

Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka

Certifikovaná metodika č. 1975

Jindřich Čítek

Libor Večerek

Lenka Hanusová

Eva Samková

Oto Hanuš

Zuzana Křížová

Tereza Kávová

Irena Jelínková

Robert Kala

2018

Tato publikace byla vytvořena za finanční podpory grantu Národní agentury pro zemědělský
výzkum QJ1510336.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Certifikovaná metodika QJ1510336 č. 1975 - název:

Genetické polymorfismy pro kvalitu kravského mléka

Certifikovaná uplatněná metodika a technicko-organizační doporučení, opatření a postupy v systému QA/QC (quality assurance/quality control, zajištění a řízení kvality) ke stanovení genotypů pro geny ovlivňující kvalitu kravského mléka.

Cíl certifikované uplatněné metodiky:

Cílem certifikované metodiky QJ1510336 č. 1975 je předat praktické zkušenosti pro genotypizaci genů, ovlivňujících složení kravského mléka. Genotypizace je prováděna na genové úrovni metodami molekulární genetiky. Metodika bude poskytnuta laboratorům, které provádí genotypizaci polymorfních lokusů jako servis pro šlechtitele a chovatele dojených plemen v ČR.

Náplň certifikované uplatněné metodiky:

Náplní certifikované metodiky QJ1510336 č. 1975 je popis současného stavu poznání o některých významných genech, ovlivňujících obsah a složení tuku v kravském mléce. Dále metodika přináší přehledně uspořádané laboratorní metodiky, umožňující implementaci do laboratorů se základním vybavením pro molekulárně genetické analýzy.

Zdroj certifikované uplatněné metodiky:

Projekt MZe NAZV KUS QJ1510336.

Zpracovali dne: 3. 9. 2018; Jindřich Čítek¹, Libor Večerek¹, Lenka Hanusová², Eva Samková³, Oto Hanuš⁴, Zuzana Křížová¹, Tereza Kávová¹, Irena Jelínková¹, Robert Kala³;
¹Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra genetiky a speciální produkce rostlinné; ²Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra zootechnických věd; ³Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů; ⁴Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů metodiky od 20. 12. 2018.

I. Cíl metodiky

Cílem certifikované metodiky je předat praktické zkušenosti pro genotypizaci markerů, ovlivňujících složení kravského mléka. Genotypizace je prováděna na genové úrovni metodami molekulární genetiky.

Metodika je dedikována projektu NAZV QJ1510336. Bude poskytnuta laboratořím, které provádí genotypizaci polymorfních lokusů jako servis pro šlechtitele a chovatele dojených plemen v ČR.

II. Vlastní popis metodiky

V produkci potravinových surovin živočišného původu dochází k tomu, že se stále větší důraz klade na jejich kvalitu. Tato situace je způsobena zejména tím, že trh s potravinami je kvantitativně nasycen a do určité míry regulován. Možnost prosadit se s výrobky v této ostré konkurenci je proto podmíněna jejich vysokou kvalitou. To pochopitelně platí také pro kravské mléko, které představuje zhruba 80 % veškeré produkce mléka a pro mléčné výrobky.

Kromě pozornosti, kterou musí producenti syrového kravského mléka věnovat neustálému zlepšování výživy, ustájení, správnému dojení a ošetření mléka po nadojení se nabízí využití nejnovějších molekulárně-genetických metod ve šlechtitelské práci. Genomová selekce podstatně zefektivnila šlechtitelský proces a zpřesnila odhad plemenné hodnoty zvířat pro ukazatele jako je produkce mléka v kilogramech, procentuální obsah tuku a bílkovin v mléce, jejich produkce v kilogramech za laktaci, ale také celoživotní užitkovost, ukazatele zdraví, exteriér atd. Zatím pouze několik prací však bylo dosud věnováno otázce genomové analýzy detailního složení mléka a jeho technologických vlastností. Protože variabilita obsahu tuku je do velké míry regulována jen několika lokusy, nabízí se možnost genotypizace genů s velkým účinkem na fenotyp, tzv. major genů.

Mléčný tuk je významnou součástí kravského mléka. Jeho obsah se pohybuje od 3 do 6 % v závislosti na celé řadě vnitřních a vnějších faktorů. Z pohledu lidské výživy je tuk základní živinou, nejbohatším zdrojem energie, zdrojem esenciálních mastných kyselin linolové a alfa-linolenové, dále konjugované kyseliny linolové, vitamínů rozpustných v tucích a hormonů. Kromě toho je poměrně významným zdrojem mononenasycených mastných kyselin, zejména kyseliny olejové. Tuk, jako „nositel chuti“, ovlivňuje do značné míry sensorické vlastnosti a podílí se na technologických vlastnostech mléka a mléčných výrobků. Na druhé straně jsou v mléčném tuku výrazně zastoupeny nasycené mastné kyseliny (až 70 % ze všech mastných

kyselin) a cholesterol v množství 120-140 mg.kg⁻¹ (Jensen, 2002; Haug et al., 2007; Dhiman et al., 2005; German et al., 2009; Barłowska et al., 2011).

Procentuální obsah tuku a jeho produkce za laktaci je součástí šlechtitelského programu všech mléčných i kombinovaných plemen. Pozornost je rovněž věnována genetické determinaci spektra mastných kyselin a potenciální možnosti jejího ovlivnění selekcí. Selekcce je umožněna především díky vysoké proměnlivosti (variabilitě) mléčného tuku (v porovnání s ostatními složkami mléka) a velká variabilita byla zjištěna i v obsazích jednotlivých MK a jejich skupin. V literatuře se lze setkat se snahou cíleně ovlivnit složení tuku, což je podpořeno i zjištěnými koeficienty heritability (Stoop et al., 2008; Garnsworthy et al., 2010; Petrini et al., 2016).

Předkládaná metodika se proto zabývá některými významnými geny, které jsou známé tím, že ovlivňují produkci mléka, obsah mléčného tuku a jsou spojovány se syntézou mléčného tuku a zastoupením mastných kyselin. Autoři certifikované metodiky předkládají souhrn laboratorních metodik a dosud zjištěné výsledky, které vyplynuly z řešení projektu QJ1510336.

1) Gen *DGATI*

Charakteristika genu

U polymorfismu lokusu diacyl-glycerol-acyl transferázy 1 (*DGATI*) byl opakovaně potvrzen statisticky významný vliv na obsah tuku v kravském mléce. Gen kóduje enzym DGAT1, který katalyzuje finální krok syntézy triacylglycerolů (Sanders et al., 2006).

V řadě studií byl popsán QTL (quantitative trait locus, lokus pro kvantitativní znak) o délce 3 cM s vlivem na ukazatele mléčné produkce, zejména na obsah tuku, v centromerické oblasti chromosomu 14 (BTA14; Riquet et al., 1999; Looft et al., 2001). Grisart et al. (2002, 2004) a Winter et al. (2002, 2004) popsali nonkonservativní dinukleotidovou substituci K232A v acyl-CoA *DGATI* genu v pozici 10433 a 10434 v exonu 8 jako příčinu působení zmíněného QTL.

