá PCR reakcia – zmoženie jednotlivých oblastí *GBSSI* génu a ich následné reštrikčné štiepenie.

Pomocou navrhnutých prajmerov boli krokovo zmožnené samostatne štyri úseky *GBSSI* génu láskavca (obrázky 2 – 5).

Pre štiepenie génu bol vybraný reštrikčný enzým *HpaII*, ktorý sa vyznačuje citlivosťou na CpG metyláciu. Štiepenie *GBSSI* génu pomocou RE *HpaII* prebehlo po predchádzajúcej analýze sekvencie *GBSSI* génu v programe NEBcutter2 voľne dostupnom na internete (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>), kde bola zostrojená mapa reštrikčných miest (obr. 6) pre *HpaII* endonukleázy.

Na obrázku 7 je zobrazené štiepne miesto úseku 1 255 – 2 725bp *GBSSI* génu reštrikčného enzýmu *HpaII*, ktorý sa vyznačuje citlivosťou na CpG metyláciu.

Na základe elektroforeogramu (obrázok 8) zostrojeného po reštrikčnom štiepení vybranou reštrikčnou endonukleázou *HpaII* bolo zistené, že príslušný enzým štiepil v úseku génu s veľkosťou 1 255 – 2 725 bp vo všetkých vzorkách mutačných línií a ich kontrol rovnako. Výsledkom boli dva štiepne produkty s veľkosťou 1 261 a 229 bp. Podobne to bolo aj v úseku génu s veľkosťou 1 – 1 098 bp (prajmer *GBSSI* 3), kde výsledkom boli dva fragmenty veľkosti 797 bp a 301 bp a v úseku génu s veľkosťou 2 548 – 3 461 bp (prajmer *GBSSI* 4) to bolo fragmenty veľkosti 215 bp a 692 bp.



Obrázok 8 Štiepenie úseku génu s veľkosťou 1 255 – 2 725 bp pomocou RE – *HpaI*

M – markér Lonza 50 – 2 500 bp, NK – negatívna kontrola, vzorky láskavca metlinatý (*Amaranthus cruentus* L.) 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – kontrola. Vzorky hybrid K-433 54/1, 279/1, 282/1, B – kontrola

Figure 8 Cleavage of the *GBSSI* gene segment 1 255 – 2 725 bp with RE – *HpaI*

M – Marker Lonza 50 – 2 500 bp, NK – negative control, samples of *Amaranthus cruentus* L. 15/1, 26/2, 26/3, 27/5, 82/1, 236/1, A – control. Samples of K-433 hybrid 54/1, 279/1, 282/1, B – control

Výsledkom štiepenia je, že v dôsledku aplikovanej mutácie v podobe radiačného žiarenia nedošlo ku zmenám – mutácii na úrovni nukleotidov v miestach reštrikčného štiepenia pomocou *HpaI* enzýmu v sekvencii *GBSSI* génu láskavca.

Hricová et al. (2011) realizovala biochemický výskum mutantných línií druhov *Amaranthus cruentus* L. genotypu 'Ficha' a hybridu K-433. Nutričné hodnoty vybraných mutantných línií v porovnaní s ich kontrolnými zostávajú bez výraznejšej zmeny s výnimkou mutačnej línie C82/1.

Múdry et al. (2011) analyzoval polymorfizmus enzýmov mutantných línií genotypu Ficha a mutantných línií hybridu K-433. Najlepší výsledok bol pozorovaný v prípade fosfoglukomutázy, kde boli oba genotypy navzájom odlišené.

Ray and Roy (2009) využili RAPD a SCAR markéry na stanovenie genetickej diverzity medzi viacerými druhmi láskavca. RAPD prajmery zabezpečili produkciu tvorby celkovo 262 amplifikovaných produktov, z ktorých 96,94 % bolo polymorfnych. Priemerná hodnota koeficientu podobnosti medzi sledovanými druhmi láskavca predstavovala hodnotu 0,56. Na základe tejto hodnoty koeficientu je zrejme, že existuje variabilita medzi rozdielnymi populáciami. SCAR markéry označili ako potencionálne užitočné pre ochranu genetických zdrojov a identifikáciu ekotypov láskavca.

Park et al. (2010) sa vo svojej práci zamerali na zistenie prítomnosti a popis polymorfnych miest v poradí nukleotidov *waxy* génov troch druhov láskavca. Porovnaním získaných sekvencií autori popísali celkovo 16 polymorfnych miest v kódujúcich úsekoch aj intrónoch, pričom väčšina bola charakteru SNP a/alebo inercií a delécií. Jednonukleotidový polymorfizmus – SNP v kódujúcich úsekoch bol nájdený v exónoch 10 a 13, ale nevedie k zmenám v zložení aminokyselín a ani k zmenám v dozrievaní tejto bielkoviny či k ovplyvneniu jej enzymatickej aktivity. Krátke indel zmeny (delécia alebo inercia) boli popísané v intróne 4 – konkrétne delécie 8 a 3 bp. Podobné krátke delécie existujú aj v iných rastlinných druhoch ako láskavca a vo väčšine z hľadiska na ich lokalizáciu neovplyvňujú fenotyp (Domon et

