



ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

ŽIVOČIŠNÁ VÝROBA

Animal Production

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

5

VOLUME 42 (LXX)
PRAHA
KVĚTEN 1997
CS ISSN 0044-4847

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření České akademie zemědělských věd a s podporou Ministerstva zemědělství České republiky

An international journal published by the Czech Academy of Agricultural Sciences and with the promotion of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic

REDAKČNÍ RADA – EDITORIAL BOARD

Předseda – Chairman

Ing. Vít Prokop, DrSc. (Výzkumný ústav výživy zvířat, Pohořelice, ČR)

Členové – Members

Prof. Ing. Jozef Bulla, DrSc. (Výzkumný ústav živočišnej výroby, Nitra, SR)

Doc. Ing. Josef Čerovský, DrSc. (Výzkumný ústav živočišné výroby Praha, pracoviště Kostelec nad Orlicí, ČR)

Prof. Dr. hab. Andrzej Filistowicz (Akademia rolnicza, Wroclaw, Polska)

Ing. Ján S. Gavora, DrSc. (Centre for Food and Animal Research, Ottawa, Ontario, Canada)

Dr. Alfons Gottschalk (Bayerische Landesanstalt für Tierzucht, Grub, BRD)

Ing. Július Chudý, CSc. (Vysoká škola poľnohospodárska, Nitra, SR)

Dr. Ing. Michal Ivan, DrSc. (Centre for Food and Animal Research, Ottawa, Ontario, Canada)

Prof. Ing. MVDr. Pavel Jelínek, DrSc. (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, ČR)

Prof. Dr. Ing. Ivo Kolář, CSc. (VÝŽV Nitra, Stanica chovu a šľachtenia oviec a koz, Rapotín, ČR)

Ing. Jan Kouřil (Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický Jihočeské univerzity, Vodňany, ČR)

Prof. Ing. František Louda, DrSc. (Česká zemědělská univerzita, Praha, ČR)

Prof. Ing. Josef Mácha, DrSc. (Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, ČR)

RNDr. Milan Margetin, CSc. (VÚŽV Nitra, Stanica chovu a šľachtenia oviec a koz, Trenčín, SR)

Dr. Paul Millar (BRITBREED, Edinburgh, Scotland, Great Britain)

Ing. Ján Poltársky, DrSc. (Výzkumný ústav živočišnej výroby, Nitra, SR)

Ing. Antonín Stratil, DrSc. (Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Liběchov, ČR)

Ing. Pavel Trefil, CSc. (Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha-Uhřetěves, ČR)

Vedoucí redaktorka – Editor-in-Chief

Ing. Marie Černá, CSc.

Cíl a odborná náplň: Časopis publikuje původní vědecké práce a studie typu review z oblasti genetiky, šlechtění, fyziologie, reprodukce, výživy a krmení, technologie, etologie a ekonomiky chovu skotu, prasat, ovcí, koz, drůbeže, ryb a dalších druhů hospodářských zvířat.

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences a v časopise Animal Breeding Abstracts. Abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 42 vychází v roce 1997.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Marie Černá, CSc., vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 34 89, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Den doručení rukopisu do redakce je publikován jako datum přijetí k publikaci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1997 je 672 Kč.

Aims and scope: The journal publishes scientific papers and reviews dealing with the study of genetics and breeding, physiology, reproduction, nutrition and feeds, technology, ethology and economics of cattle, pig, sheep, goat, poultry, fish and other farm animal management.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences and abstracted in Animal Breeding Abstracts. Abstracts from the journal are comprised in the databases: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 42 appearing in 1997.

Acceptance of manuscripts: Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Marie Černá, CSc., editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 34 89, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. The day the manuscript reaches the editor for the first time is given upon publication as the date of reception.

Subscription information: Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1997 is 170 USD (Europe), 177 USD (overseas).

RELATIONSHIP BETWEEN DAILY MILK YIELD AND PERSISTENCY OF HUNGARIAN HOLSTEIN FRIESIAN CATTLE THROUGH SELECTION INDEX AND SUBINDICES

ZÁVISLOST MEZI DENNÍ DOJIVOSTÍ A PERZISTENCÍ LAKTACE U MAĎARSKÉHO HOLŠTÝNSKO-FRÍSKÉHO SKOTU STANOVENÁ POMOCÍ SELEKČNÍCH INDEXŮ A DÍLČÍCH INDEXŮ

Ashraf A. Amin, S. Tóth, T. Gere

Gödöllő University, Gyöngyös College of Agriculture, Department of Animal Production, Gyöngyös, Hungary

ABSTRACT: Maximum likelihood procedures were used for the analysis of relationships between persistency and daily milk yield performance. Genetic and phenotypic (co)variances were generated from this analysis to construct full and reduced selection indices, selection subindices and reduced selection subindices. The structure of the data were half-sib families of 281 sire groups, lactation records in each group ranged between 12–24 records. Expected genetic gain in daily milk yield by selection subindices was similar to the corresponding value calculated by selection index, so the breeder can use selection subindices in the breeding program to improve the daily milk yield. Contribution of persistency to the improvement in daily milk yield was higher by the subindex than the selection index. The highest improvement of persistency was associated with the maximum improvement in daily milk yield per lactation and per calving interval and was achieved by the selection index which involved all these traits.

Hungarian Holstein Friesian cattle; daily milk yield; persistency of lactation; selection index; subindices

ABSTRAKT: K analýze závislosti mezi perzistencí laktace a denní dojivostí byla použita metoda maximální věrohodnosti. Na základě této analýzy byly vytvořeny genetické a fenotypové (ko)variance za účelem konstrukce úplných a redukováných selekčních indexů, dílčích selekčních indexů a redukováných dílčích selekčních indexů. Použity byly údaje o polosourodneckých rodinách pocházejících od 281 skupin otců, přičemž údaje o laktacích obsahovaly 12 až 24 záznamů v každé skupině. Očekávaný genetický zisk pro denní dojivost podle selekčních dílčích indexů byl obdobný jako odpovídající hodnota vypočítaná podle selekčního indexu. Z toho vyplývá, že dílčí selekční indexy mohou být ve šlechtitelském programu využívány pro zvýšení denní dojivosti. Příspěvek perzistence laktace ke zvýšení denní dojivosti byl vyšší podle dílčího indexu než podle selekčního indexu. Největší zlepšení perzistence laktace souviselo s maximálním zvýšením denní dojivosti za laktaci a mezidobí a bylo dosaženo na základě selekčního indexu, který zahrnoval všechny tyto znaky.

maďarský holštýnsko-fríský skot; denní dojivost; perzistence laktace; selekční index; dílčí selekční indexy

INTRODUCTION

Cow persistency in dairy cattle herds is one of the important traits and plays a major role in improvement of daily and total milk yield in dairy enterprises. Therefore the breeders should consider the persistency of cows in selection of the cow. In this respect, the genetic and nongenetic factors play an active role in affecting lactation persistency. Overall means of persistency reported in most Hungarian studies were 74.78% by Szücs et al. (1989), 90.4% by Mostafa et al. (1989) and from 70 to 81% by Sölkner and Fuchs (1987). All these authors also reported a significant effect of nongenetic factors on persistency. Sölkner and Fuchs (1987) mentioned that the

heritability of persistency ranged from 0.14 to 0.21 and was lower in the first lactation than in the later ones. The opposite trend of this heritability was reported by Mostafa (1991). Most studies in Hungary found that persistency is a trait with sufficient genetic variation and can therefore be improved by selection indices. The aim of the present study is to evaluate the differences in expected genetic gain in daily milk yield per lactation and other daily yield traits (daily milk yield per calving interval, peak daily milk yield and persistency) due to different contribution and involving these traits in different indices. Comparison between expected genetic changes in daily milk yield per lactation by selection index and subindices to evaluate the importance of economic weight.

MATERIALS AND METHODS

Data: The structure of data in the present study is composed of 8 741 lactation records of 1 592 Holstein Friesian cows, 281 sires in 8 parities. The data were collected from two herds in a period from 1983 to 1993. The traits included are DML – daily milk yield per lactation (total milk yield divided by lactation duration), DMCI – daily milk yield per calving interval (total milk yield divided by calving interval), PDM – peak daily milk yield (estimated from monthly recorded test) and Prs – persistency.

Statistical analysis: Maximum likelihood procedure was used to perform analysis of variance. For the least-squares analysis of variance, the following linear model was used as given in Eq.1:

$$y = X \cdot b + Z \cdot u + e \quad (1)$$

where: y – vector of n observations
 X and Z – known incidence matrices
 b – unknown vector of solutions for fixed herd-year-month of calving
 u – unknown vector of random effects of sires
 e – unknown vector of random residual, normally and independently distributed.

The linear system of equations was

$$\begin{bmatrix} X'X & \dots & X'Z \\ Z'X & \dots & Z'Z + I \cdot \sigma_e^2/\sigma_s^2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{b} \\ \hat{u} \end{bmatrix} = \dots = \begin{bmatrix} X'Y \\ Z'Y \end{bmatrix}$$

where: σ_s^2 – sire variance
 σ_e^2 – error variance in the population

Economic weights: The economic values in the present study were formulated on the basis of personal communications with several dairy farm managers. Calculation of economic weights followed the methods mentioned by Khattab, Sultan (1991), and by Amin et al. (1996a, b). Net profit of all traits was calculated as differences between total cost of production (feeding, animal management and others) and selling price on the farm.

1) Economic weight of milk yield: Feeding costs of production 10 kg milk with 2.8% fat (base of marketing milk) are 160 Ft (estimated by dairy farm managers). The amount of labour which is required to produce 10 kg milk is 0.15 hour and the price of one hour labour (machine work, workers, etc.) is 733.3 Ft. Therefore the labour cost/10 kg milk is $733.3 \times 0.15 = 110$ Ft. Actual miscellaneous units which are required to produce 10 kg milk is one unit, and the cost of one miscellaneous unit is 80 Ft. Total costs of production of 10 kg milk therefore (160 {feed cost} + 110 {labour} + 80 {miscellaneous}) = 250 Ft and so for 1 kg it is 25 Ft. 31 Ft is the selling price of 1 kg milk, then the net profit of 1 kg milk is $31 - 25 = 6.00$ Ft.

2) Amin et al. (1996b) analysing the daily milk yield records of Holstein Friesian in Hungary, calculated the regression coefficients of total milk yield on DML, DMCI, PDM and Prs as 0.09, 0.16, 0.05, and

0.09 kg. Economic weights of DML, DMCI, PDM and Prs were calculated by multiplication of their regression coefficients by the net income of kg milk (6.00 Ft). Thus the values of DML, DMCI, PDM and Prs were 0.54, 0.96, 0.30 and 0.54 Ft, respectively. However, several authors have concluded that the efficiency of index selection is not very sensitive to changes in economic weights (Vandepitte, Hazel, 1977; Lin, 1978).

Selection index parameters: Selection index (I) is a linear combination of phenotypic values of traits of interest. The selection index, therefore, can be expressed as Eq. 2:

$$I = \sum_{i=1}^n b_i X_i \quad (2)$$

where: X – phenotypic value of each trait
 n – number of traits
 b – partial regression coefficient

A modification of Hazel's (1943) method, as suggested by Henderson (1951) allows to construct selection indices where the economic value of traits was used for construction. The selection subindex can be constructed like this (Eq. 2.1):

$$I = \sum_{i=1}^n a_i I_i \quad (2.1)$$

where: a – relative economic value
 I – full index
 I_i – selection subindex

General formula of the selection subindex is in Eq. 2.2, where b_{ij} 's are subindex partial regression coefficients:

$$I = \sum_{i=1}^n b_{ij} X_j \quad (2.2)$$

which were obtained from the solution of Eq. 2.3:

$$\sum_{i=1}^n b_{ij} \sigma X_{ij} = \sum_{i=1}^n \sigma G_{ij} \quad (2.3)$$

where: σX_{ij} and σG_{ij} – phenotypic and genetic covariances between traits

The expected change in the total genotype (ΔH) and genetic change per trait (Δh) under selection were computed as given in Eq. 3.1 and Eq. 3.2:

$$\Delta H = s \sigma I \quad (3.1)$$

$$\Delta h_i = s \left\{ \sum_{j=1}^n b_j G_{ij} / \sigma I \right\}, j = 1, 2, \dots, n \dots \quad (3.2)$$

where: s – selection intensity (assume selection differential as one standard deviation)
 σI – index standard deviation
 b_j and G_{ij} – elements of the partial regression coefficients vector and genetic covariance matrix

The partial regression coefficients (β) of the reduced selection index and reduced subindex were computed like in Eq. 4:

$$\mathfrak{S}\beta = \mathfrak{R}_0 \quad (4)$$

where: \mathfrak{S} - $(n-1) \times (n-1)$ matrix of phenotypic generated values from a full matrix (which included n traits) after deleting the i -th row and j -th column

\mathfrak{R}_0 - $(n-1)$ vector obtained by deleting the i -th row of multiplying the genetic matrix by the economic weight vector

The correlation between the reduced index and the full index (T) of breeding value is in Eq. 5:

$$r_{Tf^*} = \sqrt{\sigma^2 I^* / \sigma^2 T} \quad (5)$$

The variance of the reduced indices ($\sigma^2 I_i^*$) obtained by ignoring each source of information can be computed by Eq. 5.1:

$$\sigma^2 I_i^* = \sigma^2 I - b_i' / w_{ii} \quad (5.1)$$

where: b_i' - i -th weighting factor in the full index
 w_{ii} - corresponding diagonal element in the inverse of the phenotypic variance-covariance matrix

The variance of the reduced index can be obtained by omitting more than one trait (i, j) from full index by Eq. 5.2:

$$\sigma^2 I_{i, j}^* = \sigma^2 I - b_{i, j}' / w_{i, j} \quad (5.2)$$

The reduction (VV) in the accuracy of full index due to omitting a source of information can be calculated by Eq. 6:

$$VV = \{(\sigma^2 I)^{0.5} - (\sigma^2 I - b_i' / w_{ii})^{0.5}\} / (\sigma^2 I)^{0.5} \quad (6)$$

The relative efficiency of the reduced index to full index can also be measured by Eq. 7:

$$RE = \{(\sigma^2 I)^{0.5} - b_i' / w_{ii}\} / (\sigma^2 I)^{0.5} \quad (7)$$

RESULTS AND DISCUSSION

Least squares means and analysis of variance:

Tab. I shows that the overall means of daily milk yield per lactation, per calving interval, persistency and peak daily milk yield were 23.5 kg, 16.2 kg, 72%, and 45.2 kg, respectively. Average daily milk yield per calving interval in investigations of Vaccaro et al. (1990) and Jadhav et al. (1991) were 9.0 ± 0.3 kg and 8.85 ± 0.4 kg, respectively, and lower than that calculated in this study. In case of fixed effects (herd year-month of calving and parity), the highest difference obtained between the two herds was in DML 5.6 kg, in PDM 7.4 kg, and in Prs 4.1%, and between the 8th and 5th parity in DMCI 2.0 kg. The present study is in agreement with most Hungarian studies that have reported a decline in persistency with increasing lactation number (Sölkner, Fuchs, 1987; Mostafa et al., 1989; Szücs et al., 1989). Least squares analysis of variance for all fixed effects is significant in most cases except the herd effect. This result indicates clearly that indices showing the highest genetic gain herein can help the managers of the two farms involved in this study to attain an economic breeding strategy to improve their dairy profitability.

Genetic and phenotypic parameters: All genetic and phenotypic parameters are presented in Tab. II. Heritability of persistency that is reported herein is lower than that reported by Mostafa (1991) but it is in agreement with that reported by Sölkner and Fuchs (1987) in a recent Hungarian study. Also heritability of DML in the present study is lower than that reported by Mostafa (1991). All genetic correla-

I. Least squares means (minimum and maximum) and significant differences in investigated traits

		Class DML	Class DMCI	Class PDM	Class Prs
Overall		23.5	16.2	45.2	72.0
Farm (F)	P		*		
	min.	F1: 20.7	F2: 15.6	F1: 41.5	F1: 69.9
	max.	F2: 26.3	F1: 16.7	F2: 48.9	F2: 74.0
Calving months	P				
	min.	Oct: 21.9	Dec: 15.8	Sep: 44.4	Aug: 69.9
	max.	Jun: 24.9	Feb: 16.5	Jan: 45.6	Nov: 73.3
Calving year	P				
	min.	1992: 21.5	1989: 15.3	1983: 44.5	1987: 70.2
	max.	1983: 25.1	1984: 17.0	1989: 45.5	1983: 73.6
Parity (Pr)	P				
	min.	Pr3: 24.4	Pr8: 14.7	Pr1: 42.4	Pr1: 70.4
	max.	Pr1: 20.7	Pr5: 16.7	Pr8: 47.4	Pr8: 73.8
Regression	P	0.09 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.05 ± 0.001	0.09 ± 0.001

DML - average daily milk yield per lactation, DMCI - average daily milk yield per calving interval, PDM - peak daily milk, Prs - persistency of lactation yield

Significance: in the table all estimates without superscript symbols are highly significant

* $P < 0.05$, ns - not significant

II. Heritabilities (on diagonal), genetic correlations (below diagonal) and phenotypic correlations (above diagonal) for investigated traits

	DML	DMCI	PDM	Prs
DML	0.21	0.45	0.17	0.18
DMCI	0.78	0.39	0.34	0.20
PDM	0.53	0.69	0.26	0.20
Prs	0.54	0.92	0.94	0.22

Other abbreviations see Tab. I

tions between DML and other traits which were investigated herein ranged from 0.17 to 0.45. Weak phenotypic relationships were obtained between DML and both PDM and Prs (0.17 and 0.18) while a moderate phenotypic correlation between DML and DMCI (0.45). Maximum estimated genetic correlation herein was obtained between PDM and Prs (0.92) and minimum between DML and PDM (0.53). Mostafa (1991) reported that the phenotypic correlation between DML and PDM was 0.80. The results by Mostafa (1991) are in disagreement with results of the present study. This may be due to differences in the additive genetic covariance between these traits in the period before and after 1992.

Selection indices: Partial regression coefficients for full (I_1) and reduced selection indices (from $I_{1,1}$ to $I_{1,6}$) and full (I_2) and reduced selection subindices (from $I_{2,1}$ to $I_{2,3}$) were presented in Tabs. III and IV. Differences in weighting factors (b_i) between the types of indices were not great. These coefficients were lower than those reported by Amin et al. (1996b) to improve total milk yield. All coefficients of selection subindices to improve DML were lower than the corresponding ones in full or reduced selection indices. This is a consequence of omission of economic weights in the selection subindices.

Expected genetic gain in all traits generated by full and reduced selection indices ranged from 0.27 to 1.19 kg in DML, from 0.23 to 1.13 kg in DMCI, from 0.20 to 0.41 kg in PDM and from 0.33 to 1.69 % in Prs per generation (Tab. III). The highest expected gain in DML, DMCI and Prs was achieved by omitting PDM in the full selection index (Fig. 1). This may be due to zero or lower proportion of economic weight of PDM. The highest prediction in PDM was achieved by full index or omitting Prs from the full index (Fig. 1). Expected improvement of average daily gain was 1.16 kg/generation as the highest estimation by omitting PDM from full index and then by omitting both PDM and Prs (0.82 kg/day/generation). Contribution of Prs to the im-

III. Full and reduced selection indices parameters for investigated traits

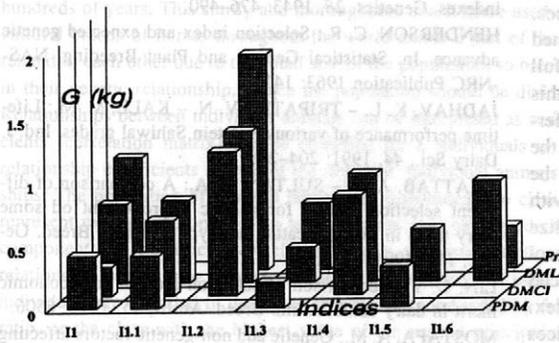
I		DML	DMCI	PDM	Prs	ADG	RE%	A
Full index								
I_1	b	0.0571	0.1913	0.0782	0.0498			
	Δh	0.62	0.23	0.41	0.89	0.42	100	65
	VV%	82	37	66	73			
Reduced indices								
$I_{1,1}$	b	0.0361	0.1538	0.0720				
	Δh	0.65	0.59	0.41		0.55	131	45
	VV%	87	38	72				
$I_{1,2}$	b	0.0598	0.1878		0.0520			
	Δh	1.19	1.13		1.69	1.16	276	24
	VV%	91	61					
$I_{1,3}$	b	0.0591		0.0608	0.0445			
	Δh	0.27		0.20	0.52	0.24	57	75
	VV%	82		68				
$I_{1,4}$	b	0.0971	0.2201					
	Δh	0.85	0.78			0.82	195	31
	VV%	97	63					
$I_{1,5}$	b	0.1025		0.0896				
	Δh	0.41		0.32		0.36	86	55
	VV%	73		75				
$I_{1,6}$	b	0.0521			0.0623			
	Δh	0.79			0.33	0.56	133	45
	VV%	99			89			

ADG – average daily gain, RE% – relative efficiency, A – accuracy of indices, b – partial regression coefficients, Δh – expected genetic gain in full and reduced selection index, VV% – trait contribution to own expected gain. Other abbreviations see Tab. I

IV. Full and reduced selection subindices parameters to improve daily milk yield per lactation

		DML	DMCI	PDM	Prs	ΔH	A	RE%
I_2	<i>b</i>	0.0275	0.0341	0.0011	0.0169	0.67	84	100
	VV%	43	1.2	9	12			
$I_{2,1}$	<i>b</i>	0.0209	0.1165	0.1106		0.67	53	100
	VV%	23	0.7	21				
$I_{2,2}$	<i>b</i>	0.0281	0.1106		0.0067	0.67	43	100
	VV%	19	1.9		33			
$I_{2,3}$	<i>b</i>	0.0563		0.0331	0.0151	0.51	67	76
	VV%	55		6.3	17			
	ADG					0.62		

ADG – average daily gain, RE% – relative efficiency, A – accuracy, *b* – partial regression coefficients, ΔH – expected genetic gain in full and reduced selection subindices, VV% – trait contribution in their expected gain. Other abbreviations see Tab. I



1. Expected genetic gain (*G*) in persistency and daily milk yield traits by full (I_1) and reduced ($I_{1,1}$... $I_{1,6}$) selection indices (structure of the indices see Tab. III)

provement ranged from 73% to 89% and was associated with changes in corresponding estimates in DML. Changes in expected genetic gain in DML with removing Prs from the full index were +0.03 kg (differences between I_1 and $I_{1,1}$), while removing Prs and PDM together increased the expected gain in DML by 0.23 kg (differences between I_1 and $I_{1,4}$). Omitting Prs and DMCI was the only case when reduction took place in the expected genetic gain of DML by 0.21 kg compared with the full index. Involving Prs in the index was not effective to improve DMCL because omitting Prs from full index increased changes in expected gain of DMCI by 0.36 kg (differences between I_1 and $I_{1,1}$) and, omitting Prs + PDM in the full index initiated a change in expected genetic gain in DMCI by +0.55 kg (differences between I_1 and $I_{1,4}$). Dropping Prs from the full index was not important to improve PDM, while a slight reduction (-0.09 kg) in expected gain of PDM was observed with removing both Prs and DMCI together from the full index.

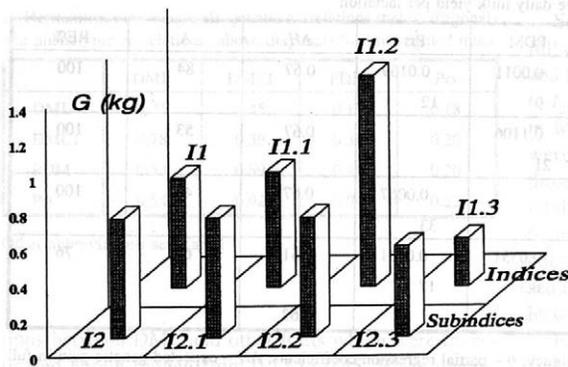
Contribution of DML to the expected gains in different indices was not lower than 73% in case of omitting both DMCI and Prs. On the other hand 99% of reduction in predicted gains of DML would occur if this trait has been removed from the reduced index $I_{1,6}$. This indicates that DML itself is the best source of information to improve DML as shown in all indices (VV%) in Tab. III. Estimates of trait contribution in

case of DMCI were lower than the contribution of other traits in all indices. This indicates the expected gain in DMCI depends on the presence or absence of other traits in the index too. Omitting both PDM and Prs increases the contribution of DMCI to the improvement.

Relative efficiency (RE%) of all indices compared with full index was presented in Tab. III. All reduced indices had higher efficiency in expected gains than the full index except in case of omitting DMCI or DMCI and Prs together. Maximum relative efficiency was associated with maximum expected gain in DML, DMCI and Prs and also in average daily gain (ADG).

The amount of realized gains could be expected through estimation of index accuracy. Realized gains can be obtained with accuracy more than 50% in case of full indices, omitting either DMCI, or both DMCI and Prs. Other indices had low accuracies in gains. The best combination between the highest expected gain in ADG and the accuracy of index was shown in the full selection index. Therefore, the index suggested herein to improve each individual trait (DML, DMCI, PDM or Prs) and average daily gain (ADG) is the full index.

Selection subindices: Tab. IV shows expected genetic gains in DML by full and reduced selection subindices. Overall mean of gain in DML by all subindices was 0.63 kg and was not different from full selection index (0.62 kg). This indicates that under continuous market economic changes breeders can select according



2. Expected genetic gain (G) in daily milk yield by full and reduced selection indices ($I_1 \dots I_{1,3}$) and subindices ($I_2 \dots I_{2,3}$)

to the method of selection index without using any weights by constructing separate selection subindices. Individual comparison between gains in DML attained by either full and reduced indices or corresponding full and reduced subindices can be seen in Fig. 2. From this figure it can be concluded that there is a greater difference within the full and reduced indices than within the full and reduced subindices. The highest gain can be achieved by $I_{1,2}$ but this gain can be realized only with accuracy of 24% (Tab. II). The best subindex to realize the expected gain in DML is the full subindex by accuracy 84% and the poorest one (43%) is the reduced subindex by omitting PDM from the full subindex. Contribution of DML to improve itself by subindices was lower than by the corresponding selection index. The estimates of VV show that the role of Prs in improvement of DML by subindex was greater than that of other traits in the same index (Tab. IV). Maximum improvement in DML by using subindex can be achieved by using information on all traits which were investigated in full subindex or if not more than one trait is absent from full subindex except for trait DMCI.

REFERENCES

AMIN, A. A. – TÓTH, S. – GERE, T.: Selection indices for milk and fat yield based on age at first mating and calving under Hungarian conditions. *Arch. Tierz.*, 39, 1996a: 28–32.
 AMIN, A. A. – TÓTH, S. – GERE, T.: Full multi-traits, reduced and restricted selection indices for improvement of milk yield composition involving relationships with productive and reproductive periods. *Állatteny. Takarm.*, 1996b (in press).
 GÁSPÁRDY, A. – BOZÓ, S. – DOHY, J.: Performance comparison of Hungarofries, Black Pied dairy cattle (SMR) and Holstein Friesian breeds in Hungary. *Arch. Tierz.*, 38, 1995: 247–262.

HAZEL, L. N.: The genetic basis for constructing selection indexes. *Genetics*, 28, 1943: 476–490.
 HENDERSON, C. R.: Selection index and expected genetic advance. In: *Statistical Genetic and Plant Breeding*. NAS-NRC Publication 1963: 141.
 JADHAV, K. L. – TRIPATHI, V. N. – KALE, M. M.: Lifetime performance of various Holstein Sahiwal grades. *Ind. J. Dairy Sci.*, 44, 1991: 204–208.
 KHATTAB, A. S. – SULTAN, Z. A.: A comparison of different selection indices for genetic improvement of some dairy traits in Friesian cattle in Egypt. *J. Anim. Breed. Genet.*, 108, 1991: 349–354.
 LIN, C. Y.: Comparison of selection indexes for economic merit in dairy cattle. *Anim. Breed. Abstr.*, 45, 1978: 6506.
 MOSTAFA, A. M.: Genetic and non-genetic factors affecting production and reproduction traits in dairy cattle. [Dissertation of Ph.D.] Gödöllő, Hungary, 1991. – Institute of Anim. Prod.
 MOSTAFA, A. M. – GERE, T. – UGRI, K. – CSIBA, A. – ÁCS, I. – SZÜCS, E.: Studies of production and reproduction traits of HF, Hungarian F. and Hungarian Fleckvieh x Meuse-Rhine-Yessel crossbred cows in Hungary. 1. Factors affecting 305MY, fat content and fat production. In: 40th Ann. Meet. of the EAAP, Dublin, Ireland, 27–31 August 1989.
 SÖLKNER, J. – FÜCHS, W.: A comparison of different measures of persistency with special respect to variation of test-day milk yields. *Livestock Prod. Sci.*, 16, 1987: 305–319.
 SZÜCS, E. – KORNEL, U. – ÁCS, I. – ÁBRAHÁM, M.: A note to the relation system of production and reproduction traits in dairy and dual purpose cattle. In: 40th Ann. Meet. of the EAAP, Dublin, Ireland, 27–31 August 1989.
 VACCARO, R. T. – GHACK, S. A. – SHONG, A. D.: Estimation of genetic (co)variance for total milk yield in first three lactations. *J. Indian Dairy Sci.*, 70, 1990: 842–849.
 VANDEPITTE, W. M. – HAZEL, L. N.: The effect of errors in the economic weights on the accuracy of selection indices. *Ann. Genet. Select. Anim.*, 9, 1977: 87.

