

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

Analýza vybraných kandidátskych génov úžitkovosti
prežúvavcov metódami analýzy DNA

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

Ing. Martina Miluchová

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. Martina Miluchová
Katedra genetiky a plemenárskej biológie
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: doc. Ing. Anna Trakovická, CSc.
Katedra genetiky a plemenárskej biológie FAPZ SPU v Nitre

Oponenti: prof. Ing. Jozef Dvořák, CSc.,
Ústav morfológie, fyziológie a genetiky zvierat,
AF MZLU v Brne

prof. Ing. Ján Grolmus, CSc.
Katedra genetiky Prírodovedeckej fakulty UK
Univerzita Komenského v Bratislave

Ing. Michal Simon, DrSc.
Ústav biochémie a genetiky živočíchov SAV
Ivanka pri Dunaji

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

Mlieko je významnou zložkou potravy človeka. Je prirodzeným zdrojom vápnika, esenciálnych mastných kyselín, bielkovín. Mliečne bielkoviny sú predmetom intenzívneho výskumu pre svoj význam na ľudské zdravie, ale aj ako potenciálne markery úžitkových vlastností.

V súčasnosti sa kladie dôraz aj na gény súvisiace s genetickým rizikom. Patria sem gény makrokazeínového komplexu a prionového génu. Bielkovinové produkty mutantných foriem týchto génov môžu, pri ich priamej konzumácii v živočíšnej potravine, tvoriť genetické riziko vzťahujúce sa k metabolickým poruchám (IDDM, LDL, alergie), kardiovaskulárnym ochoreniam, ako aj chorobám CNS.

Analyzovali sme slovenský pinzgauský dobytok v počte 92 pre gény CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB, ALA a PRNP a ovce v celkovom počte 86 z toho 28 zvierat plemena cigája, 18 zvierat plemena lacaune a 40 zvierat plemena zušľachtená valaška pre gény CSN1S1, LGB.

Genotypovanie sa uskutočnilo metódami PCR, PCR-RFLP, ARMS PCR a PCR SSCP. Genómovú DNA sme izolovali z krvi metódou proteolytickej hydrolyzy proteinázou K, fenol-chloroformovej deproteinizácie a etanolovej precipitácie podľa Sambrook et al. (1989) a vysoľovacou metódou podľa Millera et al. (1987).

Genetickou analýzou vybranej populácie hovädzieho dobytku sme pre jednotlivé gény identifikovali nasledovné genotypy:

- CSN1S1: BB = 87,10 %, BC = 12,90 %, genotyp CC sa v populácii nevyskytoval
- CSN2: AA = 22,83 %, AB = 77,17, genotyp BB sa v populácii nevyskytoval
- CSN3: AA = 48,39 %, AB = 44,09 %, BB = 7,53 %
- LGB: AA = 4,3 %, AB = 25,81 %, BB = 69,89 %
- ALA: AA = 6,67 %, AB = 81,11 %, BB = 12,22 %
- PRNP: 6/6 = 92,5 %, 5/6 = 7,3 %, genotyp 5/5 sa v populácii nevyskytoval,

Genetickou analýzou jednotlivých súborov oviec sme pre jednotlivé gény identifikovali nasledovné genotypy:

- CSN1S1: - valaška: CC = 2,86 %, CT = 2,86 %, TT = 94,29 %;
A/- = 76,47 %, -/- = 23,53 %, genotyp AA nebol pozorovaný;
D/D = 16,67 %, D/- = 72,22 %, -/- = 11,14 %
- cigája: CC = 11,54 %, TT = 88,46 %, genotyp CT nebol detegovaný;
A/- = 69,23 %, -/- = 30,77 %, genotyp A/A sme nezistili;
D/D = 27,78 %, D/- = 72,22 %, genotyp -/- sme nepozorovali.
- lacaune: CC = 5,88 %, TT = 94,12 %, genotyp CT sme nezistili;
A/- = 80 %, -/- = 20 %, genotyp AA nebol pozorovaný;
D/D = 14,29 %, D/- = 85,71, genotyp -/- nebol zistený.

- LGB: - valaška: AA = 17,65 %, AB = 35,29%, BB = 47,06%
- cigája: AA = 42,86 %, AB = 25 %, BB = 32,14 %
- lacaune: AA = 29,41 %, AB = 41,18, BB = 29,41 %

Kľúčové slová: hovädzí dobytok, ovca, kandidátne gény (CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB, ALA, PRNP)

ABSTRACT

Milk as natural source of calcium, essential fatty acids and proteins is important component of man's food. Dairy proteins are frequently studied because of their influence on human health, as well as for their economical importance.

At the present time genes connected to genetic risk, like genes of macrocasein complex and prions are emphasized. Direct consumption of proteins produced by mutated forms of these genes can generate genetic risk, which can eventually lead to metabolic (IDDM, LDL, allergy), cardiovascular and CNS diseases.

A group of 92 heads Slovak Pinzgau cattle was analyzed, for genes CSN1S1, CSN2, CSN3, GLB, ALA and PRN. Another group of 86 heads of sheep was tested at the presence of polymorphism for genes CSN1S1, GLB a PRNP. The sheep database consisted from three breeds: 28 Cigaja, 18 Lacaune and 40 Treated Valaska.

Genotyping was realized with methods PCR, PCR-RFLP, ARMS-PCR and PCR-SSCP. Genomic DNA from blood was isolated via proteolytic hydrolyse with proteinase K, phenol-chlorophorm deprotenization and ethanol precipitation according to Sambrook et al. (1989) and with salting out method according to Miller et al. (1987).

In cattle we detected following genotype frequencies:

- CSN1S1: BB = 87,10 %, BC = 12,90 %, genotype CC was not detected
- CSN2: AA = 22,83 %, AB = 77,17 %, genotype BB was not detected
- CSN3: AA = 48,39 %, AB = 44,09 %, BB = 7,53 %
- LGB: AA = 4,3 %, AB = 25,81 %, BB = 69,89 %
- ALA: AA = 6,67 %, AB = 81,11 %, BB = 12,22 %
- PRNP: 6/6 = 92,5 %, 5/6 = 7,3 %, genotype 5/5 was not detected

In sheep we detected following genotype frequencies:

- CSN1S1: - valaška: CC = 2,86 %, CT = 2,86 %, TT = 94,29 %;
A/- = 76,47 %, -/- = 23,53 %, genotype A/A was not detected;
D/D = 16,67 %, D/- = 72,22 %, -/- = 11,14 %
- cigája: CC = 11,54 %, TT = 88,46 %, genotyp CT nebol detegovaný;
A/- = 69,23 %, -/- = 30,77 %, genotype A/A was not detected;
D/D = 27,78 %, D/- = 72,22 %, genotype -/- was not detected

- lacaune: CC = 5,88 %, TT = 94,12 %, genotype CT was not detected;
A/- = 80 %, -/- = 20 %, genotype A/A was not detected;
D/D = 14,29 %, D/- 85,71, genotype -/- was not detected
- LGB:
 - valaška: AA = 17,65 %, AB = 35,29%, BB = 47,06%
 - cigája: AA = 42,86 %, AB = 25 %, BB = 32,14 %
 - lacaune: AA = 29,41 %, AB = 41,18, BB = 29,41 %

Key words: cattle, sheep, candidate genes (CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB, ALA, PRNP)

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	4
Obsah	5
Úvod	5
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky.....	6
1.1. Kandidátske gény kvality mlieka	6
1.2 Rizikové faktory.....	7
2 Ciele práce	8
3 Materiál a metódy	8
3.1 Materiál	8
3.2 Použité metódy	8
3.2.1 Izolácia genómovej DNA z krvi	8
3.2.2 Polymerázová reťazová reakcia.....	8
3.2.3 Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry	12
4 Výsledky.....	12
5 Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy	15
6 Záver	16
7 Zoznam použitej literatúry	18
8 Zoznam publikovaných prác autora súvisiacich s riešenou problematikou	19

Úvod

V šľachtení hospodárskych zvierat ide v princípe o dosiahnutie čo najlepších produkčných a reprodukčných vlastností, čo je výsledkom nielen selekcie, ale aj mnohých molekulárno-genetických metód, využívajúcich QTL a kandidátske gény.

