

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**  
**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**  
**Katedra obecné zootechniky a etologie**

**Vztah genů pro imunitní systém k funkčním vlastnostem  
(reprodukce a zdraví) u skotu**  
doktorská disertační práce

**Autor: Ing. Kateřina Jochová**

**Školitel: doc. Mgr. Ing. Ivan Majzlík, CSc.**

**Konzultant: Dr. Ing. Jitka Kysel'ová**  
**Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.**

**Konzultant: Ing. Ludmila Zavadilová, Ph.D.,**  
**Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.**

**Praha 2019**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou doktorskou disertační práci "Vztah genů pro imunitní systém k funkčním vlastnostem (reprodukce a zdraví) u skotu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího disertační práce a svých školitelů, s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury. Jako autorka uvedené disertační práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 8.3.2019

---

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu disertační práce doc. Mgr. Ing. Ivanu Majzlíkovi, CSc. za možnost věnovat se zajímavému tématu a také za pomoc a konzultace při řešení disertační práce. Také bych ráda poděkovala svým školitelkám Dr. Ing. Jitce Kyselové a Ing. Ludmile Zavadilové, Ph.D. za cenné rady, pomoc a podporu, kterou mi v průběhu studia poskytovaly. Dále bych chtěla poděkovat všem kolegům z Výzkumného ústavu živočišné výroby, v.v.i. a z katedry Obecné zootechniky a etologie za možnost konzultací a osobního rozvoje. V neposlední řadě bych také ráda poděkovala svojí rodině a přátelům, kteří mě v průběhu studia vždy velmi podporovali.

Disertační práce vznikla za podpory Ministerstva zemědělství, institucionální podpora MZE-RO0718 a fakultní podpory mezinárodní spolupráce a stáží Fakulty přírodních a potravinových zdrojů České zemědělské univerzity.

# Vztah genů pro imunitní systém k funkčním vlastnostem (reprodukce a zdraví) u skotu

## Souhrn

Využití genetických markerů může pomoci zlepšit plodnost a zdraví vemene skotu. Jedná se o vlastnosti, které jsou velmi důležité z hlediska ekonomiky chovu, ale díky nízké dědivosti je jejich šlechtění pomocí tradiční selekce problematické. Předkládaná studie hodnotila vztah mezi genotypy genu Leptin (*LEP*), Toll-like receptor 4 (*TLR4*) a Chemokinový receptor interleukinu 8 C-X-C motiv (*CXCR1*) a úrovní reprodukce a skóre somatických buněk (SCS) v mléce. Fenotypové údaje z 1. třech laktací byly získány od krav českého strakatého skotu chovaných na 5 farmách v České republice. Genotyp zvířat byl stanoven metodou PCR-RFLP. Kromě *LEP* g.-963C>T byly všechny genotypové frekvence v souladu s Hardy-Weinbergovou genetickou rovnováhou. Jednonukleotidový polymorfismus v genu *LEP* (g.-963C>T a c.357C>T) byl asociován s věkem při 1. otelení, servis periodou (DO), úspěšností zabřeznutí po 1. inseminaci (PR), případně s mezidobím (CLI). U *LEP* g.-963C>T vykazovaly jalovice s genotypem *TT* nižší věk při 1. otelení, a to o 24 dní v porovnání s jalovicemi s genotypem *CC*. Dále dojnice *CT* vykazovaly tendenci pro kratší DO a vyšší PR. U *LEP* c.357C>T jsme pozorovali delší mezidobí a DO u krav s genotypem *TT*. Závěrem, genotyp *TT* u *LEP* g.-963C>T se prokázal jako pozitivní, stejný genotyp u *LEP* c.357C>T jako nevýhodný ke sledovaným ukazatelům plodnosti krav českého strakatého skotu. Heterozygotní krávy v oblasti g.-226C>G genu *TLR4* vykazovaly významně kratší CLI. Vztah k SCS se podařilo prokázat v genu *TLR4* g.-226C>G, a to jak na 1. a 3. laktaci, tak v rámci opakovaného měření. Ve všech případech jsme zjistili nejnižší SCS u krav s genotypem *GG*. U genu *CXCR1* c.777C>G jsme nepozorovali vztah k žádné ze studovaných vlastností. Předkládané výsledky naznačují využití genu *LEP* jako efektivního markeru pro zlepšování plodnosti plemen českého strakatého skotu. Studie rovněž přináší nový pohled na vztah genů *TLR4* a *CXCR1* k plodnosti a SCS u skotu s kombinovanou užitkovostí.

**Klíčová slova:** plodnost; skóre somatických buněk; jednonukleotidový polymorfismus; český strakatý skot; asociační studie

# Relationship between genes for the immune system and functional traits (reproduction and health) in cattle

## Summary

The use of genetic markers can help to enhance reproduction and udder health in cattle, which is very important for profitability in dairy production systems. This study evaluated the association between genotypes of Leptin (*LEP*), Toll-like receptor 4 (*TLR4*), and Chemokine receptor of interleukin 8 C-X-C motif (*CXCR1*) genes and fertility traits and somatic cell score (SCS) in Czech Fleckvieh cattle. We used phenotypic data from Czech Fleckvieh cows raised on 5 farms in the Czech Republic, along with information from the 1<sup>st</sup> three parities. To determine genotype, the PCR-RFLP method was used. Except for *LEP* g.-963C>T, all studied genotype frequencies of SNPs were distributed according to Hardy-Weinberg equilibrium. Two *LEP* SNPs (c.357C>T and g.-963C>T) were associated with the age at the 1<sup>st</sup> calving, days open (DO), pregnancy rate after 1<sup>st</sup> service (PR), and calving interval (CLI). In *LEP* g.-963C>T the *TT* genotype heifers firstly calved 24 days earlier than *CC* genotype and the *CT* genotype cow showed a tendency for shorter DO and higher PR. In *LEP* c. 357C>T we observed longer CLI and DO period in *TT* cows. In general, we can propose the *TT* genotype of g.-963C>T as favorable and the *TT* genotype of c. 357C>T as unfavorable for cow fertility. Heterozygotes in *TLR4* g.-226C>G was significantly associated with shorter CLI. In *CXCR1* c.777C>G we did not observe any relationship of this SNP with reproduction. Regarding to the udder health the only SNP showing association with SCS was *TLR4* g.-226C>G. We observed lower SCS in *GG* genotype at 1<sup>st</sup> and 3<sup>rd</sup> lactation as well as in repeated measurement study. Overall, the results showed that *LEP* could be an effective marker for improving reproduction in Czech Fleckvieh cattle. This study also provides novel insights into the relationship between *TLR4* and *CXCR1* SNPs and reproduction and SCS in dual-purpose cattle.

**Keywords:** fertility; somatic cell score; single nucleotide polymorphism; Czech Fleckvieh cattle; association study

# Obsah

Seznam zkratk	7
1. Úvod	9
2. Literární přehled	10
2.1. Funkční vlastnosti	10
2.1.1. Plodnost	10
2.1.2. Mastitida	11
2.1.3. Dlouhověkost	13
2.2. Současný trend ve šlechtění českého strakatého skotu	15
2.3. Genetické markery a jejich využití	16
2.3.1. Gen a genetický polymorfismus	16
2.3.2. Genetické markery a markery asistovaná selekce	18
2.3.3. Jednonukleotidový polymorfismus	19
2.3.4. Genomika a genomická selekce	20
2.3.5. Geny a SNP se vztahem k sekundárním vlastnostem skotu	23
3. Cíle práce a hypotéza	27
4. Materiál a metodika	28
4.1. Asociační analýza plodnosti	29
4.2. Asociační analýza pro zdraví vemene	35
5. Výsledky a diskuze	37
5.1. Genotypové frekvence a genová vazba	37
5.2. Asociační studie ve vztahu k plodnosti	42
5.3. Asociační studie ke skóre somatických buněk v mléce	51
6. Závěry a doporučení pro praxi a další rozvoj vědního oboru	55
7. Seznam použité literatury	57
8. Přílohy	79

## **Seznam zkratek**

AFC – věk při 1. otelení

AIC – Akaikeho informační kritérium

bp – pár bází

C báze/alela – cytozin

CFI – inseminační interval

CLI – mezidobí

CXCR1 – Chemokinový receptor interleukinu 8 C-X-C motiv

DIM – kontrolní den v rámci laktace

DMSO – dimethyl sulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

DO – servis perioda

G – báze/alela – guanin

GOPH – genomicky optimalizovaná plemenná hodnota

GPH – genomická plemenná hodnota

GZ – genetický zdroj

H-W – Hardy-Weinbergova genetická rovnováha

LEP – Leptin

LSM – součet nejmenších čtverců

MAS – markery asistovaná selekce

mRNA – messenger ribonukleová kyselina

Na<sub>2</sub>EDTA – disodium ethylenediaminetetraacetát dihydrát

NaCl – chlorid sodný

NGS – sekvenování nové generace

PCR-RFLP – polymerázová řetězová reakce – zjištění polymorfismu délkových fragmentů

PH – plemenná hodnota

PR – % březích plemenic po 1. inseminaci

Primer R, F – primer reverse („zpětný“), forward („přední“)

QTL – lokusy kvantitativních vlastností

SCC – počet somatických buněk

SCS – skóre somatických buněk

SD – směrodatná odchylka

SDS – dodecylsírán sodný

SNP – jednonukleotidový polymorfismus

SRO – sdružený efekt farmy, roku a období otelení/ narození

T báze/alela – thymin

TLR4 – Toll-like receptor 4

Tris-HCl – trisaminomethan hydrochlorid



# 1. Úvod

V uplynulých letech bylo šlechtění skotu zaměřeno primárně na mléčnou užitkovost krav. Avšak díky negativní genetické korelaci mezi mléčnou užitkovostí a reprodukční výkonností, zdravím či dlouhověkostí zvířat došlo ke snížení úrovně funkčních vlastností. Díky studiím zabývajícím se ekonomikou chovu skotu je zřejmé, že funkční vlastnosti mají velmi významný podíl na ziskovosti chovu skotu a je tedy nutné zušlechtovat zvířata komplexně.

Je známo, že převážná část ekonomicky důležitých primárních i sekundárních vlastností je ovlivněna mnoha geny, jejich interakcemi a prostředím, ve kterém se zvíře vyskytuje. Problémem však je jejich nízká dědivost a časová náročnost šlechtění pomocí klasické selekce. Aplikace nových technologií sebou přinesla i změnu přístupů ve šlechtění hospodářských zvířat. Původní využití markery asistované selekce např. pro vyhledávání prasat odolných vůči stresu či „plodného“ genotypu Boorola genu u ovcí přechází u skotu do využití genomického hodnocení zvířat, které je považováno za variantu markery asistované selekce. Díky využití genomického testování a dalších metod molekulární genetiky je tedy možné selektovat jedince i na základě jejich genetického založení.

Markery asistovaná selekce je považovaná za vhodný doplněk současných selekčních metod. Aktuálně se selekce pouze pomocí genetických markerů příliš neuplatňuje a spíše ustupuje genomické selekci. Genomická selekce je založena na principu genetických markerů, ale bere v úvahu několik desítek tisíc vybraných markerů a mapuje genom zvířete komplexněji. Výhodou jak genomické, tak markery asistované selekce však je, že na rozdíl od plemenné hodnoty, která vyjadřuje pouze aditivní část genotypu, je možné pomocí markerů zjistit genotyp, který zvíře má, ale nevyskytuje se přímo u jeho potomků.

## 2. Literární přehled

V předchozích letech bylo šlechtění skotu zaměřeno především na primární produkční znaky a znaky fitness ani zdraví nebyly do šlechtitelského cíle zahrnuty. Tato strategie vedla ke genetickému progresu produkčních znaků a stavby těla, ale díky antagonistickému vztahu mezi mléčnou produkcí a odolností vůči chorobám byly některé znaky zdraví zhoršeny (Rauw et al., 1998). Důležitost sekundárních znaků skotu zdůraznili již například Beaudeau et al. (2000) tvrzením, že metabolické a reprodukční poruchy mohou nepřímo snížit užitkovost a plodnost krav, což nejčastěji vede k jejich předčasnému vyřazení.

### 2.1. Funkční vlastnosti

#### 2.1.1. Plodnost

Pojmem „plodnost samic“ rozumíme schopnost pravidelně zabřezávat a rodit životaschopné potomstvo. V posledních desetiletích bylo díky zlepšení genetického potenciálu a výživy zvířat dosaženo v chovu skotu intenzivního nárůstu mléčné užitkovosti. Se zvýšenou dojivostí se však spojuje nejen výskyt zdravotních problémů, ale i zhoršení reprodukčních funkcí plemenic (Gehring et al., 2017, Veerkamp et al., 2008). Důvodem je negativní genetická korelace mezi plodností a dojivostí (Pryce et al., 2004). Jelikož je pravidelná reprodukce předpokladem ekonomického chovu skotu, způsobuje chovatelům zhoršení plodnosti plemenic a zdraví vemene významné ekonomické ztráty (Lucy, 2001).

Z ekonomického hlediska je třeba brát v úvahu, že v případě osmiletého využívání dojnice, představuje každé prodloužení servis periody (nad 80 dní) o 20 dní ztrátu 0,3 až 0,4 telete a 4% snížení užitkovosti ročně (Říha et al., 2001). Zhoršením ukazatelů plodnosti se prodlužuje délka laktace. S jejím prodloužením se sice zvyšuje produkce mléka za celou laktaci, ale snižuje se produkce mléka v přepočtu na jeden den. Tím se současně zvyšují náklady na litr vyprodukovaného mléka. Přímé ekonomické ztráty způsobené zhoršenou plodností krav (prodloužením servis periody a mezidobí nad optimální hranici) vznikají především snížením produkce mléka v přepočtu na krávu/rok a poklesem produkce telat. Náklady na jalovou dojnici na 2. laktaci byly ve spojených státech odhadnuty na 3,76 \$/den tedy přibližně 86 Kč/den (Cabrera, 2016). Další náklady pak

vznikají často v důsledku vyšší potřeby práce a vyššího počtu inseminací nutných k zabřeznutí plemence.

Díky neustávajícímu trendu v poklesu plodnosti skotu (VanRaden et al., 2004), již v dnešní době není šlechtění skotu zaměřeno pouze jednostranně na zvýšení mléčné užitkovosti, ale chovný cíl se stává více komplexní (Buch et al., 2011). Situací ohledně snížené reprodukce se zabývali i Shirasuna et al. (2011), kteří se domnívají, že identifikace faktorů ovlivňující brzký nástup ovulační aktivity po otelení, by mohla zabránit dalšímu zhoršování plodnosti a podpořit zlepšení reprodukčních ukazatelů ve stádě. Strucken et al. (2012) v celogenomové studii u skotu našli markery, díky kterým by bylo možné zvyšovat dojivost, avšak úroveň plodnosti by se již nesnižovala. Mnohé studie se zabývaly zjišťováním genetické korelace mezi ukazateli zdraví a plodnosti, které byly odhadnuty jako nízké nebo střední. Nejsilnější genetická korelace byla pozorována mezi ketózou a inseminačním intervalem ( $r_g = 0,29$ ), zatímco genetická korelace mezi klinickou mastitidou a non-return-rate v 56 dnech byla nulová (Olechnowicz a Jaskowski, 2013).

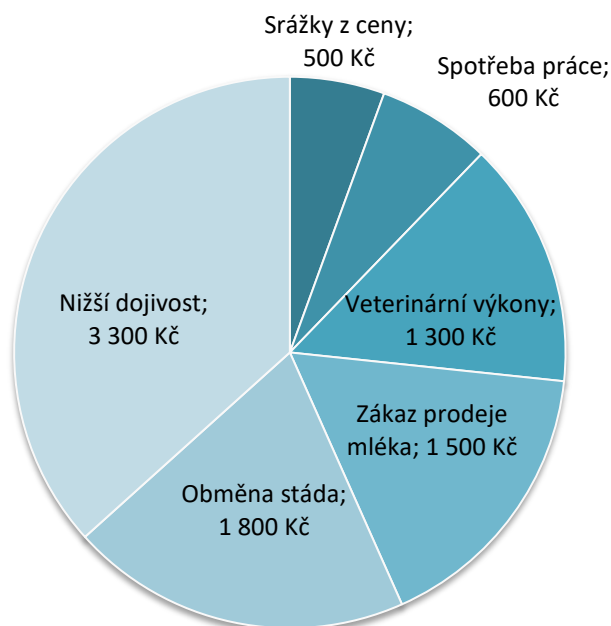
### *2.1.2. Mastitida*

Zánět vemene neboli mastitida je nejčastěji způsoben bakteriální infekcí a představuje v chovu skotu významný problém. Mastitida se projevuje ve formě klinické, subklinické nebo chronické. Klinická forma je charakteristická aberantním mlékem a otokem vemene. Bakterie se nacházejí i přímo v mléce a složení mléka je výrazně změněné. Subklinická mastitida je v chovu výraznějším problémem, protože se neprojevuje viditelnými změnami mléka ani vemene, ale způsobuje snižování dojivosti i výkupní ceny mléka. Bakterie jsou taktéž přítomny v mléce a dochází ke změnám ve složení mléka. Chronický zánět vemene se vyskytuje spíše výjimečně.

Mastitida je nejrozšířenějším onemocněním, které se vyskytuje v chovu skotu; Ruegg (2003) uvádí skóre výskytu mastitidy ve stádě mezi 25 % – 60 %. V evropské unii se odhaduje, že je mastitidou postiženo až 30 % populace krav (Sabre, 2006). Toto onemocnění je také velice nákladné, v roce 2005 činily odhadované ztráty v zemích EU podle evropského projektu 1,55 miliardy € (Sabre, 2006). Ekonomické ztráty jsou způsobeny především sníženou mléčnou produkcí a kvalitou mléka, náklady na léky a veterináře (Graf 1). Na léčbu mastitidy jsou celosvětově vynakládány významné finanční prostředky. Hillerton a Berry (2005) ve své studii uvádějí, že ztráty způsobené mastitidou

se ve Velké Británii vyšplhaly na částku vyšší než 7 000 Kč/rok/kus. Rozsahem ztrát způsobených mastitidou, se v USA zabývali Ferrero et al. (2014), kteří uvádí celkovou ztrátu v rozmezí 30 – 60 miliard korun ročně nebo ztráty až 11 % celkové mléčné produkce. V České republice průměrná ztráta mléka činí podle Kvapilíka (2014a) 565 kg na jeden výskyt klinické mastitidy, což činí ztrátu 9 000 Kč (Kvapilík, 2014b).

**Graf 1.** Kalkulace jednotlivých složek ztrát způsobených mastitidou (Kvapilík, 2014b)



Výskyt mastitidy ovlivňuje nejen kvalitu mléka, ale promítá se i do celkového fungování organismu. Vacek et al. (2007) prokázali negativní vliv mastitidy na reprodukční funkce plemenic, např. na servis periodu a inseminační index. Fuenzalida et al. (2015) dále zjistili, že v porovnání se zdravými zvířaty, krávy se subklinickou mastitidou mají vyšší pravděpodobnost zabřeznutí (75 %) než zvířata s mastitidou klinickou (56 %). Pravděpodobnost zabřeznutí rovněž ovlivňuje původce mastitidy (gramnegativní vs. grampozitivní) a závažnost onemocnění (Fuenzalida et al., 2015). Výhodou šlechtění na zdraví vemene a ukazatele plodnosti se zdá být jejich vzájemný pozitivní vztah (Buch a Norberg, 2008). Tyto úvahy dokládá i studie polských vědců, kteří uvádějí, že produkce mléka s obsahem somatických buněk nižším než 100 000 buněk/ml se promítla ve zlepšení zdraví a plodnosti krav (Olechnowicz a Jaskowski, 2013).

