

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA
V NITRE
FAKULTA AGROBIOLÓGIE A POTRAVINOVÝCH ZDROJOV
Katedra genetiky a plemenárskej biológie

**Genetický polymorfizmus Myf-5 a myostatínu pri mäsových
plemenách hovädzieho dobytká**

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor
vo vednom odbore: 15 – 03 – 9 Genetika

Ing. Janka Kišacová

Nitra, 2008

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre genetiky a plemenárskej biológie Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorandka: Ing. Janka Kišacová
Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: prof. Ing. Alojz Kúbek, CSc.
Katedra genetiky a plemenárskej biológie FAPZ SPU v Nitre

Oponenti: prof. Ing. Václav Řehout, CSc.,
Katedry genetiky, šľachtení a výživy zvierat,
ZF JU v Českých Budějoviciach

prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc.
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

doc. Ing. Peter Chrenek, DrSc.
Oddelenie genetiky a reprodukcie hosp. zvierat
Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu Nitra

Autoreferát bol rozoslaný dňa

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra genetiky a plemenárskej biológie FAPZ SPU v Nitre.

Obhajoba doktorandskej práce sa koná dňa.....oh pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác vedného odboru 15-03-9 Genetika na Fakulte agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre.

Miesto konania:
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
Slovenská poľnohospodárska univerzita
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť:
S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty agrobiológie a potravinových zdrojov SPU v Nitre.

Predseda komisie pre obhajoby vo vednom odbore 15 – 03 – 9

prof. RNDr. Daniel Vlček, DrSc.
Prírodovedecká fakulta,
Univerzita Komenského v Bratislave,
Mlynská Dolina B – 2, 842 15 Bratislava

ABSTRAKT

Chov zvierat s nadmerným osvalením má dôležitý význam pri produkcii potravín v živočíšnej výrobe. U cicavcov bola objavená dysfunkcia myostatínového génu. Straty tejto aktivity u dobytky boli spájané s dvojito osvaleným fenotypom, ktorý sa vyskytoval u európskych plemien hovädzieho dobytky. Myostatín je negatívny regulátor svalového rastu. Mutácie v tomto géne sú zodpovedné za fenotyp dvojitého osvalenia u niektorých plemien hovädzieho dobytky.

Na identifikáciu genotypov Myf-5 a mutácie Q204X myostatínu pri vybraných plemenách dobytky sme použili metódu PCR-RFLP. Tieto gény majú dôležitú úlohu v regulácii svalového vývoja. Na PCR-RFLP sme použili 243 zvierat od siedmich plemien. Len u dvoch plemien (charolais a slovenské strakaté) bol dostatočný počet jedincov pre štatistickú analýzu. PCR metóda je optimalizovaná na identifikáciu rozdielov medzi normálnymi a mutovanými alelami.

Pre Myf-5 gén sme identifikovali nasledovné genotypy:

- charolais: 11 = 34 % , 12 = 53 % , 22 = 13 % ,
- slovenské strakaté plemeno: 11 = 14 % , 12 = 41 % , 22 = 45 %

Pre myostatín gén sme identifikovali len 2 genotypy s nasledovnými frekvenciami:

- charolais: AA = 91 and AB = 9

Nepodarilo sa nám identifikovať jedinca s genotypom BB.

Gén myostatín sme u plemena slovenské strakaté neskúmali.

Kľúčové slová: Myf-5, myostatín, charolais, PCR-RFLP

ABSTRACT

The production of animals with superior muscle structure is of great importance to food animal agriculture. Dysfunction of myostatin gene has been reported in mammals. In bovine the loss of this gene activity have been associated to the double-muscling phenotype present in some european cattle breeds. Myostatin acts as a negative regulator of muscle growth. Mutations in the gene are responsible for the double muscling phenotype in several European cattle breeds.

We used a PCR-RFLP method for genotyping Myf-5 gene and myostatin Q204X mutation. These genes play an important role in the muscular development regulation. PCR- RFLP was used to genotype 243 animals of the seven breeds. But only two breeds (charolais and slovak siemmental breed) had enough individuals for statistical analysis.

A PCR based test was designed to differentiate between the normal and mutant alleles. This test is faster and less expensive to perform than sequencing of PCR products, which was used previously to resolve the two alleles.

We detected following genotype frequencies for Myf-5 gene:

charolais : 11 = 34 % , 12 = 53 % , 22 = 13 % ,

slovak siemmental breed: 11 = 14 % , 12 = 41 % , 22 = 45 %

For the myostatin gene Q204X mutation we detected only 2 genotypes with following frequencies:

charolais: BB = 91 and AB = 9.

We do not detect individuals with AA genotype.

Slovak siemmental breed was not detected for myostatin gene.

