

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

**Genetické markery kvality mäsa hovädzieho dobytká a
oviec**

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor
v študijnom programe 4.2.4 Genetika

Ing. Michal Gábor

Nitra, 2009

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.

Doktorand: Ing. Michal Gábor
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

doc. Ing. Peter Chrenek, DrSc.
Centrum výskumu živočíšnej výroby, Nitra

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 študijného programu 4.2.4 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 v študijnom programe 4.2.4 Genetika

prof. RNDr. Milan Bežo, CSc.,
Katedra genetiky a šľachtenia rastlín
Fakulta agrobiológie a potravinových zdrojov
SPU Nitra

ABSTRAKT

Analyzovali sme 130 zvierat slovenského pinzgauského plemena a 77 zvierat plemena charolais pre kandidátne gény CAPN1, CAPN2, CAST, TG, DGAT1 a SCD a ovce v celkovom počte 93 pre gény CLPG a CAST. Genotypovanie sa uskutočnilo metódami ARMS-PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP a Multiplex PCR-SSCP. Genómovú DNA sme izolovali zo vzoriek krvi a chlповých cibuliek. Genetickou analýzou populácie pinzgauského plemena sme zistili nasledovné frekvencie alel pre vybrané gény. Frekvencie alel C a T pre SNP C4685T génu CAPN1 boli 0,5308 a 0,4692. Frekvencie alel C a G pre marker CAPN316 génu CAPN1 boli 0,0769 a 0,9231. Frekvencie alel C a T pre marker CAPN4751 génu CAPN1 boli 0,6962 a 0,3038. Frekvencie alel A a B pre gén CAPN2 boli 0,4286 a 0,5714. Frekvencie alel C a G pre marker UoG-CAST génu CAST boli 0,7538 a 0,2462. Frekvencie alel C a T pre marker TG5 génu TG boli 0,6308 a 0,3692. Frekvencie alel K a A pre marker K232A génu DGAT1 boli 0,0308 a 0,9648. Frekvencie alel C a T pre SNP T878C génu CAPN1 boli 0,6346 a 0,3654. Genetickou analýzou v populácii plemena charolais sme detegovali nasledovné frekvencie alel. Frekvencie alel C a T pre SNP C4685T génu CAPN1 boli 0,5909 a 0,4091. Frekvencie alel C a G pre marker CAPN316 génu CAPN1 boli 0,1623 a 0,8377. Frekvencie alel C a T pre marker CAPN4751 génu CAPN1 boli 0,5779 a 0,4221. Frekvencie alel A a B pre gén CAPN2 boli 0,38 a 0,62. Frekvencie alel C a G pre marker UoG-CAST génu CAST boli 0,6299 a 0,3701. Frekvencie alel C a T pre marker TG5 génu TG boli 0,8506 a 0,1494. Frekvencie alel K a A pre marker K232A génu DGAT1 boli 0,1104 a 0,8896. Frekvencie alel C a T pre SNP T878C génu CAPN1 boli 0,5649 a 0,4351. Genetickou analýzou v populácii oviec sme detegovali monomorfny prejav génu CLPG pre alelu A. Frekvencie alel M a N genu CAST boli pri jednotlivých plemenách rozdielne. Pri plemene lacaune sme detegovali monomorfny prejav génu CAST pre alelu M. Frekvencie alely M a N génu CAST pre ďalšie plemená boli 0,9138 a 0,0862 pre plemeno cigája, 0,9 a 0,1 pre krížence plemien cigája a lacaune a 0,9737 a 0,0263 pre plemeno zošľachtená valaška. Evaluáciou použitých molekulárno-genetických metód sme dospeli k záveru, že najľahšie optimalizovateľnou metódou bola PCR-RFLP metóda. ARMS-PCR metóda predstavovala najlacnejšiu a najrýchlejšiu metódu detekcie SNP a najuniverzálnejšiu metódu s vysokou reprodukovateľnosťou výsledkov predstavovala metóda PCR-SSCP.

Kľúčové slová: DNA, kandidátne gény, CAPN1, CAPN2, CAST, TG, DGAT1, SCD, CLPG

ABSTRACT

We analysed 130 animals of slovak pinzgau breed and 77 animals of charolais breed for candidate genes CAPN1, CAPN2, CAST, TG, DGAT1 and SCD and 93 sheep for gene CLPG and CAST. We used ARMS-PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP and Multiplex PCR-SSCP methods for determination of genotypes for these genes. The genomic DNA was isolated from samples

of blood and hairs. By using genetic analyses we detected in population of pinzgau cattle the following frequency of alleles. Frequency of alleles C and T for SNP C4685T of gene CAPN1 were 0.5308 and 0.4692. Frequency of alleles C and G for marker CAPN316 of gene CAPN1 were 0.0769 and 0.9231. Frequency of alleles C and T for marker CAPN4751 of gene CAPN1 were 0.6962 and 0.3038. Frequency of alleles A and B for gene CAPN2 were 0.6962 and 0.3038. Frequency of alleles C and G for marker UoG-CAST of gene CAST were 0.7538 and 0.2462. Frequency of alleles C and T for marker TG5 of gene TG were 0.6308 a 0.3692. Frequency of alleles K and A for marker K232A of gene DGAT1 were 0.0308 a 0.9648. Frequency of alleles C and T for SNP T878C of gene SCD were 0.6346 a 0.3654. In population of charolais breed we detected by using genetic analyses the following frequency of alleles. Frequency of alleles C and T for SNP C4685T of gene CAPN1 were 0.5909 and 0.4091. Frequency of alleles C and G for marker CAPN316 of gene CAPN1 were 0.1623 and 0.8377. Frequency of alleles C and T for marker CAPN4751 of gene CAPN1 were 0.5779 and 0.4221. Frequency of alleles A and B for gene CAPN2 were 0.38 and 0.62. Frequency of alleles C and G for marker UoG-CAST of gene CAST were 0.6299 and 0.3701. Frequency of alleles C and T for marker TG5 of gene TG were 0.8506 and 0.1494. Frequency of alleles K and A for marker K232A of gene DGAT1 were 0.1104 and 0.8896. Frequency of alleles C and T for SNP T878C of gene SCD were 0.5649 and 0.4351. In population of 93 sheep we detected monomorphic manifestation of allele A for gene CLPG. Frequency of alleles M and N for gene CAST were different for each breed of sheep. For breed of lacaune we detected monomorphic manifestation of allele M. Frequency of alleles M and N for gene CAST in the others breeds were 0.9138 and 0.0862 for tsigai, 0.9 and 0.1 for crossbreed of lacaune and tsigai and 0.9737 and 0.0263 for improved valachian. By evaluation of using molecular genetic methods we recognized that the easiest optimized method was PCR-RFLP. The ARMS-PCR method presented the cheapest and quickest method for detection of SNP and the most universale method with the high reproducibility of results was PCR-SSCP method.