Ferrero et al. (2014) jsou přesvědčeni, že časná léčba mastitidy může vést k rychlému uzdravení. Náklady spojené s tímto onemocněním je tedy možné snížit její včasnou diagnostikou. Díky silné genetické korelaci mezi mastitidou a počtem somatických buněk ( $r_g = 0,7 - 0,8$ ) (Olechnowicz a Jaskowski, 2013), se k detekci onemocnění hojně využívá měření obsahu somatických buněk. Dále je možné měřit také konduktivitu (elektrickou vodivost) mléka nebo využít termografické zobrazení vemene.

Výskyt onemocnění je ovlivněn jak genetickými faktory, tak podmínkami prostředí a jejich interakcí (Lindhe a Philipsson, 1998). Náchyllost k onemocnění vemene je mimo jiné ovlivněna tvarem vemene, strukturou struku, technikou dojení a čistotou krav (Waller et al., 2003; Koster et al., 2006). Podle Wojdak-Maksymiec et al. (2012) se však prevence mastitidy zlepšováním podmínek prostředí prokázala jako neefektivní, a proto musí být nalezeny účinné cesty jak mastitidám předcházet. Problematický je z hlediska šlechtění, nízký koeficient dědivosti  $h^2 = 0,1$  a  $0,09$  na první a dalších laktacích (Heringstad et al., 2007; Zwald et al., 2004). Olechnowicz a Jaskowski (2013) uvažují, že genetického pokroku z hlediska mastitid může být dosaženo selekcí. Na myšlenku navazuje Wojdak-Maksymiec et al. (2010), kteří uvádí, že díky rozdílům mezi plemeny, ale i jednotlivými zvířaty se jako vhodný nástroj nabízí markery asistovaná selekce (MAS). Se zajímavými závěry přichází Ogorevc et al. (2009), kteří na základě rešerše dostupné literatury navrhují 44 genů s potenciálem zlepšit odolnost vemene vůči mastitidě. Další studie demonstrují vliv jednotlivých polymorfismů (v genech se vztahem k imunitnímu systému) na rezistenci vůči mastitidám (např. Ibeagha-Awemu et al., 2008).

### *2.1.3. Dlouhověkost*

Vyřazení zvířat je velice komplexní záležitostí, do které zasahují jak nedobrovolné - neočekávané faktory (smrt, akutní onemocnění, neplodnost), tak faktory dobrovolné, kdy je zvíře vyřazeno např. kvůli nízké mléčné produkci, exteriéru, temperamentu (Sewalem et al., 2008). Dlouhověkost je možné rozumět jako skutečnou dlouhověkost, která představuje dobu od narození do vyřazení anebo jako funkční dlouhověkost, která zahrnuje pouze dobu od 1. otelení do vyřazení.

Dobrovolným vyřazením zvířete můžeme zvýšit zisk nebo redukovat náklady na léčbu, či na plemenici s problematickou plodností (Vanarendonk, 1988), případně také zvýšit genetický pokrok

ve stádě (Sewalem et al., 2010). Gill a Allaire (1976) uvádí, že dlouhověkost je nejdůležitější z dalších sledovaných funkčních vlastností. V kontrolním roce 2017/18 bylo v celkovém oddílu plemenné knihy českého strakatého skotu vyřazeno 33,8 % zvířat z toho 23,4 % prvotetek. Nejčastějším důvodem vyřazení byla v tomto kontrolním roce neuspokojivá plodnost (18,3 %), nízká užitkovost (10,2 %), těžký porod (9,0 %), onemocnění vemene (10,6 %) a ostatní zdravotní důvody (38,3 %). Průměrné pořadí laktace žijících krav bylo v daném roce 2,7 (ČMSCH, 2018).

Výzkumy zabývající se pravděpodobností vyřazení dojnice poukazují na 6× vyšší pravděpodobnost vyřazení dojnice při poranění struků (Beaudeau et al., 1994), až 5,2× vyšší pravděpodobnost vyřazení při výskytu mastitidy u prvotetek (Erb et al., 1985) a 4× vyšší pravděpodobnost vyřazení při výskytu mastitidy u suchostojných krav (Beaudeau et al., 1995). Výpočty genetické korelace naznačují pozadí vztahu mezi dlouhověkostí a mastitidou ( $r_g = 0,52$ ), onemocněním končetin ( $r_g = 0,43$ ), metabolickými poruchami ( $r_g = 0,18$ ) a plodností ( $r_g = 0,17$ ) (Sander-Nielsen et al., 1999).

Ohledně teorie snížení dlouhověkosti se názory liší. Podle některých autorů vedlo ke snížení dlouhověkosti krav výrazné zlepšení mléčné užitkovosti (Oltenacu a Broom, 2010; Froidmont et al., 2013), které dále přispělo ke snížení reprodukčních funkcí a zvýšilo vnímavost zvířat vůči onemocněním (Simianer et al., 1991). Vyskytují se však také studie, které popisují pozitivní efekt zlepšení managementu chovu a více znakové genetické selekce právě na přežitelnost krav (Dematawewa a Berger, 1998; Dechow a Goodling, 2008; Miglior et al., 2012). Na dlouhověkost má mimo jiné vliv i plemeno (Tabulka 1). Dlouhověkost v rámci populace se nejčastěji zjišťuje pomocí lineárních, random regression nebo survival modelů.

**Tabulka 1** Vztah dlouhověkosti a doživosti (Lorenc, 2002)

Plemeno	Podíl holštýnského plemene	Průměrný počet laktací A	1. laktace doživost	Všechny laktace průměr B	Celoživotní užitkovost AxB
Simentál	2,3	4,1	5 159	6 047	24 793
Fleckvieh	56,4	4,1	5 694	6 705	27 491
Red holštýn	82,9	3	6 273	7 194	21 582
Holštýn	-	2,2	6 759	7 299	15 238

## 2.2. *Současný trend ve šlechtění českého strakatého skotu*

Svaz chovatelů českého strakatého skotu (ČESTR, 2012) uvádí, že předpokladem zefektivnění chovu strakatého skotu je prosazování znaků fitness do šlechtitelského cíle. Jedná se zejména o dlouhověkost, plodnost, průběh porodů atd., které navazují na trend zlepšování těchto vlastností i u holštýnského skotu (Miglior et al., 2005, 2012). Předpokládá se, že šlechtitelské programy kombinovaných plemen skotu se budou v dalším období stále častěji orientovat na zvýšení efektivity chované populace skotu, a to především prostřednictvím funkčních znaků.

Úskalím šlechtění na sekundární vlastnosti skotu je kromě jejich nízké dědivosti i nejednotná klasifikace jednotlivých obtíží a jejich evidence. Nejvíce zkušeností s problematikou sběru dat pro znaky zdraví mají bezesporu státy Skandinávie. Rakouské chovatelské organizace po vzoru Norska započaly projekt sledování zdravotního stavu v roce 2006 a dnes již mají i plemenné hodnoty pro hlavní sledované znaky včetně studií dopadu využití těchto znaků v selekčním indexu. O tom, že i znaky s nízkou dědivostí je možné šlechtitelsky ovlivňovat, svědčí výsledky právě z Norska (Heringstad et al., 2007), kde v průběhu 5 generací pozorovali zlepšení odhadované plemenné hodnoty pro skóre somatických buněk až o 10 %, což odpovídalo zlepšení 1,9 % za generaci u skupiny krav selektovaných na zdraví vemene.

Další směr šlechtění se podle ČESTR (2012) zaměří na zdůraznění kvalitativních ukazatelů produkce, zejména:

- zdůraznění ukazatelů fitness; zejména dlouhověkost, snadné porody, vitalita telat,

- u mléka – obsah mléčných složek, počet somatických buněk,
- adaptabilita, pastevní schopnost,
- pevná konstituce a dobrý zdravotní stav, zejména mléčné žlázy,
- harmonické a funkční utváření tělesných partií, hlavně vemene a končetin, jemná kostra,
- střední až větší tělesný rámec, dobré osvalení a šířkové i hloubkové rozměry,
- střední ranost.

Významný vliv na šlechtění skotu má výrazný rozvoj biotechnologií a jejich využívání v chovu. Plošně využívaná umělá inseminace zajistila kromě omezení přenosu pohlavních chorob především významný genetický pokrok. Ten je realizován zejména díky vysoké intenzitě selekce plemenných býků. Na důležitosti rovněž nabývají i další biotechnologické postupy, jako je například superovulace nebo přenos embryí. Díky těmto metodám lze zkrátit generační interval a zpřesnit selekci na základě většího množství potomstva od jedné plemence. V současnosti je za budoucnost ve šlechtění skotu považováno dynamicky se rozvíjející odvětví genomiky a sledování genetického polymorfismu.

## **2.3. Genetické markery a jejich využití**

### *2.3.1. Gen a genetický polymorfismus*

Genem je zpravidla označována část deoxyribonukleové kyseliny (DNA), která má speciální funkci v buňce i v organismu. Tyto funkce jsou podle Judson a Haydon (1999) například:

- gen musí vytvářet dědičný znak nebo se podílet při vytváření několika takových dědičných znaků,
- musí být schopen utvářet vlastní kopie, což umožní předávat jeho funkci z generace na generaci,



- musí být schopen přeměnit svoji strukturu a tím i funkci, tj. podléhat mutacím. Zmutovaný gen dále replikuje tuto mutaci, což je nezbytné ke vzniku genetické variability a evoluce.

Výraz polymorfismus vychází z řecké předpony poly- (mnoho, více) a morphos (tvar). Podstatná část autorů využívá pojmu polymorfismus, avšak v češtině je možné se setkat s výrazem mnohotvarost. Genetický polymorfismus je tedy označení pro výskyt téhož znaku ve více formách, přičemž tato variabilita je dědičná. Za geneticky polymorfní lze považovat takový znak, který má alespoň dvě geneticky podmíněné varianty v jedné populaci, jejichž nejnižší frekvence výskytu činí alespoň 1 % (Vignal et al., 2002). Polymorfní naopak nejsou:

- znaky, jejichž variabilita není podmíněna geneticky (např. infekční choroby),
- znaky s nízkou frekvencí výskytu (pod 1 %, např. dědičné choroby),
- znaky s kontinuální proměnlivostí,
- znaky, které jsou polymorfní mezi více populacemi téhož druhu (zbarvení kůže).

V genomu organismů lze pozorovat velkou genetickou variabilitu, významné změny v genomu mohou být způsobeny například delecí, duplikací, inverzí či translokací. Často dochází k tzv. nekauzálním mutacím, jedná se o mutace, které se nepromítnou do fenotypu jedince. Takovéto mutace nejčastěji nezpůsobí změnu fenotypu, protože se nacházejí:

- a) v intronech a jsou při postranskripčních úpravách vystřiženy,
- b) v exonech, které jsou dále překládány do mRNA, ale díky degenerovanému genetickému kódu nezpůsobí záměnu aminokyseliny v polypeptidovém řetězci.

Tyto mutace je možné detekovat jen díky významnému rozvoji metod molekulární genetiky. Mutace v genomu organismů mohou být velkého rozsahu, nejčastějšími změnami v genomu jsou však malé změny.

### 2.3.2. Genetické markery a markery asistovaná selekce

Termín marker je poměrně široký pojem. Teneva a Petrovic (2010) je rozdělují podle jejich založení a způsobu detekce. Markery tedy mohou být:

- a) založeny na vizuálně hodnocených vlastnostech (morfologické a produkční znaky),
- b) založeny na produktu transkriptu (biochemické markery),
- c) založeny na DNA analýzách (molekulární markery).

Molekulárními markery jsou specifické varianty v genetickém kódu, které se mezi jedinci liší a které mohou být determinovány na základě asociací s určitými vlastnostmi. Tyto variace jsou nejčastěji způsobeny insercí, delecí, bodovou mutací, translokací a duplikací. Charakteristické pro molekulární markery je, že mohou být identifikovány v jakékoli etapě života (Haley a De Koning, 2006) a jakékoli tkáni (Deb a Chakraborty, 2012), stejně tak, nejsou ovlivněny prostředím ani genovými interakcemi jako je pleiotropie či epistáze (Agarwal et al., 2008).

Genetický marker je tedy polymorfní znak, jehož varianty vykazují mendelistickou dědičnost a mají vztah k proměnlivosti znaku, který je pro šlechtitele významný. Markery mohou být používány při objasnění vztahů jejich polymorfismu k produkci, přičemž mutace většího rozsahu bývají ve většině případů nežádoucí. Nejvyšší stupeň genetické heterogenity mají DNA markery. O'Brien et al. (1999) DNA markery rozdělují na:

**Markery I. typu** - kódující exprimované geny, vyznačující se nízkou hladinou polymorfismu. Jejich význam spočívá ve srovnávacím mapování.

**Markery II. typu** - vysoce variabilní sekvence DNA, které nemají vlastní fenotypový projev (např.: mikrosatelity a minisatelity). Díky tomu se především mikrosatelity vyznačují velkým množstvím informací, které se využívají v populačních studiích, při zjišťování rodičovství, stanovení identity či paternity. Jsou také základem pro vazbové mapování genů.

**Markery III. typu** - jednonukleotidové polymorfismy (SNP), nacházející se většinou v intronech, bývají však i součástí exonů. Využívají se pro rodinné a populační studie.

Konvenční šlechtitelský program je založen na zlepšování genetického založení zvířat sledováním jejich fenotypu a odhadu plemenných hodnot na základě fenotypu a stanovením příbuznosti mezi jednotlivými zvířaty. Problém tradičního přístupu šlechtění je, že nezohledňuje všechny možné zdroje genetické variability (Singh et al., 2014). Proto u vlastností, které jsou závislé na pohlaví (mléčná užitkovost), mají nízkou dědivost (funkční vlastnosti) nebo se projevují později (dlouhověkost) je účinnost tradičního šlechtění zvířat omezena. Právě při šlechtění výše uvedených vlastností se uvažuje, že identifikace genů ovlivňující tyto vlastnosti a selekce zvířat s požadovaným genotypem by mohla proces šlechtění zefektivnit (Goddard a Hayes, 2009). Identifikace jednotlivých SNP a pochopení molekulárních procesů, které mají vliv na zhoršení reprodukčních ukazatelů, by mohlo pomoci zlepšit např. reprodukční výkony plemenic (Beerda et al., 2008), a proto je velmi důležité se této oblasti věnovat.

Základy využívání markerů pro selekci zvířat založili Beckman a Soller (1983), kteří předpokládali, že genetické markery mají potenciál hodnotit lokusy, které ovlivňují ekonomicky důležité vlastnosti. Díky genetickým markerům, které je možné použít při selekci, je možné zredukovat čas a zvýšit přesnost selekce (Hayes et al., 2009; VanRaden et al., 2009). Markery asistovaná selekce patří mezi způsoby, jak můžeme při šlechtění zvířat využívat údaje o genetické informaci zvířat. Jedná se také o propojení tradičních postupů selekce, genetiky a molekulární biologie. Plošné využívání markerů k selekci, známé jako halotanový test, bylo prováděno u prasat za účelem vyhledávání zvířat odolných vůči stresu. U skotu byl předmětem vyhledávání jednotlivých variant např. gen diacylglycerolové acetyl transferázy 1 (*DGATI*) či stanovení variant kaseinových bílkovin. Výhody markery asistované selekce byly potvrzeny také množstvím studií. Přínos této metody je spatřován především v dodatečném zefektivnění selekce oproti klasickým selekčním programům.

### *2.3.3. Jednonukleotidový polymorfismus*

Záměna jednoho páru nukleotidů je příčinou výskytu jednonukleotidových polymorfismů (Snustad a Simmons, 2009). Takto definované polymorfni místo vykazuje mendelisticky kodominantní dědičnost a jeho jednotlivé varianty se vyskytují s určitou frekvencí, která se může v různých

populacích lišit (Vignal et al., 2002). Odhaduje se, že mutace typu SNP se v genomu vyskytují každých 300 až 1 000 bp, oproti mikrosatelitům, u kterých se odhaduje frekvence výskytu 5 000 až 50 000 bp (Morin et al., 2004). Přičemž výskyt nového SNP se u savců odhaduje s výskytem  $1 \times 10^9$  a  $5 \times 10^9$ / rok v případě neutrální mutace (Li et al., 1981; Martínez-Arias et al., 2001). Díky sekvenování genomu bylo zjištěno přibližně 40 milionů SNP, které se nachází v genetické informaci skotu (Seidel, 2010).

Za předpokladu, že vzniklá mutace neovlivní kódující oblast genu nebo nezpůsobí záměnu aminokyseliny ve vznikajícím polypeptidovém řetězci, nazývá se synonymní nebo také "silent". V případě, že se synonymní mutace nachází v regulační oblasti DNA, která kóduje vznik polypeptidového řetězce, může tato mutace způsobit rozdílnou expresi genu (Flint a Woolliams, 2008) a tak změnit fenotypový projev znaku. Pokud SNP způsobí záměnu aminokyseliny, nazývá se tato mutace nesynonymní. Zhang a Hewitt (2003) pokládají tyto mutace na nejvýznamnější, protože mohou změnit funkci vznikajícího proteinu.

Díky velkému množství a jejich rozdělení v genomu se SNP osvědčily jako významné genetické markery v asociačních studiích (Snustad a Simmons, 2009). K efektivní detekci SNP byly vyvinuty vysokokapacitní technologie genotypování, které umožňují stanovení až desítek tisíc SNP. Jedná se především o silikonové čipy (např. Illumina, Affymetrix) nebo sekvenování nové generace (NGS), jejichž užití je plně automatizované a výrazně snižuje náklady na zjištění genotypu. Díky tomuto technologickému pokroku je možné využití SNP ke šlechtění v celogenomovém měřítku a zavedení genomické selekce zvířat v praxi (Wiggans et al., 2017).

#### *2.3.4. Genomika a genomická selekce*

Poprvé byla možnost využití celogenomové selekce navržena Meuwissen et al. (2001), jako varianta MAS. Genomika je stále poměrně nový vědní obor, který usiluje o komplexní a úplnou identifikaci a analýzu dědičné informace jedince pomocí genetických markerů (Goddard a Hayes, 2007). Postup hodnocení je založený na celogenomovém stanovení lokusů kvantitativních vlastností (QTL), což je soubor genů, které mají měřitelný vliv na určitou vlastnost (Hayes a Goddard, 2001). Tyto geny nemusí být přímo detekovatelné, proto se zpravidla využívají SNP markery, které mohou

být nedaleko daných QTL (Goddard a Hayes, 2009). Genomika se tedy zabývá využitím markerů pro identifikaci oblastí příčinných genů.

Díky DNA čipu, na kterém hybridizuje DNA zvířete s navrženými SNP sondami, je možné pomocí laseru detekovat jednonukleotidový polymorfismus genů a získat informace pro odhad genomické plemenné hodnoty (GPH). Díky snižujícím se nákladům na genotypování bylo možné začít studovat až desítky tisíc SNP u značného množství zvířat. V roce 2016 bylo jen ve Spojených státech genotypováno pomocí čipů 1 268 354 zvířat, zajímavostí je rovněž vzrůstající množství plemenic, které jsou genotypovány (Wiggans et al., 2017).