Bylo však zjištěno, že v témže QTL existuje genetická variance mimo mutaci *DGATI* K232A (Bennewitz et al., 2004; Kühn et al., 2004). Winter et al. (2002) považuje za pravděpodobnou příčinu polymorfismu typu variable number of tandem repeats (VNTR) v promotoru *DGATI*. U německého holštýna popsali Kühn et al. (2004) 5 alel ve VNTR

polymorfismu v *DGATI* promotoru a zjistili jejich vliv na tučnost mléka. Sanders et al. (2006) referuje o 6 alelách v promotoru u angelnského plemene.

Na pracovišti Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity byly provedeny analýzy, které prokázaly signifikantní vliv lokusu *DGATI* na ukazatele mléčné užitkovosti jak u českého strakatého, tak holštýnského plemene pro polymorfismus v kódující sekvenci (K232A) i pro polymorfismus v promotoru (Čítek et al., 2007; Hradecká et al., 2008; Hanusová et al., 2014). Rovněž analýzy zahraničních autorů tuto skutečnost opakovaně prokázaly (Grisart et al., 2002; Weller et al., 2003; Sanders et al., 2006; Fontanesi et al., 2014).

Metoda genotypizace

Polymorfismus K232A v genu <i>DGATI</i> (upraveno dle Winter et al., 2002)							
PCR				RFLP			
Složení směsi	Objem (μl)	Program T (°C)	Čas		Složení směsi		
PCR pufr 10x	2,0	95	pauza		pufr 10x	1,7 μl	
MgCl ₂ (25mM)	1,2	95	5 min		restriktáza <i>CfrI</i>	1,0 μl (10U)	
dNTP's	2,0	94	45 s	} 35x	PCR produkt	15 μl	
primer F	1,0	61	45 s				
primer R	1,0	72	45 s			teplota/čas	37°C/přes noc
<i>Taq</i> -polymeráza (1U)	2,0	72	4 min				
DNA	1,3	4	pauza		alely - délky fragmentů	A – 411 bp	
DMSO	1,0					K – 208/203 bp	
H ₂ O	8,5						
Σ	20,0						
Primery ^{*1}							
DGAT1 F: 5' - CAA GGC CAA GGC TGG TGA G - 3'							
DGAT2 R: 5' - GGG GGC GAA GAG GAA GTA GTA G - 3'							

^{*1} Ředění primerů (pracovní roztok): 10 μl zásobního roztoku (koncentrace 100 pmol/μl) + 90 μl H₂O

Metoda genotypizace

Polymorfismus v promotoru genu <i>DGATI</i> (upraveno dle Kühn et al., 2004)							
	PCR				Fragmentační analýza ABI® PRISM 310		
Složení směsi	Objem (μl)	Program T (°C)	Čas		Specifikace		
PCR pufr 10x	1,0	95	pauza	35x	loading (μl)	PCR produkt	2,0
MgCl ₂ (25mM)	0,6	95	5 min			STD ^{*2}	0,5
dNTP's	1,0	94	45 s		formamid	12,5	
primer F	1,0	60	45 s		STD ^{*2}	Rox 400HD	
primer R	1,0	72	45 s		filtr	D	
<i>Taq</i> -polymeráza (1U)	1,0	72	4 min		injekce		10 s
DNA	1,0	4	pauza		délka separace		25 min
Q Solution	1,8						
H ₂ O	2,6						
Σ	11,0						
Primery^{*1}							
PRIM F: 5' - TCA GGA TCC AGA GGT ACC AG - 3'							
PRIM R: 5' - GGG GTC CAA GGT TGA TAC AG - 3'							

^{*1} Ředění primerů (pracovní roztok): 10 μl zásobního roztoku (koncentrace 100 pmol/μl) + 90 μl H₂O

^{*2} STD – typ interního standardu

Docílené výsledky

Zjištěné výsledky jednoznačně prokazují, že existuje statisticky významný vliv polymorfismu v genu *DGATI* na ukazatele mléčné užitkovosti. Genotyp AA kódující alanin byl v našich studiích u býků používaných v plemenitbě asociován s vysokými plemennými hodnotami pro dojivost v kilogramech. Býci s genotypem KK kódujícím lysin měli naopak vysokou plemennou hodnotu pro obsah tuku v mléce v procentech a přes nižší dojivost jejich plemenná hodnota pro produkci tuku v kilogramech byla nejvyšší. Heterozygotní genotyp KA vykazoval prostřední hodnoty, což ukazuje, že na lokusu *DGATI* je pravděpodobně intermediární dědičnost. Je rovněž zcela zřejmé, že polymorfismus *DGATI* přispívá k negativní korelaci mezi produkcí mléka (nádojem) a obsahem tuku v mléce. I když *DGATI* neovlivňuje přímo syntézu bílkovin, měli býci s genotypem KK vyšší plemennou hodnotu pro obsah bílkovin, avšak rozdíl byl mnohem nižší než u obsahu tuku. Z toho důvodu byly plemenné hodnoty pro produkci bílkovin v kilogramech vyšší u býků s genotypem AA, a to v důsledku jejich vyšší plemenné hodnoty pro nádoj.

V polymorfismu v promotoru genu *DGATI* byl genotyp CC asociován s významně nižší plemennou hodnotou pro obsah tuku než genotyp CD a s nižší plemennou hodnotou pro obsah bílkovin než CD a CE genotypy. Alela C i genotyp CC byly asociovány s vyšší plemennou hodnotou pro nádoj a tedy také s nevýznamně vyšší hodnotou pro produkci tuku a bílkovin v

kilogramech. U genotypu *EE* byla zjištěna nejnižší plemenná hodnota pro nádoj a nejvyšší pro obsah tuku, podobně tomu bylo i pro alelu *E*.

Protože byl jednoznačně prokázán vliv alely *A* v polymorfismu K232A na vyšší dojivost a produkci bílkovin, provedli jsme rovněž společnou analýzu pro oba polymorfismy. Jako nejvhodnější kombinace genotypů pro plemennou hodnotu pro nádoj, produkci bílkovin a tuku v kilogramech se jevil genotyp *AA* v místě K232A a *CC* v promotoru (*AA/CC*). Dále byla provedena analýza u homozygotů *AA* v polymorfismu K232A, kteří mají vysokou plemennou hodnotu pro nádoj a produkci bílkovin v kilogramech a nižší pro obsah tuku. Analýza ukázala, že alela *C* v promotoru vykazuje u těchto býků asociaci s vyšší plemennou hodnotou pro nádoj mléka a s nižší pro obsah složek v procentech. Plemenná hodnota pro produkci tuku i bílkovin byla s alelou *C* v pozitivní vazbě.

Příčina vlivu promotorového polymorfismu na fenotyp (např. Kühn et al., 2004) je v přítomnosti VNTR v regulační oblasti genu *DGATI*. Tato sekvence obsahuje motiv CCCGCC, který je potenciálním vazebným místem pro transkripční faktor SP1. V eukaryontních genomech jsou vazebná místa pro SP1 známá jako zesilovače transkripce. Přítomnost uvedeného motivu proto může vysvětlovat rozdílnou úroveň transkripce regulovaného genu a různý efekt polymorfismů v promotoru na fenotyp, tj. na procento tuku v mléce.

U *DGATI* je v literatuře potvrzován i vliv na zastoupení MK v mléce (Schennink et al., 2007; Bovenhuis et al., 2016).

