

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

**VLIV VYBRANÝCH GENETICKÝCH MARKERŮ NA  
KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ UKAZATELE EJAKULÁTU  
BÝKŮ**

doktorská disertační práce

Doktorand: Ing. Kadlecová Veronika

Školitel: doc. Ing. Stádník Luděk, Ph.D.

Konzultant: Dr. Ing. Kyselová Jitka

Praha 2014

Předložená disertační práce byla vypracována za podpory projektů NAZV QI91A061, stipendia ACTION a třech interních grantů na KSZ, ČZU v Praze (rok 2011 21320/1312/3187, rok 2012 21320/1312/3177 a rok 2013 21320/1312/3176).

## PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych na tomto místě poděkovala všem, kteří přispěli k tomu, že tato práce vznikla. Především bych ráda poděkovala svému vedoucímu disertační práce doc. Ing. Ludřku Stádníkovi, Ph.D. a mé konzultantce Dr. Ing. Jitce Kyselové za cenné rady, metodické vedení a věcné i metodické připomínky. Rovněž bych ráda poděkovala všem spolupracovníkům z Katedry speciální zootechniky, zejména Ing. Daně Němečkové a Ing. Janu Beranovi, Ph.D. za jejich pomoc při realizaci experimentů. Dále mé poděkování patří Ing. Janě Rychtářové, Ph.D. a všem spolupracovníkům z oddělení molekulární genetiky ve VÚŽV, v.v.i. v Praze – Uhřetěvsi za jejich vstřícnost a spolupráci při řešení této práce. V neposlední řadě bych velice ráda poděkovala své rodině a všem svým přátelům za nekonečnou podporu a trpělivost při mém studiu.

## OBSAH

1 ÚVOD.....	1
2 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	2
2.1 ŠLECHTĚNÍ ČESKÉHO STRAKATÉHO SKOTU V ČR .....	2
2.2 ŠLECHTĚNÍ HOLŠTÝNSKÉHO SKOTU V ČR .....	3
2.3 BÝCI V PLEMENITBĚ .....	4
2.4 REPRODUKCE A INSEMINACE SKOTU .....	5
2.4.1 VNITŘNÍ FAKTORY .....	6
2.4.2 VNĚJŠÍ FAKTORY .....	7
2.5 KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ UKAZATELE EJAKULÁTU BÝKŮ .....	8
2.5.1 MAKROSKOPICKÉ HODNOCENÍ EJAKULÁTU.....	9
2.5.2 MIKROSKOPICKÉ HODNOCENÍ EJAKULÁTU .....	9
2.6 VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY VE ŠLECHTĚNÍ SKOTU.....	10
2.6.1 STRUKTURA GENOMU SKOTU .....	10
2.6.2 DĚDIČNOST UŽITKOVÝCH VLASTNOSTÍ.....	11
2.6.3 MAPOVÁNÍ GENOMU SKOTU.....	11
2.6.4 ŠLECHTĚNÍ NA PLODNOST.....	12
2.7 GENETICKÝ POLYMORFISMUS.....	13
2.7.1 JEDNONUKLEOTIDOVÝ POLYMORFISMUS (SNP).....	13
2.7.2 GENETICKÉ MARKERY.....	13
2.7.3 SELEKCE ZA PODPORY MARKERŮ (MAS).....	14
2.8 METODY ANALÝZY DNA.....	15
2.8.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR).....	15
2.8.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE - POLYMORFISMUS DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ (PCR-RFLP).....	16
2.9 PŘEHLED TESTOVANÝCH POLYMORFISMŮ .....	17
2.9.1 <i>LEP</i> .....	17
2.9.2 <i>DGATI</i> .....	18
2.9.3 <i>SPAG11</i> .....	18
2.9.4 <i>PLCz</i> .....	19
3 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE .....	21
4 MATERIÁL A METODIKA.....	22
4.1 STRUKTURA SLEDOVANÉ POPULACE .....	22

4.2 GENETICKÁ ANALÝZA SOUBORU .....	22
4.2.1 IZOLACE DNA .....	22
4.2.2 STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH POLYMORFISMŮ .....	23
4.2.2.1 <i>LEP</i> .....	23
4.2.2.2 <i>DGATI</i> .....	23
4.2.2.3 <i>SPAG11</i> .....	24
4.2.2.4 <i>PLCz</i> .....	25
4.2.3 ELEKTROFORETICKÉ VYHODNOCENÍ .....	26
4.3 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ ČERSTVÉHO EJAKULÁTU .....	26
4.4 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ ROZMRAZENÉHO EJAKULÁTU .....	27
4.5 STATISTICKÁ ANALÝZA VÝSLEDKŮ .....	27
5 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	29
5.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU .....	29
5.2 REGRESNÍ A KORELAČNÍ ANALÝZA .....	32
5.3 VÝSLEDKY ASOCIAČNÍCH ANALÝZ .....	34
5.3.1 <i>LEP</i> .....	34
5.3.2 <i>DGATI</i> .....	37
5.3.3 <i>SPAG11</i> .....	41
5.3.4 <i>PLCz</i> .....	45
5.3.5 VLIV DALŠÍCH EFEKTŮ .....	48
6 ZÁVĚR .....	53
7 SEZNAM LITERATURY .....	56
8 SEZNAM ZKRATEK .....	67

# 1 ÚVOD

Plodnost býka jako produkční vlastnost je důležitější než plodnost krávy. Na rozdíl od jedné krávy může jeden býk posloužit k chovu pro desítky krav při přirozené plemenitbě a až tisíce krav při umělé inseminaci. Dobrá plodnost je komplex složený z mnoha událostí odehrávajících se v organismu. Z hlediska samčího organismu jsou klíčovými kroky úspěšné reprodukce spermatogenní cyklus, sekrece přídatných pohlavních žláz, průchod spermií pohlavním ústrojím samice a kapacitace spermií. Každý z těchto kroků je zprostředkován řadou proteinů, které jsou kódovány mnoha geny. Tyto a další geny tvoří genetické pozadí jedince.

Genetika patří k celosvětově se rozvíjejícímu odvětví a i ve šlechtění zvířat se stalo zavedení molekulárně-genetických metod velkým krokem vpřed. Genomická selekce v chovu skotu využívá soubor genetických markerů asociovaných s různými užitkovými vlastnostmi hospodářských zvířat. V chovu mléčného skotu se velmi rychle zavedla selekce býků a jalovic na základě polymorfismu kandidátních genů asociovaných s produkcí mléka, tělesnou kondicí a dlouhověkostí. S ohledem na potvrzení negativní korelace mezi produkcí mléka a reprodukci, je třeba vyhodnotit vliv genetických markerů pro mléčnou užitkovost na ukazatele ejakulátu býků. Z tohoto důvodu je v naší práci zkoumán vliv polymorfismu v genu pro leptin (*LEP*) a acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferasu 1 (*DGATI*) na ukazatele čerstvého a rozmrazeného ejakulátu býků.

Z důvodu zavedení umělé inseminace se zvýšil selekční tlak na kvalitu býků zařazovaných do plemenitby a snížil se počet potřebných býků na zajišťování reprodukce stád. Detekce genetických markerů asociovaných s vývojem pohlavního ústrojí býků, se spermatogenezí, se sekrecí přídatných pohlavních žláz, s vlastnostmi čerstvého a mrazeného ejakulátu a dalšími událostmi zajišťujícími dobrou plodnost býků se proto stala nezbytnou. V naší práci jsme sledovali polymorfismus v genu pro sperm-associated antigen 11 (*SPAG11*) a fosfolipázu C zeta (*PLCz*).

Po prověření asociací těchto polymorfismů a produkčních a reprodukčních vlastností mohou být tyto výsledky aplikovány do markery-asistované selekce (MAS).

## 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 ŠLECHTĚNÍ ČESKÉHO STRAKATÉHO SKOTU V ČR

Český strakatý skot je původním plemenem skotu České republiky, ale je i součástí celosvětové populace strakatých plemen shodného fylogenetického původu, rozšířené pro svoje vynikající vlastnosti a široké použití (Svaz chovatelů českého strakatého skotu, dostupné na: <http://www.cestr.cz>).

Toto plemeno kombinovaného užitkového typu, středního až většího tělesného rámce, se na celkových stavech skotu v ČR podílí v současné době 48,1% z celkové populace (Svaz chovatelů českého strakatého skotu, dostupné na: <http://www.cestr.cz>; Kvapilík *et al.*, 2012).

Populace českého strakatého skotu je dlouhodobě šlechtěna podle jednotného šlechtitelského programu zpracovaného poprvé koncem šedesátých let (Bouška *et al.*, 2006). Svaz chovatelů českého strakatého skotu je zodpovědný za vedení plemenné knihy, šlechtitelského programu a definici chovného cíle (Kučera *et al.*, 2005).

Na základě sledovaných a hodnocených vlastností je u krav a plemeníků odhadována plemenná hodnota pro mléčnou užitkovost a dále pouze u plemenných býků odhadována plemenná hodnota podle zjištěných vlastností u potomstva pro:

- ukazatele zevnějšku
- dojitelnost
- vlastní plodnost a plodnost dcer
- masnou užitkovost (Bouška *et al.*, 2006).

U plemenných býků v odchovných je realizován test vlastní výkonnosti plemeníků, která má váhu při selekci plemeníků zařazených do plemenitby, dále je prováděna testace na mléčnou užitkovost, výkrmnost a jatečnou hodnotu plemeníků podle potomstva (Kvapilík *et al.*, 2012).

Český strakatý skot je rovněž populací celosvětově otevřenou a v plemenitbě jsou využíváni i býci fylogeneticky příbuzných strakatých plemen. Jako otcové býků jsou vybíráni plemeníci zařazení mezi 1% nejlepších plemeníků příbuzných strakatých plemen. V souladu s evropským trendem je pro plemeníky zpracována konstrukce souhrnného selekčního indexu, který vedle mléčné a masné užitkovosti zahrnuje ještě znaky fitness. Do selekčního indexu mohou být zahrnuty informace nejen o užitkovosti jedince, ale i o užitkovosti příbuzných jedinců (Bouška *et al.*, 2006; Pytloun, 2001; Jakubec *et al.*, 1999).

## 2.2 ŠLECHTĚNÍ HOLŠTÝNSKÉHO SKOTU V ČR

Holštýnské plemeno se stalo nejpočetnější populací z kulturních plemen na světě. Plemeno je charakteristické větším tělesným rámcem, černostrakatým zbarvením a nejvyšší mléčnou užitkovostí. Určitá část populace je nositelem recesivní alely červenostrakatého zbarvení (cca 10 – 15%) a tato zvířata se označují jako RED Holštýn. (Svaz chovatelů holštýnského skotu, dostupné z: <http://www.holstein.cz>; Motyčka *et al.*, 2005).

Toto plemeno mléčného užitkového typu se na celkových stavech skotu v ČR podílí v současné době 44,4% a 3,7% plemeno RED holštýn z celkové populace stavu skotu v ČR (Kvapilík *et al.*, 2012). Podíl krav holštýnského plemene v kontrole užitkovosti je 57% (Svaz chovatelů holštýnského skotu, dostupné z: <http://www.holstein.cz>).

Cílem šlechtění holštýnského skotu je průběžné zlepšování rentability chovu na základě souboru opatření vedoucích ke genetickému zlepšení ekonomicky důležitých vlastností zvířat. Dosažení tohoto cíle předpokládá kromě vysoké a kvalitní produkce mléka i dobrou úroveň dalších ekonomicky významných vlastností, jakými je plodnost, pevné zdraví a funkční utváření zevnějšku. Nástrojem aktivní šlechtitelské práce v populaci holštýnského skotu je plemenná kniha, jejímž nositelem je Svaz chovatelů holštýnského skotu v ČR (Bouška *et al.*, 2006).

V průběhu posledních 30 až 40 let došlo u holštýnského plemene k významnému genetickému pokroku v produkci. Ve šlechtitelských programech byly využívány téměř výhradně znaky produkce, nedostatečná pozornost byla věnována plodnosti a zdraví krav. Dnes je všeobecně známo, že reprodukční výkonnost je negativně korelována se znaky produkce. Každý posun kupředu v užitkovosti tedy znamená ztráty u znaků reprodukce a zdraví (Motyčka, 2005). Reprodukce je v současnosti jedním z největších problémů v chovu holštýnského skotu nejen v ČR, ale i ve většině zemí s jeho chovem (Svaz chovatelů holštýnského skotu, dostupné z: <http://www.holstein.cz>).

Na základě zjišťovaných vlastností je u krav a plemenných býků odhadována plemenná hodnota pro mléčnou užitkovost, zevnějšek a odolnost proti mastitidám a u býků je dále odhadována plemenná hodnota pro

- dlouhověkost
- obtížnost porodu
- rychlost dojení
- vlastní plodnost a plodnost dcer (Svaz chovatelů holštýnského skotu, dostupné z: <http://www.holstein.cz>).



V České republice se plemenní býci prověřují na vlastní plodnost a plodnost jejich dcer více než 20 let (Motyčka, 2005). Holštýnská populace skotu se považuje za populaci celosvětově otevřenou, což znamená, že při přenosu genů jsou využívány celosvětové genetické zdroje. V Čechách dochází v posledních letech ke zvyšování zastoupení holštýnského skotu (Bouška *et al.*, 2006). Podle některých údajů je více než polovina býků holštýnského plemene (H), působících v současné době v inseminaci, zahraničního původu (Hála *et al.*, 2000). Hlavním selekčním kritériem v České republice jsou ukazatele produkce (65%), zevnějšek (25%) a znaky plodnosti (10%) (Bouška *et al.*, 2006).

### 2.3 BÝCI V PLEMENITBĚ

Skutečnost, že výsledky plodnosti v populacích dojných plemen skotu se zhoršují, obnovila zájem o problematiku reprodukce z hlediska samčí složky. Bylo publikováno mnoho studií zabývajících se otázkou reprodukce z hlediska dojnice. Avšak studií zaměřených na problematiku oplození schopnost spermií nebo zabývajících se samčí složkou reprodukce bylo v posledních desetiletích publikováno velmi málo a bez jakéhokoliv významného výsledku (Karoui *et al.*, 2011).

Prvořadým cílem chovatelů skotu je dosáhnout vysokého procenta zabřezávání pomocí spermatu geneticky nadprůměrně vybavených býků (Gravance *et al.*, 2009). Průběžné snižování reprodukční výkonnosti mléčných plemen skotu vedlo ke zvýšení důrazu v selekčních programech na výběr býků s dobrou plodností. Při tomto výběru se využívá nejnovějších poznatků biotechnologií reprodukce k dosažení co nejvyšší intenzity selekce, které však zvyšuje náklady na budoucí plemeníky (DeJarnette, 2010). Cena býka se na úrovni inseminační stanice (IS) snižuje s množstvím vyprodukovaných inseminačních dávek (ID), spolu s vysokou plemennou hodnotou a vyšším genetickým ziskem, což ovlivňuje prodejnost spermatu. Další podmínkou reprodukce každého stáda je, aby nová generace byla geneticky a ekonomicky lepší než ta předcházející. Změna genetické úrovně stáda se uskutečňuje prostřednictvím použitých plemenů (Bouška *et al.*, 2006; Příbyl a Příbylová, 2005).

Z hlediska genetického se můžeme na plodnost dívat jako na kombinovanou vlastnost, která zahrnuje komponentu reprodukce samčí a samičí. S ohledem na nízkou heritabilitu ukazatelů reprodukce byla v minulosti věnována relativně malá pozornost samčí reprodukci a hlavní pozornost byla zaměřena na samičí plodnost. Pokud je v popředí zájmu samčí plodnost, je pozornost zaměřena na počet inseminací nutných k zabřeznutí, počet

nepřeběhlých krav, ale i na kvalitu semene, kdy se sleduje hustota spermií, objem, pohyblivost a morfologické změny (Říha *et al.*, 2004).

Nejlepší výsledky zabřezávání v roce 2011 v České republice vykazovala masná plemena, české strakaté plemenice zabřezávaly úspěšněji než holštýnské (Kvapilík *et al.*, 2012).

## 2.4 REPRODUKCE A INSEMINACE SKOTU

Ve snaze zefektivnit reprodukci chovaných zvířat člověk zásadním způsobem vstoupil do původního biologického děje a zavedl umělou inseminaci, embryotransfer, asistenci při porodu, organizační a medikamentózní řízení reprodukce v chovech. Daní za tato opatření je daleko větší role lidského faktoru v reprodukčním procesu stáda, která vyžaduje mnohem hlubší znalosti o reprodukčních funkcích zvířat (Bouška *et al.*, 2006).

Úroveň reprodukce významně ovlivňuje inseminace (Říha *et al.*, 2003), konkrétně se na výsledku zabřezávání z 50% podílí plemenice a z 50% býk metodou inseminace (Burdych *et al.*, 2004; Říha, 1996). V dnešní době je umělá inseminace jedna z nejvýznamnějších metod reprodukce skotu (Dai *et al.*, 2009), výrazně zlepšuje efektivitu chovu skotu (Gravance *et al.*, 2009) a urychluje genetický pokrok (Siddique *et al.*, 2006). Hlavním účelem mrazeného ejakulátu je produkce maximálního množství kvalitních spermií od geneticky kvalitně vybavených býků a jejich využití v umělé inseminaci (Dai *et al.*, 2009; Foote, 2002; Mathevon *et al.*, 1998b). Rozšíření umělé inseminace v chovech skotu znamenalo pro šlechtění základní změnu. Postupně se snížil počet potřebných býků na zajišťování reprodukce stád a mohl být značně zvýšen selekční tlak na kvalitu zařazovaných býků do plemenitby. Také počet potomků od špičkových býků v inseminaci se v populaci výrazněji rozšiřoval než při přirozené plemenitbě (Louda *et al.*, 2008).

Při umělé inseminaci skotu pracujeme téměř výhradně s dlouhodobě zamrazenými inseminačními dávkami, skladovanými v tekutém dusíku. Mezi výhody umělé inseminace patří především úspora nákladů na chov býků, vyšší bezpečnost práce, omezení přenosu pohlavních nákaz, využívání kvalitnějších býků, rychlejší prověření mladých býků a s tím spojený rychlejší postup šlechtitelské práce (Bouška *et al.*, 2006).

Inseminace hospodářských zvířat představuje i v současné době nejefektivnější způsob přenosu požadovaných nejlepších genetických vlastností a informací do populace daného druhu, plemene i chovu. Do inseminace jsou vybíráni potomci rodičů s ověřeným původem a s nejvyšší plemennou hodnotou pro požadované užitkové znaky u daného plemene,

vycházející ze strategie šlechtitelského programu. Inseminační stanice, ze které dávka pochází, garantuje dodržování všech technologických postupů při její výrobě. Každý ejakulát sloužící k výrobě inseminačních dávek je posuzován jako samostatná biologická jednotka, je prověřován předepsanými laboratorními zkouškami (Louda *et al.*, 2008). Z důvodu uspokojení vysoké poptávky po spermatu nejlepších býků je sperma ředěno, přičemž je optimalizován počet spermií v jedné dávce za účelem vytvoření maximálního možného počtu dávek (Siddique *et al.*, 2006; Foote, 2002; Mathevon *et al.*, 1998b). Pro vyhovující sperma se tedy na základě předchozího vyšetření stanoví stupeň ředění. Ejakulát se ředí speciálními ředidly zajišťující dostatečnou výživu a ochranu spermiím, následně se zchladí a po několika hodinách stabilizace zamrazí na teplotu tekutého dusíku  $-196^{\circ}\text{C}$  (Foote, 2002). V současné době se inseminační dávky zamrazují do tzv. pejet – plastových stébel na jednom konci zatavených a na druhém uzavřených polyvinylovou zátkou. Na povrchu pejety je uvedeno jméno a registr býka, místo a datum výroby inseminační dávky a kód inseminační stanice (Bouška *et al.*, 2006; Říha *et al.*, 2003). Po rozmrazení musí mít spermie v dávce pohyblivost alespoň 30% a jejich počet musí zajišťovat dostatečnou oplozovací schopnost dávky (Karoui *et al.*, 2011). U plemenných býků je minimální počet aktivních spermií po rozmrazení sedm nebo deset milionů (Bouška *et al.*, 2006). Tyto ukazatele rozmrazeného ejakulátu průkazně ovlivňuje právě ředění, plnění do pejet, chlazení a mrazení inseminační dávky (Siddique *et al.*, 2006).

Plodnost i užitkovost skotu jsou ovlivňovány podmínkami vnějšího prostředí, do kterého lze zahrnout klimatické podmínky, roční období, výživu, ustájení a ošetřování, a vnitřními faktory, mezi které lze zahrnout plemeno, věk, stupeň tělesné kondice, užitkovost a dědičné založení jedince (Štolc *et al.*, 2009; Louda *et al.*, 2007).

#### **2.4.1 VNITŘNÍ FAKTORY**

Organizace produkující sperma se na výsledcích reprodukce podílejí z 20% a z toho 10% připadá na kvalitu a oplozovací schopnost spermatu a 10% na genetické vlivy býků.

##### **Plemeno**

Plemenná příslušnost ovlivňuje nástup pohlavní a chovatelské dospělosti, přičemž jedinci masných plemen dospívají později. Plemeno je tedy důležitým vnitřním faktorem, který má vliv i na kvantitativní a kvalitativní vlastnosti ejakulátu býků (Louda *et al.*, 2007). Konkrétně byly tyto závěry potvrzeny ve studii Beran *et al.* (2011), kdy byly zkoumány asociace býků

kombinovaného plemene český strakatý (C) a býků mléčného plemene holštýnského (H) s vlastnostmi čerstvého a rozmrazeného ejakulátu a byla zjištěna signifikantně vyšší aktivita spermií ( $P \leq 0,05$ ) u býků plemene C než u býků plemene H.

### **Věk býka**

Dalším vnitřním faktorem, kterým je oplozovací schopnost spermatu ovlivněna, je věk býka. Ejakulát u býka v době pohlavní dospělosti obsahuje velké množství nezralých a patologických spermií a i jeho objem bývá nižší. První ejakuláty od pohlavně dospělých býků lze získat v 10 – 12 měsících věku, avšak do plemenitby se býci zařazují ve 14 měsících a kvalita ejakulátu se postupně zlepšuje ve všech hodnotách do 18 – 20 měsíců věku (Louda *et al.*, 2007). Tyto závěry potvrzují i výsledky několika studií, kdy bylo sledován vliv věku u různých plemen skotu na vlastnosti čerstvého i rozmrazeného ejakulátu a bylo zjištěno, že s věkem býka se zvyšuje objem odebraného ejakulátu, aktivita spermií i jejich koncentrace v ejakulátu (Beran *et al.*, 2011; Fuerst-Waltl *et al.*, 2006; Mathevon *et al.*, 1998a).