al., 2002b; Fukunaga et al., 2002; Van et al., 2008). V týchto oblastiach bolo nájdených aj niekoľko krátkych prvkov charakteru transpozónových sekvencií a rovnako ako indel zmeny, aj tieto sú zaznamenané pri viacerých rastlinných druhoch zahŕňajúc ryžu (Mochizuki et al., 1992), kukuricu (Bureau a Wessler, 1992) a proso (Fukunaga et al., 2002; Kawase et al., 2005). Molekulárna charakteristika *waxy* alel viacerých rastlinných druhov poukazuje na rôznu príčinu ich vzniku. V prípade kukurice a prosa *waxy* mutácie vznikli spontánne ako dôsledok transpozíčnej aktivity (Fedoroff et al., 1983; Wessler a Varagona, 1985; Fukunaga et al., 2002). V prípade ryže ide o dôsledok nukleotidovej substitúcie vyúsťujúci v aberáciu a zostrih 5' konca intrónu 1 (Cai et al., 1998; Hirano et al., 1998; Wang et al., 1995). V prípade pšenice existujú významné delécie génu tohto proteínu v kódujúcich oblastiach (Vrinten et al., 1999) a pri prose je *waxy* fenotyp dôsledkom delécie 5' terminálnej časti génu (Domon et al., 2002a). Testovanie diverzity genómu láskavca na molekulárnej úrovni pomocou molekulárnych markérov je účinné a je v súčasnosti vo vysokej miere používané (Park, Lee and Kim, 2009).

Záver

Reštrikčné štiepenie PCR fragmentov predstavuje efektívny nástroj druhovo špecifických analýz, ktorý efektívne a v krátkom čase umožňuje identifikáciu prítomnosti a/alebo zmeny konkrétnych poradí nukleotidov v rastlinných genómoch. Potvrdenie reštrikčného miesta *HpaI* enzýmu v *GBSSI* géne láskavca v prípade kontrolných vzoriek aj mutantných línií ukázalo, že tento úsek poradia nukleotidov nebol pozmenený v dôsledku radiačnej mutagenézy, čo dáva predpoklad pre jeho využitie v konštrukcii prajmerov ďalších molekulárnych analýz *GBSSI* génu.

Súhrn

V práci bola realizovaná detekcia *GBSSI* génu zo zámerom sledovania polymorfizmu v reštrikčných miestach pôsobenia

reštrikčnej endonukleázy *Hpa*II s využitím zmnoženia štyroch úsekov *GBSSI* génu laskavca PCR reakciou a následné štiepenie produktov príslušnou reštrikčnou endonukleázou *Hpa*II. Prítomnosť rozoznávateľného miesta štiepenia 5'CCGG3' bola potvrdená ako pre kontrolné genotypy, tak aj pre línie laskavca. Vo všetkých sledovaných mutačných líniiach a ich kontrolách boli vyštiepené dva fragmenty v úseku génu s veľkosťou 1 255 – 2 725 bp (prajmer *GBSSI* 1) to bolo fragmenty veľkosti 1 261 bp a 229 bp, v úseku génu s veľkosťou 1 – 1 098 bp (prajmer *GBSSI* 3) to bolo fragmenty veľkosti 797 bp a 301 bp a v úseku génu s veľkosťou 2 548 – 3 461 bp (prajmer *GBSSI* 4) to bolo fragmenty veľkosti 215 bp a 692 bp.

Kľúčové slová: *GBSSI* gén laskavca, PCR, reštrikčné štiepenie, mutantné línie

PodĎakovanie

Táto práca bola finančne podporená grantom Excelentné centrum ochrany a využívania agrobiodiverzity, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja a výskumnou úlohou VEGA 2/0109/09.