Key words: Myf-5, myostatin, charolais, PCR-RFLP

OBSAH

<u>ABSTRAKT.....</u>	<u>3</u>
<u>ABSTRACT.....</u>	<u>4</u>
<u>OBSAH.....</u>	<u>5</u>
<u>ÚVOD.....</u>	<u>6</u>
<u>1 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY.....</u>	<u>6</u>
<u>1.1 Myf-5.....</u>	<u>6</u>
<u>1.2 Dvojité osvalenie.....</u>	<u>7</u>
<u>1.3 Myostatín.....</u>	<u>7</u>
<u>2 CIEĽ PRÁCE.....</u>	<u>8</u>
<u>3 MATERIÁL A METÓDY.....</u>	<u>9</u>
<u>3.1 Experimentálne zvieratá a odber vzoriek.....</u>	<u>9</u>
<u>3.2 Izolácia genómovej DNA.....</u>	<u>9</u>
<u>3.3 Polymerázová reťazová reakcia.....</u>	<u>9</u>
<u>3.4 Restričná analýza PCR produktov (PCR-RFLP) a elektroforéza na agarózovom géle.....</u>	<u>10</u>
<u>4 SÚHRN VÝSLEDKOV S UVEDENÍM NOVÝCH POZNATKOV A NÁVRHOM NA VYUŽITIE PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY.....</u>	<u>11</u>
<u>4.1 Detekcia genotypov</u>	<u>11</u>
<u>4.1.1 Detekcia genotypov Myf-5 génu.....</u>	<u>11</u>
<u>4.1.2 Detekcia genotypov s Q204X mutáciou myostatínu.....</u>	<u>11</u>
<u>4.2 Genetická štruktúra populácie pri Myf-5 a mutácii Q204X myostatínu</u>	<u>12</u>
<u>4.2.1 Polymorfizmus génu Myf-5.....</u>	<u>12</u>
<u>4.2.2 Polymorfizmus mutácie Q204X myostatínu.....</u>	<u>13</u>
<u>4.2.3 Polymorfizmy Myf-5 a Q204X MSTN v podsúboroch plemena charolais.</u>	<u>13</u>
<u>4.3 Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy.....</u>	<u>16</u>
<u>5 ZÁVER.....</u>	<u>16</u>
<u>6 POUŽITÁ LITERATÚRA.....</u>	<u>17</u>
<u>7 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU.....</u>	<u>19</u>

ÚVOD

Mäso je jednou z najstarších a aj najdôležitejších základných potravín ľudí. Je cenné najmä pre obsah bielkovinových látok. V Európe mäso produkujúce zvieratá zohrávajú významnú úlohu v ľudskej výžive a ekonomike. Predtým, ako sa sval stane mäsom (pokiaľ zviera žije), kostrovo-svalové tkanivo plní dôležitú úlohu pri udržiavaní telesného vzrastu a pri pohybe. Počas života sa tkanivo prispôsobuje jeho funkcii a aktivite, a preto znalosti o svalovom vývoji dobytká majú veľkú dôležitosť.

Detekcia nových genetických markerov v spojení s kvantitatívnou genetikou vedie k zlepšeniu kvality živočíšnych produktov.

1 PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

Vytváranie svalového vlákna je pod kontrolou génovej rodiny svalovo-regulačných faktorov (Muscle Regulatory Factors – MRF) (Te Pas et al., 2001). U dvojito osvalených hlodavcov a dobytká množstvo svalových vlákien je dvojnásobne vyššie ako u normálneho dobytká spôsobené mutáciou génu myostatínu (McPherron et al., 1997; Kampadur et al., 1997). Produkt tohoto génu, GDF-8, patrí k superrodine transformačných rastových faktorov β a môže zdržiavať diferenciáciu a znižovať proliferáciu myoblastov. U cicavcov je veľa génových rodín kódujúcich proteíny, ktorých členovia vykazujú vývojovú alebo tkanivovú špecifickú expresiu. Rodina MyoD génov sa skladá zo štyroch génov: MyoD (MyoD1, Myf3), myogenín (Myf4), Myf5, MRF 4 (Myf6, herculin).

1.1 Myf-5

Myf-5 je známy ako prvý marker pre myogénne prekurzory (Ott et al., 1991). Gén bol lokalizovaný na 5. chromozóme, presnejšie v oblasti 5q2.5 (Soumillion et al., 1997). Myf- 5 je aktivovaný v bunkách produkovaných chrbtovou svalovinou (Crescenzi et al., 1990; Čepica et al., 1996; Ciestak et al., 2002). Ako uvádzajú Firulli a Olson (1997), Myf-5 pôsobí od 8. dňa veku myšieho embrya (8 - 11,5 dňa), časť Myf-5 (5,5kb) s lacZ transgénom, podmieňuje reguláciu pri tvorbe mimickej svaloviny hlavy, ale pôsobí až po expresii génov pre tvorbu svaloviny trupu (tj. 12. deň).

Neskôr Li et al., (2004) na základe svojich výsledkov s hovädzím dobytkom potvrdil silnú spojitosť medzi genotypmi Myf-5 a produkčnými znakmi medzi dvomi líniami dobytká, ktoré porovnával. Preto môžeme gén Myf-5 označiť za gén, ktorý hrá dôležitú úlohu v raste a vývoji cicavcov. Hmotnosť pri narodení, priemerný denný prírastok po odstave (PWADG) a priemerná denná dávka (ADGF) u mäsového dobytká sú tri znaky spájané so svalovým tkanivom. Li et al. (2004) zistil, že SPN u Myf-5 má významný aditívny vplyv na PWADG. Jedinci s genotypom „22“ mali vyššie prírastky ako jedinci s genotypom „11“.

1.2 Dvojité osvalenie

Dvojito osvalené zvieratá sú známe tým, že majú chudšie mäso ako normálne zvieratá. Znak dvojitého osvalenia u dobytká je charakterizovaný nárastom svalovej hmoty o približne 20%, vychádzajúci z podstatne vyššej mäsovej výťažnosti, vyššej časti cennejších častí chudého a mäkkého mäsa, z ktorého je skutočný zisk. Znak je autozomálne recesívny a lokus bol označený symbolom mh. Autori používali rôzne označenia na rozlíšenie medzi dvojito odvaleným genotypom a normálnym genotypom zvierat ako napríklad: dvojito osvalené alebo normálne, DM alebo N, D a n, DM a dm, C a N, c a n, A a a, mh a + (Bellinge et al., 2004) AA – dvojité osvalenie, AB – heterozygot, BB – normálne osvalenie (Dvořák et al., 2002).