Key words: DNA, candidate genes, CAPN1, CAPN2, CAST, TG, DGAT1, SCD, CLPG

Obsah

Abstrakt	3
Abstract	3
Obsah	4
Úvod	5
1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky	5
1.1. Kandidátske gény pre krehkosť mäsa hovädzieho dobytku	5
1.2 Potenciálne kandidátske gény pre mramorovanie mäsa hovädzieho dobytku.....	6
1.3 Kandidátske gény pre kvantitu a kvalitu jahňacieho mäsa.....	7

2	Ciele práce.....	7
3	Materiál a metódy	7
3.1	Materiál	7
3.2	Použité metódy	7
3.2.1	Izolácia genómovej DNA	7
3.2.2	Metódy detekcie SNP	8
3.2.3	Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry.....	10
4	Výsledky	10
5	Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy	14
6	Záver.....	15
7	Zoznam použitej literatúry.....	17
8	Zoznam publikovaných prác autora súvisiacich s riešenou problematikou	19

Úvod

V poslednej dobe sa selekcia pri mäsových plemenách hovädzieho dobytku a oviec čoraz výraznejšie zameriava v prospech zvýšenia kvalitatívnych znakov akými sú jemnosť a mramorovanie mäsa. Meranie uvedených znakov kvality mäsa, ktoré sú všeobecne dôležité pre záujem konzumentov mäsa, sú veľmi nákladné. Práve z toho dôvodu sa v poslednej dobe začínajú využívať testy založené na genotypovaní zvierat na prítomnosť jednotlivých mutácií, pri ktorých bola zistená silná asociácia medzi ich prítomnosťou a zlepšenou kvalitou hovädzieho a jahňacieho mäsa.

Práca vznikla s podporou projektu VEGA: „Rozvoj a využitie genetických metód pre šľachtenie hospodárskych zvierat a ochranu živočíšnej biodiverzity“. Registračné číslo projektu: 1/4440/07.

1 Prehľad o súčasnom stave riešenej problematiky

1.1 Kandidátske gény pre krehkosť mäsa hovädzieho dobytku

Medzi najznámejšie kandidátske gény asociované s jemnosťou mäsa zvierat patria gény CAPN1 a CAPN2 kódujúce proteázy μ -kalpaín (*EC 3.4.22.52*) a m-kalpaín (*EC 3.4.22.53*) a gén CAST kódujúci vznik kalpastatínu.

Gén CAPN1

Smith et al. (2000) podrobným mapovaním lokalizovali gén CAPN1 (μ -kalpaín) na 29. chromozóme hovädzieho dobytku. Doteraz bolo u bovinného CAPN1 génu popísaných 38 SNP (Page et al. 2002; White et al., 2005; Kubiak-Juszczuk et al., 2004). Medzi dva najvýznamnejšie SNP génu CAPN1 preukazne asociované s jemnejším mäsom hovädzieho dobytku patria CAPN316 a CAPN4751. Spomínané markery sú súčasťou dvoch komerčných testov využívaných na predikciu jemnejšieho mäsa hovädzieho dobytku.

Gén CAPN2

Gén kódujúci proteín m-kalpaín dostal pomenovanie CAPN2. Podrobné štúdie Smith et al. (2000) preukázali lokalizáciu tohoto génu na 29. chromozóme. Genetický polymorfizmus hovädzieho génu CAPN2 prvýkrát zistili Zhang et al. (1996). Genetický polymorfizmus génu CAPN2 objavili pomocou metódy PCR-RFLP v oblasti regulačnej podjednotky m-kalpaínu.

Gén CAST

Gén kódujúci vznik hovädzieho kalpastatínu je lokalizovaný na 7. chromozóme s relatívnou pozíciou 117, 8 cM (Bishop et al., 1993; Kappes et al., 1997). Barendse (2002) objavil v 3'UTR oblasti jeden z dvoch doposiaľ najdôležitejších polymorfizmov CAST génu. Podstatou jednoduchého nukleotidového polymorfizmu (SNP) je zámena G za A. Druhé najvýznamnejšie SNP lokalizované v 5. intróne génu CAST popísal Schenkel et al. (2006). Podstatou jednoduchého nukleotidového polymorfizmu (SNP) je zámena G za C. Toto SNP dostalo označenie UoG-CAST. Štúdia Van-Eennaama et al. (2007) potvrdila silnú asociáciu oboch polymorfizmov génu CAST s jemnosťou mäsa.

1.2 Potenciálne kandidátske gény pre mramorovanie mäsa hovädzieho dobytká

Medzi najznámejšie potenciálne kandidátske gény asociované so zvýšeným stupňom mramorovania mäsa hovädzieho dobytká patria gény TG a DGAT1 a SCD.

Gén TG

Gén TG lokalizovaný na 14. chromozóme u hovädzieho dobytká, kóduje bielkovinu tyroglobulín. Barendse et al. (1997) ako prvý objavili prítomnosť SNP polymorfizmu génu TG v 5' UTR oblasti. Podľa samotnej lokalizácie SNP dostal pomenovanie TG5. Vyvinuli test GeneSTAR[®] Marbling, pomocou ktorého je možné presnejšie odhadnúť kvalitu jatočného zvieratá, predovšetkým stupňa jeho mramorovania.

Gén DGAT1

Gén DGAT1 je považovaný za veľmi silný kandidátny gén pre obsah tuku v mlieku. Je lokalizovaný na konci centroméri 14. chromozómu v oblasti, ktorá obsahuje QTL vplývajúci na množstvo a zloženie mlieka (Farnir et al., 2002). Podstatou najviac preštudovaného polymorfizmu K232A je dinukleotidová substitúcia ApA za GpC (AAG→GCG) v pozícii 10 433 a 10 434 sekvencie DNA v 8. exóne, ktorá spôsobuje zmenu poradia sekvencie aminokyselín proteínu z pôvodného lyzínu na alanín v pozícii 232 s označením K232A (Winter et al., 2002). Thaller et al. (2003) zistili asociáciu medzi polymorfizmom K232A a zvýšením stupňom mramorovania pre plemene charolais.

Gén SCD

Gén SCD kóduje expresiu enzýmu s stearyl-CoA desaturáza (*EC 1.14.19.1*), ktorý je kľúčovým enzýmom pri bunkovej biosyntéze mononenasýtených mastných kyselín (MUFA) z nasýtených mastných kyselín v adipocytoch intramuskulárneho tuku (Kim et al., 1999). Taniguchi et al. (2004) objavili 8 nukleotidových substitúcií (obrázok 1.2) v rôznych pozíciách

cDNA sekvencie génu SCD lokalizovaného na 26. chromozóme hovädzieho dobytku (Cambell et al, 2001). Podrobnejšími analýzami medzi jednotlivými mutáciami génu SCD a zložením mastných kyselín v intramuskulárnom tuku zistili preukaznú spojitosť medzi jednou mutáciou a zvýšeným obsahom jednoduchých nenasýtených kyselín v tuku testovaných zvierat. Podstata spomínanej mutácie v 5. exóne génu SCD spočíva v substitúcii tymínu za cytozín v pozícii 878 bp sekvencie cDNA (*AB075020*), ktorá spôsobila zámenu aminokyselín valín za alanín.

1.3 Kandidátske gény pre kvantitu a kvalitu jahňacieho mäsa

Gén CLPG

Mutácia v géne CLPG („callipyge“) predstavovala prvú kauzálnu mutáciu asociovanú so svalovou hypertrofiou oviec (Cockett et al., 1994). Samotný gén CLPG bol lokalizovaný v oblasti teloméru 18. chromozómu oviec (Cockett et al., 1994). Podstatou mutácie v géne CLPG je jednoduchá zámena A za G (Freking et al., 2002). Podrobný výskum zameraný na dedivosť callipyge mutácie z rodičov na potomstvo dokázal unikátny typ dedičnosti označený ako „polárna overdominancia“ (Iannuzzi et al., 1999). Polárna overdominancia je určitou formou superdominancie, ktorá je pri cicavcoch zriedkavá. Fenotypový prejav callipyge mutácie sa totiž prejaví len pri jahňatách, ktoré zdedia mutantnú alelu od otca a normálnu alelu od matky. Zvyšné tri genotypy sa javia ako normálne.