Literatúra

- BEŽO, M. – HELDÁK, J. – ŽIAROVSKÁ, J. – HRUBÍKOVÁ, K. – ŠTEFÚNOVÁ, V. 2005. Využitie včlenených kópií Tst1 retrotranspozónu pre analýzu F1 hybridov ľulka zemiakového (*Solanum tuberosum* L.) = : The Tst1 retrotransposon in inserted copies in the potato (*Solanum tuberosum* L.) F1 hybrids analysis. In BIOS 2005. Nitra : SPU, 2005. s. 87–91.
- BUREAU, T. – WESSLER, S. 1992. Tourist: a large family of small inverted repeat elements frequently associated with maize genes, In: Plant Cell, vol. 4, 1992, p. 1283 – 1294.
- CAI, X. – WANG, Z. – XING, Y. – ZHANG, J. – HONG, M. 1998. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5'UTR and decreased expression of *waxy* gene in rice cultivars of intermediate amylose content. In: The Plant Journal, vol. 14, 1998, p. 459 – 465.
- COSTEA, M. – BRENNER, DM. – TARDIF, FJ. – TAN, YF. – SUN, M. 2006. Delimitation of *Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus caudatus* L. using micromorphology and AFLP analysis: an application in germplasm identification. In: Genet. Res. Crop Evol., vol. 53, 2006, p. 1625 – 1633.
- DOMON, E. – FUJITA, M. – ISHIKAWA, N. 2002a. The insertion/deletion polymorphisms in the *waxy* gene of barley genetic resources from East Asia. In: Theor Appl Genet., vol. 104, 2002a, p.132 – 138.
- DOMON, E. – SAITO, A. – TAKEDA, K. 2002b. Comparison of the *waxy* locus sequence from a non-*waxy* strain and two *waxy* mutants of spontaneous and artificial origins in barley. In: Genes Genet Syst., vol. 77, 2002b, p. 351 – 359.
- FEDOROFF, N. – WESSLER, S. – SHURE, M. 1983. Isolation of the transposable maize controlling elements Ac and Ds. In: Cell, vol. 35, 1983, p. 235 – 242.
- FUJITA, N. 1998. A 56kDa protein is a novel granule-bound starch synthase existing in the pericarps, aleurone layers, and embryos of immature seeds in diploid wheat (*Triticum monococcum* L.). In: Planta Academic Journal, vol. 207, 1998, p. 125 – 132.
- FUKUNAGA, K. – KAWASE, M. – KATO, K. 2002. Structural variation in the *Waxy* gene and differentiation in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.]: implications for multiple origins of the *waxy* phenotype. In: Mol. Genet. Genomics, vol. 268, 2002, 214 – 222.
- GAJDOŠOVÁ, A. – LIBIAKOVÁ, G. – OSTROLUCKA M. G. – FEJÉR, J. 2008. Mutation Breeding inbred *Amaranthus* spp. In: *Amaranth* – Plant for the Future (5th International Symposium of the European Amaranth Association) Nitra : SAV, 2008, p. 93 – 94.
- HIRANO, H. – SANO, Y. 1991. Molecular characterization of the *waxy* locus of rice (*Oryza sativa*). In: Plant Cell Physiol., vol. 32, 1991, p. 989.
- HRICOVÁ, A. – KEČEŠOVÁ, M. – GÁLOVÁ, Z. – LIBIAKOVÁ, G. – GAJDOŠOVÁ, A. 2011. Skúmanie zmien profilu bielkovín v semenách laskavca podrobených radiačnej mutagenéze. In: Chemické listy, roč. 105, 2011, s. 542 – 545.
- HRUBÍKOVÁ, K. – CANDRÁKOVÁ, A. – BEŽO, M. – ŽIAROVSKÁ, J. 2007. Retro transpozónové markéry v analýze populácií jačmeňa siateho. In: Nové poznatky z genetiky a šľachtenia poľnohospodárskych rastlín : zborník zo 14. vedeckej konferencie, 13.–14. november 2007. Nitra : Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, 2007, s. 90 – 93. ISBN 978-80-88872-65-8.
- CHAN, K. F. – SUN, M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species *Amaranthus*. In: Theoretical and applied genetics, vol. 95, 1997, no. 5 – 6, p. 865 – 873.
- INOUCHI, N. – NISHI, K. – TANAKA, S. – ASSAI, M. – KAWASE, Y. – HATA, Y. KONISHI, Y. – YUE, S. – FUWA, H. 1999. Characterization of amaranth and quiana starches. In: J. APPL. Glycosci., vol. 46, 1999, p. 233 – 240.
- JAMES, M.G. – DENYER, K. – MYERS A. M. 2003. Starch synthesis in the cereal endosperm. In: Curr. Opin. Plant Biol., vol. 6, 2003, p. 215 – 222.
- KAWASE, M. – FUKUNAGA, K. – KATO, K. 2005. Diverse origins of *waxy* foxtail millet crops in East and Southeast Asia mediated by multiple transposable element insertions. In: Mol Genet Genomics, vol. 274, 2005, p.131 – 140.
- KONISHI, Y. – NOJIMA, H. – OKUNO, K. – ASAOKA, M. – FUWA, H. 1985. Characterization of starch granules from *waxy*, nonwaxy, and hybrid seeds of *Amaranthus hypochondriacus* L. In: Agri. Biol. Chem., vol. 4, 1985, p. 1965 – 1971.
- LINDEBOOM, N. – CHANG, P.R. – TYLER, R.T. 2004. Analytical, Biochemical and Physicochemical Aspects of Starch Granule Size, with Emphasis on Small Granule Starches: A Review. In: Starch/Stärke, vol. 56, 2004, p. 89 – 99
- MARCONI, M. 2001. Starch properties of *Amaranthus pumilus* (seabeach amaranth): a threatened plant species with potential benefits for the breeding/amelioration of present *amaranthus* cultivars. In: Food Chem., vol. 73, 2001, p. 61 – 66.
- MOCHIZUKI, K. UMEMEDA, M. – OHTSUBO, H. – OHTSUBO, E. 1992. Characterization of a plant SINE, p-SINE1, in rice genomes. In: Jpn J Genet., vol. 67, 1992, p. 155 – 166.
- MÚDRY, P. – HRICOVÁ, A. – LIBIAKOVÁ, G. – GAJDOŠOVÁ, A. 2011. Methodological approaches to simple enzyme polymorphism analyses of *Amaranthus* species (*Amaranthus* sp.). In: Agriculture, vol. 57, 2011, no. 1, p. 1 – 11.
- NAKAMURA, T. – VRINTEN, P. – HAYAKAWA, K. – IKEDA, J. 1998. Characterization of a granule-bound starch synthase isoform found in the pericarp of wheat. In: Plant Physiol., vol. 118, 1998, p. 451 – 459.
- OKUNO, K. – SAKAGUCHI, S. 1981. Glutinous and non-glutinous starches in perisperm of grain amaranth. In: Cereal Res. Commun., vol. 9, 1981, p. 305 – 310.
- OSLOVIČOVÁ, V. – GÁLOVÁ, Z. – CHŇAPEK, M. – BALÁŽOVÁ, Ž. 2010. Identification of *Triticum aestivum* L., *Triticum spelta* L. and *Triticum durum* DESF. genotypes on the HMW-GS base. In: Plant, soil and environment, vol. 56, 2010, no. 2, p. 82 – 86. ISSN 1214-1178.
- PARK, Y.J. – NEMOTO, K. – NISHIKAWA, T. – MATSUSHIMA, K. – MINAMI, M. – KAWASE, M. 2009. Molecular cloning and characterization of granule bound starch synthase I cDNA from a grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.) In: Breeding Science, vol. 59, 2009, p. 351 – 360.
- PARK, Y.J. – NEMOTO, K. – NISHIKAWA, T. – MATSUSHIMA, K. – MINAMI, M. – KAWASE, M. 2010. *Waxy* strains of three amaranth grains raised by different mutations in the coding region. In: Mol Breeding, vol. 25, 2010, p. 623 – 635.
- PARK, Y.J. – NEMOTO, K. – NISHIKAWA, T. – MATSUSHIMA, K. – MINAMI, M. – KAWASE, M. 2011. Genetic diversity and expression analysis of granule bound starch synthase I gene in the new world grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). In: Journal of Cereal Science, vol. 53, 2011, p. 298 – 305.
- PARK, Y.J. – LEE, J.K. – KIM, N. S. 2009. Simple Sequence Repeat Polymorphisms (SSRPs) for Evaluation of Molecular Diversity and Germplasm Classification of Minor Crops. In: Molecules, vol. 14, 2009, p. 4546 – 4569.
- RAY, T. – ROY, S. C. Genetic Diversity of *Amaranthus* Species from the Indo-Gangetic Plains Revealed by RAPD Analysis Leading to the

