

Genetické markery pro kvalitu masa a mléka

Certifikovaná metodika

Jindřich Čítek

Václav Řehout

Lenka Hanusová

Andrea Míková

Libor Večerek

2010

Tato publikace byla vytvořena za finanční podpory grantu MSM6007665806.

I. Cíl metodiky

Cílem certifikované metodiky je předat nové poznatky a zkušenosti pro genotypizaci markerů, ovlivňujících kvalitu hovězího masa a kravského mléka. Genotypizace je prováděna na genové úrovni metodami molekulární genetiky.

Metodika je dedikována projektu MSM6007665806. Metodika bude poskytnuta Laboratoři agrogenomiky a dalším laboratořím, zabývajícím se servisem pro chovatelskou veřejnost v ČR.

II. Vlastní popis metodiky

1) V oblasti chovu skotu dochází v posledních letech k odklonu od pouhého zvyšování produkce mléka a masa ke sledování a zlepšování kvality těchto produktů. Kromě zootechnických a manažerských opatření zaměřených ke stanovenému cíli je potřeba využít nejnovější molekulárně-genetické metody ve šlechtitelské práci. Genomická selekce výrazně zefektivní šlechtitelský proces a zpřesní odhad plemenné hodnoty zvířat, možnost identifikace polymorfismů DNA poskytuje odpověď na otázku, které příčinné lokusy ovlivňují ekonomicky významné užitkové a zdravotní vlastnosti zvířat. Tato metodika se proto zaměřila na některé nově popsané genetické markery, které jsou asociovány s kvalitou hovězího masa a mléka.

V oblasti kvality hovězího masa se stále častěji hovoří zejména o vlastnostech výhodných pro konzumenty či jimi dokonce preferovaných. Podstatnou vlastností je křehkost masa. Zde se významnou měrou zapojuje calpainový enzymatický systém. Předložená metodika se zabývá dvěma genetickými markery z calpainového systému – SNP *CAPN530* a *CAST856*.

Calpains jsou na kalcium-dependentní proteázy, které hydrolyzují substráty ve vybraných oblastech. Celý calpainový systém se skládá ze dvou calpainů - μ -calpain (*CAPN1*) a m-calpain (*CAPN2*) a jejich inhibitoru calpastatinu (*CAST*). Z hlediska kvality masa je hlavní funkcí obou proteáz degradace většiny myofibrilárních proteinů (vyjma aktinu a myosinu) *post-mortem*. Gen pro *CAPN1* se skládá z 22 exonů a 21 intronů, bylo nalezeno 38 jednonukleotidových polymorfismů (SNP). Z nich se za nejpravděpodobnější SNP (Single Nucleotide Polymorphism, jednoduchý bodový polymorfismus) s vlivem na křehkost masa

považuje *CAPN530* v exonu 14. Díky transici na pozici 4558. nukleotidu dochází ke změně adeninové báze (A) na bázi guaninovou (G), což má za následek změnu aminokyseliny isoleucin (Ile) na valin (Val) na pozici 530. aminokyseliny. Alela *G* s sebou nese nižší sílu stříhu než alela *A*.

Calpastatin působí jako specifický inhibitor μ -calpainu. Bylo popsáno celkem 12 SNP, z toho pouze 4 mají za následek změnu aminokyseliny. SNP c.856G>A Ala286Thr se nachází v doméně inhibice calpainu (CID) a může tedy ovlivňovat aktivitu enzymu μ -calpain. Jedinci s alelou *C* mají v místě 856. nukleotidu bázi guanin a na místě 286. aminokyseliny tedy nesou alanin. U jedinců s alelou *T* se na téže místě nukleotidové sekvence nachází báze adenin a dochází u nich k záměně alaninu v threonin. Jedinci s genotypem *TT* mají vyšší křehkost masa než jedinci s genotypem *GG*.

Syntáza mastných kyselin (FASN) je multifunkčním proteinem s významnou rolí v *de novo* tvorbě lipidů u savců. Je asociován s kvalitou mléka i masa. Katalyzuje biosyntézu mastných kyselin s dlouhým řetězcem, a to nejen v dospělosti, ale i během embryonálního vývoje. Je umístěn na chromozomu BTA29 v oblasti výskytu několika lokusů pro kvantitativní znaky (QTL) řady vlastností mléčné užitkovosti. Je významným kandidátním genem pro obsah tuku v mléce i pro kvalitu masa, mutace v genu *FASN* může způsobovat předčasné ukončení syntézy mastných kyselin. Tím ve výsledku dochází ke snížení poměru nasycených mastných kyselin (SFA) ve prospěch polynenasycených (PUFA) a mononenasycených (MUFA) mastných kyselin. V genu pro *FASN* se nachází celá řada jednonukleotidových polymorfismů. Důležitá je mutace g.1792A>G. U genotypu *AA* se ve vazebném místě nachází aminokyselina threonin, u genotypu *GG* alanin. Následkem je pokles hydrolyzační aktivity a nižší výskyt kyseliny myristové. U mléka pak je genotyp *GG* asociován s vyšším obsahem tuku.