Tento extra svalový nárast je dôsledkom mutácie príslušného génu, ktorý produkuje neaktívnu bielkovinu myostatínu (Kambadur, 1997).

1.3 Myostatín

Synonymá: gén myostatínu (myostatín, MSTN, GDF8, MH)

Myostatín alebo rastový diferenciačný faktor 8 (GDF-8) bol identifikovaný pri skúmaní nových členov TGF- β rodiny (McPherron et al., 1997). Je členom skupiny rastových faktorov (TGF- β) a hrá úlohu v raste a vývoji svaloviny. Je to látka zasahujúca do regulácie pri tvorbe myofibríl. Ukončuje diferenciáciu myoblastov do myofibríl a pri jeho nedostatočnosti (obmedzená funkčnosť, či absencia) vyvoláva nedostatočný signál pre ukončenie tvorby svalových vlákien a dáva tak podnet pre vznik abnormálneho osvalenia u takto postihnutých organizmov. Smith et al. (1997) lokalizoval lokus pre myostatín na 2. chromozóme hovädzieho dobytká.

Skúmaním dvojito osvaleného dobytká z 10 európskych plemien, bolo objavených 7 rôznych variant sekvencií (alel) v kódujúcej oblasti génu myostatínu (Grobet et al., 1998, Georges et al., 1998).

Päť z nich môže zapríčiniť stratu (deléciu) v myostatíne: delécia 11bp, inzercia/delécia, v ktorej 10 nesúvisiacich báz je vložených na miesto 7 báz, ktoré boli deletované na 418 pozícii, C-T tranzícia na pozícii 610, G-T transverzia na pozícii 676, G-A tranzícia na pozícii 938. Dve ďalšie mutácie nepravdepodobne zapríčiňujú deficienciu : C-A transverzia na pozícii 282 (vychádzajúc zo zachovania Phe-Leu aminokyselínovej substitúcie) a tiché C-T tranzície na pozícii 414.

Mutantní kríženci len v jednej alele z páru nevykazujú jednoznačný fenotyp „dvojitého osvalenia“, ale majú o 7% vyššiu hmotnosť a o 15% menej tuku v jatočnom tele, ako u jedincov „normálnych“ (Smith, Hruska 1999).

2 CIEĽ PRÁCE

Doktorandská dizertačná práca bola súčasťou riešenia projektov VEGA 1 /2377/05, VEGA 1/4440/07 a APVT – 20-006-102.

Cieľom DDP bolo štúdium a detekcia genetického polymorfizmu vybraných génov ovplyvňujúcich mäsovú úžitkovosť hovädzieho dobytká. Na detekciu genotypov sme použili molekulárno-genetické metódy. Pri detekcii génov zodpovedajúcich za mäsovú úžitkovosť sme sa zamerali na gény Myf-5 a myostatín (Q204X mutácia v exóne2), ktoré sme sledovali u vybraných plemien hovädzieho dobytká.

Na základe uvedeného sme stanovili nasledovné ciele:

1. Optimalizácia vybraných molekulárno-genetických metód v laboratóriu Katedry genetiky a plemenárskej biológie.
2. Detekcia genotypu Myf-5 a myostatín génu v populáciách vybraných plemien hovädzieho dobytká.
3. Vyhodnotenie frekvencie genotypov a alel Myf-5 a myostatínu vo vybranej populácii.
4. Zhodnotiť vplyv jednotlivých genotypov pre ukazovatele kvality živočíšnych produktov a vplyv týchto produktov na výživu ľudí.
5. Podľa požiadaviek chovateľov zaviesť analýzu polymorfizmu DNA do praxe.

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Experimentálne zvieratá a odber vzoriek

Do analýzy sme zahrnuli 243 zvierat: 201 zvierat plemena charolais, 29 slovenské strakaté, 3 kusy pinzgauského plemena, 1 siemental, 2 belgické modré, 1 galoway a 6 kusov zvierat s 1/3 podielom hereford u plemena charolais.

Biologický materiál pozostával z krvi, ktorá bola odobraná z podchvostovej žily veterinárnym lekárom do skúmavky s antikoagulantom ACD (0,48 % kyselina citrónová, 1,32 % citrát sodný, 1,47 % glukóza) alebo do roztoku EDTA. Ďalším biologickým materiálom boli inseminačné dávky (0,25 ml - Plemenárska stanica Lužianky) a vzorky mäsa (roštenka od chovateľa plemena charolais v Česku, odoberané pri porážke).

3.2 Izolácia genómovej DNA

a) izolácia genómovej DNA z krvi

Na izoláciu DNA z krvi (500 μ l) sme použili čiastočne modifikovanú metódu podľa Millera (1988). Okrem tejto metódy sme izolovali DNA z krvi (200 μ l) pomocou kitu NucleoSpin Blood od Macherey-Nagel podľa príslušnej metodiky.

b) izolácia z mäsa

DNA z mäsa (0,2 g) sme izolovali pomocou kitu JETQUICK KIT TISSUE DNA od Genomedu. Pri izolácii sme postupovali podľa príslušnej metodiky.

c) izolácia genómovej DNA zo spermii

Genómová DNA bola izolovaná zo spermii čiastočne modifikovanou metódou podľa Trommelen et al., (1993).

3.3 Polymerázová reťazová reakcia

Polymerázovú reťazovú reakciu sme uskutočnili v programovateľnom termocykleri MinicyclerTM MJ Research.