Doporučení pro praxi

Z vlastních výsledků i literárních zdrojů celkově vyplývá, že genotypy K232 *AA* a promotorový genotyp *CC*, resp. alely *A* a *C* jsou výhodné pro šlechtění na vysokou produkci mléka, tuku a bílkovin. Pokud je žádoucí zvyšovat obsah tuku v procentech v mléce, doporučuje se preferovat alelu *K* v polymorfismu K232A.

DGATI je považován za jeden z nejvýznamnějších genů, ovlivňujících tučnost mléka. Protože rovněž další autoři zjistili podobné výsledky, lze polymorfismy v tomto genu považovat za vhodné k zařazení do šlechtitelských programů.

2) Gen *SCD1*

Charakteristika genu

U skotu jsou známy dvě izoformy stearyl- CoA- desaturázy (SCD), gen *SCD5* se nachází na BTA6 a exprimuje se v mozku, gen *SCD1* se nachází na BTA26 a exprimuje se v tukové tkáni a mléčné žláze (Schennink et al., 2008).

Enzym stearyl- CoA- desaturáza 1 (SCD1) působí nejen v adipózní tkáni, ale i např. v mléčné žláze, kde ovlivňuje zastoupení mastných kyselin v mléce (Conte et al., 2010).

Gen *SCD1* lze považovat za kandidátní gen potenciálně ovlivňující zastoupení mastných kyselin v tukové tkáni skotu. Gen *SCD1* kóduje enzym stearyl-CoA desaturázu, který je zodpovědný za přeměnu SFA (saturated fatty acids, nasycených mastných kyselin) na příslušné MUFA (monounsaturated fatty acids, mononenasyčené mastné kyseliny, jedna dvojná vazba) inzercí dvojně vazby na pozici mezi uhlíky 9 a 10. Tento enzym se rovněž podílí na endogenní produkci isomeru *cis*-9, *trans*-11 konjugované kyseliny linolové, CLA (Inostroza et al., 2013). Enzym SCD1 souvisí s produkcí *cis*-9 C14:1, *cis*-9 C16:1, *cis*-9 C18:1 a CLA z C14:0, C16:0, C18:0 a kyseliny vakcenové (Griinari a Bauman, 1999). Garnsworthy et al. (2006) použili jako měřítko aktivity SCD1 tzv. desaturační indexy, např. poměr $C14:1/(cis-9 C14:1 + C14:0)$. Mléko a maso přežvýkavců jsou přirozenými zdroji CLA s pozitivními efekty na zdraví člověka (Pariza et al., 2000; Dhiman et al., 2005).

Gen *SCD1* je také pokládán za významný kandidátní gen ovlivňující nenasycenost mléčného tuku, neboť enzym SCD1 je určující pro rychlost syntézy MUFA. U přežvýkavců je jedním z klíčových enzymů majících významný vliv na složení mastných kyselin v mléce, protože tento enzym katalyzuje přeměnu SFA s počtem uhlíků C10 až C18 na jejich mononenasyčené formy. Velmi významná je také syntéza CLA (MacDonald, 2000).

U *SCD1* genu japonského černého skotu (plemeno wagyu) byly identifikovány 3 SNP v exonu 5. SNP v pozici c.878C>T je příčinou substituce alaninu (alela A) na valin (alela V) na 293. aminokyselinové pozici (Ala293Val), tato substituce se nachází v katalytickém místě enzymu. Identifikovány byly všechny tři možné genotypy AA, VA a VV (Taniguchi et al., 2004). Variantou A genu pozměněný enzym SCD1 zvýšil svoji aktivitu, důsledkem toho se zvýšilo zastoupení MUFA a snížil bod tání intramuskulárního tuku.

Analýza u kanadského skotu plemene jersey ukázala, že alela 293A je pozitivně spojena s větším obsahem MUFA s počtem uhlíků C10 až C12 v porovnání s alelou 293V (Kgwatalala et al., 2009). Alela A byla rovněž spojena s vyšší dojivostí a produkcí tuku, nezjistili však

asociaci s C16, C18 nebo CLA. Schennink et al. (2008) uvádí, že nezjistili asociaci mezi polymorfismem v genu *SCD1* a obsahem a produkcí mléčného tuku a bílkovin a nádojem.

Metoda genotypizace

Polymorfismus A293V v genu <i>SCD1</i> (upraveno dle Inostroza et al., 2013)						
PCR				RFLP		
Složení směsi	Objem (μl)	Program T (°C)	Čas		Složení směsi	
Mastermix PPP	15,0	94	5 min	} 35x	pufr 10x	1,7 μl
primer F	0,8	94	20 s		restriktáza <i>Fnu4HI</i>	1,0 μl
primer R	0,8	65	20 s		PCR produkt	15 μl
DNA	3,0	72	30 s			
H ₂ O	13,4	72	5 min		teplota/čas	37°C/přes noc
Σ	33	4	pauza			
					alely - délky fragmentů	T – 122+28+20 bp C – 75+47+28+20 bp
Primery ^{*1}						
SCD F: 5' - ACC TGG CTG GTG AAT AGT GCT – 3'						
SCD R: 5' - TCT GGC ACG TAA CCT AAT ACC CT – 3'						

^{*1} Ředění primerů (pracovní roztok): 10 μl zásobního roztoku (koncentrace 100 pmol/μl) + 90 μl H₂O

Docílené výsledky

Naše dosavadní zatím pouze předběžné výsledky ukázaly, že populace nebyla v Hardy-Weinbergově rovnováze. I když relativní četnosti alel *C* a *T* byly velmi podobné, 0,44 a 0,56, četnost genotypu *CC* byla pouze 0,03, tj. 6x nižší, než teoretická. Relativní skutečná četnost genotypu *TT* byla poloviční oproti teoretické. Vyšší byla četnost heterozygotních genotypů *CT*, cca 1,6x vyšší oproti teoretické. Při asociační analýze jsme nezjistili statisticky významný vliv genotypu nebo alely na ukazatele mléčné užitkovosti, heterozygotní genotyp však vykazoval lepší hodnoty. Námi provedená asociační analýza obsahu mastných kyselin rovněž neposkytla statisticky významné výsledky. Podle literárních zdrojů (Inostroza et al., 2013), je genotyp c.878 *CC* asociován s vyšším obsahem mastných kyselin C14:1, C17:1, *trans*-9 C18:1, *cis*-9 C18:1, rovněž tak s celkovým obsahem MUFA a vyšším poměrem C14:1/C14:0 než další genotypy. Dále je tento genotyp spojován s vyšším obsahem CLA.

Doporučení pro praxi

I když studie o vlivu *SCD1* genu na složení mléka vyžadují opakované potvrzení dosud zjištěných výsledků, předběžné závěry lze na základě literárních pramenů formulovat tak, že genotyp *CC* se z hlediska kvality mléčného tuku jeví jako výhodnější, zvyšuje obsah

mastných kyselin, ceněných v lidské výživě. S ohledem na okolnost, že studium genu není dostatečně pokročilé, se však doporučení pro chovatelskou praxi zatím jeví jako předčasné.