## **2.4.2 VNĚJŠÍ FAKTORY**

Zhruba z 50% ovlivňují výsledky reprodukce podmínky chovatelské, jakými je řízení stáda, ošetrovatelská péče, schopnost vyhledání říje u plemenic, technologie ustájení, krmení a ošetřování. Inseminační technik ovlivňuje reprodukci 30%, konkrétně chybným nebo nedostatečným předvyšetřením, špatnou hygienou práce, inseminací mimo optimální dobu říje, chybné ošetření spermatu a zacházení s ním a vlastním inseminačním úkonem (Říha *et al.*, 2003; Říha, 1996).

Dalšími vnějšími faktory, kterými je oplozovací schopnost spermatu ovlivněna, jsou roční období, krmná dávka a její doplňky, manipulace s ejakulátem, interval mezi jednotlivými odběry a frekvence odběrů (Rowe *et al.*, 2014; Kastelic, 2013; Beran *et al.*, 2011; Karoui *et al.*, 2011; Hajirezaee *et al.*, 2010; Wolf a Smital, 2009; Hagan *et al.*, 2005; Foote, 2002; Sander, 2007).

### **Měsíc odběru**

Jedním z těchto důležitých vnějších faktorů ovlivňující plodnost a tak i kvantitativní a kvalitativní vlastnosti ejakulátu býků je roční období nebo konkrétněji měsíc, ve kterém došlo k odběru ejakulátu. Podle Loudy *et al.* (2007) závisí klimatické vlivy na intenzitě světla, slunečního záření, teplotě, tlaku, vlhkosti a proudění vzduchu. Náhlé, extrémní a dlouhodobé

změny klimatických vlivů ovlivňují reprodukci. Nejvyšší procento zabřezávání krav lze pozorovat v jarním a podzimním období, nejnižší pak v letním a zimním období. Oproti tomu podle Mathevona *et al.* (1998a) býci produkují kvalitnější sperma během zimních a jarních měsíců. Tyto výsledky potvrzuje i Ghasemi a Ghorbani (2014), kteří prokázali signifikantně vyšší aktivitu spermií čerstvého i rozmrazeného ejakulátu a vyšší koncentraci spermií v odběrech holštýnských býků ze zimního období než z jarních, letních a podzimních měsíců na území Iránu.

### **Doba skladování ID**

Umístění ID do tekutého dusíku při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  umožnilo značně prodloužit dobu skladování spermií a našlo významné uplatnění v chovu domácích zvířat (Jalme *et al.*, 2003). Úspěšnost oplodnění spermiemi uchovávanými v tekutém dusíku se značně liší mezi druhy zvířat (Thurston *et al.*, 2002). Vliv doby skladování ID na vlastnosti reprodukce krav byl hodnocen ve studii Haugan *et al.* (2007). Bylo prokázáno, že procento otelených krav se snižuje s délkou uskladnění ID v tekutém dusíku.

### **Inseminační stanice**

Důležitým vnějším faktorem je samozřejmě také prostředí, ve kterém je býk ustájen a ošetřován, kde je ejakulát odebírán, technici, kteří odběr semene realizují a sociální postavení býka ve stádě (Louda *et al.*, 2007). Že se jedná o významné skutečnosti ovlivňující kvalitu spermatu býků, bylo potvrzeno ve studii Mathevon *et al.* (1998a), kdy byl prokázán signifikantní vliv ( $P \leq 0,01$ ) vodiče býka a technika odebírajícího semeno na množství ejakulátu a celkové množství aktivních spermií v ejakulátu.

## **2.5 KVANTITATIVNÍ A KVALITATIVNÍ UKAZATELÉ EJAKULÁTU BÝKŮ**

Požadavky na býka a kvalitu jeho ejakulátu použitelného v inseminační praxi jsou uvedeny v ČSN 46 7111 – Sperma býka z května 1996 a v přílohách k Vyhlášce MZe ČR č. 471/2000 Sb., v příloze č. 5, části I. B ze dne 13. 12. 2000, kterou se provádějí některá ustanovení zákona č. 154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon) ve znění pozdějších předpisů a novelizací.

Na inseminační stanici se ejakulát pravidelně kontroluje s cílem posoudit vhodnost ke zpracování na inseminační dávky. Již naředený ejakulát se hodnotí po mrazení, před uložením

do banky semene a při vyskladnění. Mezi základní vyšetření patří makroskopické a mikroskopické zhodnocení ejakulátu. Součástí těchto vyšetření jsou i metodické postupy zaměřené na kontrolu spermiogeneze býků zařazených v inseminačním provozu (Vinkler, 2009; Bhoite *et al.*, 2008).

### 2.5.1 MAKROSKOPICKÉ HODNOCENÍ EJAKULÁTU

Ihned po odběru se provádí **makroskopické** (smyslové) posouzení ejakulátu, kdy se sleduje množství (g), barva, konzistence, pach a cizí přímíseniny (Louda *et al.*, 2007).

- Množství ejakulátu pohlavně dospělého býka - měl by být alespoň 3g (Kliment, 1989), průměrně okolo 6g. Množství ejakulátu ovlivňuje řada vnějších faktorů. Patří mezi ně plemenná příslušnost býka, individualita a věk býka, intenzita odběrů, tým pracovníků odebírajících býka a zpracovávajících odebraný ejakulát, ošetřování (Karoui *et al.*, 2011; Foote, 2002).
- Barva – měla by být bílá s odstínem šedé až krémové (Říha *et al.*, 2003).
- Konzistence - smetanová až zrnitá, vodnatá nebo hlenovitá konzistence je nepřipustná. Barva spermatu se posuzuje v procházejícím světle.
- Pach spermatu býka - měl by připomínat pach čerstvě nadojeného mléka nebo být nevyrazný (Vinkler, 2009; Kliment, 1989).
- Ejakulát nesmí obsahovat přímíseniny ani shluky spermií (Říha *et al.*, 2003).

### 2.5.2 MIKROSKOPICKÉ HODNOCENÍ EJAKULÁTU

**Mikroskopické** vyšetření ejakulátu zahrnuje stanovení

- Koncentrace - nemá být nižší než 700 000 spermií v mm<sup>3</sup>.
- Pohybová aktivita - musí být nejméně 70% spermií s progresivním pohybem vpřed za hlavičkou (Karoui *et al.*, 2011; Bouška *et al.*, 2006; Říha *et al.*, 2003; Foote, 2002). Nejvyšší počty pohyblivých spermií byly zaznamenány mezi býky odebíranými po 4 – 5 dnech (Mathevon *et al.*, 1998a).
- Stanovení živých a mrtvých spermií.
- Posouzení morfologie spermií – v ejakulátu musí být nejméně 80% morfologicky normálních spermií a nejvýše 10% primárních změn spermií (Karoui *et al.*, 2011; Bouška *et al.*, 2006; Říha *et al.*, 2003).

## 2.6 VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍ GENETIKY VE ŠLECHTĚNÍ SKOTU

Využívání nových poznatků genetiky a dosažení genetického pokroku ve šlechtění všech hospodářských zvířat je celosvětový proces, do kterého se snaží zapojit i Česká republika (Gravance *et al.*, 2009; Dvořák *et al.*, 2005). S příchodem molekulární genetiky, kdy je možné charakterizovat geny přímo na úrovni deoxyribonukleové kyseliny (DNA), není nutná složitá a nákladná analýza genomu vybraného býka zjišťovaná sledováním užitečnosti jeho potomstva. DNA *in vitro* analýzou je v případě recesivních genů možné provádět velmi účinnou selekci mezi mladými zvířaty bez vlastní známé užitečnosti, čímž je dosahováno vyšší intenzity selekce (Hála *et al.*, 2000).

Pokrok v genetických a molekulárních technikách umožňuje využití variability DNA a stanovení genetických markerů ovlivňujících užitečné vlastnosti. Tyto geny mohou být poté použity v moderních postupech šlechtění a je možná jejich přímá aplikace do praxe (Glantz, 2012; Liu *et al.*, 2011). Jedním z předpokladů využití znalostí o genetických markerech skotu, které mají vliv na užitečné vlastnosti, je jejich začlenění do selekčních chovatelských programů (Dvořák a Říha, 2005). V současnosti je publikována řada studií zabývajících se aplikací kandidátních genů jako genetických markerů pro kvalitu spermatu u různých druhů hospodářských zvířat, včetně skotu (Liu *et al.*, 2011).

### 2.6.1 STRUKTURA GENOMU SKOTU

Soubor veškerého genetického materiálu organismu se nazývá genom. Naprostá většina genetických údajů je v každé buňce založena na dvou vláknech deoxyribonukleové kyseliny (z anglického: deoxyribonucleotide acid – DNA), které jsou podstatou chromozomů. Molekula DNA je tvořena dvěma polynukleotidovými řetězci, jejichž součástí jsou pyrimidinové a purinové báze (Tymin – T, Cytosin – C, Adenin – A, Guanin – G) navzájem spojené vodíkovými můstky.

Gen je úsek DNA, který v buňce určuje tvorbu polypeptidického řetězce a tím následně projev určitého znaku a vlastnosti ve fenotypu. Geny se vyskytují ve dvou nebo více formách, tzn., existují dvě odlišné alely daného genu nebo tzv. mnohotná alelie.

Počet chromozomů je pro daný druh jednoznačně určen a je neměnný. Genom skotu má 30 párů chromozomů – 58 autozómů a 2 pohlavní chromosomy (Griffiths *et al.*, 2010; Snustad a Simmons, 2009; Bouška *et al.*, 2006; Jakubec *et al.*, 2003; Fries a Ruvisky, 1999; Váchal a Šeleda, 1999).

## 2.6.2 DĚDIČNOST UŽITKOVÝCH VLASTNOSTÍ

Sledovaná vlastnost může být ovlivněna jedním genem nebo malým počtem genů a každá alela má potom velký účinek na projev vlastnosti. Protože se změnou jedné alely výrazně změní kvalita znaku, takové znaky se nazývají jako **kvalitativní**. Patří mezi ně míra osvalení, zbarvení nebo rohatost u skotu.

Většina hospodářsky důležitých vlastností je ovlivněna velkým počtem genů malého účinku, jejichž počet ani umístění na chromozomu není známo, a jejichž působení na užítkovost se sčítá. Znaky, které tyto geny ovlivňují, se proto nazývají jako **kvantitativní**. Kvantitativními vlastnostmi nazýváme též vlastnosti měřitelné, tj. hmotnost zvířat, produkce masa, vlny nebo počet zabřeznutých samic. Šlechtění na kvantitativní vlastnosti je dlouhodobé, dochází při něm k akumulaci nežádoucích alel, ale při úspěšném šlechtění je vykazován trvalý genetický zisk. Při genetických rozborech se používá matematické statistiky. Studium těchto interakcí je třeba aplikovat na velkou skupinu jedinců – na populaci. Taková věda se pak nazývá genetika populací (Bouška *et al.*, 2006; Příbyl a Příbylová, 2005; Jakubec *et al.*, 2003). Genetika kvantitativních vlastností spočívá ve studiu jejich proměnlivosti, kterou členíme na genetické a prostředkové komponenty. Mezi kvantitativní vlastnosti je řazena mléčná užítkovost, dlouhověkost a plodnost u skotu (Jakubec *et al.*, 2003). Genetické studie, které se zabývají polygenně ovlivněnými vlastnostmi, využívají vazebné a asociační studie.

Vazebné studie se provádějí vyhledáváním tzv. lokusů kvantitativních vlastností (z anglického: quantitative trait locus – QTL), kdy se využívá markerů v určitých oblastech DNA ve spojení s fenotypem kvantitativních vlastností a jejich dědění z generace na generaci (Longeri *et al.*, 2006).

Asociační studie využívají kandidátních genů, konkrétně polymorfismů v těchto genech, které se přímo vztahují ke sledované vlastnosti. Kandidátní geny jsou takové, které jsou přímo zapojeny do metabolismu sledované vlastnosti (Liefers *et al.*, 2005).

## 2.6.3 MAPOVÁNÍ GENOMU SKOTU

Cílem mapování genomu je určení nukleotidové sekvence všech chromozomů vybraného druhu, zmapování všech genů a sestavení podrobné fyzické mapy. Genetické mapování se v současné době provádí u více než 200 savčích druhů. K dispozici jsou genetické mapy u člověka, myši, psa, potkana a několika málo zemědělsky významných



druhů, jako jsou prasata a skot (Snustad a Simmons, 2009). V roce 2004 byl poprvé přečten genom skotu (Motyčka *et al.*, 2005).

Tak jak vědci postupně odhalují molekulární strukturu DNA, otevírají genetikům dveře ke šlechtění na nové specifické znaky. Po celém světě pracují laboratoře na mapování genomu. Získané znalosti v oblasti genomu či zdokonalení molekulárních technik jsou ceněny zejména pro svoje využití ve šlechtitelských programech. U řady živočišných druhů je známo jak na sebe jednotlivé lokusy v chromozomech navazují, případně, které alely se vyskytují u jednotlivých jedinců. Bohužel zatím pouze u některých lokusů víme, co ovlivňují (Příbyl a Příbylová, 2005).

Stále doplňovanou oblastí genetiky je soubor genetických markerů asociovaných s různými užitkovými vlastnostmi hospodářských zvířat, které se využívají v moderních postupech šlechtění. Mezi hlavní cíle patří zkonstruovat moderní DNA techniky, získávat nové poznatky o identifikaci, variabilitě a asociacích SNPs u hospodářských zvířat a z nich vytvořit funkční základnu schopnou implementovat tyto genetické markery do inovací živočišné produkce v ČR. V dnešní době jsou známé a využitelné např. markery pro bezrohost skotu, marker pro myostatin a marker pro křehkost masa (Dvořák *et al.*, 2005).

## 2.6.4 ŠLECHTĚNÍ NA PLODNOST

Studium dědičnosti zdraví a selekce na rezistenci k chorobám představují perspektivní směry v dnešním chovu užitkových zvířat (Hála *et al.*, 2000).

Celosvětově se šlechtění na plodnost věnuje malá pozornost. Hlavním důvodem je nízká dědivost plodnosti a vysoký vliv prostředí a chovných podmínek. Příklady z praxe jasně potvrzují, že plodnost představuje stále se prohlubující problém. I přes nízké koeficienty dědivosti bude nezbytné plodnosti věnovat větší pozornost (Bartoň, 2000). Z důvodu velmi nízké míry dědivosti se pro plodnost hledají nepřímé znaky (indikátory), které se zjišťují snadněji, zjišťují se ještě v průběhu života a mají vyšší genetické parametry než znaky plodnosti (Motyčka, 2005). Konkrétně lze říci, že dědičnost plodnosti jako vlastnost, která je polygenně založená, je v úzkém vztahu s konstitucí a její dědičností. Proto je úkolem chovatele zařazovat do plemenitby jedince s pevnou konstitucí a dědičně podmíněným stabilním neuroendokrinním systémem (Louda *et al.*, 2007).

I přes poměrně obtížné stanovení míry heritability vlastností ejakulátu byl v řadě studií nalezen průkazný vztah mezi hodnocením plodností býků na základě výsledků umělé inseminace a vlastnostmi ejakulátu, konkrétně aktivitou spermií (Karoui *et al.*, 2011).

## 2.7 GENETICKÝ POLYMORFISMUS

V genomu lze pozorovat velkou genetickou variabilitu. Velkými změnami v genomu jsou delece, duplikace, inverze a translokace. Dále existují změny střední velikosti, což jsou delece, inserce a inverze velikosti od 1kb do 1Mb. Nejčastějšími změnami genomu jsou malé změny, a to inserce nebo delece jednoho nebo několika málo nukleotidových párů (Snustad a Simmons, 2009).

### 2.7.1 JEDNONUKLEOTIDOVÝ POLYMORFISMUS (SNP)

Substituce jednoho páru nukleotidů jsou příčinou velkého počtu jednonukleotidových polymorfismů (z anglického: single nucleotide polymorphisms, SNP) (Snustad a Simmons, 2009). V průměru SNP zaujímají více než jedno 1% z celé DNA. Většina SNP se nachází mimo kódující oblasti genů a není příčinou mutantních fenotypů. S rozvojem technologií metod molekulární biologie dochází k snadné detekci SNP v genomu, stanovení rozdílů mezi jedinci a identifikaci SNP, které mají přímý vliv na vybranou vlastnost. SNP hrají důležitou roli v selekci a diagnóze genetických znaků (Zeller a Hessler, 2005; Kwok, 2003).

Pro detekci a identifikaci jednonukleotidových mutací bylo vyvinuto velké množství laboratorních metod. Mezi nejčastěji používané metody patří jednoduchá, dobře reprodukovatelná a ekonomicky nenáročná metoda polymerázové řetězové reakce – polymorfismus délky restrikčních fragmentů (z anglického: polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism - PCR – RFLP) (Griffiths *et al.*, 2010; Kwok a Chen, 2003).

Vzhledem ke svému četnostem a distribuci v genomu se SNP osvědčily jako cenné genetické markery (Snustad a Simmons, 2009).

### 2.7.2 GENETICKÉ MARKERY

Genetické markery jsou početné, jednoduše identifikovatelné polymorfní úseky DNA, které vykazují asociaci na sledované znaky (Zeller a Hessler, 2005). Pomocí DNA markerů je možné detekovat rozdíly v genetické informaci mezi analyzovanými druhy/populacemi/klony/jedinci/buňkami. DNA markery je možné aplikovat u všech organismů, kde je zvládnutá technika izolace DNA (Cano *et al.*, 1993). Existují příčinné a vazbové markery (Zeller a Hessler, 2005).

Oproti klasickým genetickým znakům, mezi které jsou například řazeny krevní skupiny, biochemické markery a zbarvení mají molekulárně genetické markery některé významné výhody: 1) jsou většinou vysoce informativní – existuje více alel pro jeden marker nebo velký počet dvoualelických markerů, 2) mohou být určovány z jakékoliv tkáně odebrané jedincům v libovolném věku a 3) DNA může být dlouhodobě skladována a testace provedena podle potřeby i po smrti jedince (Knoll, 2010; Cano *et al.*, 1993).

Podle využití genetických markerů při mapování genomu je možné genetické markery rozdělit do těchto kategorií:

Markery I typu – kódující, strukturní geny, využívají se ke komparativnímu mapování, při ověřování rodokmenu mají malý význam z důvodu nízkého polymorfismu.

Markery II typu – minisatelity a mikrosatelity, vysoce polymorfní markery, mají význam při ověřování rodokmenu, identifikaci osob.

Markery III typu – většinou jednonukleotidové polymorfismy (z anglického: single nucleotide polymorphism – SNP), které poskytují informace o variabilitě genů v populacích a jsou perspektivními markery produkčních vlastností hospodářských zvířat (Říha, 2008; O'Brien *et al.*, 1999).

Molekulární markery je možné jednoduše dělit podle technologie jejich použití a podle charakteru jejich polymorfismu: a) Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (z anglického: Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP), b) Mikrosatelity (z anglického: Simple Sequence Repeats – SSR) c) Jednonukleotidový polymorfismus (z anglického: Single Nucleotide Polymorphism) (Zeller a Hessler, 2005; Johnson, 2004).

### **2.7.3 SELEKCE ZA PODPORY MARKERŮ (MAS)**

Selekce za podpory markerů (z anglického: marker assisted selection – MAS) je kombinace tradičních technik selekce a genetiky a molekulární biologie. MAS využívá výsledků testování DNA v selekci jedinců, kteří se mají stát rodiči příštích generací zvířat. Umožňuje výběr genů prokazatelně ovlivňujících vybrané užitkové vlastnosti (Zeller a Hessler, 2005). Provádění MAS vyžaduje zavedení jednotných technik provádění. Správný sběr a skladování DNA, genotypizace a analýza dat (Dekkers, 2004).

I přesto, že pracujeme s dlouhodobě šlechtěnými plemeny, vlivem křížení a dovozem cizích plemenů dochází k porušení ustálených četností a vazeb mnoha alel. Z tohoto důvodu je výhodné použít genetické markery k urychlení šlechtění. Pokud se prokáže vztah mezi markerem a užitkovostí, lze v rámci rodiny provést selekci mezi mladými zvířaty bez vlastní

známé užitkovosti, čímž je dosahováno vyšší intenzity selekce (Příbyl a Bouška, 2006). Je třeba detekovat variabilní markery uvnitř plemene (Dekkers, 2004).

Některé chovatelské společnosti trvale spolupracují s molekulárně-genetickými laboratoři a využívají genetických markerů při předselekcii mladých býků před testací. Vzhledem k tomu, že účinnost MAS je vázána na určité rodiny a určitá období selekce, je nutno trvale hledat nové markery (Příbyl a Příbylová, 2005).

Identifikace vysoce polymorfních genetických markerů a rozsáhlé vypracování genetických map umožňuje rozčlenění genetické proměnlivosti pro kvantitativní vlastnosti a využití chromosomálních oblastí a genů pro selekci. Reprodukční vlastnosti jsou výhodnými kandidáty pro aplikaci markerů či markerů podporující selekci (Říha *et al.*, 2004).

V rámci šlechtění na kvantitativní užitkové vlastnosti mohou mít některé geny větší roli. Jedná se o tzv. kandidátní geny, u kterých je předpokládán přímý vliv na užitkové vlastnosti. Kandidátní gen může být rozpoznán laboratorními postupy (Bouška *et al.*, 2006).

Dosud byla publikována řada studií používajících kandidátní gen jako marker pro kvalitu ejakulátu u myši a koní (Leeb, 2007), kanců (Lin *et al.*, 2006), kozlů (Wang *et al.*, 2011) a v neposlední řadě i u holštýnských býků (Yang *et al.*, 2011, Gorbani *et al.*, 2009).

## 2.8 METODY ANALÝZY DNA

### 2.8.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (z anglického: polymerase chain reaction – PCR) je proces, během kterého dochází k rychlé amplifikaci (zmnožení) nukleových kyselin (Griffiths *et al.*, 2010; Snustad a Simmons, 2009) a probíhá v podmínkách *in vitro*, tedy bez použití živých organismů (Alberts *et al.*, 1998). Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců sledovaných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5' → 3' prostřednictvím DNA-polymerázy (Šmarda *et al.*, 2008.). Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou krátkých, jednořetězcových úseků - primerů vázajících se na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'- konce směřují proti sobě (Griffiths *et al.*, 2010). Přidáním DNA-polymerázy a nukleotidů probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně (Šmarda *et al.*, 2008.). Metoda PCR je proces, během nějž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají tři kroky, během nichž v reakci probíhají tři odlišné děje s různými nároky na teplotu:

- **denaturace**: porušení vodíkových můstků spojujících dva řetězce molekuly DNA (94 - 95°C)

- **annealing** (nasednutí primerů): připojení primerů na specifická místa oddělených jednovláknových řetězců DNA (30-65°C)
- **syntéza DNA**: prodlužování primerů prostřednictvím enzymu DNA-polymerázy (65-75°C).