Received for publication on October 18, 1996

Contact Address:

Ashraf A. Amin, Gödöllő University, Gyöngyös College of Agriculture, Department of Animal Production, H-3200 Gyöngyös, Matrái ut 36, Hungary, tel.: 0036/37/31 18 71, fax: 0036/37/31 42 34

SHLUKOVÁNÍ KLADRUBSKÝCH KONÍ NA ZÁKLADĚ PŘÍBUZNOSTI

CLUSTERING OF KLADRUB HORSES ON THE BASIS OF KINSHIP

J. Příbyl¹, V. Jakubec², J. Jelínek³, J. Volenec³, J. Krys³

¹Research Institute of Animal Production, Praha-Uhřetěves, Czech Republic

²Czech University of Agriculture, Faculty of Agronomy, Praha, Czech Republic

³National Stud at Kladruby, Kladruby nad Labem, Czech Republic

ABSTRACT: The Old Kladrub horse is the only Czech horse breed with breeding continuity in the Czech Lands for several hundreds of years. This sturdy and thoroughbred coach horse used on gala occasions is currently one of the oldest conserved cultural breeds of horses throughout the world and is a part of the national and world cultural heritage. All individuals are related to each other due to the small size of the population, so breeding should be organized in order to minimize an increase in their genetic relationship. Hence the population should be divided into units with the least genetic relationship possible. Relationships between individual animals can be interpreted as correlation coefficients. An $n \times n$ table of correlation coefficients (correlation matrix) can be compiled for n individuals in which inbreeding coefficients are on the diagonal and relationship coefficients are out of the diagonal. Individual animals can be included in classes on the basis of their relationships. The population of Kladrub horses was distributed into classes in such a way that the variance due to classes would represent maximum proportion in total variance. It is calculated as variance of the first principal component or of centroid component. So the structure of classes implies maximum relationship of the individuals within the classes and minimum relationship between the classes. VARCLUS procedure was used for calculations (SAS 6.03, 1988). As the first step, all individuals are included in one class, this class is subdivided by further steps. The class with the lowest explained variance ratio, or the class with the highest value of the second principal component is subdivided. The individuals are iteratively allocated to classes in the course of selection while the variance value is calculated which equals the first eigenvalue of the matrix resulting from the equation set

$$|A - \lambda I| = 0$$

where: λ – vector of matrix eigenvalues

A – covariance matrix (of relationships)

The procedure terminates when the prescribed variance ratio is obtained in all classes. The calculation terminates in this case after the population has been distributed into eight classes. The results contain variance ratio explained by the class, value of the second principal component, total ratio of explained variance for the whole population and distribution of individuals in classes. Each individual has a coefficient of determination to its own class and to the next nearest class, then coefficient of score that expresses standard regression coefficient of class prediction by the individual concerned and class structure, which is correlation of the individual to its own class and to the other separate classes. Table of correlations between the classes is given in a summarized form. The separate groups in Tab. I are subdivided, each up to 8 classes using two methods. The group is subdivided into classes. The process of distribution is summarized in Tab. II. Distribution into classes gradually increases variance ratio explained by the classes. The explained variance ratio amounted to 21.9% as a result of distribution into eight classes. Horse inclusion in the classes was mostly in agreement (particularly for the method of centroid components) with the present taxonomic classification according to genealogical lines, up to groups of progenies after the separate sires. Genetic relationship between white horses and black horses is low, which documents that each color type has been bred autonomously in the history. Genetic relationship between the individuals and within the classes and between the color types makes it possible to organize breeding without foreign gene immigration.

Old Kladrub horse; relationship; clustering

ABSTRAKT: Starokladrubský kůň je jediným českým plemenem koní s několikasetletou kontinuou chovu v Čechách. Vzhledem k malé velikosti populace jsou všichni jedinci vzájemně příbuzní a plemenitbu je nutné organizovat s ohledem na minimalizaci zvyšování vzájemné příbuznosti. Z toho důvodu je třeba populaci dělit na jednotky, které jsou co nejméně příbuzné. Příbuzenské vazby mezi jedinci lze vysvětlit jako korelační koeficienty. Pro n jedinců lze sestavit $n \times n$ korelační matici. Jedince lze rozdělit do tříd na základě vzájemných příbuzností. Populace koní byla rozčleněna na třídy tak, aby rozptýl zapříčiněný třídami (na základě matice příbuznosti) činil maximální podíl na celkovém rozptylu. Je vypočítán jako rozptyl

první hlavní komponenty nebo centroidní komponenty. K výpočtu je použita procedura VARCLUS (SAS 6.03, 1988). Roztřídění koní do tříd se většinou shodovalo se současným taxonomickým členěním podle genealogických linií až na skupiny potomků po jednotlivých plemeních. Mezi bělouši a vraníky je nízká příbuznost, což dokumentuje, že každá barevná varianta byla v historii šlechtěna prakticky nezávisle. Příbuznost mezi jedinci a mezi třídami uvnitř a mezi barevnými variantami dovoluje organizovat šlechtění bez imigrace cizích genů.

kladrubský kůň; příbuznost; shlukování

ÚVOD

Starokladrubský kůň je jediným českým plemenem koní s několikasetletou kontinuitou chovu v Čechách. Tento mohutný a ušlechtilý galakarosier je v současné době jedním ze starších dochovaných kulturních plemen koní na světě a tvoří součást národního a světového kulturního bohatství. Vzhledem k malé velikosti populace jsou všichni jedinci vzájemně příbuzní a plemenitbu je nutné organizovat s ohledem na minimalizaci zvyšování vzájemné příbuznosti. Z toho důvodu je třeba populaci dělit na jednotky, které jsou co nejméně příbuzné.

Současná populace starokladrubských koní v ČR má cca 650 jedinců (tj. plemeníků, matek, dorostu a užitkových koní). Z toho je polovina běloušů a polovina vraníků. Z uvedených stavů je cca 200 běloušů chováno v hřebčíně Kladruhy n. L. a cca 190 vraníků v hřebčíně Slatiňany. V populaci je cca 250 starokladrubských klisen, 110 bělek a 140 vranek. Z těchto počtů je v hřebčíně Kladruhy n. L. chováno 65 bělek a v hřebčíně Slatiňany 65 vranek. Přibližně 120 matek (bělek a vranek) je chováno cca 50 privátními chovateli v zemském chovu. Současná samčí starokladrubská populace se člení na 4 bílé linie, 4 vrané linie a smíšenou linii. Současná samičí starokladrubská populace se člení na rodiny (11 bílých rodin, 13 vraných rodin a 1 smíšenou rodinu).

Plemenitba je v bílém i vraném stáde po generace organizována na základě rodin a linií. S plemenem je nutné zacházet jako s genovou rezervou (Dušek, 1992). Genetickou analýzu plemene pomocí biochemického polymorfismu, včetně stanovení heterozygotnosti a genetických vzdáleností mezi taxonomickými jednotkami, provedli Jakubec et al. (1995). Rozbor stavu koeficientu příbuzenské plemenitby uskutečnili Volenec et al. (1995). Mezi bílou a vranou variantou kladrubských koní je pouze mírná příbuznost.

Příbuzenský vztah mezi dvěma jedinci (X) a (Y) je na základě pravděpodobnosti výskytu alel stejného původu vyjadřován koeficientem příbuznosti R_{xy} . Tento koeficient odvodil Wright (1922) a byl přebírán dalšími autory (Stahl et al., 1970 aj.):

$$R_{xy} = \frac{\sum_{i=1}^m \left(\frac{1}{2}\right)^{(n_1+n_2)} \cdot (1+F_{Ai})}{\sqrt{(1+F_x) \cdot (1+F_y)}} \quad (1)$$

kde: m – počet společných předků

n_1 – počet generací ze strany otce ke společnému předku A_i

n_2 – počet generací ze strany matky ke společnému předku A_i

F_{Ai} – koeficient příbuzenské plemenitby společného předka

F_x, F_y – koeficienty příbuzenské plemenitby každého z dvojice jedinců

Koeficient příbuzenské plemenitby F_x je podle Wrighta (1922) definován jako jedna polovina korelačního vztahu mezi rodiči potomka. Po úpravě se získá:

$$F_x = \sum_{i=1}^m \left(\frac{1}{2}\right)^{(n_1+n_2+1)} \cdot (1+F_{Ai}) \quad (2)$$

Při uvažování ideální populace lze v následných generacích stanovit průměrný koeficient příbuzenské plemenitby. V generaci (n):

$$F_n = \Delta_F + (1 - \Delta_F) \cdot F_{n-1} \quad (3)$$

kde: Δ_F – nárůst příbuzenské plemenitby za generaci

$$\Delta_F = \frac{1}{2N} \quad (4)$$

kde: N – počet jedinců v ideální populaci

Vzhledem k tomu, že četnost pohlaví nebývá shodná, je přibližná velikost populace vyjádřena efektivním počtem (N_e):

$$\frac{1}{N_e} = \frac{1}{4N_m} + \frac{1}{4N_f} \quad (5)$$

kde: N_e – efektivní velikost populace

N_m – počet samců

N_f – počet samic

Dosazením do (4) lze přibližný nárůst průměrného koeficientu příbuzenské plemenitby v populaci stanovit na základě počtu jedinců

$$\Delta_F = \frac{1}{8N_m} + \frac{1}{8N_f} \quad (6)$$

Cílem této práce je prověřit vzájemné příbuznosti nejen mezi jedinci, ale též mezi skupinami a rozčlenit stáda na základě příbuznosti do nižších jednotek.

MATERIÁL A METODA

Pro celou populaci kladrubských koní (každou dvojici a každého jedince) jsou na základě (1) a (2) vypočteny koeficienty příbuznosti a příbuzenské plemenitby (Volenec et al., 1995). Výpočet překlenuje období přibližně posledních 250 let. Na základě vzájemné příbuznosti jsou žijící jedinci členěni do tříd za účelem následné organizace plemenitby, která bude minimalizovat nárůst vzájemné příbuznosti.

Rozbor příbuznosti byl prováděn uvnitř skupin zvířat uvedených v tab. I.

I. Členění do skupin pro rozbor příbuznosti – Inclusion in groups for genetic relationship analysis

Skupina ¹	Číslo skupiny ²	Počet případů ³
Klisny bělky – hřebčín Kladruby ⁴	1	67
Klisny bělky – zemský chov ⁵	2	29
Hřebci bělouši ⁶	3	16
Klisny vranky – hřebčín Slatiňany ⁷	4	65
Klisny vranky – zemský chov ⁸	5	58
Hřebci vraníci ⁹	6	16
1 + 2	12	96
4 + 5	45	123
1 + 3	13	83
4 + 6	46	81
1 + 2 + 3	123	112
4 + 5 + 6	456	139
1 + 3 + 4 + 6	1 346	164

¹group, ²group no., ³number of cases, ⁴white mares – Kladruby stud, ⁵white mares – country, ⁶white stallions, ⁷black mares – Slatiňany stud, ⁸black mares – country, ⁹black stallions

Jednotlivé skupiny zvířat (skupiny č. 1 až 1346) jsou členěny na menší jednotky pomocí procedury VARCLUS (SAS 6.03, 1988). Ke členění jednotlivých skupin dochází postupně až na 8 dílčích jednotek, které jsme si v metodickém postupu předem stanovili.

Příbuzenské vazby mezi jedinci lze vysvětlit jako korelační koeficienty. Pro n jedinců lze sestavit $n \times n$ tabulku korelačních koeficientů (korelační matice), kde na diagonále jsou koeficienty příbuzenské plemenitby a mimo diagonálu koeficienty příbuznosti.

Populace starokladrubských koní je rozčleněna na dílčí jednotky (třídy) tak, aby rozptyl zapříčiněn třídami činil maximální podíl na celkovém rozptylu. Je vy počítán jako rozptyl první hlavní komponenty nebo

centroidní komponenty. To znamená, že třídy jsou sestavovány tak, aby uvnitř byla mezi jedinci příbuznost maximální a mezi třídami minimální. Podobný metodický postup použil Vondráček (1975) při seskupování ovocných stromů.

V prvním kroku jsou všichni jedinci zařazeni do jedné třídy a tato je postupně dělena. K rozdělení dochází u té třídy, která má nejnižší podíl vysvětleného rozptylu nebo nejvyšší hodnotu druhé hlavní komponenty. Jedinci jsou při výběru iteračně přiřazováni do tříd a je počítána hodnota rozptylu, která je rovna prvnímu charakteristickému číslu matice plynoucí ze soustavy rovnic

$$|A - \lambda I| = 0 \quad (7)$$

kde: λ – vektor charakteristických čísel matice
 A – kovariační matice (příbuznosti)

Výpočet je prováděn dvěma způsoby, a to při použití hlavních a centroidních komponent.

Výsledky obsahují podíl rozptylu vysvětlený třídou, hodnotu druhé hlavní komponenty, celkový podíl vysvětleného rozptylu u celého souboru a rozčlenění jedinců do tříd. U každého jedince je koeficient determinace k vlastní třídě a k další nejbližší třídě, koeficient skóre, který vyjadřuje standardizovaný regresní koeficient předpovědi třídy daným jedincem, a složení třídy, což je korelace jedince k vlastní třídě a ostatním jednotlivým třídám. Souhrnně je uvedena tabulka korelací mezi třídami.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Jednotlivé skupiny podle tab. I jsou členěny každá postupně až na 8 tříd pomocí dvou metod. Podrobně zde uvádíme pouze členění skupiny 456 (všichni vraníci), a to na základě analýzy hlavních komponent. Skupina zahrnuje celkem 139 jedinců, z toho 16 hřebců, 65 klisen v hřebčinském chovu a 58 klisen v zemském chovu.

Skupina je postupně rozdělována na třídy. Postup dělení je shrnut v tab. II.

II. Podíl vysvětleného rozptylu v závislosti na počtu tříd – Explained variance ratio in relation to the number of classes

Počet tříd ¹	Rozptyl vysvětlený třídami ²	Podíl vysvětleného rozptylu ³	Nejmenší podíl vysvětlený třídou ⁴	Největší hodnota druhé hlavní komponenty ⁵
1	18,31	0,122	0,122	4,08
2	21,83	0,146	0,140	2,75
3	24,05	0,160	0,155	2,39
4	26,20	0,175	0,155	1,95
5	28,05	0,187	0,164	1,90
6	29,94	0,200	0,166	1,56
7	31,46	0,210	0,166	1,45
8	32,82	0,219	0,185	1,36

¹number of classes, ²variance explained by classes, ³explained variance ratio, ⁴the least ratio explained by class, ⁵highest value of the second principal component

III. Jednotlivé třídy – Separate classes

Třída ¹	Počet jedinců ²	Rozptyl ³	Vysvětlený rozptyl ⁴	Vysvětlený podíl ⁵	Druhá hlavní komponenta ⁶
1	22	24,74	5,56	0,225	1,28
2	26	26,66	4,94	0,185	1,35
3	26	27,78	5,38	0,194	1,36
4	15	16,22	3,71	0,229	1,12
5	15	16,45	4,07	0,247	1,19
6	13	14,56	3,46	0,238	1,24
7	11	11,91	2,96	0,249	1,35
8	11	11,48	2,73	0,238	1,25

¹class, ²number of individuals, ³variance, ⁴explained variance, ⁵explained ratio, ⁶second principal component

Dělením do tříd dochází postupně ke zvyšování podílu rozptylu vysvětleného třídami. Při osmi třídách dosáhl vysvětlený podíl rozptylu 21,9 %. Souběžně klesla hodnota maximální druhé hlavní komponenty ve třídě ze 4,08 při jedné třídě na hodnotu 1,36 při osmi třídách (pro třídu s maximální hodnotou). Mírně stoupl podíl vysvětleného rozptylu uvnitř každé třídy, který dosáhl hodnoty minimálně 18,5 %. V případě, že by procedura pokračovala v dělení do většího počtu tříd, byla by rozdělena třída, která dosáhla nejnižší hodnoty vysvětleného rozptylu a nejvyšší hodnoty druhé hlavní komponenty.

Jak ukazuje tab. III, je počet jedinců v jednotlivých třídách 11 až 26. Podíl vysvětleného rozptylu ve třídě kolísá od 18,5 do 24,9 % a hodnota druhé hlavní komponenty od 1,12 do 1,36. Kdyby dělení do tříd pokračovalo, byla by na základě uvedených hodnot rozdělena třída 2 nebo třída 3.

V tab. IV je uvedena jako příklad část z 22 jedinců zařazených do první třídy. U každého jedince je uvedena determinace k vlastní třídě, determinace k další nejbližší třídě a poměr vyjadřující pravděpodobnost chybného zařazení.

Pro každého jedince je stanoven koeficient skóre, který vyjadřuje standardizovaný regresní koeficient předpovědi (repräsentativnosti) třídy daným jedincem. Příklad je uveden v tab. V. U jedinců A2 a A7, kteří patří do první třídy, má hodnotu 0,085 a 0,115. Zname-

IV. Jedinci zařazení do první třídy – Individuals included in the first class

Jedinec ¹	Determinace ² R ²		Poměr ⁵ 1 - R ²
	k vlastní třídě ³	k druhé nejbližší třídě ⁴	
A2	0,176	0,099	0,915
A7	0,295	0,100	0,784
A16	0,039	0,020	0,980
A18	0,317	0,101	0,760
A35	0,158	0,074	0,910
A44	0,249	0,097	0,832

¹individual, ²determination, ³to its own class, ⁴to the second nearest class, ⁵ratio

ná to, že jedinec A7 je lepším zástupcem své třídy. Z uvedených jedinců jsou A3 a A6 ve třídě 3, A1 ve třídě 4, A4 a A5 ve třídě 6.

V tab. VI je uveden příklad vztahů jedinců k jednotlivým třídám. Jedná se o hodnoty korelačních koeficientů. Jak vyplývá z této tabulky, má jedinec A2 korelaci ke své třídě 0,419, což souhlasí s údajem determinace koeficientu $R^2 = 0,176$ v tab. IV. K ostatním třídám má korelaci 0,190 až 0,314. Kromě své vlastní třídy má nejtěsnější vztah ke třídě 4. Hodnota korelace opět koresponduje s údajem $R^2 = 0,099$ v tab. IV.

V. Koeficient skóre – Coefficients of score

Jedinec ¹	Třída ²							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A1	0,000	0,000	0,000	0,142	0,000	0,000	0,000	0,000
A2	0,085	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A3	0,000	0,000	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,170	0,000	0,000
A5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,000	0,000
A6	0,000	0,000	0,093	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
A7	0,115	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

¹individual, ²class

V tab. VII jsou uvedeny hodnoty interklasní korelace vyjadřující vztah mezi třídami.

Průměrná vzájemná příbuznost mezi jedinci uvnitř tříd a mezi jedinci různých tříd je uvedena v tab. VIII.

V závorkách jsou uvedeny směrodatné odchylky koeficientů příbuznosti uvnitř tříd, které vyjadřují, jak vzájemná příbuznost mezi jedinci ve třídě kolísá. Průměrná příbuznost ve třídě kolísá od 0,155 ve třídě 2 do

VI. Vztah jedinců ke třídám – Relation of individuals to classes

Jedinec ¹	Třída ²							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A1	0,269	0,143	0,230	0,495	0,161	0,171	0,243	0,143
A2	0,419	0,202	0,252	0,314	0,234	0,271	0,286	0,190
A3	0,050	0,030	0,067	0,032	0,029	0,038	0,039	0,041
A4	0,281	0,257	0,287	0,207	0,272	0,546	0,423	0,235
A5	0,036	0,021	0,035	0,024	0,021	0,053	0,029	0,022
A6	0,253	0,180	0,464	0,299	0,217	0,254	0,280	0,291
A7	0,543	0,243	0,292	0,235	0,268	0,318	0,264	0,212

¹individual, ²class

VII. Interklasní korelace mezi třídami – Interclass correlations between the classes

Třída ¹	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1,00	0,436	0,548	0,524	0,499	0,593	0,511	0,396
2		1,00	0,414	0,352	0,598	0,444	0,397	0,600
3			1,00	0,470	0,485	0,554	0,450	0,594
4				1,00	0,399	0,458	0,532	0,375
5					1,00	0,531	0,396	0,485
6						1,00	0,538	0,413
7							1,00	0,347
8								1,00

¹class

VIII. Průměrná vzájemná příbuznost uvnitř skupin a mezi skupinami vránků – Mean relationship within the groups and between the groups of black horses

Třída ¹	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,204 (0,064)	0,096 (0,040)	0,123 (0,043)	0,131 (0,042)	0,130 (0,034)	0,146 (0,064)	0,132 (0,039)	0,098 (0,024)
2		0,155 (0,043)	0,082 (0,035)	0,078 (0,026)	0,136 (0,027)	0,096 (0,051)	0,090 (0,046)	0,129 (0,036)
3			0,164 (0,063)	0,105 (0,042)	0,113 (0,040)	0,122 (0,050)	0,104 (0,035)	0,130 (0,054)
4				0,185 (0,044)	0,104 (0,031)	0,111 (0,053)	0,135 (0,044)	0,094 (0,038)
5					0,211 (0,035)	0,136 (0,056)	0,107 (0,030)	0,126 (0,022)
6						0,177 (0,092)	0,137 (0,060)	0,101 (0,045)
7							0,186 (0,065)	0,089 (0,030)
8								0,166 (0,059)

¹class

0,211 ve třídě 5. Průměrná příbuznost mezi třídami kolísá od 0,078 mezi třídami 2 a 4 do hodnoty 0,146 mezi třídami 1 a 6.

Stejným způsobem bylo postupováno při rozřídění jedinců všech skupin podle tab. I. Výsledky získané pomocí obou metod (hlavních a centroidních komponent) se částečně lišily, ale při podrobném rozboru původu koní se ukázalo, že se jedná o jedince, jejichž rozřídění bylo v podstatě možné několikerým způsobem. Rozřídění koní do tříd se většinou shodovalo (především u metody centroidních komponent) se současným taxonomickým členěním podle genealogických linií až postupně na skupiny potomků po jednotlivých plemenicích.

Průměrná příbuznost mezi bělouši uvnitř tříd a mezi třídami (skupina 123) je uvedena v tab. IX. Rozbor vzájemné příbuznosti všech jedinců v hřebčinech (sku-

pina 1346) je uveden v tab. X. Z tabulky je vidět, že se skupiny rozpadají do bloků, kdy uvnitř bloků (podle barevné varianty) jsou mezi třídami vyšší příbuznosti a mezi bloky (mezi barevnými variantami) je mezi třídami příbuznost prakticky desetkrát menší.

ZÁVĚR

Pro zařazování jedinců do tříd podle vzájemné příbuznosti je možné využít metod vícerozměrné analýzy.

Mezi bělouši a vraníky je nízká příbuznost, což dokumentuje, že každá barevná varianta byla v historii šlechtěna prakticky nezávisle.

Příbuznost mezi jedinci a mezi třídami uvnitř a mezi barevnými variantami dovoluje organizovat šlechtění bez imigrace cizích genů.

IX. Průměrná příbuznost uvnitř a mezi třídami běloušů – Mean relationship within and between the classes of white horses

Třída ¹	1	2	3	4	5	6	7	8	Počet jedinců ²
1	0,247	0,132	0,097	0,065	0,135	0,163	0,087	0,130	12
2		0,217	0,084	0,080	0,127	0,114	0,084	0,109	29
3			0,160	0,048	0,099	0,095	0,067	0,085	18
4				0,129	0,066	0,063	0,040	0,067	15
5					0,173	0,122	0,092	0,123	11
6						0,213	0,090	0,133	10
7							0,163	0,081	7
8								0,167	10

¹class, ²number of individuals

X. Průměrná příbuznost všech koní v hřebčinech – Mean relationship of all horses on studs

Třída ¹	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	Počet jedinců ²
1	0,178	0,113	0,106	0,147	0,082	0,153	0,117	0,025	0,013	0,015	0,015	0,048	0,018	0,014	0,018	0,039	13
2		0,197	0,092	0,123	0,073	0,118	0,121	0,027	0,014	0,015	0,016	0,041	0,019	0,014	0,019	0,036	28
3			0,185	0,108	0,073	0,118	0,105	0,019	0,010	0,011	0,012	0,038	0,014	0,011	0,016	0,026	15
4				0,238	0,072	0,148	0,123	0,031	0,014	0,017	0,017	0,049	0,021	0,018	0,020	0,035	13
5					0,190	0,080	0,093	0,016	0,008	0,010	0,010	0,024	0,012	0,009	0,012	0,022	6
6						0,250	0,146	0,022	0,011	0,013	0,013	0,043	0,016	0,011	0,014	0,038	5
7							0,174	0,031	0,016	0,019	0,021	0,048	0,023	0,019	0,029	0,039	6
8								0,208	0,104	0,128	0,139	0,117	0,156	0,168	0,168	0,109	12
9									0,157	0,078	0,134	0,090	0,102	0,138	0,107	0,056	17
10										0,181	0,102	0,085	0,158	0,106	0,132	0,117	11
11											0,223	0,101	0,115	0,149	0,149	0,071	11
12												0,170	0,108	0,088	0,137	0,075	7
13													0,212	0,125	0,164	0,105	8
14														0,259	0,134	0,065	4
15															0,231	0,073	5
16																0,217	3

¹class, ²number of individuals

LITERATURA

DUŠEK, J.: Uchování a využití genových rezerv v chovu koní. In: Uchovávanie a využitie genových rezerv v chove hospodárskych zvierat. Sborník AZV ČSFR, 159, 1992: 70–89.

JAKUBEC, V. – GLASNÁK, V. – JELÍNEK, J. – ZÁLIŠ, N.: Genetic analysis of sire lines and sire progeny groups in the Old-Kladrub Horse. In: 46th Ann. Meet. of the EAAP, Praha, 4.–7. 9. 1995.

STAHL, W. – RASCH, D. – ŠILER, R. – VÁCHAL, J.: Genetika populací v chovu zvířat. Praha, SZN 1970.

VOLENEC, J. – JAKUBEC, V. – JELÍNEK, J. – PŘIBYL, J. – ZÁLIŠ, N.: Analysis of inbreeding of Old-Kladrub Horses. Scientia Agric. Bohem., 26, 1995: 279–296.

VONDRÁČEK, J.: Základy biometrie. Přednášky. Praha-Uhřetěves, VÚŽV 1975.

WRIGHT, S.: Coefficients of inbreeding and relationship. Amer. Nat., 56, 1922: 330–338.

Došlo 10. 12. 1996

Kontaktní adresa:

Doc. Ing. Josef Přibyl, DrSc., Výzkumný ústav živočišné výroby, 104 00 Praha 10-Uhřetěves, tel.: 02/67 71 17 47, fax: 02/67 71 07 79

KŮŇ VE SLUŽBÁCH ČLOVĚKA (STŘEDOVĚK)

Jaromír Dušek

Praha, Apros – Natural. 262 s.

V poslední době se náš knižní trh rozšířil o několik hipologických titulů, převážně překladů publikací zahraničních autorů. O to více je tedy nutné přivítat publikaci domácího autora. Je jím doc. Ing. Jaromír Dušek, DrSc., dlouholetý dřívější ředitel bývalé Výzkumné stanice pro chov koní ve Slatiňanech, hipolog, který v tomto oboru pracoval celý život. I když se svou činností věnoval hlavně výzkumu, a to v mezinárodním měřítku, ve zmiňované knize se autor pohroužil do historie a přináší tak poznatky, které jsou pro dnešní generaci zájemců o chov koní jinak těžko dosažitelné.

Z autorova připravovaného triptychu „Kůň ve službách lidstva“ vyšel již dříve (1983) „Starověk“, nyní byl s odstupem času vydán druhý díl, který je zaměřen na středověk. Autor rozvrhl látku do několika tematických okruhů. V prvním seznamuje čtenáře s vývojem chovu koní v jednotlivých evropských zemích, přičemž údaje staví do historických souvislostí. Rozbor rozvoje středověkého chovu koní je doložen četnými údaji, které jistě značně obohatí studium fylogeneze četných plemen. Velmi propracovaná je obsažná část o středověkých turnajích a obecně o době rytířské, ve které je velmi poučný systém těchto zápolení, v nichž měli koně tak značný význam. Rovněž následné kapitoly o kultu žen (vznikající tzv. mariánský kult), o využití koní v lovectví, ve světském a církevním ceremoniale, v dopravě, poselské službě a v zemědělství, o mistrech jezdeckých škol, o chovech na panských dvorech

a chovech klášterních a o využití koní ve vojenství jsou velmi obsažné a poučné. Samostatný význam má kapitola zabývající se motivy koní v pojetí středověkých umělců včetně hodnocení jejich typů, kterou velmi vhodně doplňují reprodukce krásných rytin a jezdeckých soch, provázející celý text knihy.

Je trochu škoda, že publikace v rozsahu 262 stran je výběrem z podstatně obsažnějšího rukopisu. I tak je zachováno zpracování v širším kontextu hipologických, kulturních a historických souvislostí a publikace je cenným přínosem naší hipologii a poskytuje tak v širokém spektru informace pro mladou nastupující generaci zájemců o chov koní. Autor ve svých pracích často zdůrazňuje významný přínos české hipologii prof. MUDr. et PhDr. Františka Bílka, který syntetizoval zootechniku a zvláště hipologii s kulturou a historií. V těchto intencích se autor knihy snaží přispět ke zkulturnění současného chovu rozsáhlým souborem poznatků o dřívějším chovu koní. V souvislosti s jeho dalšími historicky zaměřenými publikacemi chce tak připomenout v nynější až příliš uspěchané době, že naši předkové byli odborně na výši a že i dřívější empirické poznatky byly základem dnešního rozvoje chovu koní. Tento záměr se autorovi jistě plně zdařil. Kniha „Kůň ve službách člověka (středověk)“ je napsána poutavě, zajímavě a čtivě, velmi dobrá je také redakční úprava včetně působivé grafické úpravy. Vydalo ji nakladatelství Apros – Natural, Rubešova 10/83, 120 00 Praha 2, a její cena 95 Kč ji činí velmi dostupnou.

Ing. Jan Navrátil, CSc.

Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, Praha

GENETIC ANALYSIS OF THE CROATIAN TRAKEHNER AND POSAVINA HORSE BREEDS

GENETICKÁ ANALÝZA TRAKÉNSKÝCH KONÍ CHOVANÝCH V CHORVATSKU A KONÍ PLEMENE POSAVINA

E. G. Cothran¹, M. Kovač²

¹*University of Kentucky, Department of Veterinary Science, Lexington, KY, USA*

²*The Posavina Horse Breeders Association of Croatia, Desno Trebarjevo, Croatia*

ABSTRACT: Genetic marker analysis was performed on 98 Posavina horse and 16 Trakehner horse blood samples from Croatian populations. All samples were tested for genetic types at seven red blood cell alloantigen (blood group) loci and ten biochemical genetic loci. The results were analyzed to determine genetic variability levels within the breeds and to examine genetic relationships of the horse breeds from Croatia with other breeds of domestic horses. Genetic variability within the Trakehner horse was relatively low compared to the mean for domestic horses. Mean unbiased expected heterozygosity for 87 populations of domestic breeds was 0.442 (STD = 0.045) compared to 0.398 for the Trakehner horse form Croatia. In contrast, genetic variation in the Posavina horse was relatively high with an unbiased expected heterozygosity of 0.495. Comparisons of observed and expected heterozygosity within both breeds showed no evidence of inbreeding. Here we reported on gene marker frequencies for the Posavina horse and Trakehner horse from Croatia and genetic resemblance of these horse breeds to other domestic breeds as estimated by restricted maximum likelihood techniques.

horse; breeds; Trakehner horse; Posavina horse; genetic variation; genetic similarity; conservation

ABSTRAKT: Na vzorcích krve od 98 posavských koní a 16 trakénských koní z chorvatské populace byla provedena analýza genetických markerů. Všechny vzorky byly testovány na genetické typy na sedmi lokusech alloantigenů (krevní skupiny) červených krvinek a na deseti biochemických genetických lokusech. Analýza výsledků sloužila ke stanovení hladin genetické variability uvnitř plemen a ke studiu genetické příbuznosti plemen koní z Chorvatska s ostatními plemeny domácích koní. Ve srovnání s průměrem domácích koní byla genetická variabilita uvnitř plemene trakénských kůň relativně nízká. Průměrná nezkreslená očekávaná heterozygotnost pro 87 populací domácích plemen byla 0,442 (STD = 0,045) ve srovnání s hodnotou 0,398 pro trakénského koně z Chorvatska. Naproti tomu genetická variabilita posavského koně byla relativně vysoká při nezkreslené očekávané heterozygotnosti 0,495. Srovnání zjištěné a očekávané heterozygotnosti uvnitř obou plemen neprokázalo příbuzenskou plemenitbu. V práci uvádíme frekvence genetických markerů pro posavského koně a pro trakénského koně z Chorvatska a genetickou podobnost těchto plemen koní s ostatními domácími plemeny, odhadnutou metodami omezené maximální věrohodnosti.

kůň; plemena; trakénský kůň; posavský kůň; genetická variabilita; genetická podobnost; zachování plemene

INTRODUCTION

The preservation of genetic variability within a breed is a central concept of conservation of rare breeds of domestic livestock species. Rare breeds are particularly susceptible to loss of genetic variation due to small population size. Genetic variation within a breed can be divided into two components: a) population genetic diversity, b) individual genetic variance.

Reduction of the population genetic diversity can result in the loss of long term adaptability and survival probability of the breed. Loss of individual variation, mainly due to inbreeding, can cause a reduction in individual fertility and viability.

Here, we report on the genetic variation of two breeds of horses from Croatia. One breed, the Trakehner, is found in many countries but has a small population size in Croatia. The other, the Posavina, is indigenous to Croatia.

The history of the Posavina is intimately tied to the history of Croatia. When the Croats settled what is now Croatia they brought with them horses of Asiatic origins (Croats settled present area from the region of the river Dnjeper). When they arrived, they encountered the domesticated horses already inhabiting this area which included horses of Persian, Illyian, Celtic, Roman and Gothic origins. Later, there was input of horses of Hunnish and Hungarian origins and also

oriental stock from Turkey likely had an influence for 300 to 400 years. Through the centuries, crosses of these diverse horses developed into the ancestors of the Posavina. In the 18th and 19th centuries there was Spanish and Italian horse influence and also in the 19th century an influence of the English horses on the land-owner farms. Finally, in the 19th century as well, there came the influence of the heavy northern European horses that have had a primary impact on the modern Posavina breed. An integral part of the development of the Posavina was the way it was used by man. With pasture breeding and continual exposure to the environment it lived in, it became well adapted to the region it inhabited. Today the Posavina horse is a medium to heavy weight work horse with a height of 148–152 cm in males and 142–148 cm in females. In profile, its head is noble and dry with prominent eyes. The neck is normally set, strong, relatively short and well shaped. The chest is strong and the fundament relatively dry with a short cannon and correct posture and a broad, flat and short hoof. The body is compact and firm with a general rectangular shape. The common colors are bay, dark bay, black and gray.

MATERIAL AND METHODS

Ninety-eight Posavina and sixteen Croatian Trakehner horses were examined for genetic variation. Blood was collected by venipuncture into 10 cc evacuated collection tubes, two tubes per horse. One tube contained the anticoagulant acid-citrate-dextrose (ACD) from which red blood cells (rbcs) were obtained. The other tube had additives and was used for a source of serum.

Standard immunological procedures involving hemagglutination and complement mediated hemolysis (Stormont, Suzuki, 1964; Stormont et al., 1964) were used to detect variation of red cell alloantigens at seven blood group loci. Starch and polyacrylimide gel electrophoresis and isoelectric focussing were used to detect variation at 10 serum and red cell lysate protein loci (Braend, 1973; Sandberg, 1974; Juneja et al., 1978; Braend, Johansen, 1983; Pollitt, Bell, 1980).

The loci examined were the A, C, D, K, P, Q and U horse blood group loci and the protein loci were alpha-1-beta glycoprotein (AIB), albumin (Al), serum esterase (Est), vitamin D binding protein (Gc), glucosephosphate isomerase (GPI), alpha-hemoglobin (Hb), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), phosphoglucomutase (PGM), protease inhibitor (Pi) and transferrin (Trf) loci. Nomenclature for variants at all 17 loci was in accord with internationally standardized usage for horses (Bowling, Clark, 1985; Bowling, Ryder, 1987) except for variants at some loci which have not yet received international recognition.

Gene frequencies for biochemical loci were calculated by direct count. Frequencies of alleles at blood

group loci were calculated by the allocation method (Andersson, 1985). Genetic variation was measured as observed heterozygosity (H_o), Hardy-Weinberg expected heterozygosity (H_e), unbiased expected heterozygosity (H_u) (Nei, 1978), effective number of alleles (ENA), and the total number of variants found in each population (TNV). H_o was calculated for biochemical loci only because of the presence of recessive alleles and/or ambiguous genotypes at blood group loci. Therefore, for direct comparison, H_e and H_u were calculated only for biochemical loci (in an ideal population, H_e (H_u) should equal H_o). In addition, population inbreeding level was estimated by Wright's $F_{is} = 1 - (H_o/H_e)$. Values of genetic variation of the Croatian horses were compared to those of 85 additional domestic horse populations that have been tested at the University of Kentucky. Genetic relationship (genetic similarity - S) of the Croatian breeds to these other domestic breeds were investigated using Rogers' (1972) genetic similarity coefficient (S) and restricted maximum likelihood analysis (RMS: Felsenstein, 1989) was used to construct the dendrograms of Figs. 1 and 2.

RESULTS AND DISCUSSION

Gene frequencies for the Croatian Trakehner and Posavina are given in Tabs. I and II while genetic variability measures for two breeds from Croatia and other selected breeds are shown in Tab. III. Mean values for domestic breeds are also given.

Genetic variation for Croatian Trakehners was below the mean for domestic breeds but slightly above that for Trakehners from the United States except for TNV and ENA. The difference in TNV and ENA (Tab. III) between the two Trakehner populations most likely was due to sample size differences.

Genetic variability for the Posavina was relatively high. Of the 87 populations of domestic breeds that have been examined, only 14 have higher values of H_o than the Posavina. The Posavina has particularly high allelic diversity, that is, the number of genetic variants present and the effective number of alleles. The ENA of the Posavina is second only to the Chilean Criollo of all the breeds tested to date.

The Posavina horse has a few variants that are uncommon in virtually all horse breeds (Pi-V, Pi-O, Tf-G and P-a). Pi-V is primarily found in horses of Iberian descent but it also is found in the Konik and Hucul and thus may be from the Tarpan. The same is true of Pi-O. The Tf-G and P-a are mainly associated with pony breeds.

Tab. IV shows average genetic similarity of the Croatian Trakehner and Posavina to major groupings of horses. These groupings are based upon the genetic relationship among the horse breeds.

The Croatian Trakehner has its highest similarity to US Trakehner ($S = 0.885$). The highest mean similarity

I. Genetic marker frequencies for the Croatian Trakehner horse ($n = 16$)

Biochemical loci									
Tf	A1B	A1	Gc	Est	GPI	Hb	6PGD	PGM	Pi
D 0.250	F 0.031	A 0.219	F 0.096	F 0.063	I 1.00	BI 0.594	F 0.500	S 1.00	F 0.094
F1 0.125	K 0.969	B 0.781	S 0.094	G 0.031		BII 0.406	S 0.500		I 0.031
F2 0.281				I 0.906					L 0.406
H2 0.031									N 0.031
O 0.250									R 0.063
R 0.063									S 0.094
									U 0.281

Blood group loci							
A HBGL	C HBGL	D HBGL	K HBGL	P HBGL	Q HBGL	U HBGL	
adf 0.565	a 0.970	dk 0.188	a 0.099	ac 0.536	abc 0.134	a 0.293	
adg 0.065	- 0.030	dghm 0.313	- 0.901	ad 0.229	c 0.116	- 0.707	
b 0.156		bcm 0.031		d 0.004	- 0.750		
bc 0.031		cgm 0.406		- 0.232			
bce 0.063		cegimn 0.063					
- 0.120							

HBGL = horse blood group locus

II. Genetic marker frequencies for the Posavina horse ($n = 98$)

Biochemical loci									
Tf	A1B	A1	Gc	Est	GPI	Hb	6PGD	PGM	Pi
D 0.103	K 0.939	A 0.418	F 0.760	F 0.199	F 0.010	AII 0.005	F 0.990	F 0.291	G 0.042
E 0.031	S 0.061	B 0.582	S 0.240	G 0.260	I 0.949	BI 0.633	S 0.010	S 0.709	H 0.036
F2 0.309				I 0.510	S 0.041	BII 0.362			I 0.151
G 0.041				L 0.031					J 0.010
H2 0.144									K 0.026
O 0.119									L 0.177
R 0.253									L2 0.026
									N 0.130
									O 0.026
									P 0.031
									R 0.099
									S 0.178
									T 0.031
									U 0.016
									V 0.021

Blood group loci							
A HBGL	C HBGL	D HBGL	K HBGL	P HBGL	Q HBGL	U HBGL	
adf 0.321	a 0.470	ad 0.229	a 0.005	a 0.023	abc 0.032	a 0.339	
ads 0.053	- 0.530	dn 0.016	- 0.995	ac 0.320	b 0.038	- 0.661	
a 0.018		dk 0.081		ad 0.243	c 0.218		
b 0.109		dghm 0.094		b 0.007	- 0.712		
bc 0.036		de 0.138		bd 0.114			
bce 0.029		deo 0.070		d 0.031			
b - 0.434		dek 0.018		- 0.262			
		bcm 0.052					
		cgm 0.276					
		cegimn 0.026					

HBGL = horse blood group locus

III. Genetic variability measures for two horse breeds of Croatia, other selected domestic horse breeds and the mean values for 87 domestic horse breeds

Breed	N	Ho	He	Hu	TNV	ENA	Fis
Posavina	98	0.418	0.427	0.429	76	2.873	0.020
Trakehner (Croatia)	16	0.338	0.324	0.334	52	2.122	-0.043
Trakehner (USA)	42	0.324	0.313	0.317	58	2.241	-0.033
Quarter horse	190	0.396	0.394	0.395	93	2.681	-0.007
Thoroughbred	265	0.294	0.288	0.289	64	2.009	-0.019
Arabian	121	0.308	0.326	0.328	63	2.132	0.058
Andalusian	140	0.347	0.362	0.364	75	2.508	0.043
Lipizzaner	44	0.334	0.323	0.326	64	2.324	-0.036
American Saddlebred	262	0.404	0.409	0.410	96	2.625	0.013
Morgan horse	30	0.424	0.407	0.414	84	2.334	-0.042
Standardbred pacer	324	0.401	0.395	0.395	85	2.142	-0.016
Standardbred trotter	315	0.398	0.393	0.394	68	2.153	-0.012
Belgian draft	29	0.451	0.414	0.422	71	2.799	-0.087
Clydesdale	41	0.327	0.322	0.326	54	2.125	-0.018
Haflinger	164	0.400	0.412	0.413	69	2.704	0.028
Percheron	82	0.397	0.400	0.402	68	2.693	0.007
Polish Heavy horse	204	0.391	0.386	0.387	78	2.564	-0.012
Suffolk Punch	85	0.448	0.430	0.431	61	2.489	-0.042
Dartmoor pony	32	0.399	0.413	0.420	67	2.526	0.033
Hackney pony	39	0.320	0.340	0.344	59	2.410	0.059
Shetland pony	38	0.416	0.461	0.470	65	2.809	0.097
Welsh pony	48	0.424	0.393	0.397	74	2.629	-0.079
Domestic horse mean	87	0.373	0.364	0.371	64	2.391	-0.025

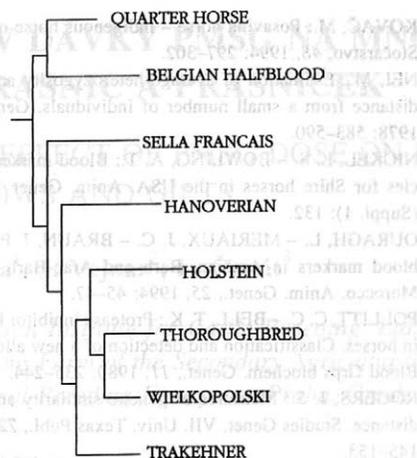
IV. Average genetic similarity (*S*) of the Croatian Trakehner and Posavina to major groupings of horses. These groupings are based upon the genetic relationship of horse breeds

Breed grouping	N	Posavina horse		Croatian Trakehner	
		mean	standard deviation	mean	standard deviation
Thoroughbred type breeds	12	0.792	0.035	0.845	0.047
Arabian and oriental breeds	15	0.804	0.035	0.816	0.033
Old World Iberian type breeds	7	0.807	0.038	0.752	0.052
New World Iberian type breeds	9	0.834	0.042	0.758	0.041
North American gaited breeds	9	0.826	0.024	0.810	0.022
Draft breeds	10	0.863	0.040	0.751	0.031
Pony breeds	10	0.825	0.027	0.759	0.037

it has to breeds related to the Thoroughbred. The RMS analysis produced a tree that shows the Trakehner in a cluster that includes the Thoroughbred, Wielkopolski (a Polish crossbred with considerable Thoroughbred blood), and the Holstein (Fig. 1). Only the Thoroughbred branch of the entire RMS tree of 64 breeds is shown here.

The Posavina has its highest mean *S* with the draft breeds, as would be expected by its physical characteristic. It showed its closest relationship (among the draft breeds tested) to the Polish Heavy horse (Fig. 2). The association with the Polish Heavy horses is the

most likely geographic rather than a direct relationship. The Polish Heavy definitely has a Hucl in its make up and this represents Tarpan ancestry. As indicated above, there is at least some suggestion that the Posavina could have a strong Tarpan component. There most likely is direct ancestry with Tarpan but, of course, we can not test that directly as the Tarpan is extinct. Also note the relatively high similarity values for the pony, New World Gaited and New World Iberian breeds. This reflects western European influence as opposed to oriental influence. These results are based on the breeds of horses that we have samples for, and other breeds

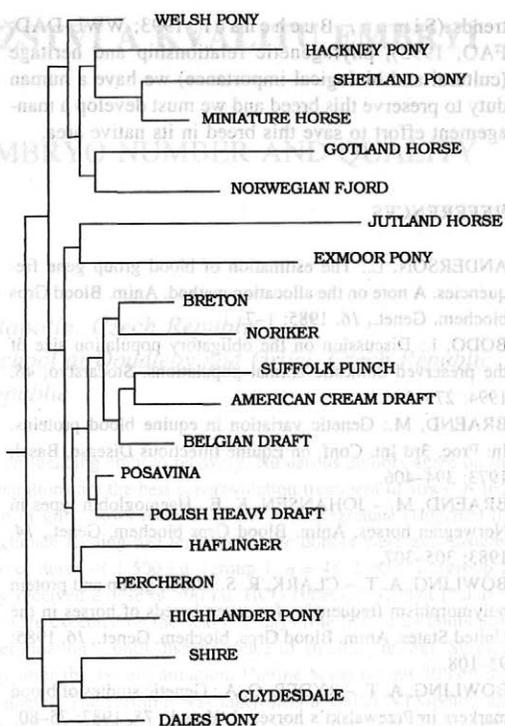


1. Portion of a RML dendrogram showing the genetic association of the Trakehner to horse breeds related to the Thoroughbred

that we have not tested may be more closely related to the Posavina.

Genetic variability of the Croatian Trakehner population is at a level that causes some concern relative to conservation. Both individual and populational estimates of variation are low for horses. The breed as a whole also has relatively low genetic variation, however, the world wide population probably contains additional variation not seen in the Croatian sample and is not at immediate risk. The actual number of Trakehners in Croatia is about 60 with 18 breeding females and only three breeding males. The Croatian population should be monitored if there is no opportunity to import Trakehners from other countries. It should be noted that although overall genetic variation is low, there is no evidence of inbreeding as estimated by *Fis*. The negative value indicates negative inbreeding. However, for reasons that are not yet fully understood, small populations of horses tend to show negative *Fis* value.

The Posavina shows high genetic variation. The levels of variation suggest that the breed has diverse origins but the overall pattern of variation indicates it now exists as a distinct breed. There is no immediate concern about loss of genetic variation if reasonable breeding practices are maintained. This means using as many stallions as are acceptable to breed standards in breeding and not overusing particular stallions. Genetic variation can be lost very quickly in small populations, and the Posavina does have a small population. The current number of the Posavina horses is about 2 000 with about 700 breeding mares and 20 stallions. The breed should be closely monitored to ensure there is no rapid erosion of genetic variation. The Posavina appears to be a good example of the type of indigenous breed that should be conserved to maximize the genetic diversity of species.



2. Portion of a RML dendrogram showing the genetic association of the Posavina to heavy draft horse and pony breeds

CONCLUSION

The point of our research was to determine the genetic variability, genetic similarity and conservations status of the Posavina and Croatian Trakehner horse breeds.

Trakehner horse in Croatia is very similar genetically to the US Trakehner breed. Cluster analysis placed the Trakehners within a group that contained the Thoroughbred and other breeds closely to the Thoroughbred. The Trakehner horse breeders in Croatia due to the population size and known available genetic material (number of males) should consider the import of few genetic materials into their population. Also, improved work on maintaining genetic variability at Trakehner horse population in their Croatian environment should be developed.

The Posavina horse was clustered with the draft horses and showed the closest resemblance to the Polish Heavy horse. The Posavina shows a good genetic performance and appears to be a homogeneous, distinct breed but the data do not give precise information about purity of breed. The genetic data do give an indication that the Posavina is not a group of disjunct subpopulations, but a single interbreeding unit. It appears to fit the definition of a breed quite well. In relation to genetic conservation programmes, population

trends (Simon, Buchenaur, 1993; WWL-DAD, FAO, 1993), phylogenetic relationship and heritage (cultural and biological importance) we have a human duty to preserve this breed and we must develop a management effort to save this breed in its native area.

REFERENCES

ANDERSON, L.: The estimation of blood group gene frequencies. A note on the allocation method. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, 16, 1985: 1-7.

BODO, I.: Discussion on the obligatory population size of the preserved domestic animal populations. *Stočarstvo*, 48, 1994: 279-286.

BRAEND, M.: Genetic variation in equine blood proteins. In: *Proc. 3rd Int. Conf. on Equine Infectious Disease*, Basel, 1973: 394-406.

BRAEND, M. - JOHANSEN, K. E.: Haemoglobin types in Norwegian horses. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, 14, 1983: 305-307.

BOWLING, A. T. - CLARK, R. S.: Blood group and protein polymorphism frequencies for seven breeds of horses in the United States. *Anim. Blood Grps. biochem. Genet.*, 16, 1985: 93-108.

BOWLING, A. T. - RYDER, O. A.: Genetic studies of blood markers in Przewalski's horses. *J. Hered.*, 78, 1987: 75-80.

FELSENSTEIN, J.: PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.4). *Cladistic*, 5, 1989: 164-166.

JUENJA, R. K. - GAHNA, B. - SANDBERG, K.: Genetic polymorphism of the vitamin D binding protein and other post-albumin protein in horse serum. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, 9, 1978: 29-36.

KOVAČ, M.: Posavina horse - indigenous horse of Croatia. *Stočarstvo*, 48, 1994: 297-302.

NEI, M.: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 1978: 583-590.

NICKEL, L. S. - BOWLING, A. T.: Blood marker frequencies for Shire horses in the USA. *Anim. Genet.*, 18, 1987 (Suppl. 1): 132.

OURAGH, L. - MERIAUX, J. C. - BRAUN, J. P.: Genetic blood markers in Arabian, Barb and Arab-Barb horses in Morocco. *Anim. Genet.*, 25, 1994: 45-47.

POLLITT, C. C. - BELL, T. K.: Protease inhibitor HBGLtem in horses. Classification and detection of a new allele. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, 11, 1980: 235-244.

ROGERS, J. S.: Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies Genet. VII. Univ. Texas Publ.*, 7213, 1972: 145-153.

SANDBERG, K.: Blood typing of horses: Current status and application to the identification problems. In: *Proc. 1st World Congr. of Genetics Applied to Livestock Production*, Madrid, 1974: 253-265.

SIMON, D. L. - BUCHENAUER, D.: Genetic diversity of European livestock breeds. *EAAP*, Wageningen, 1993.

STEINHAUSZ, M.: *Uzgoj konja u Savskoj banovini*. Zagreb, 1935.

STORMONT, C. - SUZUKI, Y.: Genetic HBGLtem of blood groups in horses. *Genetics*, 50, 1964: 915-929.

STORMONT, C. - SUZUKI, Y. - RHODE, E. A.: Serology of horse blood groups. *Cornell Veter.*, 54, 1964: 439-452. *World Watch List for Domestic Animal Diversity*. Rome, FAO 1993.

Received for publication on September 23, 1996

Contact Address:

Miroslav Kovač, dipl. ing. agr., Valturska 75/5, HR-52100 Pula, Croatia, tel./fax: 052/31 161, e-mail: mkovac@magr.agr.hr

VLIV DÁVKY PMSG NA MNOŽSTVÍ A KVALITU EMBRYÍ U PRASNIC A PRASNIČEK

THE EFFECT OF PMSG DOSE ON EMBRYO NUMBER AND QUALITY IN SOWS AND GILTS

J. Říha¹, J. Vejnar², L. Čunát³

¹Research Institute for Cattle Breeding, Ltd, Rapotín, Czech Republic

²Training Farm of the Secondary Agricultural School at Doudleby nad Orlicí, Czech Republic

³National Breeding Enterprise, Praha, Czech Republic

ABSTRACT: Superovulation in donors is an important factor influencing embryo recovery. Numerous authors agree on the fact that combined applications of PMSG, HCG or LHRH preparations are the best superovulation treatment of sows. A trial was conducted on three groups of sows-donors and one group of gilts. Sows received a diet with Regumate (Hoechst) for 18 days (group 1) or for 17 days (groups 2 and 3). After Regumate feeding had terminated, the donors were administered *i.m.* PMSG (Serum gonadotropin, Bioveta, Ivanovice in Haná) at doses of 1 500 i.u. (group 1, $n = 4$), 2 000 i.u. (group 2, $n = 10$) and 2 500 i.u. (group 3, $n = 9$) in 24 hours while they received a dose of 500 i.u. HCG (Praedyn, Léčiva Praha) in another 72 hours. Two to four inseminations with fresh semen were executed on the next two days (the first in 24 hours after HCG application, and then in 12-hour intervals until estrus termination – until disappearance of standing reflex). Surgical interventions were made to recover embryos on the fourth day after the 1st insemination. Uterine horns (about 30 cm) and oviducts were flushed in a descending order using a Foley catheter. The flushing was taken into a 100ml NTS bottle and stored at a temperature of about 25 °C. Embryos were isolated and subjected to morphological evaluation under a stereomicroscope, followed by cultivation in a complex conditioned medium H-MEMD or M 199 with 20% of fetal calf serum until further use. A total of 15.5 transferable embryos were recovered from four donors (91.2% out of the recovered ones); 14.2 transferable embryos (82.5% out of the recovered ones) were obtained from 10 donors of group 2; nine donors of group 3 produced 12.8 transferable embryos (39.3% out of the recovered ones), which is significantly less than in the two preceding groups ($P < 0.01$). The trial also included 70 clinically healthy nulliparous gilts of the Czech Expressly Meat breed at the age of about 8 months and weight 120–130 kg. These donors received the preparation Evertas-P Lonza Kouřim at a dose of 0.150 g per 2.5 kg feed mash per head/day for 15 days. Twenty-four hours following the last application of Evertas-P the donors received an *i.m.* application of 1 000 i.u. of PMSG (Serum gonadotropin, Bioveta, Ivanovice in Haná). An *i.m.* application of HCG (Praedyn, Léčiva Praha) followed in 76 hours. To make the date of insemination and ovulation more accurate the donors were administered *i.m.* the preparation LHRH in the speciality Supergestran at a dose of 1 ml (i.e. 25 µg leirellin) in 92 hours after PMSG. The gilts were inseminated with homosperm insemination doses when the standing reflex was revealed, reinsemination took place in 12 to 18 hours after the first insemination. Embryos were recovered *post mortem* on day 5 after the first insemination by flushing the prepared uterine horns and using Krebs-Ringer phosphate at a dose of ca. 40 ml per horn. Positive reactions of ovaries to the stimulating procedure were observed in 64 gilts (91.4%) with the total average production of 17.66 ± 9.28 CL, i.e. 16.1 CL per treated donor. Total post mortem recovery on average amounted to 12.64 ± 7.88 embryos (71.6%), out of them 9.08 ± 8.83 were transferable embryos (71.9% out of the recovered ones). The number of unfertilized oocytes and degenerated embryos was approximately the same (1.67 ± 2.40 and/or 1.89 ± 3.20 ; 13.2 and/or 14.9%). The effect of estrus signs and intensity on stimulation and embryo recovery was examined in 33 donors. The animals with expressive signs of estrus produced almost a twofold number of recovered and transferable embryos (10.5 and 8.0 versus 5.2 and 4.7, Tab. III).

sow; gilt; reproduction; superovulation; embryo; estrus

ABSTRAKT: Experiment byl proveden u tří skupin dárkyň-prasnic a jedné skupiny prasniček. U prasnic byl zkrmován Regumate (Hoechst) 18 dní (1. skupina), resp. 17 dní (2. a 3. skupina). Za 24 hodin po ukončení zkrmování Regumate bylo dárkyním *i.m.* aplikováno 1 500 m.j. (1. skupina), 2 000 m.j. (2. skupina) a 2 500 m.j. (3. skupina) PMSG (Sérový gonadotropin, Bioveta, Ivanovice na Haně) a za dalších 72 hodin 500 m.j. HCG (Praedyn, Léčiva Praha). V následujících dvou dnech byly provedeny 2 až 4 inseminace (první 24 hodin po HCG a potom ve 12hodinových intervalech do skončení říje – reflexu nehybnosti) čerstvým semenem. Odběr embryí byl proveden chirurgicky 4. den po 1. inseminaci. Děložní rohy (asi 30 cm) a vejcovody byly propláchnuty descendentně doplněným Krebs-Ringer fosfátem přes Foley katetr. Výplasek byl jímán do 100ml NTS láhve a uchován v teplotě okolo 25 °C. Embrya byla izolována a morfologicky hodnocena pod stereomikrosko-

pem a kultivována v komplexním kondicovaném médiu H-MEMD nebo M 199 s 20 % fetálního telecího séra do dalšího použití. Dále bylo použito 70 klinicky zdravých nulliparních prasniček plemene české výrazně masné ve věku cca 8 měsíců a hmotnosti 120 až 130 kg. Dárkyním byl podáván Evertas-P Lonza Kouřim v dávce 0,150 g v 2,5 kg krmné směsi na kus a den po dobu 15 dní. 24 hodin po poslední dávce Evertasu-P bylo dárkyním *i.m.* aplikováno 1 000 m.j. PMSG. Za 76 hodin následovala *i.m.* aplikace HCG v dávce 500 m.j. Pro zpřesnění termínu inseminace a ovulace byl dárkyním *i.m.* aplikován za 92 hodin po PMSG (16 hodin po aplikaci HCG) preparát LHRH ve specialitě Supergestran v dávce 1 ml (tj. 25 µg lecrelinu). Prasničky byly inseminovány homospermními inseminačními dávkami při zjištění reflexu nehybnosti, reinseminace byla provedena za 12 až 18 hodin po 1. inseminaci. Získávání embryí bylo prováděno *post mortem* 5. den po 1. inseminaci výplachem vypreparovaných děložních rohů doplněným Krebs-Ringer fosfátem v množství cca 40 ml na roh.

prasnice; prasnička; reprodukce; superovulace; embryo; říje

ÚVOD

Superovulace a kvalita získaných embryí jsou velmi důležitými faktory v úspěšnosti metody přenosu embryí. Cílem předkládané práce je zhodnotit výsledky stimulace prasníc-dárkyň embryí při použití různých dávek séra březích klisen – PMSG a kvalitu laparotomicky a *post mortem* získaných embryí.

Přesná kontrola pohlavního cyklu a ovulace u prasnic je nutnou podmínkou pro získání dostatečného počtu oplozených vajíček a embryí v raných vývojových stádiích (Dzuik et al., 1986).