Receptor oxidovaného lipoproteinu s nízkou hustotou (OLR1) hraje podstatnou roli v metabolismu lipidů. *OLR1* gen kóduje vaskulární endoteliální receptor, fungující na povrchu buněk. Jeho úkolem je navázat na sebe oxidovanou formu lipoproteinu s nízkou hustotou a následně jej degradovat. *OLR1* může působit jako kandidátní gen, ovlivňující složení mléka, zejména obsah tuku jak ve výtěžku v kg, tak v procentickém zastoupení v celkovém nádoji. Bodový polymorfismus v 3'UTR na pozici 8232. nukleotidu způsobuje záměnu původní báze adeninu (A) za cytosin (C). Výskyt alely *C* je spojen s významným nárůstem výtěžku a procentického zastoupení tuku.

Gen pro ATP vazebnou kazetu, subrodina G, člen 2 (ABCG2) je lokusem kódujícím protein ABCG2, který funguje jako tzv. polotransporter, přenáší přes plasmatickou membránu

různá xenobiotika, karcinogeny a toxiny z buněk tenkého střeva, jater a dalších orgánů. V případě mléčné žlázy dochází k významnému zvýšení exprimace tohoto proteinu v období laktace v závislosti na produkci estrogenu. Při produkci mléka je ABCG2 zodpovědný za sekreci xenobiotik a některých méně zastoupených nutričních látek, jako je vitamin K3 nebo cholesterol, do mléka. Z toho vyplývá, že zatímco v jiných tkáních vykazuje ABCG2 hlavně ochrannou funkci proti xenotoxinům, nelze podobnou funkci připsat ABCG2 i v případě přenosu xenobiotik do mléka, které je následně využíváno k výživě mláďat. SNP v exonu 14 způsobuje záměnu adeninu (A) za cytosin (C). Alela A kóduje aminokyselinu tyrosin, alela C serin. Při výskytu alely A dochází k poklesu celkového nádoje, ovšem za současného nárůstu koncentrace proteinu a tuku v mléce. Vzhledem ke skutečnosti, že alela C má vliv na pokles produkce mléčného tuku a tím snížení negativní energetické bilance po porodu, lze uvažovat o možném pozitivním vlivu této alely na fertilitu.

Caspase Recruitment Domain 15 (CARD15) kóduje protein, který je zapojen do systému rozpoznávajícího tzv. molekulární vzory související s patogeny (pathogen associated molecular patterns, PAMPs). *CARD15* se podílí na rozpoznávání u zánětlivých onemocnění včetně mastitidy. V lokusu pro bovinní *CARD15* byly nalezeny celkem 4 bodové polymorfismy, jedním z nich je SNP c.3020A>T. Zatímco přítomnost alely A má za následek přítomnost glutaminu v aminokyselinové sekvenci, v případě alely T se na stejném místě v sekvenci aminokyselin objevuje leucin. Studie asociace genotypů a plemenných hodnot pro SCS (somatic cell score) u kanadského holštýnského skotu prokázala, že existuje možný vztah mezi SNP c.3020A>T a plemennou hodnotou pro SCS. Jedinci s genotypem *TT* měli 21% nárůst SCS oproti jedincům s genotypem *AA*.

AFLP fragment *CGILA* - markerem je AFLP fragment o délce 155 bp v blízkosti *Lf* genu. Byla prokázána významná asociace mezi polymorfismem v lokusu *CGILA* a skóre somatických buněk (SCS), reziduálními hodnotami klinické mastitidy (CMR) a některými produkčními vlastnostmi. Ve fragmentu byl popsán SNP A>G na pozici 41. nukleotidu AFLP fragmentu. PCR/RFLP analýzy pak prokázaly významně vyšší podíl alely A u jedinců rezistentních vůči mastitidě. Jedinci nesoucí tuto alelu měli významně nižší skóre somatických buněk (SCS) v průběhu laktací oproti jedincům s homozygotním genotypem *GG*. Podobné výsledky byly zjištěny i v případě hodnot CMR.

