

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra etologie a zájmových chovů



**Využití molekulární genetiky ve šlechtění hospodářských
zvířat**

Bakalářská práce

Autor práce: Michaela Blovká

Obor studia: ATZP – Chovatelství

Vedoucí práce: Ing. Barbora Hofmanová, Ph.D.

© 2019 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Využití molekulární genetiky ve šlechtění hospodářských zvířat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Barboře Hofmanové Ph. D. za odborné vedení, pomoc a vstřícný přístup při zpracovávání mé bakalářské práce. A své rodině za podporu během celého studia.

Využití molekulární genetiky ve šlechtění hospodářských zvířat

Souhrn

Tato bakalářská práce je zaměřena na využití molekulární genetiky ve šlechtění skotu, koní a prasat. Molekulární genetiky je rychle se rozvíjející vědní obor a její využívání v chovu hospodářských zvířat se zintenzivňuje. Zabývá se hlavně specifickými diagnostickými a experimentálními metodami. Hlavními diagnostickými metodami jsou polymerázová řetězová reakce (PCR), délkové polymorfismy restrikčních fragmentů (RFLP), DNA sekvencování, fluorescenční in situ hybridizace (FISH), krátké tandemové repetice (STR, mikrosatelity) nebo polymorfismy jednotlivých nukleotidů (SNP).

V praxi se molekulární metody používají ke zkoumání chovatelsky atraktivních genů, stanovení genetického typu, ověřování původu, diagnostice nemocí a genomickému výběru.

U skotu jsou chovatelsky zajímavé geny masné produkce například myostatinový gen, jehož mutace má za následek dvojitě osvalení nebo skupina genů MYOD, které ovlivňují kvalitu masa. Mléčnou produkci ovlivňují gen DGAT1, ten ovlivňuje obsah mléčného tuku, bílkovin a výnos mléka nebo CSN3 gen, určující obsah κ – kaseinu a jeho vlastnosti pro výrobu mléčných výrobků. Dalším využitím molekulární genetiky v chovu skotu je genomická selekce, která umožňuje výběr plemenných zvířat ve velmi mladém věku, a tím zkrácení generačního intervalu. Diagnostické metody se využívají k vyšetření jedinců na genetická onemocnění: komplexní vertebrální malformace (CVM), syndrom deficience adhezní schopnosti leukocytů (BLAD), chondrodysplazie, arachnomelie, citrulinémie, syndrom zakřiveného ocasu atd.

Genetická analýza zbarvení se provádí u koní, posuzují se geny základního zbarvení (MC1R, ASIP), geny zředňující (Cream, Dun, Silver Dapple, Champagne) a gen bílého zbarvení KIT gen. U dostihových koní se posuzuje vhodnost koně pro délku tratě pomocí myostatinového genu (GDF-8), který ovlivňuje vývoj svalových vláken. Dědičná onemocnění koní diagnostikovaná genetickými metodami jsou polysacharidová myopatie (PSSM1), syndrom fragilních hříbat teplokrevníků (WFFS), nedostatek enzymů štěpících glykogen (GBED), hereditární equinní regionální dermální astenie (HERDA) a další.

Využití molekulární genetiky v chovu prasat není tak rozšířené. Hlavním využitím je šlechtění stres rezistentních linií prasat, související s geny RYR1 a RN.

Pro identifikaci zvířat a ověřování původu se stanovuje genetický typ zvířat. Stanovení je ze zákona povinné u býků, hřebců a kanců vybraných do plemenitby.

Genetické testy zvířat nabízí v České republice několik pracovišť například Genomia, laboratoř iGenetiky (ČMSCH), Vemodia nebo LAMGen.

Dostupné a méně finančně náročné genetické testy umožňují využití v chovu hospodářských zvířat. Rozsáhlé studie genů ovlivňující ekonomicky žádané vlastnosti zvířat, přináší nové poznatky pro nové metody zkoumání a zlepšování genetického založení jedinců.