Gén CAST

Prevažná väčšina génov spôsobujúcich svalovú hypertrofiu oviec je sprevádzaná zníženým stupňom jemnosti mäsa, ktorý významne ovplyvňuje kvalitu jahňacieho mäsa. Ovčie gén pre kalpastatín je lokalizovaný na 5. chromozóme (Killefer a Koohmaraie, 1994). Polymorfizmus ovčieho génu CAST lokalizovaný v oblasti prvej domény kalpastatínu prvýkrát popísali Palmer et al. (1998). Spomínaný PCR-RFLP polymorfizmus sekvencie ovčieho CAST génu objavili použitím reštrikčných enzýmov *MspI* a *NcoI*. Doteraz však nebola uverejnená v databázach génov celá sekvencia ovčieho CAST génu.

2 Ciele práce

Mapovaním genómu HD a oviec boli zaznamenané gény výrazne ovplyvňujúce kvalitu ale aj kvantitu mäsa. Zvlášť pri mäsovom dobytku sa čoraz výraznejšie využívajú komerčné DNA testy, pomocou ktorých sa stanovujú a následne selektujú jednotlivé genotypy pre gény ovplyvňujúce šťavnatosť a jemnosť mäsa. Na základe týchto poznatkov je cieľom dizertačnej práce:

1. Optimalizácia vybraných molekulárno-genetických metód (PCR-RFLP, PCR-SSCP, ARMS-PCR) pre detekciu polymorfizmu génov CAPN1, CAPN2, CAST, TG, DGAT1 a SCD pre hovädzí dobytok a génov CLPG a CAST pre ovce.
2. Zhodnotenie použitých molekulárno-genetických metód z hľadiska finančnej, časovej, technickej a manuálnej náročnosti.

3. Vyhodnotenie genotypovej štruktúry analyzovaných populácií hovädzieho dobytku a oviec.

3 Materiál a metódy

3.1 Materiál

Pre štúdium polymorfizmu vybraných kandidátskych génov bol použitý biologický materiál (krv, chlpy) získaný od hovädzieho dobytku (slovenské pinzgauské plemeno – 130 zvierat, plemeno charolais – 77 zvierat) a oviec (cigaja – 58 zvierat, lacaune – 11 zvierat, zošľachtená valaška – 19 zvierat a križencov plemien lacaune a cigája – 5 zvierat).

3.2 Použité metódy

3.2.1 Izolácia genómovej DNA

Izolácia z krvi: vysol'ovacia metóda (Miller et al., 1988) fenolchloroformová metóda (Sambrook et al., 1989), izolácia z krvných zrazenín (Kanai et al., 1994), izolácia komerčným kitom NucleospinBlood (Macherey Nagel), forézna metóda izolácie DNA z krvných škvŕn (Zhou et al., 2006).

Izolácia z chlpy: nami navrhnutá metóda izolácie DNA s využitím chemikálie DNAzol® (Molecular Research Center) a nosiča LPA (lineárny polyakrylamid) zarobeného podľa Gaillarda a Straussa (1990).

3.2.2 Metódy detekcie SNP

Pre analýzu detekcie jednoduchých nukleotidových polymorfizmov (SNP) vybraných kandidátskych a potenciálne kandidátskych génov hovädzieho dobytku a oviec boli použité metódy PCR-RFLP, PCR-SSCP a ARMS-PCR.

Gén CAPN1 – SNP C4685T

Detekciu SNP polymorfizmu C4685T génu CAPN1 sme uskutočnili metódou PCR-RFLP a ARMS-PCR metódou.

PCR-RFLP

Na amplifikáciu špecifického úseku génu CAPN1 pre SNP C4685T sme použili primery navrhnuté podľa práce Kubiak-Juszczuk et al. (2004). Pre samotnú detekciu SNP sme použili reštrikčnú endonukleázu *BseGI* (Fermentas).

ARMS-PCR

Na amplifikáciu alelovo-špecifických fragmentov pre alely C a T génu CAPN1 pre SNP C4685T sme použili vlastné oligonukleotidové primery navrhnuté pomocou programu Tetra-primer ARMS-PCR (Ye et al., 2001).

Gén CAPN1 – marker CAPN316

Detekciu polymorfizmu markeru CAPN316 génu CAPN1 sme uskutočnili ARMS-PCR metódou.

ARMS-PCR

Na amplifikáciu alelovo-špecifických fragmentov pre alely C a G génu CAPN1 pre marker CAPN316 sme použili primery navrhnuté podľa práce Rincón a Medrano (2006).

Gén CAPN1 – marker CAPN4751

Detekciu polymorfizmu markeru CAPN4751 génu CAPN1 sme uskutočnili ARMS-PCR metódou.

ARMS-PCR

Na amplifikáciu alelovo-špecifických fragmentov pre alely C a T génu CAPN1 pre marker CAPN4751 sme použili primery navrhnuté podľa práce Rincón a Medrano (2006).

Gén CAPN2 – polymorfizmus *HhaI*

Pre štúdium polymorfizmu (*HhaI*) génu CAPN2 sme optimalizovali metódu PCR-RFLP.

PCR-RFLP

Na amplifikáciu špecifického úseku génu CAPN2 sme použili primery navrhnuté podľa práce Zhang et al. (1996). Pre samotnú detekciu SNP sme použili reštrikčnú endonukleázu *HhaI* (Fermentas).

Gén CAST – marker UoG-CAST

Pre štúdium markeru UoG-CAST génu CAST (*Bos taurus*) sme optimalizovali metódy PCR-RFLP a PCR-SSCP.

PCR-RFLP a PCR-SSCP

Pre amplifikáciu špecifického úseku génu CAST pre marker UoG-CAST použitého pre obe analýzy sme použili vlastné oligonukleotidové primery navrhnuté pomocou programu BatchPrimer3 v1.0 (You et al., 2008). Pre reštrikčnú analýzu sme použili enzým *RsaI* (Fermentas).

Gén TG – marker TG5

Pre štúdium markeru TG5 génu TG sme optimalizovali metódy PCR-RFLP a PCR-SSCP.

PCR-RFLP a PCR-SSCP

Pre amplifikáciu špecifického úseku génu TG pre marker TG5 použitého pre obe analýzy sme použili oligonukleotidové primery prevzaté z práce Barendse et al.(1997). Pre reštrikčnú analýzu sme použili enzým *PsuI* (Fermentas).

Gén DGAT1 – marker K232A

Pre analýzu markeru K232A génu DGAT1 sme optimalizovali metódy PCR-RFLP a PCR-SSCP.

PCR-RFLP a PCR-SSCP

Pre amplifikáciu špecifického úseku génu DAGT1 pre marker K232A použitého pre obe analýzy sme použili oligonukleotidové primery prevzaté z práce Wintera et al. (2002). Pre reštrikčnú analýzu sme použili enzým *Cfr*I (Fermentas).

Gén SCD – SNP T878C

Pre analýzu SNP polymorfizmu T878C génu SCD sme optimalizovali metódy PCR-RFLP, PCR-SSCP a ARMS-PCR.