Na amplifikáciu cieľových úsekov Myf-5 a mutácie Q204X myostatínu sme použili špecifické oligonukleotidové primery:

Myf-5 MYFi2F : 5' ACA GCG TCT ACT GTC CTG ATG 3'

MYFi2R : 5' CGT GGT ATA TAC TAA GGA CAC 3'

(Drögemüller a Kempers, 2000)

MSTN FOR: 5' TGA GGC CTG TCA AGA CTC CT 3'

REV: 5' CAC TGT CTT CAC ATC AAT GCG CT 3'

(Antoniou a Grosz, 1999)

PCR reakčné zmesi

Pre Myf-5 gén sme použili dva varianty PCR reakčných zmesí.

PCR reakčná zmes pre DNA získanú z krvi vypoľovacou metódou a z inseminačných dávok pozostávala z nasledujúcich zložiek v nasledovných výsledných koncentráciách: 1,5 mM MgCl₂, 2,5 mM dNTPs, 4 pmol každého primera, 1 U *Taq* DNA polymerázy a buffer (Promega), a približne 50 ng DNA. Celkový objem vzorky 25 µl.

PCR reakčná zmes pre DNA získanú z krvi pomocou kitu NucleoSpin Blood, pozostávala s rovnakých zložiek s rovnakými koncentraciami, ale vzhľadom na výrobcom deklarované množstvo a kvalitu vyizolovanej DNA, sme pridali len 3 µl (50 ng/µl) DNA. Zmes bola pripravená na celkový objem vzorky 23 µl.

I keď sme upravovali zloženie reakčných zmesí v závislosti od metodiky získavania DNA, teplotný a časový režim reakcií sme nemuseli upravovať.

Teplotný a časový režim reakcie:

Myf-5: štart – 94°C, 4 min., denaturácia - 94°C, 30 s., annealing – 58 °C, 60 s., polymerizácia – 72 °C, 60 s., elongácia – 72 °C, 4 min. Počet cyklov: 38.

Pre analýzu mutácie Q204X myostatínu sme použili nasledovné zložky pre PCR reakčnú zmes pri použití DNA získanej z lyzátov v konečných koncentráciách: 2,5 mM MgCl₂, 30 µM (každého) dNTPs, 0,4 µmol každého primera, 0,35 U *Taq* polymeráza a buffer (Promega). Celkový objem vzorky 20 µl

Teplotný a časový režim reakcie:

MSTN: štart – 92°C, 3 min., denaturácia - 92°C, 30 s., annealing – 56 °C, 30 s., polymerizácia – 72 °C, 30 s., elongácia – 72 °C, 4 min. Počet cyklov: 35.

3.4 Restričná analýza PCR produktov (PCR-RFLP) a elektroforéza na agarózovom géle

Pre RFLP analýzu boli vybrané špecifické restričné enzýmy, ktoré štiepia získané PCR produkty so známou sekvenciou. PCR produkty génu Myf-5 sme štiepili endonukleázou *Taq^I* (N.E.B) a PCR produkty myostatín génu endonukleázou *Fnu4HI* (Fermentas) a FastDigest *Fnu4HI* (Fermentas). Okrem klasickej endonukleázy *Fnu4HI*

sme časť vzoriek štiepili aj modifikovanou endonukleázou FastDigest *Fnu4HI* (1FDU/ μ l). Čas štiepenia bol iba 30 minút pri teplote 37 °C. Tento spôsob štiepenia bol z hľadiska práce rýchlejší, ale finančne náročnejší.

Identifikácia a analýza produktov po izolácii, amplifikácii a štiepení bola uskutočnená elektroforetickou separáciou na agarózovom géle v 1x TBE tlmiacom roztoku. Výsledná koncentrácia gélu závisela od veľkosti delených fragmentov DNA (Sambrook et al., 1989). Ako interakčné činidlo sme používali etídium bromid (0,5 μ g.ml⁻¹) alebo činidlo Golden view (Lambda). Elektroforéza prebiehala v 1 x TBE roztoku pri napätí max. 130 V po dobu 30 minút. Po skončení elektroforézy sme fragmenty DNA detekovali UV transiluminátorom. Pre presné určenie veľkosti fragmentov sme používali DNA veľkostné markery (DNA ladder 50 – 1000 bp, Promega).

4 SÚHRN VÝSLEDKOV S UVEDENÍM NOVÝCH POZNATKOV A NÁVRHOM NA VYUŽITIE PRE ĎALŠÍ ROZVOJ VEDY

4.1 Detekcia genotypov

4.1.1 Detekcia genotypov Myf-5 génu

Na detekciu genotypov Myf-5 génu jedincov sme použili metódu PCR a PCR - RFLP, podľa reakčných podmienok uvedených v kapitole 3.3.

Amplifikovaný produkt 445 bp pre Myf-5 gén sme štiepili pomocou restriktívnej endonukleázy *Taq^{AI}*. Jeho štiepením vznikli dva fragmenty s veľkosťou 93 bp a 352 bp (recesívny homozygot, alela 2 – označenie 22). Prítomnosť alely 1 (dominantný homozygot, označenie 11) charakterizoval fragment 445 bp. Prítomnosť oboch alel charakterizovali fragmenty 445 bp, 352 a 93 bp (heterozygot, označenie 12).

4.1.2 Detekcia genotypov s Q204X mutáciou myostatínu

Podobne ako pri Myf-5 géne sme na detekciu genotypov pre Q204X mutáciu myostatínu použili metódu PCR a PCR-RFLP, podľa reakčných podmienok uvedených v kapitole 3.3.

Veľkosť amplifikovaného produktu pre myostatín je 155 bp. Štiepením tohto PCR produktu pomocou restriktívnej endonukleázy *Fnu4HI* vznikli dva fragmenty o veľkosti 23 bp a 132 bp.