3) Gen *LEP*

Charakteristika genu

Leptin (*LEP*) je protein produkovaný tukovou tkání, který reguluje obsah tuku v organismu (Taniguchi et al., 2002). Skládá se ze 167 aminokyselin (Dandapat et al., 2010) a zapojuje se do regulace příjmu krmiva, energetické bilance, imunitních funkcí a reprodukce (Javanmard et al., 2008). Tento protein je kódován genem pro *LEP*, který byl nazván jako tzv. „obese gene“ (*OB*), gen pro obezitu (Almeida et al., 2003). Molekulárně genetickými analýzami byla v tomto genu detekována řada polymorfismů a byly provedeny asociační studie z hlediska jejich vztahu k užitkovým a reprodukčním vlastnostem u skotu.

Předpokládá se, že gen pro *LEP* by mohl být potenciálním kandidátním genem regulujícím poměr tuku a libové svaloviny u skotu, je tedy jedním z genetických faktorů ovlivňujících hlavní ukazatel kvality masa, tzv. marbling (Taniguchi et al., 2002). U myši mutace *OB* nebo v genu kódujícím *OB* receptor (*OB-R*) mají za následek obezitu, neplodnost a různé varianty diabetu.

U skotu se gen pro *LEP* nachází na BTA4, skládá se ze 3 exonů a 2 intronů, pouze 2 exony jsou translatovány (Javanmard et al., 2008).

Haegeman et al. (2000) identifikovali v bovinním genu pro *LEP* C-T mutaci v exonu 3. Některé studie uvádí asociaci tohoto polymorfismu s obsahem tuku a bílkovin v kravském mléce (Liefers et al., 2002; Madeja et al., 2004). Lagonigro et al. (2003) detekovali tři dvoualelické polymorfismy, a to A-T a C-T v exonu 2 a C-T v exonu 3. Polymorfismy v kódujících oblastech *OB* genu byly sledovány z hlediska jejich vlivu na příjem krmiv zvířaty. Na základě srovnávacích studií byl prokázán zvýšený příjem krmiv pouze u jedinců s polymorfismem na pozici 252.

Javanmard et al. (2008) zkoumali *Sau3AI* polymorfismus. V sekvenci intronu 2 *OB* genu byly detekovány dva polymorfismy v pozicích 1560 C-T a 1620 G-A (Lien et al., 1997). V této nekódující oblasti genu pro *LEP* zjistili Pomp et al. (1997) analýzou PCR/RFLP další blíže nespécifikovanou mutaci. Polymorfismy intronových sekvencí jsou nadále studovány v souvislosti jejich vztahu k reprodukčním vlastnostem hospodářských zvířat (Almeida et al., 2003). Brickell et al. (2010) detekovali tři polymorfismy v bovinním genu pro *LEP* asociované s perinatální mortalitou telat.

Metoda genotypizace

Polymorfismus C-T na exonu 3 v genu <i>LEP</i> (upraveno dle Haegeman et al., 2000)						
	PCR				RFLP	
Složení směsi	Objem (μl)	Program T (°C)	Čas		Složení směsi	
PCR pufr 10x	3,0	95	5 min	35x	pufr 10x	1,7 μl
MgCl ₂ (25mM)	2,0	95	45 s		restriktáza <i>HphI</i>	1,0 μl (10U)
dNTP's	3,0	53	60 s		PCR produkt	15 μl
primer F	1,5	72	60 s			
primer R	1,5	72	5 min		teplota/čas	37°C/přes noc
<i>Taq</i> -polymeráza (1U)	3,0	15	pauza			
DNA	2,0				alely - délky fragmentů	M – 331 bp W – 311 + 20 bp
H ₂ O	14,0					
Σ	30,0					
Primery ^{*1}						
LEP F: 5' - GGG AAG GGC AGA AAG ATA G – 3'						
LEP R: 5' - TGG CAG ACT GTT GAG GAT C – 3'						

^{*1} Ředění primerů (pracovní roztok): 5 μl zásobního roztoku (koncentrace 100 pmol/μl) + 90 μl H₂O

K detekci jednotlivých genotypů pro polymorfismus C-T v exonu 3 se doporučuje metoda PCR/RFLP podle Haegeman et al. (2000), Liefers et al. (2002) s modifikací.

Docílené výsledky

V laboratoři molekulární genetiky Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích byl zjišťován polymorfismus *LEP* u tří plemen skotu: české červinky, slovenského pincgavského skotu a německého černostrakatého skotu. Genetická variabilita genu pro *LEP* byla sledována u celkem 228 jedinců (Řehout et al., 2005).

Studie prokázala výraznou převahu alely *W* v populacích všech sledovaných plemen s rozmezím 0,621–0,875, což koresponduje s frekvencemi zjištěnými zahraničními autory u jiných plemen skotu. Nejvyšší frekvence této alely byla zjištěna u slovenského pincgavského plemene (0,875), čemuž odpovídají i vysoké hodnoty četností homozygotů *WW* (0,750). Naopak u plemene česká červinka byl nejčastější heterozygotní genotyp *MW* (0,529). Relativní genotypové četnosti byly u všech testovaných plemen v Hardy-Weinbergerově rovnováze, tzn., že tyto populace zůstávají ve sledu generací v poměrně stejném genotypovém složení. Liefers et al. (2002) zjistili vysoké zastoupení alely *W* u holštýnsko-fríského plemene.

Dandapat et al. (2009) uvádějí, že *HphI* polymorfismus genu pro *LEP* má signifikantní vliv na růstové charakteristiky, produkci mléka na první a druhé laktaci, průměrnou denní dojivost během první laktace a délku první laktace. Tento polymorfismus vykazoval také signifikantní vliv na produkci mléka a mléčných bílkovin (Madeja et al., 2004). Výsledky tedy ukazují, že

gen *LEP* lze považovat za kandidátní pro příjem krmiva, konverzi živin, některé parametry mléčné a masné užitkovosti.

Kawaguchi et al. (2017) zjistili statisticky významný vliv některých polymorfismů na skladbu mastných kyselin v tuku v jatečném těle.

Doporučení pro praxi

Genotyp *MM* (neštěpená alela) má tendenci k menšímu snížení živé hmotnosti během první fáze laktace a k nižšímu obsahu laktózy v mléce (Liefers et al., 2002). Uvedený polymorfismus v kombinaci s dalšími v genu pro *LEP* vykazuje statisticky významný vliv na příjem krmiva, dojivost v kilogramech, produkci tuku a bílkovin v kilogramech.

Polymorfismy v leptinovém genu si zaslouží intenzivní studium, protože v řadě prací byla zjištěna asociace polymorfismů k ukazatelům mléčné i masné produkce, energetické bilanci, příjmu krmiva a dalším ekonomicky důležitým vlastnostem.

4) Gen *AGPAT6*

Charakteristika genu

Určité sekvence na BTA27 ovlivňují obsah mléčného tuku a spektrum mastných kyselin. Jako zvláště významná se jeví podskupina kandidátních kauzálních polymorfismů v exonech 5' UTR a v intronu genu 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferáza 6 (*AGPAT6*). Zjištěné výsledky naznačují, že varianty ovlivňující expresi *AGPAT6* jsou kauzálně zapojeny do diferenciální syntézy mléčného tuku s pleiotrofními důsledky pro různorodost spektra dalších mléčných složek (Littlejohn et al., 2014). *AGPAT6* působí v tukové tkáni, mléčné žláze a jiných tkáních.