PCR-RFLP a PCR-SSCP

Pre amplifikáciu špecifického úseku génu SCD pre SNP T787C použitého pre obe analýzy sme použili vlastné oligonukleotidové primery navrhnuté pomocou programu BatchPrimer3 v1.0 (You et al., 2008). Pre reštrikčnú analýzu sme použili enzým *Sat*I (Fermentas).

ARMS-PCR

Na amplifikáciu alelovo-špecifických fragmentov pre alely C a T génu SCD pre SNP T878C sme použili vlastné oligonukleotidové primery navrhnuté pomocou programu BatchPrimer3 v1.0 (You et al., 2008).

Gén CLPG (*Ovis aries*)

Pre štúdium polymorfizmu génu CLPG sme optimalizovali metódu PCR-RFLP.

PCR-RFLP

Na amplifikáciu špecifického úseku génu CAPN2 sme použili primery navrhnuté podľa práce Freking et al. (2002). Pre samotnú detekciu SNP sme použili reštrikčnú endonukleázu *Faq*I (Fermentas).

Gén CAST (*Ovis aries*)

Pre štúdium polymorfizmu génu CAST (*Ovis aries*) sme optimalizovali metódu PCR-RFLP.

PCR-RFLP

Na amplifikáciu špecifického úseku génu CAPN2 sme použili primery navrhnuté podľa práce Palmer et al. (1998). Pre samotnú detekciu SNP sme použili reštrikčnú endonukleázu *Msp*I (Fermentas).

3.3. Matematicko-štatistické vyhodnotenie genetickej štruktúry

Na základe PCR analýz (PCR-RFLP, ARMS-PCR, PCR-SSCP) sme stanovili genotypovú štruktúru sledovanej populácie a vypočítali frekvencie alel v jednotlivých polymorfných génoch sledovanej populácie hovädzieho dobytku a oviec. 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

Hovädzi dobytok

Gén CAPN1 - SNP C4685T

V analyzovanej populácii 130 zvierat pinzgauškého plemena mal miernu prevahu heterozygotný genotyp CT s frekvenciou výskytu 40 % nad homozygotným genotypom CC – 33,08 % a mutantným homozygotným genotypom TT – 26,92 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely C má v analyzovanej populácii pinzgavského dobytká miernu prevahu 53,08 % pred mutantnou alelou T, ktorej frekvencia výskytu je 46,92 %. V analyzovanej populácii 77 zvierat mäsového plemena charolais mal najväčšie zastúpenie homozygotný genotyp CC s frekvenciou 40,26 % pred heterozygotným genotypom CT – 37,66 % a mutantným homozygotným genotypom TT - 22,08 %. Z výsledkov pre plemeno charolais je vidieť prevahu alely C s frekvenciou 59,09 % nad alelou T s frekvenciou 40,91 %. Na základe χ^2 - testu sme zistili, že rozdiely medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytká sú štatisticky nepreukazné, čo znamená, že sa v sledovaných populáciách zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

Gén CAPN1 – marker CAPN316

V analyzovanej populácii 130 zvierat pinzgauškého plemena mal veľmi výraznú prevahu homozygotný genotyp GG s frekvenciou výskytu 86,15 % nad heterozygotným genotypom CG – 12,31 % a homozygotným genotypom CC – 1,54 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely C má v analyzovanej populácii pinzgauškého plemena veľmi nízku frekvenciu výskytu s hodnotou len 7,69 %, na rozdiel od frekvencie výskytu alely G – 92,31 %. V analyzovanej populácii 77 zvierat plemena charolais mal najväčšie zastúpenie homozygotný genotyp GG s frekvenciou 67,53 % pred heterozygotným genotypom CG – 32,47 %. Homozygotný genotyp CC nebol v analyzovanej populácii plemena charolais detegovaný. Z výsledkov pre plemeno charolais je vidieť silnú prevahu alely G s frekvenciou 83,77 % nad alelou C s frekvenciou 16,23 %. Na základe χ^2 - testu sme zistili, že rozdiely medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytká sú štatisticky nepreukazné, čo znamená, že sa v sledovaných populáciách zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

Gén CAPN1 – marker CAPN4751

V analyzovanej populácii 130 zvierat pinzgauškého dobytká mal miernu prevahu heterozygotný genotyp CT s frekvenciou výskytu 57,69 % nad homozygotným genotypom CC – 40,77 %. Frekvencia výskytu homozygotného genotypu TT bola len 1,54 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely C má v analyzovanej populácii pinzgauškého dobytká oveľa vyššiu frekvenciu výskytu s hodnotou 69,62 %, na rozdiel od frekvencie výskytu alely T – 30,38 %. V analyzovanej populácii 77 zvierat plemena charolais mal podobne ako pri pinzgavskom dobytká najväčšie zastúpenie heterozygotný genotyp CT s frekvenciou 68,83 % pred homozygotným genotypom CC s frekvenciou výskytu 23,38 %. Frekvencia výskytu

homozygotného genotypu TT bola 7,79 %. Z výsledkov pre plemeno charolais je vidieť prevahu alely C s frekvenciou 57,79 % nad alelou T s frekvenciou 42,21 %. Na základe χ^2 -testu sme zistili štatisticky preukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov v sledovaných populáciách hovädzieho dobytká, čím nebol potvrdený rovnovážny stav v daných populáciách.

Gén CAPN2 – polymorfizmus *HhaI*

V analyzovanej populácii 56 zvierat pinzgauškého dobytká mal výraznú prevahu heterozygotný genotyp AB s frekvenciou výskytu 50 % nad homozygotným genotypom BB – 32,14 % a homozygotným genotypom AA – 17,86 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely B - 57,14 % má v analyzovanej populácii pinzgauškého dobytká miernu prevahu nad frekvenciou výskytu alely A – 42,86 %. V analyzovanej populácii 50 zvierat plemena charolais mal podobne ako pri pinzgavskom dobytku najväčšie zastúpenie heterozygotný genotyp AB s frekvenciou 52 % pred homozygotným genotypom BB s frekvenciou výskytu 36 %. Frekvencia výskytu homozygotného genotypu AA bola 12 %. Z výsledkov pre plemeno charolais je vidieť prevahu frekvencie výskytu alely B – 62 % nad alelou A – 38 %. Na základe χ^2 -testu sme zistili, že rozdiely medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytká sú štatisticky nepreukazné, čo znamená, že sa v sledovaných populáciách zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

Gén CAST – marker UoG-CAST

V analyzovanej populácii 130 zvierat pinzgauškého plemena mal výraznú prevahu genotyp CC s frekvenciou výskytu 56,92 % nad heterozygotným genotypom CG – 36,92 % a homozygotným genotypom GG – 6,15 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely C - 75,38 % má v analyzovanej populácii pinzgavského dobytká výraznú prevahu nad frekvenciou výskytu alely G – 24,62 %. V analyzovanej populácii 77 zvierat plemena charolais mal miernu prevahu heterozygotný genotyp CG s frekvenciou 42,86 % pred homozygotným genotypom CC s frekvenciou výskytu 41,56 %. Frekvencia výskytu homozygotného genotypu GG bola 15,58 %. Z výsledkov pre plemeno charolais je vidieť jasnú prevahu alely C – 62,99 % nad alelou A – 37,01 %. Na základe χ^2 -testu sme zistili, že rozdiely medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytká sú štatisticky nepreukazné, čo znamená, že sa v sledovaných populáciách zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