V současné době dochází ke změně v tradičních postupech a šlechtitelé začínají využívat genomická data pro odhad tzv. genomické plemenné hodnoty (GPH) nebo genomicky optimalizované plemenné hodnoty (GOPH). Slibují si od těchto postupů především zvýšení přesnosti odhadu plemenné hodnoty (PH) u mladých zvířat. Na tuto problematiku se zaměřil VanRaden (2008), který zjistil, že při využití SNP informací odpovídá přínos těchto údajů 10-ti až 20-ti potomkům vybraného jedince. Díky využívání SNP dochází k tomu, že i mladý neprověřený býk má spolehlivost odhadu plemenné hodnoty od 0,30 do 0,60 (Příbyl et al., 2010) a je možné ho zařadit do plemenitby ještě dříve, než se dostane do testace (Banos et al., 2008). Využitím genomické selekce, je tedy možné snížit provozní náklady na testaci. Schaeffer (2006) předpokládá, že u programu mladých býků jsou díky genomice až 12,8× nižší náklady/rok, 2,2× vyšší roční genetický zisk a 27,8× levnější zlepšení v genetickém založení plemeníků o jednu směrodatnou odchylku. Velice užitečné je, že genomickou plemennou hodnotu je možné odhadnout u obou pohlaví s přesností  $r = 0,7$  a to v jakékoli etapě života (Koenig et al., 2009).

Díky většímu množství SNP detekovatelných na biočipech, které souvisejí s plodností skotu, je možné ke šlechtění využít většího množství informací. Tím se Cole et al. (2011) podařilo o 17 % zvýšit spolehlivost odhadu plodnosti dcer po testovaných býcích, která se vyznačuje velice nízkou dědivostí ( $h^2 = 0,04$ ), přičemž toto zvýšení spolehlivosti bylo v jeho výpočtech nejnižší z 12-ti dalších sledovaných vlastností. Vhodnou cestou zlepšení genomických odhadů plodnosti skotu tedy může být přidání dalších SNP na DNA biočipy (Cochran et al., 2013). Genom skotu obsahuje více než 20 tisíc genů a u více než 14 tisíc z nich, nejsou jejich SNP dosud zabudovány do čipů BovineSNP50 chip (Michelizzi et al., 2011). Díky inkorporaci kandidátních genů do biočipů bude

možné odhalit příčinné SNP nebo jim blízké SNP a nalézt účinnou cestu selekce a zlepšit schopnost vyhledávání interakce genomu a projevu onemocnění (Amos et al., 2011). Jednotlivé SNP by tedy mohly hrát klíčovou roli při šlechtění funkčních znaků u skotu.

V případě implementace GPH pro ČR by mohla být u českého strakatého skotu významně rozšířena selekční báze ve střední Evropě, čímž by mohla rovněž být posílena role strakatého skotu jako vynikajícího plemene s produkcí mléka a masa šetrnou k životnímu prostředí. Předpokladem úspěšného uplatnění této metody je mít k dispozici velkou populaci čítající dostatečný počet plemenných jedinců. Od roku 2014 začaly být odhadovány společné plemenné hodnoty mléčné užitkovosti pro zvířata z České republiky, Německa a Rakouska (ČESTR, 2014). Díky tomu byl získán dohromady celosvětově největší kalibrační vzorek plemene Fleckvieh (Kučera a Ondráková, 2011).

Zavádění genomické selekce má na současné šlechtění skotu takový dopad, že je některými autory srovnáváno se zavedením kontroly dědičnosti jako takové. Bohužel všechny dosavadní výsledky získané u ne-holštýnských populací přinášejí z chovatelského pohledu méně výrazné zpřesnění spolehlivosti, než bylo očekáváno (Kučera, 2011). Otázkou tedy bylo, zda lze současné čipy použít bez ohledu na plemennou příslušnost, nebo bude třeba pracovat na vytvoření čipů specifických pro jednotlivá plemena, případně jak mohou celou situaci pomoci zpřesnit čipy s vysokou hustotou. V současné době se v rámci genotypování zvířat českého strakatého skotu používají tzv. custom čipy, na kterých jsou navrženy specifické oblasti pro dané plemeno. Aktuálně jsou genotypy zjišťovány ve společné laboratoři v německém Grubu, avšak v nejbližší době se předpokládá využití tuzemské laboratoře Českomoravské společnosti chovatelů. Původně se uvažovalo pouze o genotypování býků, avšak v roce 2014 tvořily dojnice již 10 % z celkového počtu genotypovaných zvířat (Ondráková et al., 2014) a tento trend genotypování plemenic bude pravděpodobně nadále pokračovat.

Posledních pět let je oblast šlechtění skotu spojena s vývojem a rutinním využitím plemenných hodnot založených na údajích, které jsou získány genotypováním jedinců. Genomicky optimalizované PH umožňují přesnější a časnější selekci, čímž se zrychluje šlechtitelský pokrok. Přínos genomických informací se v případě mléčných znaků přirovnává k informacím o mléčné užitkovosti od 10 dcer z jejich 3 celých laktací, přesnost odhadu PH u mladých býků se odhaduje

vyšší než 0,8 (Dalton, 2009). Přínos genomiky by měl být především u znaků s nízkou dědivostí jako je např. plodnost, protože zvýšení přesnosti odhadu PH je vyšší (García-Ruiz et al., 2016), stejně tak u plemenic, bude genomika důležitá pro zpřesnění odhadu PH (Wiggans et al., 2017).

### *2.3.5. Geny a SNP se vztahem k sekundárním vlastnostem skotu*

K efektivnímu využití možností genomiky je nezbytné neustálé hledání a ověřování vztahů mezi SNP a jednotlivými vlastnostmi, aby bylo možné inkorporovat na čipy další SNP a znát jejich souvislosti s fenotypovým projevem zvířat. V současné době se vlivu polymorfismu typu SNP ve vztahu k reprodukčnímu výkonu plemenic a obsahu somatických buněk v mléce věnuje celá řada autorů (Goertz et al., 2009; Clempson et al., 2011a; Collis et al., 2012; Cochran et al., 2013).

#### **Leptin**

Gen Leptin byl znám především svým vztahem k produkci pohlavních hormonů, výživě zvířat a mléčné produkci. Avšak nedávno bylo zjištěno, že u buvolů je leptin cílovým místem buněk imunitního systému (De Matteis et al., 2016). U lidí je leptin spojován především s udržením metabolické homeostáze a imunitních funkcí (Chang et al., 2016). Varianty Leptinu jsou u lidí dále korelovány s expresí interleukinu 6, který je významným modulátorem zánětu a imunitní odpovědi (Fairfax et al., 2010). Leptin byl u skotu lokalizován na 4. chromozomu (Pomp et al., 1997), transkripcí vzniká cytokin/hormon, který ovlivňuje osu hypotalamus-hypofýza-nadledvinky (Procaccini et al., 2017).

Přibližně polovina krav je po otelení ohrožena infekcí dělohy, která může narušit funkci vaječnicků i dělohy a vést tak k neplodnosti (Sheldon et al., 2009). Plemenice postižené zánětem dělohy vykazují pomalejší růst dominantního folikulu po otelení a také nižší koncentrace estradiolu (Williams et al., 2007). Role leptinu v reprodukci byla podrobně popsána (Chehab, 2014) a experimentálně ověřena (Cunningham et al., 1999) na Lep<sup>ob</sup>/ Lep<sup>ob</sup> myších. Receptory pro leptin jsou umístěny v hypotalamu a vaječnicích a zvyšují sekreci gonadotropinů po období nedostatečné výživy (Zieba et al., 2005), u dojnic negativní energetické bilanci. Tím zvyšují schopnost oocytů pokračovat v embryonálním vývoji (Boelhaue et al., 2005).

Varianty Leptinu byly dosud v literatuře spojovány jak s doživostí krav (Chessa et al., 2015), obsahem tuku a bílkovin v mléce (Kulig et al., 2009), masnou užitkovostí (Silva et al., 2014), perinatální mortalitou (Brickell et al., 2010), úrovní tělesné kondice (Oikonomou et al., 2009), tak plodností (Giblin et al., 2010; Clempson et al., 2011b).

Poprvé byla promotorová mutace g.-963C>T popsána Liefers et al. (2005), kteří našli vztah tohoto polymorfismu k energetickému statusu zvířete. Dále se této oblasti věnovali Komisarek (2010) a Clempson et al. (2011b), kteří spojují uvedenou mutaci s plodností skotu plemene jersey a holštýn. Mutace známá jako A59V (c.357C>T) se nachází na 3. exonu genu Leptin a způsobuje záměnu aminokyseliny Alaninu za Valin (Haegeman et al., 2000). Tato mutace je spojována především s živou hmotností zvířete a % laktózy v mléce (Liefers et al., 2002), věkem při 1. inseminaci a doživostí na 1. a 2. laktaci (Clempson et al., 2011b). Dále byl popsán i vztah mutace c.357C>T k obsahu somatických buněk v mléce a složení mléka (Glantz et al., 2012).

#### **Toll-like receptor 4 (*TLR4*)**

Toll-like receptory rozpoznávají specifickou molekulární strukturu, která je nazývána patogen-asociované molekulární vzory, v okamžiku, kdy patogen vniká do organismu (Lu et al., 2008). Toll-like receptor 4 je umístěn na povrchu buněk a je schopný rozpoznat lipopolysacharidovou membránu gramnegativních bakterií (Akira et al., 2001; Akira a Takeda, 2004). Aktivace TLR receptorů proto hraje významnou roli v obraně organismu proti patogenům, avšak přílišná aktivita může ohrozit přirozenou rovnováhu imunitního systému a vést k poškození organismu (Fu et al., 2013). Protože nejčastějším důvodem výskytu endometritidy skotu je *Escherichia coli* (Ajevar et al., 2014), vyskytuje se v literatuře množství publikací popisujících vyšší expresi právě *TLR4* v průběhu poporodního období a infekce (Herath et al., 2009; Fu et al., 2013). Bohužel asociační studie mezi variantami genu *TLR4* a plodností skotu jsou v literatuře ojedinělé. Sominsky et al. (2013) uvažují, že právě *TLR4* by měl mít zásadní roli v regulaci reprodukce a zánětlivých procesů. Jejich výzkumy u potkanů naznačují, že časná aktivace imunitního systému pomocí TLR má významný vliv na rozvoj vaječnicků a plodnosti. Vztah rodiny *TLR* a konkrétně 2 variant *TLR4*, k plodnosti skotu byl demonstrován na jejich asociaci k odolnosti vůči brucelóze (Prakash et al., 2014). V mléčné žláze způsobuje v průběhu mastitidy zvýšenou expresi *TLR4* přítomnost *Staphylococcus Aureus* a *E. coli* (Griesbeck-Zilch et al., 2008; Petzl et al., 2008). Proto se



předpokládá, že by *TLR4* mohl být vhodný kandidát pro MAS s cílem zvýšení odolnosti vůči mastitidám u dojného skotu (Sharma et al., 2006).

Gen pro *TLR4* je umístěn na 8. chromozomu (McGuire et al., 2006). V 5'-upstream promotorové oblasti, dochází k transverzi bází C↔G, která je příčinou vzniku SNP, který je známý jako g.-226C>G (Sharma et al., 2006) a způsobuje rozdílnou expresi genu *TLR4* (Sharma et al., 2008). Promotorová oblast *TLR4* je v literatuře spojována především s ukazateli zdraví vemene (Sharma et al., 2006; Wojdak-Maksymiec et al., 2015), ale i odolností vůči paratuberkulóze skotu (Ruiz-Larranaga et al., 2011) či plemennou hodnotou pro perzistenci laktace (Sharma et al., 2006).

### **Chemokinový receptor interleukinu 8 C-X-C motiv (*CXCR1*)**

Aktivita *CXCR1* je významně spjatá s imunitní odpovědí na zánět způsobený gramnegativními bakteriemi a je proto významnou součástí vrozené imunity skotu (Rainard a Riollet, 2006; Oviedo-Boyso et al., 2007). V průběhu mastitidy je více než 90 % populace neutrofilů přítomno v mléčné žláze (Sordillo a Streicher, 2002). Proto jsou geny, jako například *CXCR1*, které mají vliv na funkci neutrofilů potenciálními markery pro genetickou selekci vůči mastitis (Paape et al., 2000). Gen *CXCR1* je exprimován na povrchu neutrofilů (Proudfoot, 2002) a komunikuje především s interleukinem 8, který je potenciálním chemoatraktantem neutrofilů a je spojován s imunitní odpovědí na infekci způsobenou gramnegativními bakteriemi (Oviedo-Boyso et al., 2007).

U skotu je gen *CXCR1* umístěn na 2. chromozomu (Murdoch a Finn, 2000). V 1. exonu byla popsána nesynonymní mutace známá jako c.777C>G, (Youngerman et al., 2004). Díky této mutaci dochází v pozici 245 k záměně aminokyseliny Glutamin za Histidin. Tento SNP se nachází v regionu, který kóduje 3. intracelulární smyčku *CXCR1* a je důležitý pro vazbu G-proteinu neutrofilů, jehož aktivace vede ke změně konformace buněk, která vede k lepší chemotaxi (Leyva-Baca et al., 2008). Proto je *CXCR1* navrhován jako kandidátní gen pro odolnost vůči mastitis (Youngerman et al., 2004).

Vztah mutace c.777C>G byl dosud v literatuře popsán k obsahu somatických buněk (Youngerman et al., 2004; Beecher et al., 2010), dojivosti a složení mléka (Galvao et al., 2011) a specifitě patogenů, kteří způsobují klinickou a subklinickou mastitidu (Verbeke et al., 2014). Uvedená

mutace byla ve vztahu k plodnosti skotu zkoumána pouze jednou, avšak žádný vztah se mezi touto variantou se nepodařilo prokázat (Galvao et al., 2011).

### **3. Cíle práce a hypotéza**

Problematice bodových mutací je v literatuře i světovém výzkumu věnována velká pozornost. Jelikož se jedná o celosvětové téma, výzkum se zaměřuje především na holštýnské plemeno skotu. Přestože z krav zapojených do kontroly užitkovosti jich 38 % prezentuje český strakatý skot, víme o genetickém založení tohoto plemene bohužel dosud jen velmi málo. Je proto velmi důležité přednést další poznatky o tomto plemeni, aby mohlo být dále efektivně zušlechťováno.

Do disertační práce byly ke studiu vybrány bodové mutace v genech, u kterých je předpokládán vztah k počtu somatických buněk v mléce krav jako indikátoru zdraví vemene a k ukazatelům plodnosti. Cílem práce je přinést přehled o genotypových frekvencích v těchto mutacích a provést asociační studii s cílem objasnit vztah mezi zaznamenanými fenotypovými údaji a genetickým založením zvířat českého strakatého skotu.

Hypotézou je, že mezi skupinami krav s rozdílným genotypem (v rámci studovaných genů) bude možné pozorovat rozdíly v jejich reprodukční výkonnosti a obsahu somatických buněk v mléce.

## 4. Materiál a metodika

Do studie bylo vybráno celkem 791 krav českého strakatého skotu, které jsou zapsány v oddílu plemenné knihy PCA. Plemenice byly potomky celkem 27 býků, počet dcer kolísal v rozmezí 11 - 89 dcer na býka. Vybrané dojnice pocházely z 5 farem v České republice a byly narozeny v letech 2000 - 2008. Do asociační studie byly zahrnuty pouze údaje o 1. třech laktacích. Fenotypové údaje vycházely z údajů kontroly užitkovosti a byly získány od Českomoravské společnosti chovatelů, a.s.

Na základě dostupné literatury, s ohledem na jejich předpokládané zapojení do imunitní odpovědi organismu či reprodukční výkonnosti plemenic, byly ke studiu vybrány celkem 4 polymorfnní oblasti ve 3 genech. (Tabulka 2).

**Tabulka 2** Přehled studovaných SNP

Gen	Oblast genu	SNP	rs kód	Délka PCR produktu	Restrikční enzym	Reference
<i>LEP</i>	Promotor	g.-963C>T	rs109956567	295 bp	<i>DraI</i>	Komisarek a Antkowiak (2007)
<i>LEP</i>	Exon 3	c.357C>T	rs29004508	331 bp	<i>HphI</i>	Haegeman et al. (2000)
<i>TLR4</i>	Promotor	g.-226C>G	rs29017188	137 bp	<i>HpaII</i>	Carvajal et al. (2013)
<i>CXCR1</i>	Exon 1	c.777C>G	rs208795699	266 bp	<i>BspI286I</i>	Goertz et al. (2009)

*LEP* – Leptin, *TLR4* – Toll-like receptor 4, *CXCR1* – Chemokinový receptor interleukinu 8 C-X-C motiv

Genomická DNA byla získána z krve a izolována metodami popsányými v Tabulce 3. Uvedené SNP byly genotypovány metodou PCR-RFLP, primery byly navrženy na základě dostupné literatury (Tabulka 2).

**Tabulka 3** Použité metody izolace DNA

<b>Přístroj/metoda/KIT</b>	<b>Zdrojový materiál</b>	<b>Výrobce</b>
ABI PrepStation 6100	krev	Applied Biosystems; USA
QuickGene-Mini80	krev	Kurabo; Japonsko
Exgene clinic	krev	GeneAll; Jižní Korea
Vysolování	krev	Metodika v příloze

Polymerázová řetězová reakce byla provedena v celkovém obsahu 10  $\mu$ l, obsahovala 20 – 100 ng genomické DNA, 1 x PPP Master Mix s  $MgCl_2$  (Top-Bio, Česká republika), 10 pmol primerů (R, F) (Generi Biotech, Česká republika), v případě rs109956567 5 % DMSO (Top-Bio, Česká republika). Amplifikované fragmenty byly následně 12 hodin štěpeny při teplotě 37 °C pomocí restrikčních enzymů (Thermo Fisher Scientific, USA) uvedených v Tabulce 2. Produkty štěpení byly dále elektroforeticky separovány na 3% agarózovém gelu (SeaKem® LE Agarose, Lonza, Switzerland), který byl obarven 5  $\mu$ l ethidium bromidu (Top-Bio, Česká republika) a následně vizualizovány fluorescenčním fotodokumentačním systémem G:box, Syngene (USA).

Pro zjištění genotypových a alelových frekvencí, Hardy-Weinbergovi (H-W) rovnováhy a genové vazby u genu Leptin byl použit software GenAlex (Peakall a Smouse, 2006, 2012).

#### **4.1. Asociační analýza plodnosti**

V rámci asociační analýzy byly, celkem u 791 krav, vyšetřovány následující vlastnosti: věk při prvním otelení (AFC), inseminační interval (CFI), servis perioda (DO), mezidobí (CLI) a % březosti po 1. inseminaci (PR). Základní statistika byla získána pomocí statistického programu SAS 9.4. (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) procedurou MEAN a výsledky jsou prezentovány v Tabulce 4.

**Tabulka 4** Popisná statistika studovaných vlastností

Vlastnost <sup>1</sup>	Jalovice <sup>2</sup>	1. laktace <sup>2</sup>	2. laktace <sup>2</sup>	3. laktace <sup>2</sup>
AFC (dny)	865 ± 82,0 (791)			
CFI (dny)		73 ± 35,9 (769)	72 ± 21,7 (767)	75 ± 23,4 (572)
DO (dny)		102 ± 52,4 (765)	101 ± 48,0 (717)	107 ± 52,8 (525)
CLI (dny)			390 ± 53,9 (772)	388 ± 50,8 (683)
PR (%)		52,1 (791)	55,8 (747)	59,0 (659)
SCS		2,77 ± 1,6 (1815)	3,27 ± 1,8 (1781)	3,67 ± 1,8 (1046)

<sup>1</sup>Vlastnosti: AFC – věk při 1. otelení; CFI – inseminační interval; DO – servis perioda; CLI – mezidobí; PR – % březích po 1. inseminaci; SCS – skóre somatických buněk.