- Development of Ecotype-Specific SCAR Marker. In Journal of heredity, vol. 100, 2009, no. 3, p. 338–347.
- REVÁK, O. – ŽIDEK, R. – BAJZÍK, P. – BELEJ, L. 2011. Detekcia lupiny (*Lupinus* spp.) ako skrytej hrozby v potravinách. In: Proteiny 2011 : sborník příspěvků VI. ročníku mezinárodní konference, 3. – 4. května 2011 Zlín. Zlín : Univerzita Tomáše Bati, 2011, s. 97 – 100. ISBN 978-80-7454-022-6.
- SAUER, J. D. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. In: Annals of the Missouri Botanical Garden, vol. 54, 1967, p. 103 – 137.
- SUIGIMOTO, Y. – YAMADA, K. – SAKAMOTO, S. – FUWA, H. 1981. Some properties of normal-and waxy-type starches of *Amaranthus hypochondriacus* L. In: Starch/Staerke, vol. 33, 1981, p. 112 – 116.
- TSAI, C. Y. 1974. The function of the waxy locus in starch synthesis in maize endosperm. In: Biochem. Genet., vol. 11, 1974, p. 83 – 96.
- VAN, K. – ONODA, S. – KIM, MY. – KIM, KD. – LEE, SH. 2008. Allelic variation of the Waxy gene in foxtail millet [*Setaria italica* (L.) P. Beauv.] by single nucleotide polymorphisms. In: Mol. Genet. Genom., vol. 279, 2008, p. 255 – 266.
- VIVODÍK, M. – GÁLOVÁ, Z. – BALÁŽOVÁ, Ž. 2011. Identification, differentiation and characterization of barley genotypes using SSR markers. In: Potravinárstvo, roč. 5, mimoriadne č. 2011, s. 96 – 100. ISSN 1338-0230.
- VRINTEN, P. – NAKAMURA, T. – YAMAMORI, M. 1999. Molecular characterization of waxy mutations in wheat. In: Molecular Genetics and Genomics, vol. 261, 1999, p. 463 – 471.
- WANG, Z. – ZHENG, F. – SHEN, G. – GAO, J. – SNUSTAD, D. – LI, M. – ZHANG, J. – HONG, M. 1995. The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the waxy gene. In: The Plant Journal, vol. 7, 1995, p. 613 – 622.
- WESSLER, S. – VARAGONA, M. 1985. Molecular basis of mutations at the waxy locus of maize: correlation with the fine structure genetic map. In: Proceedings of the National Academy of Sciences USA, vol. 82, 1985, p. 4177 – 4181.
- XU, F. – SUN, M. 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; *Amaranthaceae*) using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent intersimple sequence repeat markers. In: Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 21, 2001, no. 3, p. 372 – 387.
- ZELEŇÁKOVÁ, L. – ŽIAROVSKÁ, J. – MURA, L. – KOZELOVÁ, D. 2011. Štatistická analýza zmien v epidemiológii salmonelóz na Slovensku = : Statistical analysis of changes in the epidemiology of Salmonellosis in Slovakia. In: Forum statisticum Slovaca, vol. 7, 2011, no. 4, p. 109 – 113. ISSN 1336-7420.
- ZELEŇÁKOVÁ, L. – ŽIAROVSKÁ, J. – KRÁČMAR, S. – MURA, L. – KOZELOVÁ, D. – LOPAŠOVSKÝ, L. – KUNOVÁ, S. – TINÁKOVÁ, K. 2012a. Application of epidemiological information system (EPIS) in the Slovak republic within the surveillance of salmonellosis and campylobacteriosis outbreaks in the European union (2001–2010). In: Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, vol. 60, 2012a, no. 1, p. 189 – 200. ISSN 1211-8516.
- ZELEŇÁKOVÁ, L. – ŽIAROVSKÁ, J. – KOZELOVÁ, D. – MURA, L. – LOPAŠOVSKÝ, L. – BOBKOVÁ, A. – ZAJÁC, P. – ČAPLA, J. – TINÁKOVÁ, K. 2012b. Campylobacteriosis: importance of strengthening surveillance and reported foodborne disease control within European Union. In: Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences : scientific journal, vol. 1, 2012, special issue, p. 855 – 867.
- ŽIAROVSKÁ, J. – ŠTEFÚNOVÁ, V. – BEŽO, M. 2003. Výber prajmerov pre RAPD na rozlíšenie genotypov ľanu siateho (*Linum usitatissimum* L.) : The option of RAPD primers for determine genetic diversity of flax (*Linum usitatissimum* L.) genotypes. In: BIOS 2003. Nitra : SPU, 2003. s. 128 – 132.
- ŽIDEK, R. – BAJZÍK, P. – MARŠÁLKOVÁ, L. – GOLIAN, J. 2012. Detekcia falšovania hovädzieho mäsa pomocou Real-Time PCR = : Detection of counterfeit beef with Real-Time PCR. In: Mäso, roč. 23, 2012, č. 1, s. 15 – 17. ISSN 1210-4086.