Jako vhodný prostředek kontroly estru a ovulace u prasnic se úspěšně začala používat perorální aplikace progestanů (zinkmetallibur, altrenogest, oxolven, trenbolon) při synchronizaci pohlavního cyklu prasat (Webel, 1976; Schlieper, Holtz, 1984; Ebert et al., 1988; Pursel et al., 1987 a další). Výhodu aplikace těchto přípravků spatřují autoři v tom, že ošetření zvířat je možné začít v libovolný den pohlavního cyklu zkrmováním 15 až 20 mg přípravku na kus a den po dobu 18 dní. Sníží se růst folikulů a v 8. dni po ukončení zkrmování u 90 % zvířat nastupuje folikulární aktivita; harmonizují se pochody na ovariích a synchronizuje se pohlavní cyklus.

Polge et al. (1968) a Jin et al. (1991) doporučují jako vhodný prostředek kontroly estru a ovulace u prasnic přidávání přípravku zinkmetallibur (1 mg/kg živé hmotnosti) do krmiva po dobu 20 dní, tj. asi 100 mg na prasnici a den. Metallibur je nesteroidní odvozen od hydroxinu. Zabraňuje syntéze a vylučování folikulostimulujícího hormonu z hypofýzy bez vyvolání nepříznivých efektů na vaječnících. Metallibur podávaný v potravě má progestagenní účinek a po skončení jeho zkrmování nastupuje synchronizovaný výskyt estru ve vysokém stupni.

Polge et al. (1968) poukazují na vysokou efektivnost použití přípravku metallibur v kombinaci s exogenními gonadotropiny při kontrole ovulace.

Přípravek se stejnými účinky jako zinkmetallibur je altrenogest. Při správné aplikaci působí na synchronizaci estru (Kraeling et al., 1981; Pursel et al., 1981; Webel, Day, 1981; Wall et al., 1985).

Velmi účinný preparát používaný na synchronizaci ovulace je allyltrenbolone, syntetický steroid s progestagenovou aktivitou (Jin et al., 1991). Je to preparát,

který jako orálně aktivní syntetický progestan je perspektivní při kontrole estru a ovulace.

Superovulace dárků je důležitým faktorem ovlivňujícím získání embryí. Mnozí autoři se shodují v názoru, že nejlepší superovulační ošetření u prasat je kombinace přípravků PMSG, HCG popř. LHRH.

Dávky PMSG mohou do určité míry zvyšovat počet ovulovaných oocytů. V literatuře jsou popsány režimy ošetření nejčastěji dávkami 1 000 až 2 000 m.j. PMSG v kombinaci s 500 až 5 000 m.j. HCG (Jin et al., 1991; Illera et al., 1992; Underhill et al., 1991; Oberfranc, 1994). Stanovení optimální dávky je závislé na kvalitě hormonálního preparátu (Oberfranc, 1994). Jak uvádí Niemann (1995), není režim gestagen – PMSG – HCG – LHRH v procesu superovulace prasat překonán.

Postmortální odběr embryí prasat pro experimentální účely je nejčastější; v metodách ET u prasat se nejčastěji uplatňuje chirurgická cesta.

Technika chirurgického odběru je využívána rovněž často, je však provozně náročná. U dárkyň je třeba navodit dostatečnou sedaci a znečitlivění, zvíře umístit ve hřbetní poloze a provést v dostatečně hygienických podmínkách chovu chirurgický odběr embryí, jak souhrnně popisují Oberfranc (1994) a Wallenhorst, Holtz (1995). Jiné způsoby nejsou popsány.

MATERIÁL A METODY

Pokus byl proveden ve dvou částech; v první části (I) byly použity prasnice ve věku jednoho až čtyř let, ve druhé části prasničky (II).

Superovulace prasnic

Jako dárkyň embryí byly použity prasnice plemene bílé ušlechtilé (LW) ve věku jednoho až čtyř let, rozdělené do tří skupin.

SUPEROVULAČNÍ OŠETŘENÍ

Dárkyním byl podáván pro harmonizaci pochodů na ovariích a synchronizaci pohlavního cyklu přípravek Regumate (Hoechst) v dávce 5 ml preparátu (tj. 0,160 g

denně po dobu 18 dní (1. skupina, $n = 4$), resp. 17 dní (2. a 3. skupina, $n = 10$, $n = 9$). Za 24 hodin po ukončení zkrmování Regumate bylo dárkyním *i.m.* aplikováno 1 500 m.j. (1. skupina), 2 000 m.j. (2. skupina) a 2 500 m.j. (3. skupina) PMSG (Sérový gonadotropin, Bioveta, Ivanovice na Hané) a za dalších 72 hodin 500 m.j. HCG (Praedyn, Léčiva Praha). V následujících dvou dnech byly provedeny dvě až čtyři inseminace (první 24 hodin po HCG a potom ve 12hodinových intervalech do skončení říje – reflexu nehybnosti) čerstvým semenem.

ODBĚR EMBRYÍ

Odběr embryí byl proveden chirurgicky čtvrtý den po první inseminaci. Dárkyně byly po 24hodinové hladovce a celkové sedaci a znečitlivění (Hypnodil – Janssen Pharmaceutica Belgie, Stresnil – Janssen Pharmaceutica Belgie, Procain – Léčiva Praha, Narkamon – Léčiva Praha v dávce podle lékopisu dle hmotnosti) umístěny ve hřbetní poloze a byla provedena laparotomie v *linea alba*. Děložní rohy (asi 30 cm) a vejcovody byly propláchnuty descendentně přes Foley katetr. Výplach byl jímán do 100ml NTS láhve a uchován v teplotě okolo 25 °C. Embrya byla izolována a morfologicky hodnocena pod stereomikroskopem a kultivována v komplexním kondiciovaném médiu H-MEMD nebo M 199 s 20 % fetálního telecího séra do dalšího použití.

Superovulace prasiček

Jako dárkyně embryí pro experimentální účely bylo použito 70 klinicky zdravých nulliparních prasiček plemene české výrazně masné ve věku cca 8 měsíců a hmotnosti 120–130 kg.

Dárkyním byl podáván Evertas-P Lonza Kouřim v dávce 0,150 g v 2,5 kg krmné směsi na kus a den po dobu 15 dní za účelem stabilizace fyziologických pochodů na ovariích. 24 hodin po poslední dávce Evertasu-P bylo dárkyním *i.m.* aplikováno 1 000 m.j. PMSG (Sérový gonadotropin, Bioveta Ivanovice na Hané). Za 76 hodin následovala *i.m.* aplikace HCG (Praedyn, Léčiva Praha) v dávce 500 m.j. Pro zpřesnění termínu inseminace a ovulace byl dárkyním *i.m.* aplikován za 92 hodin po PMSG (16 hodin po aplikaci HCG) preparát LHRH ve specialitě Supergestran v dávce 1 ml (tj. 25 µg lecirelinu). U části pokusných prasiček ($n = 33$) byla posouzena intenzita a projevy říje a vyhodnocen vztah k produkci embryí. U 23 prasiček byly říje sledovány jako výborné (podle práce Čeřovský, 1996). V jednotlivých pokusných skupinách byly prasičky s výraznými říjemi inseminovány homospermními inseminacními dávkami při zjištění reflexu nehybnosti, reinseminace byla provedena za 12 až 18 hodin po první inseminaci, prasičky s méně výraznou říjí nebo bez příznaků říje byly inseminovány ve stejných termínech.

Získávání embryí bylo prováděno *post mortem* pátý den po první inseminaci výplachem vypreparovaných

děložních rohů doplněným Krebs-Ringer fosfátem v množství cca 40 ml na roh.

K vyhodnocení bylo použito běžných variačně statistických metod - *t*-test, χ^2 -test (Myslivec, 1957).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Superovulace prasnic

Od 4 dárkyň 1. skupiny ošetřených 1 500 m.j. PMSG bylo získáno průměrně 15,5 vhodných embryí (91,2 %), přičemž bylo získáno 1,3 neoplozených oocytů (7,6 %) a 0,2 degenerovaných embryí (1,2 %) – tab. I.

Od 10 dárkyň 2. skupiny ošetřených 2 000 m.j. PMSG bylo získáno průměrně 17,2 embryí, z toho vhodných bylo 14,2 embryí (82,5 %), degenerovaných 0,2 embryí (1,2 %) a neoplozených oocytů 2,8 (16,3 %). Rozdíl v úrovni stimulace a zisku embryí mezi oběma skupinami byl minimální a statisticky neprůkazný ($P > 0,05$).

Počet CL, počet získaných embryí a neoplozených oocytů u dárkyň stimulovaných dávkou 2 500 m.j. PMSG byl průkazně vyšší ($P < 0,01$), avšak počet vhodných embryí byl neprůkazně nižší ($P > 0,05$). Podíl vhodných embryí byl u dárkyň ošetřených nejvyšší dávkou PMSG (2 500 m.j.) průkazně nižší.

Od 9 dárkyň 3. skupiny bylo chirurgicky získáno průměrně 32,6 všech embryí, ze kterých bylo 12,8 přenosuschopných embryí (39,3 %) a 19,8 neoplozených oocytů (60,7 %), což je průkazně více u počtu embryí, ale průkazně méně v podílu vhodných embryí oproti předcházejícím skupinám ($P < 0,01$).

K úspěšnému získávání embryí u prasat je třeba v první řadě uspokojivě harmonizovat a synchronizovat pohlavní cyklus dárkyň. Synchronizaci pohlavního cyklu zkrmováním preparátů Regumate (Hoechst) a Evertas-P (Lonza Kouřim) bylo dosaženo uspokojivého efektu vyjádřeného počtem žlutých tělísek, resp. počtem získaných embryí.

U prasnic měla zvyšující se dávka PMSG v preparátu Sérový gonadotropin Bioveta zvyšující se trend odezvy u dárkyň. Přibližně stejné stimulační účinky ($17,0 \pm 7,2$ a $19,5 \pm 6,8$ žlutých tělísek) byly zjištěny u dárkyň po aplikaci 1 500 a 2 000 m.j. PMSG, což je průkazně méně než po aplikaci dávky 2 500 m.j. ($P < 0,01$). Obdobný trend výsledků byl zaznamenán i v počtu získaných embryí, avšak počet oplozených vhodných embryí byl téměř shodný a neprůkazně nižší při nejvyšší dávce PMSG a podíl vhodných embryí byl vysoce průkazně nižší po dávce 2 500 m.j. ve srovnání s dávkami 1 500 a 2 000 m.j. ($P < 0,01$) na úkor získaných neoplozených oocytů. Naše výsledky potvrzují poznatky autorů Jin et al. (1991), Illera et al. (1992), Underhill et al. (1991), Oberfranc et al. (1992), Oberfranc (1994) a Niemann (1995). Zvyšující se dávka gonadotropinu zvyšuje odezvu vyjádřenou počtem žlutých tělísek; získání embryí byl

I. Stimulace, odběr a kvalita embryí – Stimulation, embryo recovery and quality

Ukazatel		Skupina ⁹		
		1	2	3
Dávka PMSG ¹	m.j.	1 500	2 000	2 500
Počet zvířat-dárkyň ²	<i>n</i>	4	10	9
Průměrný počet CL ³	\bar{x}	17,0 ^a	19,5 ^a	35,0 ^b
	<i>s_x</i>	7,2	6,8	6,2
Počet získaných embryí celkem ⁴	\bar{x}	17,0 ^a	17,2 ^a	32,6 ^b
	<i>s_x</i>	7,0	5,8	5,7
	%	100	88,2	93,1
Z toho ⁵ – vhodných embryí ⁶	\bar{x}	15,5	14,2	12,8
	<i>s_x</i>	6,5	5,2	7,4
	%	91,2 ^a	82,5 ^a	39,3 ^b
– neoplozených oocytů ⁷	\bar{x}	1,3 ^b	2,8 ^b	19,8 ^a
	<i>s_x</i>	1,3	4,5	6,2
	%	7,6 ^b	16,3 ^b	60,7 ^a
– degenerovaných embryí ⁸	\bar{x}	0,2	0,2	0
	%	1,2	1,2	0

Rozdíly a, b průkazné při $P < 0,01$ – Differences a, b significant at $P < 0.01$

¹PMSG dose, ²number of animals-donors, ³average CL number, ⁴total number of recovered embryos, ⁵out of them, ⁶transferable embryos, ⁷unfertilized oocytes, ⁸degenerated embryos, ⁹group

II. Stimulace a získání embryí – Stimulation and embryo recovery

Ukazatel ¹ (<i>n</i> = 70)	$\bar{x} \pm s_x$	%
Dárkyňe s odezvou ² (<i>n</i> = 64)		91,4
Počet ³		
– žlutých tělísek ⁴ (CL)	17,66 ± 9,28	
– získaných embryí ⁵	12,64 ± 7,88	71,6
Z toho ⁶		
– vhodných embryí ⁷	9,08 ± 8,83	71,9
– degenerovaných embryí ⁸	1,67 ± 2,40	13,2
– neoplozených oocytů ⁹	1,89 ± 3,20	14,9

¹parameter, ²donors with reactions, ³number of, ⁴yellow bodies, ⁵recovered embryos, ⁶out of them, ⁷transferable embryos, ⁸degenerated embryos, ⁹unfertilized oocytes

vyšší, než zjistili Oberfranc et al. (1992), a podíl se pohyboval na horní úrovni uváděné v literatuře (Niemann, 1995), avšak stimulace byla vyšší než např. v práci autorů Guthrie et al. (1977). Oplozenost oocytů (počet vhodných embryí) byla u prvních dvou skupin (1 500 a 2 000 m.j. PMSG) vysoká. Při dávce 1 500 m.j. preparátu činil podíl vhodných embryí 91,2 % a snižoval se až na 39,3 % u dárkyň ošetřených 2 500 m.j. PMSG. Obdobný trend zaznamenali Oberfranc (1994) a Niemann (1995). Tento trend je znám i z experimentů se superovulací u skotu; zvyšování dávky PMSG zvyšovalo počet CL, získání embryí celkem, ale počet a podíl vhodných embryí (míra oplození) klesaly na úkor vyššího počtu neoplozených oocytů (Říha, 1990 a autoři v této práci citovaní).

V našem experimentu se dávka 1 500 až 2 000 m.j. PMSG ukázala jako vhodná. Obecně lze souhlasit s názorem, který uvádí Oberfranc (1994), že stanovení optimální dávky je závislé na kvalitě a značce hormonálního preparátu PMSG. Např. Niemann (1995) a Wallenhorst, Holtz (1995) používají i dávky 3 000 m.j. PMSG v různých komerčních preparátech.

Superovulace prasnic

Při superovulaci prasnic byla použita jednotná dávka 1 000 m.j. PMSG.

Pozitivní odezva ovarií na použitý stimulační postup byla zaznamenána u 64 prasnic (91,4 %) s celkovou průměrnou odezvou 17,66 ± 9,28 CL, tj. 16,1 CL na

III. Zisk a kvalita embryí od prasniček s výraznou říjí a bez říje při provedené inseminaci – Embryo recovery and quality in gilts with expressive signs of estrus and in those showing no signs of estrus after artificial insemination

Ukazatel		Dárkyně ⁹			
		s výraznou říjí 5. den po PMSG ¹⁰		bez říje 5. den po PMSG ¹¹	
		a	b	a	b
Počet zvířat celkem ¹	<i>n</i>	23	23	10	10
Počet zvířat s nízkou odezvou (do 4 CL) ²	<i>n</i>	2		1	
Průměrný počet CL ³	\bar{x}	3		3	
Počet zvířat s odezvou nad 5 CL ⁴	<i>n</i>	21		9	
Počet zvířat ⁵	<i>n</i>	20 ^{A)}		4 ^{B)}	
Průměrný počet ⁶ :					
– CL	\bar{x}	17,3	15,8	15,2	13,7
– získaných embryí ⁷	\bar{x}	12,1	10,5	13,0	5,2
– vhodných embryí ⁸	\bar{x}	9,2	8,0	11,7	4,7

a) pro zvířata podle legendy – for the animals described in the legend

b) pro všechna ošetřená zvířata, *n* = 23, resp. 10 – for all treated animals, *n* = 23 and/or 10

A) jedna dárkyně neposkytla embrya při stimulaci 10 CL, další propočít pro *n* = 20 – one donor did not produce any embryos after 10 CL stimulation, another calculation for *n* = 20

B) pět dárkyň neposkytlo embrya, další propočít pro *n* = 4 – five donors did not produce any embryos, another calculation for *n* = 4

¹total number of animals, ²number of animals with low production (less than 4 CL), ³average number of CL, ⁴number of animals with production of 5 CL and more, ⁵number of animals, ⁶average number of, ⁷recovered embryos, ⁸transferable embryos, ⁹donors, ¹⁰with expressive signs of estrus on day 5 after PMSG application, ¹¹without any signs of estrus on day 5 after PMSG application

ošetřenou dárkyni. Celkem bylo *post mortem* získáno průměrně 12,64 ± 7,88 embryí (71,6 %), z toho bylo 9,08 ± 8,83 vhodných embryí (71,9 % ze získaných). Neoplozených oocytů a degenerovaných embryí bylo přibližně stejně (1,67 ± 2,40, resp. 1,89 ± 3,20; 13,2 resp. 14,9 %).

Stimulace prasniček po dávce 1 000 m.j. PMSG byla stejná jako u prasnic po dávkách 1 500 a 2 000 m.j. PMSG (tab. I a II), avšak zisk embryí byl poněkud nižší; podíl zvířat s odezvou byl vysoký – činil 91,4 % a byl na úrovni srovnatelné s jinými experimenty (Jin et al., 1991; Niemann, 1995 a další). Postmortální zisk a počet a podíl embryí byl poněkud nižší než v experimentech popsaných autory Oberfranc et al. (1992) a Oberfranc (1994), a to při použití dávky 1 500 m.j. PMSG preparátu Sérový gonadotropin (Bioveta Ivanovice na Hané).

V části experimentu superovulace prasniček II (*n* = 33 dárkyň) byl sledován vztah projevu a intenzity říje ke stimulaci a zisku embryí.

Z tab. III je zřejmé, že plnohodnotná říje byla zjištěna u 23 ošetřených zvířat, tj. 74,2 %, v průměru pátý den po ošetření PMSG. Zbývajících 10 prasniček bylo v tomto termínu plošně inseminováno bez ohledu na zevní příznaky říje. U všech 10 zvířat byla po porážce zjištěna na ovariích žlutá tělíska (v jednom případě pouze 3 CL), ale od šesti z těchto zvířat nebyla získána žádná embrya.

U zvířat s výraznou říjí byl zjištěn téměř dvojnásobný počet získaných a vhodných embryí. Příznaky říje mohou tedy být významným faktorem v předpovědi úspěšnosti ošetření. V dostupné literatuře však není o tomto jevu zmínka.

LITERATURA

- ČEŘOVSKÝ, J.: Aktuální problémy reprodukce prasnic. In: Sem. Aktuální poznatky chovu prasat, VÚCHS Rapotín, 11. 6. 1996.
- DZUIK, P. J. – POLGE, C. – ROWSON, L. E.: Intrauterine migration of embryos in swine following egg transfer. *J. Anim. Sci.*, 23, 1986: 37–42.
- EBERT, K. M. – LOW, M. – OVERSTEON, E. – BAILE, C. F. – ROBERTS, T. N. – LEE, A. – MANDEL, G. – GOODMAN, F.: A maloney MLV-rat somatotropin fusion gene produced biologically active somatotropin in a transgen pig. *Molec. Endocrinol.*, 2, 1988: 277–283.
- GUTHRIE, H. D.: Induction of ovulation and fertility in prepubertal gilts. *J. Anim. Sci.*, 45, 1977: 1360–1367.
- ILLERA, M. J. – LORENZO, P. – SCHVANN, G. – PORTELA, A. A. – PETERS, R. M.: A simple medium support *in vitro* development of one cell embryos from miniature pigs to the blastocyst stage. *Theriogenology*, 37, 1992: 225.
- JIN, D. I. – PETERS, R. M. – JOHNSON, B. H. – SHUMAN, R. M.: Survival of early preimplantation porcine embryo after co-culture with cell producing an avian retrovirus. *Theriogenology*, 34, 1991: 521–526.
- KRAELING, R. R. – RAMPACEK, G. B. – FIORELLO, N. A.: Inhibition of pregnancy with Indomethacin in mature gilts and prepubertal gilts induced to ovulate. *Biol. Reprod.*, 30, 1981.
- MYSLIVEC, V.: Statistické metody zemědělského a lesnického výzkumnictví. Praha, SZN 1957.
- NIEMANN, H.: Proc. 30th Symp. Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategy, Milano (Italy), 11.–13. 9. 1995.

- OBERFRANC, M.: Optimalizacia metód získavania a prenosu včasných embryí pri tvorbe transgénnych ošípaných. [Kandidátská disertačná práca.] Nitra, 1994. – Výskumný ústav živočíšnej výroby.
- OBERFRANC, M. – GRAFENAU, E. – KUBOVIČOVÁ, E. – PIVKO, J. – ANTALOVÁ, H. – LAURINCÍK, J.: Využitie Evertasu P – zinkmetallibu v procese synchronizácie a superovulácie ošípaných. Věd. Práce VÚŽV Nitra, 25, 1992: 39–46.
- POLGE, C. – DAY, B. N. – GROVES, T. W.: Synchronization of ovulation and artificial insemination in pigs. Vet. Rec., 83, 1968: 136–142.
- PURSEL, V. G. – ELLIOTT, D. O. – NEWMANN, C. W. – STAIGMILLER, R. B.: Synchronization of oestrus in gilts with allyl trenbolone: Fecundity after natural service and insemination with frozen semen. J. Anim. Sci., 52, 1981: 130–133.
- PURSEL, V. G. – REXROAD, C. E., Jr. – BOLT, D. J. – MILLER, K. F. – WALL, R. J. – HAMMER, R. E. – PINKERT, C. A. – PALMITER, R. D. – BRINSTER, R. L.: Progress on gene transfer in farm animals. Vet. Immunol. Immunopathol., 17, 1987: 303–312.
- ŘÍHA, J.: Biologická hlediska přenosu embryí u skotu. [Doktorská disertační práce.] Rapotín, 1990. 228 s. – Výskumný ústav pro chov skotu.
- SCHLIEPER, B. – HOLTZ, W.: Some factors affecting the quality of pig embryos collected for transfer. Proc. 10th Int. Congr. Anim. Reprod. Artif. Insem., Urbana, Champaign, June 1984: 10–14.
- UNDERHILL, K. L. – DOVNEY, B. R. – McFARLANE, C. – KING, W. A.: Cytogenetic analysis of day-4 embryos from PMSG/HCG treated prepubertal gilts. Theriogenology, 35, 1991: 779–785.
- WALL, R. J. – PURSEL, V. G. – HAMMER, R. E. – BRINSTER, R. L.: Development of porcine ova that were centrifugated to permit visualization of pronuclei and nuclei. Biol. Reprod., 32, 1985: 645–651.
- WALLENHORST, S. – HOLTZ, W.: Transfer of pig embryos to different uterine sites. 11e Réunion A.E.T.E., Hannover, 8.–9. 9. 1995: 256.
- WEBEL, S. K.: Estrus control in swine with a progestogen. J. Anim. Sci., 42, 1976: 1385 (Abstr.).
- WEBEL, S. K. – DAY, B. N.: The control of ovulation. Control of pig reproduction. In: 33rd Easter School in Agricultural Science, University of Nottingham, London, UK, Butterwords 1981: 197–210.

Došlo 21. 11. 1996

Kontaktní adresa:

Doc. Ing. Jan Říha, DrSc., Výskumný ústav pro chov skotu, s. r. o., Rapotín, 788 13 Vikýřovice, Česká republika, tel.: 0649/21 41 01, fax: 0649/21 57 02

POROVNÁNÍ ENZYMATICKÉ METODY A METODY MOBILE BAG PRO STANOVENÍ STŘEVNÍ STRAVITELNOSTI NEDEGRADOVANÉHO PROTEINU KRMIV

COMPARISON OF ENZYMATIC TECHNIQUE AND MOBILE BAG TECHNIQUE FOR DETERMINATION OF INTESTINAL DIGESTIBILITY OF FEEDSTUFF UNDEGRADABLE PROTEIN

O. Tománková, P. Homolka

Research Institute of Animal Production, Praha-Uhřetěves, Czech Republic

ABSTRACT: The goal of this study was to compare the values of intestinal digestibility of undegraded crude protein in the rumen of ruminants, determined by a mobile bag technique in cannulated animals and by an enzymatic technique using pancreatin, for a wider range of feedstuffs. The basic set of feedstuffs was divided into subsets of bulk feeds, concentrates and extracted meals with feedstuffs from animal sources for better specification of predicted values of intestinal digestibility. The relation of values determined by a mobile bag technique to values determined by an enzymatic technique with pancreatin was expressed by equations of linear regression for the separate subsets of feedstuffs. Tab. I shows parameters of equations for all sets while the relation between values of intestinal digestibility of undegraded crude protein in the rumen obtained by a mobile bag technique and by an enzymatic technique is shown in Figs. 1–3. The largest subset of bulk feeds ($n = 39$), which included green forage of alfalfa, clover, meadow grass, clover-grass, meadow foxtail and timothy, silage of corn, beet tops, alfalfa, clover, crushed beans, barley and pea with wheat, grass silage with higher dry matter content, and alfalfa hay and barley straw, had the lowest value of correlation coefficient ($r = 0.760$, %RSD = 7.69). The highest value of correlation coefficient was recorded for the subset of extracted meals (cottonseed, rapeseed, soybean, linseed, groundnuts and sesame) with feedstuffs from animal sources (fish and meat-bone meals and blood meal) – $r = 0.941$, %RSD = 3.48, $n = 14$. The third subset, consisting of grains ($n = 22$), i.e. wheat, barley, rye, oats, corn, had the correlation coefficient $r = 0.852$ and %RSD = 5.05.

ruminants; undegradable protein; intestinal digestibility; proteolytic enzymes; regression equation

ABSTRAKT: Porovnávali jsme hodnoty střevní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bacheru přežvýkavců, stanovené metodou mobile bag na kanylovaných zvířatech a metodou enzymatickou s pankreatinem, u širšího souboru krmiv. Pro upřesnění predikovaných hodnot střevní stravitelnosti byl základní soubor ($n = 75$) rozdělen na podskupiny objemných krmiv, jádrných krmiv a extrahovaných šrotů s krmivý živočišného původu. Vztah hodnot stanovených metodou mobile bag k hodnotám stanoveným metodou enzymatickou s pankreatinem byl vyjádřen rovnicemi lineární regrese pro jednotlivé skupiny krmiv. Nejširší podskupina objemných krmiv ($n = 39$), která zahrnovala zelenou píci vojtěšky, jetele, lučního porostu, jetelotrávy, psárky a bojínku, siláže kukuřice, skrojků řepy, vojtěšky, jetele, drtí bobových, ječných a hrachovo-pšeničných a travní siláž o vyšší sušinitě, seno vojtěškové a slámu ječnou, měla nejnižší hodnotu korelačního koeficientu $r = 0,760$ a %RSD = 7,69. Nejvyšší hodnota korelačního koeficientu byla u podskupiny extrahovaných šrotů (bavlna, řepka, sója, len, podzemnice, sezam) s krmivý živočišného původu (rybí a masokostní moučka a krevní šrot) – $r = 0,941$, %RSD = 3,48, $n = 14$. Třetí podskupinu tvořila jádrná krmiva ($n = 22$), tj. pšenice, ječmen, oves, žito, kukuřice – $r = 0,852$, %RSD = 5,053.

přežvýkavci; nedegradovaný protein; střevní stravitelnost; proteolytické enzymy; regresní rovnice

ÚVOD

Hlubší poznání nutričních požadavků zvířat a nutriční hodnoty krmiv je jedním z hlavních předpokladů dalšího zvyšování užitkovosti skotu a efektivního využití zdrojů krmivové základny. Proto se dnes věnuje

velká pozornost hodnocení kvality krmiv. V poslední době došlo k podstatným změnám ve způsobu hodnocení dusíkatých látek v krmivech. Nová kritéria hodnocení jsou v souladu s fyziologickými pochody trávení dusíkatých látek u přežvýkavců, poskytují objektivní ohodnocení různých zdrojů dusíkatých látek vstupujících

cích do střeva, respektují degradovatelnost dusíkatých látek v bacheru a vliv příjmu energie na mikrobiální proteosyntézu a zahrnují stěvní stravitelnost dusíkatých látek krmiv.

Doposud bylo navrženo několik nových systémů hodnocení krmiv pro přežvýkavce. Přes společné základy těchto systémů existují rozdíly mezi jednotlivými zeměmi, jako důsledek variability podmínek praxe a aplikace experimentálně zjištěných hodnot. Ve většině zemí byly nové systémy hodnocení testovány v pokusech s domácími plemeny a krmiv. Systém zaváděný v České republice je založen na jednotkách PDI, převzatých z francouzského systému PDI (V é r i t é , P e y r a u d , 1988). Hlavním znakem nového systému je oddělené hodnocení přívodu proteinu pro bacherové mikroorganismy a pro organismus hostitele a zavedení hodnoty degradovatelnosti. Pro stanovení degradovatelnosti dusíkatých látek v bacheru se používají metody *in sacco* (O r s k o v , M c D o n a l d , 1979) a *in vitro* (A u f r é r e et al., 1991; P o o s - F l o y d et al., 1985). Hodnoty stěvní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bacheru se stanovují metodou mobile bag na kanylovaných zvířatech (F r y d r y c h , 1992; H o m o l k a et al., 1996) a výpočtem z hodnot celkové stravitelnosti a degradovatelnosti dusíkatých látek (T ř i n á c t ý et al., 1996). Jako perspektivní se ověřují enzymatické metody *in vitro* realizovatelné v běžných laboratořích. A n t o n i e w i c z o v á et al. (1992) ověřovali enzym pankreatin, S e t a l a et al. (1984) testovali enzym trypsin a chymotrypsin.