Základným predpokladom pre šľachtenie hospodárskych zvierat je genetická variabilita (polymorfizmus). Variabilita génov sa v genetike a v šľachtení hospodárskych zvierat bežne využíva pri selekcii s cieľom zlepšiť úžitkovosť (mutácie ovplyvňujúce sledovaný úžitkový znak – množstvo a kvalita mäsa, mlieka, plodnosť, rezistencia voči chorobám) a pri identifikácii

jednotlivých zvierat (DNA polymorfizmus s určitou špecifickou frekvenciou alel, ktorý nemusí mať konkrétny vplyv na fenotyp).

1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

1.1 Kandidátske gény kvality mlieka

Hoci sa v mlieku odlišných druhov vyskytujú kvantitatívne aj kvalitatívne rozdiely, môžu byť mliečne proteíny všetkých cicavcov rozdelené do dvoch tried: kazeíny (α_1 , α_2 , β a κ) a srvátkové proteíny (β -laktoglobulín, α -laktalbumínom). (Haenlein, 1991).

α_1 - kazeínový systém (CSN1S1)

Kazeíny sú hlavné mliečne proteíny cicavcov. Majú dve základné funkcie pre cicajúce mláďatá: slúžiť ako hlavný zdroj aminokyselín a transportovať fosfát a vápnik v dostatočných množstvách pre podporu rastu kostí (Prinzenberg et al., 2003).

U hovädzieho dobytky aj oviec je α_1 - kazeín lokalizovaný na 6. chromozóme (Ferretti, Leone, Sgaramella, 1990; Diez-Tascón et al., 2001).

Genotyp BB významne ovplyvňuje výťažnosť mlieka, tuku a proteínov. Genotypy BC a BB zvyšujú percento proteínov v mlieku (Aleandri, 1990). Genotyp BC zvyšuje produkciu tuku. Syrenina z kravského mlieka s variantom A CSN1S1 je mäkkšia ako syrenina z mlieka s obsahom C variantu.

Porovnaním schopnosti mlieka oviec obsahujúceho BC, CC a CD fenotypy utvárať dobre štruktúrovanú zrazeninu, CC fenotyp bol lepší ako BC. Čas zrážania mlieka s obsahom fenotypu CC v porovnaní s BC bol preukázane vyšší z dôvodu vysokého množstva kazeínov (Chianese et al., 1997). Pirisi et al. (1999) potvrdili, že DD mlieka s väčšími micelami a nižšou kazeínovou hladinou majú nielen pomalšiu formováciu rýchlosť ale aj nižšiu syrársku tuhosť než CC mlieko.

β - kazeínový systém (CSN2)

U hovädzieho dobytky aj oviec je β - kazeín lokalizovaný na chromozóme 6 (Ferretti, Leone, Sgaramella, 1990; Diez-Tascón et al., 2001).

Koncom 90-tych rokov minulého storočia bol kazeínový variant A1 zaradení medzi rizikový faktor pre diabetes melitus typ 1 (Elliott et al. 1999) a ischemické srdcové ochorenie u ľudí (McLachlan 2001). Je to zapríčinené štiepením β - kazeínového variantu A1 na β -kazomorfín-7, ktorý môže zohrávať úlohu pri niektorých ľudských chorobách. Tiež bol dokázaný vzťah β -kazomorfínu-7 k syndrómu náhleho úmrtia dojčiat (SIDS) (Sun et al. 2003).

Genotyp A1A1 má pozitívny vplyv na obsah tuku (Panicke, Freyer, Erhardt, 1997). Variant A2 redukuje sérový cholesterol. Genotyp A2A2 má priaznivý vplyv na produkciu mlieka, tuku a bielkovín v kilogramoch. Variant A3 vplýva na produkciu mlieka.

K – kazeínový systém (CSN3)

U hovädzieho dobytku aj oviec je CSN3 lokalizovaný na chromozóme 6 (Ferretti, Leone, Sgaramella, 1990; Diez-Tascón et al., 2001).

Genotyp AA vplýva na vyššiu produkciu mlieka (kg), nižší obsah tuku a bielkovín (%), pomalšiu syriteľnosť, nižšiu akosť a produkciu syreniny, nižšiu výťažnosť syra. Genotypy AB a BB zvyšujú tukovosť mlieka a obsah bielkovín. Genotyp BB má pozitívny vplyv na syriteľnosť, zvyšuje výťažnosť syra a znižuje obsah syrového prachu v srvátke a skracuje dobu sýrenia (Kučerová et al., 2004).

α -laktalbumín (LALBA)

Hovädzí α -laktalbumín je lokalizovaný na 5. chromozóme (Mioduszevska-Czyczyn et al., 2007), ovčí na chromozóme 3 (Hayes, Popescu, Dutrillaux, 1993).

Genotyp AA zvyšuje množstvo mlieka (kg) a tuku (kg). Genotyp BB zvyšuje percento bielkovín a tuku. Genotyp AB má stredné hodnoty pre všetky sledované znaky (Bleck, Bremel, 1993).

Beta laktoglobulin (LGB)

Je lokalizovaný na hovädzom chromozóme 11 (Bláhová et al., 2004) a ovčom chromozóme 3 (Mele et al., 2007).

Genotyp AA LGB je asociovaný s vysokým mliečnym výťažkom, má pozitívny vplyv na obsah bielkovín v mlieku a významne zlepšuje pomer proteínov k tuku (Panicke, Freyer, Erhardt, 1997). Alela A BLG spolu s alelami A2 CSN2 génu a B CSN3 génu aditívne zvyšujú pomer proteínov k tuku. Genotyp BB je asociovaný s vysokým obsahom tuku a kazeínov potrebných pre výrobu syrov (Mao, Buttazzoni, Aleandri, 1992).

Pri ovciach je genotyp BB spojený s vysokým mliečnym výťažkom, kým AA a AB genotypy sa zdajú byť lepšie pre proteínový a kazeínový obsah a zníženú zrážanlivosť mlieka (Bolla et. al., 1989). Bocharev (1998) našiel spojitosť medzi LGB variantu AB s vysokou telesnou hmotnosťou, kým genotyp AA môže byť spojený s hustotou vlny oviec.

1.2 Rizikové faktory

Transmisívne spongioformné encefalopatie

Neobvyklé vlastnosti pôvodcu zodpovedného za TSE (transmissible spongioform encephalopathy – transmisívna spongioformná encefalopatia) spolu s klinickými a patologickými charakteristikami týchto chorôb viedli k zložitým štúdiám o povahe infekčného pôvodcu. Gén kódujúci tento proteín, sa našiel u všetkých testovaných zvierat (u hovädzieho dobytku a ovce na 13. chromozóme) i u človeka (na 20. chromozóme).