Homozygotní jedinci s normálnym genotypom vytvárali fragmenty 23 a 132 bp. Fragmenty s veľkosťou 155 bp by mali homozygoti s Q204X genotypom. Heterozygoti (Q204X /normálny) produkovali fragmenty o veľkosti 23, 132 a 155 bp.

4.2 Genetická štruktúra populácie pri Myf-5 a mutácii Q204X myostatínu

Na štatistickú analýzu boli dostatočne početné len plemená charolais a slovenské strakaté. Na základe PCR-RFLP analýzy sme stanovili genotypovú štruktúru sledovanej populácie a vypočítali frekvencie alel v jednotlivých polymorfných génoch sledovanej populácie. Na výpočet sme použili štatistický program Statgraphics Version 4.0.

Významnosť rozdielov medzi experimentálne pozorovanou a teoreticky očakávanou frekvenciou genotypov sme overovali χ^2 – testom. Ďalej sme použili neparametrické testy: Mann-Whitneyov test a Spearmanov korelačný koeficient, z dôvodu menšieho počtu vzoriek, neprítomnosti normality distribúcie a homogenity rozptylov porovnávaných súborov.

4.2.1 Polymorfizmus génu Myf-5

Pri detekcii genotypov na Myf-5 gén sme zistili v sledovanej skupine (121 zvierat) najväčšie zastúpenie jedincov s heterozygotným genotypom. Genotyp jedincov (12 -heterozygot) sa u plemena charolais vyskytoval s frekvenciou (53%), čo je viac ako polovica pri danom plemene. U plemena slovenské strakaté sa genotyp „12“ vyskytoval s frekvenciou (41%). Heterozygotný genotyp pri oboch plemnách sa výrazne nelíšil ako pri homozygotných genotypoch.

Frekvencia homozygotného genotypu pri plemene charolais bola 34%, čo je viac ako dvojnásobok v porovnaní s frekvenciou výskytu homozygotného genotypu pri plemene slovenské strakaté, kde frekvencia bola len 14%.

Oveľa výraznejší bol výskyt recesívneho genotypu u plemena slovenské strakaté (45%) ako u plemena charolais, kde genotyp „22“ sa vyskytoval len s frekvenciou (13%).

Frekvencia dominantnej alely u plemena charolais bola 60,7% a u slovenského strakatého 34,5%. Recesívna alela sa vo vyššej miere vyskytovala u slovenského strakatého dobytká (65,5%). Pri plemene charolais bola frekvencia recesívnej alely 39,3%.

Pri overovaní genetickej rovnováhy vo vyšetrených populáciách oboch plemien, sme zistili, že obe plemená sa signifikantne neodlišujú v genotypových frekvenciách od očakávaných početností.

4.2.2 Polymorfizmus mutácie Q204X myostatínu

Pri detekcii genotypov na myostatín sme využili zvieratá plemena charolais (170 zvierat). V sledovanej skupine výrazne prevažoval normálny genotyp (91%). Heterozygotnému genotypu patrilo zostávajúcich 9% populácie, pretože v sledovanej skupine sme nedetekovali ani jedného jedinca s genotypom pre dvojité osvalenie. Neprítomnosť jedincov s genotypom AA (dvojité osvalenie) môžeme vysvetliť tým, že zvieratá, ktoré sme testovali, boli už zaradené do plemenidby. Chovateľ musel vyberať zvieratá na základe ich konštitúcie, alebo už poznal genotypy zvierat a zámerne vyberal jedincov s požadovaným genotypom.

Frekvencia alely pre normálne osvalenie bola $B = 0,956$ a pre dvojité osvalenie $A = 0,044$.

Pri testovaní prítomnosti Hardyho-Weinbergovej genetickej rovnováhy, populácia vykazovala značnú genetickú rovnováhu, pričom však recesívna alela sa nachádzala výlučne v heterozygotnej forme a jej frekvencia je veľmi nízka v porovnaní s recesívnou alelou u polymorfizmu Myf-5.

Keďže frekvencia alely pre dvojité osvalenie bola veľmi nízka pri plemene charolais, ktoré patrí medzi mäsové plemená, plemeno slovenské strakaté sme na prítomnosť tejto alely netestovali.

4.2.3 Polymorfizmy Myf-5 a Q204X MSTN v podsúboroch plemena charolais

Iba počet vyšetrených jedincov charolais umožnil bližšie testovanie parametrov oboch polymorfizmov aj v podsúboroch tohoto plemena, definovaných pohlavím a pôvodom.

a) polymorfizmus Myf-5 a Q204X mutácie MSTN u pohlaví

Zo 79 zvierat genotypovaných pre polymorfizmus Myf-5 bolo 50 kráv a 29 býkov. Zistené genotypové a alelové frekvencie pre Myf-5 udáva tabuľka 1 a 2.

Tabuľka 1: Rozdiely v genotypových frekvenciách Myf-5 medzi pohlaviami

Pohlavie	n	Genotypové frekvencie (%)		
		11	12	22
krava	50	12,00	70,00	18,00
býk	29	72,18	24,14	3,45
Spolu	79			

11 – dominantný homozygot, 12 – heterozygot, 22 – recesívny homozygot

Tabuľka 2: Rozdiely v alelových frekvenciách Myf-5 medzi pohlaviami

Frekvencia alely	Alela 1	Alela 2	Chí-kvadrátový test	
			χ^2 (d.f.)	p
Celková	0,607	0,393		
kravy	0,470	0,530	7,87 (1)	<0,001
býky	0,845	0,155	23,75 (1)	<0,001

χ^2 - testová charakteristika, d.f. - počet stupňov voľnosti, p - hladina významnosti výsledku testu

I keď sa obe pohlavia pri Myf-5 signifikantne líšili v alelových aj genotypových frekvenciách, u kráv je oveľa vyššie zastúpenie recesívnej alely (0,53) v porovnaní s býkmi (0,155).