Reakce se provádějí v přístroji nazývaném termocykler, který umožňuje automatické změny teplot v načasovaných intervalech. Celý proces se mnohokrát opakuje, dokud není dosaženo požadovaného stupně amplifikace úseku cílové molekuly DNA (Snustad a Simmons, 2009; Šmarda *et al.*, 2008; Brown, 2007; Sambrook *et al.*, 1989). Mezi nejpoužívanější separační techniky při izolaci a analýze nukleových kyselin patří elektroforéza. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul, v tomto případě negativně nabitě fosfátové skupiny v nukleových kyselinách, v elektrickém poli. Elektrické pole v tomto případě obvykle představuje agarózový gel. Výsledky gelové elektroforézy lze nejlépe pozorovat tak, že gel obarvíme látkou, která DNA zviditelní, nejčastěji je používán ethidiumbromid. Po osvětlení ultrafialovým světlem jsou molekuly DNA na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita viditelnosti je úměrná koncentraci DNA (Šmarda *et al.*, 2008; Brown, 2007).

PCR je hlavní metodou používanou pro detekci. Umožňuje s minimálními pracovními a materiálovými náklady získat požadované výsledky. Takto je možné získat základní informace o zátěži plemenných zvířat nežádoucími recesivními geny, což je první krok ve zlepšení genofondu skotu. V praxi to znamená prověřit všechny plemeníky, kteří se používají v umělé inseminaci na přítomnost nežádoucích recesivních genů a do dalšího chovu vybrat pouze ty, kteří budou ve všech testech negativní. Takto praktikované genetické poradenství není zvláštní službou pouze u skotu, ale využívá se i u dalších hospodářských zvířat, na příklad u koní a prasat (Hála *et al.*, 2000).

### **2.8.2 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE - POLYMORFISMUS DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ (PCR-RFLP)**

Polymerázová řetězová reakce je používána v široké škále variant, které jsou upraveny podle toho, zda je potřeba detekovat sekvenční polymorfismy, provádět molekulární identifikaci nebo modifikovat sekvence nukleových kyselin. Stanovení polymorfismu délky restričních fragmentů produktů PCR (PCR-RFLP) je modifikace standardní PCR používaná pro typizaci cílové sekvence, obvykle určitého genu, který obsahuje sekvenční polymorfismus. Výsledkem amplifikace jsou produkty PCR o stejné délce, které se detekují

elektroforeticky. Agarózová gelová elektroforéza slouží také ke zjištění restrikčních míst na amplifikovaném úseku DNA, které jsou na gelu viditelné po rozštěpení restrikční endonukleázou. Velikost fragmentů DNA závisí na přesné pozici rozpoznávacích sekvencí pro restrikční endonukleázu v původní molekule (Šmarda *et al.*, 2008; Brown, 2007). Dojde-li vlivem mutací ke změně nukleotidové sekvence v cílových místech pro štěpící restrikční enzymy, přestanou být tato místa enzymy rozpoznávána. Jiné mutace mohou naopak nová restrikční místa tvořit. Takové mutace způsobují variabilitu v délce fragmentů DNA vzniklých štěpením různými restrikčními enzymy. RFLP představují fenotypy využívané ke klasifikaci potomstva (Snustad a Simmons, 2009).

## **2.9 PŘEHLED TESTOVANÝCH POLYMORFISMŮ**

### **2.9.1 LEP**

V genetickém výzkumu skotu byl odhalen gen, který nese kód pro produkci proteinu leptinu, což otvírá možnosti šlechtění na vysokou užitkovost (Motyčka *et al.*, 2005).

Gen kódující hormon leptin leží na bovinním chromozomu 4 (Pomp *et al.*, 1997). Leptin je protein, jehož molekula je tvořena 146 aminokyselinami, hormon syntetizovaný převážně adipocyty (Komisarek a Antkowiak, 2007). Podílí se na regulaci příjmu potravy, energetické bilanci a celkovém metabolismu (Macajova *et al.*, 2004; Ji *et al.*, 1998). Dále byl zjištěn vliv na znaky plodnosti (Goumenou *et al.*, 2003).

Gen pro leptin obsahuje několik SNP v kódujících částech genu (exonech) i v nekódujících úsecích (intronech) a několik vysoce polymorfních mikrosatelitních markerů. Gen pro leptin se skládá ze třech exonů, přičemž první z nich není transkribován na protein (Lagonigro *et al.*, 2003).

Bylo detekováno několik polymorfismů korelujících se změnami dojivosti a obsahu mléčných složek (Kulig *et al.*, 2009; Chebel *et al.*, 2008). Byl prokázán vliv polymorfismu R4C v exonu 2 na dojivost a konverzi krmiva (Liefers *et al.*, 2002). Komisarek a Antkowiak (2007) studovali tři známé polymorfismy v promotoru a exonu 2 a 3. Konkrétně to byly R4C, A59V a C(-963)T, kdy byly zjištěny pozitivní korelace polymorfismu A59V na vybrané reprodukční ukazatele krav. Ve studii Oikonomou *et al.* (2008) byl potvrzen vliv polymorfismů genu pro Leptin na zvýšení dojivosti, ale zhoršení odolnosti zvířat na onemocnění mastitidami. Komisarek (2010), Liefers *et al.* (2005) poukazují na polymorfismus C(-963)T umístěný v promotoru, který pravděpodobně nezpůsobuje změnu proteinového řetězce, ale poukazují na možný vliv na míru exprese leptinu.

### 2.9.2 *DGATI*

Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (*DGATI*) je enzym katalyzující poslední krok v syntéze nejdůležitějších mléčných lipidů – triacylglycerolů (Anton *et al.*, 2012; Farese *et al.*, 2000).

Knockoutem myšního genu *DGATI* byla prokázána jeho klíčová role v laktaci (Smith *et al.*, 2000). U skotu je považován za velmi důležitý kandidátní gen pro mléčnou užitkovost a obsah tuku v mléce (Farnir *et al.*, 2002).

Gen *DGATI* je lokalizován na konci centromery bovinního chromozomu 14 (Gautier *et al.*, 2007; Kühn *et al.*, 2004; Grisart *et al.*, 2002). V genu *DGATI* byly identifikovány dva polymorfismy. Konkrétně to byla změna jedné alely v úseku variabilního počtu tandemových repetitiv (VNTR) a v exonu 8 umístěná netradiční dinukleotidová substituce lysinu za alanin na pozici 10 433 a 10 434 a v pozici 232 kódujícího proteinu (*K232A*). Bylo zjištěno, že lysinová varianta genu *DGATI* má vliv na vyšší obsah tuku a proteinu v mléce, zatímco alaninová způsobuje nárůst mléčné užitkovosti (Komisarek *et al.*, 2004). *K232A* polymorfismus tedy pozitivně ovlivňuje dojivost a obsah mléčných složek (Anton *et al.*, 2012; Gautier *et al.*, 2007; Kaupe *et al.*, 2007; Sanders *et al.*, 2006; Winter *et al.*, 2002), ale zároveň negativně ovlivňuje reprodukční vlastnosti (Oikonomou *et al.*, 2008). Dále byl zjištěn možný pleiotropní efekt tohoto polymorfismu na vybrané reprodukční ukazatele (Ashwell *et al.*, 2004).

Ve studii Komisarek a Michalak (2008) bylo zjištěno, že homozygotní býci AA mají vyšší plemenné hodnoty pro test nepřebíhavosti po první inseminaci u jalovic i krav. Na druhé straně alelická varianta *KK* má pozitivní vliv na plemenné hodnoty tří sledovaných ukazatelů plodnosti, konkrétně věk při první inseminaci, servis perioda a inseminační interval. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Oikonomou *et al.*, (2008), kdy byl potvrzen pozitivní vliv polymorfismu na mléčnou užitkovost, ale negativní vliv na sledované reprodukční ukazatele, konkrétně na počet inseminací nutných k zabřeznutí.

### 2.9.3 *SPAG11*

Se spermii asociovaný antigen 11 (z anglického: sperm-associated antigen 11 – *SPAG11*) je rozhodující v samčím pohlavním ústrojí (Liu *et al.*, 2011).

*SPAG11* gen je umístěn na bovinním chromozomu 27, uvnitř shluku beta-defensiních genů, který se skládá z 8 exonů a 7 intronů (Avellar *et al.*, 2007). Defensiny jsou

antimikrobiální peptidy, které podporují přirozenou obranu hostitele proti bakteriím, houbám a virům (Lehrer a Ganz, 2002).

Existuje několik izoforem genu *SPAG11*, které byly detekovány v různých tkáních reprodukčního traktu býka. Konkrétně to je *SPAG11C*, *SPAG11E*, *SPAG11U*, *SPAG11D*, *SPAG11V* a *SPAG11W*. *SPAG11* gen je známý také jako epididymální protein 2 (*EP2*) u opic a jako lidský epididymis 2 (*HE2*) a zajišťuje imunitu a reprodukční funkce u lidí, krys a skotu (Yenugu *et al.*, 2006).

Podle Yenugu *et al.* (2006) je u opic a krys exprese genu *SPAG11* pozitivně regulovaná androgeny. U skotu se na expresi kromě androgenů navíc podílí i hormony nebo extracelulární signály. Proto se mutace genu *SPAG11* jeví jako kandidátní pro ukazatele reprodukce (Avellar *et al.*, 2007).

Ve studii Liu *et al.* (2011) bylo detekováno 6 jednonukleotidových polymorfismů. Ve vazebné nerovnováze byly jednonukleotidové polymorfismy 1306G>A a 1454G>A (SNP-1); 16904G>T, 16974C>T a 17000A>G (SNP-2) a 22696T>C (SNP-3). Korelační analýza prokázala statisticky významný vliv SNP-2 na aktivitu a hustotu čerstvého ejakulátu a SNP-3 na aktivitu spermií rozmrazeného ejakulátu. V této disertační práci jsme se zaměřili na jedno- nebo dinukleotidové substituce, proto jsme si vybrali 1454G>A (*SPAG11-P2*), který byl detekován na intronu 2 a polymorfismus 22696T>C (*SPAG11-P8*) lokalizovaný na intronu 8. I když introny nekódují proteiny, bylo prokázáno, že hrají důležitou roli v regulaci a expresi genu (Nott *et al.*, 2003). Liu *et al.* (2011) zjistili, že jedinci s alelickou kombinací *TC* polymorfismu 22696T>C mají průkazně vyšší aktivitu spermií po rozmrazení ejakulátu, ale zároveň i vyšší procento morfologických abnormalit spermií. Homozygoti *TT* se vyznačovali neprůkazně vyššími hodnotami ukazatelů čerstvého ejakulátu. Pro tento polymorfismus se nepodařilo detekovat genotyp *CC*, což může být způsobeno eliminací býků s tímto genotypem z populace metodou umělé selekce a šlechtění z důvodu jejich nízkých kvantitativních i kvalitativních ukazatelů.

#### **2.9.4 PLCz**

Fosfolipáza C (PLC) je hydrolytický enzym, který se svým působením podílí na aktivaci transportních proteinů. Aktivovaná fosfolipáza C štěpí uvnitř membrány fosfatidylinositol – 4,5 – bisfosfát (PIP<sub>2</sub>), z něhož vzniká inositol-1,4,5-trifosfát (IP<sub>3</sub>) a diacylglycerol (DG). IP<sub>3</sub> difunduje do cytoplazmy, kde působením na receptory endoplazmatického retikula vede k uvolňování Ca<sup>2+</sup> do cytoplazmy. Vzestup koncentrace



kalcia v cytoplazmě se podílí na aktivaci transportních proteinů (Trojan *et al.*, 2003). V savčích vajíčkách byly nalezeny extrakty spermií bohaté na  $IP_3$  (Wu *et al.*, 2001). Toto zjištění poukazuje na účast enzymu, jehož produktem štěpné reakce je právě  $IP_3$ , v procesu přenosu signálu během spermatogeneze a aktivace oocyty, což stimuluje začátek normálního embryonálního vývoje (Rice *et al.*, 2000; Stricker, 1999). Dosud je známo 12 izoenzymů fosfolipázy C. Izoformy enzymu PLC -  $\beta, \gamma$  a  $\delta$ , které jsou přítomny ve spermiích, nebyly prokázány během oscilace  $Ca^{2+}$  (Wu *et al.*, 2001). Pro spermie specifická fosfolipáza C zeta (*PLCz*) byla identifikována jako kandidátní spermie-oocyt aktivující faktor, který spouští charakteristickou řadu fyziologických podnětů cytoplazmatických  $Ca^{2+}$  oscilací během oplodnění (Kouchi *et al.*, 2004; Pan *et al.*, 2013), což bylo potvrzeno ve studii Saunders *et al.* (2002), kdy prokázali přítomnost této izoformy *PLCz* při aktivaci vajíčka a je tedy nezbytným proteinem pro oplození a vývoj embrya. Ve studii Pan *et al.* (2013) byly identifikovány dva nové polymorfismy -456 G>A a +65 T>C v 5'přilehlé oblasti bovinního *PLCz* genu. Substituce tyminu cytosinem (mutace *PCLZ*<sub>+65T>C</sub>) způsobuje vymizení vazebného místa transkripčního faktoru CdxA, což umožňuje sledovat regulaci transkripce *PLCz* genu u skotu. Proto je této mutace využito k detekci variant *PLCz* genu v této práci. V prozatím jediné provedené asociační analýze tohoto polymorfismu a ukazatelů čerstvého a rozmrazeného ejakulátu býků byly detekovány všechny tři možné genotypy. Zároveň byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi genotypy pro množství ejakulátu, kdy nejvyšších hodnot dosahovali jedinci s genotypem CC (Pan *et al.*, 2013).

### 3 VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Na základě zjištěných skutečností z výše citované literatury byly stanoveny následné hypotézy práce předpokládající, že:

- polymorfismy vybraných genů *LEP*, *DGATI*, *SPAG11* a *PLCz* budou u býků českého strakatého a holštýnského skotu vykazovat obdobné zastoupení alel a genotypů, jako v jiných populacích skotu,
- polymorfismy genů *LEP*, *DGATI*, *SPAG11* a *PLCz* mají průkazný vliv na kvantitativní i kvalitativní vlastnosti čerstvého ejakulátu býků,
- polymorfismy genů *LEP*, *DGATI*, *SPAG11* a *PLCz* mají průkazný vliv na aktivitu spermií rozmrazeného ejakulátu býků,
- věk býka, sezóna odběru ID, plemeno, inseminační stanice a doba skladování ID mají průkazný vliv na kvantitativní i kvalitativní vlastnosti čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků.

Ze stanovených hypotéz vyplývají následující cíle práce:

- 1) Detekovat polymorfismy genů *LEP*, *DGATI*, *SPAG11* a *PLCz* u vybrané populace českých holštýnských a českých strakatých plemenných býků.
- 2) Definovat úroveň a průkaznost vlivu detekovaných polymorfismů genů *LEP*, *DGATI*, *SPAG11* a *PLCz* na kvantitativní i kvalitativní vlastnosti čerstvého ejakulátu vybraných plemenných býků
- 3) Definovat úroveň a průkaznost vlivu detekovaných polymorfismů genů *LEP*, *DGATI*, *SPAG11* a *PLCz* na aktivitu spermií rozmrazeného ejakulátu sledovaných plemenných býků
- 4) Definovat úroveň a průkaznost vlivu věku býka, sezóny odběru ID, plemene, inseminační stanice a doby skladování ID na kvantitativní i kvalitativní vlastnosti čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 STRUKTURA SLEDOVANÉ POPULACE

Do studie bylo zahrnuto celkem 217 býků narozených v letech 1993 – 2012. Sledovaná populace se skládala ze 118 dospělých býků českého strakatého plemene, linií AMT, BA, BD, BCH, BJR, EG, HEL, HG, HCH, NIC, MOR, RAD, TAR, TON a UF, a 99 býků holštýnského plemene, linií NBY, NEA, NEB, NEO, NGA, NXA, NXB a RED. Tito býci byli používáni pro odběr ejakulátu a výrobu inseminačních dávek na pěti českých inseminačních stanicích. U těchto plemenů byly stanoveny polymorfismy v genech *LEP*, *DGATI*, *SPAG11* a *PLCz*. DNA potřebná pro genetické analýzy byla izolována z inseminačních dávek. Údaje o opakovaných odběrech čerstvého ejakulátu od každého býka byly převzaty z databází inseminačních stanic, kde jsou dostupné záznamy o celoživotní plemenné aktivitě býka. Od každého jedince jsou zaznamenány údaje z 1-484 odběrů. Jedná se o 40 420 údajů o čerstvých ejakulátech z let 1997 až 2013. V rámci hodnocení aktivity rozmrazeného ejakulátu byly z inseminačních stanic získány běžně prodejné inseminační dávky od býků zařazených do naší populace. Bylo hodnoceno 464 inseminačních dávek býků českého strakatého plemene a 372 dávek holštýnských býků. Celkem tedy bylo použito 835 inseminačních dávek z let 1997 až 2013.

### 4.2 GENETICKÁ ANALÝZA SOUBORU

#### 4.2.1 IZOLACE DNA

Genomická DNA byla extrahována z ID (0,25 cm<sup>3</sup>) skladovaných při -20 °C. ID byly po rozmrazení v teplé vodní lázni (38-40 °C) naředěny 0,29 % fyziologickým roztokem (0,5 ml). DNA byla izolována ručně pomocí komerčního kitu DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen, Germany) s aplikací specifického lyzačního kroku pomocí pufru X2 nutného pro izolaci DNA ze spermatu. Výsledná koncentrace DNA byla 20-40 ng/μl.

## 4.2.2 STANOVENÍ JEDNOTLIVÝCH POLYMORFISMŮ

### 4.2.2.1 LEP

V této práci byl sledován jednonukleotidový polymorfismus *C(-963)T*, který se nachází v promotoru genu a ovlivňuje míru genové exprese. Polymorfismus je rozeznáván restričním enzymem *DraI*, který rozeznává a štěpí restriční místo o sekvenci 5'...TTT↓AAA... 3'.

Pro detekci polymorfismu *C(-963)T* byla použita metoda PCR-RFLP dle Komisarek a Antkowiak (2007) upravená pro podmínky naší laboratoře. Pro amplifikaci 295 bp dlouhého fragmentu DNA byly použity primery: kódující (F): 5'- GTG ATC AGA AAA CAC ATA CCA TTT TAT AAT -3', antikódující (R): 5'- GCC TGG TTG TTT TGC TTT TAA TAA TTA TCT T -3'(KRD, Czech Republic). PCR reakční směs ve 25 µl obsahovala 20-40 ng genomické DNA, 1 U *LA* polymerázy (Top-Bio, Czech Republic), 200 µM PCR dNTP mix (Top-Bio, Czech Republic), 0,4 µM každého primeru (KRD, Czech Republic), 2 % DMSO (Top-Bio, Czech Republic), 2 mM MgCl<sub>2</sub> (Top-Bio, Czech Republic), 1xPCR pufr (Top-Bio, Czech Republic) a doplnění ddH<sub>2</sub>O do 25 µl. PCR reakce probíhala ve standardním termocykleru (BioRad, USA). Samotná PCR reakce se skládala z úvodní denaturace při 95 °C po dobu 2 min. Poté následovalo 31 cyklů tvořených denaturací DNA při 95 °C (1 min), anelací při 55 °C (20 s) a elongací při 68 °C (20 s). V posledním cyklu byla elongace prodloužena na 6 min a následovalo konečné zchlazení a uschování PCR produktů při 4 °C. Získané PCR produkty byly následně štěpeny 2 U restriční endonukleázy *DraI* (Biogen, Czech Republic). Inkubace probíhala při 37 °C po dobu 12 hod (termostat Memmert, Germany). PCR-RFLP fragmenty byly separovány a vyhodnoceny elektroforeticky na 3,5 % agarózovém gelu (BioRad, USA) obarveném ethidium bromidem (EtBr). Pokud je v restričním místě cytosin zaměněn za thymin dochází ke štěpení, a proto je přítomnost alely *T* prezentována dvěma viditelnými fragmenty o délce 268 bp a 27 bp.

### 4.2.2.2 DGATI

V případě genu *DGATI* byla analyzována dinukleotidová substituce *K232A* nacházející se na exonu 8. Polymorfismus je rozeznáván restriktázou *BglI*, která štěpí restriční místo o sekvenci 5'...GCCNNNN↓NGGC... 3'.

Způsob detekce alelických variant *DGATI* genu se provádí na principu PCR-RFLP dle Komisarek a Michalak (2008). K amplifikaci potřebného úseku DNA byly použity primery:

F: 5'- TGC CGC TTG CTC GTA GCT TTG GCC -3' a R: 5'- ACC TGG AGC TGG GTG AGG AAC AGC -3'(KRD, Czech Republic). PCR reakční směs obsahovala 20-40 ng genomické DNA, 1 U *LA* polymerázy (Top-Bio, Czech Republic), 1xPCR pufr (Top-Bio, Czech Republic), 200  $\mu$ M PCR dNTP mix (Top-Bio, Czech Republic), 0,2  $\mu$ M každého primeru (KRD, Czech Republic), 2 % DMSO (Top-Bio, Czech Republic), 1,5  $\mu$ M  $MgCl_2$  (Top-Bio, Czech Republic) a do 25  $\mu$ l doplnění ddH<sub>2</sub>O. Samotná PCR reakce probíhala ve standardním termocykleru (BioRad, USA) a skládala se z počáteční denaturace při 95 °C po dobu 2 min, následovalo 30 cyklů, kdy se opakovala denaturace DNA při 95 °C (30 s), anelace při 58,5 °C (30 s) a elongace při teplotě 68 °C (30 s). V posledním cyklu byla konečná elongace prodloužena na 7 min. Následovalo konečné zchlazení a uschování PCR produktů při 4 °C. Získané 378 bp dlouhé PCR fragmenty byly následně štěpeny 2 U restriční endonukleázy *Bgl*I (Biogen, Czech Republic) při 37°C po dobu 12 hod (termostat Memmert, Germany). PCR-RFLP produkty byly separovány a vyhodnoceny elektroforeticky na 3,5 % agarózovém gelu (BioRad, USA) obarveném EtBr. V případě přítomnosti alel kódujících alaninovou variantu (A) byl PCR produkt štěpen na tři fragmenty dlouhé 254 bp, 96 bp a 28 bp. Pokud byly přítomny alely kódující lysinovou variantu (K) byly na gelu viditelné dva fragmenty dlouhé 282 bp a 96 bp.