K najznámejším transmisívnym spongioformným encefalopatiám patrí bovinná spongioformná encefalopatia (BSE). Ide o afebrilnú, letálne končiacu chorobnú jednotku, ktorá je prenosná na viaceré druhy prežúvavcov, mäsožravcov a pravdepodobne aj na človeka. Vzniká v dôsledku degeneratívneho procesu centrálného nervového systému. Charakteristická je

typickým histopatologickým nálezom – vakuolizáciou neurónov v centrálnej nervovej sústave postihnutých kráv. Vakuolizácia neurónov spôsobuje špongiovitý vzhľad mozgového tkaniva, od čoho je odvodený aj názov choroby (Levkut et al., 2001). Nevyhnutne končí letálne.

2 Cieľ práce

Pre kvalitu a kvantitu mlieka oviec a hovädzieho dobytku je známy celý rad kandidátskych génov. Niektoré z nich podmieňujú výskyt rizikových faktorov pre výživu ľudí. Na základe toho je cieľom dizertačnej práce:

1. Optimalizovať metódy molekulovej genetiky pre štúdium polymorfizmu kandidátskych génov mlieka a prionového génu hovädzieho dobytku a vybraných plemien oviec.
2. Identifikácia mutácií na úrovni DNA v kandidátskych génoch mlieka a prionového génu v populáciách hovädzieho dobytku a vybraných plemien oviec.
3. Vyhodnotiť genotypovú štruktúru populácií hovädzieho dobytku a vybraných plemien oviec.

3 Materiál a metódy

3.1 Materiál

Pre štúdium polymorfizmu vybraných kandidátskych génov bol použitý biologický materiál získaný od hovädzieho dobytku (slovenský pinzgauský dobytok – 93 zvierat) a od baranov (cigaja – 28 zvierat, lacaune – 18 zvierat, valaška – zošľachtená – 40 zvierat).

Zvieratám bola odoberaná krv veterinárnym lekárom z krčnej žily – vena jugularis, do skúmavky s antikoagulačným roztokom ACD (0.48 % kyselina citrónová, 1.32 % citrát sodný, 1,47 % glukóza), v pomere 1 : 6 (ACD: krv). Vzorky boli až do zahájenia analýz zmrazené.

3.2 Použité metódy

3.2.1 Izolácia genómovej DNA z krvi

Hovädzí dobytok: metóda proteolytickej hydrolýzy proteinázou K, fenol-chloroformovej deproteinizácie a etanolovej precipitácie podľa Sambrook et al. (1989).

Barany: vysoľovacia metóda podľa Millera et al., (1987).

3.2.2 Polymerázová reťazová reakcia

ARMS PCR génu *CSN1S1* hovädzieho dobytku

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu génu *CSN1S1* sme použili oligonukleotidové primery FOR a REV prevzaté z práce Rincón a Medrano (2003).

***CSN1S1* FOR in:** 5' - CAT TCC ATT TCC TGT ATA ATG AGG CA - 3'

***CSN1S1* REV in:** 5' - AAT TCT AAG GAG AGT TTA CAA CAA AGA CGC - 3'

CSN1S1 FOR out: 5' - TGC ATG TTC TCA TAA TAA CC - 3'

CSN1S1 REV out: 5' - GAA GAA GCA GCA AGC TGG - 3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 4 pM out primer, 24 pM in primer, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 1,0 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Fermentas), 1x PCR reakčný roztok a približne 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 94 °C, 2 min., denaturácia: 94 °C, 30 s., annealing: 59 °C, 30 s., polymerizácia: 72 °C, 30 s., posledný krok: 72 °C, 10 min. Počet cyklov:30. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4 °C.

ARMS PCR génu CSN2 hovädzieho dobytku

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu génu *CSN2* sme použili oligonukleotidové primery FOR a REV prevzaté z práce Rincón a Medrano (2003).

CSN2 FOR in: 5' - AAT ATC CAG TTG AGC CCT TTA CTG AAT GC - 3'

CSN2 REV in: 5' - CAA CAT CAG TGA GAG TCA GGC TCA GC - 3'

CSN2 FOR out: 5' - AAC ATC CCT CCT CTT ACT CAA ACC CCT G - 3'

CSN2 REV out: 5' - CTT CTT TGA TGT CTC CTT AGA G - 3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 4 pM out primer, 24 pM in primer, 2 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 1,0 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Fermentas), 0,8 x PCR reakčný roztok a 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 94 °C, 2 min., denaturácia: 94 °C, 30 s., annealing: 63 °C, 30 s., polymerizácia: 72 °C, 30 s., posledný krok: 72 °C, 10 min. Počet cyklov:30. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4 °C.

MULTIPLEX PCR génu CSN3 a LGB hovädzieho dobytku

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu génu *CSN3* (Schlieben et al., 1991) a génu *LGB* (Medrano, Aguilar-Cordova, 1990) sme použili oligonukleotidové primery FOR a REV.

CSN3 FOR: 5' - GCT GAG CAG GTA TCC TAG TTA T - 3'

CSN3 REV: 5' - CTT CTT TGA TGT CTC CTT AGA G - 3'

LGB FOR: 5' - TGT GCT GGA CAC CGA CTA CAA AAA G - 3'

LGB REV: 5' - GCT CCC GGT ATA TGA CCA CCC TCT - 3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 8 pM *CSN3* primer, 14 pM *LGB* primer, 0,75 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 1,0 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Fermentas), 1 x PCR reakčný roztok a 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 94 °C, 2 min., denaturácia: 94 °C, 1 min., annealing: 59 °C, 1 min., polymerizácia: 72 °C, 1 min., posledný krok: 72 °C, 8 min. Počet cyklov: 35. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4°C.

Pre RFLP analýzu bol vybraný reštrikčný enzým *HindIII* pre *CSN3* a reštrikčný enzým *HaeIII* pre *LGB*, ktoré štiepili získané PCR produkty so známou sekvenciou.

ARMS PCR génu *ALA* hovädzieho dobytku

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu génu *ALA* sme použili oligonukleotidové primery FOR a REV prevzaté z práce Rincón a Medrano (2003).

***ALA* FOR in:** 5' - GTG TGG TGA CCC CAT TTC AGA ATC TGG A- 3'

***ALA* REV in:** 5' - GAG ACA AAG GAC ATC ATT TTG GTG ACC ACC- 3'

***ALA* FOR out:** 5' - CTC TTC CTG GAT GTA AGG CTT - 3'

***ALA* REV out:** 5' - AGC CTG GGT GGC ATG GAA TA - 3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 4 pM out primer, 24 pM in primer, 3,5 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 1,0 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Fermentas), 1x PCR reakčný roztok a približne 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 94 °C, 2 min., denaturácia: 94 °C, 30 s., annealing: 60 °C, 30 s., polymerizácia: 72 °C, 30 s., posledný krok: 72 °C, 10 min. Počet cyklov: 30. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4 °C.

Pri amplifikácii PCR produktov bol použitý touchdown. Annealingová teplota bola v prvom cykle 64 °C, následne bola znižovaná o 1 °C po každých dvoch cykloch až do dosiahnutia teploty 60 °C.

PCR génu *PRNP* hovädzieho dobytku

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu génu *PRNP* sme použili oligonukleotidové primery FOR a REV prevzaté z práce Premzla et al., (2000).

***PRNP* FOR:** 5' - ACG TGG GCC TCT GCA AGA AGC GAC - 3'

***PRNP* REV:** 5' - GCA CTT CCC AGC ATG TAG CCA CCA - 3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 5 pM primer, 3 mM MgCl₂, 2 mM dNTP, 1,5 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Invitrogen), 1 x PCR reakčný roztok a približne 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 94 °C, 5 min., denaturácia: 94 °C, 1 min., annealing: 65 °C, 1 min., polymerizácia: 72 °C, 1 min., posledný krok: 72 °C, 10 min. Počet cyklov: 40. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4°C.