Na myostatín sme testovali 170 zvierat. Rozdiely v genotypových a alelových frekvenciách pre Q204X mutáciu sú uvedené v tabuľke 3 a 4.

Tabuľka 3: Rozdiely v genotypových frekvenciách pri mutácii myostatínu Q204X medzi pohlaviami

Pohlavie	n	Genotypové frekvencie (%)		
		AA	AB	BB
krava	88	0	13,64	86,36
býk	82	0	3,66	96,34
Spolu	170			

AA – genotyp dvojitého osvalenia, AB – heterozygot, BB – genotyp pre normálne osvalenie

Tabuľka 4: Rozdiely v alelových frekvenciách medzi pohlaviami pri Q204X mutácii MSTN

Frekvencia alely	A	B	Chí-kvadrátový test	
			χ^2 (d.f.)	p
Celková	0,044	0,956		
kravy	0,068	0,932	1,37 (1)	0,24
býky	0,018	0,982	1,61 (1)	0,20

A - alela pre dvojite osvalenie, B - alela pre normálny genotyp, χ^2 - testová charakteristika, d.f. - počet stupňov voľnosti, p - hladina významnosti výsledku testu

V prípade polymorfizmu Q204X mutácie myostatínu sme nezistili signifikantné odchýlky jednotlivých alelových frekvencií medzi jednotlivými pohlaviami a celopopulačnou hodnotou. Preto môžeme súhlasiť s inými zisteniami, že pohlavie nemá vplyv na množstvo svalového vlákna u zvierat produkujúcich mäso, i keď má silný vplyv na zloženie svalového vlákna.

b) frekvencie Myf-5 a Q204X mutácií MSTN u jednotlivých chovov

Zistené údaje nám umožnili porovnať u kráv frekvencie jednotlivých alel pre Myf-5 aj Q204X myostatínu podľa farmy, z ktorej jedince pochádzajú. Vybrali sme dva chovy (resp. súbory), ktoré boli dostatočne početné na porovnanie týchto parametrov: chov 32095 (priradený kód = A) a chov 843 (priradený kód = B).

V chove A sme u 28 kráv zistili 3 dominantne homozygotné jedince (11), 20 heterozygotov (12) a 5 recesívnych homozygotov (22) pre polymorfizmus Myf-5.

V chove B (13 testovaných samíc) boli pre tento génový polymorfizmus zistené 2 jedince (11), 9 jedincov heterozygotných (12) a 2 jedince (22) recesívne homozygotné.

Pre Q204X mutáciu myostatínu bolo v chove A testovaných 52 kráv, z toho bolo 43 BB (normálne osvalenie) a 9 heterozygotov (AB - normálny/Q204X genotyp). V chove B bolo všetkých 15 vzoriek s genotypom BB – normálne osvalenie. Tieto údaje sa už nedajú porovnať chí-kvadrátovým testom, pretože sa znížil počet štatistických jednotiek v jednotlivých genotypových kategóriách pod $n = 2$, už kritickú hodnotu pre tento inak robustný test. Takisto sa už v chove B nevyskytuje mutovaná alela ani u jediného zvierat'a a okrem toho, pri tak malých počtoch nemožno určiť vzťah genotypových frekvencií ku alelovým.

Z popisnej štatistiky bolo zjavné, že rozdiely v alelových a genotypových frekvenciách populácií porovnávaných chovov A a B sa veľmi nelíšia v genetických

parametroch polymorfizmu Myf-5 a odlišnosti vo frekvencii mutácie myostatínu sú v rozmedzí marginálnej štatistickej významnosti ($p < 0,10$), ktorá síce ukazuje istý rozdiel, ale serióznejší záver sa nedá vyvodiť.

4.3 Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy

Metóda DNA analýzy je vhodná na sledovanie uvedených polymorfizmov génov Myf-5 a myostatínu pri hovädzom dobytku. Umožňuje chovateľom identifikovať jedincov s predispozíciou na lepší vývoj svalovej hmoty (vyššie prírastky hmotnosti) a identifikovanie jedincov, ktorí vo svojom genotype nesú alelu, ktorá je príčinou nežiadúcej mutácie u dobytku. Chovateľ preto bude vedieť, buď vyradiť jedinca s takýmto genotypom z plemenidby, alebo ho správne využiť k vhodným plemeniciam, pri ktorých nie je také veľké riziko úhynu teľaťa alebo plemenného zvierat'a. Týmto spôsobom mu môžeme pomôcť pri zostavovaní šľachtiteľského programu pri chove hovädzieho dobytku a k dosiahnutiu požadovaného ekonomického efektu.

Zloženie a metódy regulujúce myostatínovu aktivitu môžu mať široký rozsah použitia, okrem zlepšovania produkcie u dobytku aj pri liečení ľudských ochorení ako sú svalová dystrofia, kachexia a sarkopénia. Tlmenie myostatínovej aktivity môže byť tiež užitočné pri liečbe metabolických porúch ako je obezita a diabetes II, pretože na základe spomenutých poznatkov je možné produkovať mäso nižším obsahom tuku.

V súčasnosti existujú aj rýchlejšie metódy identifikácie jedincov. Metóda PCR-RFLP z hľadiska ekonomiky je pre chovateľa lacnejšia.