#### 4.2.2.3 *SPAG11*

Do naší asociační studie byly dále zahrnuty dva jednonukleotidové polymorfismy v genu *SPAG11*. Prvním z nich byl polymorfismus nacházející se v intronu 2 *SPAG11-P2* na pozici 1454G>A, který je rozeznáván restriktázou *Pst*I metodou PCR-RFLP dle Liu *et al.* (2011) upravené dle podmínek naší laboratoře. Druhým sledovaným byl polymorfismus *SPAG11-P8* na pozici 22696T>C rozeznáván restriktázou *Eco*72 detekovaný modifikovanou metodou PCR-RFLP, dle Liu *et al.* (2011) upravenou dle podmínek naší laboratoře.

V případě prvního polymorfismu byly pro amplifikaci 308 bp dlouhého PCR fragmentu DNA použity primery: F: 5'- TAA GTG ACA GAG CCC GGG AT-3' a R: 5'- AGC AGG CAG ACC ACA GTA TG-3'(KRD, Czech Republic). PCR reakční směs obsahovala 20-40 ng genomické DNA, 1x PPP Master mix (Top-Bio, Czech Republic), 0,3  $\mu$ M každého primeru (KRD, Czech Republic) a do 17  $\mu$ l doplnění ddH<sub>2</sub>O. PCR reakce probíhala ve standardním termocykleru (East Port Scientific, Czech Republic). Samotná polymerázová řetězová reakce se skládala z úvodní denaturace při 94 °C po dobu 5 min, následovalo 35 cyklů tvořených denaturací DNA při 94 °C (30 s), anelací při 52 °C (30 s) a

elongací při 72 °C (30 s). V posledním cyklu byla konečná elongace prodloužena na 7 min a následovalo konečné zchlazení a uschování PCR produktů při 4 °C. Získané PCR fragmenty byly poté přes noc inkubovány a štěpeny při 37 °C po dobu 12 hod (termostat Memmert, Germany) s 10 U restriční endonukleázy *PstI* (Biogen, Czech Republic). Získané PCR-RFLP fragmenty byly separovány a hodnoceny elektroforeticky na 3,5 % agarózovém gelu (BioRad, USA) obarveném EtBr.

Pro detekci druhého sledovaného polymorfismu, nacházející se na exonu 8, byla použita modifikace metody PCR-RFLP, tzv. ACRS-PCR, kdy se pro štěpení využívá uměle vytvořeného restričního místa. Pro amplifikaci 166 bp dlouhého fragmentu DNA byly použity primery: F 5'- GAA GAG TCT CCA CCA CGA AT-3', R 5'- CCT TTT GGC TAA GAT CAC G-3' (KRD, Czech Republic). PCR reakční směs obsahovala 20-40 ng genomické DNA, 1x PPP Master mix (Top-Bio, Czech Republic), 0,3 μM každého primeru (KRD, Czech Republic) a doplnění ddH<sub>2</sub>O do 17 μl. Režim PCR byl založen na úvodní denaturaci při 94 °C po dobu 5 min. Poté následovalo 35 cyklů tvořených denaturace DNA při 94 °C (30 s), anelací při 54 °C (30 s) a elongací při 72 °C (30 s). V posledním cyklu byla konečná elongace prodloužena na 7 min a následovalo konečné zchlazení a uschování PCR produktů při 4 °C. Získané PCR fragmenty byly následně štěpeny po dobu 12 hod při 37 °C (termostat Memmert, Germany) se směsí 8 U restriktázy *Eco72* (Biogen, Czech Republic). ACRS-PCR fragmenty byly separovány a vyhodnoceny elektroforeticky na 3,5 % agarózovém gelu (BioRad, USA) obarveném EtBr.

#### 4.2.2.4 *PLCz*

V případě genu *PLCz* bylo pro asociační analýzu využito jednonukleotidové substituce *g. +65 T>C* v 5 přilehlé oblasti genu. Polymorfismus je rozeznáván restričním enzymem *BsrI*, který štěpí restriční místo o sekvenci 5'...ACTGGN↓...3'. Amplifikací vzniká 344 bp dlouhý PCR fragment. Alelová varianta *CC* je prezentována PCR-RFLP fragmenty o délce 256/142 bp a alelová varianta *TT* PCR-RFLP fragmenty o délce 205/142 bp.

Pro detekci polymorfismu *+65 T>C* byla použita metoda PCR-RFLP dle Pan *et al.* (2013) upravená pro podmínky naší laboratoře. Pro amplifikaci sledovaného fragmentu DNA byly použity primery: F 5'- GGA CCC AAA GGA AAA CAT GA -3', R 5'- TTT TCC CAT GAA CAG CCA TC -3' (KRD, Czech Republic). PCR reakční směs obsahovala 20-40 ng genomické DNA, 1x PPP Master mix (Top-Bio, Czech Republic), 0,3 μM každého primeru (KRD, Czech Republic) a do 17 μl doplnění ddH<sub>2</sub>O. PCR reakce probíhala ve

standardním termocykleru (East Port Scientific, Czech Republic). Samotný PCR režim se skládal z úvodní denaturace při 95 °C po dobu 3 min. Následovalo 35 cyklů tvořených denaturací DNA při 94 °C (45 s), anelací při 64 °C (1 min) a elongací při 72 °C (1 min). V posledním cyklu byla konečná elongace prodloužena na 4 min. Reakce pokračovala konečným zchlazením a uschováním PCR produktů při 4 °C. Získané PCR fragmenty byly následně inkubovány po dobu 12 hod při 37 °C (termostat Memmert, Germany) a štěpeny směsí 10 U restriční endonukleázy *Bsr*I (Biogen, Czech Republic). PCR-RFLP fragmenty byly separovány a vyhodnoceny elektroforeticky na 3,5% agarózovém gelu (BioRad, USA) obarveném EtBr.

#### **4.2.3 ELEKTROFORETICKÉ VYHODNOCENÍ**

Elektroforéza probíhala v prostředí 1x TBE, 3,5 % agarózovém gelu s obsahem EtBr (Top-Bio, Czech Republic) 30 – 50 min při stejnosměrném napětí o velikosti 5 V/cm. Pro porovnání délek PCR produktů i restričních fragmentů byl použit marker Gene Ruler 50 bp (Fermentas, Lithuania). Snímání agarózových gelů s viditelnými fragmenty DNA probíhalo pomocí transluminátoru MiniBIS Pro (DNR, Israel).

### **4.3 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ ČERSTVÉHO EJAKULÁTU**

V období 1997 až 2013 byl ejakulát od býků odebírán v 3 - 7 denních intervalech pomocí umělé vaginy různého typu na atrapu (jiného býka) nebo na fantom (odpruženou konstrukci). V současné době se nejčastěji používají 30 cm dlouhé, předem nahřáté, umělé vaginy vybavené jednorázovým sběračem kournoutovitého tvaru z polyetylénu nebo plastovou zkumavkou. Ihned po odběru je ejakulát předán do laboratoře k okamžitému vyšetření čerstvého ejakulátu a k dalšímu zpracování. Během celého procesu až do požadovaného chlazení se musí udržovat teplota ejakulátu 37 – 39 °C, proto se na vyšetření používají nahřáté laboratorní přístroje a pomůcky. Ze sběrače se odebírá vzorek k laboratornímu posouzení a poté se v něm semeno ředí.

V laboratoři je ejakulát hodnocen proškoleným personálem inseminační stanice dle standardní metodiky. Mezi vyšetření čerstvého ejakulátu patří stanovení aktivity (% - subjektivně, za pomoci mikroskopu), koncentrace ( $\text{mil}/\text{cm}^3$ - spektrofotometricky), množství (g – na automatické váze), přítomnost cizích přímísenin, barva, pach. Dále se provádí

morfologické vyšetření spermatu (stanovení počtu spermií s morfologickou vadou pod mikroskopem) a stanovuje se procento živých a mrtvých spermií (barvením).

Na základě tohoto vyšetření se poté semeno ředí komerčními, žloutkovými nebo bezžloutkovými ředidly na požadovanou koncentraci a plní se do plastových pejet o objemu 0,25 cm<sup>3</sup>. Ředěním se vytváří podmínky pro přežívání spermií mimo organismus a proces ředění by měl být zahájen do 15 minut po odběru. Pejety jsou dále zchlazeny na 4 °C, 90 min. ekvilibrovány a následně zmrazeny metodou postupného zmrazování na teplotu -105 °C v automatickém zmrazovači a poté uloženy do kontejneru s tekutým dusíkem při -196 °C.

#### **4.4 LABORATORNÍ VYŠETŘENÍ ROZMRAZENÉHO EJAKULÁTU**

Inseminační dávky byly rozmrazeny ve vodní lázni o teplotě 39 °C ± 1 °C a vloženy do předehřáté zkumavky s 0,5 ml 0,29 % fyziologického roztoku. Přežitelnost spermií je hodnocena pomocí rozdílné motility spermií ihned po rozmrazení a naředění za použití mikroskopu Eclipse E200 (Nikon, Japan) s destičkou předehřátou na 39 °C ± 1 °C. Dále se provádí krátkodobý tepelný test přežitelnosti spermií, kdy se jejich motilita hodnotí s odstupem 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení při teplotě 39 ± 1 °C v termostatu (Termoblock, FALC®). Po uplynutí 120 min byla směs obsahu inseminační dávky a fyziologického roztoku okamžitě použita k extrakci DNA nebo uskladněna při -20 °C.

#### **4.5 STATISTICKÁ ANALÝZA VÝSLEDKŮ**

##### **Stanovení alelové a genotypové četnosti**

Ze získaných údajů vznikla rozsáhlá databáze dat, která umožnila stanovit přehled o zastoupení alelových a genotypových frekvencí výše uvedených genů.

##### **Regresní a korelační analýza**

Z databáze shromážděných údajů byly vypočteny v programu SAS 9.2 (SAS Institute Inc. 2002 – 2005) regresní analýza a koeficienty korelace pomocí procedury REG a CORR.

##### **Asociační analýza**

Základní statistické charakteristiky byly vypočteny v programu SAS 9.2 (SAS Institute Inc. 2002 – 2005) pomocí procedury MEANS.



Vliv analyzovaných polymorfismů na sledované kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků byl hodnocen analýzou rozptylu s více proměnnými (MANOVA) s opakovatelností použitím GLM procedury v programu SAS 9.2. Průkaznost vlivu jednotlivých genotypů byla určena pomocí F-testu. Poté byly nalezené signifikantní rozdíly mezi skupinami s rozdílným genotypem stanoveny pomocí mnohonásobného porovnávání.

Pro vyhodnocení ukazatelů čerstvého ejakulátu byl použit následující model:

$$y_{ijkl} = \mu + A_i + S_j + B_k + G_l + e_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$  – sledovaný ukazatel (aktivita, hustota, množství)

$\mu$  – střední hodnota zkoumané populace

$A_i$  – pevný efekt věku býka (v měsících) v době odběru ( $i = 15 - 36, n = 4962; 37 - 60, n = 1063; 61 - 120, n = 3364$ )

$S_j$  – pevný efekt měsíce odběru býka ( $j = \text{březen} - \text{květen}, n = 2495; \text{červen} - \text{srpen}, n = 2279; \text{září} - \text{listopad}, n = 2353; \text{prosinec} - \text{únor}, n = 2262$ )

$B_k$  – pevný efekt plemene býka ( $k = \text{český strakatý skot}, n = 3625; \text{holštýnský skot}, n = 5764$ )

$G_l$  – pevný efekt zkoumaného genotypu

$e_{ijkl}$  – náhodný reziduální efekt

Pro vyhodnocení ukazatelů rozmrazeného ejakulátu byl použit následující model:

$$y_{ijkl} = \mu + T_i + B_j + I_k + G_l + e_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$  – sledovaný ukazatel (aktivita po rozmrazení za 0, 30, 60, 90, 120 min)

$\mu$  – střední hodnota zkoumané populace

$T_i$  – pevný efekt období od odběru do rozmrazení ID (v měsících) ( $i = 0 - 24, n = 323; 25-48, n = 226; 49 - 72, n = 133; 73 - 171, n = 153$ )

$B_j$  – pevný efekt plemene býka ( $j = \text{český strakatý skot}, n = 3625; \text{holštýnský skot}, n = 5764$ )

$I_k$  – pevný efekt inseminační stanice býka ( $k = 1.IS, n = 222; 2.IS, n = 258; 3.IS, n = 60; 4.IS, n = 160; 5.IS, n = 135$ )

$G_l$  – pevný efekt zkoumaného genotypu

$e_{ijkl}$  – náhodný reziduální efekt

## 5 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 5.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA SLEDOVANÉHO SOUBORU

V rámci sledování hodnot čerstvého ejakulátu byly shromážděny údaje od 118 býků českého strakatého (C) a 99 býků holštýnského plemene (H), respektive 3625 a 5764 pozorování. Přehled o počtu pozorování, průměru, směrodatné odchylce, mediánu, minimu a maximu aktivity, hustoty a množství čerstvého ejakulátu je uveden v Tabulce 1.

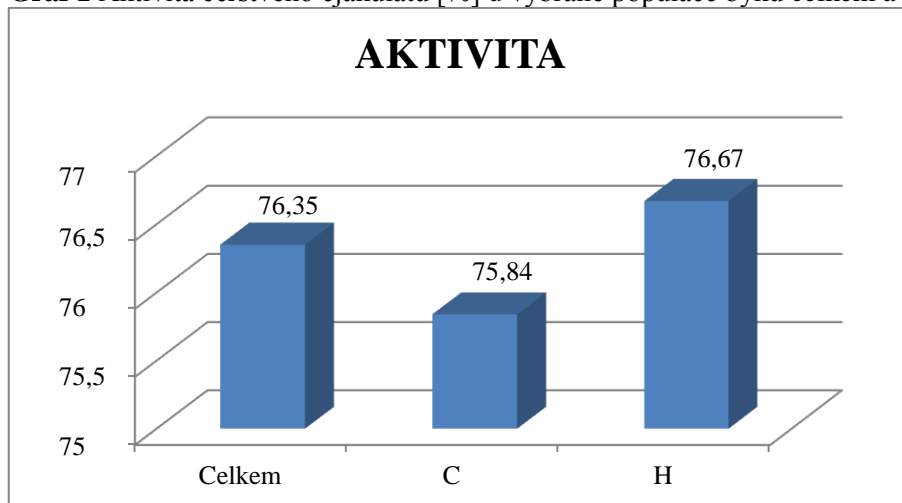
**Tabulka 1** Přehled vypočtených průměrů, směrodatných odchylek (SD), mediánů, minim (Min) a maxim (Max) sledovaných ukazatelů čerstvého ejakulátu u vybrané populace všech býků celkem, C a H býků zvlášť

	n	Průměr	SD	Medián	Min	Max
<b>Aktivita [%]</b>						
Celkem	9389	76,35	8,21	70,00	70,00	100,00
C	3625	75,84	8,21	70,00	70,00	100,00
H	5764	76,67	8,19	70,00	70,00	100,00
<b>Hustota [mil/cm<sup>3</sup>]</b>						
Celkem	9389	1,19	0,43	1,10	0,50	3,20
C	3625	1,28	0,46	1,20	0,50	3,20
H	5764	1,14	0,40	1,10	0,50	2,90
<b>Množství [g]</b>						
Celkem	9389	10,64	4,89	9,80	1,00	53,00
C	3625	9,81	4,26	9,00	1,00	45,00
H	5764	11,16	5,18	10,10	1,00	53,00

C – soubor býků českého strakatého plemene, H – soubor českých býků holštýnského plemene

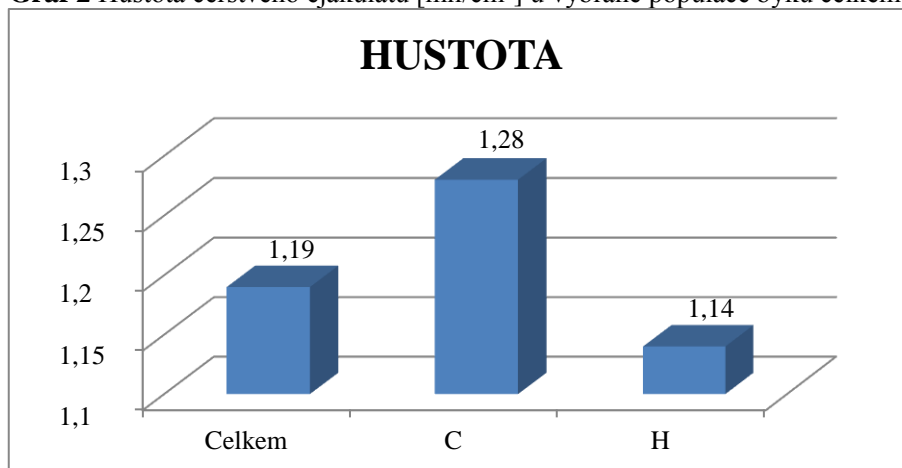
Z Grafů 1, 2 a 3 je patrné, že u býků C byla sledována nižší aktivita spermií a množství ejakulátu, ale zároveň vyšší hustota čerstvého ejakulátu než u plemene H. Tyto souvislosti mezi aktivitou, množstvím a hustotou potvrzují výsledky regresní a korelační analýzy (Kapitola 5.2).

**Graf 1** Aktivita čerstvého ejakulátu [%] u vybrané populace býků celkem a zvlášť u plemene C a H



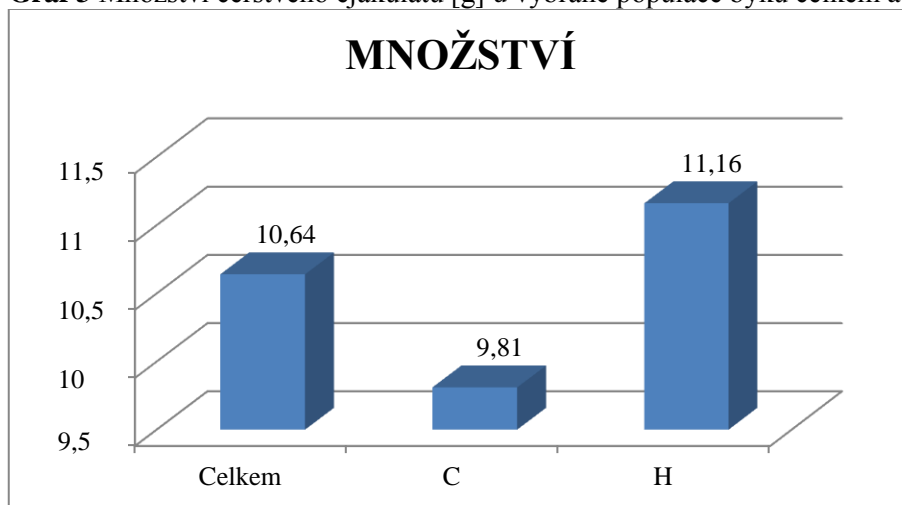
C – soubor býků českého strakatého plemene, H – soubor českých býků holštýnského plemene

**Graf 2** Hustota čerstvého ejakulátu [mil/cm<sup>3</sup>] u vybrané populace býků celkem a zvlášť u plemene C a H



C – soubor býků českého strakatého plemene, H – soubor českých býků holštýnského plemene

**Graf 3** Množství čerstvého ejakulátu [g] u vybrané populace býků celkem a zvlášť u plemene C a H



C – soubor býků českého strakatého plemene, H – soubor českých býků holštýnského plemene

V rámci sledování hodnot rozmrazených inseminačních dávek bylo shromážděno 835 údajů o aktivitě spermií po rozmrazení, konkrétně je zaznamenáno 463 hodnot českých strakatých býků a 372 sledování holštýnských býků. Přehled o počtu pozorování, průměru, směrodatné odchylce, mediánu, minimu a maximu aktivity spermií v době ihned po rozmrazení ejakulátu a za každých dalších 30 min až do dvou hodin po rozmrazení je uveden v Tabulce 2. Z té je patrné, že motilita spermií po celou dobu tepelného testu přežitelnosti u býků plemene C je lehce nad průměrem celé sledované populace a to během celého testu, což je v souladu s výsledky studie Beran *et al.* (2011), kdy byly stejně jako v naší studii porovnávány vlastnosti ejakulátu býků plemene H a C.

**Tabulka 2** Přehled vypočtených průměrů, směrodatných odchylek (SD), mediánů, minim (Min) a maxim (Max) pro aktivitu spermií [%] rozmrazených inseminačních dávek u vybrané populace býků celkem a zvlášť u plemene C a H

	n	Průměr	SD	Medián	Min	Max
<b>AKT0</b>						
Celkem	835	54,98	18,05	55,00	10,00	95,00
C	463	56,99	18,04	60,00	10,00	90,00
H	372	52,49	17,78	50,00	10,00	95,00
<b>AKT30</b>						
Celkem	835	47,78	18,06	50,00	0,00	90,00
C	463	49,49	18,87	50,00	0,00	90,00
H	372	45,65	16,77	45,00	0,00	90,00
<b>AKT60</b>						
Celkem	835	41,25	18,21	40,00	0,00	85,00
C	463	42,66	19,10	45,00	0,00	85,00
H	372	39,49	16,91	40,00	0,00	80,00
<b>AKT90</b>						
Celkem	835	33,64	18,25	35,00	0,00	75,00
C	463	34,48	19,03	35,00	0,00	75,00
H	372	32,59	17,21	35,00	0,00	75,00
<b>AKT120</b>						
Celkem	835	26,32	18,40	25,00	0,00	75,00
C	463	26,92	19,15	25,00	0,00	75,00
H	372	25,56	17,42	25,00	0,00	65,00

C – soubor býků českého strakatého plemene, H – soubor českých býků holštýnského plemene  
 AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení

## 5.2 REGRESNÍ A KORELAČNÍ ANALÝZA

V rámci studie byla provedena regresní a korelační analýza pro všech 217 vybraných býků a zvláště pro 118 býků C a 99 býků H. Regresní analýzou bylo zjištěno, že pokud dojde ke zvýšení hustoty spermií v odebraném ejakulátu o 1,00 mil/cm<sup>3</sup>, dojde ke snížení aktivity o 3,21% u plemene C a o 3,84% u plemene H. Naopak pokud dojde ke zvýšení množství odebraného ejakulátu o 1,00 g, zvýší se i aktivita spermií o 0,18% u plemene C a o 0,10% u plemene H. Tuto skutečnost potvrzuje i korelační analýza, kdy byla zjištěna významná ( $P \leq 0,01$ ), ale slabá negativní závislost mezi aktivitou a hustotou čerstvého ejakulátu a pozitivní závislost mezi aktivitou a množstvím spermií (Tabulka 3). Nejtěsněji mezi sebou korelovaly ukazatele čerstvého ejakulátu u plemene C, u kterého byla zjištěna výrazně nejvyšší hustota čerstvého ejakulátu (Graf 2) a zároveň nejnižší další dva sledované ukazatele (Graf 1 a 3).