V předešlé práci (T o m á n k o v á , H o m o l k a , 1995) jsme se zaměřili na výběr a ověření vhodné metodiky pro stanovení stěvní stravitelnosti nedegradovaných dusíkatých látek v bacheru metodou *in vitro*. Byla vybrána metoda s enzymem pankreatinem otestovaná na malém souboru krmiv ($n = 16$). Tato práce je zaměřena na širší soubor testovaných krmiv rozdělených do podskupin a na odvození regresních rovnic stěvní stravitelnosti nedegradovaných dusíkatých látek krmiv v bacheru pro tyto dané podskupiny.

MATERIÁL A METODA

U souboru krmiv ($n = 75$) byla stěvní stravitelnost nedegradovaných dusíkatých látek v bacheru stanovena metodou *in sacco* s mobilními sáčky na kanylova-

ných kravách a enzymatickou metodou *in vitro* s pankreatinem. Popis obou metod byl uveřejněn v předcházející práci (T o m á n k o v á , H o m o l k a , 1995).

VÝSLEDKY A DISKUSE

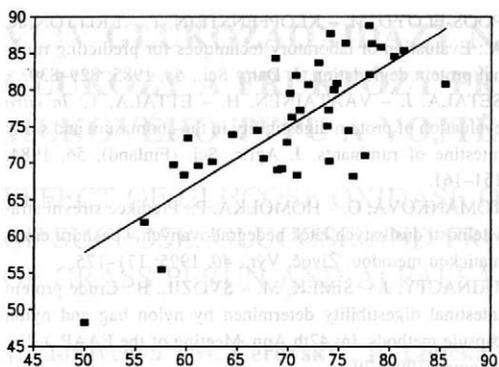
Vztah hodnot stanovených metodou mobile bag k hodnotám stanoveným enzymaticky s pankreatinem byl vyjádřen rovnicemi lineární regrese (tab. I). Základní soubor obsahoval 75 vzorků krmiv. Do souboru byly zahrnuty základní druhy krmiv. Pro upřesnění predikovaných hodnot stěvní stravitelnosti byl základní soubor rozdělen na podskupiny objemných krmiv, jadrných krmiv a extrahovaných šrotů s krmiv živočišného původu. Nejvyšší počet testovaných krmiv byl u podskupiny objemných krmiv ($n = 39$), mezi kterými se vyskytuje velká variabilita stanovených hodnot. Zaměřili jsme se na tuto podskupinu, neboť většina autorů, např. A n t o n i e w i c z o v á et al. (1992), C a l s a - m i g l i a et al. (1995), testovala použité enzymy pouze na krmivech jadrných a živočišného původu. Objemná krmiva přitom podléhají velké variabilitě hodnot stěvní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bacheru. Podskupina zahrnovala: 24 krmiv zelené píce (jetel, vojtěška, luční porost, jetelotráva, bojínek a psárka), 12 vzorků siláží (kukuřice, skrojky řepy, vojtěška, jetel a drtě bobové, ječné, hrachovo-pšeničné) a po jednom vzorku, travní siláže o vyšší sušinitě, vojtěškového sena a ječné slámy. Hodnota korelačního koeficientu v této podskupině byla $r = 0,760$ a reziduální směrodatná odchylka (%RSD) činila 7,69. Nejvyšší hodnota korelace mezi metodou mobile bag a enzymatickou metodou byla u podskupiny extrahovaných šrotů s krmiv živočišného původu (bavlna, sója, řepka, sezam, len, podzemnice, rybí a masokostní moučka a krevní šrot), a to $r = 0,941$ s nejnižší hodnotou %RSD = 3,48. Tato podskupina obsahovala nejnižší počet zkoumaných krmiv ($n = 14$). Do podskupiny jadrných krmiv byly zařazeny základní cereálie (pšenice, ječmen, žito, oves, kukuřice). V této skupině byly získány hodnoty $r = 0,852$ a %RSD = 5,05. Parametry rovnic pro dané podskupiny jsou uvedeny v tab. I. Vztah hodnot stěvní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bacheru, stanovených metodou mobile bag a enzymaticky s pankreatinem, je znázorněn na obr. 1 až 3.

I. Lineární regrese mezi hodnotami zjištěnými enzymatickou metodou a metodou mobile bag u jednotlivých skupin krmiv – Linear regression between the values determined by an enzymatic technique and by a mobile bag technique for the particular sets of feedstuffs

Soubory krmiv ¹	<i>n</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i>	RSD	%RSD
Objemná krmiva ²	39	14,76	0,86	0,760	5,806	7,69
Jadrná krmiva ³	22	-17,80	1,27	0,852	4,519	5,05
Extrahované šrot y a krmiva živočišného původu ⁴	14	16,90	0,86	0,941	3,155	3,48

n – počet testovaných krmiv, *a*, *b* – parametry rovnice, *r* – korelační koeficient, RSD – reziduální směrodatná odchylka
n – sample size, *a*, *b* – parameters of equation, *r* – correlation coefficient, RSD – residual standard deviation

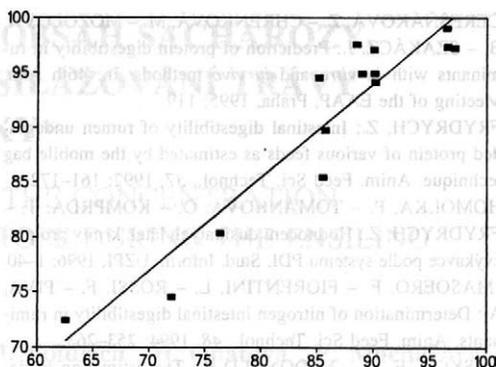
¹sets of feedstuffs, ²bulk feeds, ³grains, ⁴extracted meals and feedstuffs from animal sources



1. Srovnání hodnot střevní stravitelnosti nedegradovaných dusíkatých látek v bachoru získaných metodou enzymatickou a metodou mobile bag: objemná krmiva ($n = 39$), $y = 14,76 + 0,86x$ – Comparison of the values of intestinal digestibility of undegraded protein in rumen obtained by an enzymatic technique and a mobile bag technique: bulk feeds ($n = 39$), $y = 14,76 + 0,86x$

Pro obr. 1–3: osa x – enzymatická střevní stravitelnost (%), osa y – střevní stravitelnost metodou mobile bag (%)

For Figs. 1–3: x-axis – enzymatic intestinal digestibility (%), y-axis – intestinal digestibility by a mobile bag technique (%)



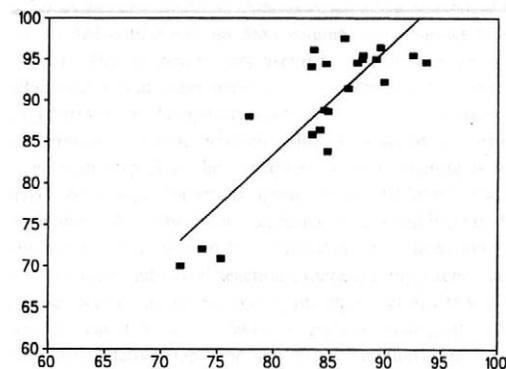
3. Srovnání hodnot střevní stravitelnosti nedegradovaných dusíkatých látek v bachoru získaných metodou enzymatickou a metodou mobile bag: extrahované šroty s krmivý živočišného původu ($n = 14$), $y = 16,90 + 0,86x$ – Comparison of the values of intestinal digestibility of undegraded protein in rumen obtained by an enzymatic technique and a mobile bag technique: extracted meals and feedstuffs from animal sources ($n = 14$), $y = 16,90 + 0,86x$

V naší práci jsme se zaměřili na stanovení střevní stravitelnosti nedegradovaných dusíkatých látek v bachoru přežvýkavců metodou mobile bag na kanylovaných zvířatech a metodou enzymatickou. Považovali jsme za účelné rozšířit okruh zkoumaných krmiv, čímž jsme dosáhli rozdělení základní skupiny krmiv na tři podskupiny. Vztah hodnot stanovených metodou mobile bag k hodnotám stanoveným enzymatickou metodou byl vyjádřen rovnicemi lineární regrese pro jednotlivé skupiny krmiv.

Podle našeho názoru je možné, vzhledem k získaným hodnotám, stanovovat střevní stravitelnost nedegradovaných dusíkatých látek i u skupiny objemných krmiv. Nižší hodnoty r a RSD vzhledem k ostatním skupinám jsou zapříčiněny variabilitou testovaných objemných krmiv v rámci skupiny (odlišné botanické druhy, vegetační fáze a stupně lignifikace pletiv, technologie sklizně a konzervace, klimatické a jiné faktory).

LITERATURA

- ANTONIEWICZ, A. M. – VAN VUUREN, A. M. – VAN DER KOELEN, C. J. – KOSMALA, J.: Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of formaldehyde-treated feedstuffs measured by mobile bag and *in vitro* technique. Anim. Feed Sci. Technol., 39, 1992: 111–124.
- AUFRÈRE, J. – GRAVIOU, D. – DEMARQUILLY, C. – VÉRITÉ, R. – MICHALET-DOREAU, B. – CHAPOUTOT, P.: Prediction *in situ* degradability of feed proteins in the rumen by two enzymatic methods (solubility and enzymatic degradation). Anim. Feed Sci. Technol., 33, 1991: 97–116.
- CALSAMIGLIA, S. – STERN, M. D.: A three-step *in vitro* procedure for estimating intestinal digestion of protein in ruminants. J. Anim. Sci., 73, 1995: 1459–1465.



2. Srovnání hodnot střevní stravitelnosti nedegradovaných dusíkatých látek v bachoru získaných metodou enzymatickou a metodou mobile bag: jádrná krmiva ($n = 22$), $y = -17,80 + 1,27x$ – Comparison of the values of intestinal digestibility of undegraded protein in rumen obtained by an enzymatic technique and a mobile bag technique: grains ($n = 22$), $y = -17,80 + 1,27x$

V literatuře se častěji objevují hodnoty střevní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bachoru přežvýkavců stanovené metodou mobile bag (Masero et al., 1994; Frydrych, 1992; Homolka et al., 1996 a další) než hodnoty stanovené enzymaticky. Proteolytické enzymy testovali Calsamiglia et al. (1995) na krmivech živočišného původu. Antoniewiczová et al. (1992) testovali pankreatin na jádrných krmivech. Čerešňáková et al. (1995) stanovili stravitelnost proteinu enzymy trypsin-chymotrypsin u skupiny jádrných krmiv.

- ČEREŠŇÁKOVÁ, Z. – CHRENKOVÁ, M. – MOZOLOVÁ, B. – SZAKÁČZ, J.: Prediction of protein digestibility in ruminants with *in vitro* and *in vivo* methods. In: 46th Ann. Meeting of the EAAP, Praha, 1995: 119.
- FRYDRYCH, Z.: Intestinal digestibility of rumen undegraded protein of various feeds as estimated by the mobile bag technique. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 37, 1992: 161–172.
- HOMOLKA, P. – TOMÁNKOVÁ, O. – KOMPRDA, T. – FRYDRYCH, Z.: Hodnocení dusíkatých látek krmiv pro přežvýkavce podle systému PDI. *Stud. Inform. ÚZPI*, 1996: 1–40.
- MASOERO, F. – FIORENTINI, L. – ROSSI, F. – PIVA, A.: Determination of nitrogen intestinal digestibility in ruminants. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 48, 1994: 253–263.
- ORSKOV, E. R. – McDONALD, J.: The estimation of degradability in the rumen from incubation measurements weighed according to the rate of passage. *J. Agric. Sci.*, 92, 1979: 499–503.
- POOS-FLOYD, M. – KLOPFENSTEIN, T. – BRITTON, R. A.: Evaluation of laboratory techniques for predicting ruminal protein degradation. *J. Dairy Sci.*, 68, 1985: 829–839.
- SETALA, J. – VAATAINEN, H. – ETTALA, T.: *In vitro* evaluation of protein digestibility in the abomasum and small intestine of ruminants. *J. Agric. Sci. (Finland)*, 56, 1984: 151–161.
- TOMÁNKOVÁ, O. – HOMOLKA, P.: Predikce stěvní stravitelnosti dusíkatých látek nedegradovaných v bachoru enzymatickou metodou. *Živoč. Výr.*, 40, 1995: 171–175.
- TRÍNÁCTÝ, J. – ŠIMEK, M. – SVOZIL, B.: Crude protein intestinal digestibility determined by nylon bag and nylon capsule methods. In: 47th Ann. Meeting of the EAAP, Lillehammer, 1996: 79.
- VÉRITÉ, R. – PEYRAUD, J. L.: Nutrition Azotée. In: JARRIGE, R. (ed.): *Alimentation des Bovins, Ovins et Caprins*. INRA, Paris, 1988: 75–93.

Došlo 15. 11. 1996

Kontaktní adresa:

Ing. Olga Tománková, Výzkumný ústav živočišné výroby, 104 00 Praha 10-Uhřetěves, Česká republika, tel.: 02/67 71 17 47, fax: 02/67 71 07 79

VLIV GLUKÓZAOXIDÁZY NA OBSAH SACHARÓZY, GLUKÓZY A FRUKTÓZY PŘI SILÁŽOVÁNÍ TRÁVY JÍLKOVÉHO TYPU A VOJTĚŠKY*

EFFECT OF GLUCOSE OXIDASE ON THE CONCENTRATION OF SUCROSE, GLUCOSE AND FRUCTOSE DURING THE ENSILING OF GRASS PERUN AND ALFALFA

J. Moravcová¹, M. Čeřovský¹, R. Loučka², M. Voldřich¹, H. Opatová¹, E. Macháčová²

¹ *Institute of Chemical Technology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Praha, Czech Republic*

² *Research Institute of Animal Production, Praha-Uhřetěves, Czech Republic*

ABSTRACT: Wilted grass Perun (*Lolium multiflorum* Lam. x *Festuca pratensis* Huds., 2n = 28) with dry matter (DM) 33.6% and alfalfa (*Medicago sativa* L.) with 33.5% DM were ensiled untreated (control) or treated with both the inoculant of Lactobacillus (Microsil) and the enzyme complex of cellulase, hemicellulase and glucose oxidase (GO) which contained the identical inoculant (Bactozyme). Sucrose, glucose and fructose were extracted with boiling ethanol (70%, v/v) and the individual sugars were determined using ligand exchange chromatography on a strong cation exchanger in Na⁺ form with water as an eluent at 53 °C. Ribose was used as an internal standard. Under these conditions, the high-molecular compounds are eluted with a column dead volume, disaccharides give only one peak, and monosaccharides are separated efficiently (Tab. I). This method is very useful for routine analyses of natural materials. The chromatograms of both grass Perun and alfalfa extracts are depicted in Fig. 1. Among sugars tested, sucrose disappeared most rapidly in all experiments (Figs. 2 and 3). Interestingly, the hydrolysis of sucrose was a first-order reaction characterized by a linear dependence of logarithm of the concentration on time between 3 and 30 hours of the ensiling. The calculated rate constants (Tab. II) were practically the same with respect to the experimental error. Sucrose is most probably hydrolyzed with the original microflora, and the half-time of this reaction is approximately 10 hours. The changes in the glucose concentration (Figs. 4 and 5) reflected a complex role of this monosaccharide: its content increased by the hydrolysis of sucrose or polysaccharides and glucose was simultaneously consumed by fermentation or by the action of GO. The final concentration profile is determined by the relative rates of these individual reactions, therefore any attempt at the application of a simple mathematic description need not be correct (Š p i č k a, 1995). The significant effect of GO was found in the initial stage of ensiling where glucose concentration was decreased by its oxidation to gluconic acid as it had been described previously (R a u r a m a a et al., 1991). In the homofermentative stage, the rate of consumption of both glucose and fructose was higher in the treated silages than in the control due to the activity of an inoculant (Figs. 4–7). Surprisingly, GO seemed to have the pronounced influence on the fructose concentration (Figs. 6 and 7). The content of fructose was not changed during initial 20 h although it was formed from sucrose by hydrolysis. Furthermore, this observation is illustrated by the changes in the sum of glucose and fructose concentrations which was remained rather constant (Fig. 8). The GO probably activated the original microflora which isomerized fructose to glucose within the heterofermentative stage of ensiling. The addition of glucose oxidase has the greatest effect in the initial hours of ensiling when glucose is rapidly oxidized to gluconic acid. Glucose oxidase also activates the original plant microflora which isomerizes fructose to glucose. This observation had not been described previously.

ensiling; glucose oxidase; sucrose; glucose; fructose

ABSTRAKT: Byl sledován obsah sacharózy, glukózy a fruktózy během 100 hodin laboratorního silážování zavdlé trávy jílčkového typu Perun (*Lolium multiflorum* Lam. x *Festuca pratensis* Huds., 2n = 28) a vojtěšky (*Medicago sativa* L.) ve třech paralelních pokusech: kontrolní, po ošetření inokulantem mléčného kvašení Microsil a po ošetření probioticko-enzymovým komplexem Bactozym obsahujícím i glukózooxidázu. Sacharidy byly extrahovány vodným etanolem a stanovovány kapalinovou chromatografií na silně kyselém iontoměničči s ribózou jako vnitřním standardem. Sacharóza byla hydrolyzována účinkem originální mikroflóry stejnou rychlostí s poločasem reakce 10 hodin ve všech pokusech. Vliv glukózooxidázy byl

* Práce vznikla za finanční podpory grantu č. 507/94/1297 Grantové agentury České republiky.

prokázán v raném stadiu silážování trávy Perun i vojtěšky, kdy obsah glukózy klesal oxidací na glukonovou kyselinu. Dále glukózaoxidáza aktivovala originální mikroflóru, která izomerizovala fruktózu na glukózu. V homofermentativní fázi silážování byla rychlost utilizace glukózy a fruktózy vyšší u ošetřených siláží než u siláže kontrolní.

silážování; glukózaoxidáza; sacharóza; glukóza; fruktóza

ÚVOD

Jedním ze základních kritérií používaných k hodnocení jakosti píce je průběh jejich silážování je koncentrace sacharidů rozpustných ve vodě (WSC), jejichž hlavními zástupci jsou sacharóza, glukóza, fruktóza a fruktózy. Cílem této práce je sledovat dynamiku změn obsahu sacharózy, glukózy a fruktózy během prvních 100 hodin silážování trávy Perun (*Lolium multiflorum* Lam. x *Festuca pratensis* Huds., 2n = 28) a vojtěšky (*Medicago sativa* L.) po ošetření probioticko-enzymovým prostředkem s glukózaoxidázou (GO). Výsledky by měly přispět k objasnění úlohy GO.

Pro stanovení WSC jsou nejčastěji popisovány tři metody: neselektivní spektrofotometrická metoda podle Somogyi (1945), založená na stanovení všech redukujících sacharidů jako glukózy, plynová chromatografie, která vyžaduje poměrně náročnou úpravu vzorku včetně derivatizace (Špička, 1995; Jankovský et al., 1985; Hartman, 1981; McDonald, Henderson, 1964), a enzymové metody (Steen, Larsson, 1986), které jsou rovněž dost pracné, zejména pro stanovení sacharózy, glukózy a fruktózy vedle sebe. Každá uvedená metoda pracuje s jinou přesností a postihuje jiné sacharidy, a publikované výsledky jsou proto obtížně porovnatelné. Další komplikace jsou způsobeny tím, že doba silážování použitá v jednotlivých pracích je různě dlouhá a většinou se pohybuje v desítkách dnů. Přitom novější práce (Špička, 1995; Lundén Pettersson, Lindgren, 1991) popisují relativně komplikované změny v koncentraci sacharózy, glukózy a fruktózy během první fáze silážování. Sacharóza ubývá nejrychleji, je prakticky úplně hydrolyzována během 24 až 48 hodin silážování (Špička, 1995; Lundén Pettersson, Lindgren, 1991). Glukóza a fruktóza jsou využívány podstatně pomaleji, přičemž glukóza rychleji než fruktóza, u které může být koncentrační profil ovlivněn štěpením fruktózanů (Špička, 1995).

Vliv GO byl zatím sledován jen u sterilních siláží s přidavkem čisté glukózy (Rauramaa et al., 1991). Během prvních 10 hodin byl nalezen největší pokles koncentrace glukózy, která byla oxidována na glukonovou kyselinu.

MATERIÁL A METODY

Způsob laboratorního silážování, popis pícnin a charakteristika použitých preparátů jsou uvedeny v práci autorů Čerovský et al. (1997). Microsil obsahuje inokulant mléčného kvašení, Bactozym má vedle stej-

ného inokulantu ještě enzymový komplex složený z celulózy, hemicelulózy a GO. Siláže byly založeny vždy dvě vedle sebe a uváděné hodnoty jsou průměrem ze dvou stanovení. Pokusy jsou označeny písmeny: J – tráva Perun, V – vojtěška, O – neošetřená siláž, M – siláž ošetřená Microsilem, B – siláž ošetřená Bactozymem.

Stanovení sušiny (DM). Navážka siláže (cca 10 g) byla sušena v sušárně při teplotě 110 °C do konstantní hmotnosti (4 h). Sušina byla stanovena před uzavřením silážních boxů a po ukončení pokusu, tj. po 96 hodinách.

Příprava extraktu. Po otevření boxu se siláží bylo okamžitě naváženo přesně 5 až 6 g rostlinného materiálu do uzavíratelné lahvičky, přidán byl etanol (20 ml) a chloroform (0,5 ml) k zastavení enzymové aktivity. Takto odebrané vzorky byly skladovány při teplotě -20 °C až do doby analýzy. Celý obsah lahvičky byl převeden do baňky (250 ml) a převrstven etanolem (32 ml) a vodou (20 ml), takže výsledná koncentrace vodného etanolu pro extrakci byla 70 % obj. Obsah baňky byl zahříván za míchání k varu pod zpětným chladičem po dobu jedné hodiny. Potom byl vzorek zfiltrován, promyt etanolem a spojené filtry byly doplněny v odměrné baňce etanolem na objem 100 ml. Odtud bylo odpipetováno 10 ml filtrátu do Erlenmeyerovy baňky (50 ml), přidán byl roztok vnitřního standardu ve vodě (1 ml, koncentrace D-ribózy 10 mg.ml⁻¹) a na špičku nože karborafinu. Vzorek byl odbarven krátkým varem, karborafin byl odfiltrován, promyt destilovanou vodou a čirý filtrát byl odpařen do sucha na rotačním vakuovém odpařovačce při teplotě lázně 50 °C a vakuu vodní vývěvy. Odparek byl poté rozpuštěn v destilované vodě (1 ml) a bylo zkontrolováno pH, protože pro následující HPLC analýzu je nutné, aby vzorek byl neutrální až slabě alkalický. Pokud byl vzorek kyselý, přidavkem pevného oxidu vápenatého byl zneutralizován a přefiltrován přes mikrofiltr (0,2 µm, Sartorius, Německo). K analýze bylo nastříkáváno 0,5 µl tohoto konečného filtrátu.

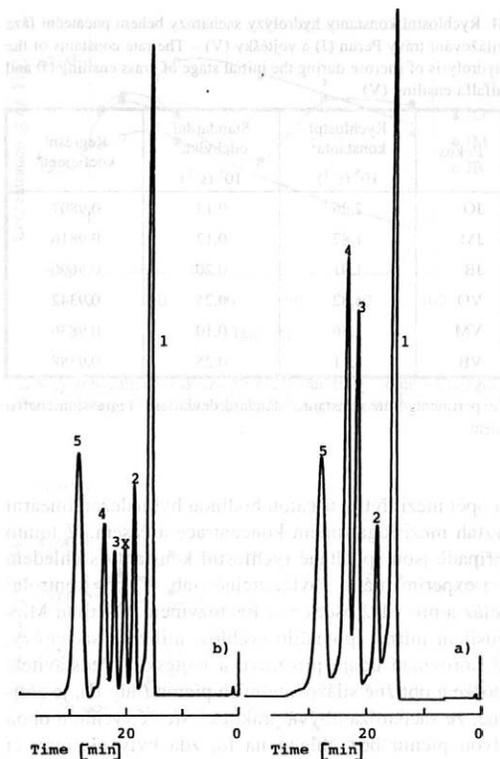
HPLC analýza. K analýzám byla použita plášťovaná skleněná kolona (25 cm x 6 mm) termostátovaná na 53 °C a plněná silně kyselým iontoměničím OSTION LGKS 0802 (H⁺ cyklus, Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Česká republika) převedeným do Na⁺ cyklu. Průtok deionizované vody byl udržován na 6 ml.h⁻¹ pumpou Beckman 100 A a analýzy byly monitorovány diferenciálním refraktometrem Optilab 5902 (Tecator, Švédsko) spojeným se zapisovačem TZ 4200 (Laboratorní přístroje, Česká republika). Jako vnitřní standard byla použita ribóza a chromatogramy byly integrovány pomocí výšek elučních pásů, mrtvý objem kolony byl

0,13 ml. Obsah sacharidů je udáván v g na kg čerstvého materiálu (FM).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Ve srovnání s běžněji používanou plynovou chromatografií (Hartman, 1981; Špička, 1995) je kapalinová chromatografie na silně kyselém iontoměničči, založená na mechanismu ligandové výměny, méně účinná, ale jednotlivé monosacharidy se vždy vymývají jako jeden pás a kvantitativní analýza není komplikována dělením jednotlivých izomerních forem sacharidů (acyklická, cyklická pěti- a šestičlenná, α a β anomery). Další výhodou je jednoduchá úprava vzorku bez derivatizace, která metodu zvyhodňuje pro rutinní stanovení. Za použitých podmínek se vysokomolekulární látky eluují s mrtvým objemem kolony, disacharidy se vymývají prakticky jako jeden pás a nejlepší separace je dosaženo pro monosacharidy a alditoly (Tab. I). Nečistoty s vyšší molekulovou hmotností, běžně přítomné ve vzorcích z přírodních materiálů, nezátěžují tak kolonu a nesnižují účinnost separace. Vzhledem k tomu, že majoritními sacharidy v pícech jsou sacharóza, glukóza a fruktóza (Hartman, 1981) a za nejdůležitější z hlediska fermentace jsou považovány glukóza a fruktóza (McDonald et al., 1968), lze danou metodu považovat za dostatečně přesnou. Ukázkové chromatogramy extraktů trávy Perun a vojtěšky před silážováním jsou na obr. 1. Eluční pás označený X (obr. 1) přísluší neidentifikované sloučenině, jejíž obsah ve vojtěšce před silážováním byl $4,0 \text{ g.kg}^{-1}$ (počítáno na sacharózu) a během fermentace se neměnil. Zřejmě se jedná o stejnou sloučeninu, kterou našel Hartman (1981). Všechny uváděné koncentrace sacharidů jsou vztahy na FM, protože obsah DM se příliš nemění ani po 21 dnech silážování (Garcia et al., 1989). Ve shodě s tímto faktem byly nalezeny jen malé změny DM (tráva Perun: 0 h – 33,64 %, 96 h – 30,84 %; vojtěška: 0 h – 33,45 %, 96 h – 32,35 %).

Mezi sledovanými sacharidy (obr. 2 a 3) ubývala ve shodě s literárními údaji (Špička, 1995) nejrychleji sacharóza, a to jak při silážování trávy, tak při silážování vojtěšky. V případě silážování trávy Perun nejprve stoupl obsah sacharózy během prvních tří hodin u neošetřené siláže až na 150 % původního množství a u siláže ošetřené Bactozymem (probioticko-enzymo-



1. Chromatogram extraktu trávy Perun (a) a vojtěšky (b): 1 – vysokomolekulární látky, 2 – sacharóza, 3 – glukóza, 4 – fruktóza, 5 – ribóza (vnitřní standard), X – neidentifikováno – The chromatograms of an extract of grass (a) and alfalfa (b): 1 – high-molecular compounds, 2 – sucrose, 3 – glucose, 4 – fructose, 5 – ribose (internal standard), X – unidentified

vý preparát s GO) na 115 %. Pouze u pokusů s Microsilem byl nalezen trvalý úbytek sacharózy (obr. 2). Zajímavé je, že hydrolyzu sacharózy od třetí do třicáté hodiny silážování lze popsat ve všech případech jako reakci prvního řádu charakterizovanou lineární závislostí logaritmu koncentrace na čase, jejíž směrnice udává rychlostní konstantu reakce (tab. II). Hodnoty rychlostních konstant a směrodatných odchylek dokazují, že sacharóza je hydrolyzována prakticky stejně rychle s poločasem reakce zhruba 10 hodin. Během silážování vojtěšky ubývala sacharóza od počátku procesu (obr. 3)

I. Kapacitní faktory některých běžných sacharidů a alditolů – The capacity factors of some common carbohydrates and alditols

Sloučenina ¹	k'	Sloučenina ¹	k'	Sloučenina ¹	k'
Rafinóza ²	0,11	glukóza ⁷	0,36	xyulóza ¹²	0,54
Sacharóza ³	0,13	galaktóza ⁸	0,45	manitol ¹³	0,54
Laktóza ⁴	0,18	manóza ⁹	0,50	inozitol ¹⁴	0,59
Maltóza ⁵	0,22	fruktóza ¹⁰	0,50	arabínóza ¹⁵	0,63
Celobióza ⁶	0,22	glucitol ¹¹	0,50	ribóza ¹⁶	0,80

¹ compound, ² raffinose, ³ sucrose, ⁴ lactose, ⁵ maltose, ⁶ cellobiose, ⁷ glucose, ⁸ galactose, ⁹ mannose, ¹⁰ fructose, ¹¹ glucitol, ¹² xylose, ¹³ mannitol, ¹⁴ inositol, ¹⁵ arabinose, ¹⁶ ribose

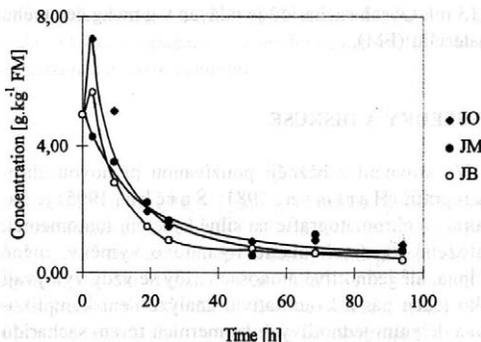
II. Rychlostní konstanty hydrolýzy sacharózy během počáteční fáze silážování trávy Perun (J) a vojtěšky (V) – The rate constants of the hydrolysis of sucrose during the initial stage of grass ensiling (J) and alfalfa ensiling (V)

Pokus ¹	Rychlostní konstanta ² 10 ⁵ (s ⁻¹)	Standardní odchylka ³ 10 ⁵ (s ⁻¹)	Regresní koeficient ⁴
JO	2,26	0,13	0,9807
JM	1,87	0,12	0,9816
JB	1,91	0,20	0,9690
VO	1,82	0,25	0,9342
VM	1,36	0,10	0,9836
VB	2,11	0,25	0,9588

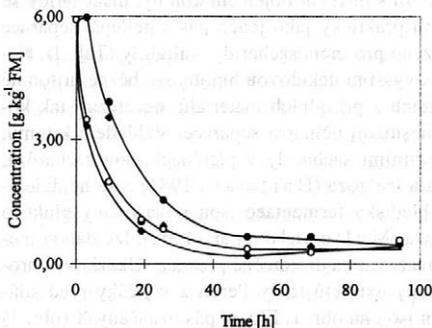
¹experiment, ²rate constant, ³standard deviation, ⁴regression coefficient

a opět mezi třetí a třicátou hodinou byl nalezen lineární vztah mezi logaritmem koncentrace a časem. V tomto případě jsou spočítané rychlostní konstanty s ohledem na experimentální chybu stejné (tab. II) pro kontrolní siláž a pro siláž ošetřenou Bactozymem. Ošetření Microsilem mírně zpomalilo rychlost utilizace sacharózy. Z porovnávacích údajů pro trávu a vojtěšku, představitelů dobře a obtížně silážovatelných píceň (tab. II), je zřejmé, že sacharóza ubývá prakticky stejně rychle u obou dvou píceň bez ohledu na to, zda byly ošetřeny či nikoliv. Pravděpodobně se v této fázi silážování uplatňují při hydrolýze sacharózy především původní rostlinné enzymy.