PCR - SSCP génu *CSN1S1* oviec

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu génu *CSN1S1* sme použili oligonukleotidové primery FOR a REV prevzaté z práce Ceriotti et al., (2004).

***CSN1S1* FOR:** 5' - CAC TGT TGC TTT TTC AAT GGT C - 3'

***CSN1S1* REV:** 5' - AAG GCA ACA ATA TGC AGT CAT TT - 3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 5 pM primer, 2,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1,5 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Fermentas), 1x PCR reakčný roztok a približne 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 94 °C, 5 min., denaturácia: 94 °C, 1min., annealing: 56 °C, 1 min., polymerizácia: 72 °C, 1 min., posledný krok: 72 °C, 10 min. Počet cyklov:35. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4 °C.

PCR - RFLP génu *CSN1S1* – alela A oviec

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu mutácie *CSN1S1* A sme použili oligonukleotidové primery navrhnuté podľa Pilla et al.(1998):

***CSN1S1* A FOR:** 5' - GGT GTC AAA TTT AGC TGT TAA A -3'

***CSN1S1* A REV:** 5' - GCC CTT TTC TCT AAA AAG GTT T -3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 5 pM primer, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1,5 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Fermentas), 1x PCR reakčný roztok a približne 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 95 °C, 5 min., denaturácia: 95 °C, 30 s., annealing: 53 °C, 30 s., polymerizácia: 72 °C, 30 s., posledný krok: 72 °C, 10 min. Počet cyklov:30. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4 °C.

Pre RFLP analýzu bol vybraný reštrikčný enzým *MboII*, ktorý štiepil získané PCR produkty so známou sekvenciou.

PCR - RFLP génu *CSN1S1* – alela D oviec

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu mutácie *CSN1S1* D sme použili oligonukleotidové primery navrhnuté podľa Pilla et al.(1998):

***CSN1S1* D FOR:** 5' - CAA CAT ATT TTA AAT AAA TTG ACA AT -3'

***CSN1S1* D REV:** 5' - AAT TAA CAT AAA AAT GGC ATA CGT C -3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 20 pM primer, 2 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 1,0 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Fermentas), 1 x PCR reakčný roztok a približne 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 95 °C, 5 min., denaturácia: 95 °C, 30 s., annealing: 53 °C, 30 s., polymerizácia: 72 °C, 30 s., posledný krok: 72 °C, 10 min. Počet cyklov:30. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4 °C.

Pre RFLP analýzu bol vybraný reštrikčný enzým *MaeIII*, ktorý štiepil získané PCR produkty so známou sekvenciou.

PCR - RFLP génu *LGB* oviec

Na amplifikáciu špecifických úsekov pre detekciu génu *LGB* sme použili oligonukleotidové primery FOR a REV prevzaté z práce Kučinskienea et al., (2005).

***LGB* FOR:** 5' - AAA AGC CCT GGG TGG GCA GC - 3'

***LGB* REV:** 5' - TTG GGT TCA GTG TGA GTC TGG - 3'

PCR reakčná zmes zahŕňala zložky v nasledovných výsledných koncentráciach: 20 pM primer, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 1,5 U *Taq* DNA polymerázy recombinant (Invitrogen), 1x PCR reakčný roztok, 0,002 mg BSA a 50 ng DNA.

Teplotný a časový profil PCR reakcie: štart: 95 °C, 5 min., denaturácia: 95 °C, 50 s., annealing: 65 °C, 40 s., polymerizácia: 72 °C, 40 s., posledný krok: 72 °C, 5 min. Počet cyklov: 330. Po skončení PCR reakcie boli vzorky vychladené na teplotu 4 °C.

Pre RFLP analýzu bol vybraný reštrikčný enzým *RsaI*, ktorý štiepil získané PCR produkty so známou sekvenciou.

3.3. Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry

Na základe PCR analýz (PCR, PCR-RFLP, PCR ARMS, PCR SSCP) sme stanovili genotypovú štruktúru sledovanej populácie a vypočítali frekvencie alel v jednotlivých polymorfných génoch sledovanej populácie hovädzieho dobytká a ovieca. Významnosť rozdielov medzi experimentálne pozorovanou a teoreticky očakávanou frekvenciou genotypov sme overili χ^2 -testom.

Vypočítaná hodnota χ^2 -testu bola na základe stupňov voľnosti porovnávaná s tabuľkovou hodnotou podľa Fishera a následne určená pravdepodobnosť zhody alebo rozdielov medzi teoretickými a experimentálnymi hodnotami.

4 Výsledky

ARMS PCR génu CSN1S1 hovädzieho dobytká

V populácii hovädzieho dobytká v celkovom počte 93 zvierat boli zistené dva genotypy a to genotyp BB (310 bp, 236 bp) 81 zvierat (87,10 %) a genotyp BC (310 bp, 236 bp, 130bp) 12 zvierat (12,90 %). Genotyp CC (310 bp, 130 bp) nebol detegovaný. Alela B sa v populácii vyskytuje s veľmi vysokou frekvenciou až 93,55 %. Frekvencia alely C je 6,45 %.

Na základe χ^2 -testu sme zistili, že rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytká sú štatisticky nepreukazný, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

ARMS PCR génu CSN2 hovädzieho dobytká

V populácii hovädzieho dobytká v celkovom počte 92 zvierat boli zistené dva genotypy a to genotyp AA (338 bp, 217 bp) 21 zvierat (22,83 %) a genotyp AB (338 bp, 217 bp, 177 bp) 71 zvierat (77,17 %), ktorý mal prevahu. Genotyp BB (338 bp, 177 bp) nebol detegovaný. Alela A je početnejšia ako alela B a je v populácii zastúpená 61,41 %. Frekvencia alely B je 38,59 %.

Na základe χ^2 -testu sme zistili štatisticky preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov v sledovanej populácii hovädzieho dobytká.

MULTIPLEX PCR génu *CSN3* a *LGB* hovädzieho dobytku

V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 93 zvierat boli zistené všetky tri genotypy *CSN3* génu a to genotyp AA (443 bp) 45 zvierat (48,39 %), genotyp AB (443 bp, 348 bp, 95 bp) 41 zvierat (44,09 %) a genotyp BB (348 bp, 95 bp) 7 zvierat s frekvenciou výskytu (7,53 %).

V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 92 zvierat boli zistené všetky tri genotypy *LGB* génu a to genotyp AA (148 bp, 99 bp) 4 zvieratá s frekvenciou výskytu 4,3 %, genotyp AB (148 bp, 99 bp, 74 bp) 24 zvierat s frekvenciou výskytu 25,81 % a genotyp BB (99bp, 74 bp) 65 zvierat s frekvenciou výskytu 69,89 %. Frekvencia alely B je veľmi vysoká a je v populácii zastúpená 82,79 %. Frekvencia alely A je 17,21 %.

Na základe χ^2 - testu sme štatisticky preukázali odchytku medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov v sledovanej populácii nezaznamenali, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

ARMS PCR génu *ALA* hovädzieho dobytku

V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 90 zvierat boli zistené všetky tri genotypy a to genotyp AA (166 bp, 97 bp) 6 zvierat (6,67 %), genotyp AB (166 bp, 127 bp, 97 bp) 73 zvierat (88,11 %) a genotyp BB (166 bp, 127 bp) 11 zvierat (12,22 %). Alela A 47,22 % a alela B 52,78 % majú takmer vyrovnanú frekvenciu výskytu v populácii.