Klíčová slova: gen, skot, koně, prasata, genetické onemocnění, genetický typ, genomická selekce

Application of molecular genetics in livestock breeding

Summary

This Bachelor's thesis focuses on the application of molecular genetics in breeding cattle, horses and pigs. Molecular genetics is a booming branch of science and its use in breeding livestock has rapidly increased. It mostly deals with specific diagnostic and experimental methods. The main diagnostic methods are Polymerase Chain Reaction (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP), DNA sequencing, fluorescence in situ hybridization (FISH), short tandem repeat (STR, microsatellites) or single nucleotide polymorphisms (SNP).

In practice, molecular methods are used for examining genes less attractive for breeders, establishing genetic types, verification of origin, diagnostics of diseases and genomic selection.

In cattle, these are genes for meat production and they are considered less interesting by breeders, e.g. myostatin gene, of which the mutation results in double muscling, or MYOD group of genes that influence meat quality. Milk production is influenced by DGAT1 gene influencing milk fat content, protein content and milk yield, or CSN3 gene that determines the content of κ – casein and its qualities for the production of dairy products. Another use of molecular genetics in breeding cattle is genomic selection that allows selecting breeding animals at a very early age and thus shortens the generation interval. Diagnostic methods are used for examining animals as for genetic diseases, e.g. Complex vertebral malformation (CVM), bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD), chondrodysplasia, arachnomelia, citrullinemia or crooked tail syndrome.

The genetic analysis coat colour is carried out in horses and the following genes are assessed: genes of basic coat colours (MC1R, ASIP), dilution genes (Cream, Dun, Silver Dapple, Champagne) and white coloration KIT gene. In racehorses, the suitability of horses for the trail length is assessed by means of myostatin gene (GDF-8) that influences the development of muscle fibres. Equine hereditary diseases diagnosed using genetic methods are polysaccharide storage myopathy (PSSM1), warmblood fragile foal syndrome (WFFS), glycogen branching enzyme deficiency (GBED), hereditary equine regional dermal asthenia (HERDA) and others.

The use of molecular genetics in breeding pigs is not so widespread. The main use is breeding stress resistant lines of pigs related to genes RYR1 and RN.

Genetic types are established for identifying animals and verifying origin. It is mandatory by law in bulls, stallions and boars chosen for breeding.

In the Czech Republic, animal genetic testing is offered by several workplaces, e.g. Genomia, Laboratoř iGenetiky (ČMSCH, Czech Moravian Breeders' Corporation), Vemodia or LAMGen.

Accessible and less expensive genetic tests allow the use in breeding livestock. Extensive studies of genes influence the economically desired qualities of animals, bring new knowledge for new methods of research and the improvement of genetic dispositions of individuals.

Keywords: gene, cattle, horses, pigs, genetic diseases, genetic type, genomic selection

Obsah

1 Úvod	6 -
2 Cíl práce	7 -
3 Literární rešerše	8 -
3.1 Mapování genomu hospodářských zvířat	8 -
3.1.1 Genetické rekombinační mapy	8 -
3.1.2 Fyzické mapy	10 -
3.1.3 Mapování QTL	11 -
3.2 Sekvencování genomu hospodářských zvířat	11 -
3.2.1 Sekvencování DNA	12 -
3.2.2 Maxam – Gilbertova metoda (chemické sekvencování).....	12 -
3.2.3 Sangerova metoda	12 -
3.2.4 Pyrosekvencování	13 -
3.2.5 SMRT (Single molecule real-time).....	13 -
3.2.6 Technologie nanopórů	13 -
3.3 Využití mapování a sekvencování genomu	13 -
3.4 Skot (<i>Bos taurus</i>)	14 -
3.4.1 Stanovení genetického typu skotu	14 -
3.4.2 Růstové schopnosti	15 -
3.4.3 Mléčná produkce.....	15 -
3.4.4 Genomický výběr (selekce)	18 -
3.4.5 Genetické onemocnění skotu	19 -
3.5 Kůň (<i>Equus caballus</i>)	21 -
3.5.1 Stanovení genetického typu (profilu)	21 -
3.5.2 Genetická analýza zbarvení	22 -
3.5.3 Myostatin gen	24 -
3.5.4 Dědičné nemoci u koní	24 -
3.6 Prasata (<i>Sus scrofa</i>)	27 -
3.6.1 Stanovení genetického typu prasat	27 -
3.6.2 Gen ryanodinového receptoru (RYR1 gen)	27 -
3.6.3 Rendment Napole gen (RN gen).....	28 -
3.6.4 Rezistence vůči PRRS viru	29 -
3.7 Genetické laboratoře	30 -
4 Závěr	32 -
5 Literatura	33 -
6 Internetové zdroje	41 -
7 Seznam použitých zkratk a symbolů	42 -

1 Úvod

Genetika je vědní obor, který se zabývá proměnlivostí a dědičností živých organismů. Molekulární genetika zkoumá především nukleové kyseliny, DNA, geny jejich produkty a procesy s nimi spojenými na molekulární úrovni.