**Tabulka 3** Pearsonův korelační koeficient  $r$  a související statistické významnosti  $P$  mezi sledovanými vlastnostmi čerstvého ejakulátu v celé sledované populaci býků a zvláště u plemene C a H

Populace	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
Celkem	1	-0,1927	0,0839
	Aktivita [%]	<0,0001	<0,0001
	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	1	-0,0558
			Množství [g]
C	1	-0,1954	0,1271
	Aktivita [%]	<0,0001	<0,0001
	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	1	-0,1758
			Množství [g]
H	1	-0,1826	0,0530
	Aktivita [%]	<0,0001	<0,0001
	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	1	0,0477
			Množství [g]
			1

C – soubor býků českého strakatého plemene, H – soubor českých býků holštýnského plemene

Regresní a korelační analýza byla provedena i pro údaje rozmrazeného ejakulátu. Regresní analýzou byly zjištěny nepatrné nárůsty aktivity spermií po rozmrazení při zvýšení aktivity spermií čerstvého ejakulátu o jedno procento a poměrně výrazné poklesy motility spermií po rozmrazení při zvýšení hustoty čerstvého ejakulátu o jeden mil/cm<sup>3</sup>. Tuto slabou, ale významnou závislost potvrdila i korelační analýza, kdy byla zjištěna významná ( $P \leq 0,05$ ), ale slabá pozitivní závislost mezi aktivitou rozmrazeného ejakulátu a aktivitou čerstvého ejakulátu a negativní závislost mezi aktivitou rozmrazeného ejakulátu a hustotou čerstvého ejakulátu ( $P \leq 0,01$ ) ve všech hodnocených sledování (Tabulka 4).

**Tabulka 4** Pearsonův korelační koeficient r a související statistické významnosti P mezi aktivitou spermií rozmrazeného ejakulátu [%] a sledovanými vlastnostmi čerstvého ejakulátu v celé sledované populaci býků

	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
<b>AKT0</b>	0,0678	-0,1466	-0,0416
	0,0500	<0,0001	0,2401
<b>AKT30</b>	0,0981	-0,1575	0,0204
	0,0055	<0,0001	0,5635
<b>AKT60</b>	0,0786	-0,1566	0,0381
	0,0261	<0,0001	0,2810
<b>AKT90</b>	0,0699	-0,1390	0,0844
	0,0481	<0,0001	0,0169
<b>AKT120</b>	0,0699	-0,1207	0,0899
	0,0479	0,0006	0,0109

AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení

## 5.3 VÝSLEDKY ASOCIAČNÍCH ANALÝZ

Býci zařazení do naší studie pocházeli z různých inseminačních stanic, byli různého věku, odběry byly realizovány v různých ročních obdobích a vyšetřované inseminační dávky byly skladovány různě dlouhou dobu. Z těchto údajů a detekce genotypů byla shromážděna rozsáhlá databáze dat umožňující provést asociační analýzy. Hlavními sledovanými nezávisle proměnnými byly vybrané geny, ale i výše jmenované údaje byly zařazeny jako pevné efekty v použitém statistickém modelu a jejich vliv byl hodnocen na dvou hladinách významnosti  $P \leq 0,01$  a  $P \leq 0,05$ .

### 5.3.1 *LEP*

#### Variabilita genu *LEP* ve sledované populaci býků

V této práci byl sledován polymorfismus *C(-963)T* bovinního genu *LEP* s frekvencí alel *C* 0,72 a *T* 0,28 a genotypů *CC* 0,54, *CT* 0,36 a *TT* 0,10. Z výsledků minulých studií vyplývá, že četnosti alel lokusu *C(-963)T* genu *LEP* bývají závislé na plemenné příslušnosti. Polymorfismus byl již dříve zkoumán u polských býků holštýnského plemene a byly nalezeny poměrně vyrovnané četnosti alely *C* 0,56 a *T* 0,44 (Komisarek, 2010), což se potvrdilo i v naší studii (Tabulka 5), kdy byla frekvence alely *C* 0,58 a alely *T* 0,42 u holštýnských býků. Oproti tomu u býků plemene český strakatý skot byla zjištěna výrazná převaha alely *C* nad alelou *T*, respektive 0,84 a 0,16. Podobné frekvence byly zjištěny u plemene Jersey ve studii Komisarek a Antkowiak (2007), konkrétně 0,83 pro *C* a 0,17 pro *T* alelu. Dále ve studii Glantz *et al.* (2012) byla u švédského holštýnského skotu zjištěna frekvence alely *C* 0,61 a *T* 0,39. Oproti tomu u plemene švédský červený byl zjištěn výrazně vyšší podíl alely *T*. Ve Švédsku byla provedena asociační analýza tohoto plemene a byla zjištěna frekvence alel *C* 0,20 a *T* 0,80.

**Tabulka 5** Zastoupení jednotlivých genotypů genu *LEP* ve vybraném souboru zvířat

SNP	Genotyp	n	Genotypová frekvence celkem	Alelová frekvence	Genotypová frekvence C	Genotypová frekvence H
<i>LEP</i>	<i>CC</i>	117	0,54	<i>C</i> 0,72	0,69	0,36
	<i>CT</i>	78	0,36	<i>T</i> 0,28	0,29	0,44
	<i>TT</i>	22	0,10		0,02	0,20

## Asociační analýza genu *LEP*

Leptin se podílí na celkovém metabolismu, energetické bilanci a regulaci znaků plodnosti (Macajova *et al.*, 2004; Goumenou *et al.*, 2003; Ji *et al.*, 1998). V dřívějších studiích byl prokázán vliv leptinu na znaky plodnosti u krav plemene Jersey (Komisarek a Antkowiak, 2007), polských holštýnských (Komisarek, 2010) a iránských holštýnských dojnic (Yazdani *et al.*, 2010). Liefers *et al.* (2005) poukazují na námi sledovaný polymorfismus *C(-963)T* umístěný v promotoru, který má pravděpodobně vliv na míru exprese leptinu. V dřívějších asociačních analýzách polymorfismu *C(-963)T* a znaků mléčné produkce byl zjištěn pozitivní vliv alely *C* na produkci mléka, ale zároveň pozitivní vliv alely *T* na obsah bílkovin a tuku v mléce (Kadlecová *et al.*, 2014a; Glantz *et al.*, 2012). Z těchto důvodů byl v minulých letech gen pro leptin používán jako kandidátní gen ve šlechtění na mléčnou užitkovost.

V našem souboru byl polymorfismus *C(-963)T* signifikantně asociován s aktivitou a hustotou čerstvého ejakulátu ( $P \leq 0,01$ ) (Tabulka 6). V celé sledované populaci byla zjištěna statisticky významně vyšší aktivita spermií genotypu *TT* (+1,86 a 4,17%) než u genotypu *CC* a *CT*. Signifikantně větší množství spermií v odebraném ejakulátu bylo zjištěno u heterozygotů *CT* (+0,08 mil/cm<sup>3</sup>). Dále se jedinci s genotypem *TT* vyznačovali neprůkazně větším množstvím odebraného ejakulátu. Po rozdělení celkového souboru býků podle plemene byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi všemi genotypy pro první dva sledované ukazatele čerstvého ejakulátu a to u obou plemen. Polymorfní varianta *TT* genu *LEP* u býků plemene H se vyznačovala významně ( $P \leq 0,01$ ) vyšší aktivitou spermií (+ 2,93 a + 3,78 %) a zároveň nižším počtem spermií v cm<sup>3</sup> (- 0,05 a -0,06 mil/cm<sup>3</sup>) v čerstvém ejakulátu než genotypy *CC* a *CT*. Oproti tomu se nejvyšší hustotou čerstvého ejakulátu vyznačovali heterozygoti *CT* plemene C. I přes statisticky neprůkazné rozdíly bylo shledáno největší množství čerstvého ejakulátu býků C homozygotní varianty *CC*, avšak u plemene H homozygotní varianty *TT*. Tuto skutečnost může ovlivňovat nízký počet detekovaných homozygotů *TT* mezi býky plemene C. Naše výsledky jsou v rozporu se závěry studie Komisarek a Antkowiak (2007), kdy tento polymorfismus nebyl pozitivně asociován s ukazateli reprodukce krav plemene Jersey, nicméně také v tomto případě heterozygoti *CT* dosahovali lepších výsledků. Podobných výsledků bylo dosaženo i ve studii Komisarek (2010), kdy nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi genotypy polských holštýnsko-frízských krav, avšak jedinci *CT* a *TT* dosahovali vyšších odhadů plemenných



hodnot. To může naznačovat vliv alely *T*, která byla v populaci udržována selekcí na vysoký obsah tuku a bílkovin v mléce, k ukazatelům reprodukce.

**Tabulka 6** Efekt polymorfismu genu *LEP* na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků sledované populace celkem a zvláště býků plemene C a H

<i>LEP</i>	n/n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
<b>CELKEM</b>	217/9389			
<i>CC</i>	117/4430	76,41±0,13 <sup>A,B</sup>	1,19±0,01 <sup>A</sup>	11,22±0,07
<i>CT</i>	78/3480	74,10±0,15 <sup>A,C</sup>	1,27±0,01 <sup>A,B</sup>	11,24±0,08
<i>TT</i>	22/1479	78,27±0,23 <sup>B,C</sup>	1,19±0,01 <sup>B</sup>	11,36±0,13
<b>C</b>	118/3625			
<i>CC</i>	82/2458	76,06±0,21 <sup>A,B</sup>	1,23±0,01 <sup>A</sup>	10,54±0,10
<i>CT</i>	34/1131	71,93±0,27 <sup>A</sup>	1,40±0,02 <sup>A</sup>	10,48±0,13
<i>TT</i>	2/36	69,84±1,29 <sup>B</sup>	1,33±0,08	9,49±0,62
<b>H</b>	99/5764			
<i>CC</i>	35/1972	76,14±0,19 <sup>A,B</sup>	1,16±0,01 <sup>A</sup>	11,87±0,11
<i>CT</i>	44/2349	75,20±0,18 <sup>A,C</sup>	1,17±0,01 <sup>B</sup>	11,94±0,11
<i>TT</i>	20/1443	79,07±0,22 <sup>B,C</sup>	1,11±0,01 <sup>A,B</sup>	12,10±0,13

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. C = populace býků českého strakatého plemene, H = populace českých býků holštýnského plemene. Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly mezi genotypy. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá – P<0,05; velká – P<0,01.

Pozitivní, avšak statisticky neprůkazný, vliv alely *T* se projevil i na aktivitě spermií po rozmrazení, kdy býci s alelickou variantou *TT* dosahovali vyšší motility spermií ihned po rozmrazení (+ 3,31 a + 4,48 %), i ve všech dalších sledovaných časových intervalech než býci s genotypem *CC* a *CT* (Tabulka 7). Po rozdělení sledované populace podle plemenné příslušnosti byla zjištěna statisticky významně vyšší aktivita spermií rozmrazeného ejakulátu po 120 minutách tepelného testu homozygotních býků *TT* (+ 21,45 a + 18,8 %) než u býků *CC* a *CT* plemene C. Opět i tato skutečnost může být způsobena malým počtem býků plemene C s alelickou variantou *TT*. Z Tabulky 7 je patrné, že lepší aktivita spermií po celou dobu krátkodobého tepelného testu přežitelnosti byla shledána pro C býky.

**Tabulka 7** Efekt mutace genu *LEP* na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků ve sledované populaci celkem a zvláště býků plemene C a H

<i>LEP</i>	n/n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
<b>CELKEM</b>	217/835					
<i>CC</i>	117/451	54,57±1,03	47,43±1,01	41,07±1,03	32,47±1,05	24,66±1,06
<i>CT</i>	78/303	53,40±1,10	46,59±1,09	40,52±1,11	34,06±1,12	26,63±1,14
<i>TT</i>	22/81	57,88±2,06	51,01±2,04	44,14±2,07	37,55±2,10	29,70±2,14
<b>C</b>	118/463					
<i>CC</i>	82/321	54,86±1,41	47,67±1,46	41,92±1,49	34,19±1,50	26,26±1,51 <sup>A</sup>
<i>CT</i>	34/134	54,75±1,79	49,20±1,85	43,01±1,89	36,38±1,91	28,91±1,92 <sup>b</sup>
<i>TT</i>	2/8	64,44±6,50	59,48±6,70	55,19±6,85	50,78±6,91	47,71±6,94 <sup>A,b</sup>
<b>H</b>	99/372					
<i>CC</i>	35/130	53,45±1,93	47,41±1,78 <sup>a</sup>	39,84±1,80	30,46±1,82	23,82±1,87
<i>CT</i>	44/169	50,70±1,58	42,77±1,46 <sup>a</sup>	36,49±1,47	30,25±1,50	23,23±1,53
<i>TT</i>	20/73	55,18±2,29	47,82±2,11	39,87±2,13	32,63±2,16	24,88±2,22

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení. C = populace býků českého strakatého plemene, H = populace českých býků holštýnského plemene.

Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly mezi genotypy. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá – P≤0,05; velká – P≤0,01.

### 5.3.2 *DGATI*

#### Variabilita genu *DGATI* ve sledované populaci býků

Variabilitu genu *DGATI* v pozici 10 433 a 10 434, kde se jedná o dinukleotidovou substituci K/A (*K232A*), vyjadřuje Tabulka 8, která uvádí přehled frekvencí genotypů ve sledované populaci býků. Z těchto výsledků je patrná velmi nízká frekvence homozygotní varianty *KK* u holštýnských býků a v populaci býků českého strakatého skotu dokonce nepřítomnost genotypu *KK*. Z toho vyplývá velmi vysoká frekvence alely A 0,87 ve vybrané populaci býků. V dřívějších studiích byl zjištěn velký rozsah frekvence alely A u různých plemen. Podobné frekvence jako v naší práci byly zjištěné ve studii Manga a Říha (2011) kdy byla frekvence alely A 0,81 u českých dojnic holštýnského skotu, ve studii Komisarek *et al.* (2011) kdy byla četnost alely A 0,79 u krav plemene Jersey, u dojnic českého strakatého skotu 0,72 (Kadlecová *et al.*, 2014b) a 0,62 u polských holštýnsko-fríských býků (Komisarek a Michalak, 2008). V asociační analýze německých holštýnských býků byla zjištěna frekvence alely A 0,45 (Kaupe *et al.*, 2007). Oikonomou *et al.* (2008), zjistil v populaci holštýnských

krav chovaných v Řecku frekvenci alely *A* 0,38. Ve studii Winter *et al.* (2002) byl porovnáván výskyt lysinové varianty (*K*) mezi zvířaty s vysokými a nízkými plemennými hodnotami. Bylo zjištěno, že alela *K* se častěji vyskytuje u zvířat plemene Fleckvieh a holštýnsko-fríského skotu s vyššími plemennými hodnotami. U polských krav plemene Jersey byla zjištěna frekvence alely *A* 0,17 (Komisarek *et al.*, 2004). Lze tedy říci, že četnosti jednotlivých genotypů i alel lokusu *DGATI* se v publikovaných pracích výrazně liší mezi jednotlivými skupinami zvířat a podle produkčního charakteru plemene.

**Tabulka 8** Zastoupení jednotlivých genotypů genu *DGATI* ve vybraném souboru zvířat

SNP	Genotyp	n	Genotypová frekvence celkem	Alelová frekvence	Genotypová frekvence C	Genotypová frekvence H
<i>DGATI</i>	<i>KK</i>	2	0,01	<i>K</i> 0,13	0,00	0,02
	<i>KA</i>	51	0,23	<i>A</i> 0,87	0,15	0,33
	<i>AA</i>	164	0,76		0,85	0,65

#### Asociační analýza genu *DGATI*

Mutace genu *DGATI* ovlivňuje obsah mléčných složek v mléce. Alela *K* zvyšuje obsah tuku a proteinu v mléce, zatímco alela *A* zvyšuje množství nadojeného mléka (Kadlecová *et al.*, 2014b; Winter *et al.*, 2002). Z důvodu využívání tohoto polymorfismu ve šlechtění skotu na vysokou mléčnou produkci a známé záporné genetické korelaci mezi produkčními a reprodukčními ukazateli byla již několikrát prováděna asociační analýza této mutace a plodnosti krav i býků. Kaupe *et al.* (2007) zjistili negativní vliv lysinové varianty genu na test nepřeběhlých plemenic a Oikonomou *et al.* (2008) na tělesnou kondici. Ve studii Berry *et al.* (2010) nebyly nalezeny žádné asociace s plodností, telením jalovic a krav a s jatečnou výtěžností.

V naší populaci byl tento polymorfismus asociován se všemi sledovanými ukazateli čerstvého ejakulátu (Tabulka 9). Analýza prokázala, že býci genotypu *KA* produkovali spermie s významně ( $P \leq 0,05$ ) vyšší aktivitou spermií (+ 5,82 %) a signifikantně ( $P \leq 0,01$ ) větším množstvím odebraného ejakulátu (+ 4,46 g) než homozygoti *KK*. Oproti tomu statisticky významně ( $P \leq 0,01$ ) větší množství spermií v ejakulátu (+ 0,56 a + 0,55 mil/cm<sup>3</sup>) bylo shledáno u býků genotypu *KK* než u býků *KA* a *AA*. I v tomto případě je však nutné podotknout, že se podařilo detekovat pouze dva homozygotní jedince *KK* v celé sledované populaci. Po rozdělení souboru podle plemenné příslušnosti nebylo možné hodnotit vliv genotypu *KK* u plemene C na vlastnosti čerstvého ejakulátu, protože tato alelická kombinace

nebyla v této skupině býků vůbec detekována. Pravděpodobně z toho důvodu byly statisticky významné rozdíly prokázány pouze v množství odebraného ejakulátu, kdy významně ( $P \leq 0,01$ ) větším množstvím ejakulátu se vyznačovali homozygoti AA (+ 1,1 g). Ve vybrané skupině býků plemene H byly prokázány stejné asociace jako v celé sledované populaci, kdy se signifikantně ( $P \leq 0,01$ ;  $P \leq 0,05$ ) nejnižší aktivitou a množstvím spermií a nejvyšší hustotou čerstvého ejakulátu vyznačovali homozygoti KK. Všeobecně bez ohledu na genotypy však lepších ukazatelů vlastností čerstvého ejakulátu dosahovali býci holštýnského plemene, což může být způsobeno, stejně jako v případě prvního sledovaného polymorfismu, dlouhodobou selekcí mléčného skotu na vysoký obsah mléčných složek a tím udržování alely *K* v populaci.

**Tabulka 9** Efekt polymorfismu genu *DGATI* na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků sledované populace celkem a zvlášť býků plemene C a H

<i>DGATI</i>	n/n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
<b>CELKEM</b>	217/9389			
<i>KK</i>	2/16	70,12±2,01 <sup>a,b</sup>	1,77±0,11 <sup>A,B</sup>	6,84±1,10 <sup>A,B</sup>
<i>KA</i>	51/1984	75,94±0,20 <sup>a</sup>	1,21±0,01 <sup>A</sup>	11,30±0,11 <sup>A</sup>
<i>AA</i>	164/7389	75,77±0,11 <sup>b</sup>	1,22±0,01 <sup>B</sup>	11,23±0,06 <sup>B</sup>
<b>C</b>	118/3625			
<i>KK</i>	0/0	x	x	x
<i>KA</i>	18/374	74,20±0,44	1,31±0,03	9,52±0,20 <sup>A</sup>
<i>AA</i>	100/3251	74,77±0,20	1,28±0,01	10,62±0,09 <sup>A</sup>
<b>H</b>	99/5764			
<i>KK</i>	2/16	70,56±2,03 <sup>A,B</sup>	1,69±0,10 <sup>A,B</sup>	7,47±1,20 <sup>A,B</sup>
<i>KA</i>	33/1610	76,59±0,22 <sup>A</sup>	1,12±0,01 <sup>A,C</sup>	12,22±0,13 <sup>A,c</sup>
<i>AA</i>	64/4138	76,46±0,14 <sup>B</sup>	1,16±0,01 <sup>B,C</sup>	11,86±0,09 <sup>B,c</sup>

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. C – populace býků českého strakatého plemene, H – populace českých býků holštýnského plemene. Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly mezi genotypy. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá –  $P \leq 0,05$ ; velká –  $P \leq 0,01$ .

Žádné signifikantní asociace v celé sledované populaci mezi genotypy genu *DGATI* a aktivitou rozmrazeného ejakulátu nebyly nalezeny, což je patrné z Tabulky 10. Po rozdělení vybrané populace podle plemenné příslušnosti, byly nalezeny signifikantní rozdíly v motilitě spermií mezi genotypy *KA* a *AA* u býků plemene C 30 a 60 minut po rozmrazení, kdy lepších výsledků dosahovali heterozygoti *KA* (+ 6,14 % po 30 min a 5,14 % po 60 min). Z dalších výsledků je možné pouze konstatovat, že homozygoti *KK*, kteří se vyznačovali signifikantně

( $P \leq 0,01$ ) nejvyšším množstvím spermií a zároveň nejnižší aktivitou spermií v čerstvém ejakulátu, dosahovali nejvyšších hodnot motility spermií ihned po rozmrazení a pro jedince plemene H po celou dobu provádění krátkodobého tepelného testu přežitelnosti.

Z výsledků naší studie je možné konstatovat, že lysinová varianta genu *DGATI*, která zvyšuje obsah tuku a bílkovin v mléce (Grisart *et al.*, 2004), má prokazatelně ( $P \leq 0,01$ ) pozitivní vliv i na množství spermií v  $\text{cm}^3$ . A dále, že alaninová varianta tohoto genu, u které byl prokázán pozitivní vliv na množství nadojeného mléka (Komisarek *et al.*, 2004), zvyšuje množství a aktivitu spermií v čerstvém ejakulátu. Neprůkazný vliv tohoto polymorfismu na aktivitu spermií po rozmrazení by bylo potřeba dále zkoumat.