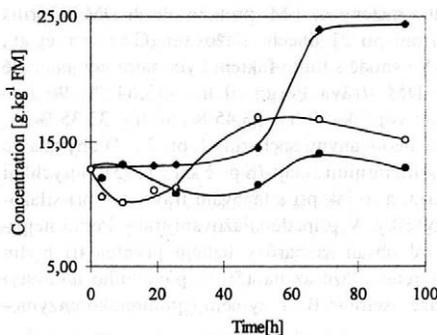
Zcela jiný charakter změn koncentrace byl nalezen pro glukózu a fruktózu. Koncentrace glukózy při silážování trávy jílkového typu Perun po počáteční stagnaci či mírném poklesu prochází maximem (obr. 4). Teoretická maximální koncentrace glukózy za předpokladu, že jejím jediným zdrojem je sacharóza a že se dále neutilizuje, činí 15,4 g.kg⁻¹. V obou pokusech s ošetřenou siláží se koncentrace glukózy této hranici blíží, zatímco v kontrolní siláži se pohybuje vysoko nad 20 g.kg⁻¹. Je zřejmé, že oba preparáty díky probiotické složce výrazně urychlují utilizaci glukózy po 60 hodinách silážování, kdy se již ve větší míře uplatňuje homofermentativní fáze. Přítomnost GO (obr. 4, pokus JB) se projeví ve shodě s literárními údaji (Raurama et al., 1991) v samém počátku fermentace, během prvních 10 hodin, kdy obsah glukózy jako v jediném případě klesá díky její oxidaci na glukonovou kyselinu. Velmi podobné závislosti byly nalezeny i pro koncentrační profil glukózy při silážování vojtěšky (obr. 5). Jak Microsil, tak i Bactozym urychlují utilizaci glukózy dříve než u trávy jílkového typu a po 40. hodině silážování je patrný pokles koncentrace glukózy. Důvodem může být téměř třetinový obsah glukózy ve vojtěšce v porovnání s trávou jílkového typu při stejném množství probiotických preparátů. Nalezené závislosti (obr. 4 a 5) svědčí o tom, že úloha glukózy během silážování dobře i obtížně silážovatelných píceň není jednoduchá. Na jedné straně přibývá hydrolý-



2. Změny koncentrace sacharózy při silážování trávy Perun – Changes in the sucrose concentration during Perun grass ensiling

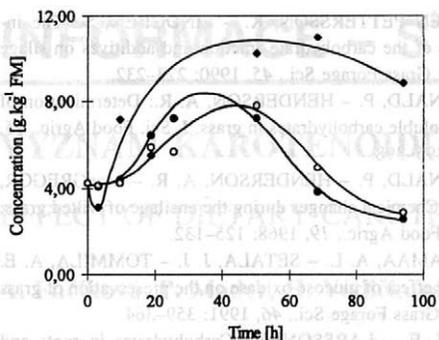


3. Změny koncentrace sacharózy při silážování vojtěšky – Changes in the sucrose concentration during alfalfa ensiling

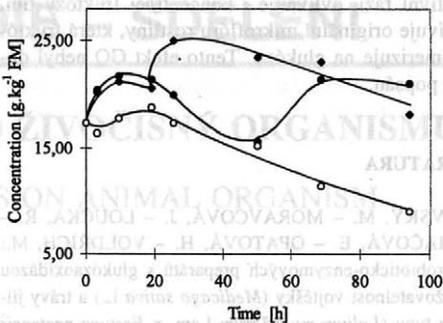


4. Změny koncentrace glukózy při silážování trávy Perun – Changes in the glucose concentration during Perun grass ensiling

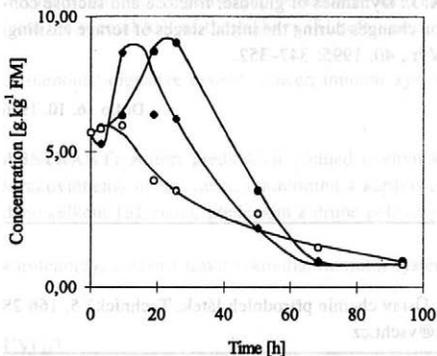
zou sacharózy převážně původní rostlinnou mikroflórou a dále vzniká hydrolýzou polysacharidů. Na druhé straně glukóza slouží jako C-zdroj pro mléčné či jiné kvašení a je oxidována účinkem GO na kyselinu glukonovou (pokusy JB a VB); uplatňuje se i při respiraci. Konečný koncentrační profil glukózy v závislosti na



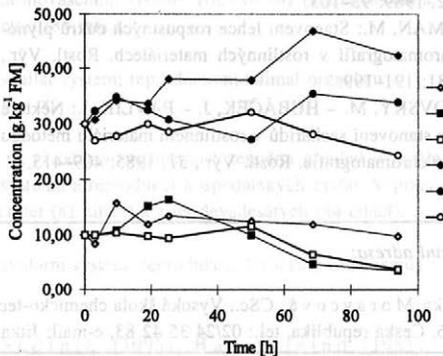
5. Změny koncentrace glukózy při silážování vojtěšky – Changes in the glucose concentration during alfalfa ensiling



6. Změny koncentrace fruktózy při silážování trávy Perun – Changes in the fructose concentration during Perun grass ensiling



7. Změny koncentrace fruktózy při silážování vojtěšky – Changes in the fructose concentration during alfalfa ensiling



8. Změny sumy koncentrace glukózy a fruktózy během silážování – Changes in the sum of concentrations of glucose and fructose during ensiling

relativních rychlostech těchto procesů může vykazovat velice odlišné průběhy, což poněkud zpochybňuje snahu vyjádřit dynamiku změn obsahu glukózy nějakou matematickou rovnicí (Š p i č k a, 1995).

Obsah fruktózy se při silážování trávy Perun i vojtěšky neošetřené a ošetřené Microsilem zvyšuje v průběhu prvních 10 až 15 hodin (obr. 6 a 7) v té míře, jak rychle je hydrolyzována sacharóza. Maximální koncentrace fruktózy přítom v silážích z trávy jilkového typu převyšuje hranici danou obsahem sacharózy ($20 \text{ g.kg}^{-1} \text{ FM}$), protože zároveň začíná hydrolyza fruktozanů produkujících fruktózu. Z téhož důvodu je i následující pokles koncentrace fruktózy pozvolný. Při silážování vojtěšky, která fruktozany neobsahuje, je maximální koncentrace fruktózy blízká hodnotě $9 \text{ g.kg}^{-1} \text{ FM}$, která odpovídá koncentraci po totální hydrolyze sacharózy. Zcela odlišné koncentrační závislosti byly nalezeny pro siláže ošetřené Bactozymem (obr. 6 a 7). V první fázi silážování (15 hodin – vojtěška, 20 hodin – tráva) se obsah fruktózy překvapivě nemění, i když hydrolyza sacharózy je stejně rychlá jako v případě neošetřené siláže nebo po ošetření Microsilem (tab. II). Díky pří-

tomnosti GO musí fruktóza v této fázi silážování ubývat zhruba takovou rychlostí, jako vzniká hydrolyzou sacharózy. Celou situaci ještě lépe ilustruje závislost sumy koncentrací glukózy a fruktózy na čase (obr. 8). Až do 25. hodiny silážování je hladina glukózy a fruktózy přibližně konstantní, i když do té doby má GO nejvyšší aktivitu (R a u r a m a a et al., 1991) a rychle oxiduje glukózu na glukonovou kyselinu. Pravděpodobně GO aktivuje originální mikroflóru v době, kdy fermentační pochody probíhají jen v malé míře, a ta enzymaticky izomerizuje fruktóza na glukózu. Tento závěr je v souladu s dříve formulovaným názorem, že GO může ovlivňovat profil a aktivitu originální rostlinné mikroflóry (R a u r a m a a et al., 1991).

ZÁVĚR

Podle předpokladu (R a u r a m a a et al., 1991) se aktivita GO projevuje nejvíce v prvních 10 hodinách fermentace, a to snížením koncentrace glukózy. Zároveň ale v počátečním stadiu silážování, tj. v heterofer-

mentativní fázi, ovlivňuje i koncentraci fruktózy tím, že aktivuje originální mikroflóru rostliny, která fruktózu izomerizuje na glukózu. Tento efekt GO nebyl doposud popsán.

LITERATURA

ČEŘOVSKÝ, M. – MORAVCOVÁ, J. – LOUČKA, R. – MACHAČOVÁ, E. – OPATOVÁ, H. – VOLDŘICH, M.: Vliv probioticko-enzymových preparátů s glukózooxidázou na silážovatelnost vojtěšky (*Medicago sativa* L.) a trávy jílkového typu (*Lolium multiflorum* Lam. x *Festuca pratensis* Huds.). *Živoč. Výr.*, 42, 1997 (v tisku).

GARCIA, A. D. – OLSON, W. G. – OTTERBY, D. E. – LINN, J. G. – HANSEN, W. P.: Effects of temperature, moisture and aeration on fermentation of alfalfa silage. *J. Dairy Sci.*, 72, 1989: 93–103.

HARTMAN, M.: Stanovení lehce rozpustných cukrů plynovou chromatografií v rostlinných materiálech. *Rostl. Výr.*, 27, 1981: 191–199.

JANKOVSKÝ, M. – HUBÁČEK, J. – PAVLÍK, I.: Některé aspekty stanovení sacharidů v rostlinném materiálu metodou plynové chromatografie. *Rostl. Výr.*, 31, 1985: 409–415.

LUNDÉN PETERSSON, K. – LINDGREN, S.: The influence of the carbohydrate fraction and additives on silage quality. *Grass Forage Sci.*, 45, 1990: 223–232.

McDONALD, P. – HENDERSON, A. R.: Determination of water-soluble carbohydrates in grass. *J. Sci. Food Agric.*, 15, 1964: 395–398.

McDONALD, P. – HENDERSON, A. R. – MacGREGOR, A. W.: Chemical changes during the ensilage of wilted grass. *J. Sci. Food Agric.*, 19, 1968: 125–132.

RAURAMAA, A. L. – SETALA, J. J. – TOMMILA, A. E. A.: The effect of glucose oxidase on the preservation of grass silage. *Grass Forage Sci.*, 46, 1991: 359–364.

STEEN, E. – LARSSON, K.: Carbohydrates in roots and rhizomes of perennial grasses. *New Phytologist*, 104, 1986: 339–346.

SOMOGYI, M.: A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160, 1945: 61–65.

ŠPIČKA, J.: Dynamics of glucose, fructose and sucrose concentration changes during the initial stages of forage ensiling. *Živoč. Výr.*, 40, 1995: 347–352.

Došlo 16. 10. 1996

Kontaktní adresa:

Ing. Jitka Moravcová, CSc., Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav chemie přírodních látek, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, tel.: 02/24 35 42 83, e-mail: Jitka.Moravcova@vscht.cz

INFORMACE – STUDIE – SDĚLENÍ

VÝZNAM KAROTENOIDŮ PRO ŽIVOČIŠNÝ ORGANISMUS*

EFFECT OF DIETARY CAROTENOIDS ON ANIMAL ORGANISM

A. Fučíková, P. Mader, H. Vodičková

Czech University of Agriculture, Faculty of Agronomy, Praha, Czech Republic

ABSTRACT: The authors submit literature review about the influence of carotenoids on the animal organism. Special attention is paid to the retention of carotenoids in the digestive system and their metabolic transformation, and to their relations to cancer, immune response, reproduction of farm animals, and cardiovascular system. Total of 181 references come mainly from the second half of the eighties (81 refs.), and from the nineties (84 refs.).

carotenoids; digestive system; cancer; immune system; cardiovascular system; reproduction; animal organism

ABSTRAKT: Autoři předkládají přehled o vlivu karotenoidů na živočišný organismus, zejména přehled o jejich vztahu k rakovinnému onemocnění, imunitnímu a kardiovaskulárnímu systému a reprodukci hospodářských zvířat. V práci je uvedeno celkem 181 citací, především z druhé poloviny osmdesátých let (81 citací) a z let devadesátých (84 citací).

karotenoidy; zaživací trakt; rakovina; imunitní systém; kardiovaskulární systém; reprodukce; živočišný organismus

ÚVOD

Karotenoidy se dělí na karoteny a xantofyly. Karoteny jsou uhlovodíky, xantofyly jsou kyslíkaté deriváty těchto uhlovodíků. Jsou to látky rostlinného původu. V současné době je známo téměř 600 různých karotenoidů, z toho asi desetina jsou karoteny. Nejznámějším karotenem je beta-karoten. Jedná se o vysoce nenasycený uhlovodík (sumární vzorec $C_{40}H_{56}$) s velkým počtem konjugovaných dvojných vazeb. Nejznámějším xantofylem je lutein, což je dihydroxy-alfa-karoten ($C_{40}H_{56}O_2$).

KAROTENOIDY V ŽIVOČIŠNÉM ORGANISMU

Retence v zaživacím traktu, ukládání a metabolické přeměny

S rostlinnou potravou se karotenoidy dostávají do zaživacího traktu živočichů, kde dochází k jejich částečné absorpci a následnému mechanickému ukládání do různých částí a orgánů. Jen některé karotenoidy jsou v živočišném organismu metabolicky přeměňovány, a to ještě s velmi rozdílnou účinností. Základní práce o příjmu, distribuci a metabolismu karotenoidů v organismech živočichů a člověka publikovali Bartley,

Scolnik (1995), Bauernfeind (1981), Becker et al. (1994), Bjerkeng et al. (1990), Bondi, Sklan (1984), Brady et al. (1996), Cooney et al. (1991), Goodwin (1986), Gottlieb et al. (1993), Hudon (1994), Jarvinen (1995), Kohlmeier, Kohlmeier (1995), Mascio et al. (1989), Mayne, Parker (1986), Olson (1994), Sauberlich et al. (1994), Schiedt (1989), Schiedt et al. (1991), Scott et al. (1996), Stahl et al. (1992), Suda et al. (1987), Tang et al. (1995), Thurnham (1994), Yang et al. (1992) a Zeng et al. (1992).

PŘEMĚNA NA VITAMIN A

Mimořádný význam pro organismus má přeměna beta-karotenu a několika dalších karotenoidů na vitamin A. K této přeměně může dojít jen u těch karotenoidů, u kterých je jedna polovina molekuly typu beta-karotenu s nemodifikovaným beta jononovým kruhem. Vzhledem k vysokému zastoupení beta-karotenu v rostlinách i ke skutečnosti, že z jedné jeho molekuly mohou teoreticky vzniknout dvě molekuly vitamínu A, byla daleko největší pozornost věnována právě přeměně beta-karotenu na vitamin A (Granguly, Sasstry, 1984; Brubacher, Weiser, 1985). Účinnost

* Tento literární přehled byl vypracován jako součást řešení grantového projektu GA ČR č. 509/94/0736.

této přeměny se velmi liší v různých druzů zvířat. Zatímco u býložravců je vysoká (rostlinné prekurzory vitamínu A jsou pro ně jediným zdrojem tohoto vitamínu), masožravci získávají část vitamínu A přímo z živočišných tkání a složka z rostlinných zdrojů je jen doplňující. Člověk je schopen štěpit beta-karoten na vitamin A. V roce 1965 doporučila expertní skupina FAO/WHO za konverzní faktor pro beta-karoten v lidské potravě hodnotu 1/6 (tzn. že 1 µg beta-karotenu v dietě je připsována stejná biologická aktivita jako 0,167 µg retinolu, viz WHO, 1967).

Vliv karotenoidů na prevenci a vznik rakoviny

V současné době je v epidemiologických výzkumech zaměřena pozornost na vztah mezi působením různých antioxidantů, včetně karotenoidů, a chronickým onemocněním. Cílem je najít nejhodnější indikátory ve vztahu k dietě, stavbě lidského organismu a nežádoucímu poškození buněk. V této souvislosti se staly středem zájmu karotenoidy nejen vzhledem k nutriční hodnotě, ale i k ochranné funkci v oxidativních procesech u živočichů a jejich možné intracelulární aktivitě. V mnoha studiích je ochranný účinek karotenoidů naznačen korelací mezi jejich vyšším příjmem organismem a sníženým rizikem vzniku karcinomu. V některých případech tyto látky vykazují chemopreventivní zásah do mechanismu tvorby nádorového onemocnění. Tento účinek je možné částečně vysvětlit schopností karotenoidů potlačit negativní vlivy volných radikálů (Krinsky, 1990; Olson, 1993a, b). Za neprozkoumanou oblast této problematiky lze považovat odhalení možné funkce karotenoidů jako faktorů zvyšujících odolnost organismu, čímž by mohly plnit roli prevence v dalším šíření již vzniklých nádorů (Krinsky, 1990). Jedním z vysvětlujících mechanismů této funkce by mohla být jejich schopnost tvorby systémů, které stabilizují buněčné membrány nebo zabraňují jejich poškození (Mathews-Roth, 1989).

Odhalení souvislostí mezi obsahem karotenoidů v dietě a rizikem vzniku rakoviny bylo záměrem kontrolních studií a studií prováděných u lidí s nádorovým onemocněním. Bylo prokázáno zvýšené riziko vzniku rakoviny plic u lidí s nízkou hladinou příjmu karotenoidů v dietě. V případě onemocnění rakovinou prsu bylo riziko vzniku v souvislosti s nedostatečným příjmem karotenoidů menší. Avšak výskyt krční displazie, preinvasivní fáze krčního karcinomu, nebyl přítomností beta-karotenu v dietě ovlivněn (Byers, Perry, 1992).

S ohledem na silný ochranný účinek beta-karotenu bylo provedeno několik studií, které měly ověřit chemopreventivní působení této sloučeniny proti vzniku různých druhů rakoviny. V deseti studiích, které byly prováděny na populaci vystavené zvýšenému riziku vzniku nádorového onemocnění a u lidí s odstraněným nádorem, byla zaznamenána funkce beta-karotenu jako inhibitoru při vzniku karcinomu plic, tlustého střeva, dutiny ústní a kůže (Malone, 1991).

Existuje předpoklad, že karotenoidy mohou specificky inhibovat růst nádorových buněk v buněčné kultuře. Bylo prokázáno, že 70 µM beta-karoten inhibuje proliferaci plicního a orálního karcinomu. Tato koncentrace nezpůsobila změnu v růstu normálních humánních keratinocytů. Účinek beta-karotenu v tumorových buňkách je vysvětlován přítomností proteinu s molekulovou hmotností 70 000 Da, podobného „heat shock“ proteinům (Krinsky, 1993).

In vitro byl testován účinek beta-karotenu v humánních buněčných liniích získaných z neoplazmatické orální mukózy. V tomto pokusu byla prokázána schopnost beta-karotenu redukovat klonogennou aktivitu; nebyl patrný vliv na buněčnou proliferaci, což je důsledek ochranného účinku proti genotoxickému poškození (Tom et al., 1991).

Na modelových pokusech se zvířaty byl testován antikarcinogenní účinek různých karotenoidů. Jak uvádí Krinsky (1990), byly získány pozitivní výsledky při aplikaci karotenoidů (250 mg v 0,1 ml esenciálního média) extrahovaných ze dvou řas (*Spirulina* a *Dunaliella*). Byl rovněž testován antimutagenní účinek karotenoidů v bakteriálních buňkách *S. typhimurium* TA 100 a TA 98, u nichž byla mutagenese vyvolána aflatoxinem B₁. U obou druhů byla prokázána důležitá role beta-karotenu jako antioxidantu, který má inhibiční účinky v metabolismu mutagenese indukované tímto karcinogenem (He, Campbell, 1990).

Jednou z charakteristik beta-karotenu je jeho schopnost kumulace v epitelálních tkáních. Z tohoto předpokladu vychází animální studie. V různých tkáních byl nalezen odlišný obsah, čas saturace a kinetika přeměny beta-karotenu byly rovněž rozdílné. Jaký vliv mají tyto rozdíly v různých tkáních na riziko vzniku karcinomu ve specifických místech, není jasné. Je možné se domnívat, že hladina beta-karotenu v tkáni však bude směrodatnějším ukazatelem potenciálního rizika vzniku rakoviny, než bychom mohli předpokládat z příjmu tohoto antioxidantu nebo jeho hladiny v krvi (Rosin, 1990).

Úloha karotenoidů je prezentována v prevenci mutagenese, genotoxického působení nebo maligní transformace v bakteriálních a živočišných tkáních, v buněčných a orgánových kulturách. Byly prokázány antikarcinogenní účinky u živočichů vystavených UV záření, současněmu vlivu UV záření a chemikálií nebo chemickým karcinogenům. V některých experimentech byly používány farmakologické dávky karotenoidů a nejnovější studie ukázaly, že i nižší dávky mohou být účinné. Humánní studie jsou založeny na hypotéze, že tento nutriční prvek má funkci chemopreventivní reagentie. Antikarcinogenní účinky karotenoidů lze pravděpodobně vysvětlit jejich biologickou funkcí, avšak toto tvrzení je nutné ověřit dalšími experimenty (Krinsky, 1993).

Z uvedeného výčtu je zřejmé, že nejčastěji studovaným karotenoidem je beta-karoten (Alam, Alam, 1987; Alam et al., 1984; Beems, 1987; Belisario et al., 1985; Collachio, Memoli, 1986;

Edes, Gysbers, 1993; Edes et al., 1989, 1991; Fuller et al., 1992; Greenberg et al., 1985; Hazuka et al., 1990; Hibino et al., 1990; Kadir et al., 1986; Krinsky, 1989; Lambert et al., 1990; Malone, 1991; Mathews-Roth, 1986, 1989; Manoharan et al., 1990; Ohno et al., 1988; Ong et al., 1989; Peto et al., 1981; Raj, Katz, 1985; Renner, 1985, 1986; Shultz et al., 1992; Singh, 1992; Steinel, Baker, 1990; Stich, Dunn, 1986; Stich et al., 1988, 1989; Suda et al., 1986, 1987; Toma et al., 1991; Tomita et al., 1987). Modelovou studii pokoušející se vysvětlit antikarcinogenní účinky beta-karotenu rolí singletového radikálu provedli Doering a Kitawa (1991).

Ostatní karotenoidy byly studovány v mnohem menším rozsahu. Murakoshi et al. (1989, 1992) považují alfa-karoten za mnohem účinnější než beta-karoten, a to jak v případě karcinogeneze jater, plic a kůže u myši, tak i u kultury lidských buněk. Podle autorů Di Mascio et al. (1989) je lykopen vůbec nejúčinnější biologický karotenoidní „zhášec“ singletového kyslíku. Účinnost zhášení singletového kyslíku osmi hlavními karotenoidy mořských organismů (astaxantin, canthaxantin, beta-karoten, zeaxantin, lutein, tunaxantin, fukoxantin a halocynthiaxantin) studovali Shimidzu et al. (1996). Jak uvádějí Hirayama et al. (1994), acyklické karotenoidy jsou účinnějšími zhášeci singletového kyslíku než karotenoidy cyklické. Lykopen se zdá být účinnější než beta-karoten při expozici kůže UV-zářením (Ribayamercado et al., 1995). Poměrně velká pozornost byla věnována canthaxantinu (Bertram et al., 1989; Bianchi-Santamaria et al., 1993; Colacchio et al., 1989; El-Attar, Lin, 1991; Mathews-Roth, Krinsky, 1987; Mathews-Roth et al., 1991; Pung et al., 1988; Santamaria, Bianchi, 1989; Schwarz, Shklar, 1988). Pung et al. (1993) studovali účinek syntetického C₂₂-karotenoidu. Mathews-Roth (1982) a Black, Mathews-Roth (1991) porovnali účinnost beta-karotenu, canthaxantinu a phytoenu. Zhang et al. (1991) pracovali s beta-karotenem, alfa-karotenem, canthaxantinem, lykopenem a luteinem. Nové možné vysvětlení účinku karotenoidů, totiž potlačení hyperfosforylace buněčných proteinů, navrhli Matsushimanishiwaki et al. (1995). Modelovou srovnávací studii antioxidantních účinků šesti karotenoidů (beta-karoten, septapreno-beta-karoten, canthaxantin, astaxantin, zeaxantin a lutein) v micelárnímu systému Tritonu X-100 provedli Hill et al. (1995).

Celkový obsah karotenoidů v krevním séru byl korelovan s dalšími faktory v epidemiologické studii zahrnující 12 866 mužů, z nichž 156 později zemřelo na rakovinu (Connet et al., 1989). Micozzi et al. (1990) dávali do korelace obsah karotenoidů v dietě s rizikem vzniku rakoviny. Přehledné referáty k problematice biologické aktivity karotenoidů, zejména pokud jde o chemoprevenci, publikovali Correa (1995), Krinsky (1989a, b; 1993a, b), Lachance (1994), Mathews-Roth (1985), Moon (1989),

Olson (1992, 1993a, b) a Tomita (1983). V české literatuře se o účincích karotenoidů krátce zmiňují v přehledném referátu o ochraně před volnými radikály Holeček a Racek (1994). Kritické stanovisko k celé problematice zaujímá Bieri (1987). Složitost problematiky epidemiologických studií a jejich interpretace zevrubně diskutuje Schwartz (1996).

Vliv karotenoidů na imunitní systém

Během doby bylo zjištěno, že beta-karoten a jiné karotenoidy hrají důležitou úlohu v imunitním systému, zejména v imunitní odpovědi, a působí jako látka, která chrání před rakovinným onemocněním a podporuje činnost zabíječských buněk při nádorovém bujení (Bendich, 1991a). Působení na imunitní systém se projevuje zvětšováním thymu a periferních lymfatických uzlin a antagonistickým vlivem na působení imunosupresivních látek (Šterzl, 1993). Karotenoidy jsou také přítomny v lidské kůži a jejich koncentrace ubývá po vystavení UV záření. Při vystavení lidského organismu UV záření se současně snižují i imunitní funkce (Bendich, 1991a, b).

NESPECIFICKÁ IMUNITA

Fagocytóza, pohlcování korpuskulárních částic, je složitý proces. Pro fagocytózu částic se specializovaly profesionální fagocyty, tj. buňky monocytárního fagocytujícího systému (makrofágy, histiocyty), a buňky periferní krve, tj. neutrofilů a monocytů. Po internalizaci mikroorganismů do fagocytů a vytvoření fagocytární vakuoly jsou mikroorganismy inaktivovány a nitrobuňčně štěpeny. Nejvýznamnější bakteriocidní aktivitu má kyslíkový superoxid, který vzniká po aktivaci redukovatelného NADPH-oxidázového systému za účasti membránové a cytosolové frakce, kyseliny arachidonové a hořčičku. Ze superoxidu se vytvářejí oxygenové produkty, které působí buď samostatně, nebo s dalšími enzymy fagocytů, myeloperoxidázou a laktoferinem. Oxidační produkty katalyzují peroxidaci lipidů, poškozují DNA a degradují proteiny (Šterzl, 1993).

Lidské PMN byly inkubovány s beta-karotenem a bakteriemi. Bakterie byly buňkami PMN usmrceny a buňky PMN poškozeny nebyly. V případě, že k buňkám PMN nebyl přidán beta-karoten, byly buňky PMN poškozeny svými vlastními oxidativními produkty (Bendich, 1989).

Vliv beta-karotenu a vitamínu A na fagocytární funkci PMN periferní krve a na makrofágy a PMN mléčné žlázy v souvislosti s výskytem *Staphylococcus aureus* studovala celá řada autorů. Tjølkelter et al. (1986) přidávali kravám v období stání na sucho a během laktace do krmiva různé dávky vitamínu A a beta-karotenu, nebo obě látky současně. Na izolovaných PMN *in vitro* a po inkubaci s beta-karotenem sledovali fagocytární aktivitu. Zjistili, že beta-karoten zvyšuje

fagocytózu PMN v periferní krvi krav v době stání na sucho, ale nikoliv během laktace. Přídavek beta-karotenu a vitamínu A snižuje působení nových infekcí během časného zaprahnutí (Dahlquist et al., 1985). Přesný mechanismus, kterým beta-karoten a vitamín A chrání, není zcela jasný. Dowd a Heatley (1984) zjistili, že snížená hladina beta-karotenu v krevním séru snižuje buněčnou imunitu a rovněž cirkulaci imunokompetentních buněk. Beta-karoten a retinol mají rozdílný způsob působení. Beta-karoten má větší ochranný vliv než retinol, který zmenšuje riziko nádorového onemocnění (Haenszel et al., 1985). Daniel et al. (1991) vysvětlují ochranný účinek beta-karotenu proti infekci tím, že tento karotenoid umocňuje funkci lymfocytů. Chew (1995) se domnívá, že antioxidační funkce karotenoidů může alespoň zčásti zvyšovat imunitu tím, že zachovává funkční a strukturní integritu významných imunitních buněk. Haq et al. (1995), kteří testovali 0,02% obsah beta-karotenu, canthaxantinu a luteinu v dietě nosnic, dospěli k závěru, že tyto karotenoidy nemají vliv na zvýšení neonatální imunitní odpovědi.