<sup>2</sup>Hodnoty jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka. Hodnota v závorce udává počet analyzovaných záznamů.

V případě CLI na 2. laktaci je míněn interval mezi 1. a 2. otelením, CLI na 3. laktaci je interval mezi 2. a 3. otelením. Normální rozdělení souboru bylo kontrolováno pomocí sledování reziduí. Jelikož ani rezidua nevykazovala normální rozdělení, byly při použití procedury MIXED v statistickém programu SAS 9.4., pro získání normálního rozdělení všechny závislé proměnné (AFC, CFI, DO, CLI) transformovány pomocí přirozeného logaritmu. Do výpočtů byl zahrnut efekt věku při prvním otelení. Na základě této informace byly krávy rozděleny do 3 skupin: krávy s průměrnou hodnotou AFC ± 1 směrodatná odchylka (SD), krávy s prvním otelením > průměr + 1 SD a krávy s průměrem AFC < (průměr – 1 SD). Pozorování PR byla diskontinuálního charakteru (březost: 1 = ano/ 0 = ne) a proto byla k vyhodnocení použita procedura GLIMIX s binárním rozdělením, opět v programu SAS 9.4.

Pro statistickou analýzu byly použity následující smíšené lineární modely:

a) Opakované měření pro CFI, CLI a DO:

$$Y_{ijklm} = \mu + SRO_i + B\acute{y}k_j + Skupina\_v\acute{e}k(Lakt)_k + Lakt_l + SNP_m + e_{ijklm}$$

b) Měření podle pořadí laktace pro CFI, CLI a DO:

$$Y_{ijkm} = \mu + SRO_i + Býk_j + Skupina\_věk_k + SNP_m + e_{ijkm}$$

c) AFC:

$$Y_{ijm} = \mu + SRO_i + Býk_j + SNP_m + e_{ijm}$$

d) Logistická regrese pro opakované měření pro PR:

$$P_{(PR)} = a + b1SRO_i + b2Býk_j + b3Skupina\_věk(Lakt)_k + b4Lakt_l + b5SNP_m + e_{ijklm}$$

e) Logistická regrese pro měření podle pořadí laktace pro PR:

$$P_{(PR)} = a + b1HYS_i + b2Bull_j + b3 Skupina\_věk_k + b4SNP_m + e_{ijkm}$$

kde,  $Y$  = pozorovaná vlastnost;  $P_{(PR)}$  = % březích po 1. inseminaci;  $\mu$  = průměr populace;  $a$  = intercept;  $SRO_i$  = sdružený pevný efekt ité farmy – roku – období otelení ( $i = 1$  až 17) v modelu c) sdružený pevný efekt ité farmy – roku – období narození ( $i = 1$  až 16);  $Býk_j$  = jtý efekt otce krávy v modelech a), d), e) pevný efekt; v modelech b), c), náhodný efekt ( $j = 1$  až 27);  $Skupina\ věku_k$  = pevný efekt kté skupiny při AFC ( $k = 3$ );  $Lakt_l$  = pevný efekt lté pořadí laktace ( $l = 1$  až 3);  $SNP_m$  = fixní efekt mtého genotypu SNP ( $m = 1$  až 3);  $b$  = regresní koeficient pro SRO, býka, skupinu věku, pořadí laktace a SNP;  $e$  = vektor náhodných reziduí.

K vyhodnocení asociační studie byl vybrán vždy pouze ten model, který vykazoval nejnižší hodnotu Akaikeho Informačního Kritéria (Tabulka 5). Pro porovnání průměrů mezi jednotlivými skupinami genotypu bylo využito Bonferroniho korekce, která se k vyhodnocení zpravidla doporučuje a vyznačuje se svojí konzervativností. Protože v proceduře MIXED není možné provést zpětnou transformaci logaritmovaných hodnot, nebylo možné stanovit střední chybu průměru a proto jako ukazatel variability posloužily 95% intervaly spolehlivosti. Pro hodnotu PR, která byla hodnocena procedurou GLIMMIX byla vypočítána střední chyba průměru.

**Tabulka 5** Výsledky F-testu před Bonfferoniho korekcí a hodnoty Akaikeho informačního kritéria (AIC) pro studované vlastnosti

Laktace	SNP	SCS <sup>1</sup>		AFC <sup>1</sup>		CFI <sup>1</sup>		DO <sup>1</sup>		CLI <sup>1</sup>		PR <sup>1</sup>	
		AIC	F-test	AIC	F-test	AIC	F-test	AIC	F-test	AIC	F-test	AIC	F-test
1	<i>LEP</i> g.-963C>T	5482,4	0,6700			336,3	0,5710	806,3	0,5478			982,86	0,2003
	<i>LEP</i> c.357C>T	6327,0	0,8017			331,2	0,8543	914,4	0,4606			1109,18	0,0844
	<i>TLR4</i> g.-226C>G	6237,5	<b>0,0776</b>			331,6	0,7064	892,4	0,4870			1084,83	<u>0,0526</u>
	<i>CXCR1</i> c.777C>G	6286,5	0,2364			342,6	0,9607	910,5	0,4041			1097,32	0,2149
2	<i>LEP</i> g.-963C>T	3623,9	0,7465			-37,5	0,2458	686,1	0,3804	-946,5	0,6840	965,30	0,2947
	<i>LEP</i> c.357C>T	4353,9	0,9092			8,0	0,1300	799,5	0,0226	-1107,9	0,6913	1087,67	0,5508
	<i>TLR4</i> g.-226C>G	4342,2	0,7396			21,2	0,4692	775,6	0,2943	-1082,8	0,3463	1053,75	0,1299
	<i>CXCR1</i> c.777C>G	4362,8	0,3950			18,2	0,1741	800,1	0,8690	-1095,0	0,1216	1069,94	0,8758
3	<i>LEP</i> g.-963C>T	3351,5	0,3352			165,3	0,2280	546,3	0,4019	-791,3	0,4149	799,35	0,3221
	<i>LEP</i> c.357C>T	3852,7	0,5712			180,1	0,8422	637,2	0,1131	-930,8	<b>0,0214</b>	902,56	<u>0,0583</u>
	<i>TLR4</i> g.-226C>G	3759,8	<b>0,0070</b>			188,1	0,9337	629,5	0,8629	-913,3	<u>0,0911</u>	887,04	0,9232
	<i>CXCR1</i> c.777C>G	3820,7	0,6049			180,9	0,7738	627,6	0,8501	-900,2	0,9957	896,06	0,8253
Opakované měření	<i>LEP</i> g.-963C>T	12895,4	0,4859	-1497,2	<b>0,0372</b>	530,5	0,2165	2062,6	<u>0,0576</u>	-1718,1	0,7028		<u>0,0782</u>
	<i>LEP</i> c.357C>T	15005,8	0,9984	-1715,2	0,7682	568,1	0,6002	2370,5	0,4945	-2015,2	0,0729		0,1849
	<i>TLR4</i> g.-226C>G	14797,7	<b>0,0202</b>	-1671,9	<u>0,0825</u>	580,7	0,5517	2312,4	0,4308	-1974,7	<u>0,0591</u>		<b>0,0425</b>
	<i>CXCR1</i> c.777C>G	14939,6	0,5260	-1688,5	0,2960	587,5	0,9397	2348,8	0,5570	-1974,5	0,3873		0,8355



<sup>1</sup>Vlastnosti: SCS – skóre obsahu somatických buněk v mléce; AFC – věk při 1. otelení; CFI – inseminační interval; DO – servis perioda; CLI – mezidobí;  
PR – % březích po 1. inseminaci

V práci jsou prezentovány výsledky, jak pro opakované měření do kterého byla zahrnuta všechna pozorování a třídila se pouze v závislosti na genotypu, tak výsledky, které byly tříděny dále i podle pořadí laktace. Jelikož plemenice na 1. a 2. laktaci ještě nedokončily růst, bylo cílem zjistit, jestli se asociace jednotlivých genotypů bude lišit v závislosti na změnách v metabolismu krav. Avšak pro další šlechtění je důležité znát vliv jednotlivých genotypů na užitkovost krav jako komplexu a proto bylo do experimentu zahrnuto i opakované měření. Díky kombinaci obou přístupů je možné vyhodnotit asociační studii celkově s ohledem na metabolické rozdíly mezi mladými plemenicemi s nedokončeným růstem a staršími krávy na 3. laktaci. Asociační studie nebyla provedena pro krávy na vyšší než 3. laktaci. Důvodem je, že s postupujícím časem vstupují do života krávy další faktory, které s narůstajícím počtem laktací je již velmi složité zohlednit. Proto se vyhodnocování vyšších laktací v literatuře nedoporučuje.

## **4.2. Asociační analýza pro zdraví vemene**

V rámci asociační analýzy byly porovnávány údaje o počtu (SCC), respektive skóre somatických buněk (SCS) v mléce u celkem 362 krav. Celkový počet zpracovaných záznamů z jednotlivých testovacích dní činil 4 642. Jelikož počet somatických buněk v mléce zpravidla nevykazuje normální rozdělení a je charakteristický výraznou variabilitou, přistupuje se standardně k přepočtu na SCS, podle následujícího vzorce:

$$SCS = \log^2 (SCC / 100\,000) + 3$$

Z důvodu odstranění extrémních hodnot, byla před začátkem výpočtu stanovena podmínka, že zvířata v daný testovací den musela mít nádoj minimálně 6 kg mléka. Dále byla do výpočtu zahrnuta pouze zvířata s normovanou laktací, tedy dny v rozpětí 6 – 305 dní laktace. Do modelu byl zahrnut efekt věku při prvním otelení. Na základě této informace byly krávy rozděleny do 3 skupin: krávy s průměrnou hodnotou AFC  $\pm$  1 SD, krávy s prvním otelením  $>$  průměr + 1 SD a krávy s průměrem AFC  $<$  (průměr – 1 SD).

Pro statistickou analýzu byly použity následující smíšené lineární animal Test-day modely:

a) Opakované měření:

$$Y_{ijklmn} = \mu + SRO_i + Býk_j + Skupina\_věk_k + Lakt_l + b_{r(m)}X_r + SNP_n + e_{ijklmn}$$

b) Měření podle pořadí laktace:

$$Y_{ijkmn} = \mu + SRO_i + Býk_j + Skupina\_věk_k + b_{r(m)}X_r + SNP_n + e_{ijkmn}$$

kde,  $Y$  = sledovaná vlastnost (SCS);  $\mu$  = průměr populace;  $SRO_i$  = sdružený pevný efekt ité farmy – data kontroly ( $i = 1$  až 118);  $Býk_j$  = jtý pevný efekt otce krávy ( $j = 1$  až 27);  $Skupina\ věk_k$  = pevný efekt kté skupiny věku při 1. otelení ( $k = 3$ );  $Lakt_l$  = pevný efekt ltého pořadí laktace ( $l = 1$  až 3);  $b_{r(m)}$  = regresní koeficient na kontrolní den laktace (DIM), který popisuje laktační křivku;  $třidy_m = X_1 = 1, X_2 = DIM/c, X_3 = (DIM/c)^2, X_4 = \ln(c/DIM), X_5 = (\ln(c/DIM))^2, c = 305$ ;  $SNP_n$  = fixní efekt ntého genotypu SNP ( $n = 1$  až 3);  $e$  = vektor náhodných reziduí.

K vyhodnocení asociační studie byl vybrán vždy pouze ten model, který vykazoval nejnižší hodnotu Akaikeho Informačního Kritéria (Tabulka 5). Pro porovnání průměrů mezi jednotlivými skupinami genotypu bylo využito Bonferroniho korekce, která se k vyhodnocení zpravidla doporučuje a vyznačuje se svojí konzervativností.

V rámci asociační studie jsme se věnovali výsledkům v závislosti na pořadí laktace, tak i výsledkům z opakovaného měření, do kterého byla zahrnuta všechna pozorování a třídila se pouze v závislosti na genotypu. Cílem tohoto přístupu bylo popsat případnou změnu asociací v čase. Důvodem je, že s narůstajícím počtem laktací je mléčná žláza dojnic vystavena opakovaným expozicím patogenů a prochází dalšími náročnými procesy, jako je např. zasušování, období rozdojování a negativní energetické bilance. Avšak pro další šlechtění je důležité znát vliv jednotlivých genotypů na užitkovost krav jako komplexu a proto bylo do experimentu zahrnuto i opakované měření. Asociační studie nebyla provedena pro krávy na vyšší než 3. laktaci. Důvodem je, že s postupujícím časem vstupují do života krávy další faktory, které s narůstajícím počtem laktací je již velmi složité zohlednit. Proto se vyhodnocování vyšších laktací v literatuře nedoporučuje.

## 5. Výsledky a diskuze

### 5.1. Genotypové frekvence a genová vazba

Jelikož dosud nebyly u českého strakatého skotu popsány genotypové frekvence studovaných genů, byla nejprve provedena analýza genotypových frekvencí a Hardy-Weinbergovy (H-W) genetické rovnováhy (Tabulka 6). Jediný lokus, který vykazoval odklon od H-W genetické rovnováhy byl Leptin g.-963C>T ( $P < 0,005$ ); ostatní genotypové frekvence byly distribuovány v souladu s H-W genetickou rovnováhou.

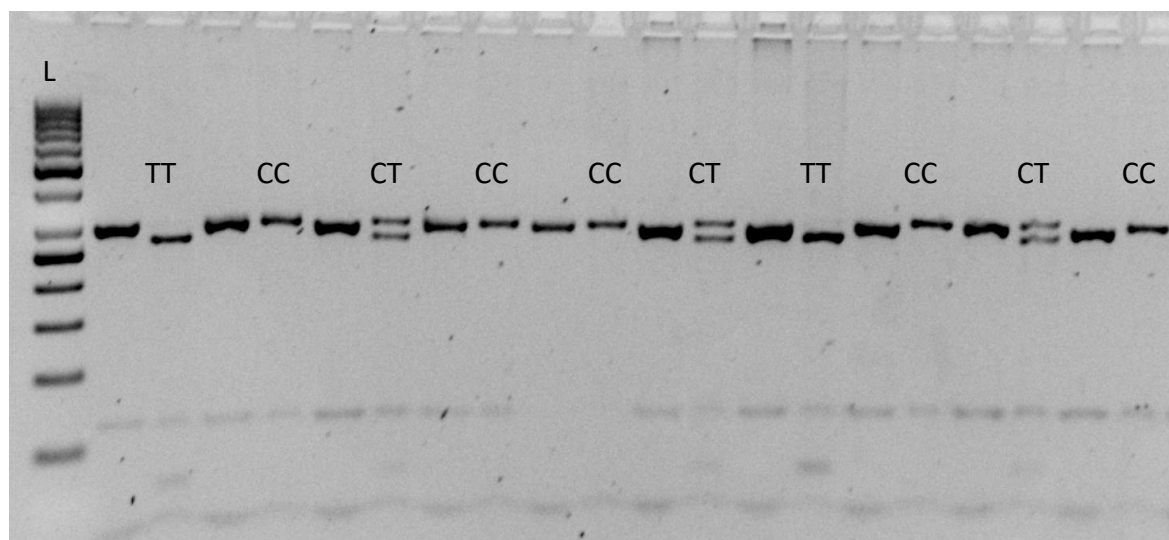
**Tabulka 6** Frekvence výskytu genotypů a alel u českého strakatého skotu

Gen	SNP	Pozorovaná frekvence				$X^2$
		Genotyp (n)		Alela		
<i>LEP</i>	g.-963C>T	<i>CC</i> (436)	0,64	<i>C</i>	0,79	7,79**
		<i>CT</i> (207)	0,30			
		<i>TT</i> (36)	0,06	<i>T</i>	0,22	
		Celkem (687)				
<i>LEP</i>	c.357C>T	<i>CC</i> (457)	0,58	<i>C</i>	0,77	1,38
		<i>CT</i> (290)	0,37			
		<i>TT</i> (44)	0,05	<i>T</i>	0,23	
		Celkem (783)				
<i>TLR4</i>	g.-226C>G	<i>CC</i> (265)	0,35	<i>C</i>	0,58	1,37
		<i>CG</i> (357)	0,46			
		<i>GG</i> (143)	0,19	<i>G</i>	0,42	
		Celkem (765)				
<i>CXCR1</i>	c.777C>G	<i>CC</i> (305)	0,40	<i>C</i>	0,62	0,66
		<i>CG</i> (352)	0,45			
		<i>GG</i> (115)	0,15	<i>G</i>	0,38	
		Celkem (772)				

$X^2$  – výsledek chí-kvadrát testu; \*\*  $P < 0,005$ ; *LEP* – Leptin, *TLR4* – Toll like receptor 4, *CXCR1* – Chemokinový receptor interleukinu 8 C-X-C motiv

Protože některé linie českého strakatého skotu jsou zařazeny mezi genetické zdroje (GZ), provedli jsme rovněž základní populační analýzu mezi populací krav z GZ ( $n = 45$ ) a z produkčních stád ( $n = 650$ ), které byly studovány v rámci disertační práce. Cílem této studie byl gen Leptin promotorová oblast g.-963C>T (Obrázek 1). Nejčastějším genotypem v produkční populaci byl genotyp *CC* (64 %), zatímco v populaci GZ se nejčastěji vyskytoval genotyp *CT* (48 %). Rozdělení genotypů bylo dále testováno podle H-W zákona. Jak již bylo uvedeno výše, zvířata z produkční populace byla z této rovnováhy vychýlena, naopak populace GZ se v H-W rovnováze nacházela. Jelikož Leptin oblast g.-963C>T nebyla u českého strakatého skotu dosud studována, není možné zjištěné frekvence porovnat s dalšími autory. V Tabulce 7 jsme však shromáždili průřez genotypovými frekvencemi tohoto SNP u jiných plemen, které byly v posledních letech publikovány. Ze zjištěných informací je zřejmé, že se genotypové frekvence studovaného SNP v rámci jednotlivých plemen liší. Předpokládáme, že důvodem těchto rozdílů je především odlišný užitkový typ plemene a tudíž i směr šlechtění. Avšak nejčastější pozorovanou alelou byla ve všech případech alela *C*, která je v literatuře spojována především s vyšší mléčnou užitkovostí (Giblin et al., 2010; Matteis et al., 2012), což je v souladu s trendem zvyšování dojivosti krav a to i u českého strakatého skotu. Častější výskyt alely *C*, a genotypu *CC*, v produkční populaci, stejně tak jako odklon od H-W rovnováhy, může naznačovat nepřímý selekční tlak na tento polymorfismus.