Genom zahrnuje genetickou informaci uloženou v DNA, skládá se z genů a nekódujících sekvencí.

Gen je základní jednotkou genetické informace, jedná se o různě dlouhý úsek DNA, složený z určitého pořadí nukleotidů. Každý gen uchovává informaci pro určitý protein s další funkcí v organismu. Triplety nukleotidů kódují pořadí aminokyselin v molekule proteinu. V molekulární genetice je důležité znát funkci a umístění genů, které jsou dále podrobeny bližšímu zkoumání. Umístění genů na chromozomech se sleduje pomocí mapování genomu. Pořadí jednotlivých nukleotidů se zjišťuje pomocí sekvencování genomu.

Pokud je známa sekvence nukleotidů, které tvoří gen, dají se pomocí diagnostických metod zjišťovat genetické polymorfismy a mutace (inzerce, delece, inverze, substituce). Genetické polymorfismy jsou možné varianty genů a pomáhají vyhodnocovat pro výzkum atraktivní genotypy.

U hospodářských zvířat využití poznatků molekulární genetiky vede ke zkoumání genetického založení šlechtitelsky významných vlastností, propojování fenotypu a genotypu, stanovování genetického typu plemenných zvířat, ověřování původu jedinců, vybírání rodičovských párů na základě genetických testů, zkrácení generačního intervalu, předcházení genetickým onemocněním a k možné manipulaci s genetickou informací.

Genetické testy je možné provést na objednání v genetických laboratořích po celé České republice a ve světě. Stávají se čím dál více dostupnější a finančně méně náročné, i díky tomu se genetika začíná ve větší míře rozšiřovat do chovů hospodářských zvířat.

2 Cíl práce

Cílem této bakalářské práce bylo na základě literatury, především vědeckých článků, popsat možné využití molekulární genetiky ve šlechtění hospodářských zvířat. Z hospodářských zvířat byla práce zaměřena na skot, koně a prasata. Popsány byly metody, které jsou používány v praxi ale i metody, které jsou v současné době podrobovány bližšímu zkoumání.

3 Literární rešerše

3.1 Mapování genomu hospodářských zvířat

Každá jaderná buňka v těle hospodářského zvířete obsahuje dvouvláknovou šroubovici DNA, která nese jeho genetickou výbavu. DNA s histony (proteiny) tvoří chromozom. Genom je soubor veškeré genetické informace uložené v DNA určitého jedince. Genom skotu obsahuje 30 párů chromozomů, ovce 27 párů, kozy 30 párů, koně 32 párů a prasete 19 párů (Kappes 1999).

Mapování genomu se používá k určení polohy krátkých DNA sekvencí (molekulárních markerů) nebo specifických genů na chromozomech a k určení jejich vzdáleností (pořadí umístění na chromozomu) (Tiwari et al. 2016). Ze zjištěných údajů se dále sestavují mapy, které jsou nezbytným nástrojem pro vědce, kteří se zabývají studiem genomu. Genomové mapy podávají podrobný obraz organizace genomu – umístění genů, restričních enzymů, jedinečných sekvencí, opakujících se sekvencí atd. (Saraswathy & Ramalingam 2011).

3.1.1 Genetické rekombinační mapy

Při sestavování genetických map jsou využívány Mendelovy principy, sestavují se řízené šlechtitelské programy s experimentálními organismy. Studovanými lokusy jsou ve většině případů geny, u nichž můžeme dědičnost sledovat projevy fenotypu u potomků vzniklých křížením rodičů velmi rozdílných ve sledovaných znacích (Brown 2007). Mapy jsou sestavovány na základě výsledků analýzy dvojnásobných nebo vícenásobných testovacích páření, křížení nebo analýzou rodokmenu (člověk) (Kappes 1999).