Na základe χ^2 - testu sme zistili štatisticky preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov v sledovanej populácii hovädzieho dobytku.

PCR génu *PRNP* hovädzieho dobytku

V populácii hovädzieho dobytku v celkovom počte 92 zvierat boli zistené dva genotypy a to genotyp 6/6 (373bp) 85 zvierat s frekvenciou výskytu 92,5 %, ktorý mal prevahu a genotyp 5/6 (349 bp, 373 bp) 7 zvierat s frekvenciou výskytu 7,3 %. Genotyp zodpovedný za BSE - 5/5 (349 bp) nebol detegovaný. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely 6 je vysoká a je v populácii zastúpená 96,2 %. Frekvencia alely 5 je 3,8 %.

Na základe χ^2 - testu sme zistili, že rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytku sú štatisticky nepreukazný, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

PCR SSCP génu *CSN1S1* oviec

V populácii baranov v celkovom počte 75 zvierat boli zistené všetky tri genotypy a to genotyp CC 5 zvierat (2,86 %), genotyp CT 1 zvierat (2,86 %) a genotyp TT 69 zvierat (94,29 %). Frekvencia alely T je vyššia a je v populácii zastúpená 95,31 %. Frekvencia alely C je 4,69 %.

Pri baranoch plemena cigája mali najväčšie zastúpenie homozygoti TT (88,46 %), nižšia frekvencia výskytu bola pre genotyp CC (11,54 %). Genotyp CT nebol detegovaný. Frekvencia alely C je 88,46 % a frekvencia alely T je 11,54 %

V prípade plemena lacaune bol najviac zastúpený genotyp TT (94,12 %). S nízkou frekvenciou (5,58 %) sa vyskytoval genotyp CC. Genotyp CT sme nezistili. Z výsledkov možno vidieť, že alela T sa v populácii vyskytuje so značnou prevahou (92,95 %) nad alelou C (7,05 %).

Na základe χ^2 -testu sme zistili u všetkých plemien štatisticky nepreukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

PCR - RFLP génu CSN1S1 – alela A oviec

V populácii baranov v celkovom počte 75 zvierat boli zistené dva genotypy a to genotyp A/- (306 bp, 160 bp, 146 bp, 66 bp) 56 zvierat (76,47 %) a genotyp -/- (306 bp, 66 bp) 19 zvierat (23,53 %). Genotyp AA (160 bp, 146 bp, 66 bp) nebol detegovaný. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely (-) je vyššia a je v populácii zastúpená 61,76 %. Frekvencia alely A je 38,24 %.

Pri baranoch plemena cigája mali najväčšie zastúpenie heterozygoti A/- (69,23 %), nižšia frekvencia výskytu bola pre genotyp -/- (30,77 %). Genotyp A/A sme nezistili. Frekvencia alely A je 34,62 % a frekvencia alely (-) je 65,38 %

Pri plemene lacaune sa heterozygoti A/- vyskytujú s vysokou frekvenciou (80 %). Genotyp -/- má frekvenciu výskytu 20 %. Genotyp AA nebol pozorovaný. Alela (-) sa v populácii vyskytuje s vyššou frekvenciou (60 %) ako alela A (40 %).

Na základe χ^2 -testu sme zistili štatisticky preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov u všetkých plemien baranov.

PCR - RFLP génu CSN1S1 – alela D oviec

V populácii baranov v celkovom počte 46 zvierat boli zistené všetky tri genotypy a to genotyp D/D (157 bp, 80 bp) 9 zvierat, genotyp D/- (157 bp, 80 bp, 53 bp, 27 bp) 32 zvierat a genotyp -/- (157 bp, 53 bp, 27 bp) 2 zvieratá.

Pri plemene valaška sme zaznamenali najväčšie zastúpenie baranov s genotypom D/- (72,22 %), obaja homozygoti D/D (16,67 %) a -/- (11,14 %) majú nízke frekvencie výskytu. Frekvencia alely D (52,78 %) je vyššia ako frekvencia alely (-), ktorá je v populácii zastúpená 47,22 %.

Pri baranoch plemena cigája mali vysoké zastúpenie heterozygoti D/- (72,22 %), nižšia frekvencia výskytu bola pre genotyp D/D (27,78 %). Genotyp -/- sme nepozorovali. Frekvencia alely D je 63,89 % a frekvencia alely (-) je 36,11 %.

Pri plemene lacaune bol genotyp D/- (85,71 %) zastúpený s oveľa vyššou frekvenciou ako genotyp D/D (14,29 %). Genotyp -/- nebol zistený. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely D je vyššia a je v populácii zastúpená 58,14 %. Frekvencia alely (-) je 41,86 %.

Na základe χ^2 - testu sme zistili štatisticky preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov u plemena cigaja. Pri plemenách valaška a lacaune je rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov štatisticky nepreukazný, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

PCR-RFLP génu *LGB* oviec

V populácii baranov v celkovom počte 79 zvierat boli zistené všetky tri genotypy a to genotyp AA (175 bp, 170 bp, 66 bp, 41 bp) 23 zvierat, genotyp AB (236 bp, 175 bp, 170 bp, 66 bp, 41 bp) 26 zvierat a genotyp BB (236 bp, 175 bp, 41 bp) 30 zvierat.

Pri plemene valaška sme zaznamenali najväčšie zastúpenie baranov s genotypom BB (47,06 %), len o čosi nižšiu frekvenciu výskytu mali heterozygoti AB (35,29 %) a najmenej sa vyskytovali jedince s genotypom AA (17,65 %). Frekvencia alely B je vyššia a je v populácii zastúpená 64,71 %. Frekvencia alely A je 35,29 %.

Pri baranoch plemena cigaja mali najväčšie zastúpenie homozygoti AA (42,86 %), nižšia frekvencia výskytu bola pre genotyp BB (32,14 %) a najmenej sa vyskytovali jedinci s genotypom AB (25 %). Frekvencia alely A je 55,36 % a Frekvencia alely B je 44,64%

Pri plemene Lacaune sa obaja homozygoti AA aj BB vyskytujú s rovnakou frekvenciou (29,41 %). Heterozygoti AB (41,18 %) sa vyskytujú s vyššou frekvenciou. Z výsledkov možno vidieť, že obe alely A aj B sa v populácii vyskytujú s rovnakou frekvenciou 50%.

Na základe χ^2 - testu sme zistili štatisticky preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov u plemena cigaja. U plemien valaška a lacaune je rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov štatisticky nepreukazný, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

5 Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy

Výsledky a závery uvedené v dizertačnej práci predstavujú prvotné informácie o genetickom polymorfizme detegovaných kandidátnych génov hovädzieho dobytku a oviec chovaných na Slovensku.

Metóda DNA analýzy je vhodná na sledovanie uvedených polymorfizmov kandidátskych génov mlieka a priónového proteínu pri hovädzom dobytku a ovciach.