**Obrázek 1** Ukázka výsledků genotypování metodou PCR-RFLP, gen Leptin oblast g.-963C>T



L – marker 50 bp, neoznačené pozice - PCR produkt

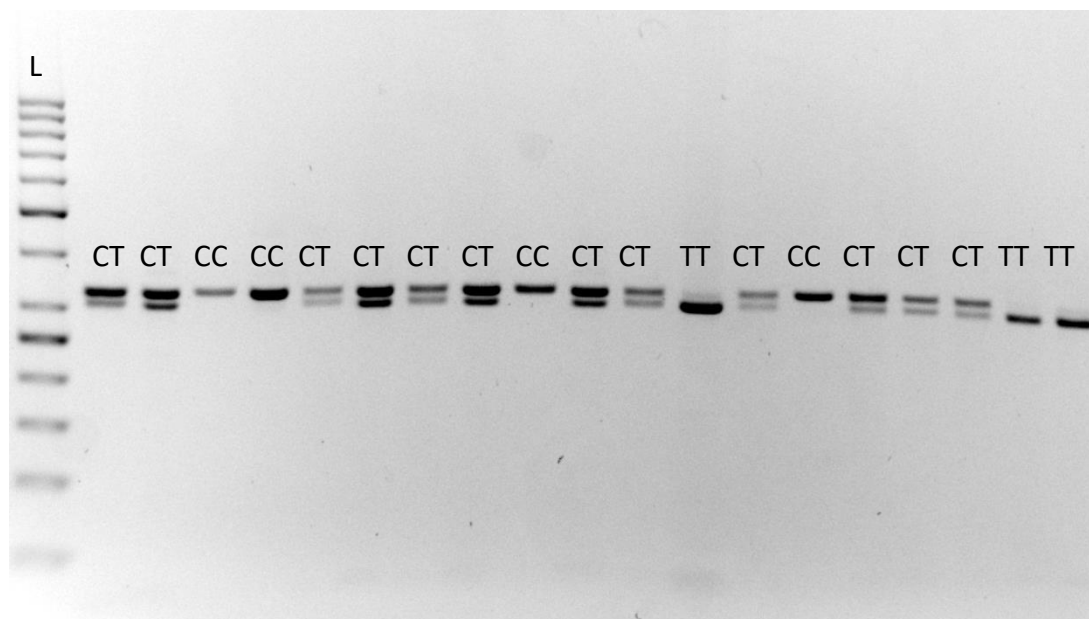
**Tabulka 7** Frekvence alel a genotypů u dojných plemen skotu v oblasti Leptin g.-963C>T

Plemeno	Genotypové frekvence (%)			Frekvence alel (%)		Reference	Země původu
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>		
Holštýn	44	45	13	65	35	Banos et al. (2008)	Skotsko
Holštýn	28	55	17	56	44	Komisarek (2010)	Polsko
Holštýn	39	47	16	61	39	Glantz et al. (2012)	Švédsko
Holštýn	37	47	16	60	40	Clempson et al. (2011a)	Velká Británie
Jersey	66	34	0	83	17	Komisarek a Antkowiak (2007)	Polsko
Holštýn	38	40	22	58	42	Kadlecova et al. (2014)	Česká republika

Další rozdíly mezi populacemi jsme pozorovali i v úrovni heterozygotnosti, kterou jsme porovnávali pomocí fixačního indexu. V produkční populaci jsme zjistili úbytek heterozygotů, a to až 11 % oproti očekávaným hodnotám, populace GZ však prezentovala přebytek heterozygotů až o 24 % oproti očekávání na základě H-W rovnováhy. V rámci zjišťování základních populačních údajů jsme zjistili např. hodnotu polymorfního informačního obsahu a provedli analýzu molekulárního rozptylu. Podrobnější výsledky i metodika zpracování jsou prezentovány v publikaci Jecminkova et al. (2016). Závěrem lze konstatovat, že v populaci GZ jsme, navzdory nízkému počtu zvířat, pozorovali vyšší genetickou variabilitu než v populaci produkčních krav.

U genu Leptin v oblasti c.357C>T (Obrázek 2) byly u holštýnského skotu popsány obdobné genotypové frekvence (Liefers et al., 2002; Clempson et al., 2011b; Glantz et al., 2012), jako jsme pozorovali u českého strakatého skotu (Tabulka 6). Charakteristická pro tento SNP je nízká frekvence genotypu *TT*, který je spojován s nižší dojivostí krav (Clempson et al., 2011b) a nižším obsahem SCC (Glantz et al., 2012).

**Obrázek 2** Ukázka výsledků genotypování metodou PCR-RFLP, gen Leptin oblast c.357C>T



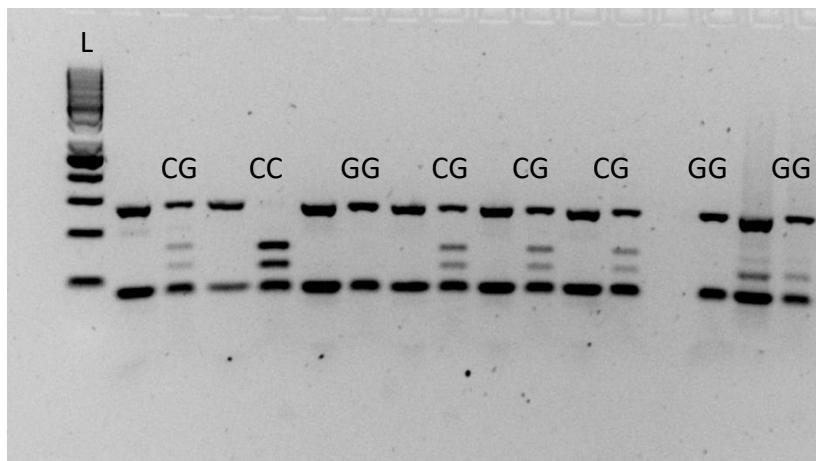
L – marker 50 bp

Jelikož byly studovány dva SNP na stejném chromozomu (Leptin c.357C>T a Leptin g.-963C>T), provedli jsme analýzu vazby mezi oběma SNP. V rámci studovaných SNP u genu Leptin byla pozorována vazbová rovnováha ( $D = 0,046$ ;  $P < 0,001$ ) a proto byl každý SNP studován samostatně.

U genu *TLR4* (Obrázek 3) byly publikovány frekvence alel u plemene mόνtbeliard, které odpovídají rozložení, které jsme pozorovali v našem souboru (Tabulka 6). Podle Carvajal et al. (2013) byla u plemene mόνtbeliard frekvence alely C 55 % a alely G 45 %. Obdobné genotypové frekvence, jako u českého strakatého skotu popsali rovněž de Mesquita et al. (2012) a Wojdak-Maksymiec et al. (2015) u holštýnského skotu. Mutaci v promotorové oblasti genu *TLR4* studovali rovněž Sharma et al. (2006), kteří uvádějí nejčastější výskyt heterozygotů (50 %) a dále homozygotů GG (35 %), což se od našeho pozorování liší. V našem pozorování byl častějším genotypem homozygot CC (35 %). Carvajal et al. (2013) rovněž prezentovali frekvence alel u plemene jersey, kdy bylo možno pozorovat převahu alely C (79 %), avšak ve studovaném souboru se nacházelo pouze 28 zvířat.

Toto zjištění může být v důsledku nízkého počtu zvířat zatíženo chybou a bylo by vhodné provést další sledování na větším počtu zvířat.

**Obrázek 3** Ukázka výsledků genotypování metodou PCR-RFLP, gen *TLR4* g.-226C>G



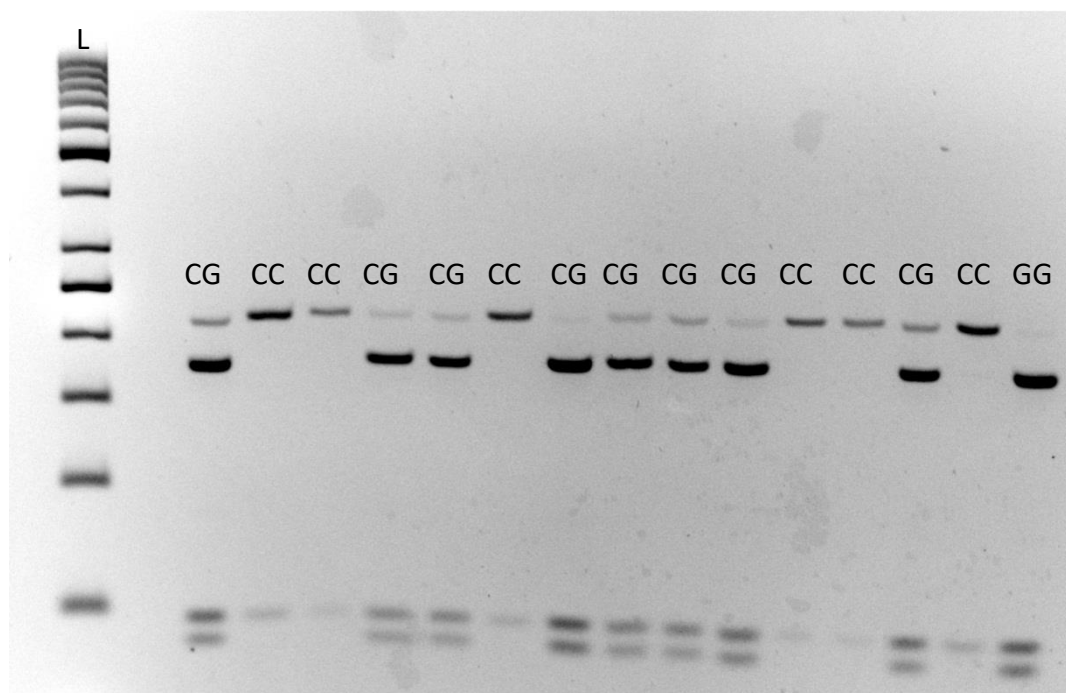
L – marker 50 bp, neoznačené pozice – PCR produkt

Gen *CXCR1* (Obrázek 4) byl taktéž studován u plemene mόνtbeliard (Beecher et al., 2010) nebo u holštýnských býků v Kanadě (Leyva-Baca et al., 2008), kdy byly zjištěny genotypové frekvence obdobné jako v našem souboru u českého strakatého skotu (Tabulka 6). U holštýnských krav v Polsku však byl pozorován nejnižší výskyt genotypu *CC*, pouze 0,36 %, a to ve prospěch genotypu *GG*, který byl přítomen u 44 % krav (Pawlik et al., 2015). Beecher et al. (2010) zjišťovali genotypové frekvence i u plemene jersey, které se výrazně liší od rozložení genotypů u kombinovaných plemen s převahou genotypu *GG* (62 %) a nejnižší pozorovanou frekvencí genotypu *CC* (13 %).

Rozdílné rozložení genotypů všech studovaných SNP u plemene jersey, si vysvětlujeme především úzkým zaměřením šlechtění na obsah složek v mléce a převážně čistokrevnou plemenitbou v historii plemene (Jersey, 2017). Tyto poznatky podporuje i populační studie (Wiener et al., 2004), ve která bylo zjištěno, že plemeno jersey nevytváří společný klastř s mléčnými plemeny holštýn a airshire, ale poněkud překvapivě s plemenem dexter.



**Obrázek 4** Ukázka výsledků genotypování metodou PCR-RFLP, gen *CXCR1* c.777C>G



L – marker 50 bp

## **5.2. Asociační studie ve vztahu k plodnosti**

Předkládané výsledky mapují vztah mezi ukazateli plodnosti u krav českého strakatého skotu a geny *Leptin*, *TLR4* a *CXCR1*. Popsané asociace jsou poprvé prezentovány jak u českého strakatého skotu, tak ve vztahu genů pro imunitní systém k reprodukci skotu.

### **Leptin g.-963C>T**

V genu *Leptin* byly studovány dva SNP. V promotorové oblasti g.-963C>T jsme pozorovali asociaci s AFC (Tabulka 8). Krávy s genotypem *TT* se otelily o 24 dní dříve, než zvířata s genotypem *CC* ( $P = 0,031$ ) a o 22 dní dříve, než s genotypem *CT* ( $P = 0,069$ ). Dále jsme pozorovali pozitivní vliv genotypu *CT* na délku servis periody, kdy krávy s heterozygotním genotypem vykazovaly kratší DO než krávy s genotypem *CC* ( $P = 0,052$ ). Příznivý vliv alely *T* na délku servis periody a mezidobí popsali například Clempson et al. (2011b). Vztah genotypu g.-963C>T k CLI se v naší studii nepodařilo prokázat, a to ani při opakovaném měření či

v závislosti na laktaci. Clempson et al. (2011b) dále popisují vztah genotypu *CC* ke sníženému procentu březích krav ve 100 dnech laktace. Popsané výsledky se shodují i s naším pozorováním, kdy krávy s genotypem *CC* vykazovaly nejnižší PR ( $P = 0,091$ ). Ačkoli neprůkazný, pozorovali jsme taktéž nejvyšší PR u genotypu *TT* v průběhu 1. a 2. laktace. Promotorové oblasti Leptinu se věnovali také Giblin et al. (2010), kteří neprokázali asociaci SNP g.-963C>T ke studovaným vlastnostem, avšak spojují alelu *T* s nižší obtížností telení a kratší gestační periodou. U plemene jersey se v promotorové oblasti Leptinu taktéž nepodařilo potvrdit asociace s plodností (Komisarek a Antkowiak, 2007; Komisarek, 2010).

Pozitivní vliv alely *T* byl prokázán ve vztahu k příjmu sušiny a energetické bilanci krav, na druhou stranu je alela *T* spojována s pozdějším nástupem říje po otelení (Liefers et al., 2005). Naše výsledky naopak naznačují pozitivní vliv genotypu *TT* na věk při 1. otelení a servis periodu. To může znamenat, že se první říje vyskytuje později, ale zapuštění je úspěšné, což dokládá i vyšší PR u genotypu *TT*. Tento pozitivní trend může vycházet ze zjištění, že alela *T* je spojována s vyšším příjmem sušiny a proto zvířata mohou více růst a lépe zvládat období negativní energetické bilance (Liefers et al., 2005). Tato zjištění jsou v souvislosti se zjištěnými asociacemi s AFC, PR a DO. V literatuře je genotyp *CC* spojován s vyšší dojivostí (Clempson et al., 2011b) a negativní vliv tohoto genotypu na reprodukci je v souladu s dnešním poznáním antagonistického vztahu mezi produkcí a reprodukcí.

**Tabulka 8** Asociace SNP k plodnosti při opakovaném měření. Statisticky významné efekty studovaných SNP a jejich genotypů ( $P < 0,05$ ) jsou vyznačeny tučně, tendence pro asociaci ( $0,05 < P < 0,1$ ) jsou podtrženy.

Gen Genotyp	Vlastnosti <sup>1</sup>				
	AFC <sup>2</sup>	CFI <sup>2</sup>	DO <sup>2</sup>	CLI <sup>2</sup>	PR (%) <sup>3</sup>
<i>LEP</i> g.-963C>T					
<i>CC</i>	<b>860 (852,9; 868,3)<sup>a, C</sup></b>	69 (67,8; 72,0)	<u>98 (93,5; 104,0)<sup>A</sup></u>	391 (385,5; 397,3)	<u>52,1 ± 2,2<sup>A</sup></u>
<i>CT</i>	<u>858 (848,8; 868,4)<sup>b, D</sup></u>	68 (66,0; 70,7)	<u>92 (87,1; 98,3)<sup>A</sup></u>	388 (381,7; 395,1)	<u>58,6 ± 2,7<sup>A</sup></u>
<i>TT</i>	<b>836 (818,0; 854,7)<sup>a, D</sup></b>	71 (67,2; 75,8)	93 (84,6; 103,7) <sup>B</sup>	389 (378,7; 401,2)	59,7 ± 2,7 <sup>B</sup>
<i>LEP</i> c.357C>T					
<i>CC</i>	857 (850,0; 865,8)	69 (67,5; 71,6)	95 (90,1; 100,4)	390 (384,3; 395,9) <sup>B</sup>	56,7 ± 2,1
<i>CT</i>	860 (851,9; 869,3)	68 (66,8; 71,0)	96 (91,4; 102,2)	<u>389 (383,9; 395,8)<sup>A</sup></u>	53,2 ± 2,3
<i>TT</i>	854 (834,1; 875,4)	70 (65,9; 74,8)	103 (92,2; 115,4)	<u>401 (390,0; 413,6)<sup>A</sup></u>	47,8 ± 5,7
<i>TLR4</i> g.-226C>G					
<i>CC</i>	853 (844,4; 862,7)	69 (66,7; 71,3)	98 (92,3; 104,0)	<b>393 (387,1; 400,0)<sup>a</sup></b>	52,3 ± 2,5
<i>CG</i>	863 (855,8; 872,2)	68 (66,8; 71,0)	93 (88,7; 99,0)	<b>387 (381,3; 393,0)<sup>a</sup></b>	58,1 ± 2,2
<i>GG</i>	855 (844,2; 867,1)	70 (68,0; 73,2)	98 (91,9; 104,9)	391 (384,3; 398,2) <sup>b</sup>	52,1 ± 3,1
<i>CXCR1</i> c.777C>G					
<i>CC</i>	860 (851,4; 869,1)	69 (66,8; 71,2)	95 (90,3; 101,3)	389 (383,8; 395,9)	55,5 ± 2,4
<i>CG</i>	860 (852,4; 869,5)	69 (67,3; 71,6)	94 (89,7; 100,3)	388 (383,0; 394,9)	55,8 ± 2,2

Gen	Vlastnosti <sup>1</sup>				
	AFC <sup>2</sup>	CFI <sup>2</sup>	DO <sup>2</sup>	CLI <sup>2</sup>	PR (%) <sup>3</sup>
GG	850 (838,7; 863,2)	69 (66,2; 71,9)	96 (90,1; 104,3)	393 (395,9; 401,9)	53,6 ± 3,5

Hodnoty pro různé genotypy v rámci stejného SNP označené stejným písmenem se po Bonferroniho korekci významně liší. Malá písmena označují rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$ , velká písmena označují tendenci pro významnost v intervalu  $0,05 < P < 0,1$ .

<sup>1</sup>Vlastnosti: AFC – věk při 1. otelení; CFI – inseminační interval; DO – servis perioda; CLI – mezidobí; PR – % březích po 1. inseminaci.

<sup>2</sup>LSM (95% interval spolehlivosti)

<sup>3</sup>LSM ± střední chyba průměru

**Tabulka 9** Vztah studovaných SNP k ukazatelům plodnosti, v závislosti na pořadí laktace. Statisticky významné efekty studovaných SNP a jejich genotypů ( $P < 0,05$ ) jsou vyznačeny tučně, tendence pro asociaci ( $0,05 < P < 0,1$ ) jsou podtrženy.