SPECIFICKÁ IMUNITNÍ ODPOVĚĎ

Seifter et al. (1981) zjistili u myši po přidání beta-karotenu zvýšený počet cirkulujících lymfocytů a v dalších pokusech proliferaci cytotoxických T lymfocytů. Hoskinson et al. (1992) prokázali v pokusech na prasatech zvýšení počtu lymfocytů po podání beta-karotenu a vitamínu A. Počet pomocných T lymfocytů, které ovlivňují proliferaci B lymfocytů, byl u lidí vyšší po přidávání 180 mg beta-karotenu denně po dobu dvou týdnů (Alexander et al., 1985). Bendich a Shapiro (1986) sledovali vliv beta-karotenu a canthaxantinu na funkci T a B lymfocytů u laboratorních zvířat. Specifická imunitní odpověď na mitogeny (concanavalin, phytohemaglutinin a lipopolysacharid) byla u pokusných zvířat zvýšena po podání diety obsahující jak beta-karoten, tak canthaxantin. Canthaxantin je stejně jako beta-karoten účinný antioxidant, ale u savců nemůže být přeměněn na vitamín A.

Watson et al. (1991) podávali beta-karoten lidem (0, 15, 30, 45 a 60 mg denně) po dobu dvou měsíců. Zjistili signifikantně vyšší počet pomocných T lymfocytů u jedinců s dávkami 30, 45 a 60 mg denně. Signifikantní vzestup supresorových buněk T byl prokázán již při dávce 15 mg beta-karotenu denně. Významné rozdíly mezi skupinami byly zjištěny i u NK buněk (natural killer cells – přirození zabijáci). Výsledky jednoznačně ukazují na úlohu beta-karotenu jako imunostimulátoru. Stejně závěry z celé řady pokusů, které se týkají NK buněk, uvádí Bendich (1991b).

Vitamín A zvyšuje mitogenní odpověď lymfocytů na phytohemaglutinin u lidí a zvířat (Micksche et al., 1987). Je známo, že stimulace mitogeneze není univerzální pro všechny karotenoidy ve všech koncentracích. Vitamín A ve vysokých koncentracích inhibuje mito-

genní odpověď lymfocytů na phytohemaglutinin (Skinnider, Geisbrecht, 1979).

Mitogeny jsou látky, které vyvolávají aktivaci a dělení buněk. Působí jako polyklonové aktivátory lymfocytů. Mezi nejvýznamnější patří lektiny izolované z vyšších rostlin, jako např. phytohemaglutinin (PHA) z červené fazole (*Phaseolus vulgaris*) nebo konkanavalin A (CON A) z *Canavalia ensiformis*. Lektiny se mimo vyšší rostliny vyskytují i v bakteriích a v živočišných buňkách. Jsou to většinou proteiny nebo glykoproteiny, jejichž molekuly mají na svém povrchu vazebné místo pro monosacharid. Vazba se uskutečňuje podobně jako vazba mezi antigenem a vazebným místem protilátky (Ferenčík, 1989).

Vliv karotenoidů na reprodukci hospodářských zvířat

Vliv beta-karotenu a vitamínu A je sledován i z pohledu působení na reprodukční procesy v organismu. Doplněk beta-karotenu přidávaný do krmiva významně ovlivňuje intenzitu estrálních cyklů a následně zabřeznutí u samic (Zile, Cullum, 1983). Relativně vysoké koncentrace beta-karotenu ve žlutém tělísku krav mohou ovlivnit produkci steroidních hormonů produkovaných vaječnickou (Gawienowski et al., 1974; Inaba et al., 1986). Při nedostatku beta-karotenu zjistili Meinecke et al. (1986) poruchu steroidogeneze ve folikulech vaječnicků krav s následnými klinickými změnami. Inaba et al. (1987) zjistili výrazné zvýšení steroidogeneze v granulózních buňkách vaječnicků krav. Buňky byly inkubovány s beta-karotenem *in vitro* po dobu čtyř dnů. Autoři zjistili v těchto buňkách výrazně signifikantní vzestup progesteronu. O'Shaughnessy a Wathes (1988) poukázali na výraznou steroidogenezi v buňkách žlutého tělísku krav po inkubaci s beta-karotenem *in vitro*.

Ascarelli et al. (1985) uvádějí, že vysoká hladina karotenů v krevní plazmě není základním předpokladem pro zabřeznutí u dojníc, ale za určitých podmínek se ukazuje jako limitující faktor. Block a Farmer (1987) popisují beta-karoten jako látku, která je v určitém vztahu k reprodukci dojníc. Zvýšený výskyt ovariálních cyst u krav při nízké koncentraci beta-karotenu v krevní plazmě našli Inaba et al. (1986).

Celá řada autorů se zabývala studiem vlivu beta-karotenu na ukazatele spojené s reprodukcí krav holštýnského plemene. Bindas et al. (1984) zjistili po přidání syntetického beta-karotenu do krmiva těchto krav signifikantní vzrůst koncentrace karotenů v krevní plazmě, zatímco vliv beta-karotenu na zvýšenou koncentraci progesteronu, glukózy, luteinizačního hormonu, glukagonu a inzulínu v krevní plazmě zjištěn nebyl. Inaba et al. (1986) zjistili, že nízká hladina beta-karotenu v krevní plazmě je jednou z příčin zadržování placenty na více než 12 hodin po porodu. Přídavek beta-karotenu do krmiva signifikantně neovlivnil plodnost (Akdor et al., 1986), ale snížil záněty dělohy a výskyt cyst na vaječnicku. Wang et al. (1987) podá-

vali kravám holštýnského plemene přidávek beta-karotenu 30 dní před porodem a 98 dní po porodu. Ve sledovaném období nezjistili změny v reprodukčních ukazatelích a v mléčné produkci. Sezonní rozdíly v koncentraci beta-karotenu a vitamínu A v krevním séru krav holštýnského plemene a vliv na poporodní reprodukční funkce sledovali Tekpetey et al. (1987). Sezonní rozdíly v obsahu beta-karotenu v krevním séru krav byly signifikantní, ale sledované parametry reprodukčního cyklu nebyly významně ovlivněny. Přidávek beta-karotenu do krmné dávky prepubertálním kravám holštýnského plemene způsobil vzrůst beta-karotenu v séru ve srovnání s kravami drženími na dietě s nízkým obsahem karotenů. Na začátku puberty nebyla délka estrálních cyklů, koncentrace ovariálních hormonů a hormonů adenohipofýzy ovlivněna přidávkou karotenu. Na druhé straně intenzita estrálního cyklu byla slabší u kontrolních zvířat (Tekpetey et al., 1987). Existuje předpoklad, že za určitých podmínek může mít nízký, ale i vysoký přidávek β -karotenu do krmiva nepříznivý vliv na plodnost krav v laktaci. Krávy při pastevním způsobu odchovu mohou mít dokonce nižší produkci mléka na rozdíl od krav krměných nižším přidávkem beta-karotenu (Folman et al., 1987). Wang et al. (1988b) v dalších pokusech na kravách holštýnského plemene zjistili, že přidávek β -karotenu do krmiva snížil onemocnění mastitidami, ale neměl vliv na další ukazatele reprodukce (děložní involuce, ovariální cyklus, mléčná produkce). Wang et al. (1988a) připouštějí výraznější vliv dávek beta-karotenu v krmivu na reprodukční ukazatele jiných plemen skotu (Friessecke, 1978; Bonomi et al., 1994). Huszeniczka et al. (1985) zjistili u dojnic pozitivní vliv beta-karotenu na obnovu ovariálního cyklu po porodu.

Ashes et al. (1982) a O'Fallon, Chew (1984) zaznamenali u skotu, že beta-karoten v krevním séru cirkuluje a je transportován společně s lipoproteiny, zejména s lipoproteiny o vysoké hustotě.

Sníženými hladinami beta-karotenu jsou postiženy především krávy vysokobřezí a krávy v první fázi laktace. Důsledek tohoto nepříznivého stavu lze pozorovat ve snížené odolnosti novorozenečků telat. Toto ohrožení jejich odolnosti ještě prohlubuje příjem mleziva s nižším obsahem beta-karotenu (Lebeda, 1986).

Přeměna beta-karotenu na vitamin A ve folikulu krav se zdá být regulačním mechanismem zralosti a vývoje folikulárních struktur. Vliv zvýšených dávek beta-karotenu na koncentraci sérového vitamínu A jak u gravidních, tak u negravidních jalovic nebyl pozorován (Bakeová et al., 1985). Podle některých údajů (Sklan, 1983) je žluté bovinní tělísko schopno uskládat beta-karoten a v době potřeby jej přeměnit na vitamin A.

Významný vliv beta-karotenu na metabolické procesy v organismu zjistili Bertini et al. (1983) a Bakeová et al. (1988). Beta-karoten ovlivňuje produkci hormonů štítné žlázy, a tím zasahuje do energetického metabolismu organismu před porodem a po porodu.

Retinol, kyselina retinolová a beta-karoten stimuluje sekreci progesteronu ve žlutém tělísku prasníc (Tallavera, Chew, 1988) a stimulaci steroidních ovariálních hormonů zlepšují reprodukční vlastnosti (Chew, 1993). U krysu byl zjištěn po injekci beta-karotenu vyšší počet plodů, nižší embryonální úmrtnost a vyšší porodní hmotnost narozených mláďat (Brief, Chew, 1985). Vyšší počet živě narozených mláďat po přidávku beta-karotenu (40 mg/kg krmné směsi) do krmiva samicím králíka uvádějí Besenfelder et al. (1993). Sharma et al. (1985) prokázali sníženou hladinu vitamínu A a beta-karotenu u žen s *abruptio placentae* (odloučení placenty).

Vliv karotenoidů na kardiovaskulární systém

Významnou úlohu beta-karotenu a dalších karotenů jako antioxidantů vysvětluje ve své práci Gerster (1991). Antioxidační funkce těchto látek je důležitá z hlediska prevence kardiovaskulárních onemocnění. Toxické oxidanty, jako je superoxidový anion, peroxid vodíku, hydroxylový radikál a singletový kyslík, jsou inaktivovány enzymy v buňkách, ale proti hydroxylovému radikálu a singletovému kyslíku nejsou dostatečně účinné. V celé řadě pokusů bylo prokázáno, že zejména beta-karoten vykazuje antioxidační účinek proti hydroxylovému radikálu a singletovému kyslíku. Beta-karoten mírně stimuluje vzestup hladiny HDL lipoproteinů v krevním séru. HDL lipoproteiny se významně podílejí na snížení kardiovaskulárních onemocnění. Tato zjištění potvrzují i další autoři (Gey et al., 1993a, b). Howard et al. (1996) porovnávali obsahy jednotlivých karotenoidů v krevním séru obyvatel Belfastu a Toulouse, které se významně liší ve výskytu koronárních srdečních onemocnění. Zjistili vysoký rozdíl (o 100 %) v obsahu luteinu a beta-kryptoxantinu ve prospěch obyvatel Toulouse, kde je výskyt koronárních onemocnění mnohem nižší. Obdobný rozdíl pro alfa-karoten činil 50 %. Ostatní karotenoidy se u obou populací nelišily.

ZÁVĚR

Význam vitamínu A pro řadu základních funkcí živočišného organismu a při terapii rakoviny je již dlouho znám. Toxicita vitamínu A ve vyšších koncentracích vedla k syntéze a aplikaci jeho strukturálních analogů – retinoidů. Beta-karoten je však i v nejvyšších dávkách zcela netoxický (Anonymus, 1987; Bendich, 1988; Heywood et al., 1985; Matthews-Roth, 1988; Micozzi et al., 1988). Navíc je dnes již jasné, že beta-karoten je biologicky aktivní i v nerozštěpené formě a že tuto aktivitu mají i jiné karotenoidy.

Funkce karotenoidů jako antioxidantů je významná z důvodů potlačení negativních vlivů volných radikálů

v živočišném organismu. Karotenoidy zvyšují odolnost organismu zejména stabilizací buněčných membrán. Dále byla potvrzena funkce beta-karotenu jako inhibitoru při vzniku karcinomu plic, tlustého střeva, dutiny ústní a kůže. Zůstává otevřena otázka kumulace beta-karotenu v epitelálních tkáních různých orgánů, čas saturace a kinetika přeměny beta-karotenu. Významná podpora imunitního systému beta-karotenem a vitamínem A byla jednoznačně prokázána v souvislosti s fagocytární aktivitou PMN, se zvýšeným počtem cirkulujících T lymfocytů a NK buněk a se stimulačním vlivem na mitogenní látky.

Vlivy beta-karotenu a vitamínu A na reprodukční procesy v organismu byly potvrzeny zejména v otázkách intenzity estrálních cyklů, produkce steroidních hormonů ve vaječniku, snížení tvorby ovariálních cyst u krav, zadržení placenty po porodu a zánětů dělohy. Některé práce také ukazují na vliv beta-karotenu a vitamínu A na snížení embryonální úmrtnosti a zvýšení počtu živě narozených mláďat. Vliv karotenoidů jako antioxidantů a stimulatorů HDL lipoproteinů má význam v prevenci kardiovaskulárních onemocnění. V literatuře jsou uváděny i další příznivé účinky karotenoidů na zdravotní stav živočišného a lidského organismu, např. v případě očního kataraktu (Jacques et al., 1988), ochrany proti cekální kokcidioze (Allen et al., 1996) aj. Olson (1996) nedávno navrhl pro karotenoidy a další podobně účinkující látky termín „fyziologické modulatory“. Tento termín rozšiřuje jak tuto skupinu sloučenin, tak i možný charakter jejich biologických účinků.

LITERATURA

ALAM, B. S. – ALAM, S. Q.: The effect of different levels of dietary beta-carotene on DMBA-induced salivary gland tumors. *Nutr. Cancer*, 9, 1987: 93–101.

ALAM, B. S. – ALAM, S. Q. – WEIR, J. C. – GIBSON, W. A.: Chemopreventive effects of beta-carotene and 13-cis-retinoic acid on salivary gland tumors. *Nutr. Cancer*, 6, 1984: 4–12.

ALLEN, P. C. – DANFORTH, H. D. – MORRIS, V. C. – LEVANDER, O. A.: Association of lowered plasma karotenoids with protection against cecal coccidiosis by diets high in n-3 fatty acids. *Poult. Sci.*, 75, 1996: 966–972.

AKORDOR, F. Y. – STONE, J. B. – WALTON, J. S. – LESLIE, K. E. – BUCHANAN-SMITH, J. G.: Reproductive performance of lactating holstein cows fed supplemental beta-carotene. *J. Dairy Sci.*, 69, 1986: 2173–2178.

ALEXANDER, M. – NEWMARK, H. – MILLER, R. G.: Oral beta-carotene can increase the number of OKT4+ cells in human blood. *Immunol. Lett.*, 9, 1985: 221–224.

ANONYMUS: Beta-carotene; affirmation as generally recognized as safe. *Food and Drug Administration, Final Rule. Federal Register*, 52, 1987: 25209–25211.

ASCARELLI, I. – EDELMAN, Z. – ROSENBERG, M. – FOLMAN, Y.: Effect of dietary carotene on fertility of high yielding dairy cows. *Anim. Prod.*, 40, 1985: 195–207.

ASHES, J. R. – BURLEY, R. W. – DAVENPORT, J. B. – SIDHU, G. S.: Effect of dietary supplements of protected lipids on the concentration and transport of beta-carotene and cholesterol in bovine blood and milk; unusual chromatographic behaviour of the high density lipoproteins with high levels of beta-carotene. *J. Dairy Res.*, 49, 1982: 39–49.

BAKEOVÁ, E. – ELEČKO, J. – ROSÍVAL, I. – HAJURKA, J. – KRAJNÍČÁKOVÁ, M.: Koncentrace tyroxinu, beta-karotenu, vitamínu A a zabřezávání jalovic po přívode beta-karotenu. *Vet. Med. (Praha)*, 30, 1985: 715–724.

BAKEOVÁ, E. – ELEČKO, J. – LAZÁR, L. – KRAJNÍČÁKOVÁ, M.: Vplyv beta-karoténu na zmeny koncentrácie tyroxínu, glukózy a inzulínu u telných jalovic v období porodu. *Vet. Med. (Praha)*, 33, 1988: 321–328.

BARTLEY, G. E. – SCOLNIK, P. A.: Plant carotenoids: Pigments for photoprotection, visual attraction, and human health. *Plant Cell*, 7, 1995: 1027–1038.

BAUERNFEIND, J. C. (ed.): Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors: Technological and Nutritional Applications. New York, Academic Press 1981.

BECKER, K. – BOTTICHER, D. – LEICHSENDRING, M.: Antioxidant vitamins in malnourished Nigerian children. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 64, 1994: 306–310.

BEEMS, R. B.: The effect of beta-carotene on BP-induced respiratory tract tumors in hamsters. *Nutr. Cancer*, 10, 1987: 197–204.

BELISARIO, M. A. – PECCE, R. – BATTISTA, C. – PANZA, N. – PACILIO, G.: Inhibition of cyclophosphamide mutagenicity by beta-carotene. *Biomed. Pharmacother.*, 39, 1985: 445–448.

BENDICH, A.: The safety of beta-carotene. *Nutr. Cancer*, 11, 1988: 207–214.

BENDICH, A.: Carotenoids and the immune response. *J. Nutr.*, 119, 1989: 112–115.

BENDICH, A.: Non-provitamin A activity of carotenoids: immunoenhancement. In: *Trends in Food Science & Technology*, 1991a: 127–130.

BENDICH, A.: Beta-carotene and immune response. *Proc. Nutr. Soc.*, 50, 1991b: 263–274.

BENDICH, A. – OLSON, J. A.: Biological actions of carotenoids. *FASEB J.*, 3, 1989: 1927–1932.

BENDICH, A. – SHAPIRO, S. S.: Effect of beta-carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat. *J. Nutr.*, 116, 1986: 2254–2262.

BERTINI, G. – PALLAVICINI, G. – LOMBARDELLI, R.: Considerazione e ricerche sui rapporti fra lattazione, metabolismo energetico ed attività tiroidea. *Zoot. Nutr. Anim.*, 9, 1983: 19–30.

BERTRAM, J. S. – HOSSAIN, Z. – PUNG, A. – RUNDHAUG, J. E.: Development of *in vitro* systems for chemoprevention research. *Preventive Med.*, 18, 1989: 562–575.

BESSENFELDER, U. – SOLTI, L. – SEREGI, J. – BREM, G.: Influence of beta-carotene on fertility in rabbits when using embryo transfer programs. *Theriogenology*, 39, 1993: 1093–1109.

BIANCHI-SANTAMARIA, A. – TATEO, F. – SANTAMARIA, L.: Antimutagenic action of beta carotene, canthaxanthin and extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Melissa officinalis*. Genotoxicity of basil and tarragon oil. In: WALDRON,

- K. W. – JOHNSON, I. T. – FENWICK, G. R. (eds.): Food and Cancer Prevention: Chemical and Biological Aspects. Royal Society of Chemistry, 1993: 75–80.
- BIERI, J. G.: Are the recommended allowances for dietary antioxidants adequate? *Free Radical Biol. Med.*, *3*, 1987: 193–197.
- BINDAS, E. M. – GWAZDAUSKAS, F. C. – AIELLO, R. J. – HERBEIN, J. H. – MCGILLIARD, M. L. – POLAN, C. E.: Reproductive and metabolic characteristics of dairy cattle supplemented with beta-carotene. *J. Dairy Sci.*, *67*, 1984: 1249–1255.
- BJERKENG, B. – STOREBAKKEN, T. – LIAAEN-JENSEN, S.: Response of carotenoids by rainbow trout in the sea: resorption and metabolism of dietary astaxanthin and canthaxanthin. *Aquaculture*, *91*, 1990: 153–162.
- BLACK, H. S. – MATHEWS-ROTH, M. M.: Protective role of butylated hydroxytoluene and certain carotenoids in photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol.*, *53*, 1991: 707–716.
- BLOCK, E. – FARMER, B.: The status of beta-carotene and vitamin A in Quebec dairy herds: factors affecting their status in cows and their effects on reproductive performance. *Can. J. Anim. Sci.*, *67*, 1987: 775–788.
- BONDI, A. – SKLAN, D.: Vitamin A and carotene in animal nutrition. *Progr. Food Nutr. Sci.*, *8*, 1984: 165–191.
- BONOMI, A. – QUARANTELLI, A. – SABBIONI, A. – SUPERCHI, P.: Protected beta-carotene for dairy cattle ration integration. Effects on productivity and reproductive efficiency (experimental contribution). *Riv. Scienza dell Alimentazione*, *23*, 1994: 233–249.
- BRADY, W. E. – MARESPERLMAN, J. A. – BOWEN, O. – STACEWICZAPUNTZAKIS, M.: Human serum carotenoid concentrations are related to physiologic and lifestyle factors. *J. Nutr.*, *126*, 1996: 129–137.
- BRIEF, S. – CHEW, B. P.: Effects of vitamin A and beta-carotene on reproductive performance in gilts. *J. Anim. Sci.*, *60*, 1985: 998.
- BRUBACHER, G. B. – WEISER, H.: The vitamin A activity of beta-carotene. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, *55*, 1985: 5–15.
- BYERS, T. – PERRY, G.: Dietary carotenes, vitamin A, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *A. Rev. Nutr.*, *12*, 1992: 139–159.
- CHEW, B. P.: Effect of supplemental beta-carotene and vitamin A on reproduction in swine. *J. Anim. Sci.*, *77*, 1993: 247–252.
- CHEW, B. P.: Antioxidant vitamins affect food animal immunity and health. *J. Nutr.*, *125* (Suppl.), 1995: S1804–S1808.
- COLACCHIO, T. A. – MEMOLI, V. A.: Chemoprevention of colorectal neoplasms. Ascorbic acid and beta-carotene. *Arch. Surg.*, *121*, 1986: 1421–1424.
- COLACCHIO, T. A. – MEMOLI, V. A. – HILDEBRANDT, L.: Antioxidants vs carotenoids. Inhibitors or promoters of experimental colorectal cancers. *Arch. Surg.*, *124*, 1989: 217–221.
- CONNET, J. E. – KULLER, L. H. – KJELSBORG, M. O. – POLK, B. F. – COLLINS, G. – RIDER, A. – HULLEY, S. B.: Relationship between carotenoids and cancer. The multiple risk factor intervention trial (MRFIT) study. *Cancer*, *64*, 1989: 126–134.
- COONEY, R. V. – BERTRAM, J. S. – HANKIN, J. H. – KOLONEL, L. N. – MIYAKE, A. – BILLINGS, K. – BOURNE, W.: Relationship between dietary, serum, and tissue levels of carotenoids. *Cancer Lett.*, *61*, 1991: 81–87.
- CORREA, P.: The role of antioxidants in gastric carcinogenesis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, *35*, 1995: 59–64.
- DAHLQUIST, S. P. – CHEW, B. P.: Effects of vitamin A and beta-carotene on mastitis in dairy cows during the early dry period. *J. Dairy Sci.*, *68*, 1985: 191.
- DANIEL, L. R. – CHEW, B. P. – TANAKA, T. S. – TJOELKER, L. W.: *In vitro* effects of beta-carotene and vitamin A on peripartum bovine peripheral blood mononuclear cell proliferation. *J. Dairy Sci.*, *74*, 1991: 911–915.
- DI MASCIO, P. – KAISER, S. – DECASAGAYAM, T. P. A. – SUNDQUIST, A. R. – SIES, H.: Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet oxygen quenchers. In: DAVIES, K. J. A. (ed.): *Oxidative Damage and Repair. Chemical, Biological and Medical Aspects*. New York, Pergamon Press 1992: 311–314.
- DI MASCIO, P. – KAISER, S. – SIES, H.: Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, *274*, 1989: 532–538.
- DOERING, W. E. – KITAGAWA, T.: Thermal cis-trans rearrangement of semirigid polyenes as a model for the anticarcinogen beta-carotene: An all-trans-pentaene and an all-trans-heptaene. *J. Amer. Chem. Soc.*, *113*, 1991: 4288–4297.
- DOWD, P. S. – HEATLEY, R. V.: The influence of undernutrition on immunity. *Clin. Sci.*, *66*, 1984: 241.
- EDES, T. E. – GYSBERS, D. S.: Carcinogen-induced tissue vitamin A depletion. Potential protective advantages of beta-carotene. *Ann. New York Acad. Sci.*, *686*, 1993: 203–212.
- EDES, T. E. – GYSBERS, D. S. – BUCKLEY, C. S. – THORNTON, W. H., Jr.: Exposure to the carcinogen benzo(a)pyrene depletes tissue vitamin A: beta-carotene prevents depletion. *Nutr. Cancer*, *15*, 1991: 159–166.
- EDES, T. E. – THORNTON, W. – SHAH, J.: Beta-carotene and aryl hydrocarbon hydroxylase in the rat: An effect of beta-carotene independent of vitamin A activity. *J. Nutr.*, *119*, 1989: 796–799.
- EL-ATTAR, T. M. A. – LIN, H. S.: Effect of retinoids and carotenoids on prostaglandin formation by oral squamous carcinoma cells. *Prostaglandins Leukotriens Essential Fatty Acids*, *43*, 1991: 175–178.
- FERENČÍK, M.: *Imunochémia*. Bratislava, Alfa 1989: 160–163.
- FOLMAN, Y. – ASCARELLI, I. – KRAUS, D. – BARASH, H.: Adverse effect of beta-carotene in diet on fertility of dairy cows. *J. Dairy Sci.*, *70*, 1987: 357–366.
- FRIESECKE, H.: The significance of beta-carotene in ruminant nutrition: field results – Europe. In: *Proc. Roche Symp. Importance of beta-carotene for bovine fertility*, London, England, 1978: 53–72.
- FULLER, C. J. – FAULKNER, H. – BENDICH, A. – PARKER, R. S. – ROE, D. A.: Effect of beta-carotene supplementation on photosuppression of delayed-type hypersensitivity in normal young men. *Amer. J. Clin. Nutr.*, *56*, 1992: 684–690.
- GAWIENOWSKI, A. M. – STACEWICZ-SAPUNCAKIS, M. – LONGLEY, R.: Biosynthesis of retinal in bovine corpus luteum. *J. Lipid. Res.*, *15*, 1974: 375–379.