Bylo zjištěno, že vyřazení genu *AGPAT6* u myši produkuje zvířata s poruchami laktace, kde se v mléce od zvířat s dvojitým knockoutem genu snížily diacylglyceroly a triacylglyceroly o přibližně 90 % (Beigneux et al., 2006).

Bionaz et al. (2008) uvádí 8 izoform AGPAT, a to AGPAT1 až AGPAT8. Proteiny se podílí na syntéze triacylglycerolů, fosfolipidů a acylaci kyseliny lysofosfatidové (LPA). Podle výskytu a exprese mRNA izoform je zřejmé, že *AGPAT6* byla nejrozšířenější izoformou, což odpovídalo přibližně 60 % veškeré *AGPAT* mRNA, následovaly *AGPAT1* a *AGPAT3*.

Metoda genotypizace

Polymorfismus alel v genu <i>AGPAT6</i> (upraveno dle Mathew et al., 2014)						
PCR				Fragmentační analýza ABI® 3500 DX		
Složení směsi	Objem (μl)	Program T (°C)	Čas		Specifikace	
mastermix PPP	5,0	95	5 min		velikostní standard	500-LIZ
primer F	0,25	95	40 s	35x	dd formamid ^{*2}	0,5 μl
primer R	0,25	58	60 s			
DNA	1,5	72	90 s			
H ₂ O	3,5	72	10 min		pipetování (do sekvenačních destiček)	11,0 μl
Σ	10,5	4	pauza		naředěná DNA	5 ng/μl
						1,0 μl
					denaturace	vortex
					chlazení (na ledu)	95°C/5 min
					délka kapiláry	5 min
						50 cm, osmikanálová

Primery^{*1}

AGPAT6 F: 5'- CAA GGC GGC GTA GAC AAA - 3'

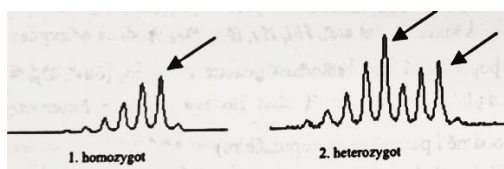
AGPAT6 R: 5'- AGC CCC GTC AGA GGT TCA T - 3'

^{*1} Ředění primerů (pracovní roztok): 10 μl zásobního roztoku (koncentrace 100 pmol/μl) + 90 μl H₂O

^{*2} dd formamid – deionizovaný formamid

Fragmentační analýza *AGPAT6*

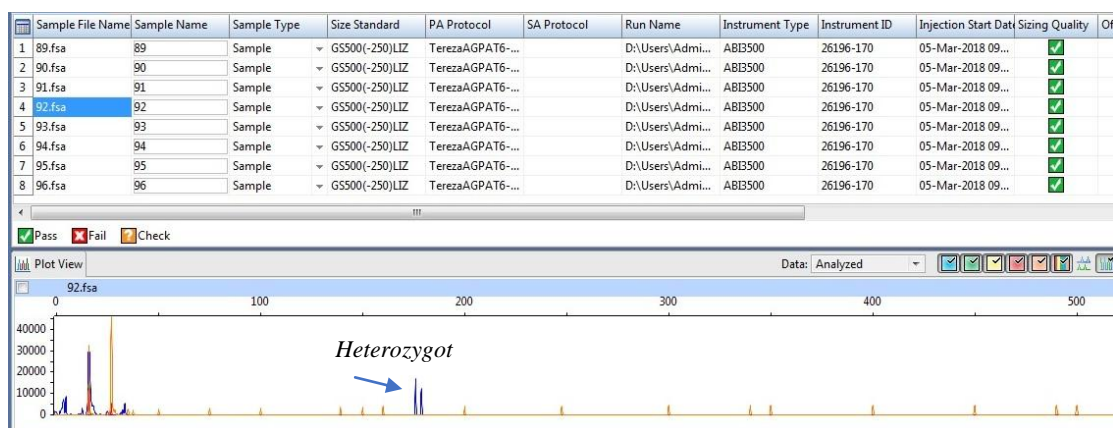
Délka alel se zjišťuje fragmentační analýzou v automatickém sekvenátoru.



Složení směsi a postup při fragmentační analýze:

1. Velikostní standard 500-LIZ 0,5 μl
2. Přidáme deionizovaný formamid 11 μl
3. Vortex
4. Do sekvenačních destiček napipetujeme vzorky po 11 μl
5. Přidáme naředěnou DNA (5 ng/μl) 1 μl
6. Vortex
7. Denaturujeme 5 minut při 95 °C.
8. Zchladíme na ledu po dobu pěti minut.

Polymorfismus alel byl testován pomocí fragmentační analýzy na osmikapilárovém sekvenátoru ABI®3500 DX Genetic Analyser Applied Biosystems za pomoci Dye setu G5 a polymeru POP7 s délkou kapiláry 50 cm. Zpracování výsledků fragmentační analýzy a určení genotypů proběhlo pomocí softwaru GeneMapper (Applied Biosystems). Výsledkem bylo rozlišení alel lišících se délkou, tj. indel polymorfismus na BTA27 g.36198118GGC.



Doporučení pro praxi

Dosavadní analýzy polymorfismu v genu *AGPAT6* a jeho vlivu na produkci mléčného tuku nejsou příliš četné. Nicméně statisticky významný vliv byl některými autory prokázán (Littlejohn et al., 2014), a to jak na obsah tuku, tak na spektrum mastných kyselin. V současné době by formulace jednoznačných závěrů byla předčasná. Doporučujeme další intenzivní výzkum. Spolu s polymorfismy v genu *DGATI* je gen *AGPAT6* velmi perspektivním regionem v bovinním genomu při výzkumu možností šlechtitelského ovlivnění produkce mléčného tuku a jeho složení.

III. Vyjádření k novosti postupů

Metodika přináší návod k postupu při laboratorní genotypizaci polymorfních lokusů. Týká se jak lokusů chovatelské veřejnosti dosud méně známých, tak lokusů již dříve popsanych. Zcela nové je zařazení lokusů s potenciálním vlivem na složení mastných kyselin mléčného tuku.

IV. Popis uplatnění metodiky

Certifikovaná metodika je určena zejména laboratořím, zabývajícím se genetickými analýzami u skotu. Výsledky genotypizace předmětných polymorfních lokusů jsou zajímavé pro majitele plemenných zvířat, šlechtitelské firmy a potenciálně rovněž pro zpracovatele mléka, který může cenu vykupované suroviny diferencovat podle zastoupení preferovaných genotypů ve stádě dojnic. Tímto způsobem by bylo možné chovatele stimulovat k vytváření stáda dojnic, které budou produkovat mléko s požadovanou kvalitou.

Výhodou je, že tyto analýzy mohou být provedeny bezprostředně po narození zvířete. Jejich výběr pro produkční stádo může být proveden tak, že budou uspořeny náklady na odchov zvířat s nežádoucím genotypem.

Na druhé straně je změna genotypových frekvencí ve stádě poměrně dlouhodobou záležitostí, proto musí šlechtitelé a chovatelé reagovat v předstihu.