Vlastnosti <sup>1</sup>	Genotyp											
	<i>LEP</i> g.-963C>T			<i>LEP</i> c.357C>T			<i>TLR4</i> g.-226C>G			<i>CXCR1</i> c.777C>G		
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>
CFI <sup>2</sup>												
1. laktace	70 (67,1; 73,9)	69 (66,1; 74,0)	73 (66,9, 81,5)	70 (67,1; 73,8)	69 (66,4; 73,0)	68 (61,8; 76,4)	69 (66,2; 73,6)	69 (66,3; 72,9)	71 (67,1; 75,7)	69 (66,0; 73,1)	69 (66,6; 73,2)	70 (65,7; 75,1)
2. laktace	72 (70,2; 75,2)	70 (67,7; 73,5)	70 (65,2, 75,3)	70 (68,4; 73,4)	71 (69,2; 74,3)	76 (70,7; 83,4)	70 (67,7; 73,4)	71 (68,9; 74,1)	72 (69,3; 76,2)	72 (69,4; 74,8)	71 (69,1; 74,2)	68 (65,1; 72,3)
3. laktace	73 (69,7; 76,7)	71 (67,6; 75,8)	78 (70,6, 87,2)	73 (70,0; 76,9)	72 (69,2; 76,2)	74 (66,9; 83,4)	73 (69,7; 77,7)	73 (69,7; 76,7)	72 (68,3; 77,4)	72 (68,9; 76,3)	72 (69,2; 76,1)	74 (69,2; 79,9)
CLI <sup>2</sup>												
2. laktace	388 (381,8; 394,4)	390 (382,6; 397,9)	391 (378,8,405,5)	388 (381,8; 394,7)	387 (381,2; 394,0)	394 (379,8; 409,5)	392 (385,1; 399,3)	385 (379,6; 392,3)	387 (379,5; 395,9)	388 (381,4; 394,8)	385 (379,6; 392,4)	395 (386,0; 404,6)
3. laktace	389 (382,0; 396,3)	385 (377,6; 394,4)	379 (365,0,394,6)	<b>386 (379,5; 392,9)<sup>a</sup></b>	<b>387 (380,4; 394,4)<sup>b</sup></b>	<b>408 (392,5; 424,6)<sup>a,b</sup></b>	<u>392 (384,7; 399,9)<sup>A</sup></u>	<u>383 (377,1; 390,5)<sup>A</sup></u>	386 (377,6; 395,0) <sup>B</sup>	387 (380,2; 394,8)	387 (380,8; 394,8)	387 (377,3; 397,4)
DO <sup>2</sup>												
1. laktace	95 (89,1; 103,0)	92 (84,8; 100,2)	91 (79,0, 105,8)	93 (86,8; 100,6)	94 (87,7; 101,5)	103 (87,5; 121,1)	96 (88,7; 104,5)	92 (86,1; 99,6)	96 (87,8; 105,8)	95 (87,7; 102,8)	92 (85,6; 99,2)	98 (88,4; 108,7)
2. laktace	98 (92,3; 105,1)	94 (87,4; 102,2)	91 (79,6, 105,1)	<b>94<sup>a</sup></b> <b>(88,7; 101,3)</b>	<b>95<sup>b</sup></b> <b>(89,2; 102,1)</b>	<b>116<sup>ab</sup></b> <b>(100,0;136,6)</b>	97 (90,9; 105,3)	92 (86,8; 99,2)	97 (88,8; 105,9)	96 (90,0; 103,7)	95 (89,1; 101,9)	94 (85,4; 104,1)
3. laktace	99 (92,0; 108,2)	94 (85,6; 103,8)	102 (85,3, 122,4)	96 (88,8; 104,3)	102 (94,8; 111,8)	87 (71,4; 106,5)	98 (89,6; 107,9)	100 (92,6; 109,5)	98 (88,8; 110,2)	96 (88,8; 105,7)	99 (91,5; 107,6)	98 (86,9; 111,2)
PR <sup>3</sup>												
1. laktace	47,2 ± 3,7	53,9 ± 4,6	61,8 ± 8,8	<u>53,8 ± 3,5<sup>A</sup></u>	49,7 ± 3,8 <sup>B</sup>	<u>32,3 ± 8,8<sup>A</sup></u>	47,8 ± 4,3 <sup>B</sup>	<u>55,4 ± 3,5<sup>A</sup></u>	<u>43,5 ± 5,1<sup>A</sup></u>	52,7 ± 3,8	53,3 ± 3,6	43,0 ± 5,7
2. laktace	54,1 ± 4,0	59,3 ± 5,0	67,5 ± 8,5	57,0 ± 3,8	57,7 ± 4,2	47,0 ± 9,9	52,2 ± 4,6	61,5 ± 3,9	57,4 ± 5,5	55,5 ± 4,3	57,8 ± 3,9	56,3 ± 6,2
3. laktace	60,0 ± 4,2	64,1 ± 5,0	49,3 ± 10,6	62,1 ± 3,8	52,0 ± 4,6	68,5 ± 10,1	60,0 ± 4,8	58,8 ± 4,1	57,4 ± 5,7	59,6 ± 4,5	58,4 ± 4,2	62,4 ± 6,3

Hodnoty pro různé genotypy v rámci stejného SNP označené stejným písmenem se po Bonferroniho korekci významně liší. Malá písmena označují rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$ , velká písmena označují tendenci pro významnost v intervalu  $0,05 < P < 0,1$ .

<sup>1</sup>Vlastnosti: CFI – inseminační interval; DO – servis perioda; CLI – mezidobí; PR – % březích po 1. inseminaci.

<sup>2</sup>LSM (95% interval spolehlivosti)

<sup>3</sup>LSM ± střední chyba průměru

### ***Leptin c.357C>T***

V oblasti c.357C>T genu Leptin byl pozorován vztah genotypu k DO, CLI i PR. Naopak jsme nepozorovali vztah genotypu c.357C>T k AFC, který byl v literatuře asociován s pozitivním vlivem genotypu *TT* (Clempton et al., 2011b). Uvedené mutaci se rovněž věnovali Leifers et al. (2002), kteří pozorovali vyšší koncentraci leptinu v krvi krav těsně před otelením. Díky tomu je možné uvažovat o vyšším příjmu krmiva u krav s genotypem *TT*. Avšak právě u dojníc s homozygotním genotypem *TT* byly pozorovány horší parametry reprodukce. Tyto dojnice například v opakovaném měření vykazovaly tendenci pro delší CLI než heterozygoti *CT* ( $P = 0,094$ ) a homozygoti *CC* ( $P = 0,116$ ). Negativní efekt genotypu *TT* na CLI byl potvrzen ve 3. laktaci (Tabulka 9). V porovnání s genotypem *CC* a *CT* vykazovaly krávy s genotypem *TT* významně delší mezidobí ( $P = 0,01$ , respektive  $P = 0,024$ ). Naopak pozitivní vliv genotypu *TT* na mezidobí pozoroval u krav plemene jersey Komisarek a Antkowiak (2007). Tito autoři také popisují pozitivní vliv genotypu *TT* na DO, což rovněž nekoresponduje s naším pozorováním. V průběhu 2. laktace vykazovaly dojnice s genotypem *TT* nejdelší mezidobí v porovnání s genotypem *CC* nebo *CT* ( $P = 0,019$ , respektive  $P = 0,027$ ). Vztahu genotypu c.357C>T k ukazatelům reprodukce se u holštýnského skotu věnovali Yazdani et al. (2010) nebo u masného skotu Almeida et al. (2003), kteří nenalezli vztah mezi touto mutací a délkou servis periody nebo mezidobí. Tendenci pro asociaci jsme pozorovali u PR, které bylo na 1. laktaci vyšší u krav s genotypem *CC* v porovnání s genotypem *TT* ( $P = 0,085$ ). Asociaci mutace c.357C>T k ukazatelům plodnosti se rovněž nepodařilo potvrdit Giblin et al. (2010), avšak autoři popisují negativní vliv alely *T* na přežitelnost krav. Právě horší plodnost homozygotů *TT* může být důvodem k předčasnému vyřazení krav, které mají až 1,83 krát větší pravděpodobnost vyřazení než krávy s genotypem *CC* (Szyda et al., 2011).

### ***TLR4 g.-226C>G***

V rámci asociační studie byl nalezen vztah genotypu g.-226C>G k délce mezidobí a PR (Tabulka 9). Heterozygotní krávy *CG* vykazovaly na 3. laktaci kratší CLI než dojnice s genotypem *CC* ( $P = 0,059$ ). Toto zjištění bylo dále potvrzeno při opakovaném měření (Tabulka 8), kdy dojnice s genotypem *CG* měly průkazně kratší délku mezidobí než homozygoti *CC* ( $P = 0,029$ ). Trend pro lepší výsledky reprodukce jsme zaznamenali opět u heterozygotů *CG* v opakovaném měření u

vlastnosti PR při opakovaném měření ( $P = 0,101$ ) a také v průběhu 1. laktace ( $P = 0,960$ ). Podle Herath et al. (2009) mohou krávy dosáhnout dobré plodnosti díky omezení imunitní odpovědi v 1. týdnu po otelení. Doba po otelení je kritickým obdobím, kdy v průběhu porodu mohly do pohlavních orgánů proniknout bakterie, avšak u zvířat s výraznou imunitní odpovědí může dojít k chronickému zánětu nebo zhoršení právě reprodukčních funkcí. Protože krávy s genotypem *GG* mají významně vyšší úroveň exprese genu *TLR4* (Sharma et al., 2008), může být jejich reprodukce snížena. V našem sledování nejlepší parametry reprodukce vykazovaly dojnice *CG*, které vykazují střední úroveň exprese (Sharma et al., 2008) a mohou produkovat optimální množství protilátek proti gramnegativním bakteriím. Nakonec ani genotyp *CC* nevynikal dobrou reprodukcí a podle studie exprese tohoto genu tento genotyp vykazoval nejnižší úroveň exprese (Sharma et al., 2008), možná tak nízké, že organismus obtížně bojuje s infekcí.

### ***CXCR1 c.777C>G***

Množství studií popisuje asociaci mutace *c.777C>G* na doживost krav nebo zdraví vemene, nicméně studie věnující se vztahu tohoto SNP k plodnosti krav téměř chybí. Pouze Galvao et al. (2011) studoval vliv tohoto SNP na metritidu, endometritidu a zadržení lůžka, avšak bez významné asociace s uvedenými vlastnostmi. Jejich sledování ale bylo provedeno pouze na 350 dojnicích, které byly chovány celkem na 23 farmách. Proto mohlo být vyhodnocení asociace ovlivněno nesystematickými vlivy, které je nesnadné ve výpočtu zohlednit. V našem sledování jsme nezjistili statistický významný vztah mezi mutací *c.777C>G* a ukazateli reprodukce. Na základě studií, které byly prováděny ve vztahu ke zdraví vemene, je možné uvažovat o vyšší rezistenci vůči infekcím u krav s genotypem *GG*. Předpokládáme také, že vyšší odolnost krav by zkrátila i jejich mezidobí, což se v našem sledování nepodařilo potvrdit. Bohužel dosud nebyla provedena obdobná studie, proto není možné zjištěné výsledky porovnat. Je proto nezbytné provést další sledování a to jak ve vztahu genu *CXCR1* k plodnosti krav českého strakatého, tak u dalších plemen skotu.



### 5.3. Asociační studie ke skóre somatických buněk v mléce

#### Leptin g.-963C>T

Provedená asociační studie neprokázala vztah promotorové oblasti genu Leptin k SCS v mléce (Tabulka 10). Na třetí laktaci jsme pozorovali v průměru nejvyšší SCS u skupiny krav s genotypem *TT*, avšak předpokládáme, že díky vysoké variabilitě, nebyl tento rozdíl statisticky průkazný. Promotorová oblast genu Leptin je v literatuře spojována s množstvím i kvalitou mléka (Giblin et al., 2010; Glantz et al., 2012), tak i energetickou bilancí, příjmem krmiva (Liefers et al., 2005) a plodností (Clempson et al., 2011b). Vztahu vybrané promotorové oblasti k SCS se věnovali i další autoři (Giblin et al., 2010; Komisarek, 2010), ale stejně jako v naší studii se vztah tohoto SNP nepodařilo prokázat. Jistou tendenci ve prospěch alely *T* pozorovali (Glantz et al., 2012), avšak pracovali s obsahem somatických buněk, tedy netransformovanými hodnotami. Přesto, že leptin patří mezi cytokiny a předpokládá se, tedy jeho působení v průběhu zánětu (Procaccini et al., 2017), jeho koncentrace v krvi se při mastitidě nemění (Soliman et al., 2002). Tudíž ani možné ovlivnění exprese tohoto genu díky přítomnosti SNP v promotorové oblasti nehraje, v závislosti k onemocnění vemene, potažmo SCS, významnou roli.

#### Leptin c.357C>T

Průkazné rozdíly mezi genotypy jsme nepozorovali ani v kódující oblasti tohoto genu. Szyda et al. (2011) popisují vyšší riziko vyřazení u krav s genotypem *TT*, avšak na základě námi zjištěných výsledků uvažujeme, že spíše než zhoršení zdravotního stavu mléčné žlázy může být důvodem tohoto rizika zhoršení plodnosti těchto zvířat. Negativní vliv alely *T* na přežití ve stádě uvádějí i Giblin et al. (2010), avšak ve svojí práci stejně jako Szyda et al. (2011) nezmiňují důvod vyřazení zvířat. Dále byl popsán negativní vliv genotypu *TT* na kvalitu i kvantitu mléka (Kulig et al., 2009), ale nepodařilo se prokázat vztah tohoto polymorfismu k obsahu somatických buněk nebo SCS u krav plemene holštýn, ani jersey (Giblin et al., 2010; Kulig et al., 2010). Ojedinělou studii, popisující vztah alely *T* k obsahu somatických buněk, přináší Glantz et al. (2012), avšak jejich závěry nebyly dalšími pracemi potvrzeny.

**Tabulka 10** Výsledky asociační studie pro skóre somatických buněk (SCS). Statisticky významné efekty studovaných SNP a jejich genotypů ( $P < 0,05$ ) jsou vyznačeny tučně, tendence pro asociaci ( $0,05 < P < 0,1$ ) jsou podtrženy.

Pořadí laktace	<i>LEP</i> g.-963C>T			<i>LEP</i> c.357C>T			<i>TLR4</i> g.-226C>G			<i>CXCR1</i> c.777C>G		
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>	<i>CC</i>	<i>CG</i>	<i>GG</i>
1	2,97±0,18	2,88 ±0,21	2,69 ±0,35	2,97± 0,18	2,87± 0,19	2,86 ±0,34	<u>2,89±0,19<sup>B</sup></u>	<u>3,08±0,18<sup>A</sup></u>	<u>2,65±0,22<sup>A</sup></u>	2,97 ±0,19	2,70 ±0,19	2,80 ±0,25
2	3,57±0,22	3,37 ±0,31	3,38 ±0,64	3,59 ±0,23	3,69 ±0,23	3,59 ±0,52	3,68±0,24	3,73±0,25	3,52±0,27	3,78 ±0,25	3,53 ±0,23	3,84 ±0,34
3	3,90 ±0,22	3,78 ±0,30	4,69 ±0,60	3,44 ±0,76	3,28 ±0,77	3,66±0,85	<b>3,56±0,74<sup>a</sup></b>	<b>3,49±0,75<sup>a,b</sup></b>	<b>2,68±0,77<sup>b</sup></b>	3,22 ±0,77	3,25 ±0,76	3,57 ±0,80
Opakované měření	3,33 ±0,15	3,16 ±0,19	3,11 ±0,31	3,28 ±0,15	3,28 ±0,16	3,28 ±0,28	3,32±0,16 <sup>b</sup>	<b>3,41±0,16<sup>a</sup></b>	<b>2,96±0,18<sup>a</sup></b>	3,27 ±0,16	3,13 ±0,16	3,23 ±0,21

Hodnoty pro různé genotypy v rámci stejného SNP označené stejným písmenem se po Bonferroniho korekci významně liší. Malá písmena označují rozdíl na hladině významnosti  $P < 0,05$ , velká písmena označují tendenci pro významnost v interval  $0,05 < P < 0,1$ .

### ***TLR4 g.-226C>G***

Gen *TLR4* je v literatuře obvykle spojován se zdravím vemene a imunitní odpovědí skotu, bohužel výsledky jednotlivých pozorování jsou často nejednotné. V naší studii jsme pozorovali na první laktaci tendenci ( $P = 0,085$ ) genotypu *GG* pro nižší skóre somatických buněk v porovnání s heterozygoty. Na třetí laktaci tento trend nabyl průkazných hodnot a to jak v porovnání s genotypem *CG* ( $P = 0,011$ ), tak genotypem *CC* ( $P = 0,011$ ). Nižší SCS u genotypu *GG* jsme pozorovali rovněž u opakovaného měření ( $P = 0,016$ ) v porovnání s heterozygotem *CG* (Tabulka 10). Například Sharma et al. (2006) popisují vztah alely *C* (při konstrukci haplotypů) k vyššímu počtu SCS a vliv genotyp *CC* na snížení plemenné hodnoty pro perzistenci laktace u holštýnských býků. S našimi výsledky koresponduje také práce Wojdak-Maksymiec et al. (2015) kteří spojují nižší SCS s alelou *G*. Tato alela je dále spojována s vyšší odolností vůči infekci způsobené *Mycobacterium avium* ssp. *Paratuberculosis* (Ruiz-Larranaga et al., 2011). Dále bylo zjištěno, že tento SNP ovlivňuje expresi *TLR4*, přičemž nejvyšší úroveň exprese vykazoval genotyp *GG* (Sharma et al., 2008). Předpokládá se, že důvodem může být ovlivnění vazby a interakce mezi transkripčními faktory, které expresi ovlivňují. Popsané výsledky tedy mohou naznačovat pozitivní vliv alely *G* na zdraví mléčné žlázy krav.

### ***CXCRI c.777C>G***

V našem sledování se nepodařilo prokázat vztah mezi SNP *c.777C>G* a skórem somatických buněk. Rozdíly nebyly pozorovány v závislosti na pořadí laktace, ani v opakovaném měření. Naopak například Youngerman et al. (2004) popsali vztah tohoto SNP k SCS. Přesto, že je SCS geneticky korelováno s klinickou mastitidou a je užíváno jako indikátor mastitidy, nepodařilo se vztah genotypu k SCS potvrdit ani v řadě dalších studií (Leyva-Baca et al., 2008; Goertz et al., 2009; Zhang et al., 2012; Pawlik et al., 2015). Naopak se vyskytují práce popisující vztah tohoto SNP k výskytu mastitidy, například vyšší výskyt onemocnění u genotypu *GG* a nižší doживost u krav s tímto genotypem (Galvao et al., 2011). Obdobnou studii provedli Bagheri et al. (2016), kteří však popisují alelu *G* jako rezistentní vůči mastitidě. Jejich výsledky potvrzují Verbeke et al. (2014), kteří pozorovali nižší výskyt klinické mastitidy po infekci *Staphylococcus aureus* a také vyšší doживost u krav s genotypem *GG* v porovnání s homozygoty *CC*. Dále bylo zjištěno, že doживnice s genotypem *GG* vykazují vyšší množství transkriptů 24 hodin po záměrné infekci *Streptococcus*

*dysgalactiae* ssp. *Dysgalactiae* v porovnání s genotypem *CC* (Beecher et al., 2012). Předpokládá se tedy, že tyto odlišnosti mohou způsobovat rozdílnou závažnost onemocnění u jednotlivých zvířat, avšak dosavadní výsledky asociačních studií nejsou jednoznačné.

## 6. Závěry a doporučení pro praxi a další rozvoj vědního oboru

Nízká úroveň reprodukce a zdraví zvířat je jedním z nejčastějších důvodů pro nedobrovolné vyřazení krav. Zhoršená reprodukce má značně negativní vliv na ekonomiku chovu a to díky několika faktorům. Zvýšené náklady díky nevyhovující reprodukci jsou spojené především s vyšší spotřebou inseminačních dávek, delším mezidobím, které je spojené se snížením celoživotní užitkovosti, zvýšením nákladů na krmení zvířat, nižší produkcí telat a tím spojenými problémy s uzavřeným obratem stáda. Pro zlepšení plodnosti krav se někdy používá aplikace pohlavních hormonů, jejich použití je v dnešní době, kdy čelíme kontaminaci prostředí hormony velice diskutabilní. Aktuálním problémem je také narůstající rezistence vůči antibiotikům. V případě, že zvířata budou více odolná infekčnímu tlaku z okolí, je možné předpokládat, že bude možné snížit spotřebu antibiotik i dalších léčiv, které jsou nezbytné při léčení onemocnění vemene. Díky nalezení genetických variant, které jsou výhodnější z hlediska plodnosti nebo zdraví zvířat by bylo možné zlepšit nejen ekonomiku hospodaření, ale také snížit ekologickou zátěž živočišné produkce na životní prostředí.