Kontaktná adresa:

Ing. Mária Labajová, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov, Katedra genetiky a šľachtenia rastlín, Tr. Andeja Hlinku 2, 949 76 Nitra, ☎ 0949 479 723, e-mail: majka.labajova@gmail.com

Acta fytotechnica et zootechnica 3
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2012, s. 81 – 84

CARCASS TRAITS OF FATTENING PIGS IN RESPONSE TO HIGH AMBIENT TEMPERATURE

VPLYV VYSOKEJ TEPLoty NA JATOČNÉ PARAMETRE VÝKRMOVÝCH OŠÍPANÝCH

Andrea LEHOTAYOVÁ, Ondřej BUČKO, Juraj PETRÁK, Ondrej DEBRECÉNI

Slovak University of Agriculture in Nitra

The influence of high ambient temperature on carcass parameters was studied in 13 fattening pigs of Large White breed. The pigs were divided into two groups. The experimental group was housed in a climatic chamber with fixed constant temperature (30 °C), and the control group of pigs was housed in a pen (average temperature 20.25 °C) in standard conditions according to the station of fattening and carcass value. The pigs were slaughtered at about 100 kg body weight. The results showed that higher average body weight during the whole trial was marked in the experimental group of pigs, differences were not statistically significant. The weight of loin was higher ($P < 0.05$) in the group of pigs under long-term heat burden compared with group in standard conditions (5.32 vs. 4.89 kg). The weight of thigh, percentage of lean meat cuts and lean meat from thigh was also higher in the experimental group of pigs compared with the control group. On the contrary, the weight of backfat, thigh fat weight and average backfat thickness was lower in the experimental group of pigs. There were no statistically significant differences. The results indicated that high long-term temperature caused non-significantly lower fat tissue and higher percentage of lean meat in pig carcass. The weight of loin was statistically highly significant.

Keywords: pigs, carcass traits, high ambient temperature

In the summertime in our climatic zone, the extreme increase in temperature occurs more frequently. The ambient temperature is one of the major factors that affect the production of pigs (Sirotkin et al., 2011) and it decreases the performance (Misztal et al., 2006). When the border zone of thermal neutrality is overpassed, it is impossible to achieve maximum performance. Kovalčíková, Kovalčík (1974) suggest that crossing the border zone of thermal neutrality is noticed by organism as a burden. The critical rate for pig is considered at 26 °C and more, depending on a category of pigs (Botto, 2011).

Pigs are animals which are quite sensitive to high temperatures, and the thermoregulation mechanisms represent great expenses in energy (Fagundes et al., 2009). When pigs are exposed to a high ambient temperature, the possibility to dissipate heat to the environment is limited (Le Bellego et al., 2002). Renaudeau et al. (2006) also deals with the influence of high ambient temperature in growing pigs. Myer and Bucklin (2009) show that pigs can reduce their metabolic heat production by eating less feed. Souza (2009) considered the reduction of feed consumption as the primary response of animals when exposing to high temperatures because pigs do not have functional sweat glands like other livestock species. According to Hsia and Lu (2004), when pigs are given very restricted same amounts of feed, they may need less energy to maintain their body temperature under moderately high environmental temperature (30 °C). Pigs were significantly taller ($P < 0.05$) and significantly longer ($P < 0.05$) and the belly was significantly heavier than in pigs kept at 20 °C. Consequently, their performance is better than that of pigs under optimum environmental temperature.

Huynh et al. (2005) indicate that animals respond to increased temperature by decreasing feed intake mainly as a form of reduction of metabolic heat. Quiniou et al. (2000) suggest that thermal stress has a significant negative effect on pigs with higher body weight. Voluntary feed intake depends

on temperature and body weight with a marked negative effect of high ambient temperatures in heavier pigs.

Hot weather alters pigs' metabolic system and reduces the production performance and carcass quality. The relationship between growth potential and efficiency in lean meat of pigs is regulated by environmental conditions (Fagundes et al., 2009). Environmental temperature has an influence on the physical appearance and weight of internal organs of pigs (Lefaucheur et al., 1991). Rinaldo et al. (2000) indicate that high temperature had direct effect on fat compared to the cool season, it was also mentioned that in the warm season, fat percentage of the carcass was reduced ($P < 0.001$), whereas less fat was deposited in backfat ($P < 0.001$) and more fat retained in leaf fat ($P < 0.001$). Backfat weight was not modified by indoor temperature or by winter temperature, but it was decreased by summer outdoor rearing (Lebret et al., 2002). Carcass fatness was higher ($P < 0.01$) and lean content was lower ($P < 0.01$) at 22 °C than at 29 °C (Le Bellego et al., 2002). Fagundes et al. (2009) suggest that *longissimus thoracis* muscle thickness was smaller in pigs under heat stress, but lean content was higher in those animals. Farrell (1978) implies that high temperature usually increases the length of pig carcass compared with that at lower temperatures. The degree of fatness tends towards a leaner carcass in a hot environment. According to Renaudeau (2006), the results showed an improved tolerance to heat stress with duration of exposure indicating an acclimation to heat, it was found out that the physiological reactions during heat acclimation are affected by breed. The aim of this work was to evaluate the impact of high temperature on carcass characteristics of fattening pigs.