2) Popis laboratorních postupů:

2.1 μ -calpain (gen pro mikromolekulární vápníkem aktivovanou neutrální proteázou)

Používané zkratky: *CAPN1*

Typ markeru: kódující gen

Chromozomální lokalizace: telomerický konec bovinního chromozomu 29 (BTA29)

Použitá metoda genotypizace: PCR/RFLP (Rincón and Medrano, 2006).

Primery:

| Primer | Sekvence (5' - 3') |
|--------|---------------------------------------|
| CAPN1F | CGT TTC TTC TCA GAG AAG AGC GCA GGG A |
| CAPN1R | CCT GCG CCA TTA CTA TCG ATC GCA AAG T |

Reakční směs:

| Chemikálie | Množství (μ l) |
|---------------------|---------------------|
| 10x Taq buffer | 2,0 |
| MgCl ₂ | 2,0 |
| dNTP's | 2,5 |
| CAPN1F | 1,0 |
| CAPN1R | 1,0 |
| DNA | 2,0 |
| Taq polymeráza (1U) | 2,0 |
| H ₂ O | 12,5 |
| Σ | 25,0 |

PCR cyklus:

| | | |
|----------------------|-------|--|
| počáteční denaturace | 95 °C | 3 min. (predenaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza) |
| 35 cyklů | 95 °C | 45 s |
| | 64 °C | 1 min. |
| | 72 °C | 1 min. |
| finální elongace | 72 °C | 5 min. |
| udržování | 4 °C | pauza |

Restrikční endonukleáza: *Pst*I

Velikost fragmentů: alela A – 341 bp

G – 195 + 146 bp

Preferovaná alela: G

2.2 Calpastatin

Používané zkratky: *CAST*

Typ markeru: kódující gen

Chromozomální lokalizace: bovinní chromozóm 7 (BTA7)

Použitá metoda genotypizace: Real-Time PCR (Barrendse *et al.*, 2007)

Izolace RNA: komerční kit NucleoSpin RNA (Macherey-Nagel), postup dle návodu výrobce

Převod RNA na cDNA: použit komerční kit High Capacity RNA – to- cDNA Mastermix (Applied Biosystems)

Reakční směs:

| Chemikálie | Množství (μl) |
|------------------|---------------|
| Mastermix | 4,0 |
| RNA | 1,0 |
| H ₂ O | 15,0 |
| Σ | 20,0 |

PCR cyklus:

| | |
|-------|---------|
| 25 °C | 5 min. |
| 42 °C | 30 min. |
| 85 °C | 5 min. |
| 4 °C | pauza |

Přečištění: komerční kit NucleoTraPCR (Macherey-Nagel), postup dle výrobce

Použitý systém Real-Time PCR: TaqMan, včetně komerčního mastermixu TaqMan Genotyping Mastermix (Applied Biosystem)

Primery a sondy:

| Primer | Sekvence (5' - 3') |
|---------------|----------------------------|
| CAST1 | AGT TCA GCC CAT CCC ATT C |
| CAST2 | CAC CAA GGA GTC TGG AGG AG |
| FAM probe | CCC TGT GAT CCC TTC |
| VIC probe | CCC TGC GAT CCC TTC |

Reakční směs:

| Chemikálie | Množství (μl) |
|-------------------------------|----------------------|
| Mastermix | 10,0 |
| CAST1 | 0,5 |
| CAST2 | 0,5 |
| Fam sonda | 0,05 |
| VIC sonda | 0,05 |
| cDNA | 1,0 |
| AmpliTaq Gold polymeráza (1U) | 1,0 |
| H ₂ O | 6,9 |
| Σ | 20,0 |

Použitý thermocykler: MiniOpticon MJ Mini (Bio-Rad)

Real-Time PCR cyklus:

| | | |
|----------------------|-------|--------|
| počáteční denaturace | 94 °C | 2 min. |
| 36 cyklů | 94 °C | 45 s |
| | 64 °C | 30 s |
| | 72 °C | 45 s |
| finální elongace | 72 °C | 2 min. |

Preferovaná alela: *T*

2.3 Gen pro syntázu mastných kyselin

Používané zkratky: *FASN*

Typ markeru: kódující gen

Chromozomální lokalizace: bovinní chromozom 19 (BTA19)

Použitá metoda genotypizace: PCR/RFLP (asociační studie Zhang *et al.*, 2008)