5 ZÁVER

Mäsová úžitkovosť a jej komplexné znaky (prírastok hmotnosti, konverzia krmiva a pod.) teda predstavujú kvantitatívne znaky s polygennou dedičnosťou.

V dizertačnej práci sme vyhodnocovali frekvenciu genotypov a alel génov Myf-5 a mutácie Q204X myostatínu pri vybraných plemenách hovädzieho dobytku. Genotypy zvierat sme stanovili pomocou metódy PCR-RFLP. Identifikáciu fragmentov sme uskutočnili na agarózovom géle.

Testovali sme 121 zvierat na gén Myf-5 a 176 zvierat na Q204X mutáciu myostatínu.

Pri géne Myf-5 sme zistili nasledovné zloženie testovanej populácie: 33 dominantných homozygotov, 65 heterozygotov a 23 recesívnych homozygotov.

Na myostatín gén sme testovali len zvieratá plemena charolais. V sledovanej skupine zvierat sme zistili výskyt len dvoch genotypov a to jedinci s normálnym osvalením (155 ks) a heterozygoti (21 ks). Nepodarilo sa nám detekovať jedincov s genotypom dvojitého osvalenia. Túto skutočnosť však môžeme vysvetliť tým, že testované zvieratá boli plemena charolais. Vzorky od tohto plemena pochádzali z chovu Charolais Kft. (Lajosmizse, Maďarsko). V tomto chove už museli byť zvieratá selektované na prítomnosť danej mutácie ešte pred zaradením do plemenidby. Jedinci, ktorí vykazovali heterozygotny genotyp, boli väčšinou kríženci charolais s 1/3 podielom hereforda.

Jedným z cieľov tejto dizertačnej práce bolo aj zhodnotiť vplyv týchto génov na ukazovatele kvality živočíšnych produktov a vplyv týchto produktov na výživu ľudí. Vplyv myostatínu na produkciu svaloviny s nižším obsahom tuku, by mal pozitívny dopad na výživu ľudí a na zníženie počtu civilizačných ochorení.

6 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. ANTONIOU, E. – GROSZ, M. 1999. PCR based detection of bovine myostatin Q204X mutation. In: *Animal Genetics*, vol. 30, 1999, p. 231-232.
2. BELLINGE, R.H.S. – LIBERLES, D.A. – IASCHI, S.P.A. – O'Brien, P.A. – TAY, G.K. 2005. Myostatin and its implications on animal breeding: a review. In: *Animal Genetics*, vol. 36, 2005, p. 1-6.
3. CIESLAK, D. – KURYL, J. – KAPELANSKI, W. – PIERZCHALA, M. – GRAJEWSKA, S. – BOCIAN, M. 2002. . A relationship between genotypes at *MYOG*, *MYF3* and *MYF5* loci and carcass meat and fat deposition traits in pigs. In: *Animal Science Papers and Reports*, vol.20, 2002, no. 2, p. 77 – 92.
4. CRESCENZI, M. - FLEMING, T.P. - LASSAR, A.B. - WEINTRAUB, H. - AARONSON, S.A. 1990. MyoD induces growth arrest independent of differentiation in normal and transformed cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, vol. 87, 1990, no.21, p. 7442 – 8446.
5. ČEPICA, S. – STRATIL, A. 1996. Three polymorphisms in the porcine myogenic factor 5 (*MYF5*) gene detected by PCR-RFLP. In: *Animal Genetics*, vol. 30, 1996, no. 1, p. 79-80.

6. DRÖGEMÜLLER, C. – KEMPERS, A. 2000. A Taq I PCR-RFLP at the bovine myogenic factor (MYF5) gene. In: *Animal Genetics*, s.l. : International Society for Animal Genetics, vol. 31, p. 146-147.
7. DVOŘÁK, J. - FILISTOWITZ A. - HRUŠKA D. - HORÁK P. - VRTKOVÁ I., KÚBEK A. - SZULC T. - POMICHAL Š. 2002. The polymorphism of *MSTN*, *PRNP* and *CSN3* genes in Charolais cattles. In: *Animal Science Papers and Reports*. 2002, vol. 20, supplement 1, s. 19-23.
8. FIRULLI, A.B. – OLSON, E.N. 1997. Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity, In: *Trends in Genetics*, vol. 13, 1997, no. 9, p. 364-369.
9. GEORGES, M. - GROBET, L. - PONCELET, D. - ROYO, L.J. - PIROTTIN, D. - BROUWERS, B. 1998. Positional candidate cloning of the bovine mh locus identifies an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. In: *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, vol. 26, 1998; p. 195-204.
10. GROBET, L. – PONCELET, D. – ROYO, L. – BROUWERS, B. – PIROTTIN, D. – MICHAUX, C. – MÉNISSIER, F. – ZANOTTI, M. – DUNNER, S. – GEORGES, M. 1998. Molecular definition of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle, In: *Mammalian Genome*, vol 9, 1998, p. 210-213.
11. KAMPADUR, R. – SHARMA, M. – SMITH, T.P.L. – BASS, J.J. 1997. Mutations in *myostatin* (*GDF8*) in Double-Muscle Belgian Blue and Piedmontese Cattle. In: *Genome Research*, vol. 7, 1997, p. 910-915.
12. LI, C – BASARAB, J. – SNELLING, W.M. – BENKEL, B. – MURDOCH, B. – HANSEN, C. – MOORE, S.S. 2004. Assesment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. In: *Journal of Animal Science*, vol. 82, 2004, p. 1-7.
13. McPHERRON, AC. – LEE, SJ. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, 1997, p. 12457-12461.
14. OTT, M.O. – BOBER, E. – LYONS, G. – ARNOLD, H. – BUCKIGHAM, M. 1991. Early expression of the myogenic regulatory gene *Myf-5*, in precursor cells