Genetická mapa zobrazuje přiřazení fragmentů DNA do chromozomů. To zahrnuje umístění určitého genu nebo polymorfních DNA sekvencí do určité oblasti chromozomu a určení polohy a relativní vzdálenosti na chromozomu (Shah et al. 2013).

Rekombinační mapy jsou sestavovány na základě 3 Morganových zákonů:

1. Geny jsou lokalizované v chromozomech a jsou uspořádány lineárně.
2. Geny jednoho chromozomu tvoří vazebnou skupinu. Počet vazebných skupin organismu je shodný s počtem párů homologních chromozomů příslušného organismu.
3. Mezi geny homologického páru chromozomu může prostřednictvím crossing-overu probíhat genová výměna. Frekvence crossing-overu je úměrná vzdálenosti genů.

Vzdálenost genů u genetické mapy se vyjadřuje jako frekvence rekombinace v centimorganech (cM), 1 cM označuje 1 % možnost, že proběhne rekombinace (Salem 2015). Pokud jsou 2 geny na jednom chromozomu blízko u sebe, je vzdálenost mezi nimi menší než 50 cM (rekombinační frekvence menší než 0,5), existuje mezi nimi vazba a tyto geny se dědí společně, jsou na sebe vázány. Pokud jsou dva geny na stejném chromozomu ve vzdálenosti větší než 50 cM (rekombinační frekvence větší než 0,5), může dojít k jejich rekombinaci, jsou volně kombinovatelné. Frekvence rekombinace (v procentech) je počítána z pokusů s chovem zkoumaných organismů. T. H. Morgan jako první vytvořil genetickou mapu *Drosophila* (Brown 2007).

Morganovo číslo (poměr rekombinantů ku všem potomkům) lze počítat pouze pokud zajistíme údaje o existenci a vazbové fázi u třígeneračních rodin nebo pokud rodičovský pár

poskytne velké množství potomků druhé generace. Tyto nevýhody kompenzuje statistická analýza nazývaná LOD skóre. LOD = logarithm of the odds ratio (logaritmus pro převahu pravděpodobnosti), kdy k vyhodnocení stačí dvougenerační křížení a není potřeba velké množství potomků (Tiwari et al. 2011). Tato metoda je založená na porovnávání nulové hypotézy (vazba neexistuje) s alternativní hypotézou, kde existuje vazba s určitým rekombinačním zlomkem. Pokud LOD skóre vyjde rovno nebo více než +3, je 1000x pravděpodobnější hypotéza ve prospěch vazby. Pokud vyjde menší nebo rovna -2, je 100x pravděpodobnější hypotéza pro nepřítomnost vazby. Výsledek mezi -2 a 3, nám nedává odpověď a je potřeba získat další údaje od dalších potomstev (Saraswathy & Ramalingam 2011).

Pro genetické mapování jsou u hospodářských zvířat nejlepší DNA markery, geny s pozorovatelným fenotypem – RLFP, STR (neboli mikrosatelity) nebo SNP. Vybrané geny by měly mít více alel (variant znaku u fenotypu). U skotu se pro určení variant alel používají rodiny polosourozenců a u prasat tří generační rodokmeny vzniklé křížením odlišných plemen či linií. Geny, které nevykazují viditelné fenotypy, jsou obtížně mapovány. Tyto geny jsou mapovány jiným typem markerů, molekulárními markery (Saraswathy & Ramalingam 2011).

Délkové polymorfismy restrikčních fragmentů – RFLP (Restriction fragment length polymorphism) je jedním z nejstarších DNA markerů vyvinutých pro genetické mapování (Saraswathy & Ramalingam 2011). Cílová dvoušroubovice DNA je vlivem restrikčních enzymů (endonukleáz) rozštěpena pouze tam, kde endonukleáza rozpozná specifickou sekvenci nukleotidů (restrikční místo) (Foxman 2012). Fragmenty se liší podle umístění restrikčních míst podél molekuly DNA. Elektroforézou jsou fragmenty rozděleny podle délky (úseky o různé délce se pohybují různou rychlostí a vytvářejí tak na gelu specifické proužky), výsledek ale není viditelný a je potřeba ho vizualizovat. DNA se z gelu přenesse na nylonovou nebo nitrocelulózovou membránu, abychom mohli provést hybridizaci se značenou sondou. K membráně se přidá jednovláknová sonda (definovaný gen nebo segment DNA či RNA), která je značena radioaktivní nebo chemiluminiscenční látkou. Komplementární fragmenty se naváží na řetězec. Po vymytí zde zůstanou pouze ty, které hybridizovaly (Brown 2007).