Primery:

| Primer | Sekvence (5' - 3') |
|--------|----------------------------|
| FASN1 | AGA GCT GAC GGA CTC CAC AC |
| FASN2 | GCC GAT GCA CTC GAT GTA G |

Reakční směs:

| Chemikálie | Množství (μl) |
|---------------------|---------------|
| 10x Taq buffer | 2,0 |
| MgCl ₂ | 1,5 |
| dNTP's | 2,0 |
| FASN1 | 1,0 |
| FASN2 | 1,0 |
| DNA | 2,0 |
| Taq polymeráza (1U) | 2,0 |
| DMSO | 2,0 |
| H ₂ O | 12,5 |
| Σ | 25,0 |

PCR cyklus:

| | | |
|----------------------|-------|---------|
| počáteční denaturace | 94 °C | 2 min. |
| 35 cyklů | 95 °C | 12 s |
| | 56 °C | 30 s |
| | 72 °C | 30 s |
| finální elongace | 72 °C | 10 min. |
| udržování | 15 °C | pauza |

Restrikční endonukleáza: *MscI*

Velikost fragmentů: alela A – 188 + 167 + 27 bp

G – 355 + 27 bp

Preferovaná alela: G

2.4 Receptor oxidovaného lipoproteinů s nízkou hustotou (oxidized low-density lipoprotein receptor)

Používané zkratky: *OLR1*

Typ markeru: kódující gen

Chromozomální lokalizace: bovinní chromozom 5 (BTA5)

Použitá metoda genotypizace: PCR/RFLP (dle Khatib *et al.*, 2006)

Primery:

| Primer | Sekvence (5' - 3') |
|--------|----------------------------|
| OLR3 | AAG GCG AAT CTA TTG AGA GC |
| OLR4 | ACT TCT CTG AAG TCC TGC A |

Reakční směs:

| Chemikálie | Množství (μl) |
|---------------------|---------------|
| 10x Taq buffer | 2,0 |
| MgCl ₂ | 2,0 |
| dNTP's | 2,5 |
| OLR3 | 1,0 |
| OLR4 | 1,0 |
| DNA | 2,5 |
| Taq polymeráza (1U) | 2,0 |
| H ₂ O | 12,0 |
| Σ | 25,0 |

PCR cyklus:

| | | |
|----------------------|-------------------------|---|
| počáteční denaturace | 95 °C | pauza (predenaturace, u lyzátů se v této fázi přidává po 2 min. Taq polymeráza) |
| 35 cyklů | 95 °C 60 °C 72 °C | 45 s 1 min. 1 min. |
| finální elongace | 72 °C | 5 min. |
| udržování | 4 °C | pauza |

Restrikční endonukleáza: *Pst*I**Velikost fragmentů:** alela A – 270 bp

C – 250 + 20 bp

Preferovaná alela: C**2.5 Gen pro ATP vazebnou kazetu, subrodina G, člen 2 (ATP-binding cassette, subfamily G, member 2)****Používané zkratky:** ABCG2**Typ markeru:** kódující gen**Chromozomální lokalizace:** bovinní chromozom 6 (BTA6)**Použitá metoda genotypizace:** PCR/RFLP (dle Komisarek and Dorynek, 2009)**Primery:**

| Primer | Sekvence (5' - 3') |
|---------------|-----------------------------------|
| ABCG2F | AAC AGC CTC AGC TCC AGA GAG ATA T |
| ABCG2R | CGG TGA CAG ATA AGG AGA ACA TAC T |

Reakční směs:

| Chemikálie | Množství (μl) |
|---------------------|---------------|
| 10x Taq buffer | 2,0 |
| MgCl ₂ | 2,0 |
| dNTP's | 2,0 |
| ABCG2F | 1,0 |
| ABCG2R | 1,0 |
| DNA | 2,0 |
| Taq polymeráza (1U) | 1,0 |
| H ₂ O | 4,0 |
| Σ | 15,0 |

PCR cyklus:

| | | |
|----------------------|-------|--------|
| počáteční denaturace | 95 °C | 5 min. |
| 35 cyklů | 95 °C | 30 s |
| | 58 °C | 30 s |
| | 72 °C | 40 s |
| finální elongace | 72 °C | 5 min. |
| udržování | 15 °C | pauza |