V. Ekonomické aspekty

1) Vyčíslení nákladů na zavedení postupů uvedených v metodice

Náklady na pořízení potřebných přístrojů závisí na vybavení laboratoře, která bude metodiku zavádět. Pro popsané laboratorní metody je zapotřebí termální cykler, UV transiluminátor, inkubátory, elektroforézy, pipety. Uvedené přístroje jsou v běžně vybavené genetické laboratoři k dispozici. Provozní náklady (chemikálie, enzymy, mzdy) na genotypizaci jednoho lokusu pro jedno zvíře se pohybují cca kolem 200 Kč. Rozpětí výše nákladů pro konkrétní lokusy je závislé zejména na ceně použitých restričních endonukleáz, ceně za syntézu primerů.

2) Vyčíslení ekonomického přínosu

Velmi podstatná může být úspora nákladů za odchov a chov včas vyřazených plemenných býků s genotypem nežádoucím pro zvolenou strategii. Na příjmové straně jde o zvýšení tržeb za kvalitnější mléko. Produkce speciálních mléčných výrobků v menším množství je šancí pro menší mlékárny, které mohou konkurovat kvalitou.

Přesná kvantifikace uvedených přínosů je velmi obtížná a závisí na řadě faktorů, jako jsou náklady na krmný den v odchovu, náklady na odhad plemenné hodnoty mladého plemeníka, výkupní ceny kravského mléka, cena inseminační dávky aj.

Při kalkulaci úspory za odchov a chov včas vyřazených plemenných býků s nevhodným genotypem, kterou lze považovat za nejvýznamnější, vycházíme z nákladů na odchov a chov do doby, kdy je proveden odhad plemenné hodnoty a rozhodnuto, zda inseminační dávky budou použity v dalším šlechtění. Tyto náklady odhadujeme na cca 160 tis. Kč na jednoho býka, po odečtení tržby za prodej na jatka cca 140 tis. Kč.

V ČR uvažujeme zařazení 200 plemenných býků ročně do testace. Úspora za odchov a chov závisí na počtu býků, kteří budou genotypizováni na lokusech uvedených v této metodice a vyřazení před zahájením odchovu. Intenzita selekce podle genotypu pro kvalitativní ukazatele produkce musí být volena velmi obezřetně tak, aby umožnila v další fázi selekci na kvantitativní ukazatele (plemenná hodnota pro produkci mléka, bílkovin, tuku, přírůstek). Při vyřazení 15 býků podle genotypu na uvedených lokusech (býci s kombinací nevhodných genotypů na několika lokusech) lze kalkulovat s úsporou 1,5 mil. Kč.

K uvedené kalkulaci přistupují přínosy za zlepšení kvality produkovaného mléka. V tomto případě je vyčíslení velmi obtížné, protože závisí na vývoji cen vykupovaného syrového mléka, objemu produkce v ČR, resp. v jednotlivém zemědělském podniku, objemu dovozu a vývozu, zvýšení ceny produktů od zvířat s požadovaným genotypem. Zvláště je však nutné zdůraznit, že zlepšování kvality v důsledku změn genotypů je postupný proces. Změna alelických a genotypových frekvencí v celé populaci skotu probíhá rychlostí, která je dána intenzitou selekce a délkou generačního intervalu. Protože selekce probíhá hlavně na kvantitativní ukazatele mléčné užitkovosti, reprodukci a exteriér a generační interval je u skotu dlouhý, lze výraznější změny frekvencí v produkčních stádech dojených krav očekávat v řádu let.

Uvedené kalkulace jsou proto rámcové a nevystihují plně ekonomický potenciál genotypizací, jejichž laboratorní metodiky jsou zde uvedeny.

Při současné a rovněž budoucí nadvýrobě mléka je jediným způsobem zlepšení ekonomické efektivnosti jeho výroby zvýšená kvalita. Kromě zlepšování chovatelských podmínek, zejména výživy, zde zásadní roli hraje zlepšování genetického potenciálu. Řada šlechtitelských firem již reagovala a v katalogích plemenných býků uvádí jejich genotyp pro některé major geny, např. kappa kasein. Je nepochybné, že šlechtitelské možnosti se nabídkou genotypizace dalších genů velkého účinku zlepšují a nadále zlepšovat budou.

VI. Seznam použité literatury

- Almeida S. E. M., Almeida E. A., Moraes J. C. F., Weimer T. A. (2003): Molecular markers in the *LEP* gene and reproductive performance of beef cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120, 106-113.
- Barłowska J., Sz wajkowska M., Litwińczuk Z., Król J. (2011): Nutritional value and technological suitability of milk from various animal species used for dairy production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 291-302.
- Beigneux A. P., Vergnes L., Qiao X., Quatela S., Davis R. (2006): *AGPAT6* – a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. *Journal of Lipid Research*, 47, 734-744.
- Bennewitz J., Reinsch N., Paul S., Looft C., Kaupe B., Weimann C., Erhardt G., Thaller G., Kühn Ch., Schwerin M., Thomsen H., Reinhardt F., Reents R., Kalm E. (2004): The *DGATI* K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. *Journal of Dairy Science*, 87, 431-442.
- Bionaz M., Loo J. J. (2008): *ACSL1*, *AGPAT6*, *FABP3*, *LPIN1*, and *SLC27A6* are the most abundant isoforms in bovine mammary tissue and their expression is affected by stage of lactation. *Journal of Nutrition*, 138, 1019-1024.
- Brickell J. S., Pollott G. E., Clempson A. M., Otter N., Wathes D. C. (2010): Polymorphisms in the bovine leptin gene associated with perinatal mortality in Holstein-Friesian heifers. *Journal of Dairy Science*, 93, 340-347.
- Conte G., Mele M., Chessa S., Castiglioni B., Serra A., Pagnacco G., Secchiari P. (2010): Diacylglycerol Acyltransferase 1, Stearoyl-Coa Desaturase 1, and Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 Gene Polymorphisms and Milk Fatty Acid Composition in Italian Brown Cattle. *Journal of Dairy Science*, 93, 753-763.
- Dandapat A., Chakraborty D., Banerjee D. (2010): Highly Polymorphic Bovine Leptin Gene – A Review. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 5, 6-10.
- Dandapat A., Kumar D., Ghosh A. K., Banerjee D. (2009): Association of leptin polymorphism with growth, milk production and reproduction traits in Sahiwal and crossbred cattle. *Indian Journal of Animal Sciences*, 79, 892-896.
- Dhiman T. R., Nam S. H., Ure A. L. (2005): Factors affecting conjugated linoleic acid content in milk and meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 463-482.