Gén TG – marker TG5

V analyzovanej populácii 130 zvierat pinzgauškého dobytká mal najväčšie zastúpenie heterozygotný genotyp CT s frekvenciou 44,62 %, len o niečo nižšiu frekvenciu výskytu mal homozygotný genotyp CC so 40,77 % a najmenej zastúpený bol genotyp TT s frekvenciou 14,61 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely C je v analyzovanej populácii pinzgavského dobytká vyššia a je zastúpená 63,08 %. Frekvencia výskytu mutantnej alely T má hodnotu 36,92 %. V analyzovanej populácii 77 zvierat mäsového plemena charolais mal najväčšie zastúpenie homozygotný genotyp CC s frekvenciou 70,13 %. Heterozygotný genotyp

CT mal frekvenciu výskytu 29,87 %. Mutantný homozygotný genotyp TT nebol detegovaný. Z výsledkov je zrejماً jasná prevaha alely C s frekvenciou 85,06 % nad mutantnou alelou T s frekvenciou 14,94 %. Na základe χ^2 -testu sme zistili, že rozdiely medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytká sú štatisticky nepreukazné, čo znamená, že sa v sledovaných populáciách zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

Gén DGAT1 – marker K232A

V analyzovanej populácii 130 zvierat pinzgauškého dobytká mal veľmi vysoké zastúpenie homozygotný genotyp AA s frekvenciou 93,85 % kým heterozygotný genotyp KA mal frekvenciu výskytu len 6,15 %. Homozygotný genotyp KK nebol detekovaný. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely A mala v analyzovanej populácii pinzgauškého dobytká veľmi vysokú frekvenciu výskytu 96,62 %. Frekvencia výskytu alely K mala hodnotu len 3,08 %. V analyzovanej populácii 77 zvierat plemena charolais mal dominantné zastúpenie homozygotný genotyp AA s frekvenciou 80,52 %. Heterozygotný genotyp KA mal frekvenciu výskytu 16,88 % a homozygotný genotyp KK len 2,60 %. Z výsledkov je zrejماً jasná prevaha alely A s frekvenciou 88,96 % nad alelou K s frekvenciou 11,04 %. Na základe χ^2 -testu sme zistili, že rozdiely medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytká sú štatisticky nepreukazné, čo znamená, že sa v sledovaných populáciách zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

Gén SCD – SNP T878C

V analyzovanej populácii 130 zvierat pinzgauškého plemena mali genotypy CC a CT rovnakú frekvenciu výskytu 42,31 %. Homozygotný genotyp TT mal frekvenciu výskytu 15,38 %. Výsledky poukazujú na to, že frekvencia alely C má v analyzovanej populácii pinzgauškého dobytká vyššiu frekvenciu výskytu 63,46 % ako frekvencia výskytu alely T – 36,54 %. V analyzovanej populácii 77 zvierat plemena charolais mal dominantné zastúpenie heterozygotný genotyp CT s frekvenciou 53,25 %. Homozygotný genotyp CC mal frekvenciu výskytu 29,87 % a homozygotný genotyp TT len 16,88 %. Z výsledkov pre plemeno charolais uvedených v tabuľke 4.8 je vidieť miernu prevahu alely C s frekvenciou 56,49 % nad alely T s frekvenciou 43,51 %. Na základe χ^2 -testu sme zistili, že rozdiely medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov hovädzieho dobytká sú štatisticky nepreukazné, čo znamená, že sa v sledovaných populáciách zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona.

Ovce

Gén CLPG

V populácii oviec v celkovom počte 93 zvierat bol detekovaný pri všetkých jedincoch homozygotný genotyp AA. Heterozygotný genotyp AG a homozygotný genotyp GG nebol detegovaný.

Gén CAST

V analyzovanom súbore 58 zvierat plemena cigája bol s vysokou prevahou detegovaný homozygotným genotyp MM s frekvenciou výskytu 82,76 %. Frekvencia výskytu heterozygotného genotypu MN bol len 17,24 %. Homozygotný genotyp NN nebol detegovaný. Výsledky poukazujú na vysokú prevahu frekvencia alely M – 91,38 % nad frekvenciou alely N – 8,62 %. V analyzovanom súbore 11 zvierat plemena cigája bol so 100 % frekvenciou výskytu detegovaný homozygotný genotyp MM a alela M. V analyzovanom súbore 5 zvierat vzniknutých krížením plemien cigája a lacaune bol najviac zastúpený homozygotným genotyp MM s frekvenciou výskytu 80 %. Frekvencia výskytu heterozygotného genotypu MN bola len 20 %. Homozygotný genotyp NN nebol detekovaný. Výsledky poukazujú na vysokú prevahu frekvencie alely M s frekvenciou 90 % nad alelou N – 10 %. V analyzovanom súbore 19 zvierat plemena zošľachtená valaška bol s vysokou frekvenciou výskytu pozorovaný homozygotným genotyp MM – 94,74 %. Frekvencia výskytu heterozygotného genotypu MN bola len 5,26 %. Homozygotný genotyp NN nebol detekovaný. Výsledky poukazujú na jednoznačnú prevahu frekvencie alely M – 97,37 % nad alelou N – 2,63 %. Na základe χ^2 -testu sme zistili pri plemene cigája štatisticky nepreukazný rozdiel medzi očakávanými a pozorovanými frekvenciami genotypov, čo znamená, že sa v sledovanej populácii zistil rovnovážny stav v zmysle Hardy-Weinbergovho zákona. Pri zvyšných plemenách (zošľachtená valaška, lacaune a krížence plemien lacaune a cigája) sme z dôvodu nízkeho počtu zvierat χ^2 -test nepočítali.

Evaluácia použitých molekulárno-genetických metód

Pre detekciu vybraných polymorfizmov génov TG, DGAT1, SCD, CAPN1, CAPN2, CAST pre hovädzi dobytok a CLPG a CAST pre ovce boli vykonané metódami PCR-RFLP, PCR-SSCP a ARMS-PCR. Kombinácia všetkých troch metód pre detekciu rovnakého polymorfizmu SNP reprezentoval SNP T878C génu SCD. Porovnaním finančných nákladov na potrebných pre analýzu SNP T878C génu SCD sme zistili potrebu najnižších nákladov pre metódu ARMS-PCR v porovnaní s metódami PCR-RFLP a PCR-SSCP. Porovnávaním časových požiadaviek sme opäť potvrdili výhodu metódy ARMS-PCR pred PCR-SSCP a PCR-RFLP metódami. Porovnaním reprodukovateľnosti všetkých troch metód sme zistili, že najvyšší stupeň detekcie zaznamenala metóda PCR-SSCP, pred metódou PCR-RFLP. Metóda ARMS-PCR mala o niečo nižšiu reprodukovateľnosť výsledkov z dôvodu nízkej kvality DNA vzorky. Najvyššia detekčná citlivosť sme zistili pri metóde PCR-SSCP.

5 Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy

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

Použité metódy DNA analýzy sú vhodné na sledovanie mutácií a poskytujú možnosť výberu najoptimálnejšej metódy pre detekciu uvedených polymorfizmov.