Krátké tandemové repetice – STR (short tandem repeats) nazývané také mikrosatelity se skládají z krátkých repetitivních sekvencí (např. CACACA) (Brown 2007). Mikrosatelitové lokusy typicky obsahují 5 až 20 kopií krátkého sekvenčního motivu, který se opakuje v tandemu. Počet opakujících se jednotek se liší mezi jednotlivci, což vede k velkému počtu alel pro daný lokus. Poměrně velký počet alel na mikrosatelitových místech a jejich přizpůsobivost k PCR amplifikaci z nich činí vynikající markery pro použití v genetických studiích (Williams 2005).

Polymorfismy jednotlivých nukleotidů – SNP (single nucleotide polymorphisms) jsou místa v genomu, kde se mohou vyskytovat jeden nebo dva odlišné nukleotidy (Brown 2007). Vyskytují se s vysokou frekvencí v nekódující i kódující oblasti genomu. Pokud uvnitř kódovacích oblastí nemá vliv na protein kódovaný genem, jedná se o tiché polymorfismy. Pokud změna nukleotidu vede k záměně aminokyseliny v proteinové sekvenci, může dojít ke změně fenotypové vlastnosti (funkční polymorfismy). Výhoda použití SNP je ta, že mohou být detekované jinými metodami, než je elektroforéza (fluorescence nebo hmotnostní spektroskopie) (Williams 2005).

3.1.2 Fyzické mapy

Fyzické mapy uvádějí skutečné vzdálenosti pro určení pozice genu nebo DNA markerů podél chromozomu (Shah et al. 2013). Vzdálenost mezi specifickými genetickými sekvencemi se určuje počtem bází. Pro utváření fyzických map se používají různé metody: cytogenetické mapování, fluorescenční in situ hybridizace (FISH), restriční mapování a mapování STS (Saraswathy & Ramalingam 2011).

3.1.2.1 Cytogenetické (chromozomální) mapování

Cytogenetická mapa zaznamenává vzhled chromozomů, které jsou barveny a zkoumány pod mikroskopem. Zvláště důležité jsou vizuálně odlišné úseky, nazývané světlé a tmavé pruhy, které dávají každý z chromozomů jedinečný vzhled. Chromozomy mohou být zkoumány v klinickém testu (karyotyp) a porovnávat se standardními ideogramy, což umožňuje vědcům hledat chromozomální změny (Shah et al. 2013).

Jedna z možností barvení chromozomů je G-banding, barvení podle Giemsy. Giemsa banding se používá k barvení kondenzovaných chromozomů. Roztok se váže na fosfátovou složku v DNA s preferencí pro AT nukleotidy (tmavě se barvící) spíše než GC nukleotidy (světle se barvící). To vede k řadě pásem, každý z několika miliónů nukleotidů, které lze pozorovat mikroskopem (Sanders & Mason 2016). Další možností barvení jsou Q – banding, barvivo chinakrin (Quinacrine), které je ovšem finančně nákladnější a pro sledování potřebujeme fluorescenční mikroskop.

3.1.2.2 Fluorescenční in situ hybridizace (FISH)

Tato metoda označuje umístění genu přímo na chromozomu, kdy dochází k hybridizaci (spojení) značené sondy, u které je známa sekvence nukleotidů s řetězcem DNA chromozomu, u kterého hledáme umístění dané sekvence. Sonda je označena fluorescenčním barvivem a pomocí fluorescenčního mikroskopu poté zviditelněna (Chen & Chen 2013).

Pokud použijeme chromozomy v metafázi, kdy jsou plně kondenzovány, jsou lokalizované geny nebo DNA sekvence velmi blízko, což vede ke špatnému rozlišení mapy. Vylepšení přineslo použití méně kondenzovaných chromozomů v pachytenním stádiu (profáze) (Balajee & Hande 2018).