Material and methods

The experiment was carried out in the laboratory conditions of the Experimental centre of farm animals at Department of Special Animal Husbandry in Nitra, and lasted 3 months, from

October till December. In this study, 13 growing pigs of Large White breed were used. All pigs were from one litter. The control group consisted of 6 growing pigs and the experimental group consisted of 7 growing pigs. The experimental group of pigs (4 gilts, 3 barrows) was housed in a climatic chamber, sized 4 × 3 m, and air temperature was constant 30 °C ± 1.0 degree, depending on the intervention of swineherd for feeding and bedding. The temperature in the climatic chamber and also in the pen was measured every half an hour by temperature datalogger HDL. From the obtained data, average temperature was evaluated by software EHDLog. Space in the climatic chamber was divided into feeding-lying area and dunging area. The pigs were offered wet diet *ad libitum*, feed was humidizing by adjunctive water. In the experiment, a nipple drinker was used. The pigs had unlimited access to water and feed throughout the day. Urine and faeces were mucked out every day. Straw was delivered to lying area every day. The control group consisted of 6 pigs (3 gilts, 3 barrows), which were housed in pens. Floor was made of agro brick. Excrements were removed every day. During the winter, the stall was heated (average temperature 20.25 °C). A wet feeder was situated at the front of the pen on lying area, the pigs were also offered water and feed *ad libitum*. Feeding was controlled by computer program, which provided different mixture of components into each pen. Daylight was provided from 6 a.m. to 6 p.m. The pigs were regularly weighed and they were electrically stunned in the station of fattening and slaughter value when they reached slaughter weight 100 kg according to legislation and standard practises STN 466164.

The carcass indicators were evaluated. Hot and cold carcass weights were taken. Half-carcass length, weight of loin, weight of thigh, weight of backfat, thigh fat weight, lean meat cuts and lean meat from thigh, average backfat thickness, *M. longissimus thoracis* muscle were measured from the right half-carcass. From the data obtained in experiment, mean values and standard deviations were calculated. For comparison of

differences between groups with different temperatures, one-way analysis of variance using the F-test with significant level $P \leq 0.05$ was used. Data were analysed by statistical software package SPSS 11.

Results and discussion

High ambient temperature 30 °C which influenced pig performance was used in the experiment; Botto (2011) suggested that critical rate for pigs is considered at 26 °C. Quiniou et al. (2000) found out that thermal burden has a significant negative effect on pigs with higher body weight; heavier pigs receive less food than pigs with less weight. The long term effect of exposure to heat burden on carcass traits of pigs influenced by high ambient temperature and pigs in standard conditions of breed Large White are presented in Table 1 for both groups. The results showed that the weight of right and left half cold carcass was higher in pigs under heat burden. According to experiment of Hsia and Lu (2004) it was found out that in pigs kept at 30 °C, the lean meat of the loin, ham were significantly greater ($P < 0.05$). The obtained results showed that the pigs influenced by heat had longer carcasses than pigs in the pen (99.57 vs. 97.08 cm), which is consistent with the results of Farrell (1978), Lefaucheur et al. (1991) and Hsia and Lu (2004). Significantly lower weight of loin (4.89 vs. 5.32 kg) was observed in the control group of pigs in the pen. The weight of thigh was also higher in pigs housed in the climatic chamber than in the pen (8.88 vs. 8.39 kg). The lower weight of backfat and thigh fat weight showed the pigs influenced by high temperature, but there were no significant differences, as also found out by Hsia and Lu (2004). The carcass parameters of lean meat cuts and lean meat from thigh were higher in the experimental group than in the control group (54.29 vs. 53.16 %, 21.33 vs. 20.95 %), but they did not reach significance, which is consistent with the results of Hsia and Lu (2004) and Le Bellego et al. (2002).

Table 1 Effect of high ambient temperature on carcass traits

Trait (1)	Experiment $x \pm SD$ (2)	Control $x \pm SD$ (3)
Live weight at slaughter in kg (4)	105.79 ± 4.67	102.33 ± 5.44
Cold proportion of left half-carcass weight in kg (5)	41.07 ± 2.13	39.67 ± 2.25
Cold proportion of right half-carcass weight in kg (6)	41.71 ± 1.80	40.08 ± 2.01
Carcass length in cm (7)	99.57 ± 1.88	97.08 ± 2.87
Weight of loin in kg (8)	5.32 ± 0.27a	4.89 ± 0.31b
Weight of thigh in kg (9)	8.88 ± 0.45	8.39 ± 0.33
Weight of backfat in kg (10)	2.99 ± 0.84	3.06 ± 0.60
Thigh fat weigh in kg (11)	1.47 ± 0.39	1.63 ± 0.26
Lean meat cuts in % (12)	54.29 ± 2.38	53.16 ± 2.06
Lean meat from thigh in % (13)	21.33 ± 1.03	20.95 ± 1.08
Average backfat thickness in mm (14)	17.81 ± 6.05	21.33 ± 5.97
Loin eye area in cm ² (15)	39.86 ± 9.65	40.68 ± 5.33

statistical significance: a, b $P \leq 0.05$; SD – standard deviation
štatistická preukaznosť: a, b $P \leq 0,05$; SD – smerodajná odchýlka

Tabuľka 1 Vplyv vysokej teploty prostredia na jatočné parametre

(1) ukazovateľ (2) pokus, priemer, smerodajná odchýlka, (3) kontrola, priemer, smerodajná odchýlka, (4) živá hmotnosť pred zabitím, (5) hmotnosť ľavej polovičky za studena v kg, (6) hmotnosť pravej polovičky za studena v kg, (7) dĺžka tela v cm (8) hmotnosť karé v kg, (9) hmotnosť stehna v kg, (10) hmotnosť chrbtovej slaniny v kg, (11) hmotnosť slaniny zo stehna v kg, (12) % cenných mäsových častí, (13) % mäsa zo stehna, (14) priemerná hrúbka chrbtovej slaniny v mm, (15) plocha *musculus longissimus thoracis* v cm²