Na základe skutočností uvedených v dizertačnej práci odporúčame:

- Sledovať vplyv jednotlivých genotypov nami sledovaných génov na produkčné vlastnosti, čo prispieva k spoznávaniu vzťahov medzi ukazovateľmi úžitkovosti a polymorfizmom DNA a mohlo by mať nielen šľachtiteľský ale aj ekonomický prínos.
- Rozšíriť analýzy asociácií nami sledovaných génov aj do iných chovov a na iné plemená hovädzieho dobytku a oviec chovanými na Slovensku.
- Z hľadiska chromozómovej lokalizácie génov kazeínového navrhujeme uskutočniť výskum zameraný na odhalenie možných efektov väzbových vzťahov medzi týmito génmi.
- Na základe existujúcich prác poukazujúcich na možnú asociáciu medzi *LGB* génom a vysokou telesnou hmotnosťou, navrhujeme rozšíriť výskum na zisťovanie vzťahov medzi génom *LGB* a nárastom telesnej hmotnosti.
 - Naše výsledky je možné využiť okrem zlepšovania produkcie dobytku a oviec aj pri zostavovaní zásad zdravej výživy pre ľudí s metabolickými poruchami, ktorí sú rizikovou skupinou pre srdcovocievne ochorenia, diabetes mellitus I. typu a autizmus.
 - Optimalizované metódy odporúčame využiť vo výučbe.

6 ZÁVER

V súlade s vytýčenými cieľmi dizertačnej práce sme optimalizovali a aplikovali PCR metódy pre identifikovanie a genotypovanie kandidátnych génov *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB*, *ALA*, *PRNP*.

Pre štúdium polymorfizmu vybraných kandidátskych génov bol použitý biologický materiál získaný od baranov v celkovom počte 79 a hovädzieho dobytku v celkovom počte 93.

Na základe výsledkov molekulárno-genetickej detekcie sme vyhodnotili genetickú štruktúru vo vybranej populácii hovädzieho dobytku a oviec.

Genetickou analýzou populácie hovädzieho dobytku sme dospeli k nasledovným záverom:

- V prípade *CSN1S1* génu sme v populácii hovädzieho dobytku zistili prevahu homozygotnej formy BB, genotyp CC sa v nami sledovanej populácii nevyskytoval, z čoho vyplýva prevaha alely B nad alelou C.
- Pre gén *CSN2* sme v populácii hovädzieho dobytku zistili prevahu heterozygotnej formy AB nad homozygotmy AA, genotyp BB sa v nami sledovanej populácii nevyskytoval, z čoho vyplýva, že alely A je v populácii početnejšia ako alela B.
- Nami sledovaná populácia hovädzieho dobytku mala pre *CSN3* gén prevahu homozygotnej formy AA nad heterozygotmy AB, homozygotný genotyp BB sme detekovali ojedinele. Z alel jednoznačne prevládala alela A.
- V prípade *LGB* génu sme v populácii hovädzieho dobytku zistili prevahu homozygotnej formy BB, nižšiu frekvenciu výskytu mali heterozygoti AB a najmenej zastúpený bol genotyp AA, z čoho vyplýva prevaha alely B nad alelou A.

➤ Pri géne ALA sme v populácii hovädzieho dobytku detegovali prevahu genotypu AB, nižšie zastúpenie mali genotypy BB a AA. Výsledky poukazujú na to, že alela A a alela B majú takmer vyrovnanú frekvenciu

➤ Génu *PRNP* bol v populácii hovädzieho dobytku najviac zastúpený homozygotnou formou 6/6, heterozygoti 5/6 mali nízku frekvenciu výskytu a genotyp 5/5 sa v nami sledovanej populácii nevyskytoval, z čoho vyplýva prevaha alely 6 nad alelou 5.

Genetickou analýzou jednotlivých súborov oviec sme dospeli k nasledovným záverom:

➤ V prípade *LGB* génu sme u plemena valaška zistili prevahu heterozygotnej formy AB nad homozygotmy BB. Výskyt jedincov s genotypom AA bol ojedinelý, z čoho vyplýva prevaha alely B nad alelou A. U baranov plemena cigája mali najväčšie zastúpenie heterozygoti AB, nižšiu frekvenciu výskytu mali homozygoti AA. Najmenej sa vyskytovali jedince s genotypom BB. Z alel prevládala alela A. U plemena Lacaune sa obaja homozygoti AA aj BB vyskytujú s rovnakou frekvenciou, heterozygoti AB sa vyskytujú s o čosi vyššou frekvenciou. Z výsledkov možno vidieť, že obe alely A aj B sa v populácii vyskytujú s rovnakou frekvenciou.

➤ Pre CSN21S1 sme u plemena valaška zaznamenali najväčšie zastúpenie baranov s genotypom TT, genotypy CC a CT sa v sledovanej populácii vyskytovali s rovnakou frekvenciou. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely T je vyššia ako frekvencia alely C. Ďalej sme zaznamenali najväčšie zastúpenie baranov s genotypom A/-, nižšiu frekvenciu výskytu mali homozygoti -/-. Genotyp AA nebol pozorovaný, z čoho vyplýva prevaha alely (-). Taktiež sme detegovali najväčšie zastúpenie baranov s genotypom D/-, obaja homozygoti D/D a (-/-) majú nízke frekvencie výskytu. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely D je len o čosi vyššia ako frekvencia alely (-).

Pri baranoch plemena cigája mali najväčšie zastúpenie homozygoti TT, nižšia frekvencia výskytu bola pre genotyp CC. Genotyp CT nebol detegovaný. Frekvencia alely T je vyššia ako frekvencia alely C. Tiež sme zistili najväčšie zastúpenie heterozygotov A/-, nižšia frekvencia výskytu bola pre genotyp -/-. Genotyp A/A sme nezistili. Frekvencia alely A je nižšia ako frekvencia alely (-). Vysoké zastúpenie mali aj heterozygoti D/-, nižšia frekvencia výskytu bola pre genotyp D/D. Genotyp -/- sme nepozorovali. Frekvencia alely D je vyššia oproti frekvencii alely (-).

V prípade plemena Lacaune bol najviac zastúpený genotyp TT. S nízkou frekvenciou sa vyskytoval genotyp CC. Genotyp CT sme nezistili. Z výsledkov možno vidieť, že alela T sa v populácii vyskytuje so značnou prevahou nad alelou C. Ďalej sme pozorovali prevahu heterozygotov A/-. Nižšiu frekvenciu výskytu má genotyp -/-. Genotyp AA nebol pozorovaný. Alela (-) sa v populácii vyskytuje s vyššou frekvenciou ako alela A. Tiež sme zistili, že genotyp D/- bol zastúpený s oveľa vyššou frekvenciou ako genotyp D/D. Genotyp -/- nebol zistený. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely D je v populácii vyššia ako frekvencia alely (-).