Na základe skutočností uvedených v dizertačnej práci odporúčame:

- ❖ Z hľadiska hodnotenia mramorovania mäsa hovädzieho dobytku navrhujeme rozšíriť analýzu nami sledovaných génov na iné plemená hovädzieho dobytku chovaného na Slovensku.
- ❖ Na základe zistených frekvencií alely T a homozygotného genotypu TT génu TG pre marker TG5 v analyzovanej populácii pinzgauského plemene navrhujeme:
 - rozšíriť testovanú populáciu pinzgauského dobytku o plemenné zvieratá,
 - zvýšiť počet testovaných zvierat zaradených do fenotypového hodnotenia mramorovania mäsa za účelom overenia asociácie alely T so zvýšeným stupňom mramorovania.
- ❖ Z hľadiska vyššej frekvencie priaznivého genotypu CC génu SCD, asociovaného s nutrične kvalitnejším zložením hovädzieho tuku, navrhujeme:
 - rozšíriť testovanú populáciu pinzgauského plemena pre detekciu genotypu CC génu SCD a zároveň pri testovaných zvieratách vykonať biochemickú analýzu zameranú na zistenie pomeru mastných kyselín
 - analyzovať populáciu slovenského strakatého plemena, vrátane plemenných zvierat,
- ❖ Na základe existujúcich komerčných DNA testov pre predikciu jemnejšieho hovädzieho mäsa navrhujeme evaluáciu komerčného panelu markerov pre gény CAST a CAPN1 na základe asociácie s Warner-Bratzlerovým testom strižnej sily pre slovenské pinzgauské a slovenské strakaté plemeno.
- ❖ Na základe výsledkov frekvencie alely G génu CLPG pri ovciach navrhujeme aby pri prípadných fenotypových prejavoch dvojitého osvalenia boli do DNA analýz zaradené ďalšie gény asociované so zvýšeným osvalením oviec.
- ❖ Na základe výsledkov optimalizácie molekulárno-genetických metód pre detekciu jednotlivých mutácií navrhuje ich použitie v laboratóriu za účelom zníženia finančných nákladov a časovej náročnosti potrebnej pre genotypovanie zvierat pre vybrané gény.
- ❖ Optimalizované metódy odporúčame využiť vo výučbe.

6 ZÁVER

V súlade s vytýčenými cieľmi dizertačnej práce sme optimalizovali a aplikovali vybrané modifikácie PCR metódy (ARMS-PCR, PCR-RFLP, PCR-SSCP) pre identifikovanie a

genotypovanie génov *CAPN1*, *CAPN2*, *CAST*, *SCD*, *DGATI*, *TG*, pre hovädzi dobytok a génov *CLPG* a *CAST* pre ovce.

Pre štúdium polymorfizmu jednotlivých kandidátskych génov bola použitá periférna krv a chlповé cibulky získané od hovädzieho dobytku plemena charolais chovaného v Maďarsku a na Slovensku v celkovom počte 77 zvierat a slovenského pinzgauského plemena z chovu v Spišskom Bystrom v celkovom počte 130. Vzorky periférnej krvi oviec plemien valaška, cigája, lacaune, zošľachtená valška a krížencov plemien cigája a lacaune boli získané z Výskumného ústavu živočíšnej výroby v Nitre, chov Trenčianska Teplá.

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 SNP C4685T génu *CAPN1* sme v populácii pinzgauského plemena zistili prevahu heterozygotného genotypu CT nad genotypmi CC a TT, ktoré mali približne rovnaké frekvencie výskytu. Výsledkov vyplýva, že alela C má miernu prevahu nad alelou T. V analyzovanej populácii plemena charolais sme detegovali miernu prevahu homozygotného genotypu CC nad genotypmi CT a TT. Z výsledkov frekvencií jednotlivých alel vyplýva prevaha alely C nad alelou T.
- ❖ Pre marker CAPN316 génu *CAPN1* sme v populácii pinzgauského plemena zistili výraznú prevahu homozygotného genotypu GG nad heterozygotným genotypom CG. Homozygotný genotyp CC sa vyskytoval len ojedinele z čoho vyplýva vysoká prevaha alely G nad alelou C. V populácii plemena charolais sme zistili rovnako vysokú prevahu homozygotného genotypu GG nad heterozygotným genotypom CG. Homozygotný genotyp CC sme nezistili. Z alel jednoznačne prevláda alela G.
- ❖ V prípade markeru CAPN4751 génu *CAPN1* sme v populácii pinzgauského plemena detegovali miernu prevahu heterozygotného genotypu CT nad homozygotným genotypom CC. Genotyp TT bol detekovaný len ojedinele, z čoho vyplýva jasná prevaha alely C nad alelou T. V populácii plemena charolais sme zistili výraznejšiu prevahu heterozygotného genotypu CT nad homozygotným genotypom CT. Homozygotný genotyp TT sme detegovali v nižšom zastúpení. Z výsledkov frekvencií alel vyplýva prevaha alely C nad alelou T.
- ❖ Pre gén *CAPN2* sme v populácii pinzgauského plemena zistili prevahu heterozygotného genotypu AB nad homozygotnými genotypmi BB a AA. Z alel mala miernu prevahu alela B nad alelou A. V analyzovanej populácii plemena charolais sme zistili podobnú prevahu heterozygotného genotypu AB nad homozygotnými genotypmi BB a AA. Z výsledkov vyplýva prevaha alely B nad alelou A.
- ❖ Pre marker UoG-CAST génu *CAST* sme v populácii pinzgauského plemena zistili prevahu homozygotného genotypu CC nad heterozygotným genotypom CG. Homozygotný genotyp

GG sme detegovali len výnimočne, z čoho vyplýva vysoká prevaha alely C nad alelou G. V populácií plemena charolais sme zistili takmer rovnakú prítomnosť genotypov CC a CG. Homozygotný genotyp GG sa vyskytol len v nízkej frekvencii, z čoho vyplýva prevaha alely C nad alelou G.

- ❖ Pre marker TG5 génu TG sme v populácií pinzgauského plemeno detegovali miernu prevahu heterozygotného genotypu CT pred homozygotnými genotypmi CC a TT, z čoho vyplýva prevaha alely C nad alelou T. V analyzovanej populácií plemena charolais sme zistili vyššiu prevahu homozygotného genotypu CC nad genotypom CT. Homozygotný genotyp TT sme nezistili. Z alel jednoznačne prevláda alela C nad alelou T.
- ❖ V prípade markeru K232A génu DGAT1 sme v populácii pinzgauského plemena zistili výraznú prevahu homozygotného genotypu AA nad heterozygotným genotypom KA, ktorý sa vyskytoval len ojedinele. Prítomnosť homozygotného genotypu KK sme nezistili. Z výsledkov frekvencií jednotlivých alel jednoznačne prevláda alela A nad alelou K. V populácii plemena charolais sme zistili podobnú prevahu homozygotného genotypu AA nad heterozygotným genotypom KA. Frekvencia homozygotného genotypu bola veľmi nízka, z čoho vyplýva vysoká prevaha alely A nad alelou K.
- ❖ Pre SNP T878C génu SCD v populácií pinzgauského dobytká sme detegovali identické frekvencie výskytu genotypov CC a CT, ktoré prevládali nad genotypom TT, z čoho vyplýva prevaha alely C nad alelou T. V populácií plemena charolais sme zistili prevahu heterozygotného genotypu CT nad homozygotnými genotypmi CC a TT. Alela C mala miernu prevahu nad alelou T.