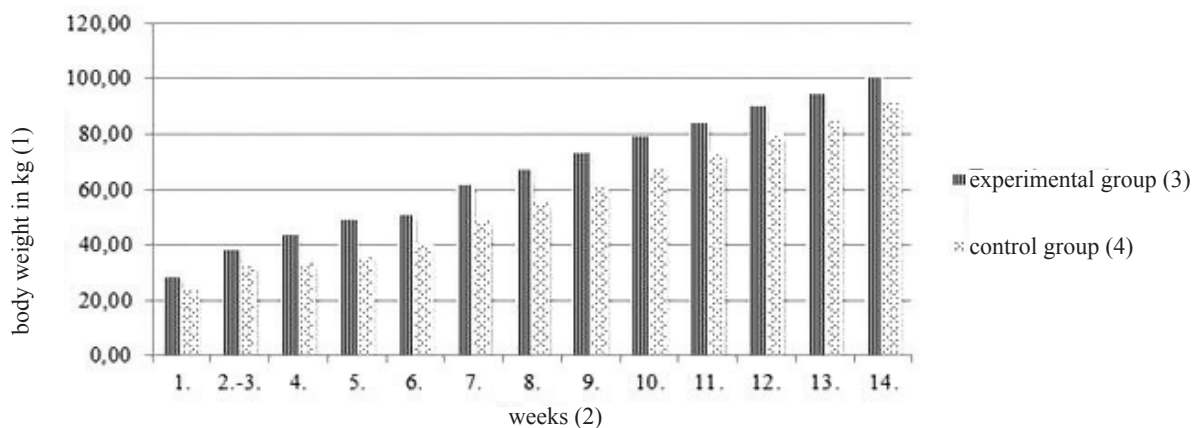


Figure 1 Average body weight of pigs in control and experimental group
Obrázok 1 Priemerná hmotnosť ošípaných v kontrolnej a pokusnej skupine
 (1) hmotnosť v kg, (2) týždne, (3) pokusná skupina, (4) kontrolná skupina

The average backfat thickness was lower in the experimental group than in standard conditions (17.81 vs. 21.33 mm) and it decreased with increasing temperature, which was reported also by results of Rinaldo et al. (2000). The area of *M. longissimus thoracis* muscle was lower in pigs under heat burden as showed Fagundes et al. (2009) and Farrell (1978). The pigs fed *ad libitum* showed a significant effect of high temperature in reducing back-fat thickness and eye muscle area.

Figure 1 shows the average body weight of the pigs during the experiment. The pigs in the climatic chamber (experimental group) reached higher body weight than the control group every week during the trial what is in contradiction with the results of Fagundes et al. (2009) and Myer and Bucklin (2009), who pointed out that pigs reared during the summer grew slower and required more feed per unit of weight gain than a group of pigs reared during the autumn. The obtained results showed that the pigs influenced by high temperature had significantly higher average body weight during the 5 weeks at the beginning of the experiment, than in the pen. The pigs had also significantly higher average body weight than in standard conditions during the week 7. – 10. and week 11. – 13.

Conclusion

The presented results indicated that the high constant long term ambient temperature (30 °C) in the climatic chamber compared to standard conditions (20.25 °C) showed that rearing pigs in the high ambient temperature resulted in non-significantly higher average body weight. Higher temperature in the climatic chamber caused non-significantly lower fat tissue and higher percentage of lean meat in carcass. The weight of loin was significantly higher compared to normal conditions.

Súhrn

Vplyv vysokej teploty prostredia na jatočné parametre bol skúmaný na 13 ks výkrmových ošípaných plemena biela ušľachtilá. Ošípané boli rozdelené do dvoch skupín. Experimentálna skupina bola ustajnená v klimatickej komore s konštantnou teplotou (30 °C) a kontrolná skupina ošípaných bola umiestnená v koteroch (pri priemernej teplote 20,25 °C) v štandardných podmienkach stanice výkrmnosti a jatočnej hodnoty. Ošípané boli zabité pri dosiahnutí 100 kg telesnej hmotnosti. Výsledky

poukázali na to, že vyššia priemerná telesná hmotnosť bola dosiahnutá v priebehu celého experimentu v experimentálnej skupine ošípaných, rozdiely neboli štatisticky preukázateľné. Hmotnosť karé bola vyššia ($P < 0,05$) v skupine ošípaných v dlhodobej tepelnej záťaži v porovnaní so skupinou v štandardných podmienkach (5,32 proti 4,89 kg). Hmotnosť stehna, percentuálny podiel cenných mäsitých častí, podiel mäsa zo stehna boli tiež vyššie v pokusnej skupine ošípaných v porovnaní s kontrolnou skupinou. Naopak, hmotnosť chrbtovej slaniny, hmotnosť slaniny zo stehna a priemerná hrúbka chrbtovej slaniny bola v pokusnej skupine ošípaných nižšia. Rozdiely neboli štatisticky významné. Z výsledkov vyplýva, že dlhodobo vysoká teplota prostredia sa prejavila nepreukázateľne nižším obsahom tukového tkaniva a vyšším percentuálnym podielom mäsa v jatočne opracovanom tele ošípaných. Štatisticky významne sa zvýšila hmotnosť karé.