3.1.2.3 Restriční mapování

Restriční mapování je fyzikální mapovací technika, která se používá k určení relativní lokalizace restričních míst na DNA fragmentu za účelem vytvoření restriční mapy (Saraswathy & Ramalingam 2011).

K sestavení restriční mapy se musí provést série restričních reakcí. Je za potřebí zjistit počet a velikosti fragmentů vytvořených jednotlivými restričními endonukleázami a ty porovnat s velikostními markery. Počet a velikost vytvořených fragmentů zjistíme gelovou elektroforézou. Dále musíme znát údaje z dvojitých restričních reakcí, kdy necháme působit 2 restriční endonukleázy současně (pokud mají stejné nároky na pH, koncentraci soli atd.) nebo po sobě (změnou podmínek po první reakci). Porovnáním výsledků lze zmapovat restriční místa (Brown 2007).

Restriční mapování genomu je užitečné pouze u menších genomů, jako jsou viry a bakterie. Velké genomy produkují mnoho DNA fragmentů. Pro větší genomy se používá další

podoba restriktivního mapování - optické mapování. Kdy se restriktivní trávení provádí umístěním izolovaného chromozomu do agarózového roztoku na mikroskopickém sklíčku a umožní se tvorba gelu (pokud agaróza tvoří gel, DNA je napnutá). Omezenou DNA pozorujeme pod mikroskopem s vysokým výkonem. Umístění restriktivních míst je viditelné jako mezery (Tiwari et al. 2011).

3.1.2.4 Mapování STS

Místo označené sekvence – STS (sequence tagged site) je relativně krátká sekvence nukleotidů (200 až 500 bp), která může být specificky amplifikována pomocí PCR (je vymezena konečnými sekvencemi pro jedinečné primery). Mapa STS představuje genom jako řadu orientačních bodů STS ve známých fyzických vzdálenostech od sebe.

Expimovaná sekvenční značka – EST (expressed sequence tag) je stejná metoda jako STS, s tím rozdílem, že k amplifikaci není použita DNA celého genomu, ale jen komplementární cDNA (po zpětném přepisu z mRNA, tj. bez nekódujících oblastí) (Brown 2007).

3.1.3 Mapování QTL

Lokusy obsahující geny, které řídí komplexní kvantitativní vlastnost (užitkovost, výnosy atd.) – QTL (Quantitative Trait Loci). Je statistická metoda propojující fenotypová data s daty genetickými, za účelem vysvětlit genetický základ pro variaci složitých znaků. Účelem je propojit fenotypové projevy se specifickými místy na chromozomu (Miles & Wayne 2008).

QTL se skládají z velkého počtu genů s různým počtem kombinací alel, které zkoumáme jako celek. Neznáme jejich přesnou strukturu, proto vztah ke kvantitativním vlastnostem vyjadřujeme nepřímo pomocí genetických markerů (polymorfni úseky DNA), u kterých známe jejich polohu na chromozomu. Používají se genetické markery jako RFLP, mikrosatelity (STRs) nebo SNPs.

Jakmile jsou identifikovány markery spojené s QTL, mohou být použity ve výběrovém programu MAS (Marker-Assisted Selection), který slouží pro nepřímý výběr vynikajících chovných zvířat. Hlavní výhodou této metody je výrazné zkrácení generačního intervalu, jelikož můžeme testovat zvířata ve velmi mladém věku. Hlavním omezením je především finanční náročnost. Je potřeba odebrat vzorky od mnoha jedinců, izolovat DNA, zjistit genotyp a jeho vliv na užitkové znaky. Výběr informací o značkách není plně spolehlivý z důvodu možného nadsnadnocení efektů QTL a chyb v poloze QTL. Je nutné potvrdit přítomnost zmapovaného QTL, než se přikročí k dalšímu kroku v MAS (Wakchaure et al. 2015).

3.2 Sekvencování genomu hospodářských zvířat

DNA se skládá ze čtyř typů nukleotidů – adenin (A), thymin (T), guanin (G) a cytosin (C). Sekvencování DNA je proces čtení sekvence bází v molekule DNA. Sekvence DNA nebo genetického kódu se liší posloupností čtyř nukleobází (Wasfi et al. 2018).