- GERSTER, H.: Potential role of beta-carotene in the prevention of cardiovascular disease. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **61**, 1991: 277–291.
- GEY, K. F. – STAHELIN, H. B. – EICHHOLZER, M.: Poor plasma status of carotene and vitamin C is associated with higher mortality from ischemic heart disease and stroke: Basel Prospective Study. *Clin. Invest.*, **71**, 1993: 3–6.
- GEY, K. F. – MOSER, U. K. – JORDAN, P. – STAHELIN, H. B. – EICHHOLZER, M. – LUDIN, E.: Increased risk of cardiovascular disease at suboptimal plasma concentrations of essential antioxidants: an epidemiological update with special attention to carotene and vitamin C. *Amer. J. Clin. Nutr.*, **57** (Suppl.), 1993: 787S–797S.
- GOODWIN, T. W.: Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Ann. Rev. Nutr.*, **6**, 1986: 273–297.
- GOTTLIEB, K. – ZARLING, E. J. – MOBARHAN, S. – BOWEN, P. – SUGERMAN, S.: Beta-carotene decreases markers of lipid peroxidation in healthy volunteers. *Nutr. Cancer*, **19**, 1993: 207–212.
- GRANGULY, J. – SASTRY, P. S.: Mechanism of conversion of beta-carotene into vitamin A – Central cleavage versus random cleavage. *Wld. Rev. Nutr. Diet*, **45**, 1985: 198–220.
- GREENBERG, E. R. – BARON, J. A. – BECK, J. R.: Carotenoids and cancer prevention. In: SAURAT (ed.): *Prevention and Therapy of Cancer and Leukemia*. Basel, S. Karger 1985: 360–369.
- HAENSZEL, W. – CUELLO, C. – CORREA, P. – LOPEZ, S. A. – ZARAMA, G. – ZAVALA, D.: Correlations of values of micronutrients in sera with gastric pathology. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, **69**, 1985: 115.
- HAQ, A. U.: Neonatal immune response and growth performance of chicks hatched from Single Comb White Leghorn breeders fed diets supplemented with beta-carotene, canthaxanthin, or lutein. *Poult. Sci.*, **74**, 1995: 844–851.
- HAZUKA, M. B. – EDWARDS-PRASAD, J. – NEWMAN, F. – KINZIE, J. J. – PRASAD, K. N.: Beta-carotene induces morphological differentiation and decreases adenylate cyclase activity in melanoma cells in culture. *J. Amer. Coll. Nutr.*, **9**, 1990: 143–149.
- HE, Y. – CAMPBELL, T. C.: Effects of carotenoids on aflatoxin B1-induced mutagenesis in *S. typhimurium* TA 100 and TA 98. *Nutr. Cancer*, **13**, 1990: 243–253.
- HEYWOOD, R. – PALMER, A. K. – GREGSON, R. L. – HUMMLER, H.: The toxicity of beta-carotene. *Toxicology*, **36**, 1985: 91–100.
- HIBINO, K. – ARAI, K. – KAWAI, K. – CHIHARA, T. – MARUTA, K. – ARAI, M. – NAGATSU, T. – FUJITA, K.: Polyamine levels of urine and erythrocytes on inhibition of DMBA-induced oral carcinogenesis by topical beta-carotene. *Biogen. Amines*, **7**, 1990: 209–216.
- HILL, T. J. – LAND, E. J. – MCGARVEY, D. J. – SCHALCH, W. – TINKLER, J. H. – TRUSCOTT, T. G.: Interactions between carotenoids and the CCl_3O_2 center dot radical. *J. Amer. Chem. Soc.*, **117**, 1995: 8322–8326.
- HIRAYAMA, O. – NAKAMURA, K. – HAMADA, S. – KOBAYASHI, Y.: Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids*, **29**, 1994: 149–150.
- HOLEČEK, V. – RACEK, J.: Ochrana před volnými radikály pomocí antioxidantů, stopových prvků a léků. *Klin. Biochem. Metab.*, **3**, 1994: 137–141.
- HOSKINSON, C. D. – CHEW, P. B. – WONG, T. S.: Effects of injectable beta-carotene and vitamin A on lymphocyte proliferation and polymorphonuclear neutrophil function in piglets. *Biol. Neonate*, **62**, 1992: 325–326.
- HOWARD, A. N. – WILLIAMS, N. R. – PALMER, C. R. – CAMBOU, J. P. – EVANS, A. E. – FOOTE, J. W. – MARQUESVIDAL, P. – MCCRUM, E. E. – RUIDAVETS, J. B. – NIGDIKAR, S. V. – RAJPUTWILLIAMS, J. – THURNHAM, D. I.: Do hydroxy-carotenoids prevent coronary heart disease? A comparison between Belfast and Toulouse. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **66**, 1996: 113–118.
- HUDON, J.: Biotechnological applications of research on animal pigmentation. *Biotechnol. Adv.*, **12**, 1994: 49–69.
- HUSZENICZA, G. – PETHES, G. – KULCSÁR, M. – MOLNÁR, L. – SOMORJAI, G. – BÁLINT, T.: Effect of beta-carotene supplementation on the postpartum resumption of ovarian cyclicity in cows kept on carotene-deficient diet. *Acta Vet. Hung.*, **33**, 1985: 75–88.
- INABA, T. – INOUE, A. – SHIMIZU, R. – NAKANO, Y. – MORI, J.: Plasma concentrations of progesterone, estrogens, vitamin A and beta-carotene in cows retaining fetal membranes. *Jap. J. Vet. Sci.*, **48**, 1986: 505–508.
- INABA, T. – MEZAN, M. – SHIMIZU, R. – NAKANO, Y. – MORI, J.: Plasma concentrations of beta-carotene and vitamin A in cows with ovarian cyst. *Jap. J. Vet. Sci.*, **48**, 1986: 1275–1278.
- INABA, T. – MEZAN, M. – SHIMIZU, R. – ONO, T. – MORI, J.: Effect of beta-carotene and vitamin A on progesterone production by cultured bovine granulosa cells. *Jap. J. Vet. Sci.*, **49**, 1987: 1021–1025.
- JACQUES, P. F. – CHYLACK, L. T. – MCGLANDY, R. B. – HARTZ, S. C.: Antioxidant status in persons with and without senile cataract. *Arch. Ophthalmol.*, **106**, 1988: 337–340.
- JARVINEN, R.: Carotenoids, retinoids, tocopherols and tocotrienols in the diet. The Finnish Mobile Clinic Health Examination Survey. *Int. J. Vit. Nutr. Res.*, **65**, 1995: 24–30.
- KADIR, R. A. – MENG, D. J. – SIDEK, H. M. – MOHAMMED, M. A.: Status of beta-carotene and retinol in rats that were induced with liver cancer and the effect of excessive beta-carotene intakes. In: *Proc. 12th Malays. Biochem. Soc. Conf.*, 1986: 93–98.
- KOHLMEIER, L. – KOHLMEIER, M.: Adipose tissue as a medium for epidemiologic exposure assessment. *Environ. Health Persp.*, **103** (Suppl. 3), 1995: 99–106.
- KRINSKY, N. I.: Carotenoids as chemopreventive agents. *Preventive Med.*, **18**, 1989a: 592–602.
- KRINSKY, N. I.: Carotenoids and cancer in animal models. *J. Nutr.*, **119**, 1989b: 123–126.
- KRINSKY, N. I.: Carotenoids in medicine. In: KRINSKY, N. I. (ed.): *Carotenoids: Chemistry and Biology*. New York, Plenum Press 1989c: 279–291.
- KRINSKY, N. I.: Beta-carotene: Functions. In: SPILLER, G. A. – SCALA, J. (eds.): *New Protective Roles for Selected Nutrients*. Alan R. Liss, Inc., 1989d: 1–15.

- KRINSKY, I. N.: Carotenoids in medicine. In: KRINSKI, N. I. (ed.): Carotenoids: Chemistry and Biology. New York, Plenum Press 1990: 279–291.
- KRINSKY, I. N.: Anticarcinogenic activities of carotenoids in animals and cellular systems. In: EMERIT, L. – CHANCE, B. (eds.): Free Radicals and Aging. Basel, Birkhauser Verlag 1992: 227–234.
- KRINSKY, N. I.: Actions of carotenoids in biological systems. Annu. Rev. Nutr., 13, 1993a: 561–587.
- KRINSKY, N. I.: Actions of carotenoids in cells and animals. In: BRAY, G. A. – RYAN, D. H. (eds.): Vitamins and Cancer Prevention. Louisiana State Univ. Press, Baton Rouge, 1993b: 342–351.
- KRINSKY, N. I.: Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation. Ann. New York Acad. Sci., 686, 1993c: 229–242.
- LACHANCE, P. A.: Micronutrients in cancer prevention. Food Phytochemicals for Cancer Prevention I (Series: ACS Symposium Series 546), 1994: 49–64.
- LAMBERT, L. A. – KOCH, W. H. – WAMER, W. G. – KORNHAUSER, A.: Antitumor activity in skin of Skh and Sencar mice by two dietary beta-carotene formulations. Nutr. Cancer, 13, 1990: 213–221.
- LEBEDA, M.: Pokles beta-karotenémie u vysokoběžčích dojníc. Vet. Med. (Praha), 31, 1986: 513–520.
- MALONE, W. F.: Studies evaluating antioxidants and beta-carotene as chemopreventives. Amer. J. Clin. Nutr., 53, 1991: 305S–313S.
- MANOHARAN, K. – SOM, S. – CHATTERJEE, M. – ANERJEE, M. R.: Beta-carotene prevention of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced transformation of mouse mammary cells *in vitro*. – In: KRINSKY, N. I. (ed.): Carotenoids: Chemistry and Biology. New York, Plenum Press 1990: 293–300.
- MASCIO, P. – KAISER, S. – DEVASAGYAM, T. P. A. – SUNDQUIST, A. R. – SIEH, H.: Carotenoids, tocopherols and thiols as biological singlet oxygen quenchers. – In: KELVIN, J. A. D. (ed.): Oxidative Damage and Repair. Chemical, Biological and Medical Aspects. New York, Pergamon Press 1992: 311–314.
- MASCIO, P. – KAISER, S. – SIES, H.: Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Arch. Biochem. Biophys., 274, 1989: 532–538.
- MATHEWS-ROTH, M. M.: Carotenoid pigments as antitumor agents. In: NELSON, J. D. – GRASSI, C. (eds.): Current Chemotherapy and Infectious Disease. Proc. 11th Int. Congr. Chemother. Amer. Soc. Microbiol., 1980, Vol. 2: 1503–1505.
- MATHEWS-ROTH, M. M.: Antitumor activity of beta-carotene, canthaxanthin and phytoene. Oncology, 39, 1982: 33–37.
- MATHEWS-ROTH, M. M.: Carotenoids and cancer prevention – experimental and epidemiological studies. Pure Appl. Chem., 57, 1985: 717–722.
- MATHEWS-ROTH, M. M.: Beta-carotene therapy for erythropoietic protoporphyria and other photosensitivity diseases. Biochimie, 68, 1986: 875–884.
- MATHEWS-ROTH, M. M.: Lack of genotoxicity with beta-carotene. Toxicol. Lett., 41, 1988: 185–191.
- MATHEWS-ROTH, M. M.: Beta-carotene: Clinical aspects. In: New Protective Roles for Selected Nutrients. Alan R. Liss, Inc., 1989: 17–38.
- MATHEWS-ROTH, M. M. – KRINSKY, N. I.: Carotenoids affect development of UV-B induced skin cancer. Photochem. Photobiol., 46, 1987: 507–509.
- MATHEWS-ROTH, M. M. – LAUSEN, N. – DROUIN, G. – RICHTER, A. – KRINSKY, N. I.: Effects of carotenoid administration on bladder cancer prevention. Oncology, 48, 1991: 177–179.
- MATSUSHIMANISHIWAKI, R. – SHIDOI, Y. – NISHIWAKI, S. – YAMADA, T. – MORIWAKI, H. – MUTO, Y.: Suppression by carotenoids of microcystin-induced morphological changes in mouse hepatocytes. Lipids, 30, 1995: 1029–1034.
- MAYNE, S. T. – PARKER, R. S.: Subcellular distribution of dietary beta-carotene in chick liver. Lipids, 21, 1986: 164–169.
- MEINECKE, B. – BITTNER, W. – GIPS, H.: The effect of beta-carotene on fertility in cows: clinical and endocrinological findings. Zuchthygiene, 21, 1986: 225–232.
- MICKSCHE, M. – CERNI, C. – KOKRON, O. – TITSCHER, R. – WRBA, H.: Stimulation of immune response in lung cancer patients by vitamin A therapy. Oncology, 34, 1987: 234–238.
- MICOZZI, M. S. – BEECHER, G. R. – TAYLOR, P. R. – KHACHIK, F.: Carotenoid analyses of selected raw and cooked foods associated with a lower risk for cancer. J. Natl. Cancer Inst., 82, 1990: 282–285.
- MICOZZI, M. S. – BROWN, E. D. – TAYLOR, P. R. – WOLFE, E.: Carotenoderma in men with elevated carotenoid intake from foods and beta-carotene supplements. Amer. J. Clin. Nutr., 48, 1988: 1061–1064.
- MOON, R. C.: Comparative aspects of carotenoids and retinoids as chemopreventive agents for cancer. J. Nutr., 119, 1989: 127–134.
- MURAKOSHI, M. – TAKAYASU, J. – KIMURA, O. – KOHMURA, E. – NISHINO, H. – IWASHIMA, A. – OKUZUMI, J. – SAKAI, T. – SUGIMOTO, T. – IMANISHI, J. – IWASAKI, R.: Inhibitory effect of alpha-carotene on proliferation of the human neuroblastoma cell line GOTO. J. Natl. Cancer Inst., 81, 1989: 1649–1652.
- MURAKOSHI, M. – NISHINO, H. – SATOMI, Y. – TAKAYASU, J. – HASEGAWA, T. – TOKUDA, H. – IWASHIMA, A. – OKUZUMI, J. – OKABE, H. – KITANO, H. – IWASAKI, R.: Potent preventive action of alpha-carotene against carcinogenesis: Spontaneous liver carcinogenesis and promoting stage of lung and skin carcinogenesis in mice are suppressed more effectively by alpha-carotene than by beta-carotene. Cancer Res., 52, 1992: 6583–6587.
- O'FALLON, J. V. – CHEW, B. P.: The subcellular distribution of beta-carotene in bovine corpus luteum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 177, 1984: 406–411.
- OHNO, Y. – YOSHIDA, O. – OISHI, K. – OKADA, K. – YAMABE, H. – SCHROEDER, F. H.: Dietary beta-carotene and cancer of the prostate: A case-control study in Kyoto, Japan. Cancer Res., 48, 1988: 1331–1336.
- OLSON, J. A.: Carotenoids and vitamin A: An overview. In: ONG, A. S. H. – PACKER, L. (eds.): Lipid-Soluble Anti-

- oxidants: Biochemistry and Clinical Applications. Basel, Birkhauser Verlag 1992: 178–192.
- OLSON, J. A.: Retinoids and carotenoids: Thoughts for the future. In: Clin. Dermatol. 5. Retinoids. 1993a: 629–634.
- OLSON, J. A.: Vitamin-A and carotenoids as antioxidants in a physiological context. J. Nutr. Sci. Vitaminol., 39 (Suppl.), 1993b: S57–S65.
- OLSON, J. A.: Needs and sources of carotenoids and vitamin A. Nutr. Revs., 52, 1994: 67–73.
- OLSON, J. A.: Benefits and liabilities of vitamin A and carotenoids. J. Nutr., 126 (Suppl.), 1996: S1208–S1212.
- ONG, T. – WHONG, W. Z. – STEWARD, J. D. – BROCKMAN, H. E.: Comparative antimutagenicity of 5 compounds against 5 mutagenic complex mixtures in *Salmonella typhimurium* strain TA98. Mutat. Res., 222, 1989: 19–25.
- O'SHAUGHNESSY, P. J. – WATHES, D. C.: Bovine luteal cell activity in culture. Maintenance of steroidogenesis by high density lipoprotein containing high or low beta-carotene concentrations. Anim. Reprod. Sci., 17, 1988: 165–176.
- PETO, R. – DOLL, R. – BUCKLEY, J. D. – SPORN, M. B.: Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? Nature, 290, 1981: 201–208.
- PUNG, A. – RUNDHAUG, J. E. – YOSHIZAWA, C. N. – BERTRAM, J. S.: Beta-carotene and canthaxanthin inhibit chemically- and physically-induced neoplastic transformation in 10T1/2 cells. Carcinogenesis, 9, 1988: 1533–1539.
- PUNG, A. – FRANKE, A. – ZHANG, L. X. – IPPENDORF, H. – MARTIN, H. D. – SIES, H. – BERTRAM, J. S.: A synthetic C22 carotenoid inhibits carcinogen-induced neoplastic transformation and enhances gap junctional communication. Carcinogenesis, 14, 1993: 1001–1005.
- RAJ, A. S. – KATZ, M.: Beta-carotene as an inhibitor of benzo(a)pyrene and mitomycin C induced chromosomal breaks in the bone marrow of mice. Can. J. Genet. Cytol., 27, 1985: 598–602.
- RENNER, H. W.: Anticlastogenic effect of beta-carotene in Chinese hamsters. Time and dose response studies with different mutagens. Mutat. Res., 144, 1985: 251–256.
- RENNER, H. W.: Bioassays with an antioxidant and beta-carotene as antimutagenic factors. In: Genetic Toxicology of the Diet. Alan R. Liss, Inc., 1986: 255–263.
- RIBAYAMERCADO, J. D. – GARMYN, M. – GILCHREST, B. A. – RUSSELL, R. M.: Skin lycopene is destroyed preferentially over beta-carotene during ultraviolet irradiation in humans. J. Nutr., 125, 1995: 1854–1859.
- ROSIN, M. P.: Antigenotoxic activity of carotenoids in carcinogen exposed population. In: KURODA, Y. – SHANKEL, D. M. – WATERS, M. D. (eds.): Antimutagenesis and Anticarcinogenesis Mechanismus II. Plenum Publ. Corp. 1990: 45–59.
- SANTAMARIA, L. – BIANCHI, A.: Cancer chemoprevention by supplemental carotenoids in animals and humans. Preventive Med., 18, 1989: 603–623.
- SAUBERLICH, H. E. – WEINBERG, D. S. – FREEBERG, L. E. – JUAN, W. Y. – SULLIVAN, T. R. – TAMURA, T. – CRAIG, C. B.: Effects of consumption of an umbeliferous vegetable beverage on constituents in human sera. Food Phytochemicals for Cancer Prevention I (Series: ACS Symposium Series 546), 1994: 258–271.
- SCHIEDT, K.: New aspects of carotenoid metabolism in animals. In: KRINSKY, N. I. (ed.): Carotenoids: Chemistry and Biology. New York, Plenum Press 1989: 247–268.
- SCHIEDT, K. – BISCHOF, S. – GLINZ, E.: Recent progress on carotenoid metabolism in animals. Pure Appl. Chem., 63, 1991: 89–101.
- SCHWARZ, J. L.: The dual roles of nutrients as antioxidants and prooxidants: Their effect on tumor cell growth. J. Nutr., 126 (Suppl.), 1996: S1221–S1227.
- SCHWARTZ, J. – SHKLAR, G.: Regression of experimental oral carcinomas by local injection of beta-carotene and canthaxanthin. Nutr. Cancer, 11, 1988: 35–40.
- SCOTT, K. J. – THURNHAM, D. I. – HART, D. J. – BINGHAM, S. A. – DAY, K.: The correlation between the intake of lutein, lycopene and beta-carotene from vegetables and fruits, and blood plasma concentrations in a group of women aged 50–65 years in the UK. Brit. J. Nutr., 75, 1996: 409–418.
- SEIFTER, E. – RETTURA, G. – LEVENSON, S. M.: Carotenoids and cell-mediated immune responses. In: CHARALAMBORS, G. – INGLET, G. (eds.): The Quality of Foods and Beverages. New York, Academic Press 1981: 335–347.
- SHARMA, S. C. – BONNAR, J. – DOSTALOVA, L.: Comparison of blood levels of vitamin A, beta-carotene and vitamin E in abruptio placentae with normal pregnancy. Int. J. Vit. Nutr. Res., 56, 1985: 3–9.
- SHEARER, R. W.: Chemoprevention of azo-dye-induced liver carcinogenesis in the rat by a natural carotenoid. In: Modulation and Mediation of Cancer by Vitamins. Basel, Karger 1983: 89–94.
- SHIMIDZU, N. – GOTO, M. – MIKI, W.: Carotenoids as singlet oxygen quenchers in marine organisms. Fish. Sci., 62, 1996: 134–137.
- SHULTZ, T. D. – CHEW, B. P. – SEAMAN, W. R. – LUEDECKE, L. O.: Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linolenic acid and beta-carotene on the *in vitro* growth of human cancer cells. Cancer Lett., 63, 1992: 125–133.
- SKINNIDER, L. F. – GEISBRECHT, K.: Inhibition of phorbol myristate acetate and phytohemagglutinin stimulation of human lymphocytes by retinol. Cancer Res., 39, 1979: 3332–3334.
- SKLAN, D.: Carotene cleavage activity in the corpus luteum of cattle. Int. J. Vitam. Nutr. Res., 53, 1983: 23–26.
- SINGH, V. N.: Role of beta-carotene in disease prevention with special reference to cancer. In: ONG, A. S. H. – PACKER, L. (eds.): Lipid-Soluble Antioxidants: Biochemistry and Clinical Applications. Basel, Birkhauser Verlag 1992: 208–227.
- STAHL, W. – SCHWARZ, W. – SUNDQUIST, A. R. – SIES, H.: Cis-trans isomers of lycopene and beta-carotene in human serum and tissues. Arch. Biochem. Biophys., 294, 1992: 173–177.
- STEINEL, H. H. – BAKER, R. S. U.: Effects of beta-carotene on chemically-induced skin tumors in HRA/Skh hairless mice. Cancer Lett., 51, 1990: 163–168.
- STICH, H. F. – DUNN, B. P.: Relationship between cellular levels of beta-carotene and sensitivity to genotoxic agents. Int. J. Cancer, 38, 1986: 713–717.
- STICH, H. F. – HORNBY, A. P. – DUNN, B. P.: Beta-carotene levels in exfoliated human mucosa cells following its oral administration. Cancer Lett., 30, 1986: 133–141.

- STICH, H. F. – BRUNNEMANN, K. D. – MATHEW, B. – SANKARANARAYANAN, R. – NAIR, M. K.: Chemopreventive trials with vitamin A and beta-carotene: Some unresolved issues. *Preventive Med.*, 18, 1989: 732–739.
- STICH, H. F. – ROSSIN, M. P. – HORNBY, A. P. – MATHEW, B. – SANKARANARAYANAN, R. – NAIR, K.: Remission of oral leukoplakias and micronuclei in tobacco/betel quid chewers treated with beta-carotene and with beta-carotene plus vitamin A. *Int. J. Cancer*, 42, 1988: 195–199.
- SUDA, D. – SCHWARZ, J. – SHKLAR, G.: Inhibition of experimental oral carcinogenesis by topical beta carotene. *Carcinogenesis*, 7, 1986: 711–715.
- SUDA, D. – SCHWARZ, J. – SHKLAR, G.: GGT reduction in beta-carotene inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 23, 1987: 43–46.
- ŠTERZL, J.: Imunitní systém a jeho fyziologické funkce. Praha, Čs. imunologická společnost 1993.
- TALAVERA, F. – CHEW, B. P.: Comparative role of retinol, retinoic acid and beta-carotene on progesterone secretion by pig *corpus luteum in vitro*. *J. Reprod. Fertil.*, 82, 1988: 611–615.
- TANG, G. G. – BLANCO, M. C. – FOX, J. G. – RUSSELL, R. M.: Supplementing ferrets with canthaxanthin affects the tissue distribution of canthaxanthin, ether carotenoids, vitamin A and vitamin E. *J. Nutr.*, 125, 1995: 1945–1951.
- TEKPETEY, F. R. – PALMER, W. M. – INGALLS, J. R.: Reproductive performance of prepubertal dairy heifers on low or high beta-carotene diets. *Can. J. Anim. Sci.*, 67, 1987: 477–489.
- TEKPETEY, F. R. – PALMER, W. M. – INGALLS, J. R.: Seasonal variation in serum beta-carotene and vitamin A and their association with postpartum reproductive performance of Holstein cows. *Can. J. Anim. Sci.*, 67, 1987: 491–500.
- TERAO, J.: Antioxidant activity of beta-carotene-related carotenoids in solution. *Lipids*, 24, 1989: 659–661.
- THURNHAM, D. I.: Carotenoids – functions and fallacies. *Proc. Nutr. Soc.*, 53, 1994: 77–87.
- TJÖELKER, L. W. – CHEW, B. P. – TANAKA, T. S. – DANIEL, L. R.: Effects of vitamin A and beta-carotene on phagocytosis and killing by bovine mammary neutrophils *in vitro*. *J. Dairy Sci.*, 69, 1986: 103 (Abstr.)
- TOMA, S. – ALBANESE, E. – PALUMBO, R. – NICOLO, G. – MOREIRO, C. – MANGIANTE, P. E. – BONATTI, S. – CANCEDDA, R. – SANTI, L.: *In vitro* effects of beta-carotene on human oral keratinocytes from precancerous lesions and squamous carcinoma. *Anti-Cancer Drugs*, 2, 1991: 581–589.
- TOMITA, Y.: Immunological role of vitamin A and its related substances in prevention of cancer. *Nutr. Cancer*, 5, 1983: 187–194.
- TOMITA, Y. – HIMENO, K. – NOMOTO, K. – ENDO, H. – HIROHATA, T.: Augmentation of tumor immunity against syngeneic tumors in mice by beta-carotene. *JNCI*, 78, 1987: 679–681.
- WANG, J. Y. – HAFI, C. B. – LARSON, L. L.: Endocrine responses and estrous activity in holstein heifers fed supplemental beta-carotene. *Theriogenology*, 29, 1988a: 731–742.
- WANG, J. Y. – OWEN, F. G. – LARSON, L. L.: Effect of beta-carotene supplementation on reproductive performance of lactating Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, 71, 1988b: 181–186.
- WANG, J. Y. – HAFI, C. B. – OWEN, F. G. – LARSON, L. L.: Effect of beta-carotene supplementation on periparturient health and reproduction of Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.*, 15, 1987: 139–144.
- WATSON, R. R. – PRABHALA, R. H. – PLEZIA, P. M. – ALBERTS, D. S.: Effect of beta-carotene on lymphocyte subpopulations in elderly humans: evidence for a dose-response relationship. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 53, 1991: 90–94.
- YANG, A. – LARSEN, T. W. – TUME, R. K.: Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Austral. J. agric. Res.*, 43, 1992: 1809–1817.
- ZENG, S. – FURR, H. C. – OLSON, J. A.: Metabolism of carotenoid analogs in humans. *Amer. J. Clin. Nutr.*, 56, 1992: 433–439.
- ZHANG, L. X. – COONEY, R. V. – BERTRAM, J. S.: Carotenoids enhance gap junctional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T1/2 cells: relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, 12, 1991: 2109–2114.
- ZILE, M. H. – CULLUM, M. E.: The function of vitamin A: Current concept. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 172, 1983: 139–152.
- WHO: Requirements of Vitamin A, Thiamine, Riboflavine and Niacin. Technical Report Series No. 1967: 362.

Došlo 24. 9. 1996

Kontaktní adresa:

Ing. Alena Fučíková, CSc., Česká zemědělská univerzita, Agronomická fakulta, Kamýcká 129, 165 21 Praha 6-Suchbát, Česká republika, tel.: 02/24 38 21 79, fax: 02/39 37 05

NEKROLOG

Za Ing. Stanislavem Bartošem, DrSc.

Dne 13. března 1997 zemřel dlouholetý pracovník Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky Ing. Stanislav Bartoš, DrSc.

Dr. Bartoš patřil k zakládajícím pracovníkům našeho ústavu, pracoval zde od roku 1962. Velmi významný byl především jeho podíl na zavedení radioizotopových metod do zemědělského výzkumu (pracovní pobyt na Cornellově univerzitě v USA a Timirjazevově univerzitě v Moskvě), neopominutelný je jeho zásadní přínos ke studiu metabolismu tukové tkáně a fyziologie anaerobních mikroorganismů. Dr. Bartoš byl dlouho-

tým předsedou komise pro udělování vědeckých hodností a členem řady vědeckých institucí a společností. Během svého života vychoval řadu vědeckých pracovníků, jako osobnost se stal známým i v zahraničí. Naše odborná veřejnost stále oceňuje jeho knihu „Mikrobiologie a biochemie trávení v bacheru přežvýkavců“, která byla vydána v roce 1987.

Dr. Bartoš zůstane v našich srdcích, kam se nesmazatelně zapsal jako kolega, trpělivý učitel i nezištný rádce. Jeho životní moudrost se pro mnohé z nás často stávala inspirací i silou.

Spolupracovníci z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky v Praze-Uhřetěvsi

POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem (včetně klíčových slov).

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce.

Rozsah vědeckých prací nemá přesáhnout 15 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

Vlastní úprava rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery), k rukopisu je vhodné přiložit disketu s prací pořízenou na PC v některém textovém editoru, nejlépe v T602, a s grafickou dokumentací. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

Název práce (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

Krátký souhrn (Abstrakt) je informačním výběrem obsahu a závěru článku, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Musí obsahovat klíčová slova. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě. Je uveřejňován a měl by být dodán ve stejném jazyce jako vědecká práce.

Rozšířený souhrn (Abstract) je uveřejňován v angličtině, měl by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

Úvod má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce realizována a velmi stručnou formou má být popsán stav studované otázky.

Literární přehled má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému.

Metoda se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál.

Výsledky – při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostatcích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

Literatura musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selective reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short and a longer summary (including the key words).

The author is fully responsible for the originality of his paper, for its subject and formal correctness. The author shall make a written declaration that his paper has not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper.

The paper extent shall not exceed 15 typescript pages, including tables, figures and graphs.

Manuscript layout shall correspond to the State Standard ČSN 88 0220 (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). A PC diskette should be provided with the paper, written in an editor program, preferably T602, and with graphical documentation. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The title of the paper shall not exceed 85 strokes. Subtitles of the papers are not allowed either.

Abstract is an information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes, and comprise base numerical data including statistical data. It must contain key words. It should be submitted in English and if possible also in Czech or Slovak.

Introduction has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form.

Review of literature should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material.

In the section **Results** figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

Discussion contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telefon and fax number or e-mail.

OBSAH - CONTENTS

Genetika a šlechtění - Genetics and Breeding

Amin A. A., Tóth S., Gere T.: Relationship between daily milk yield and persistency of Hungarian Holstein Friesian through selection index and subindices - Závislost mezi denní dojitostí a perzistencí laktace u maďarského holštýnsko-fríského skotu stanovená pomocí selekčních indexů a dílčích indexů 193

Příbyl J., Jakubec V., Jelínek J., Volenec J., Krys J.: Shlukování kladrubských koní na základě příbuznosti - Clustering of Kladrub horses on the basis of kinship 199

Cothran E. G., Kovač M.: Genetic analysis of the Croatian Trakehner and Posavina horse breeds - Genetická analýza trakénských koní chovaných v Chorvatsku a koní plemene posavina .. 207

Fyziologie a reprodukce - Physiology and Reproduction

Říha J., Vejnár J., Čunát L.: Vliv dávky PMSG na množství a kvalitu embryí u prasnic a prasniček - The effect of PMSG dose on embryo number and quality in sows and gilts 213

Výživa a krmení - Nutrition and Feeding

Tománková O., Homolka P.: Porovnání enzymatické metody a metody mobile bag pro stanovení střevní stravitelnosti nedegradovaného proteinu - Comparison of enzymatic technique and mobile bag technique for determination of intestinal digestibility of feedstuff undegradable protein 219

Moravcová J., Čeřovský M., Loučka R., Voldřich M., Opatová H., Machačová E.: Vliv glukózooxidázy na obsah sacharózy, glukózy a fruktózy při silážování trávy jílkového typu a vojtěšky - Effect of glucose oxidase on the concentration of sucrose, glucose and fructose during ensiling of grass Perun and alfalfa 223

INFORMACE - STUDIE - SDĚLENÍ - INFORMATION - STUDIES - REPORTS

Fučíková A., Mader P., Vodičková H.: Význam karotenoidů pro živočišný organismus - Effect of dietary carotenoids on animal organism 229

RECENZE

Navrátil J.: Jaromír Dušek - Kůň ve službách člověka (středověk) 206

NEKROLOG

Kolektiv: Za Ing. Stanislavem Bartošem, DrSc. 240

Vědecký časopis ŽIVOČIŠNÁ VÝROBA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd - Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 34 89, fax: 02/24 25 39 38 ● Sazba: Studio DOMINO - Ing. Jakub Černý, Bří. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997