- of skeletal muscle in the mouse embryo. In: *Development*, vol. 111, 1991, p. 1097-1107.
15. SMITH, T. P (USDA-ARS) – HRUSKA, R. L.: U.S. Meat Animal Research Center, 8.6. 1999 < <http://www.ars.usda.gov/is/AR/archive/jun99/beef0699.htm> > (23.3. 2000).
16. SMITH, T.P.L. – LOPEZ-CORRALES, N. – KAPPES, S.M. – SONSTEGARD, T.S. 1997. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. In: *Mammalian Genome*, vol. 8, 1997, p. 742-744.
17. SOUMILLION, A. - ERKENS, J.H.F. – LENSTRA, J.A. – RETTENBERGER, G. – TE PAS, M.F.W. 1997. Genetic variation in the porcine myogenin locus. In: *Mamm. Genome.*, vol. 8, 1997, p. 564-568.
18. TE PAS, M. F. W. – SOUMILLION, A. 2001. Improvement of livestock breeding strategies using physiologic and functional genomic information of the muscle regulatory factors gene family for skeletal muscle development. In: *Current Genomics*, 2001, no. 2, p. 285-304.

7 ZOZNAM PUBLIKOVANÝCH PRÁC AUTORA SÚVISIACICH S RIEŠENOU PROBLEMATIKOU

1. KÚBEK, A. - TRAKOVICKÁ, A. – TOTHOVÁ, K. – BEŽOVÁ, K. – MILUCHOVÁ, M. – **KIŠACOVÁ, J.**: Vplyv génov MYF3 a MYF4 na kvalitu mäsa ošípaných pri reciprokom krížení bielej ušľachtilej x landras. In: Sborník přednášek z mezinárodního symposia na CD-ROM „Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat“, JU ZF České Budějovice, 2005, s. 123-126, ISBN 80-85645-50-5.
2. **KIŠACOVÁ, J.** – KÚBEK, A.: The influence of Myf-5 and Myf-6 genes for the meat production of the cattle. In: Sborník článků z VI. Mezinárodní konferenci doktorandů a pregraduálních studentů „Genetika a šlechtění zvířat“ na CD-ROM, MZLU v Brně, 2005, s. 66-69, ISBN 80-7157-858-4.
3. **KIŠACOVÁ, J.** – KÚBEK, A.: Genetický polymorfismus β -kazeínu a jeho vztah k produkci. In: „Biotechnology 2006“, Scientific Pedagogical Publishing na CD ROM, JU ZF České Budějovice, 2006, s. 269-271, ISBN 8085645–53–X.

4. KÚBEK, A. - TRAKOVICKÁ, A. - TOČKA, I. - **KIŠACOVÁ, J.**: Genetické polymorfne znaky nutrie riečnej „*myocastor coypus*”. In: Acta fytotechnica et zootechnica, SPU v Nitre, roč. 9, 2006, č. Mimoriadne číslo, s. 70-72, ISSN 1335-258X.
5. **KIŠACOVÁ, J.** - KÚBEK, A. - TRAKOVICKÁ, A.: Genetický polymorfizmus génu *MYF-5* u hovädzieho dobytká. In: Acta fytotechnica et zootechnica, SPU v Nitre, roč. 9, 2006, č. Mimoriadne číslo, s. 203-205, ISSN 1335-258X.
6. **KIŠACOVÁ, J.**: Aplikácia metódy PCR-RFLP na hodnotenie polymorfizmu *Myf-5* u hovädzieho dobytká. In: Zborník príspevkov z Vedeckej konferencie doktorandov s medzinárodnou účasťou, Nitra : SPU, 2006, s. 86-88, ISBN 80-8069-782-5.
7. **KIŠACOVÁ, J.** – KÚBEK, A.: Metabolické choroby a genetika. In: Zborník príspevkov z vedeckej konferencie na CD verzii „Výživa a potraviny pre tretie tisícročie“, Nitra : SPU, 2006, časť Príspevky: s. 1-4, ISBN 80-8069-775-2.
8. **KIŠACOVÁ, J.** – KÚBEK, A. – TRAKOVICKÁ, A. – ŠŤASTNÝ, P. – ČANAKYOVÁ, Z.: Molekulárno-genetické markery využívané v produkcii ošípaných. In: Zborník príspevkov z celoslovenského odborného seminára „75 rokov kontroly úžitkovosti ošípaných na Slovensku“. Nitra : SPU, 2006, s. 83-87. ISBN 80-8069-773-6.
9. **KIŠACOVÁ, J.** - KÚBEK, A.: Frequency of myostatin gene occurrence in Charolais breed . In: II Polski kongres genetyki : XVI Zjazd Polskiego Towarzystwa Genetycznego : V Zjazd Polskiego Towarzystwa Genetyki Człowieka, 18-20 września, Warszawa 2007. - Warszawa : Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, 2007. - s. 232
10. **KIŠACOVÁ, J.** - KÚBEK, A. – ČANAKYOVÁ, Z. : Myostatin Q204X mutation in Charolais breed. In: „Biotechnology 2008“, Scientific Pedagogical Publishing na CD ROM, JU ZF České Budějovice, 2008, s.205-207, ISBN 8085645–58–0.
11. ČANAKYOVÁ, Z. – KÚBEK, A. – SVOBODOVÁ, Z. - **KIŠACOVÁ, J.** : Post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs. In: „Biotechnology 2008“, Scientific Pedagogical Publishing na CD ROM, JU ZF České Budějovice, 2008, s. 33-34, ISBN 8085645–58–0.