Použitím různých metod sekvencování DNA je možné přímo sekvencovat pouze úseky dlouhé několik stovek nukleotidů. Aby bylo možné sekvencovat celý genom, je potřeba provést velké množství sekvencovacích experimentů. K tomuto úkolu se používají automatizované

systemy, které vykonávají přípravu DNA pro sekvencování, provádějí sekvenční experimenty a čtou jednotlivé sekvence, které dále přenášejí do počítače.

Největším problémem se stává následné sestavení jednotlivých sekvenčních dat do jediné sekvence, což je možné provést dvěma způsoby. Metoda „shotgun“, kdy dochází k rozbití genomu na krátké úseky. V takto vzniklých sekvencích, je možné zjistit překryvy, podle kterých je možné sestavit genomovou sekvenci. U této metody roste chybovost s rostoucí velikostí genomu, proto se dá použít pouze u bakteriálních genomů.

Druhou metodou, která kompenzuje nedostatky „shotgun“, je metoda „kontigu“ klonů, která je ovšem náročná na čas a finance. Vyžaduje konstrukci překrývajících se sérií klonovaných fragmentů DNA. Následuje využití metody „shotgun“, která sekvencuje klonovaný fragment, jsou zjištěny data překryvu fragmentů a sestavena sekvence genomu (Brown 2007).

3.2.1 Sekvencování DNA

Za první generaci sekvencování DNA se považuje metoda Sanger & Coulsona (1975) a Maxam & Gilberta (1977), které byly široce přijaty, avšak poskytovaly velmi krátkou čtecí délku.

Techniky druhé generace se liší od předchozích, zvýšením množství DNA, které lze sekvencovat v jednom cyklu. Tyto techniky se začaly používat v roce 2005 se zprávou o paralelním pyrosekvencování.

Techniky třetí generace jsou použitelné pro sekvencování jediné molekuly bez nutnosti amplifikace. Tyto techniky vedou ke snížení nákladů a zjednodušení postupu. Jednou z nejpoužívanějších technik třetí generace je SMRT (Single molecule real-time). Další metodou je nanoporové sekvencování, které je nejvíce slibnou technikou třetí generace (Heather & Chain 2016).

3.2.2 Maxam – Gilbertova metoda (chemické sekvencování)

Maxam & Gilbert (1977) v sedmdesátých letech vyvinuli metodu pro sekvencování pomocí chemické degradace DNA. Metoda vyžaduje dvouvláknové fragmenty a spočívá v rozštěpení koncově značené molekuly DNA (radioaktivní fosfátovou skupinou) chemickými látkami, které působí na příslušný nukleotid (Brown 2007). Rozštěpené sekvence se umístí do polyakrylamidového gelu a provede se elektroforéza. Autoradiograf gelu vyrobeného ze čtyř různých chemických štěpení, z nichž každá je specifická pro určitou bázi, pak ukazuje vzorek pásem, z něhož lze sekvenci číst přímo.

3.2.3 Sangerova metoda

V polovině sedmdesátých let Sanger a Coulson vyvinuli novou techniku "řetězového zakončení", která definuje sekvenci nukleotidu v jednovláknové DNA (Wasfi et al. 2018). Dochází k enzymatické syntéze druhého vlákna DNA, komplementárního k existujícímu templátu. Ke zkoumané jednovláknové DNA se přidá radioaktivně značený primer, který je začátkem syntézy komplementárního vlákna tvořeného DNA polymerázou. Syntéza vlákna je spuštěna přidáním enzymu a čtyř deoxiribonukleotidů (dATP, dTTP, dGTP, dCTP). Dále

musíme přidat dideoxynukleotid, který ukončí syntézu vlákna, jelikož neobsahuje hydroxylovou skupinu pro připojení dalšího nukleotidu. Gelovou elektroforézou jsou následně separovány jednotlivé složky. Pro vizualizaci použijeme autoradiograf (Brown 2007).

Technika, vyvinutá Sangerem a kolegy, vyžadovala menší manipulaci s toxickými chemikáliemi a radioizotopy než Maxamova a Gilbertova metoda. V důsledku toho se stala převládající metodou DNA sekvencování pro příštích 30 let (Van Dijk 2014).