Kľúčové slová: ošípané, jatočné parametre, vysoká teplota prostredia

Acknowledgements

This work was supported by projects VEGA 1/2717/12, ECOVA - ITMS 26220120015 and ECOVA Plus - ITMS 26220120032

References

- BOTTO, Ľ. 2011. Významný faktor redukcie tepelnej záťaže. Ochladzovanie ošípaných. Dostupné na internete: <<http://www.cvzv.sk/ziv/Botto8.pdf>>.
- FAGUNDES, A. C. A. – da SILVA, R. G. – GOMES, J. D. F. – SOUZA, L. W. O. – FUKUSHIMA, R. S. 2009. Influence of environmental temperature, dietary energy level and sex on performance and carcass characteristics of pigs. In: Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science [online], vol. 46, 2009, p. 32 – 39. Available on the Internet <<http://www.revistasusp.sibi.usp.br/pdf/bjvras/v46n1/v46n1a05.pdf>>.
- FARRELL, D. J. 1978. Effects of high temperature on the biological performance of growing pigs. Available on the Internet: <http://livestocklibrary.com.au/bitstream/handle/1234/19349/78_152.pdf?sequence=1>.
- HSIA, L. C. – LU, G. H. 2004. The effect of high environmental temperature and nutrient density on pig performance, conformation and carcass characteristics under restricted feeding system. In: Asian-Australasian Journal of Animal Science [online], vol. 17, 2004, p. 250 – 258. Available on the Internet <http://www.ajas.info/Editor/manuscript/upload/17_40.pdf>.

- HUYNH, T. T. T. – AARNINK, A. J. – VERSTEGEN, M. W. – GERRITS, W. J. – HEETKAMP, M. J. – KEMP, B. – CANH, T. T. 2005. Effects of increasing temperatures on physiological changes in pigs at different relative humidities. In: *Journal of Animal Science* [online], vol. 83, 2005, p. 1385-1396. Available on the Internet <<http://www.animal-science.org/content/83/6/1385.full.pdf+html>>.
- KOVALČIKOVÁ, M. – KOVALČÍK, K. 1974. *Adaptácia a stres v chove hospodárskych zvierat*. Bratislava : Príroda, 1974, 206 s.
- LEBRET, B. – MASSABIE, P. – GRANIER, R. – JUIN, H. – MOUROT, J. – CHEVILLON, P. 2002. Influence of outdoor rearing and indoor temperature on growth performance, carcass, adipose tissue and muscle traits in pigs, and on the technological and eating quality of dry-cured hams. In: *Meat Science* [online], vol. 62, 2002, p. 447-455. Available on the Internet <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0309174002000360>>.
- Le BELLEGO, L. – Van MILGEN, J. – NOBLET, J. 2002. Effect of high temperature and low-protein diets on the performance of growing-finishing pigs. In: *Journal of Animal Science* [online], vol. 80, 2002, p. 691-701. Available on the Internet <<http://www.animal-science.org/content/80/3/691.full.pdf>>.
- LEFAUCHEUR, L. – Le DIVIDICH, J. – MOUROT, J. – MONIN, G. – ECOLAN, P. – KRAUSS, D. 1991. Influence of environmental temperature on growth, muscle and adipose tissue metabolism, and meat quality in swine. In: *Journal of Animal Science* [online], vol. 69, 1991, p. 2844 – 2854. Available on the Internet <<http://www.journalofanimalscience.org/content/69/7/2844.full.pdf>>.
- MISZTAL, I. – AGUILAR, I. – TSURUTA, S. – SANCHEZ, J. P. – ZUMBACH, B. 2006. Studies on heat stress in dairy cattle and pigs. Available on the Internet: <<http://www.kongressband.de/wcgalp2010/assets/pdf/0625.pdf>>.
- MYER, R. – BUCKLIN, R. 2009. Influence of hot-humid environment on growth performance and reproduction of swine. Florida : Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Available on the Internet: <<http://edis.ifas.ufl.edu/an107>>.
- RENAUDEAU, D. – HUC, E. – KERDONCUFF, M. – GOURDINE, J. L. 2006. Acclimation to high ambient temperature in growing pigs: Effects of breed and temperature level. In: *Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture, Tainan*. Available on the Internet: <<http://www.angrin.tlri.gov.tw/INRA/p19.pdf>>.
- RINALDO, D. – LE DIVIDICH, J. – NOBLET, J. 2000. Adverse effects of tropical climate on voluntary feed intake and performance of growing pigs. In: *Livestock Production Science* [online], vol. 66, 2000, p. 223 – 234. Available on the Internet: <<http://directory.umm.ac.id/Data%20Elmu/jurnal/L/Livestock%20Production%20Science/Vol66.Issue3.Nov2000/1903.pdf>>.
- SIROTKIN A. V. – PARKÁNYI, V. – BAUER, M. 2011. Mechanizmy vplyvu vysokých teplôt na hospodárske zvieratá. In: *Bioclimate: Source and Limit of Social Development International Scientific Conference*. Available on the Internet: <<http://www.cbks.cz/SbornikTopolcianky11/pdf/Sirotkin.pdf>>.
- SOUZA, L. 2009. How can heat stress affect your production? Available on the Internet: <<http://www.thepigsite.com/articles/6/production-management/2715/how-can-heat-stress-affect-your-production>>.
- QUINIOU, N. – DUBOIS, S. – NOBLET, J. 2000. Voluntary feed intake and feeding behaviour of group-housed growing pigs are affected by ambient temperature and body weight. In: *Livestock Production Science* [online], vol.63, 2000, p. 245 – 253. Available on the Internet: <<http://elmu.umm.ac.id/file.php/1/jurnal/L/Livestock%20Production%20Science/Vol63.Issue3.May2000/1825.pdf>>.

Contact address:

Ing. Andrea Lehotayová, Slovak University of Agriculture in Nitra, Faculty of Agrobiological and Food Resources, Department of Animal Husbandry, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovakia, e-mail: xlehotayova@is.uniag.sk