Restrikční endonukleáza: *Pst*I**Velikost fragmentů:** alela A – 292 bp

C – 268 + 24 bp

Preferovaná alela: A**2.6 Caspase Recruitment Domain 15****Synonymní název:** Nucleotide Oligomerization Domain 2**Používané zkratky:** *CARD15* (*NOD2*)**Typ markeru:** kódující gen**Chromozomální lokalizace:** bovinní chromozom 18 (BTA18)**Použitá metoda genotypizace:** ARMS-PCR (Pant *et al.*, 2007)

Primery:

| Primer | Sekvence (5' - 3') |
|-----------|---------------------------------------|
| CARD151F0 | AGC AGT GTT TAG AAA TAG CCT CGC AAT |
| CARD151F1 | AGA GAC GCA AGC AGG CCC CTG GGC CGC A |
| CARD151R0 | AGA GAA CCC ACA CAC ATG CCC TTA CTG |
| CARD151R1 | CCC TGG AGA CAC TTG GAG AGA ATG GGG G |

Reakční směs:

| Chemikálie | Množství (μl) |
|---------------------|---------------|
| 10x Taq buffer | 1,0 |
| MgCl ₂ | 2,5 |
| dNTP's | 1,0 |
| CARD151F0 | 0,5 |
| CARD151F1 | 0,5 |
| CARD151R0 | 0,5 |
| CARD151R1 | 0,5 |
| DNA | 1,0 |
| Taq polymeráza (1U) | 0,5 |
| H ₂ O | 2,0 |
| Σ | 10,0 |

PCR cyklus:

| | | |
|----------------------|-------|--------|
| počáteční denaturace | 95 °C | 8 min |
| 30 cyklů | 95 °C | 30 s |
| | 59 °C | 30 s |
| | 72 °C | 30 s |
| finální elongace | 72 °C | 5 min. |
| udržování | 4 °C | pauza |

Velikost fragmentů: outer - 310 bp

alela A – 197 bp

alela T – 166 bp

Preferovaná alela: A

2.7 Marker s potenciálním vztahem k výskytu klinické mastitidy

Používané zkratky: *CGILA*

Typ markeru: AFLP fragment

Chromozomální lokalizace: bovinní chromozom 22 (BTA22)

Použitá metoda genotypizace: PCR/RFLP (Sharma *et al.*, 2006)

Primery:

| Primer | Sekvence (5' - 3') |
|--------|-----------------------------------|
| E155F | TGA CGC AGA ATC CAA AGT TAA AAC A |
| T155R | GAG GAG GTG GCC GGT TCA GA |

Reakční směs:

| Chemikálie | Množství (μl) |
|---------------------|---------------|
| 10x Taq buffer | 2,0 |
| MgCl ₂ | 2,0 |
| dNTP's | 2,5 |
| E155F | 1,0 |
| T155R | 1,0 |
| DNA | 2,0 |
| Taq polymeráza (1U) | 1,5 |
| H ₂ O | 13,0 |
| Σ | 25,0 |

PCR cyklus:

| | | |
|----------------------|-------|--------|
| počáteční denaturace | 95 °C | 2min |
| 35 cyklů | 95 °C | 45 s |
| | 60 °C | 1 min |
| | 72 °C | 1 min |
| finální elongace | 72 °C | 5 min. |
| udržování | 4 °C | pauza |

Restrikční endonukleáza: *TaqI*

Velikost fragmentů: PCR produkt - 399 bp

alela A –125 + 274 bp

G –125 + 235 bp

Preferovaná alela: A

III. Novost postupů, použitých v metodice

Metodika přináší návod ke genotypizaci několika nových, chovatelské veřejnosti dosud neznámých lokusů a shrnuje je v komplexní informaci spolu s lokusy již dříve známými. Zcela nové je zařazení lokusů pro selekci na zdravotní stav mléčné žlázy.

IV. Popis uplatnění certifikované metodiky

Certifikovaná metodika je určena laboratořím, zabývajícím se genetikou skotu, které výsledky genotypizace předají majitelům plemenných zvířat, šlechtitelům. Výsledky genotypizace se stanou jedním z podkladů, na jejichž základě šlechtitel rozhoduje o dalším využití zvířete.

Ve srovnání s klasickými postupy odhadu plemenné hodnoty na základě užitkovosti potomstva je výhodou, že genotyp stanovený analýzou na genové úrovni může být stanoven bezprostředně po narození zvířete, může tedy být prvním kritériem pro ranou selekci. Tím mohou být uspořeny náklady na odchov zvířat s nežádoucím genotypem.

Další velmi podstatnou okolností je, že lokusy zahrnuté do předkládané metodiky umožní šlechtění na kvalitativní ukazatele produkce a zdraví. Kvalita potravinových surovin významně ovlivňuje jejich cenu. Protože důraz na kvalitu se bude zvyšovat, musí šlechtitelé v předstihu reagovat.