**Tabulka 10** Efekt mutace genu *DGATI* na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků ve sledované populaci celkem a zvlášť býků plemene C a H

<i>DGATI</i>	n/n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
<b>CELKEM</b>	217/835					
<i>KK</i>	2/8	58,12±6,44	47,51±6,36	38,32±6,46	32,79±6,57	25,07±6,69
<i>KA</i>	51/203	54,84±1,33	48,16±1,31	41,92±1,33	33,88±1,36	26,70±1,38
<i>AA</i>	164/624	54,27±0,88	47,26±0,87	41,00±0,88	33,60±0,90	25,77±0,91
<b>C</b>	118/463					
<i>KK</i>	0/0	x	x	x	x	x
<i>KA</i>	18/78	58,10±2,25	53,82±2,31 <sup>A</sup>	47,15±2,37 <sup>a</sup>	38,28±2,41	30,44±2,43
<i>AA</i>	100/385	54,70±1,29	47,68±1,33 <sup>A</sup>	42,01±1,36 <sup>a</sup>	35,02±1,38	27,46±1,39
<b>H</b>	99/372					
<i>KK</i>	2/8	62,27±6,61	49,57±6,14	39,78±6,16	35,43±6,24	26,39±6,40
<i>KA</i>	33/125	50,71±1,97	42,98±1,83	36,80±1,83	29,76±1,86	24,19±1,90
<i>AA</i>	64/239	51,97±1,53	45,34±1,42	38,36±1,43	30,71±1,44	23,22±1,48

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení. C = populace býků českého strakatého plemene, H = populace českých býků holštýnského plemene.

Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly mezi genotypy. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá –  $P \leq 0,05$ ; velká –  $P \leq 0,01$ .

### 5.3.3 SPAG11

#### Variabilita genu *SPAG11* ve sledované populaci býků

V rámci této studie byly pro gen *SPAG11* testovány dva známé jednonukleotidové polymorfismy. Pomocí analýzy PCR-RFLP byly v lokusu *SPAG11-P2* (*g1454G>A*) detekovány tři genotypy (*GG*, *GA*, *AA*) stejně jako v lokusu *SPAG11-P8* (*g22696T>C*) (*TT*, *TC*, *CC*). Výsledky genotypových a alelových frekvencí ve sledované populaci 217 býků jsou uvedeny v Tabulce 11.

U polymorfismu *SPAG11-P2* bylo zjištěno zastoupení genotypů *GG* 0,47 *GA* 0,37 a *AA* 0,16 a zastoupení jednotlivých alel *G* 0,66 a *A* 0,34, což je v podobném trendu jako výsledky studie Liu *et al.* (2011), kde byl výskyt alely *G* 0,80 a *A* 0,20 u čínských holštýnských býků. Zároveň se v této studii nepodařilo detekovat genotyp *CC* lokusu *SPAG11-P8*, čemuž se podobají i výsledky naší práce, kdy v celkovém souboru byly nalezeny pouze dva jedinci s tímto genotypem. To nasvědčuje tomu, že homozygotní býci *CC* jsou pravděpodobně vyřazováni z chovu pomocí umělé inseminace a selekce, kvůli jejich horším kvalitativním vlastnostem ejakulátu (Dai *et al.*, 2009). V dalším se ale naše studie rozcházejí. V naší sledované populaci se vyskytovala převaha heterozygotů *CT*, a proto byla frekvence alely *C* a *T* poměrně vyrovnaná, respektive 0,60 a 0,40. Ve výše jmenované studii však byla většina jedinců detekována jako homozygoti *TT*, což se projevilo i na frekvenci alely *T* a *C*, respektive 92% a 8%.

**Tabulka 11** Zastoupení jednotlivých genotypů lokusů genu *SPAG11* ve vybraném souboru zvířat

SNP	Genotyp	n	Genotypová frekvence celkem	Alelová frekvence	Genotypová frekvence C	Genotypová frekvence H
<i>SPAG11 – P2</i>	<i>GG</i>	102	0,47	<i>G</i> 0,66	0,48	0,47
	<i>GA</i>	81	0,37	<i>A</i> 0,34	0,32	0,43
	<i>AA</i>	34	0,16		0,20	0,10
<i>SPAG11 – P8</i>	<i>TT</i>	46	0,21	<i>T</i> 0,60	0,16	0,27
	<i>TC</i>	169	0,78	<i>C</i> 0,40	0,83	0,72
	<i>CC</i>	2	0,01		0,01	0,01

#### Asociační analýza genu *SPAG11-P2*

V předchozí studii (Liu *et al.*, 2011) nebyl polymorfismus *SPAG11-P2* statisticky významně korelován s žádnou sledovanou vlastností čerstvého i rozmrazeného ejakulátu.

V naší studii byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi genotypy této mutace pro aktivitu a hustotu čerstvého ejakulátu ( $P \leq 0,01$ ) (Tabulka 12). Dále při hodnocení skupin býků rozdělených podle plemene byly nalezeny signifikantní rozdíly pro všechny sledované ukazatele. Konkrétně největší aktivitou čerstvých spermií se vyznačovali homozygoti AA obou plemen, největší počet spermií v  $\text{cm}^3$  byl naměřen u homozygotů GG obou plemen a jednoznačně nejvíce gramů odebraného ejakulátu bylo zaznamenáno u holštýnských býků s genotypem AA, což se shoduje s výsledky naší korelační analýzy.

**Tabulka 12** Efekt polymorfismu genu *SPAG11-P2* na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků sledované populace celkem a zvláště býků plemene C a H

<i>SPAG11-P2</i>	n/n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
<b>CELKEM</b>	217/9389			
GG	102/5167	75,43±0,13 <sup>A</sup>	1,22±0,01 <sup>A,B</sup>	11,22±0,07
GA	81/3034	75,40±0,16 <sup>B</sup>	1,18±0,01 <sup>A,C</sup>	11,25±0,09
AA	34/1188	77,86±0,24 <sup>A,B</sup>	1,31±0,01 <sup>B,C</sup>	11,30±0,14
<b>C</b>	118/3625			
GG	56/1786	74,40±0,23 <sup>A,b</sup>	1,35±0,02 <sup>A</sup>	10,48±0,11 <sup>A,B</sup>
GA	38/1006	73,60±0,29 <sup>b,C</sup>	1,26±0,02 <sup>B</sup>	11,39±0,14 <sup>B,C</sup>
AA	24/833	76,78±0,31 <sup>A,C</sup>	1,27±0,01 <sup>A,B</sup>	9,50±0,15 <sup>A,C</sup>
<b>H</b>	99/5764			
GG	46/3381	76,23±0,15 <sup>A</sup>	1,65±0,01 <sup>A,B</sup>	11,98±0,09 <sup>A,b</sup>
GA	43/2028	76,54±0,19 <sup>B</sup>	1,11±0,01 <sup>A,C</sup>	11,59±0,11 <sup>b,C</sup>
AA	10/355	78,85±0,43 <sup>A,B</sup>	1,26±0,02 <sup>B,C</sup>	14,10±0,26 <sup>A,C</sup>

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. C – populace býků českého strakatého plemene, H – populace českých býků holštýnského plemene. Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá –  $P \leq 0,05$ ; velká –  $P \leq 0,01$ .

Žádné signifikantní asociace v celé sledované populaci mezi genotypy genu *SPAG11-P2* pro aktivitu rozmrazeného ejakulátu nebyly nalezeny, což je patrné z Tabulky 13. V populaci C býků byla nalezena prokazatelně ( $P \leq 0,05$ ) větší motilita spermií 120 min po rozmrazení pro heterozygoty GA (+ 4,99 %) než pro homozygoty GG. Ve vybrané populaci H býků byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi všemi genotypy a při všech měřeních tepelného testu přežitelnosti. Nejlepších aktivit rozmrazených spermií dosahovali homozygotní býci ( $P \leq 0,01$ ;  $P \leq 0,05$ ) GG, kteří se vyznačovali největší hustotou čerstvého

ejakulátu, ale nejnižší aktivitou odebraných spermií. Tento trend je možné pozorovat i v asociačních studiích dalších genů.

**Tabulka 13** Efekt mutace genu *SPAG11-P2* na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků ve sledované populaci celkem a zvlášť býků plemene C a H

<i>SPAG11-P2</i>	n/n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
<b>CELKEM</b>	217/835					
<i>GG</i>	102/389	54,97±1,02	47,79±1,01	41,45±1,03	33,43±1,04	25,93±1,06
<i>GA</i>	81/310	54,72±1,12	47,93±1,11	41,59±1,13	34,05±1,15	26,82±1,17
<i>AA</i>	34/136	52,69±1,57	45,83±1,55	39,74±1,58	33,45±1,60	24,47±1,63
<b>C</b>	118/463					
<i>GG</i>	56/217	54,56±1,55	47,14±1,60	40,74±1,63	32,91±1,65	25,45±1,66 <sup>a</sup>
<i>GA</i>	38/149	55,17±1,76	49,27±1,81	44,20±1,85	37,31±1,86	30,44±1,88 <sup>a</sup>
<i>AA</i>	24/97	56,48±1,98	50,45±2,04	44,76±2,09	38,06±2,10	29,24±2,12
<b>H</b>	99/372					
<i>GG</i>	46/172	54,26±1,67 <sup>B</sup>	47,63±1,54 <sup>B</sup>	41,37±1,53 <sup>B,c</sup>	33,74±1,57 <sup>A,b</sup>	27,03±1,60 <sup>A,b</sup>
<i>GA</i>	43/161	52,51±1,66 <sup>a</sup>	44,83±1,52 <sup>A</sup>	37,23±1,52 <sup>A,c</sup>	29,57±1,56 <sup>b</sup>	22,57±1,59 <sup>b</sup>
<i>AA</i>	10/39	43,95±2,90 <sup>a</sup> <sub>B</sub>	35,53±2,66 <sup>A,B</sup>	28,69±2,66 <sup>A,B</sup>	24,22±2,72 <sup>A</sup>	15,70±2,77 <sup>A</sup>

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení. C = populace býků českého strakatého plemene, H = populace českých býků holštýnského plemene.

Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly mezi genotypy. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá – P≤0,05; velká – P≤0,01.

### Asociační analýza genu *SPAG11-P8*

Polymorfismus *SPAG11-P8* vykazoval v naší studii statisticky významné rozdíly (P≤0,01) mezi genotypy *TT* a *TC* pro všechny sledované ukazatele čerstvého ejakulátu (Tabulka 14). Nejvyšších hodnot dosahovali heterozygoti *TC* a homozygoti *TT*, což může naznačovat pozitivní vliv alely *T* na produkci a vitalitu spermií. Podobného trendu bylo dosaženo i při rozdělení populace býků podle plemenné příslušnosti, kdy byly pro všechny ukazatele čerstvého ejakulátu signifikantní rozdíly mezi genotypy *TT* a *CT* (P≤0,01). Vyšší hodnoty pro aktivitu, hustotu i množství byly zjištěny u holštýnských býků. Nízké hodnoty všech sledovaných ukazatelů homozygotů *CC* mohou být způsobeny malým počtem jedinců s tímto genotypem v populaci, proto nelze tyto závěry brát jako platně zobecnitelné a byl by vhodný další výzkum.



**Tabulka 14** Efekt polymorfismu genu *SPAG11-P8* na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků sledované populace celkem a zvláště býků plemene C a H

<i>SPAG11-P8</i>	n/n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
<b>CELKEM</b>	217/9389			
<i>TT</i>	46/2070	73,81±0,19 <sup>A</sup>	1,30±0,01 <sup>A</sup>	13,21±0,10 <sup>A</sup>
<i>TC</i>	169/7301	76,35±0,11 <sup>A,b</sup>	1,20±0,01 <sup>A</sup>	10,71±0,06 <sup>A</sup>
<i>CC</i>	2/18	71,36±1,88 <sup>b</sup>	1,13±0,10	11,37±1,01
<b>C</b>	118/3625			
<i>TT</i>	19/720	72,63±0,35 <sup>A</sup>	1,35±0,02 <sup>A</sup>	9,68±0,16 <sup>A</sup>
<i>TC</i>	98/2888	75,17±0,20 <sup>A</sup>	1,27±0,01 <sup>A</sup>	10,69±0,10 <sup>A</sup>
<i>CC</i>	1/17	70,95±1,91	1,18±0,11	11,45±0,89
<b>H</b>	99/5764			
<i>TT</i>	27/1350	74,50±0,23 <sup>A</sup>	1,24±0,39 <sup>A</sup>	15,23±0,13 <sup>A</sup>
<i>TC</i>	71/4413	77,12±0,14 <sup>A</sup>	1,12±0,01 <sup>A</sup>	10,92±0,08 <sup>A</sup>
<i>CC</i>	1/1	67,95±8,01	1,36±0,39	9,12±4,47

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. C – populace býků českého strakatého plemene, H – populace českých býků holštýnského plemene. Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá – P≤0,05; velká – P≤0,01.

Z Tabulky 15 je patrné, že v naší studii nebyly potvrzeny žádné signifikantní asociace mezi jednotlivými genotypy polymorfismu *SPAG11-P8* celé vybrané populace a aktivitou rozmrazeného ejakulátu. Při samostatném hodnocení skupiny C býků byly prokázány statisticky významné rozdíly (P≤0,01; P≤0,05) v aktivitě spermií ihned po rozmrazení a po 60, 90 a 120 minutách. Tyto asociace však nelze brát jako platně zobecnitelné, protože ve sledované skupině býků plemene C byla detekována alelická varianta *CC* pouze u jednoho býka. Největší procento pohyblivých spermií bylo zjištěno u C býků homozygotní varianty *TT*. Oproti tomu ve skupině H býků se neprůkazně největší motilitou spermií vyznačovali homozygotní býci *CC*. Naše výsledky částečně korespondují s výsledky studie Liu *et al.* (2011), kde byl zjištěn vliv této mutace na aktivitu rozmrazeného ejakulátu u čínských holštýnských býků. Lepší aktivitou spermií během krátkodobého tepelného testu přežitelnosti průkazně vyznačovali býci genotypu *TC*.

**Tabulka 15** Efekt mutace genu *SPAG11-P8* na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků ve sledované populaci celkem a zvlášť býků plemene C a H

<i>SPAG11-P8</i>	n/n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
<b>CELKEM</b>	217/835					
<i>TT</i>	46/182	53,56±1,55	47,13±1,53	41,87±1,55	35,37±1,58	27,92±1,60
<i>TC</i>	169/645	54,97±0,90	47,75±0,89	41,13±0,91	33,28±0,92	25,55±0,94
<i>CC</i>	2/8	44,83±6,17	40,51±6,10	33,25±6,20	24,45±6,30	16,41±6,41
<b>C</b>	118/463					
<i>TT</i>	19/77	56,65±2,30 <sup>b</sup>	50,23±2,37	45,54±2,43 <sup>a</sup>	39,14±2,45 <sup>B</sup>	31,30±2,46 <sup>B</sup>
<i>TC</i>	98/382	55,09±1,38 <sup>a</sup>	48,36±1,43	42,22±1,46	34,76±1,47 <sup>a</sup>	27,29±1,48 <sup>A</sup>
<i>CC</i>	1/4	33,32±8,77 <sup>a,b</sup>	30,91±9,70	22,82±9,27 <sup>a</sup>	10,48±9,34 <sup>a,B</sup>	-0,49±9,40 <sup>A,B</sup>
<b>H</b>	99/372					
<i>TT</i>	27/105	49,58±2,34	43,03±2,17	36,93±2,18	30,84±2,21	24,56±2,26
<i>TC</i>	71/263	53,06±1,48	45,49±1,38	38,29±1,38	30,60±1,40	23,27±1,43
<i>CC</i>	1/4	54,66±8,83	48,81±8,20	42,34±8,22	38,28±8,32	34,40±8,52

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení. C = populace býků českého strakatého plemene, H = populace českých býků holštýnského plemene.

Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly mezi genotypy. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá – P≤0,05; velká – P≤0,01.

### 5.3.4 *PLCz*

#### Variabilita genu *PLCz* ve sledované populaci býků

Za pomoci technik molekulární genetiky byla otestována variabilita genu *PLCz*. V Tabulce 16 je uveden přehled zjištěných frekvencí genotypů. V testované populaci býků byla zjištěna největší četnost homozygotů *CC* u obou sledovaná plemena. Zjištěná alelová frekvence proto byla *T* 0,11 a *C* 0,89. Tento trend je shodný s výsledky studie Pan *et al.* (2013), kde se také vyskytovalo nejvíce genotypů *CC*, a proto frekvence této alely byla 0,67. Vysoká frekvence alely *C* v obou porovnávaných studiích může být způsobena dlouhodobou selekcí těchto plemen na různé druhy užitkovosti. Další výsledky genotypových a alelových frekvencí není možné uvést, protože byla zatím provedena pouze jedna asociační analýza tohoto polymorfismu k vlastnostem čerstvého ejakulátu býků.

**Tabulka 16** Zastoupení jednotlivých genotypů genu *PLCz* ve vybraném souboru zvířat

SNP	Genotyp	n	Genotypová frekvence celkem	Alelová frekvence	Genotypová frekvence C	Genotypová frekvence H
<i>PLCz</i>	<i>TT</i>	2	0,01	<i>T</i> 0,11	0,01	0,01
	<i>TC</i>	42	0,20	<i>C</i> 0,89	0,28	0,10
	<i>CC</i>	172	0,79		0,71	0,89

**Asociační analýza genu *PLCz***

Lokus +65T>C s homozygotní variantou *CC* měl již ve výše jmenované studii průkazně vyšší hodnoty kvantitativních vlastností ejakulátu čínských holštýnských býků. Alela *T* v lokusu +65T>C vytváří CdxA transkripční faktor, který je blokován substitucí alely *T* za *C*. I v naší práci byly nalezeny signifikantní rozdíly mezi genotypy ( $P \leq 0,01$ ;  $P \leq 0,05$ ) pro aktivitu čerstvého ejakulátu (Tabulka 17). Pro další dvě sledované vlastnosti významně nejvyšších hodnot dosahovali shodně heterozygoti *TC* pro hustotu ( $P \leq 0,01$ ) a pro množství ( $P \leq 0,05$ ). Po rozdělení populace podle plemen byly nalezeny signifikantní rozdíly pouze mezi genotypy býků H plemene, kdy nejvyšších hodnot pro poslední dva jmenované ukazatele dosahovali opět heterozygoti *TC*.

**Tabulka 17** Efekt polymorfismu genu *PLCz* na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků sledované populace celkem a zvláště' býků plemene C a H

<i>PLCz</i>	n/n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
<b>CELKEM</b>	217/9389			
<i>TT</i>	2/205	77,56±0,57 <sup>a,B</sup>	1,12±0,03 <sup>A,B</sup>	10,68±0,31 <sup>a</sup>
<i>TC</i>	43/1068	76,03±0,26 <sup>a</sup>	1,31±0,01 <sup>A,C</sup>	11,52±0,14 <sup>a</sup>
<i>CC</i>	172/8116	75,71±0,11 <sup>B</sup>	1,21±0,01 <sup>B,C</sup>	11,23±0,06
<b>C</b>	118/3625			
<i>TT</i>	1/24	73,66±1,62	1,42±0,09	11,29±0,76
<i>TC</i>	33/583	74,32±0,38	1,29±0,02	10,54±0,18
<i>CC</i>	84/3018	74,78±0,20	1,28±0,01	10,50±0,10
<b>H</b>	99/5764			
<i>TT</i>	1/181	78,20±0,61 <sup>A</sup>	1,01±0,03 <sup>A,B</sup>	11,15±0,36 <sup>A</sup>
<i>TC</i>	10/485	77,50±0,38 <sup>B</sup>	1,34±0,02 <sup>B,C</sup>	12,58±0,23 <sup>A,b</sup>
<i>CC</i>	88/5098	76,32±0,13 <sup>A,B</sup>	1,14±0,01 <sup>A,C</sup>	11,95±0,08 <sup>b</sup>

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. C – populace býků českého strakatého plemene, H – populace českých býků holštýnského plemene. Znak A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá –  $P \leq 0,05$ ; velká –  $P \leq 0,01$ .

Asociační analýza polymorfismu genu *PLCz* a aktivitou spermií během krátkodobého tepelného testu přežitosti prokázala signifikantní rozdíly v motilitě spermií mezi jednotlivými genotypy, v čemž se rozcházíme s výsledky studie Pan *et al.* (2013), kde nebyl vliv polymorfismu potvrzen. Z Tabulky 18 je patrné, že statisticky významně nejnižší motility po rozmrazení dosahovaly spermie býků s genotypem *TT* a to ihned po rozmrazení (- 24,05 a - 22,52 %) a 30 min po rozmrazení (- 21,80 a - 20,29 %) na hladině významnosti  $P \leq 0,01$  a 60 min po rozmrazení na hladině významnosti  $P \leq 0,05$  než býci genotypu *TC* a *CC*. Tato skutečnost je o to zajímavější, že homozygoti *TT* se vyznačovali statisticky významně nejvyšší aktivitou spermií čerstvého ejakulátu. Tyto výsledky však nemohou být platně zobecnitelné, jelikož byly v celé sledované populaci detekovány pouze jeden býk H a jeden C s genotypem *TT*. V celé sledované populaci i po rozdělení do skupin podle plemen se neprůkazně nejvyšší aktivitou spermií během celého tepelného testu přežitosti vyznačovali heterozygoti *TC*, kteří se při hodnocení čerstvého ejakulátu vyznačovali nejvyššími hodnotami pro hustotu a množství.

**Tabulka 18** Efekt mutace genu *PLCz* na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků ve sledované populaci celkem a zvláště býků plemene C a H

<i>PLCz</i>	n/n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
<b>CELKEM</b>	217/835					
<i>TT</i>	2/8	32,06±6,16 <sup>A,B</sup>	27,27±6,10 <sup>A,B</sup>	25,51±6,21 <sup>a,b</sup>	19,30±6,32	11,07±6,43
<i>TC</i>	43/170	56,11±1,45 <sup>A</sup>	49,07±1,43 <sup>A</sup>	41,96±1,46 <sup>a</sup>	34,31±1,48	26,59±1,51
<i>CC</i>	172/657	54,58±0,85 <sup>B</sup>	47,56±0,85 <sup>B</sup>	41,37±0,86 <sup>b</sup>	33,83±0,88	26,20±0,89
<b>C</b>	118/463					
<i>TT</i>	1/4	31,59±8,97 <sup>A</sup>	28,12±9,27	29,21±9,53	23,37±9,64	15,46±9,72
<i>TC</i>	33/130	56,80±1,81 <sup>B</sup>	50,31±1,87	43,35±1,92	35,78±1,94	28,24±1,96
<i>CC</i>	84/329	55,49±1,38 <sup>A,B</sup>	48,70±1,43	43,08±1,47	35,88±1,48	28,27±1,49
<b>H</b>	99/372					
<i>TT</i>	1/4	34,04±8,79	29,09±8,16	24,21±8,19	19,57±8,30	13,19±8,51
<i>TC</i>	10/40	53,18±3,02	45,55±2,80	38,84±2,81	32,24±2,85	25,28±2,93
<i>CC</i>	88/328	52,34±1,37	45,03±1,27	38,06±1,28	30,70±1,30	23,64±1,33

Hodnoty jsou uváděny jako průměry nejmenších čtverců ± SE. n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení. C = populace býků českého strakatého plemene, H = populace českých býků holštýnského plemene.

Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly mezi genotypy. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá –  $P \leq 0,05$ ; velká –  $P \leq 0,01$ .

### 5.3.5 VLIV DALŠÍCH EFEKTŮ

Z výsledků asociačních analýz je patrný vliv všech sledovaných genů. Jak je patrné z literárního přehledu kvantitativní a kvalitativní vlastnosti ejakulátu býků jsou kromě genetických efektů ovlivňovány mnoha dalšími vnitřními faktory, jakými jsou plemeno a věk býka a vnějšími, jako je vnější prostředí, krmná dávka a její doplňky, roční období při odběru a frekvence odběrů (Rowe *et al.*, 2014; Kastelic, 2013; Beran *et al.*, 2011; Karoui *et al.*, 2011; Hajirezaee *et al.*, 2010; Sander, 2007). Asociační analýzy některých těchto efektů s kvantitativními a kvalitativními vlastnostmi ejakulátu býků se staly součástí naší studie.

### PLEMENO BÝKA

Signifikantní vliv plemene na vlastnosti čerstvého ejakulátu byl již potvrzen v dřívějších studiích (Boujenane a Boussaq, 2014; Beran *et al.*, 2011). Boujenane a Boussaq (2014) ve své studii porovnávali hodnoty čerstvého i rozmrazeného ejakulátu mezi býky H plemene, charolais, piedmontese, belgického modrého a oulmes-zaer. Nejvyšší koncentraci spermií prokázali ( $P \leq 0,05$ ) u býků plemene piedmontese, nejvíce aktivních spermií ihned po odběru i po rozmrazení zjistili u býků plemene H. Tyto výsledky korespondují se závěry naší studie, kdy byly zjištěny signifikantně ( $P \leq 0,01$ ) vyšší aktivita (+ 1 %) a množství (+ 1,4 g) čerstvého ejakulátu pro býky plemene H avšak nižší počet spermií v  $\text{cm}^3$  (Tabulka 19). Oproti tomu ale Beran *et al.* (2011) ve své studii zkoumal vliv holštýnského a českého strakatého plemene na vlastnosti čerstvého ejakulátu býků. Byla zjištěna asociace plemene a aktivity spermií ( $P \leq 0,05$ ), kdy se větší aktivitou ihned po odběru semene vyznačovali býci plemene C.

**Tabulka 19** Efekt plemene na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků

Plemeno	n/n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
C	118/3625	75,76±0,17 <sup>A</sup>	1,29±0,01 <sup>A</sup>	10,59±0,10 <sup>A</sup>
H	99/5764	76,76±0,12 <sup>A</sup>	1,14±0,01 <sup>A</sup>	11,99±0,07 <sup>A</sup>

n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. C = populace býků českého strakatého plemene, H = populace českých býků holštýnského plemene. Znak A označuje statisticky významné rozdíly mezi plemeny na hladině významnosti  $P \leq 0,01$ .

Stejný trend v motilitě spermií po rozmrazení mezi dvěma sledovanými plemeny jako ve studii Beran *et al.* (2011) byl shledán i v naší studii. Vyšší aktivita spermií po celou dobu průběhu tepelného testu přežitelnosti byla signifikantně ( $P \leq 0,01$ ) vyšší u plemene C, tedy u plemene, jehož býci se zpravidla vyznačovali nižší aktivitou spermií čerstvého ejakulátu ale vyšší hustotou (Tabulka 20).

**Tabulka 20** Efekt plemene na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků

Plemeno	n/n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
<b>C</b>	118/463	46,21±3,79 <sup>A</sup>	36,16±3,83 <sup>A</sup>	33,06±3,87 <sup>A</sup>	26,43±3,89 <sup>A</sup>	18,11±3,90 <sup>A</sup>
<b>H</b>	99/372	40,62±3,74 <sup>A</sup>	33,79±3,76 <sup>A</sup>	27,71±3,81 <sup>A</sup>	21,86±3,82 <sup>A</sup>	13,49±3,84 <sup>A</sup>

n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení. C = populace býků českého strakatého plemene, H = populace českých býků holštýnského plemene. Znak A označuje statisticky významné rozdíly mezi plemeny na hladině významnosti P≤0,01.

## VĚK BÝKA

Ve vybrané populaci 217 českých býků byly na inseminačních stanicích nejčastěji prováděny odběry u býků do 3 let věku. Ve statistickém modelu byl použit pevný efekt věku býka v měsících v době odběru ejakulátu. Statisticky významné rozdíly (P≤0,01), mezi skupinami býků rozdělených podle věku v době odběru, byly nalezeny pro všechny sledované vlastnosti čerstvého ejakulátu býků (Tabulka 21). Prokazatelně větší motilitou spermií (+ 3,06 a + 4,5 %) a množstvím odebraného ejakulátu (+ 4,1 g) se vyznačovali býci starší 6 let. Tyto výsledky korespondují se závěry studie Beran *et al.* (2011), kdy byla aktivita spermií ihned po odběru pozitivně korelována s věkem býka a se studií Fuerst-Waltl *et al.* (2006), kdy množství ejakulátu prokazatelně rostlo s věkem býka. Největší počet spermií v cm<sup>3</sup> byl prokazatelně nejvyšší u býků starých 37 – 60 měsíců, což ve své studii potvrzuje i Mathevon *et al.* (1998a), který zjistil, že se signifikantně lepšími vlastnostmi čerstvého ejakulátu vyznačovali kanadští býci H plemene starší třiceti měsíců.

**Tabulka 21** Efekt věku býka na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků

Věk	n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
<b>1</b>	4962	75,72±0,13 <sup>A,B</sup>	1,23±0,01 <sup>A</sup>	8,60±0,07 <sup>A,B</sup>
<b>2</b>	1063	74,28±0,25 <sup>A,C</sup>	1,26±0,01 <sup>B</sup>	12,56±0,15 <sup>A</sup>
<b>3</b>	3364	78,78±0,14 <sup>B,C</sup>	1,15±0,01 <sup>A,B</sup>	12,70±0,08 <sup>B</sup>

n<sup>2</sup> = počet pozorování. Znaky A, a; B, b; C, c označují statisticky významné rozdíly. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá – P≤0,05; velká – P≤0,01; Věk 1 = 15 – 36 měsíců, 2 = 37 – 60 měsíců, 3 = 61 – 120 měsíců

Vliv stáří býka v době odběru ejakulátu na motilitu spermií po rozmrazení byl v naší studii prokázán. Průkazně nejvíce aktivními spermii se vyznačovali býci staří 37 - 60 měsíců (Tabulka 22). To se částečně shoduje s výsledky studie Beran *et al.* (2011), kdy se vyšší aktivitou spermií po rozmrazení vyznačovali býci starší 48 měsíců.

**Tabulka 22** Efekt věku býka na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků

Věk	n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
1	592	46,03±3,60 <sup>a</sup>	39,27±3,58	33,36±3,64	27,12±3,71	18,63±3,77
2	85	48,54±4,13 <sup>b</sup>	42,92±4,11 <sup>a</sup>	37,15±4,18 <sup>A</sup>	29,87±4,26 <sup>a</sup>	20,70±4,33 <sup>a</sup>
3	158	41,38±3,81 <sup>a,b</sup>	36,26±3,78 <sup>a</sup>	29,34±3,85 <sup>A</sup>	23,09±3,92 <sup>a</sup>	14,60±3,98 <sup>a</sup>

n<sup>2</sup> = počet pozorování. Znaky A, a; B, b; označují statisticky významné rozdíly. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá – P≤0,05; velká – P≤0,01; Věk 1 = 15 – 36 měsíců, 2 = 37 – 60 měsíců, 3 = 61 – 120 měsíců

## MĚSÍC ODBĚRU BÝKA

V dřívějších studiích byl již prokázán vliv měsíce odběru inseminační dávky na nepřebíhavost plemenic, potraty a natalitu telat, na vlastnosti čerstvého ejakulátu býků a na množství abnormálních spermií v ejakulátu (Haugan et al., 2005; Zavy a Geisert, 1996; Graffer *et al.*, 1988; Sekoni a Gustafsson, 1987). Konkrétně Mathevon *et al.* (1998a) zjistil, že kvalitnější sperma je produkováno během zimních a jarních měsíců. Proto byla i v naší studii hodnocena asociace měsíce odběru býka a vlastností čerstvého i rozmrazeného ejakulátu. Kalendářní rok byl rozdělen podle ročních období, podobně jako ve studii Sander (2007) na jaro (březen – květen), léto (červen – srpen), podzim (září – listopad) a zimu (prosinec – únor). Signifikantní rozdíly (P≤0,01) mezi ročními obdobími byly nalezeny pro aktivitu a hustotu čerstvého ejakulátu, přičemž nejvyšší hodnoty byly zjištěny u inseminačních dávek odebraných na podzim. Nesignifikantně avšak nejvíce g odebraného ejakulátu (+ 0,16; + 0,14 a + 0,33 g) bylo zjištěno u ID odebíraných v jarních měsících (Tabulka 23). Tyto výsledky se shodují se závěry studie Sander (2007). Nebyl zjištěn vliv měsíce odběru ejakulátu na aktivitu spermií po rozmrazení.

**Tabulka 23** Efekt měsíce odběru býka na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků

Měsíc odběru	n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
1	2495	76,08±0,18	1,20±0,01 <sup>A</sup>	11,27±0,10
2	2279	75,70±0,19 <sup>A,B</sup>	1,23±0,01	11,43±0,10
3	2353	76,64±0,18 <sup>A</sup>	1,23±0,01 <sup>A</sup>	11,29±0,10
4	2262	76,62±0,19 <sup>B</sup>	1,21±0,01	11,10±0,10

n<sup>2</sup> = počet pozorování. Znaky A, B označují statisticky významné rozdíly mezi třídami. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti P≤0,01. Sezóna 1 = březen – květen, 2 = červen – srpen, 3 = září – listopad, 4 = prosinec – únor

## DOBA SKLADOVÁNÍ

Vliv doby skladování ID na aktivitu spermií po rozmrazení byl zkoumán na dávkách uložených v tekutém dusíku při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 až 219 měsíců. Doba skladování ID byla rozdělena do 4 tříd. Signifikantní rozdíly v motilitě spermií po rozmrazení byly nalezeny 90 min ( $P\leq 0,05$ ) a 120 min ( $P\leq 0,01$ ) po rozmrazení mezi ID zařazenými do třídy 1 a 2, kdy se vyšší aktivitou vyznačovali spermie skladované 25 – 48 měsíců (Tabulka 24). Naše výsledky tudíž nepotvrzují závěry studie Haugan *et al.* (2007), kdy byl prokázán vliv doby skladování ID na procento otelení. V naší studii se aktivita spermií zařazených do třídy s nejdelší dobou skladování významně nelišila od aktivity spermií zařazených do ostatních tříd.

**Tabulka 24** Efekt doby skladování na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků

Doba skladování	n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
1	323	43,01±3,79	35,51±3,82	28,24±3,86	21,64±3,88 <sup>a</sup>	12,99±3,90 <sup>A</sup>
2	226	42,31±3,80	36,59±3,83	30,87±3,87	25,87±3,89 <sup>a</sup>	18,20±3,90 <sup>A</sup>
3	133	46,73±4,01	38,42±4,04	32,67±4,08	25,41±4,10	16,43±4,12
4	153	41,61±3,89	35,39±3,92	29,75±3,97	23,65±3,98	15,59±4,00

n<sup>2</sup> = počet pozorování. AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení. Znak A, a označuje statisticky významné rozdíly mezi třídami. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá –  $P\leq 0,05$ ; velká –  $P\leq 0,01$ . Doba skladování 1 = 0 – 24 měsíců, 2 = 25 – 48 měsíců, 3 = 49 – 72 měsíců a 4 = 73 – 219 měsíců.

## INSEMINAČNÍ STANICE

Inseminační dávky použité ve studii pocházely od plemenných býků chovaných v pěti různých inseminačních stanicích (IS) nacházejících se na území České republiky. Všechny IS zařazené do studie uplatňovali standardně používané makroskopické i mikroskopické hodnocení ejakulátu, obdobné postupy ředění komerčními ředidly a ekvilibraci. Všechny ID byly poté skladovány při  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  v tekutém dusíku. Jak je patrné z Tabulky 25 byly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi všemi IS a všemi ukazateli čerstvého ejakulátu. Nejvyšší aktivitou spermií v čerstvém ejakulátu se vyznačovali plemenci z inseminační stanice č. 1., nejvyšší hustotu spermií měli býci z IS č. 5 a největší množství odebraného ejakulátu bylo zaznamenáno u jedinců odebíraných na IS č. 4. Do této analýzy nebyly zahrnuty další důležité faktory, jako jsou výživa, způsob ustájení, ošetřování, klimatické podmínky ve stáji a sociální postavení plemníka ve stádě, které se mohli na jednotlivých stanicích lišit a mohli významně ovlivnit tyto výsledky.



**Tabulka 25** Efekt inseminační stanice na kvantitativní a kvalitativní ukazatele ejakulátu býků

IS	n <sup>2</sup>	Aktivita [%]	Hustota [mil/cm <sup>3</sup> ]	Množství [g]
1	5251	79,32±0,91 <sup>A,b,C,D</sup>	1,26±0,05 <sup>A,B,C,D</sup>	11,96±0,50 <sup>A,B,C</sup>
2	1157	72,85±0,92 <sup>A,E,F,G</sup>	1,34±0,05 <sup>A,E,F</sup>	9,90±0,50 <sup>A,D,E,F</sup>
3	990	78,26±0,93 <sup>b,E,H,I</sup>	1,38±0,05 <sup>B,G,H</sup>	11,72±0,51 <sup>D,G,H</sup>
4	1448	75,95±0,93 <sup>C,F,H,J</sup>	1,44±0,05 <sup>C,E,G,I</sup>	15,44±0,51 <sup>B,E,G,I</sup>
5	543	70,19±0,91 <sup>D,G,I,J</sup>	1,58±0,05 <sup>D,E,H,I</sup>	8,63±0,50 <sup>C,F,H,I</sup>

n<sup>2</sup> = počet pozorování. Znak A, B označují statisticky významné rozdíly mezi třídami. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti P≤0,01. Sezóna 1 = březen – květen, 2 = červen – srpen, 3 = září – listopad, 4 = prosinec – únor

Co se týká výsledků tepelného testu přežitelnosti nejnižší motilita spermií byla signifikantně prokázána u plemenníků působících na inseminační stanici č. 5, kteří se vyznačovali nejvyšší hustotou čerstvého ejakulátu, a to po celou dobu trvání krátkodobého tepelného testu přežitelnosti. Nejvyšší aktivitou spermií po rozmrazení se vyznačovali býci z inseminační stanice č. 2 (Tabulka 26).

**Tabulka 26** Efekt inseminační stanice na aktivitu rozmrazeného ejakulátu býků

IS	n <sup>2</sup>	AKT0	AKT30	AKT60	AKT90	AKT120
1	61/222	55,53±1,34 <sup>A</sup>	47,46±1,33 <sup>a,B</sup>	40,93±1,35 <sup>A</sup>	34,44±1,37 <sup>A</sup>	27,84±1,39 <sup>A</sup>
2	64/258	61,02±1,52 <sup>B</sup>	53,55±1,50 <sup>a,C</sup>	45,45±1,52 <sup>B</sup>	36,31±1,55 <sup>B</sup>	28,58±1,57 <sup>B</sup>
3	16/60	59,14±2,55 <sup>C</sup>	54,19±2,52 <sup>D</sup>	47,45±2,56 <sup>C</sup>	39,85±2,60 <sup>C</sup>	29,86±2,65 <sup>C</sup>
4	41/160	54,37±1,75 <sup>d</sup>	49,80±1,72 <sup>E</sup>	45,26±1,75 <sup>D</sup>	38,56±1,78 <sup>D</sup>	30,62±1,81 <sup>D</sup>
5	35/135	46,36±1,77 <sup>A,B,C,d</sup>	36,72±1,75 <sup>B,C,D,E</sup>	30,47±1,77 <sup>A,B,C,D</sup>	24,30±1,80 <sup>A,B,C,D</sup>	18,09±1,83 <sup>A,B,C,D</sup>

n/n<sup>2</sup> = počet zvířat/ počet pozorování. AKT0-120 = motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení. Znak A, a, B, b, C, c, D, d, E, e označuje statisticky významné rozdíly mezi IS. Hodnoty se stejným písmenem se statisticky významně liší na hladině významnosti: malá – P≤0,05; velká – P≤0,01. IS č. 1, 2, 3, 4 a 5.

## 6 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývá studiem variability DNA ve vybraných polymorfních lokusech, které byly již na základě výsledků dřívějších prací označeny jako kandidátní k různým ekonomicky významným vlastnostem hospodářských zvířat, a na vyhodnocení vlivu těchto polymorfismů na kvantitativní a kvalitativní vlastnosti ejakulátu plemenných býků českého strakatého a holštýnského plemene.

Byla provedena genetická analýza u 118 býků českého strakatého a 99 býků holštýnského plemene polymorfismu *C(-963)T* bovinního genu kódující hormon leptin, dále dinukleotidová substituce lysinu za alanin (*K232A*) genu kódujícího enzym Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1, dvou jednonukleotidových polymorfismů genu pro se spermii asociovaný antigen 11 (*SPAG11*) na pozici *1454G>A* (*SPAG11-P2*) detekovaný na intronu 2 a *SPAG11-P8* na pozici *22696T>C* lokalizovaný na intronu 8 a nakonec substituce thyminu cytosinem (+65 T>C) v 5' přílehlé oblasti bovinní pro spermie specifická fosfolipáza C zeta (*PLCz*). Z výsledků genetických analýz bylo stanoveno zastoupení alel a genotypů v celé sledované populaci i v populaci českého strakatého a holštýnského skotu zvlášť. Byla provedena asociační analýza mezi těmito polymorfismy a kvantitativními a kvalitativními vlastnostmi čerstvého a rozmrazeného ejakulátu býků, tj. aktivitou (%), hustotou ( $\text{mil/cm}^3$ ) a množstvím (g) čerstvého ejakulátu a motilitou spermií (%) rozmrazeného ejakulátu sledované během krátkodobého tepelného testu přežitelnosti. Zároveň byla provedena asociační analýza plemene, věku býka, měsíce odběru býka a doby skladování ID na vlastnosti čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků.

Prvním dílčím cílem této práce bylo zjistit variabilitu vybraných polymorfismů v populaci celkem, českého strakatého a holštýnského skotu. Pro genotypování byla využita DNA izolovaná z ID. Všechny polymorfismy byly stanoveny pomocí metody PCR-RFLP. Celkem bylo genotypováno 217 býků. Výsledky genotypování můžeme zhodnotit následovně:

- Sledovaný soubor býků českého strakatého a holštýnského plemene vykazoval variabilitu ve všech sledovaných polymorfních místech.
- Zastoupení genotypů i alel je blízké výsledkům dřívějších studií.

Dalším dílčím cílem bylo zhodnotit asociace mezi genotypy a alelami vyšetřovaných polymorfismů a kvantitativními i kvalitativními vlastnostmi ejakulátu býků, tj. aktivitou, hustotou a množstvím čerstvého ejakulátu a aktivitou spermií rozmrazeného ejakulátu.

Statistická analýza byla provedena analýzou rozptylu s více proměnnými (MANOVA) s opakovatelností použitím GLM procedury u každého polymorfismu:

- Byla prokázána asociace polymorfismu *C(-963)T* genu *LEP* s vlastnostmi čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků
- Byla prokázána asociace polymorfismu *K232A* genu *DGATI* s vlastnostmi čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků
- Byla prokázána asociace polymorfismu *SPAG11-P2* s vlastnostmi čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků
- Byla prokázána asociace polymorfismu *SPAG11-P8* s vlastnostmi čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků
- Byla prokázána asociace polymorfismu *PLCz* s aktivitou a množstvím čerstvého ejakulátu i motilitou spermií rozmrazeného ejakulátu býků

Statistická analýza, která byla provedena pro hodnocení asociací mezi polymorfismy a sledovanými ukazateli ejakulátu býků, byla použita i pro zhodnocení vztahů mezi vlastnostmi čerstvého i rozmrazeného ejakulátu a dalšími podstatnými efekty zařazenými do modelu. Z asociačních analýz bylo zjištěno následující:

- Byla prokázána asociace plemene býka s vlastnostmi čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků
- Byla prokázána asociace věku plemeníka s vlastnostmi čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků
- Byla prokázána asociace měsíce odběru býka s vlastnostmi čerstvého ejakulátu
- Byla prokázána asociace doby skladování ID s vlastnostmi rozmrazeného ejakulátu býků
- Byla prokázána asociace inseminační stanice s vlastnostmi čerstvého i rozmrazeného ejakulátu býků

Výsledky studovaných polymorfismů ukazují na rozdílnost efektů sledovaných lokusů v různých populacích skotu, což je možné vysvětlit jejich rozdílným genetickým pozadím u těchto populací, jež jsou šlechtěny s různou intenzitou a důrazem na vybrané užitkové vlastnosti. Potvrzení asociací analyzovaných polymorfismů a sledovaných užitkových vlastností podporuje jejich využití při dalších studiích u býků českého strakatého a

holštýnského skotu. Výsledky studie lze dále v budoucnosti využít při šlechtění a selekci plemenných býků, neboť byl prokázán vliv vybraných polymorfismů na sledované ukazatele ejakulátu. Vzhledem k připravovanému uvedení genomické selekce u české populace skotu jsou možnosti uplatnění zjištěných výsledků velmi aktuální.