7 Zoznam použitej literatúry

1. ALEANDAI, R. – BUTTAZZONI, L. G. – SCHNEIDER, J. C. – CAROLI, A. DAVOLI, R. 1990. The Effects of Milk Protein Polymorphisms on Milk Components and Cheese-Producing Ability. In: *J. Dairy Sci.*, vol. 73, 1990, p. 241-255.
2. BLÁHOVÁ, B. – ŘEHOUT, V. – KÚBEK, A. – ČÍTEK, J. – PŮBALOVÁ, M. 2004. Genetic variation of milk proteins in cattle maintained as gene reserve. In: *Anim. Sci. Pap. Rep.*, vol. 22, 2004, no. 2, p. 7-10.
3. BLECK, G. T. – BREMEL, R. D. 1993: Correlation of the α -lactalbumin (+15) Polymorphism to Milk Production and Milk Composition of Holsteins . In: *J. Dairy Sci.*, vol. 76, 1993, no. 8, p. 2292-2298.
4. BOCHAREV, V.V. 1998. The molecular analysis of β -lactoglobulin locus in the different sheep breeds. Dubrovicy : doctoral thesis. 1998, p. 1-93.
5. BOLLA, P. – CAROLI, A. – MEZZELANI, A. – RIZZI, R. – PAGNACCO, G. – FRAGHI, A. – CASU, S. 1989. Milk protein markers and production in sheep. In: *Anim. Genet.*, vol. 20, 1989, p. 78-79.
6. CERIOTTI, G. – CHESSA, S. – BOLLA, P. – BUDELLI, E. – BIANCHI, L. – DURANTI, E. – CAROLI, A. 2004. Single Nucleotide Polymorphisms in the Ovine Casein Genes Detected by Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism. In: *J. Dairy Sci.*, vol. 87, 2004, p. 2606–2613.
7. CHIANESE, L. – MAURIELLO, R. – FERRANTI, P. – TRIPALDI, C. – TAIBI, L. – DELL'AQUILA, S. 1997. Relationship between α s1-casein variants and clotting capability of ovine milk. In: *Milk Protein Polymorphism*. Brussels, Belgium : IDF, 1997, p. 316–323.
8. DIEZ-TASCÓN, C. – BAYÓN, Y. – ARRANZ, J. - DE LA FUENTE, F. – SAN PRIMITIVO, F. 2001. Mapping quantitative trait loci for milk production traits on ovine chromosome 6. In: *J. Dairy Res.*, vol. 68, 2001, p. 389-397.
9. ELLIOTT, R.B. – HARRIS, D.P. – HILL, J.P. – BIBBY, N.J. – WASMUTH, H.E. 1999. Type I (insulindependent) diabetes mellitus and cow milk: casein variant consumption. In: *Diabetologia*, vol. 42, 1999, p. 292–296.
10. FERRETTI, L. – LEONE, P. – SGARAMELLA, U. 1990. Long range restriction analysis of the bovine casein gene. In: *Nuc. Acids Res.*, vol. 18, 1990, p. 6829-6833.
11. HAENLEIN, G.F.W. 1991. Recent research on milk protein polymorphism and related items. In: *Proc. 8th Ann. Mtg. Amer. Cheese Soc. San Francisco*, 1991, p. 6.
12. HAYES, H. C. – POPESCU, P. – DUTRILLAUX, B. 1993. Comparative gene mapping of lactoperoxidase, retinoblastoma, and α -lactalbumin genes in cattle, sheep, and goats. In: *Mamm. Genome*, vol. 4, 1993, no. 10, 593-597.
13. KUČEROVÁ, J. – NĚMCOVÁ, E. – ŠTÍPKOVÁ, M. – VRTKOVÁ, I. – DVOŘÁK, J. – FRELICH, J. – BOUŠKA, J. – MARŠÁLEK, M. 2004. Vliv markerů CSN3 a ETH10 na parametry mléčné užitkovosti u českého strakatého skotu. In: *J. Central Europ. Agric.*, vol. 5, 2004, no. 4, p. 303-308.
14. KUČINSKIENE, J. – VAGONIS, G. – MALEVIČIUTE, J. – TAPIO, I. 2005. Genetic polymorphism of B-lactoglobulin in lithuanian blackface and lithuanian native coarsewoolwd sheep. In: *Veter. Zootechn.*, vol. 29, 2005, no. 51, p. 90-92.
15. LEVKUT, M. – LEVKUTOVÁ, M. – REVAJOVÁ, V. 2001. Patologicko-anatomická a histologická diagnostika bovinnej špongioformnej encefalopatie (BSE). In: *Slov. veter. čas.*, roč. 26, 2001, č. 4, s. 214–216.
16. MAO, I.L. – BUTTAZZONI, L.G. – ALEANDRI, R. 1992. Effects of polymorphic milk protein genes on milk yield and composition traits in Holstein cattle. In: *Acta Agric. Scand. Sect. A, Anim. Sci.*, vol. 42, 1992, p. 1-7.
17. McLACHLAN, C.N. 2001. Beta-casein A1, ischaemic heart disease mortality, and other illnesses. In: *Med. Hypoth.*, vol. 56, 2001, p. 262–272.
18. MEDRANO, J.F. – AGUILAR-CORDOVA, E. 1990. Polymerase chain reaction amplification of bovine β -lactoglobulin genomic sequences and identification of genetic variants by RFLP analysis. In: *Anim. Bio-Technol.*, vol. 1, 1990, p. 73 – 77.
19. MELE, M. – CONTE, G. – SERRA, A. – BUCCIONI, A. – SECCHIARI, P. 2007. Relationship between beta-lactoglobulin polymorphism and milk fatty acid composition in milk of Massese dairy ewes. In: *Small Rumin. Res.*, vol. 73, 2007, p. 37-44.
20. MILLER, S. A. – DYKES, D. D. – POLESKY, H. F. 1987. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. In: *Nuc. Acids Res.*, vol. 16, 1988, no. 3, 1215 p.
21. MIODUSZEWSKA-CZYCZYN, U. – CZARNIK, U. – WALAWSKI, K. – RUŚĆ A. 2007. Levels of some blood diagnostic indices in young cattle with different genotypes at α -lactalbumin locus. In: *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, vol. 51, 2007, p. 97-103.

22. PANICKE, L., FREYER, G., ERHARDT, G. 1997. Effects of milk protein genotypes on milk production traits. In: 48th Ann. Mee. of the Europ. Associat. for Anim. Produkt. am 25.-28.08.1997 in Vienna. Wien, 1997.
23. PILLA, F. – BEVILACQUA, C. – LEROUX, C. – FRAGHI, A. – MARTIN, P. 1998. Genotyping of α -s1 casein in sheep. In: Anim. Genet. Vol. 29 1998, p. 472–473.
24. PIRISI, A. – PIREDDA, G. – PAPOFF, C.M. – DI SALVO, R. – PINTUS, S. – GARRO, G. – FERRANTI, P. – CHIANESE, L. 1999. Effects of sheep α s1-casein CC, CD and DD genotypes on milk composition and cheesemaking properties. In: J. Dairy Res., vol. 66, 1999, p. 409–419.
25. PREMZL, M. – BOZIC, P. – GAMULIN, V. 2000. PRNP actarepeat allele genotype frequencies among the modern and rare cattle breeds in Croatia. In: Animal Genetics, vol. 31 2000, no. 6, p. 408–409.
26. PRINZENBERG, E. M. – WEIMANN, C. – BRANDT, H. – BENNEWITZ, J. – KALM, E. – SCHWERIN, M. – ERHARDT, G. 2003. Polymorphism of the bovine CSN1S1 promoter: Linkage mapping, intragenic haplotypes, end effects on milk production traits. In: J. Dairy Sci., vol. 86, 2003, p. 2696–2705.
27. RINCÓN, G. – MEDRANO, F. 2003. Single nucleotide polymorphism genotyping of bovine milk protein gene using the tetra-primer ARMS PCR. In: J. Anim. Breed. Genet., vol. 120, 2003, p. 331–337.
28. SAMBROOK, J. – FRITZ, E. F. – MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd ed., Cold Spring Harb. Lab. Press, USA. vols. 1-3, 1989.
29. SCHLIEBEN, S. – ERHARD, G. – SENFT, B. 1991: Genotyping of bovine kappa-casein following DNA sequence amplification and direct sequencing of kappa-CN^E PCR product. In: Anim. Genet., vol. 22, 1991, p. 333–342.
30. SUN, Z. – ZHANG, Z. – WANG, X. – CADE, R. – ELMER, Z. – FREGLY, M. 2003. Relation of beta-casomorphin to apnea in sudden infant death syndrome. In: Peptides, vol. 24, 2003, p. 937–943.