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, přístroj pro RT-PCR, inkubátory, elektroforézy, pipety. Uvedené přístroje jsou v běžně vybavené genetické laboratoři k dispozici. Pokud není laboratoř vybavena přístrojem pro RT-PCR, který je potřebný pro genotypizaci lokusu *CAST*, lze jej pořídit za cca 500 tis. Kč. 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 a sond.

2) Vyčíslení ekonomického přínosu

Ekonomický přínos lze vyčíslit v několika úrovních. Nejpodstatnější je úspora nákladů za odchov a chov včas vyřazených plemenných býků s nevhodným genotypem. Dále dosažení lepší realizační ceny produktu (masa, mléka), úspora nákladů na léčení mastitid, snížení ztrát způsobených mastitidou (množství a kvalita tržního mléka).

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 hovězího masa a mléka, výše nákladů na léčení mastitid (léčiva, odměna pro veterinárního lékaře), 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 činí cca 160 tis. Kč na jednoho býka, po odečtení tržby za prodej na jatka 140 tis. Kč.

V roce 2009 bylo v ČR zařazeno do testace celkem 190 býků (78 českých strakatých, 112 holštýnských). 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 a zdravotní stav mléčné žlázy 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 10 býků podle

genotypu na uvedených lokusech (býci s kombinací nevhodných genotypů na několika lokusech) **lze kalkulovat s úsporou 1,4 mil. Kč.**

K uvedené kalkulaci přistupují přínosy za zlepšení kvality produkovaných potravinových surovin (mléko, maso) a úspora za zlepšení zdravotního stavu mléčné žlázy. V tomto případě je vyčíslení velmi obtížné, protože závisí na vývoji cen komodit, objemu jejich produkce v ČR resp. v jednotlivém zemědělském podniku, zvýšení ceny produktů od zvířat s lepším 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. Výraznější změny s ohledem na nutnost selekce podle dalších ukazatelů a dlouhý generační interval skotu lze očekávat v řádu let.

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

Je však nutné si uvědomit, že při současné nadvýrobě potravin je jediným způsobem zlepšení ekonomické efektivity zemědělské výroby zlepšení kvality produkovaných potravinářských surovin. Tlak na kvalitu ze strany zpracovatelského průmyslu, obchodu i spotřebitele je v posledních letech zřejmý. Šlechtitelé již na tento tlak reagovali, např. v plemenářské dokumentaci šlechtitelských firem je pro býky dojených plemen uváděn genotyp pro kappa-kasein (CSN3). Šlechtitelské možnosti se možností zavedení genotypizace dalších lokusů výrazně rozšiřují.

VI. Seznam použité související literatury

Barendse W. J. (2002): DNA markers for meat tenderness. International patent application PCT/AU02/00122. International patent publication WO 02/064820 A1.

Barrendse W., Harrison B.E., Hawken R.J., Ferguson D.M., Thompson J.M., Thomas M.B., Bunch R.J. (2007): Epistasis Between Calpain 1 and Its Inhibitor Calpastatin Within Breeds of Cattle. *Genetics*, 176: 2601-2610.

Boichard D., Grihs C., Bourgeois F., Cergueira F., Faugeras R., Neau A., Rupp R., Amigues Y., Boscher M.Y., Leveziel H. (2003): Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genetic Selection Evolution*, 35: 77-101.

Carragher N.O., Westhof M.A., Riley D., Potter D.A., Dutt P., Elce J.S., Greer P.A., Frame M.C. (2002): V-src-induced modulation of the calpain-calpastatin proteolytic system regulates transformation. *Moll. Cell. Biol.*, 22: 257-269.

Casas E., White S.N., Riley D.G., Smith T.P.L., Brenneman R.A., Olson T.A., Johnson D.D., Coleman S.W., Bennet G.L., Chase Jr. C.C. (2005): Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass traits in *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.*, 83: 13-19.

Casas E., White S.N., Wheeler T.L., Schackelford S.D., Koohmaraie M., Riley D.G., Chase Jr. C.C., Johnson D.D., Smith T.P.L. (2006): Effects of *calpastatin* and μ -*calpain* in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.*, 84: 520-525.

Cohen-Zinder M., Seroussi E., Larkin D.M., Looor J.J., Everts.van der Wind A., LeeJ.-H., Drackley K., Band M.R., Hernandez A.G., Shani M., Lewin H.A., Weller J.I., Ron M. (2005): Identification of a missense mutation in the bovine *ABCG2* gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. *Genome Res.*, 15: 936-944.