Genetickou analýzou jednotlivých súborov oviec sme dospeli k nasledovným záverom:

- ❖ Pre gén CLPG sme v nami sledovaných súboroch oviec plemien cigája, lacaune, zošľachtená valaška a krížencov plemien cigája a lacaune zistili jednoznačne dominantné zastúpenie genotypu AA. Zvyšné dva genotypy AG a GG sme nedetegovali. Z výsledkov vyplýva monomorfný prejav génu CLPG v podobe alely A pri všetkých testovaných súboroch oviec
- ❖ V prípade génu CAST sme pri plemene cigája zistili výraznú prevahu homozygotného genotypu MM nad heterozygotným genotypom MN. Homozygotný genotyp NN sme nezistili, z čoho vyplýva výrazná prevaha alely M nad alelou N. Pri plemene lacaune sme detegovali len genotyp MM. Pri plemene zošľachtená valaška sme zistili vysokú prevahu homozygotného genotypu MM v porovnaní s heterozygotným genotypom MN. Homozygotný genotyp NN sme nezistili. Výsledky poukazujú na výraznú prevahu alely M nad alelou N. Pri krížencoch plemien cigája a lacaune sme zistili vyššiu frekvenciu homozygotného genotypu MM v porovnaní s heterozygotným genotypom NN. Z alel jednoznačne prevládala alela M nad alelou N.

Evaluáciou použitých molekulárno-genetických metód sme dospeli k záveru, že najľahšie optimalizovateľnou metódou bola PCR-RFLP metóda. ARMS-PCR metóda predstavovala

najlacnejšiu a najrýchlejšiu metódu detekcie SNP a najuniverzálnejšiu metódu s vysokou reprodukovateľnosťou výsledkov predstavovala metóda PCR-SSCP.

7 Zoznam použitej literatúry

1. BARENDSE, W., VAIMAN, D., KEMP, S. J. et al. 1997. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. In: *Mammalian Genome*, vol. 8, 1997, p. 21-28.
2. BARENDSE, W. G. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application No. PCT/AU02/00122. World Intellectual Property Org. Int. Publication No. WO 02/064820 A1.
3. BISHOP, M. D., KOOHMARAIE, M., KILLEFER, J. et al. 1993. Rapid communication: Restriction fragment length polymorphisms in the bovine *calpastatin* gene. In *J. Anim. Sci.* vol. 7, 1993, 1:2277.
4. CAMPBELL, E. M. G., GALLAGHER, D. S., DAVIS, S. K. et al. 2001, Mapping of the bovine stearoyl coenzyme A desaturase (SCD) gene to BTA26. In *J. Anim. Sci.*, vol. 79, 2001, p. 1954-1955.
5. COCKETT, N. E., JACKSON, S. P., SHAY, T. L. et al. 1994. Chromosomal localization of the *callipyge* gene in sheep (*Ovis aries*) using bovine DNA markers. In *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, vol. 91, 1994, p. 3019 – 3023.
6. FARNIR, F., GRISART, B., COPPIETERS, W. et al. 2002. Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revisiting the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14. In *Genetics*, vol. 161, 2002, p. 275-287.
7. FREKING, B. A., MURPHY, S. K., WYLIE, A. A. 2002. Identification of the Single Base Change Causing the Callipyge Muscle Hypertrophy Phenotype, the Only Known Example of Polar Overdominance in Mammals. In *Genome Research*, vol. 12, 2002, p. 1496 – 1506.
8. GAILLARD, C., STRAUSS, F. 1989. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier, In *Nucleic Acids Research*, vol. 18, no.2, 1989, p. 378.
9. GRISART, B., COPPIETERS W., FARNIR F. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. In *Genome Research*, vol. 12, 2002, p. 222–231.
10. IANNUZZI, L., DI MEO, G. P., PERUCATTI, A. et al. 1999. Comparison of the human with the sheep genomes by use of human chromosome-specific painting probes. In *Mamm. Genome.*, vol. 10, 1999, p. 719 – 723.
11. KANAI, N., FUJII, T., SAITO, K. et al. 1994. Rapid and simple method for preparation of genomic DNA from easily obtainable clotted blood. In *J Clin Pathol*, vol. 47, 1994, p. 1043–1044.
12. KILLEFER, J., KOOHMARAIE, M. 1994. Bovine skeletal muscle calpastatin: cloning, sequence analysis, and steady-state mRNA expression. In *J. Anim. Sci.* vol. 72, 1994, p.606-614.
13. KIM, Y. C., NTAMBI, J. M. 1999, Regulation of stearoyl-CoA desaturase genes: role in cellular metabolism and preadipocyte differentiation, In *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 266, 1999, p. 1–4.
14. KUBIAK-JUSZCZUK E., SAKOWSKI T., FLISIKOWSKI K. 2004. Bovine μ -calpain (CAPN1) gene: new SNP within intron 14. In *J.Appl.Genet.* vol. 45(4), 2004, p. 457-460.
15. 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 Res.* vol.16, 1988, p. 1215.
16. PAGE, B. T., CASAS, E., HEATON, M. P. et al. 2002. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. In *Journal of Animal Science*, vol. 80,2002, p. 3077–3085.
17. PALMER, B. R., ROBERST, N., HICKFORD, H. G. J. et al. 1998. Rapid communication: PCR-RFLP for *Msp* I and *Nco* I in the ovine calpastatin gene. In *J. Anim. Sci.*, vol. 76, 1998, p. 1499-1500.
18. RINCON, G., MEDRANO, J. F. 2006. Assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in the bovine CAPN1 gene. In *Animal genetics* 2006, vol. 37(3), 2006, p. 294-295.
19. 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.
20. SCHENKEL, F. S., MILLER, S. P., JIANG, Z. et al. 2006. Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. In *Journal of Animal Science*, vol. 84, 2006, p. 291–299.

21. SMITH, T.P.L., CASAS, E., REXROAD III, C.E. et al. 2000. Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. In *J. Animal Science*, vol. 78, 2000, p. 2589–2594.
22. TANIGUCHI, M., UTSUGI, T., OYAMA, K. et al. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. In *Mamm. Genome*, vol. 15, 2004, p. 142–148.
23. THALLER, G., KUHN, C., WINTER, A. et al. 2003. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. In *Anim. Genet.*, vol. 34, 2003, p. 354–357.
24. VAN EENENNAAM, A. L., LI, J., THALLMAN, R. M. et al, 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. In *Journal of Animal science*, vol. 85 (4), 2007, p. 891-900.
25. WHITE, S. N., CASAS, E., WHEELER T. L. et al. 2005. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of *Bos indicus*, *Bos taurus*, and crossbred descent. In *J. Animal Science*, vol. 83, 2005, p. 2001–2008.
26. WINTER A., KRÄMER W., WERNER F.A.O. et al. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. In *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, vol. 99, 2002, 9300-9305.
27. YE, S., DHILLON, S., KE, X. et al. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. In *Nucleic Acids Research*, vol. 29, 2001, p.17– 88.
28. YOU, M. F., HOU, N. H., GU, Q. Y. et al. 2008. BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design, In *BMC Bioinformatics*, vol.9, 2008, p. 253, Dostupné na internete: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/9/253>
29. ZHANG, H.M., DENISE, S.K., AX, R.L. 1996: Rapid communication: A novel DNA polymorphism of the bovine calpain gene detected by PCR-RFLP analysis. In *Journal of Animal Science*, vol.74,1996,p.1441.
30. ZHOU, H., HICKFORD, H. G. J., FANG, Q. 2006. A two-step procedure for extracting genomic DNA from dried blood spots on filter paper for polymerase chain reaction amplification. In *Analytical Biochemistry*, vol. 354 , 2006, p. 159–161.