## 7 SEZNAM LITERATURY

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Espero publishing. Ústí nad Labem. 630 s. ISBN: 8090290620.
- Anton, I., Kovács, K., Holló, G., Farkas, V., Szabó, F., Egerszegi, I., Rátky, J., Zsolnai, A., Brüssow, K.-P. 2012. Effect of DGAT1, leptin and TG gene polymorphisms on some milk production traits in different dairy cattle breeds in Hungary. *Archiv Tierzucht*. 55(4): 307-314.
- Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., Da, Y., VanRaden, P. M., Ron, M., Weller, J. I., Lewin, H. A. 2004. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*. 87(2): 468-475.
- Bartoň, L. 2000. Plodnost. Černostrakaté novinky. 1. s. 47-49.
- Beran, J., Stádník, L., Ducháček, J., Toušová, R., Louda, F., Štolc, L. 2011. Effect of bulls' breed, age and body condition score on quantitative and qualitative traits of their semen. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*. 59 (6): 37-44.
- Bhoite, U. Y., Sutar, D. A., Ulmek, B. R. 2008. Studies on semen quality of crossbred bulls. *Indian Veterinary Journal*. 85: 395-397.
- Boujenane, I., Boussaq, K. 2014: Breed effects on semen traits of dairy and beef artificial insemination bulls. *Livestock Research for Rural Development*. 26(6): 114.
- Bouška, J., Doležal, O., Jílek, F., Kudrna, V., Kvapilík, J., Příbyl, J., Rajmon, R., Sedmíková, M., Skřivanová, V., Šlosárková, S., Tyrolová, Y., Vacek, M., Žižlavský, J. 2006. Chov dojeného skotu. Profi Press. Praha. 186 s. ISBN: 80-86726-16-9.
- Brown, T. A. 2007. Klonování genů a analýza DNA. Univerzita Palackého. Olomouc. 389 s. ISBN: 9788024417196.
- Burdych, V., Všetečka, J., Divoký, L., Brychta, J., Stejskalová, E., Kvapilík, J. 2004. Reprodukce ve stádech skotu. Chovservis a.s. Hradec Králové. 72 s.

- Cano, R. J., Poinar, H. N., Pieniazek, N. J., Acra, A., Poinar, Jr. G. O. 1993. Amplification and sequencing of DNA from a 120-135 million year old weevil. *Nature*. 363 (6429): 536-538.
- Chebel, R. C., Susca, F., Santos, J. E. P. 2008. Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 91: 2893-2900.
- ČSN 467111 – Sperma býka. Vyhláška č. 471 MZe ČR z 13. 12. 2000. Zákon č. 154/2000 Sb. O šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat. Online dostupné na: <http://www.eagri.cz>
- Dai, L., Zhao, Z., Zhao, R., Xiao, S., Jiang, H., Yue, X., Li, X., Gao, Y., Liu, J, Zhang, J. 2009. Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH  $\beta$ -subunit gene on semen quality and fertility in bulls. *Animal Reproduction Science*. 114: 14-22.
- Dekkers, J. C. M. 2004. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *Journal of Animal Science*. 82 (13): E313-E328.
- Dvořák, J., Gazdová, V., Říha, J. 2005. Využití genetických markerů a molekulárně genetických metod pro šlechtění specializovaných masných plemen skotu. In: Využití genetických metod ve šlechtění skotu na masnou užitkovost a její ovlivnění faktory prostředí: sborník příspěvků k semináři. Asociace chovatelů masných plemen. Rapotín. s. 63 – 67. ISBN: 8090314376.
- Dvořák, J., Říha, J. 2005. Genetické markery, jejich současné a budoucí využití v chovu skotu. In: Možnosti využití molekulární a populační genetiky pro šlechtění skotu na vyšší kvalitu produktů: sborník příspěvků. Výzkumný ústav pro chov skotu. Rapotín. 166 s. ISBN: 8090314252.
- Farese, JR R. V., Cases, S., Smith, S. J. 2000. Triglyceride synthesis: insights from the cloning of diacylglycerol acyltransferase. *Current Opinion in Lipidology*. 11: 229-234.
- Farnir, F., Grisart, B., Coppieters, W., Riquet, J., Berzi, P., Cambisano, N., Karim, L., Mni, M., Moisisio, S., Simon, P., Wagenaar, D., Vilkki, J., Georges, M. 2002 Simultaneous mining of linkage and linkage disequilibrium to fine map quantitative trait loci in outbred half-sib pedigrees: revisiting the location of a quantitative trait locus with major effect on milk production on bovine chromosome 14. *Genetics*. 161: 275-287.

- Foote, R. H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *American Society of Animal Science*. 80: 1-10.
- Fuerst-Waltl, B., Schwarzenbacher, H., Perner, C., Sölkner, J. 2006. Effect of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Animal Reproduction Science*. 95 (1-2): 27-37.
- Gautier, M., Capitan, A., Fritz, S., Eggen, A., Boichard, D., Druet, T. 2007. Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. *Journal of Dairy Science*. 90: 2980-2988.
- Ghasemi, M.V., Ghorbani, A. 2014. Environmental and genetic factors affecting on semen quality in Iranian hostein bulls. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 4 (1): 33-37.
- Graffer, T., Solbu, H., Filseth, O. 1988. Semen production in artificial insemination bulls in Norway. *Theriogenology*. 30: 1011–1021.
- Gravance, C. G., Casey, M. E., Casey, P. J. 2009. Pre-freeze bull sperm head morphometry related to post-thaw fertility. *Animal Reproduction Science*. 114(1-3): 81-88.
- Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Carroll, S. B., Doebley, J. 2010. *Introduction to Genetic Analysis*. Freeman and Company. Basingstoke. 802 s. ISBN: 9781429276344.
- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M., Snell, R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research*. 12: 222-231.
- Gorbani, A. Vaez Torshizi, R., Bonyadi, M., Amirinia, C. 2009. A MspI PCR-RFLP within bovine growth hormone gene and its association with sperm quality traits in Iranian Holstein bulls. *African Journal Of Biotechnology*. 8(19): 4811-4816.
- Goumenou, A. G., Matalliotakis, I. M., Koumantakis, G. E., Panidis, D. K. 2003. The role of leptin in fertility. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 106(2): 118-124.

- Hajirezaee, S., Mojazi Amiri, B., Mirvaghefi, A., Sheikh Ahmadi, A. 2010. Evaluation of semen quality of endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in different times of spermiation during the spawning season. *Czech Journal of Animal Science*. 55(10): 445-455.
- Haugan, T., Gröhn, Y.T., Kommisrud, E., Ropstad, E., Reksen, O. 2007. Effect of sperm concentration at semen collection and storage period of frozen semen on dairy cow conception. *Animal Reproduction Science*. 97: 1-11.
- Haugan, T., Reksen, O., Gröhn, Y. T., Kommisrud, E., Ropstad, E., Sehested, E. 2005. Seasonal effect of semen collection and artificial insemination on dairy cow conception. *Animal Reproduction Science*. 90(1-2): 57-71.
- Hála, K., Vaníček, D., Řehout, V. 2000. Moderní metody při zlepšování genofondu skotu. Černostrakaté novinky. 1. s. 23-26.
- Jakubec, V., Říha, J., Golda, J., Majzlík, I. 1999. Odhad plemenné hodnoty hospodářských zvířat. Výzkumný ústav pro chov skotu. Rapotín. 177 s. ISBN: 802130622X.
- Jakubec, V., Říha, J., Majzlík, I., Bjelka, M. 2003. Teorie a praxe selekce hospodářských zvířat. Asociace chovatelů masných plemen. Rapotín. 154 s. ISBN: 8090314325.
- Jalme, M.S., Lecoq, R., Seigneurin, F., Blesbois, E., Plouzeau, E. 2003. Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*. 59: 875–888.
- Ji, S., Willis, G. M., Scott, R. R., Spurlock, M. E. 1998. Partial cloning and expression of the bovine leptin gene. *Animal Biotechnology*. 9: 1-4.
- Johnson, R. 2004. Marker-assisted Selection. In: Janick, J. (ed.). *Plant Breeding Reviews*. 24(1). s. 293-309. ISBN: 0471353167.
- Kadlecová, V., Němečková, D., Ječmínková, K., Stádník, L. 2014a. Association of bovine *DGATI* and leptin genes polymorphism with milk production traits and energy balance indicators in primiparous Holstein cows. *Mljekarstvo*. 64 (1): 19-26.
- Kadlecová, V., Němečková, D., Ječmínková, K., Stádník, L. 2014b. The effect of polymorphism in the *DGATI* gene on energy balance and milk production traits in



- primiparous holstein cows during the first six months of lactation. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*. 20 (1): 219-225.
- Karoui, S., Díaz, C., Serrano, M., Cue, R., Celorrio, I., Carabaño, M. J. 2011. Time trends, environmental factors and genetic basis of semen traits collected in Holstein bulls under commercial conditions. *Animal Reproduction Science*. 124 (1-2): 28-38.
- Kastelic, J.P. 2013. Male involvement in fertility and factors affecting semen quality in bulls. *Animal Frontiers*. 3 (4): 20-25.
- Kaupe, B., Brandt, H., Prinzenberg, E. - M., Erhardt, G. 2007. Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction, and productive lifespan in German Holstein cattle. *Journal of Animal Science*. 85(1): 11-21.
- Kliment, J. 1989. Reprodukcia hospodárskych zvierat. *Príroda Bratislava*. 378 s. ISBN: 8007000275.
- Knoll, A. 2010. Nové přístupy vyhledávání genetických markerů pro šlechtění na masnou užitkovost. In: Šlechtění na masnou užitkovost a aktuální otázky produkce jatečných zvířat: sborník příspěvků z IV. Mezinárodní konference pořádaná v rámci presentace výsledků řešení projektu MŠMT 2B06107. 16.9.2010. Mendelova univerzita v Brně. Brno. 194 s. ISBN: 9788073754303.
- 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.
- Komisarek, J., Antkowiak, I. 2007. The relationship between leptin gene polymorphisms and reproductive traits in Jersey cows. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 10(4): 193-197.
- Komisarek, J., Michalak, A. 2008. A relationship between DGAT1 K232A polymorphism and selected reproductive traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports*. 26(2): 89-95.

- Kouchi, Z., Fukami, K., Shikano, T., Oda, S., Nakamura, Y., Takenawa, T., Miyazaki, S. 2004. Recombinant phospholipase C $\zeta$  has high Ca<sup>2+</sup> sensitivity and induces Ca<sup>2+</sup> oscillations in mouse eggs. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 10408-10412.
- Kučera, J., Král, P., Gančev, R. 2005. Šlechtění českého strakatého skotu. In: Možnosti využití molekulární a populační genetiky pro šlechtění skotu na vyšší kvalitu produktů: sborník příspěvků. Výzkumný ústav pro chov skotu. Rapotín. 166 s. ISBN: 8090314252.
- Kühn, C., Thaller, G., Winter, A., Bininda-Emonds, O. R., Kaupe, B., Erhardt, G., Bennewitz, J., Schwerin, M., Fries, R. 2004. Evidence for Multiple Alleles at the DGAT1 Locus Better Explains a Quantitative Trait Locus With Major Effect on Milk Fat Content in Cattle. *Genetics*. 167: 1873-1881.
- Kulig, H., Kmiec, M., Kowalewska-Luczak, 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.
- Kvapilík, J., Růžička, Z., Bucek, P. 2012. Ročenka-Chov skotu v České republice. Hlavní výsledky a ukazatele za rok 2011. ČMSCH. Praha. 92 s. ISBN:9788087633021.
- Kwok, P. Y. 2003. *Single Nucleotide Polymorphisms; Methods and protocols*. Humana Press. New Jersey. 288 s. ISBN: 0896039684.
- Kwok, P. Y., Chen, X. 2003. Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Current Issues in Molecular Biology*. 5. 43-60.
- Lagonigro, R., Wiener, P., Pilla, F., Woolliams, J. A., Williams, J. L. 2003. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics*. 34(5): 371-374.
- Leeb, T. 2007. The horse genome project-sequence based insight into male reproductive mechanisms. *Reproduction in Domestic Animals*. 42: 45-50.
- Lehrer, R. I., Ganz, T. 2002. Defensins of vertebrate animals. *Current Opinion in Immunology*. 14(1): 96-102.

- Liefers, S. C., Veerkamp, R. F., te Pas, M. F. W., 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(2): 111-118.
- Lin, C. L., Ponsuksili, S., Tholen, E., Jennen, D. G., Schellander, K., Wimmers, K. 2006. Candidate gene markers for sperm quality and fertility of boar. *Animal Reproduction Science*. 92 (3-4): 349-363.
- Liu, X., Ju, Z., Wang, L., Zhang, Y., Huang, J., Li, Q., Li, J., Zhong, J., An, L., Wang, Ch. 2011. Six novel single-nucleotide polymorphisms in SPAG11 gene and their association with sperm quality traits in Chinese Holstein bulls. *Animal Reproduction Science* 129: 14-21.
- Longeri, M., Polli, M., Strillacci, M. G., Samore, A. B., Zanotti, M. 2006. Short Communication: Quantitative Trait Loci Affecting the Somatic Cell Score on Chromosomes 4 and 26 in Italian Holstein Cattle. *Journal of Dairy Science*. 89(8): 3175–3177.
- Louda, F., Bjelka, M., Ježková, A., Pozdíšek, J., Stádník, L., Bezdíček, J. 2007. Zásady využívání plemenných býků v podmínkách přirozené plemenitby. Výzkumný ústav pro chov skotu, s.r.o. Rapotín. Česká republika. 43 s. ISBN: 9788087144015.
- Louda, F., Vaněk, D., Ježková, A., Stádník, L., Bjelka, M., Bezdíček, J., Pozdíšek, J. 2008. Uplatnění biologických zásad při řízení reprodukce plemenic. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o. Rapotín. 55 s. ISBN: 9788087144053.
- Manga, I., Říha, H. 2011. The *DGATI* gene *K232A* mutation is associated with milk fat content, milk yield and milk somatic cell count in cattle. *Archiv Tierzucht*. 54(3): 257-236.
- Mathevon, M., Buhr, M. M., Dekkers, J. C. 1998a. Environmental, management, and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *Journal of Dairy Science*. 81(12): 3321-3330.
- Mathevon, M., Dekkers, J. C. M., Buhr, M. M. 1998b. Environmental, management and genetic factors affecting semen production in French Montbéliard bulls. *Livestock Production Science*. 55(1): 65-77.

- Motyčka, J. 2005 Šlechtění holštýnského plemene. In: Možnosti využití molekulární a populační genetiky pro šlechtění skotu na vyšší kvalitu produktů: sborník příspěvků. Výzkumný ústav pro chov skotu. Rapotín. 166 s. ISBN: 8090314252.
- Motyčka, J., Vacek, M., Šlejtr, J., Chládek, G., Vondrášek, L., Pazdera, J. 2005. Šlechtění holštýnského skotu. Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR. Praha. 87 s.
- Nott, A., Meislin, S.H., Moore, M.J. 2003. A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression. *RNA*. 9: 607-617.
- 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: 458-480.
- Oikonomou, G., Angelopoulou, K., Arsenos, G., Zygoiannis, D., Banos, G. 2008. 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(1): 10-17.
- Pan, Q., Ju, Z., Huang, J., Zhang, Y., Qi, Ch., Gao, Q., Zhou, L., Li, Q., Wang, L., Zhong, J., Liu, M., Wang, Ch. 2013. PLCz functional haplotypes modulating promoter transcriptional activity are associated with semen quality traits in chinese hosltein bulls. *PLoS ONE* 8(3): e58795. Doi:10.1371/journal.pone.0058795.
- Pomp, D., Zou, T., Clutter, A. C., Barendse, W. 1997. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal of Animal Science*. 75(5): 1427.
- Příbyl, J., Příbylová, J. 2005. Populační genetiky ve šlechtění dojných a masných plemen skotu. In: Možnosti využití molekulární a populační genetiky pro šlechtění skotu na vyšší kvalitu produktů: sborník příspěvků. Výzkumný ústav pro chov skotu. Rapotín. 166 s. ISBN: 8090314252.
- Rice, A., Parrington, J., Jones, K.T., Swann, K. 2000. Mammalian sperm contain a  $Ca^{2+}$  sensitive phospholipase C activity that can generate  $InsP_3$  from  $PIP_2$  associated with intracellular organelles. *Developmental Biology*. 228: 125-135.

- Rowe, M.P., Powell, J.G., Kegley, E.B., Lester, T.D., Rorie, R.W. 2014. Effect of supplemental trace-mineral source on bull semen quality. *The Professional Animal Scientist*. 30 (1): 68-73.
- Říha, J. 2008. Genetické markery ve šlechtění skotu pro masnou produkci. Výzkumný ústav pro chov skotu s.r.o. Rapotín. Zpracováno za podpory projektu MŠMT č. 2B08037. 5.11.2008. Online dostupné na: <http://www.vuchs.cz/akce/2008-11-05-Rapotin/2008-11-05-Rapotin-Riha.pdf>
- Říha, J. 1996. Reprodukce ve stádě skotu. Svaz chovatelů českého strakatého skotu. Praha 125 s.
- Říha, J., Jakubec, V., Jílek, F., Illek, J., Kvapilík, J., Hanuš, O., Čermák, V. 2004. Reprodukce v procesu šlechtění skotu. Asociace chovatelů masných plemen. Rapotín. 144 s. ISBN: 809031435X.
- Říha, J., Petelíková, J., Čerňovský, J., Bažant, J., Bochenek, M., Pytloun, J. 2003. Plemenitba hospodářských zvířat. Asociace chovatelů masných plemen. Rapotín. 151 s. ISBN: 8090314341.
- Sander, M.J.U. 2007. Environment related variations in the semen characteristics of bulls used for Artificial Insemination (AI) programme in Bangladesh. *University Journal of Zoology, Rashahi University*. 26:81-88.
- Sanders, K., Bennewitz, J., Reinsch, N., Thaller, G., Prinzenberg, E. - M.; Kühn, C., Kalm, E. 2006. Characterization of the DGAT1 mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln diary cattle population. *Journal of Dairy Science*. 89(8): 3164-3174.
- Saunders, Ch.M., Larman, M.G., Parrington, J., Cox, L.J., Royse, J., Blayney, L.M., Swann, K., Lai, F.A. 2002. PLC $\zeta$ : a sperm-specific trigger of Ca<sup>2+</sup> oscillations in eggs and embryo development. *Development*. 129: 3533-3544.
- Siddique, M., Ali, R., Raza, A. 2006. Effect of buffers on Freezing of buffalo bull semen. *Journal of Agriculture & Social Sciences*. 2: 117-119.
- Snustad, D. P., Simmons, M. J. 2009. Genetika. Tiskárna Helbich a.s. Brno. 871 s. ISBN: 9788021048522.

- Stricker, S.A. 1999. Comparative biology of calcium signaling during fertilization and egg activation in animals. *Developmental Biology*. 211: 157-176.
- Šmarda, J., Doškař, J., Pantůček, R., Růžičková, V., Koptíková, J. 2008. *Metody molekulární biologie*. Masarykova Univerzita. Brno. 188 s. ISBN: 9788021038417.
- Štolc, L., Ježková, A., Stádník, L., Louda, F. 2009. Effect of rams' breeds and ages on quantitative and qualitative traits of their sperm. *Výzkum v chovu skotu*. 51(1): 14-21.
- Thurston, L.M., Watson, P.F., Holt, W.H., 2002. Semen cryopreservation: a genetic explantation for species and individual variation? *CryoLetters*. 23: 255-262.
- Trojan, S., Langmeier, M., Hrachovina, V., Kittnar, O., Koudelová, J., Kuthan, V., Mareš, J., Marešová, D., Mourek, J., Pokorný, J., Sedláček, J., Schreiber, M., Trávníčková, E., Wünsch, Z. 2003, *Lékařská fyziologie*. Grada Publishing, a.s. Praha, 772 s., ISBN: 8024705125.
- Vinkler, A. 2009. Metody diagnostiky pohlavní aktivity a poruch plodnosti. In: Hofírek, B., Dvořák, R., Němeček, L., Doležel, R., Pospíšil, Z. (Eds.). *Nemoci skotu*. Noviko a.s. Brno. s. 513-524. ISBN: 9788086542195.
- Wang, L. B., Fan, J. S., Yu, M. J., Zheng, S. Y., Zhao, Y. J., 2011. Association of Goat (*Capra Hircus*) CD4 Gene Exon 6 Polymorphism with Ability of Sperm Internalizing Exogenous DNA. *Molecular Biology Reports*. 38(3): 1621-1628.
- Winter, A., Krämer, W., Werner, F. A. O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J. E., Thaller, G., Fries, R. 2002. Association of a lysine-232-alanine polymorphisms in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. 99(14): 9300-9305.
- Wolf, J., Smital, J. 2009. Effect in genetic evaluation for semen traits in Czech Large White and Czech Landrace boars. *Czech Journal of Animal Science*. 54: 349-358.
- Wu, H., Smyth, J., Luzzi, V., Fukami, K., Takenawa, T., Black, S.L., Allbritton, N.L., Fissore, R.A. 2001. Sperm factor induces intracellular free calcium oscillations by stimulating the phosphoinositide pathway. *Biology of Reproduction*. 64: 1338-1349.

Yang, W. C., Tang, K. Q., Yu, J. N., Zhang, C. Y., Zhang, X. X., Yang, L. G. 2011. Effect of MboII and BspMI polymorphisms in the gonadotropin releasing hormone receptor gene on sperm quality in Holstein bulls. *Molecular Biology Reports*. 38(5): 3411-3415.

Yenugu, S., Hamil, K. G., French, F. S., Hall, S. H. 2006. Antimicrobial Actions of Human and Macaque Sperm Associated Antigen (SPAG) 11 Isoforms: influence of the N-terminal peptide. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 284(1-2): 25-37.

Zeller, M., Hessler, K. 2005. From Mendel to Markers: Impact of molecular technologies on animal, plant, and human genetics. Iowa State University 228 s. Online dostupné na: <http://www.biotech.iastate.edu/publications/mendel/>

Internetové zdroje:

<http://www.cestr.cz>

<http://www.pravnipredpisy.cz>

<http://www.holstein.cz>

## 8 SEZNAM ZKRATEK

ACSR-PCR - artificially created restriction site polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

AKT0-120 - motilita spermií [%] 0, 30, 60, 90 a 120 min po rozmrazení

bp – base pair, pár bází

býci C - populace býků českého strakatého plemene

býci H - populace českých býků holštýnského plemene

DG - diacylglycerol

DGAT1 – diacylglycerol O-acyltransferase 1

DNA – deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina

EtBr – Ethidium bromid

ID – inseminační dávka

IS – inseminační stanice

IP<sub>3</sub> – inositol – 1,4,5 - trifosfát

LEP – leptin

MAS – Marker Assisted Selection, selekce za podpory markerů

PCR – polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

RED holštýn – červenostrakatá linie holštýnského skotu

RFLP-PCR – restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction, polymorfismus délky restrikčních fragmentů-polymerázová řetězová reakce

SNP, SNPs – single nucleotide polymorphism(s), jednonukleotidový polymorfismus

SPAG11 – sperm-associated antigen 11

SPAG11-P2 – SNP 1454G>A na intronu 2 genu SPAG11

SPAG11-P8 – SNP 22696T>C na intronu 8 genu SPAG11

PLCz – phospholipase C zeta

primer F – forward primer, primer kódující

primer R – reverse primer, primer antikódující

VNTR – Variable Number of Tandem Repeats, variabilní počet tandemových repetitiv