Předkládané výsledky popisují genotypové frekvence v genech *Leptin*, *TLR4* a *CXCR1* a vztah jejich polymorfismu k plodnosti a skóre obsahu somatických buněk u krav českého strakatého skotu. V disertační práci byl zjištěn:

- pozitivní efekt genotypu *TT* v genu *Leptin* g.-963C>T na ranost zvířat a také pozitivní vliv genotypu *CT* na servis periodu a vyšší pravděpodobnost březosti po 1. inseminaci (PR). Tyto výsledky by mohly naznačovat pozitivní vliv alely *T* na reprodukci u krav českého strakatého skotu. V oblasti c.357C>T genu *Leptin* jsme zjistili negativní vliv genotypu *TT* na plodnost krav. Tento efekt jsme pozorovali především u délky mezidobí, nižší PR na 1. laktaci a delší servise periodě. Ani u jedné z variant genu *Leptin* se nepodařilo nalézt vztah ke skóre somatických buněk (SCS) v mléce.
- V genu *TLR4* promotorové oblasti g.-226C>G jsme zjistili dosud nepublikovaný pozitivní vliv heterozygotního genotypu *CG* na délku mezidobí a PR. Dále jsme také popsali nižší SCS u krav s genotypem *GG*, a to jak v průběhu 1. a 3. laktace, tak i v rámci opakovaného měření.

- U genu *CXCR1* oblasti c.777C>G nebyl zjištěn významný vztah genotypu k ukazatelům plodnosti ani SCS.

Na základě zjištěných výsledků je zřejmé, že genotyp Leptinu má významný vliv na reprodukci dojnic českého strakatého skotu a může být využitý jako efektivní marker pro zlepšování plodnosti zvířat. Asociace v genech *TLR4* a *CXCR1* poskytují nové informace o vztahu genů zapojených do imunitní odpovědi organismu k reprodukci skotu a SCS, avšak je potřeba zjištěné asociace potvrdit další studií. Dále by bylo vhodné asociační studie doplnit informacemi o expresi jednotlivých genů právě v závislosti na genotypu, aby zjištěné informace byly komplexní a bylo možné vydat jasné doporučení pro praxi a další šlechtění českého strakatého skotu.

## 7. Seznam použité literatury

- Agarwal, M., Shrivastava, N., Padh, H. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Reports*. 27 (4). 617–631.
- Ajevar, G., Muthu, S., Sarkar, M., Kumar, H., Das, G. K., Krishnaswamy, N. 2014. Transcriptional profile of endometrial TLR4 and 5 genes during the estrous cycle and uterine infection in the buffalo (*Bubalus bubalis*). *Veterinary Research Communications*. 38 (2). 171–176.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 2. 675–680.
- Akira, S., Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews Immunology*. 4. 499–511.
- 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.
- Amos, W., Driscoll, E., Hoffman, J. I. 2011. Candidate genes versus genome-wide associations: which are better for detecting genetic susceptibility to infectious disease? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 278. 1183–1188.
- Bagheri, M., Moradi-Sharhrbabak, M., Miraie-Ashtiani, R., Safdari-Shahroudi, M., Abdollahi-Arpanahi, R. 2016. Case-control approach application for finding a relationship between candidate genes and clinical mastitis in Holstein dairy cattle. *Journal of Applied Genetics*. 57. 107–112.

- Banos, G., Woolliams, J. A., Woodward, B. W., Forbes, A. B., Coffey, M. P. 2008. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 91. 3190–3200.
- Beaudeau, F., Frankena, K., Fourichon, C., Seegers, H., Faye, B., Noordhuizen, J. P. T. M. 1994. Associations between health disorders of French dairy cows and early and late culling within the lactation. *Preventive Veterinary Medicine*. 19. 213–231.
- Beaudeau, F., Ducrocq, V., Fourichon, C., Seeger, H. 1995. Effect of Disease on Length of Productive Life of French Holstein Dairy Cows Assessed by Survival Analysis. *Journal of Dairy Science*. 78. 103–117.
- Beaudeau, F., Seegers, H., Ducrocq, V., Fourichon, C., Bareill, N. 2000. Effect of health disorders on culling in dairy cows: a review and a critical discussion. *Annales de zootechnie* 49. 293–311.
- Beckmann, J., Soller, M. 1983. Restriction Fragment Length Polymorphisms in Genetic-Improvement - Methodologies, Mapping and Costs. *Theoretical and Applied Genetics*. 67. 35–43.
- Beecher, C., Daly, M., Childs, S., Berry, D. P, Magee, D. A., McCarthy, T. V., Giblin, L. 2010. Polymorphisms in bovine immune genes and their associations with somatic cell count and milk production in dairy cattle. *Bmc Genetics*. 11.
- Beecher, C., Daly, M., Ross, R. P, Flynn, J, McCarthy, T. V, Giblin, L. 2012. Characterization of the bovine innate immune response in milk somatic cells following intramammary infection



- with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae*. *Journal of Dairy Science*. 95. 5720–5729.
- Beerda, B., Wyszynska-Koko, J., te Pas M. F. W., de Wit A. a. C., Veerkamp, R. F. 2008. Expression profiles of genes regulating dairy cow fertility: recent findings, ongoing activities and future possibilities. *Animal* 2. 1158–1167.
- Boelhauve, M., Sinowatz, F., Wolf, E., Paula-Lopes, F. F. 2005. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biology of Reproduction*. 73. 737–744.
- 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.
- Buch, L. H., Norberg, E. 2008. Genetic analysis of protein yield, udder health, and female fertility in first-parity Danish Holstein cows. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science*. 58. 5–9.
- Buch, L. H., Sorensen, M. K., Lassen, J., Berg, P., Jakobsen, J. H., Johansson, K., Sorensen, A. C. 2011. Udder health and female fertility traits are favourably correlated and support each other in multi-trait evaluations. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 128. 174–182.
- Cabrera, V. E. Ekonomická hodnota dojnice. 20.5.2016 Česká republika. VÚŽV. Seminář: Jaká je hodnota dojnice? Ekonomická hodnota dojnice.

- Carvajal, A. M., Huircan, P., Lepori, A. 2013. Single nucleotide polymorphisms in immunity-related genes and their association with mastitis in Chilean dairy cattle. *Genetics and molecular research*. 12. 2702–2711.
- Chang, M.-L., Kuo, C.-J., Huang, H.-C., Chu, Y.-Y., Chiu, C.-T. 2016. Association between Leptin and Complement in Hepatitis C Patients with Viral Clearance: Homeostasis of Metabolism and Immunity. *Plos One* 11. e0166712.
- Cehab, F.F. 2014. Leptin and Reproduction: Past Milestones, Present Undertakings and Future Endeavors. *Journal of Endocrinology*. 223. T37–T48.
- Chessa, S., Nicolazzi, E. L., Nicoloso, L., Negrini, R., Marino, R., Vicario, D., Ajmone, M., Valentini, A., Stefanon, B. 2015. Analysis of candidate SNPs affecting milk and functional traits in the dual-purpose Italian Simmental cattle. *Livestock Science*. 173. 1–8.
- ČESTR - Svazu chovatelů českého strakatého skotu. Chovný cíl a standard; Šlechtitelský program českého strakatého skotu. 2012. [online] [cit. 2016-01-01]. Dostupné z [http://www.cestr.cz/files/slechteni\\_a\\_reprodukce/slechtitelsky\\_program\\_2007.pdf](http://www.cestr.cz/files/slechteni_a_reprodukce/slechtitelsky_program_2007.pdf).
- ČESTR - Svazu chovatelů českého strakatého skotu. Prosincové plemenné hodnoty. 2014. [online] [cit. 2017-04-026]. Dostupné z <http://www.cestr.cz/clanky-prosincove-plemenne-hodnoty.html>.
- Clempson, A. M., Pollott, G. E., Brickell, J. S., Bourne, N. E., Munce, N., Wathes, D. C. 2011a. Polymorphisms in the autosomal genes for mitochondrial function TFAM and UCP2 are associated with performance and longevity in dairy cows. *Animal* 5. 1335–1343.

- Clempson, A. M., Pollott, G. E., Brickell, J. S., Bourne, N. E., Munce, N., Wathes, D. C. 2011b. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 94. 3618–3628.
- ČMSCH - Českomoravská společnost chovatelů. Výsledky kontroly užítkovosti. 2018. [online] [cit. 2019-02-13]. Dostupné z <[http://www.cmsch.cz/plemenarska-prace/kontrola-uzitkovosti-\(ku\)/rocenky/kontrola-uzitkovosti](http://www.cmsch.cz/plemenarska-prace/kontrola-uzitkovosti-(ku)/rocenky/kontrola-uzitkovosti)>.
- Cochran, S. D., Cole, J. B., Null, D. J., Hansen, P. J. 2013. Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *Bmc Genetics*. 14. 49.
- Cole, J. B., Wiggans, G. R., Ma, L., Sonstegard, T. S., Lawlor, T. J., Crooker, B. A., Van Tassell, C. P., Yang, J., Wang, S., Matukumalli, L. K., Da, Y. 2011. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary US Holstein cows. *Bmc Genomics* 12. 408.
- Collis, E., Fortes, M. R. S., Zhang, Y., Tier, B., Schutt, K., Barendse, W., Hawken, R. 2012. Genetic variants affecting meat and milk production traits appear to have effects on reproduction traits in cattle. *Animal Genetics*. 43. 442–446.
- Cunningham, M. J., Clifton, D. K., Steiner, R. A. 1999. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. *Biology of Reproduction*. 60. 216–222.
- Dalton, R. 2009. No bull: genes for better milk. *Nature News*. 457:369–369.

- De Matteis, G., Grandoni, F., Scata, M. C., Catizone, A., Reale, A., Crisa, A., Moiola, B. 2016. Evaluation of leptin receptor expression on buffalo leukocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 177. 16–23.
- Deb, R., Chakraborty, S. 2012. Trends in veterinary diagnostics. *Journal of Veterinary Science and Technology*. 3.
- Dechow, C. D., Goodling R. C. 2008. Mortality, culling by sixty days in milk, and production profiles in high- and low-survival Pennsylvania herds. *Journal of Dairy Science*. 91. 4630–4639.
- Dematawewa, C. M. B., Berger, P. J. 1998. Genetic and Phenotypic Parameters for 305-Day Yield, Fertility, and Survival in Holsteins. *Journal of Dairy Science*. 812700–2709.
- Erb, H. N., Smith, R. D., Oltenacu, P. A., Guard, C. L., Hillman, R. B., Powers, P. A., Smith, M. C., White, M. E. 1985. Path Model of Reproductive Disorders and Performance, Milk Fever, Mastitis, Milk Yield, and Culling in Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. 68. 3337–3349.
- Fairfax, B. P., Vannberg, F. O., Radhakrishnan, J., Hakonarson, H., Keating, B. J., Hill, A. V. S., and Knight, J. C. 2010. An integrated expression phenotype mapping approach defines common variants in *LEP*, *ALOX15* and *CAPNS1* associated with induction of IL-6. *Human Molecular Genetics*. 19. 720–730.
- Ferrero, F. J., Valledor, M., Campo, J. C.. 2014. Screening method for early detection of mastitis in cows. *Measurement* 47. 855–860.

- Flint, A. P., Woolliams, J. 2008. Precision animal breeding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Science*. 363. 573–590.
- Froidmont, E., Mayeres, P., Picron, P., Turlot, A., Planchon, V., Stilmant, D. 2013. Association between age at first calving, year and season of first calving and milk production in Holstein cows. *An International Journal of Animal Bioscience*. 7. 665–672.
- Fu, Y., Liu, B., Feng, X., Liu, Z., Liang, D., Li, F., Li, D., Cao, Y., Feng, S., Zhang, X., Zhang, N., Yang, Z. 2013. Lipopolysaccharide increases Toll-like receptor 4 and downstream Toll-like receptor signaling molecules expression in bovine endometrial epithelial cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 151. 20–27.
- Fuenzalida, M. J., Fricke, P. M., Ruegg, P. L. 2015. The association between occurrence and severity of subclinical and clinical mastitis on pregnancies per artificial insemination at first service of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 98. 3791–3805.
- Galvao, K. N., Pighetti, G.M., Cheong, S. H., Nydam, D. V., Gilbert, R. O. 2011. Association between interleukin-8 receptor-alpha (CXCR1) polymorphism and disease incidence, production, reproduction, and survival in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 94. 2083–2091.
- García-Ruiz, A., Cole, J. B., VanRaden, P. M., Wiggans, G. R., Ruiz-López, F. J., Van Tassell, C.P. 2016. Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113. E3995-4004.

- Gehring, S., Hamann, H., Herold, P.. 2017. Relationship between health data and dairy performance traits in Fleckvieh and Vorderwaelder cattle. *Zuchtungskunde*. 89. 70–79.
- Giblin, L., Butler, S. T., Kearney, B. M., Waters, S. M., Callanan, M. J., Berry, D. P. 2010. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires. *Bmc Genetics*. 11. 73.
- Gill, G. S., Allaire, F. R. 1976. Genetic and Phenotypic Parameters for a Profit Function and Selection Method for Optimizing Profit in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 59. 1325–1333.
- Glantz, M., Mansson, H. L., Stalhammar, H., Paulsson, M. 2012. Effect of polymorphisms in the leptin, leptin receptor and acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) genes and genetic polymorphism of milk proteins on bovine milk composition. *Journal of Dairy Research*. 79. 110–118.
- Goddard, M. E., Hayes, B. J. 2007. Genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 124. 323–330.
- Goddard, M. E., Hayes, B. J. 2009. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Reviews Genetics*. 10. 381–391.
- Goertz, I., Baes, C., Weimann, C., Reinsch, N., Erhardt, G. 2009. Association between single nucleotide polymorphisms in the CXCR1 gene and somatic cell score in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 92. 4018–4022.
- Griesbeck-Zilch, B., Meyer, H. H. D., Kühn, C., Schwerin, M., Wellnitz, O. 2008. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Cause Deviating Expression Profiles of Cytokines and

- Lactoferrin Messenger Ribonucleic Acid in Mammary Epithelial Cells. *Journal of Dairy Science*. 91. 2215–2224.
- Haegeman, A., Zeveren, A. V., Peelman, L. J.. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Animal Genetics*. 31.79–79.
- Haley, C., De Koning, D. J. 2006. Genetical genomics in livestock: potentials and pitfalls. *Animal Genetics*. 37. 10–12.
- Hayes, B., Goddard, M. E. 2001. The distribution of the effects of genes affecting quantitative traits in livestock. *Genetics Selection Evolution*. 33. 209–229.
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., Goddard, M. E. 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science*. 92. 433–443.
- Herath, S., Lilly, S. T., Santos, N. R., Gilbert, R. O., Goetze, L., Bryant, C. E., White, J. O., Cronin, J., Sheldon, I. M. 2009. Expression of genes associated with immunity in the endometrium of cattle with disparate postpartum uterine disease and fertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 7. 55.
- Heringstad, B., Klemetsdal, G., Steine, T. 2007. Selection responses for disease resistance in two selection experiments with Norwegian red cows. *Journal of Dairy Science*. 90. 2419–2426.
- Hillerton, J. E., Berry, E. A. 2005. Treating mastitis in the cow - a tradition or an archaism. *Journal of Applied Microbiology*. 98. 1250–1255.

- Ibeagha-Awemu, E. M., Kgwatalala, P., Ibeagha, A. E., Zhao, X. 2008. A critical analysis of disease-associated DNA polymorphisms in the genes of cattle, goat, sheep, and pig. *Mammalian Genome*. 19. 226–245.
- Jecminkova, K., Kyselova, J., Said, A. A., Zavadilova, L., Matlova, V., Majzlik, I. 2016. Leptin Promoter Region Genotype Frequencies and Its Variability in the Czech Fleckvieh Cattle. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 47. 54–59.
- Jersey - Český svaz chovatelů jerseyškého skotu. Plemeno Jersey. 2017. [online] [cit. 2017-04-10]. Dostupné z <<http://www.jersey.cz/clanky/plemeno.html>>.
- Judson, O. P., Haydon, D. 1999. The genetic code: What is it good for? An Analysis of the effects of selection pressures on genetic codes. *Journal of Molecular Evolution*. 49. 539–550.
- Kadlecova, V., Nemeckova, D., Jecminkova, K., Stadnik, L. 2014. Association of bovine DGAT1 and leptin genes polymorphism with milk production traits and energy balance indicators in primiparous Holstein cows. *Mljekarstvo* 64. 19–26.
- Koenig, S., Simianer, H., Willam, A. 2009. Economic evaluation of genomic breeding programs. *Journal of Dairy Science*. 92. 382–391.
- Komisarek, J., Antkowiak, I. 2007. The relationship between leptin gene polymorphisms and reproductive traits in Jersey cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 10. 193–197.
- Komisarek, J. 2010. Impact of LEP and LEPR gene polymorphisms on functional traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*. 28. 133–141.



- Koster, G., Tenhagen, B. A., Heuwieser, W. 2006. Factors associated with high milk test day somatic cell counts in large dairy herds in Brandenburg. I: Housing conditions. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine*. 53. 134–139.
- Kučera, J., Ondráková, M. Genomická selekce strakatého skotu v rutině. *Zpravodaj svazu chovatelů a plemenné knihy českého strakatého skotu*. 2011 (2). 8-9.
- Kučera, J. Genomická selekce v praxi. *Zpravodaj svazu chovatelů a plemenné knihy českého strakatého skotu*. 2011 (3). 7-8.
- Kulig, H., Kmiec, M., Kowalewska-Łuczak, I., Andziak, G. 2009. Effect of leptin gene polymorphisms on milk production traits of Jersey cows. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 33. 143–146.
- Kulig, H., Kmiec, M., Wojdak-Maksymiec, K. 2010. Associations between leptin gene polymorphisms and somatic cell count in milk of jersey cows. *Acta Veterinaria Brno*. 79. 237–242.
- Kvapilík, J. 2014a. Mastitidy a výrobní ztráty. *Veterinářství*. 64 (7). 550 – 560.
- Kvapilík, J. 2014b. Mastitidy dojených krav a ekonomické ztráty. *Veterinářství*. 64 (12). 946-955.
- Leyva-Baca, I., Schenkel, F., Martin, J., Karrow, N. A. 2008. Polymorphisms in the 5'upstream region of the CXCR1 chemokine receptor gene, and their association with somatic cell score in Holstein cattle in Canada. *Journal of Dairy Science*. 91. 407–417.
- Li, W. H., Gojobori, T., Nei, M. 1981. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature* 292. 237–239.

- Liefers, S. C., te Pas, M. F. W., 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.
- Liefers, S. C., Veerkamp, R. F., Pas, M., Delavaud, C., Chilliard, Y., Platje, M., van der Lende, T. 2005. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance traits in dairy cows. *Animal Genetics*. 36. 111–118.
- Lindhe, B., Philipsson, J. 1998. Genetic correlations between production with disease resistance and fertility in dairy cattle and consequences for total merit selection. *Acta Agriculturae Scandinavica Section a-Animal Science*. 48. 216–221.
- Lorenc, M. 2002. Šlechtitelská práce v chovu skotu, aneb, Cesta do hlubin genetiky skotu. Chovservis.
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42. 145–151.
- Lucy, M. C. 2001. ADSA Foundation Scholar Award - Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *Journal of Dairy Science*. 84. 1277–1293.
- Martínez-Arias, R., Calafell, F., Mateu, E., Comas, D., Andrés, A., Bertranpetit, J. 2001. Sequence variability of a human pseudogene. *Genome Research*. 11. 1071–1085.
- Matteis, G. D., Scatà, M. C., Grandoni, F., Petrera, F., Abeni, F., Catillo, G., Napolitano, F., Moiola, B. 2012. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes on milk and morphological traits in Holstein cows. *Open Journal of Animal Sciences*.