- Fontanesi L., Calo D. G., Galimberti G., Negrini R., Marino R., Nardone A., Ajmone-Marsan P., Russo V. (2014): A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle. *Animal Genetics*, 45, 576-580.
- Garnsworthy P. C., Feng S., Lock A. L., Royal M. D. (2010): Short communication: Heritability of milk fatty acid composition and stearoyl-CoA desaturase indices in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 93, 1743-1748.
- Garnsworthy P. C., Masson L. L., Lock A. L., Mottram T. T. (2006): Variation of milk citrate with state of lactation and *de novo* fatty acid synthesis in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 89, 1604-1612.
- German J. B., Gibson R. A., Krauss R. M., Nestel P., Lamarche B., van Staveren W. A., Steijns J. M., de Groot L., Lock A. L., Destailats F. (2009): A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *European Journal of Nutrition*, 48, 191-203.
- Griinari J. M., Bauman D. E. (1999): Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: Yurawecz M., Mossoba M. M., Kramer J. K. G., Pariza M. W., Nelson G. J. (eds.): *Advances in conjugated linoleic acid research*. Champaign, Illinois: AOCS Press, vol. 1, pp 180-200.
- Grisart B., Coppieters W., Farnir F., Karim L., Ford C., Berzi P., Cambisano N., Mni M., Reid S., Simon P., Spelman R., Georges M., Snell R. (2002): Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine *DGATI* gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research*, 12, 222-231.
- Grisart B., Farnir F., Karim L., Cambisano N., Kim J. J., Kvasz A., Mni M., Simon P., Frere J. M., Coppieters W., Georges M (2004): Genetic and functional confirmation of the causality of the *DGATI* K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 2398-2403.
- Haegeman A., van Zeveren A., Peelman L. J. (2000): New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Animal Genetics*, 31, 68-79.
- Haug A., Hostmark A. T., Harstad O. M. (2007): Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6, 1-16.
- Inostroza K. B., Scheuermann E. S., Sepúlveda N. A. (2013): Stearoyl CoA desaturase and fatty acid synthase gene polymorphisms and milk fatty acids composition in Chilean Black Friesian cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26, 263-269.

- Javanmard A., Asadzadeh N., Sarhadi F. (2008): DNA Polymorphism of Bovine Pituitary-Specific Transcription Factor and Leptin Gene Between Iranian *Bos indicus* and *Bos taurus* Cattle. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5, 282-285.
- Jensen R. G. (2002): The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*, 85, 295-350.
- Kawaguchi F., Okura K., Oyama K., Mannen H., Sasazaki S. (2017): Identification of leptin gene polymorphisms associated with carcass traits and fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 88, 433-438.
- Kgwatalala P. M., Ibeagha-Awemu E. M., Mustafa A. F., Zhao X. (2009): Influence of stearoyl-coenzyme A desaturase 1 genotype and stage of lactation on fatty acid composition of Canadian Jersey cows. *Journal of Dairy Science*, 92, 1220-1228.
- Kühn Ch., Thaller G., Winter A., Bininda-Emonds O. R. P., Kaup B., Erhardt G., Bennewitz J., Schwerin M., Fries R. (2004): Evidence for multiple alleles at the *DGATI* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics*, 167, 1873-1881.
- Lagonigro R., Wiener P., Pilla F., Woolliams J. A., Williams J. L. (2003): A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics*, 34, 371-374.
- Liefers S. C., te Pas M. F., Veerkamp R. F., van der Lende T. (2002): Associations between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. *Journal of Dairy Science*, 85, 1633-1638.
- Lien S., Sundvold H., Klungland H., Vage D. I. (1997): Two novel polymorphisms in the bovine obesity gene (*OBS*). *Animal Genetics*, 28, 238-246.
- Littlejohn M. D., Tiplady K., Lopdell T., Law T. A., Scott A., Harland C., Sherlock R., Henty K., Obolonkin V., Lehnert K., Macgibbon A., Spelman R. J., Davis S. R., Snell, R. G. (2014): Expression variants of the lipogenic *AGPAT6* gene affect diverse milk composition phenotypes in *Bos taurus*. *PLoS One*, 9, e85757.
- Looft C., Reinsch N., Karall-Albrecht C., Paul S., Brink M., Thomsen H., Brockmann G., Kühn C., Schwerin M., Kalm E. (2001): A mammary gland EST showing linkage disequilibrium to a milk production QTL on bovine chromosome 14. *Mammalian Genome*, 12, 646-650.
- MacDonald H. B. (2000): Conjugated linoleic acid and disease prevention: A review of current knowledge. *Journal of the American College of Nutrition*, 19, 111-118.

- Madeja Z., Adamowicz T., Chmurzynska A., Jankowski T., Melonak J., Switonski M., Strabel T. (2004): Effect of Leptin Gene Polymorphisms on Breeding Value for Milk Production Traits. *Journal of Dairy Science*, 87, 3925-3927.
- Mathew D. Littlejohn, Kathrin Tiplady, Thomas Lopdell, Tania A. Law, Andrew Scott, Chad Harland, Rick Sherlock, Kristen Henty, Vlad Obolonkin, Klaus Lehnert, Alistair MacGibbon, Richard J. Spelman, Stephen R. Davis, Russell G. Snell (2014): Expression variants of the lipogenic *AGPAT6* gene affect diverse milk composition phenotypes in *bos taurus*. *Plos One*, 9, 1-12.
- Pariza M. W., Park Y., Cook M. E. (2000): Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 223, 8-13.
- Petrini J., Iung L. H., Rodriguez M. A., Salvian M., Pértille F., Rovadoscki G. A., Cassoli L. D., Coutinho L. L., Machado P. F., Wiggans G. R., Mourão G. B. (2016): Genetic parameters for milk fatty acids, milk yield and quality traits of a Holstein cattle population reared under tropical conditions. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 133, 384-395.
- Pomp D., Zou T., Clutter A. C., Barendse W. (1997): Mapping of Leptin to Bovine Chromosome 4 by Linkage Analysis of a PCR-Based Polymorphism. *Journal of Animal Science*, 75, 1427.
- Riquet J., Coppeters W., Cambisano N., Arranz J. J., Berzi P., Davis S. K., Grisart B., Farnir F., Karim L., Mni M., Simon P., Taylor J. F., Vanmanshoven P., Wagenaar D., Womack J. E., Georges M. (1999): Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: Application to milk production in dairy cattle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 9252-9257.
- Sanders K., Bennewitz J., Reinsch N., Thaller G., Prinzenberg E. M., Kühn C., Kalm E. (2006): Characterization of the *DGATI* mutations and the *CSN1S1* promoter in the German Angeln dairy cattle population. *Journal of Dairy Science*, 89, 3164-3174.
- Schennink A., Heck J. M., Bovenhuis H., Visker M. H., van Valenberg H. J., van Arendonk J. A. (2008): Milk fatty acid unsaturation: genetic parameters and effects of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*) and acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGATI*). *Journal of Dairy Science*, 91, 2135-2143.