Du M., Zhu M.J., Means W.J., Hess B.W., Ford S.P. (2004): Effect of nutrient restriction on calpain and calpastatin content of skeletal muscle from cows and fetuses. *J. Anim. Sci.*, 82: 2541-2547.

Falaki M., Prandi A., Corradini C., Sneyers M., Gengler N., Massart S., Fazzini U., Burny A., Portetelle D., Renaville R. (1997): Relationships of growth hormone gene and milk protein polymorphisms to milk production traits in Simmental cattle. *J. Dairy Res.*, 64: 47-56.

Farke C., Meyer H.H., Bruckmaier R.M., Albrecht C. (2008): Differential expression of ABC transporters and their regulatory genes during lactation and dry period in bovine mammary tissue. *J. Dairy Res.*, 75: 406-414.

Geesink G.H., Koohmaraie M. (1999): Effect of calpastatin on degradation of myofibrillar proteins by μ -calpain under *post mortem* conditions. *J. Anim. Sci.*, 77: 2685-2692.

Girardin S.E., Boneca I.G., Viala J., Chamaillard M., Labigne A., Thomas G., Philpott D.J., Sansonetti P.J. (2003): Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J. Biol. Chem.*, 278(11): 8859-8872.

Goll D.E., Thompson V.F., Li H., Wei W., Cong J. (2003): The calpain system. *Physiol. Rev.*, 83: 731-801.

Chirala S.S., Chang H., Matzuk M., Abu-Elheiga L., Mao J., Mahon K., Finegold M., Wakil S.J. (2003): Fatty acid synthesis is essential in embryonic development: fatty acid synthase null

mutation and most of the heterozygotes die in utero. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 100: 6358-6363.

Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., PONS F., Crespo J., Fuakse K., Inamura S., Kusumoto S., Hashimoto M., Foster S.J., Moran A.P., Fernandez-Luna J.L., Nunez G. (2003): Host recognition of muramyl dipeptide mediated through NOD2. J. Biol. Chem., 278(8): 5509-5512.

Jonker J.W., Merino G., Musters S., van Herwaarden A.E., Bolscher E., Wagenaar E., Mesman E., Dale T.C., Schinkel A.H. (2005): The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. Nat. Med., 11: 127-129.

Juszczuk-Kubiak E., Sakowski T., Flisikowski K., Wicińska K., Oprzadek J., Rosochacki S.J. (2004): Bovine μ -calpain (*CAPNI*) gene: new SNP within intron 14. J. Appl. Genet., 45 (4): 457-460.

Khatib H., Leonard S.D., Schutzkus V., Luo W., Chang Y.M. (2006): Association of the *OLRI* Gene with Milk Composition in Holstein Dairy Cattle. J. Dairy Sci., 89: 1753-1760.

Komisarek J., Dorynek Z. (2009): Effect of *ABCG2*, *PPARGCIA*, *OLRI* and *SCD1* gene polymorphism on estimated breeding values for functional nad production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. J. Appl. Genet., 50(2): 125-132.

Liao C.H., Shaw H.M., Chao P.M. (2008): Impairment of glucose metabolism in mice induced by dietary oxidized frying oil is different from that induced by conjugate linoleic acid. Nutrition, 24: 744-752.

Metha J.L., Li D. (2002): Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor. J. Ann. Coll. Cardiol., 39: 1429-1435.

Morris C.A., Cullen N.G., Glass B.C., Hyndman D.L., Manley T.R., Hickey S.M., McEwan J.C., Pitchford W.S., Bottema C.D., Lee M.A. (2007): Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. Mamm. Gen., 18: 64-74.

Netea M.G., Kullberg B.J., de Jong D.J., Franke B., Sprong T., Naber T.H., Drenth J.P., Van der Meer J.W. (2004): NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease. Eur. J. Immun., 34(7): 2052-2059.

Page B.T., Casas E., Quaas R.L., Thallman R.M., Wheeler T.L., Shackelford S.D., Koohmaraie M., White S.N., Bennett G.L., Keele J.W., Dikeman M.E., Smith T.P.L. (2004): Association of markers in the bovine *CAPNI* gene with meat tenderness in large crossbred populations that sample influential industry sires. J. Anim. Sci., 82: 3474-3481.