8 Zoznam publikovaných prác autora súvisiacich s riešenou problematikou

1. MILUCHOVÁ, M., **GÁBOR, M.**, TRAKOVICKÁ, A.: Polymorfizmus prion proteinového génu u vybranej populácie hovädzieho dobytku. In: Acta fytotechnica et zootechnica, SPU v Nitre, roč. 9, 2006, č. Mimoriadne číslo, s. 11-13, ISSN 1335-258X.
2. **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. 10, s. 23-26, ISSN 1335-258X.
3. **GÁBOR, M.**, TRAKOVICKÁ, A.: Analýza polymorfizmu TG5 génu hovädzieho dobytku metódou PCR-RFLP. In: II. Vedecká konferencia doktorandov s medzinárodnou účasťou pri príležitosti 1. ročníka Veľtrhu VEDA – VZDELÁVANIE – PRAX a Európskeho týždňa vedy, Nitra : SPU, 2007, s. 174-177, ISBN 978-80-8069-959-8.
4. 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, Abstrakt článku je uverejnený v časopise Journal of Central European agriculture na s. 84 : ISBN 978-80-8069-961-1
5. **GÁBOR, 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.
6. MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., **GÁBOR, M.**: Analysis of polymorphism of alpha S1 casein of beef cattle by ARMS PCR. In: II. Polski Kongres Genetyki, Warszawa, 2007, p. 237.
7. **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 : Technická univerzita Zvolen, 2007, s. 149-154, ISBN 978-80-228-1789-9
8. **GÁBOR, M.**, TRAKOVICKÁ, A., MILUCHOVÁ, M.: Analysis of polymorphism of CAST

- gene in breeds of Slovak Pinzgau cattle and Charolais by PCR-RFLP method. In: Acta Biochimica Polonica, vol. 55, Supplement 4, Abstracts of the Central European Congress of Life Sciences „EUROBIOTECH 2008“, Kraków Poland, 17.-19.10.2008, p. 126, ISSN 0001-527X.
9. MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., **GÁBOR, M.**: Analysis of polymorphism of beta lactoglobulin of sheep by PCR-RFLP. In: Acta Biochimica Polonica, vol. 55, Supplement 4, Abstracts of the Central European Congress of Life Sciences „EUROBIOTECH 2008“, Kraków Poland, 17.-19.10.2008, p. 129, ISSN 0001-527X.
 10. **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 : Jihočeská univerzita, 2008, part 1, s. 117-119, ISBN 80-85645-58-0.
 11. **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 : Jihočeská univerzita, 2008, part 1, s. 121-123, ISBN 80-85645-58-0.
 12. MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., **GÁBOR, M.**: Identifikácia LGB génu hovädzieho dobytky metódou PCR – RFLP. In: Biotechnology 2008, [elektronický zdroj], České Budějovice 13.-14.2.2008, České Budějovice : Jihočeská univerzita, 2008, part 1, s. 257-259, ISBN 80-85645-58-0.
 13. MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., **GÁBOR, M.**: Identifikácia génu CSN3 hovädzieho dobytky metódou PCR – RFLP. In: Biotechnology 2008, [elektronický zdroj], České Budějovice 13.-14.2.2008, České Budějovice : Jihočeská univerzita, 2008, part 1, s. 261-263, ISBN 80-85645-58-0.
 14. **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.
 15. MILUCHOVÁ, M., **GÁBOR, M.**, TRAKOVICKÁ, A.: Analýza polymorfizmu génu beta laktoglobulínu v populácii slovenského pinzgauského dobytky 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.
 16. **GÁBOR, M.**, TRAKOVICKÁ, A., MILUCHOVÁ, M.: POLYMORPHISM OF STEAROYL-COENZYME A DESATURASE GENE IN SLOVAK PINZGAU CATTLE. In: Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii, [elektronický zdroj], Scientifical papers Faculty of Animal Sciences and Biotechnologies, Timisoara, roč. 42, 2009, č. 2, s. 249-254, ISSN 1221-5287.
 17. MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., **GÁBOR, M.**: ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF ALPHA S1 CASEIN OF SLOVAK PINZGAU CATTLE BY PCR-RFLP. In: Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii, [elektronický zdroj], Scientifical papers Faculty of Animal Sciences and Biotechnologies, Timisoara, roč. 42, 2009, č. 2, s. 284-287, ISSN 1221-5287.
 18. MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., **GÁBOR, M.**: ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF BETA CASEIN OF SLOVAK PINZGAU CATTLE BY PCR-RFLP FOR ALLELS A1 AND A2. In: Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii, [elektronický zdroj], Scientifical papers Faculty of Animal Sciences and Biotechnologies, Timisoara, roč. 42, 2009, č. 2, s. 288-292, ISSN 1221-5287.
 19. **GÁBOR, M.**, TRAKOVICKÁ, A., MILUCHOVÁ, M.: ANALYSIS OF POLYMORPHISM OF CAST GENE AND CLPG GENE IN SHEEP BY PCR-RFLP METHOD. In: Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii, [elektronický zdroj], Scientifical papers Faculty of Animal Sciences and Biotechnologies, Timisoara, roč. 42, 2009, č. 2, s. 470-476, ISSN 1221-5287.
 20. **GÁBOR, M.** – TRAKOVICKÁ, A. – MILUCHOVÁ, M.: Identifikácia dvoch SNP markerov *CAPN316* a *CAPN4751* kandidátskeho génu *CAPN1* pre jemnosť mäsa hovädzieho dobytky metódou ARMS-PCR. In: Acta fytotechnica et zootechnica, SPU v Nitre, roč. 12, 2009, č. Mimoriadne číslo, s. 178-184, ISSN 1335-258X. Abstrakt článku je uverejnený v zborníku IV. vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou „Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín“, Nitra 27.1.-28.1.2009, s. 29.
 21. **GÁBOR, M.**, TRAKOVICKÁ, A., MILUCHOVÁ, M.: Využitie variability cytochrómu B pri identifikácii živočíšnych druhov pomocou metódy PCR-RFLP. In: Acta fytotechnica et zootechnica, SPU v Nitre, roč. 12, 2009, č. Mimoriadne číslo, s. 185-190, ISSN 1335-258X. Abstrakt článku je uverejnený v zborníku IV. vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou „Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín“, Nitra 27.1.-28.1.2009, s. 30.

22. MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., **GÁBOR, M.:** Identifikácia CSN2 génu hovädzieho dobytku metódou ARMS PCR. In: Acta fytotechnica et zootechnica, SPU v Nitre, roč. 12, 2009, č. Mimoriadne číslo, s. 447-449, ISSN 1335-258X. Abstrakt článku je uverejnený v zborníku IV. vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou „Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín“, Nitra 27.1.-28.1.2009, s. 56-57.
23. MILUCHOVÁ, M., TRAKOVICKÁ, A., **GÁBOR, M.:** Molekulárno-genetická detekcia génov CSN3 a LGB v populácii slovenského pinzgauského plemena metódou MULTIPLEX PCR-RFLP. In: Acta fytotechnica et zootechnica, SPU v Nitre, roč. 12, 2009, č. Mimoriadne číslo, s. 450-454, ISSN 1335-258X. Abstrakt článku je uverejnený v zborníku IV. vedecká konferencia s medzinárodnou účasťou „Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín“, Nitra 27.1.-28.1.2009, s. 57.