- McGuire, K., Jones, M., Werling, D., Williams, J. L., Glass, E. J., Jann, O. 2006. Radiation hybrid mapping of all 10 characterized bovine Toll-like receptors. *Animal Genetics*. 37. 47–50.
- de Mesquita, A. Q., Minafra e Rezende, C. S., de Mesquita, A. J., Garcia da Veiga Jardim, E. A., Junqueira Kipnis, A. P. 2012. Association of Tlr4 Polymorphisms with Subclinical Mastitis in Brazilian Holsteins. *Brazilian Journal of Microbiology*. 43. 692–697.
- Meuwissen, T. H., Hayes, B. J., Goddard, M. E. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157. 1819–1829.
- Michelizzi, V. N., Wu, X., Dodson, M. V., Michal, J. J., Zambrano-Varon, J., McLean, D. J., Jiang, Z. 2011. A Global View of 54,001 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Illumina BovineSNP50 BeadChip and Their Transferability to Water Buffalo. *International Journal of Biological Sciences*. 7. 18–27.
- Miglior, F., Muir, B. L., Van Doormaal, B. J. 2005. Selection indices in Holstein cattle of various countries. *Journal of Dairy Science*. 88. 1255–1263.
- Miglior, F., Chesnais, J., Van Doormaal, B. J. 2012. Genetic improvement: a major component of increased dairy farm profitability. Invited Presentation at 38th ICAR Biennial Session held in Cork, Ireland, May 28–June 1, 2012, ICAR Technical Series. International Committee for Animal Recording, Rome, Italy.
- Morin, P. A., Luikart, G., Wayne, R. K. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*. 19. 208–216.
- Murdoch, C., Finn, A. 2000. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 95. 3032–3043.

- O'Brien, S. J., Menotti-Raymond, M., Murphy, W. J., Nash, W. G., Wienberg, J., Stanyon, R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Womack, J. E., Graves, J. a. M. 1999. The promise of comparative genomics in mammals. *Science*. 286. 458-+.
- Ogorevc, J., Kunej, T., Razpet, A., Dovc, P. 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*. 40. 832–851.
- Oikonomou, G., Angelopoulou, K., Arsenos, G., Zygoyiannis, D., Banos, G. 2009. The effects of polymorphisms in the DGAT1, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. *Animal Genetics*. 40. 10–17.
- Olechnowicz, J., Jaskowski, J. M. 2013. A Connection Between Mastitis During Early Lactation and Reproductive Performance of Dairy Cows - a Review. *Annals of Animal Science*. 13. 435–448.
- Oltenacu, P., Broom, D. 2010. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. *Animal Welfare*. 19. 39–49.
- Ondráková, M., Kučera J., Král, P. 2014. Další pohled na genotypizaci strakatých býků. *Zpravodaj svazu chovatelů a plemenné knihy českého strakatého skotu*. 1. 7-10.
- Oviedo-Boyso, J., Valdez-Alarcón, J. J., Cajero-Juárez, M., Ochoa-Zarzosa, A., López-Meza, J. E., Bravo-Patiño, A., Baizabal-Aguirre, V. M. 2007. Innate immune response of bovine mammary gland to pathogenic bacteria responsible for mastitis. *The Journal of Infection*. 54. 399–409.

- Paape, M. J., Shafer-Weaver, K., Capuco, A. V., Van Oostveldt, K., Burvenich, C. 2000. Immune surveillance of mammary tissue by phagocytic cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 480. 259–277.
- Pawlik, A., Sender, G., Kapera, M., Korwin-Kossakowska, A. 2015. Association between interleukin 8 receptor alpha gene (CXCR1) and mastitis in dairy cattle. *Central European Journal of Immunology*. 40. 153–158.
- Peakall, R., Smouse, P. E. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6. 288–295.
- Peakall, R., Smouse, P. E. 2012. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28. 2537–2539.
- Petzl, W., Zerbe, H., Günther, J., Yang, W., Seyfert, H.-M., Nürnberg, G., Schuberth, H.-J. 2008. *Escherichia coli*, but not *Staphylococcus aureus* triggers an early increased expression of factors contributing to the innate immune defense in the udder of the cow. *Veterinary Research*. 39. 18.
- Pomp, D., Zou, T., Clutter, A. C., Barendse, W. 1997. Rapid communication: Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal of Animal Science*. 75. 1427–1427.
- Prakash, O., Kumar, A., Sonwane, A., Rathore, R., Singh, R. V., Chauhan, A., Kumar, P., Renjith, R., Yadav, R., Bhaladhare, A., Baqir, M., Sharma, D. 2014. Polymorphism of cytokine and innate immunity genes associated with bovine brucellosis in cattle. *Molecular Biology Reports*. 41. 2815–2825.

- Příbyl, J., Řehout, V., Čítek, J., Příbylová, J. 2010. Genetic evaluation of dairy cattle using a simple heritable genetic ground. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 90. 1765–1773.
- Procaccini, C., La Rocca, C., Carbone, F., De Rosa, V., Galgani, M., Matarese, G. 2017. Leptin as immune mediator: Interaction between neuroendocrine and immune system. *Developmental and Comparative Immunology*. 66. 120–129.
- Proudfoot, A. E. I. 2002. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nature Reviews Immunology*. 2. 106–115.
- Pryce, J. E., Royal, M. D., Garnsworthy, P. C., Mao, I. L. 2004. Fertility in the high-producing dairy cow. *Livestock Production Science*. 86. 125–135.
- Rainard, P., Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Veterinary Research*. 37. 369–400.
- Rauw, W. M., Kanis, E., Noordhuizen-Stassen, E. N., Grommers, F. J. 1998. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. *Livestock Production Science*. 56. 15–33.
- Ruegg, P. L. 2003. Investigation of mastitis problems on farms. *Veterinary Clinics of North America-Food Animal Practice*. 19. 47–73.
- Ruiz-Larranaga, O., Manzano, C., Iriondo, M., Garrido J. M., Molina, E., Vazquez, R., Juste, R. A., Estonba, A. 2011. Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science*. 94. 3635–3641.

- Říha, J., Hanuš, O. 2001. Důležitá hlediska zajišťování pravidelné reprodukce dojníc, Výzkum v chovu skotu. 3. 12–19.
- SABRE: Cutting edge genomics for sustainable animal breeding. Cutting edge genomics for sustainable animal breeding Farm Animal Genetics and Genomics Faraday Partnership Ltd; 2006.
- Sander-Nielsen, U., Pedersen, G. A., Pedersen, J., Jensen, J. 1999. Genetic variation in disease traits and their relationships with survival in Danish dairy cattle. *Interbull Bull.* 0:170.
- Schaeffer, L. R. 2006. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics.* 123. 218–223.
- Seidel, G.E. 2010. Brief introduction to whole-genome selection in cattle using single nucleotide polymorphisms. *Reproduction Fertility and Development.* 22. 138-144.
- Sewalem, A., Miglior, F., Kistemaker, G. J., Sullivan, P., Van Doormaal, B. J. 2008. Relationship Between Reproduction Traits and Functional Longevity in Canadian Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science.* 91. 1660–1668.
- Sewalem, A., Miglior, F., Kistemaker, G. J. 2010. Analysis of the relationship between workability traits and functional longevity in Canadian dairy breeds. *Journal of Dairy Science.* 93. 4359–4365.
- Sharma, B. S., Leyva, I., Schenkel, F., Karrow, N. A. 2006. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *J Journal of Dairy Science.* 89. 3626–3635.

- Sharma, B. S., Mount, J., Karrow, N. A. 2008. Functional Characterization of a Single Nucleotide Polymorphism in the 5'UTR Region of the Bovine Toll-like Receptor 4 Gene. *Development in Biologicals*. 132. 331–336.
- Sheldon, I., Price, S., Cronin, J., Gilbert, R., Gadsby, J. 2009. Mechanisms of Infertility Associated with Clinical and Subclinical Endometritis in High Producing Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals*. 44. 1–9.
- Shirasuna, K., Kawashima, C., Murayama, C., Aoki, Y., Masuda, Y., Kida, K., Matsui, M., Shimizu, T., Miyamoto, A. 2011. Relationships Between the First Ovulation Postpartum and Polymorphism in Genes Relating to Function of Immunity, Metabolism and Reproduction in High-producing Dairy Cows. *Journal of Reproduction and Development*. 57. 135–142.
- Silva, D. B. S., Crispim, B. A., Silva, L. E., Oliveira, J. A., Siqueira, F., Seno, L. O., Grisolia, A. B. 2014. Genetic variations in the leptin gene associated with growth and carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*. 13. 3002–3012.
- Simianer, H., Solbu, H., Schaeffer, L. R. 1991. Estimated Genetic Correlations Between Disease and Yield Traits in Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science*. 74. 4358–4365.
- Singh, U., Deb, R., Alyethodi, R. R., Alex, R., Kumar, S., Chakraborty, S., Dhama, K., Sharma, A. 2014. Molecular markers and their applications in cattle genetic research: A review. *Biomarkers and Genomic Medicine*. 6. 49–58.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. *Genetika*. Tiskárna Helbich a.s. Brno. 871 s. ISBN: 9788021048522.



- Soliman, M., Ishioka, K., Yoshida, R., Komabayashi, K., Hatai, H., Matsui, Y., Hirai, T., Katagiri, S., Takahashi, Y., Kawakita, Y., Abe, H., Kitamura, H., Kimura, K., Saito, M. 2002. Serum leptin levels during the periparturient period in cows. *Journal of Veterinary Medical Science*. 64. 1053–1056.
- Sominsky, L., Sobinoff, A. P., Jobling, M. S., Pye, V., McLaughlin, E. A., Hodgson, D. M. 2013. Immune regulation of ovarian development: programming by neonatal immune challenge. *Frontiers in Neuroscience*. 7. 100.
- Sordillo, L. M., Streicher, K. L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 7. 135–146.
- Strucken, E. M., Bortfeldt, R. H., Tetens, J., Thaller, G., Brockmann, G. A. 2012. Genetic effects and correlations between production and fertility traits and their dependency on the lactation-stage in Holstein Friesians. *Bmc Genetics*. 13. 108.
- Szyda, J., Morek-Kopec, M., Komisarek, J., Zarnecki, A. 2011. Evaluating markers in selected genes for association with functional longevity of dairy cattle. *Bmc Genetics*. 12. 30.
- Teneva, A., Petrović, M. P. 2010. Application of molecular markers in livestock improvement. *Biotechnology in Animal Husbandry*. 26. 135–154.
- Vacek, M., Stádník, L., Štípková, M. 2007. Relationships between the incidence of health disorders and the reproduction traits of Holstein cows in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 52. 227.
- Vanarendonk, J. 1988. Management Guides for Insemination and Replacement Decisions. *Journal of Dairy Science*. 71. 1050–1057.

- VanRaden, P. M., Sanders, A. H., Tooker, M. E., Miller, R. H. 2004. Development of a national genetic evaluation for cow fertility. *Journal of Dairy Science*. 87. 2285.
- VanRaden, P. M. 2008. Efficient Methods to Compute Genomic Predictions. *Journal of Dairy Science*. 91. 4414–4423.
- VanRaden, P. M., Van Tassell, C. P., Wiggans, G. R., Sonstegard, T. S., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Schenkel, F. S. 2009. Invited review: reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. 92. 16–24.
- Veerkamp, R. F., Windig, J., Calus, M., Ouweltjes, W., De Haas, Y., Beerda, B. 2008. Selection for high production in dairy cattle. In *Resource allocation theory applied to farm animal production* (ed. W Rauw), pp. 243–260. CAB International, Wallingford, UK.
- Verbeke, J., Van Poucke, M., Peelman, L., Piepers, S., De Vlieghe, S. 2014. Associations between CXCR1 polymorphisms and pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis, test-day somatic cell count, and test-day milk yield. *Journal of Dairy Science*. 97. 7927–7939.
- Vignal, A., Milan, D., SanCristobal, M., Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution*. 34. 275–305.
- Waller, K. P., Westermarck, T., Ekman, T., Svennersten-Sjaunja, K. 2003. Milk leakage - An increased risk in automatic milking systems. *Journal of Dairy Science*. 86. 488–3497.
- Wiener, P., Burton, D., Williams, J. L. 2004. Breed relationships and definition in British cattle: a genetic analysis. *Heredity*. 93. 597–602.

- Wiggans, G. R., Cole, J. B., Hubbard, S. M., Sonstegard, T. S. 2017. Genomic Selection in Dairy Cattle: The USDA Experience. H.A. Lewin and R.M. Roberts, ed. Annual Reviews, Palo Alto.
- Williams, E. J., Fischer, D. P., Noakes, D. E., England, G. C. W., Rycroft, A., Dobson, H., Sheldon, I. M. 2007. The relationship between uterine pathogen growth density and ovarian function in the postpartum dairy cow. *Theriogenology* 68. 549–559.
- Wojdak-Maksymiec, K., Kmiec, M., Kowalewska-Luczak, I., Warlinski, M. 2010. DRB3 Gene Polymorphism and Somatic Cell Count in Milk of Jersey Cows. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9. 1295–1300.
- Wojdak-Maksymiec, K., Strabel, T., Szyda, J., Mikołajczyk, K. 2012. Clinical Mastitis and Combined Defensin Polymorphism in Dairy Cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11. 2230–2237.
- Wojdak-Maksymiec, K., Mikołajczyk, K., Prüffer, K. 2015. Association of TLR4 and CARD15/NOD2 polymorphisms with SCC in Holstein-Friesian cattle. *Archiv Tierzucht*. 58. 293–300.
- Yazdani, H., Rahmani, H. R., Edris, M. A., Dirandeh, E. 2010. Association between A59V polymorphism in exon 3 of leptin gene and reproduction traits in cows of Iranian Holstein. *African Journal of Biotechnology*. 9. 5997–6000.
- Youngerman, S. M., Saxton, A. M., Oliver, S. P., Pighetti, G. M. 2004. Association of CXCR2 polymorphisms with subclinical and clinical mastitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 87. 2442–2448.

- Zhang, C. L., Wang, Y., Chen, H., Fang, X., Gu, C. 2012. The chemokine receptor 1 gene polymorphism and its association with Somatic Cell Score and milk production traits in dairy cattle. *Animal Science Papers and Reports*. 30. 25–33.
- Zhang, D.-X., Hewitt, G. M. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*. 12:563–584.
- Zieba, D. A., Amstalden, M., Williams, G. L. 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*. 29. 166–185.
- Zwald, N. R., Weigel, K. A., Chang, Y. M., Welper, R. D., Clay, J. S. 2004. Genetic Selection for Health Traits Using Producer-Recorded Data. I. Incidence Rates, Heritability Estimates, and Sire Breeding Values. *Journal of Dairy Science*. 87. 4287–4294.

## 8. Přílohy

### Izolace DNA vysolováním z krve

1. Označené ependorfky s objemem 2 ml naplnit 0,5 ml T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> promývacím pufrem
2. Přidat 200 µl homogenizované nesrážlivé krve a lehce promíchat špičkou
3. Přidat 0,5 ml T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> promývacího pufru
4. Vortexovat dokud není obsah ependorfky zcela homogenní
5. Centrifugace – 13 000 rpm/ 2min
6. Odstranit supernatant
7. Na peletku leukocytů přidat čistý T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> pufr – 0,5 ml
8. Vortexovat dokud není obsah ependorfky zcela homogenní
9. Propírání v T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> pufru opakovat 5x (dokud není supernatant zcela čirý)
10. Centrifugace – 13 000 rpm/ 2min
11. Odstranit supernatant, zbytek T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> promývacího pufru odsát na buničině
12. Ependorfky vysušit odklopené dnem vzhůru na buničině – cca 15 min.
13. Ependorfky lehce oklepat o buničinu
14. Na peletku promytých leukocytů přidat lyzační směs v množství 160 µl /vzorek
15. Důkladně vortexovat - co nejvíce narušit kompaktnost peletky
16. Inkubovat ve vodní lázni po dobu nejméně 8 hod. nebo přes noc při teplotě 37 °C
17. Během inkubace aspoň 1x vortexovat
18. K obsahu ependorfky postupně přidat 100 µl nasyceného roztoku NaCl + 250 µl roztoku chloroform-isoamylalkohol 24:1 (v/v)
19. Vysolovat na třepačce po dobu 2 x 1 hodina (po 1. hodině vortexovat)
20. Centrifugovat 7 500 rpm /15 min/ 15 °C
21. Odpipetovat čirý supernatant nad rozhraním a přenést do čisté ependorfky – 1,5 ml
22. Centrifugovat 7 500 rpm /15 min/ 15 °C
23. Odpipetovat supernatant nad zbytkem precipitátů a přenést do čisté ependorfky - 1,5ml
24. Přidat 200 µl Isopropanolu z mrazáku
25. Jemným překlápěním ependorfky vysrážet DNA do viditelného vlákna
26. Centrifugovat ependorfku s vysráženou DNA 15 000 rpm /15 min./ 4 °C
27. Odstranit supernatant

28. Na peletku DNA přidat 200  $\mu$ l 70% Etanolu z lednice
29. Vortexováním opláchnout peletku v Etanolu
30. Centrifugovat 15 000 rpm /15 min./ 4 °C
31. Odstranit supernatant
32. Ependorfky lehce oklepat o buničinu
33. Vysušit zbytek Etanolu při pokojové teplotě cca 1hod.
34. Rozpustit peletku DNA v TE pufru, množství cca 65  $\mu$ l (podle velikosti peletky)
35. Zvortexovat - krátce stočit
36. Nechat rozpouštět při pokojové teplotě cca 2 hod. na třepáče
37. V průběhu rozpouštění 1x zvortexovat – krátce stočit
38. Měření koncentrace izolované DNA na NanoDropu se provádí až následující den, po důkladném rozpuštění DNA a velmi důkladném protřepání izolátu na vortexu.

## Roztoky

T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> Promývací pufr:

**Tris-HCl** 10,0 ml Tris-HCl (1M - tj. 60,5g/500ml - pH 7,5 úprava HCl)

**Na<sub>2</sub>EDTA** 5,0 ml Na<sub>2</sub>EDTA (0,2M- tj. 4,0g/500ml, bez úpravy pH)

Doplnit do 1 000 ml destilovanou vodou.

Pufr A

**Tris-HCl** 10 mM 1,0 ml Tris-HCl (1M - tj. 12,1g/100ml - pH 8,2 úprava HCl)

**Na<sub>2</sub>EDTA** 2 mM 0,8 ml Na<sub>2</sub>EDTA (0,25M tj.18,6g/200ml, bez úpravy pH)

**NaCl** 400 mM 8,0 ml NaCl (5M – Sigma-Aldrich, USA)

**SDS** 1 % 5,0 ml SDS (20% – Sigma-Aldrich, USA)

Doplnit do 1 000 ml destilovanou vodou.

TE Pufr:

**50  $\mu$ l Tris-EDTA** Pufr 100x Koncentrovaný (Sigma-Aldrich, USA) + 4 550  $\mu$ l destilované vody

Nasycený roztok NaCl: MG: 58,44

Do flakonku nalít roztok 5M NaCl a nasypat cca 1cm vysoký sloupeček krystalů NaCl. Dosypávat, dokud se krystalky rozpouští a sloupeček nezůstane zachován.

Lyzační směs v množství 169  $\mu\text{l}$  na vzorek:

<b>Složka</b>	<b>1 vzorek</b>
Pufir A	150 $\mu\text{l}$
Proteináza K (Roche, Švýcarsko)	12 $\mu\text{l}$
10% SDS (Sigma-Aldrich, USA)	7 $\mu\text{l}$