Page B.T., Casas E., Heaton M.P., Cullen N.G., Hyndman D.L., Morris C.A., Crawford A.M., Wheeler T.L., Koohmaraie M., Keele J.W., Smith T.P.L. (2002): Evaluation of single-

nucleotide polymorphisms in *CAPNI* for association with meat tenderness in cattle. *J. Anim. Sci.*, 80: 3077-3085.

Pant S.D., Schenkel F.S., Leyva-Baca I., Sharma B.S., Karrow N.A. (2007): Identification of single nucleotide polymorphisms in bovine *CARD15* and their associations with health and production traits in Canadian Holsteins. *BMG Genomics*, 8: 421-431.

Prochazka M., Walder K., Xia J. (2001): AFLP fingerprinting of the human genome. *Hum. Genet.*, 108: 59-65.

Rincón G., Medrano J.F. (2006): Assays for genotyping single nucleotide polymorphisms in the bovine *CAPNI* gene. *Anim. Genet.*, 37: 294-295.

Ringseis R., Dathe C., Muschick A., Brandsch C., Eder K. (2007): Oxidized fat reduces milk triacylglycerol concentrations by inhibiting gene expression of lipoprotein lipase and fatty acid transporters in the mammary gland of rats. *J. Nutr.*, 137: 2056-2061.

Roy R., Ordovas L., Zaragoza P., Romero A., Moreno C., Altarriba J., Rodellar C. (2006): Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene in milk-fat content. *Anim. Genet.*, 37: 215-218.

Sawamura T., Kune N., Ayoyama T., Moriwaki H., Hoshikawa H., Aiba Y., Tanaka T., Miwa S., Katsura Y., Kita T., Masaki T. (1997): An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature*, 386: 73-77.

Sharma B.S., Jansen G.B., Karow N.A., Kelton D., Jiang Z. (2006): Detection and Characterization of Amplified Fragment Length Polymorphism Markers for Clinical Mastitis in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 89: 3653 – 3663.

Suzuki K., Sorimachi H. (1998): A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.*, 433: 1-3.

Taylor J.F., Coutinho L.L., Herring K.L. *et al.* (1998): Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Anim. Genet.*, 29: 194-201.

Uehara A., Yang S., Fujimoto Y., Fukase K., Kusumoto S., Shibata K., Sugawara S., Takada H. (2005): Muramyl dipeptide and diamino pimelic acid-containing desmuramyl peptides in combination with chemically synthesized Toll-like receptor agonist synergistically induced production of interleukin-8 in a NOD2- and NOD1-dependent manner, respectively, in human monocytic cells in culture. *Cell. Biol.*, 7(1): 53-61.

van Heel D.A., Ghosh S., Butler M., Hunt K.A., Lundberg A.M., Ahmad T., McGovern D.P., Onnie C., Negoro K., Goldthorpe S., Foxwell B.M., Mathew C.G., Forbes A., Jewell D.P., Playford R.J. (2005): Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet*, 365(9473): 1794-1796.

van Herwaarden A.E., Wagenaar E., Merino G., Jonker J.W., Rosing H., Beijnen J.H., Schinkel A.H. (2007): Multidrug transporter ABCG2/breast cancer resistance protein secretes riboflavin (vitamin B2) into milk. *Mol. Cell. Biol.*, 27: 1247-1253.

Zhang S., Knight T.J., Reecy J.M., Beitz D.C. (2008): DNA polymorphisms in bovine *fatty acid synthase* are associated with beef fatty acid composition. *Anim. Genet.*, 39: 62-70.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

Pribyl J., Rehout V., Citek J., Pribylova J. (2010): Genetic evaluation of dairy cattle using a simple heritable genetic ground. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90, 1765-1773.

Říha J., Bezdíček J., Čítek J., Voříšková J., Řehout V. (2009): Interaction of genotypes of *GH*, *Pit-1*, *CAPNI* genes and their influence on shear force of grilled beef in Czech Fleckvieh bulls during the period of maturation. *Cattle Research*, 51 (4), 22-29.

Hradecká, E., Řehout, V., Čítek, J. (2004): Biometrické hodnocení faktorů ovlivňujících délku inseminačního intervalu a servis perody. *Coll. Sci. Pap., Fac. Agric., Č. Budějovice, Ser. Anim. Sci.*, 21, 1, 61-67.

Hradecká, E., Řehout, V. a Čítek, J. (2004): Populačně genetické hodnocení reprodukce dojeného skotu. *Coll. Sci. Pap., Fac. Agric., Č. Budějovice, Ser. Anim. Sci.*, 21, 2, 187-194.