8 Zoznam publikovaných prác autora súvisiacich s riešenou problematikou

1. TRAKOVICKÁ, A. – BEŽOVÁ, K. – ANGELOVIČOVÁ, M. – KÚBEK, A. – TURJANITSA, I. – KAČÁNIOVÁ, M. – CHLEBO, R. – MINDEK, S. – ŽIDEK, R. – POKORÁDI, J. – MILUCHOVÁ, M. – GÁBOR, M.: Genetické markéry a kvalita produktov špeciálnych odvetví živočíšnej výroby. Nitra : SPU, 2005, 178 s., ISBN 80-8069-633-0.
2. 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“, České Budějovice : JU ZF, 2005, s. 123-126, ISBN 80-85645-50-5.
3. GÁBOR, M. – MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – VAŠÍČEK, D.: DNA analýza polymorfizmu Booroola génu oviec metódou PCR-RFLP. In: Ogólnouczelniana sesja kól naukowych, Krakow, 2005, p. 46-47.
4. KŁOC, M. – MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – VAŠÍČEK, D.: Štúdium génu svalovej hypertrofie oviec „Callipyge génu“ a jeho detekcia metódou PCR-RFLP. In: Ogólnouczelniana sesja kól naukowych, Krakow, 2005, p. 54-55.
5. TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M. – KÚBEK, A.: Rizikové faktory živočíšnych produktov a metódy ich identifikácie. In: Zborník referátov z celoštátneho odborného seminára cyklu „Biologická bezpečnosť a agropotravinárstvo 05“. Nitra : SPU, 2005, s. 134-142. ISBN 80-969068-6-0.
6. MILUCHOVÁ, M. – GÁBOR, M. – TRAKOVICKÁ, A.: Polymorfizmus prion proteinového génu u vybranej populácie hovädzieho dobytku. In: Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 9, 2006, č. Mimoriadne číslo, s. 11-13, ISSN 1335-258X.
7. TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M. – GÁBOR, M.: Analýza polymorfizmu ESR génu ošípanej metódou PCR-RFLP. In: Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 9, 2006, č. Mimoriadne číslo, s. 18-19, ISSN 1335-258X.
8. GÁBOR, M. – MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – MARGETÍN, M.: Analýza polymorfizmu Booroola génu „FecB“ oviec metódou PCR – RFLP. In: Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 9, 2006, č. Mimoriadne číslo, s. 43-44, ISSN 1335-258X.
9. MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – GÁBOR, M.: Analysis of gene for double muscle in sheep. In: „Biotechnology 2006“, Scientific Pedagogical Publishing na CD ROM, České Budějovice : JU ZF, 2006, s. 303-305, ISBN 8085645–53–X.
10. TRAKOVICKÁ, A. – MINDEKOVÁ, S. – GÁBOR, M. – MILUCHOVÁ, M.: The polymorphism of H-FABP (Hinf1) gene in pig population. In: III. Miedzynarodowa konferencja „Zastosowanie osiagnieć naukowych z zakresu genetyki, rozrodu, zywienia oraz jakości tusz i miesa

w nowoczesnej produkcji świń“, Wydawnictwa Uczelniane Akademii Techniczno-Rolniczej Bydgoszcz, s. 99, 2006, ISBN 83-89334-48-8.

11. MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – KULÍŠEK, V. – BUJKO, J.: Molekulový základ priónov, výskyt priónóz u ľudí a zvierat a ich klinická charakteristika a diagnostika. In: Slovak J. Anim. Sci., roč. 40, 2007, č. 2, s. 105-112, ISSN 1335-3686.
12. GÁBOR, M. – TRAKOVICKÁ, A. – KASARDA, R. – MILUCHOVÁ, M. – DOBIAŠ, M.: Molekulárno-genetická detekcia génov RYR1 a ESR v populácii svine divej európskej (*Sus scrofa scrofa*). In: Acta fytotechnica et zootechnica, roč. 1, 2007, č. 1, s. 23-26, ISSN 1335-258X.
13. TRAKOVICKÁ, A. – GÁBOR, M. – MILUCHOVÁ, M. – MINDEKOVÁ, S.: Polymorfizmus génu H-FABP (*Hinf I*) v populácii ošípaných. In: Agri-environment and animal welfare [elektronický zdroj] : book of proceedings of 2nd international conference on agricultural and rural development, Nitra : SPU, 2007, s. 665-668, ISBN 978-80-8069-962-8.
14. GABOR, M. – TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M.: Analysis of polymorphism of TG5 (Mbo I) gene of cattle by method PCR-RFLP. In: II. Polski Kongres Genetyki, Warszawa, 2007, p. 221-222.
15. MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – GABOR, M.: Analysis of polymorphism of alpha S1 casein of beef cattle by ARMS PCR. In: II. Polski Kongres Genetyki, Warszawa, 2007, p. 237.
16. GÁBOR, M. – TRAKOVICKÁ, A. – DOBIAŠ, M. – KASARDA, R. – MILUCHOVÁ, M. – GAŠPARÍK, J.: Genotypovanie svine divej európskej (*Sus scrofa scrofa*) pre gén RYR1 metódou PCR-RFLP. In: Poľovnícky manažment a ochrana zveri 2007 : Zborník referátov z XX. ročníka odborného seminára s medzinárodnou účasťou, Zvolen : TU, 2007, s. 149-154, ISBN 978-80-228-1789-9
17. GÁBOR, M. – TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M.: Identifikácia polymorfizmu kandidátskych génov RYR1 a ESR u jedincov svine divej európskej (*Sus scrofa scrofa*) a jednotlivých plemien ošípaných metódou multiplex PCR-RFLP. In: Biotechnology 2008, [elektronický zdroj], České Budějovice 13.-14.2.2008, České Budějovice : JU, 2008, part 1, s. 117-119, ISBN 80-85645-58-0.
18. GÁBOR, M. – TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M.: Identifikácia polymorfizmu génu CAPN2 (M – KALPAÍN) u plemien slovenský pinzgauský dobytok a charolais metódou PCR-RFLP. In: Biotechnology 2008, [elektronický zdroj], České Budějovice 13.-14.2.2008, České Budějovice : JU, 2008, part 1, s. 121-123, ISBN 80-85645-58-0.
19. MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – GÁBOR, M.: Identifikácia LGB génu hovädzieho dobytku metódou PCR – RFLP. In: Biotechnology 2008, [elektronický zdroj], České Budějovice 13.-14.2.2008, České Budějovice : JU, 2008, part 1, s. 257-259, ISBN 80-85645-58-0.
20. MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A. – GÁBOR, M.: Identifikácia génu CSN3 hovädzieho dobytku metódou PCR – RFLP. In: Biotechnology 2008, [elektronický zdroj], České Budějovice 13.-14.2.2008, České Budějovice : JU, 2008, part 1, s. 261-263, ISBN 80-85645-58-0.
21. GÁBOR, M. – MILUCHOVÁ, M. – TRAKOVICKÁ, A.: Analýza polymorfizmu Génu CAPN1 (μ - kalpaín) u plemien slovenský pinzgauský dobytok a charolais metódou PCR-RFLP. In: Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín, [elektronický zdroj] : zborník vedeckých prác z III. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, Nitra 31.1.-1.2.2008, Nitra : SPU, 2008, s. 153-156, ISBN 978-80-8069-996-3.
22. MILUCHOVÁ, M. – GÁBOR, M. – TRAKOVICKÁ, A.: Analýza polymorfizmu génu beta laktoglobulínu v populácii slovenského pinzgauského dobytku metódou PCR RFLP. In: Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín, [elektronický zdroj] : zborník vedeckých prác z III. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, Nitra 31.1.-1.2.2008, Nitra : SPU, 2008, s. 372-375, ISBN 978-80-8069-996-3.