- Stoop W. M., van Arendonk J. A. M., Heck J. M. L., van Valenberg H. J. F., Bovenhuis H. (2008): Genetic parameters for major milk fatty acids and milk production traits of Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*, 91, 385-394.
- Taniguchi M., Utsugi T., Oyama K., Manmen H., Kobayashi M., Tanabe Y., Ogino A., Tsuji S. (2004): Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black Cattle. *Mammalian Genome*, 14, 142-148.
- Taniguchi Y., Itoh T., Yamada T., Sasaki Y. (2002): Genomic Structure and Promoter Analysis of the Bovine Leptin Gene (Research Communication). *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, 53, 131-135.
- Weller J. I., Golik M., Seroussi E., Ezra E., Ron M. (2003): Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. *Journal of Dairy Science*, 86, 2219-2227.
- Winter A., Alzinger A., Fries R. (2004): Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine *DGATI*. *Genomics*, 83, 172-180.
- Winter A., Krämer W., Werner F. A. O., Kollers S., Kata S., Durstewitz G., Buitkamp J., Womack J. E., Thaller G., Fries R. (2002): Association of lysine-232/alanine polymorphism in bovine gene encoding acylCoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGATI*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 9300-9305.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

- Čítek J., Hanusová L., Brzáková M., Večerek L., Panicke L., Lískovcová L. (2018): Associations between Gene Polymorphisms, Breeding Values, and Glucose Tolerance Test Parameters in German Holstein Sires. *Czech Journal of Animal Science*, 63, 167-173.
- Čítek J., Řehout V., Hradecká E., Večerek L., Panicke L. (2007): The Breeding values of German Holstein Sires and the *DGATI* Polymorphism. *Archiv für Tierzucht*, 50, 136-146.
- Čítek, J., Panicke, L., Řehout, V., Bláhová, B., Pávková, J. (2004): The *DGATI* polymorphism and breeding value of Holstein sires. *Animal Science Papers and Reports*, 22, 19-24.

- Čítek, J., Panicke, L., Řehout, V., Pávková, J. (2004): Plemenné hodnoty holštýnských býků v závislosti na polymorfismu *DGATI*. Collection of Scientific Papers Faculty of Agriculture in Ceske Budejovice Series for Animal Sciences, 21, 41-44.
- Hanusová L., Brzáková M., Míková A., Večerek L., Hosnedlová B., Tothová L., Čítek J. (2016): Analysis of glucose metabolization capability and breeding value of Holstein sires. Livestock Science, 193, 92-94.
- Hanusová L., Míková A., Večerek L., Schroeffelová D., Řehout V., Tothová L., Vernerová K., Hosnedlová B., Čítek J. (2014): Effect of *DGATI* polymorphisms on the estimated breeding values of Czech Simmental sires. Czech Journal of Animal Science, 59, 365-373.
- Hradecká E., Čítek J., Panicke L., Řehout V., Hanusová L. (2008): The relation of *GHI*, *GHR* and *DGATI* polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. Czech Journal of Animal Science, 53, 238-245.
- Kala R., Samková E., Koubová J., Hasoňová L., Kváč M., Pelikánová T., Špička J., Hanuš O. (2018): Nutritionally desirable fatty acids including CLA of cow's milk fat explained by animal and feed factors. Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis, 66, 69-76.
- Kala R., Samková E., Čítek J., Hasoňová L., Hanusová L., Tothová L. (2017): Association of selected genes with milk fat in two breeds of cattle. In MendelNet 2017, Proceedings of 24th International PhD Students Conference. Brno, Mendel University, Faculty of AgriSciences, Czech Republic, Nov 8-9, 696-701.
- Kala R., Samková E., Čítek J. (2016): Selected candidate genes affecting milk fatty acids. Acta Fytotechnica et Zootechnica, 19, Special Issue, 31-33,
- Řehout V, Kváčová B, Kadlec J, Čítek J, 2005. Polymorfismus leptinu u různých plemen skotu. Collection of Scientific Papers Faculty of Agriculture in Ceske Budejovice Series for Animal Sciences, 22, 83-86.
- Samková E., Koubová J., Hasoňová L., Hanuš O., Kala R., Kváč M., Pelikánová T., Špička J. (2018): Joint effects of breed, parity, month of lactation, and cow individuality on the milk fatty acids composition. Mljekarstvo, 68, 98-107.
- Samková E., Kala R., Hasoňová L., Pecová L., Hanuš O. (2018): Využití rutinního stanovení mastných kyselin při odhadu heritability. Mlékařské listy – Zpravodaj, 168, 13-16.

Ne všechny práce ze seznamu literatury (VII, VIII), jejichž studium a poznatky byly využity při vývoji metodiky, jsou citovány explicitně v textu vlastní metodiky pro praxi. Jsou však pro úplnost uvedeny v seznamu výše.

Většina vlastních prací, použita při tvorbě této certifikované metodiky, byla předtím již samostatně odborně oponována, jak plyne ze seznamu výše.

Dedikace QJ1510336

Projekty a podpory rozvoje instituce (podíly): MZe NAZV KUS QJ1510336 (100 %).

Oponenti CM: Ing. Irena Vrtková, Ph.D. (v oboru genetika), Mendelova univerzita v Brně, vědecká pracovnice pro obor molekulární genetika.

Oponenti státní správa: Ing. Zdeňka Majzlíková, Česká plemenářská inspekce.

Autorský kolektiv (podíly): Jindřich Čítek (25 %), Libor Večerek (10 %), Lenka Hanusová (15 %), Eva Samková (15 %), Oto Hanuš (10 %), Zuzana Křížová (10 %), Tereza Kávová (5 %), Irena Jelínková (5%), Robert Kala (5 %).

Přílohy, dokumenty a doklady:

technická řešení a postupy této certifikované metodiky byly zejména podpořeny výsledky vlastního výzkumu, vývoje a empirických poznatků, které byly publikovány.

Certifikovaná metodika pro praxi byla podporována řešením projektů MZe NAZV KUS QJ1510336.

Abstrakt

Kromě pozornosti, kterou musí producenti syrového kravského mléka věnovat neustálému zlepšování výživy, ustájení, správnému dojení a ošetření mléka po nadojení se nabízí využití nejnovějších molekulárně-genetických metod ve šlechtitelské práci. Genotypizace majorgenů umožňuje efektivní výběr žádoucích variant a následné ovlivnění kvality mléka. Zejména geny ovlivňující tučnost mléka zde mohou významně napomoci šlechtitelskému úsilí, které je nyní veden zejména ve směru genomové selekce. Cílem certifikované metodiky je shrnout praktické zkušenosti a ucelené laboratorní metodiky pro genotypizaci několika genů, ovlivňujících složení kravského mléka a předat je laboratořím, které provádí genotypizaci polymorfních genů jako servis pro šlechtitele a chovatele dojených plemen v ČR.

Klíčová slova: mléko, polymorfismus, *DGATI*, *SCD1*, *LEP*, *AGPAT6*

Abstract

In dairy industry, except of care for nutrition, housing, milking etc. the use of methods of molecular biology offers quality improvement of milk. Genotyping of majorgens enables effective selection of favourable variants and influencing of milk quality. Especially the genes influencing the fat content could help significantly in the breeding, even though the genomic approach is now favoured. The goal of the methodic is to summarize the practice and labour methodics for genotyping of some genes, influencing the milk composition, and offer it to the labs doing the genotyping as a service for breeders.

Key words: milk, polymorphism, *DGATI*, *SCD1*, *LEP*, *AGPAT6*

Technické parametry (RIV):upravit

Pravidelná systematická podpora kvality specificky efektivní selekce suroviny pro výrobu mléčných výrobků s vyšším nárokem na tepelné ošetření a s vyšší přidanou hodnotou a tím podpora technologické jistoty zpracovatele. Smlouva byla uzavřena se Svazem výrobců mléka, a.s. Za společnost Ing. Radek Musil, kontakt: Jílová 1550/1, 787 01 Šumperk, tel: 00420 583 214 718; 00420 603 891 289; e-mail: ekonom@dubicka.cz.