3.2.4 Pyrosekvencování

Pyrosekvencování je alternativou klasické metody Sanger. Tato technika je založena na principu sekvencování podle syntézy a na luminometrické detekci pyrofosfátu (PPi), který se uvolňuje během včlenění nukleotidu. Jeden ze čtyř nukleotidů je přidán do reakční směsi. Pokud náleží k dalšímu dostupnému nukleotidu na vlákně původní DNA, nukleotid se připojí ke komplementárnímu nukleotidu na řetězci a bude vydán světelný signál. Tento světelný signál je zachycen pyrosekvencí stroje a vykreslení na pyrogramu (Heather & Chain 2016).

3.2.5 SMRT (Single molecule real-time)

SMRT se uskutečňuje v zero-mode waveguide (ZMW), což jsou malé otvory v kovovém filmu pokryté čipy, ve kterých probíhá DNA polymerace (Heather & Chain 2016).

V každém ZMW je na průsvitném dnu imobilizována jedna polymeráza, která replikuje cílovou molekulu DNA. Při zabudování jednotlivých fluorescenčně značených nukleotidů do nově vznikajícího řetězce, se uvolní jejich fluorescenční barvivo a produkuje světelný signál. Kamerový systém zaznamenává v reálném čase barvu a trvání vyzařovaného světla, podle kterého určí nukleotid (Van Dijk 2014).

3.2.6 Technologie nanopórů

Sekvencování pomocí nanopórů se odehrává v průtokové buňce, ve které jsou dvě komory naplněné iontovým roztokem odděleny membránou s 2048 nebo 12 000 individuálními nanopory. Konstantní napětí vytváří iontový proud přes nanopory a lze pozorovat translokaci molekuly DNA nebo RNA a charakterizovat změnu iontového proudu. Proud v nanoporech je měřen čidlem několik tisíckrát za sekundu a je graficky znázorněn. Zpracování dat provádí software, který se zabývá získáváním a analýzou dat (Van Dijk 2014). Generovaný signál je způsoben interakcí mezi řetězcem DNA a nanoporem. Jsou tři třídy nanopórů – biologické, umělé a hybridní (Wasfi et al. 2018).

3.3 Využití mapování a sekvencování genomu

V minulých letech se výběr zvířat prováděl hlavně na základě fenotypových a specifických vlastností. V současné době se rozvíjí obor molekulární genetiky, který se snaží najít pro fenotyp odpovídající genotypový základ.

Základní pomůckou jsou genetické mapy, které nám ukazují polohy genů, které můžeme blíže zkoumat a přiřazovat jim význam fenotypu. Znalost genetických map hospodářských zvířat vede k rozvoji plemen, které jsou produktivní a lépe odolávají chorobám (Kappes 1999).

Na základě přesné lokalizace cílového genu pomocí molekulárních markerů DNA mohou chovatelé využít molekulární markery, které úzce souvisejí s cílovými geny.

Následně lze identifikovat existenci cílového genu v chovu potomků a zjistit, zda získali požadované vlastnosti od rodičů. Tím můžeme zkrátit generační interval a omezit výběr jedinců pro další odchov plemenných zvířat (Fang et al. 2016). Příklad, pokud je vybráno 500 býků narozených od vybraných rodičů, už ve velmi mladém věku je možná genotypizace. Dá se zjistit, která zvířata převzala námi požadované geny. Podle toho je možný výběr 20 nejlepších, které vezmeme do testování. Tudíž odchováváme pouze 20 zvířat. Pokud použijeme tradiční způsob, budeme odchovávat všech 500 zvířat, které budeme postupně selektovat. Náklady na odchov budou několikanásobně vyšší, ale se stejným výsledkem (Schaeffer 2006).

3.4 Skot (*Bos taurus*)

Ve světě je chováno okolo 1 miliardy hovězího dobytka. Na prvním místě v počtu chovaných zvířat je Brazílie, kde se chová 14,41 % z celkového počtu. Jedná se okolo 215 milionů zvířat. Dalšími jsou Indie (185 mil. ks) a Čína (USA 93 mil. ks). Stavby skotu v zemích s nejvyšším počtem chovaných kusů v roce 2017 jsou uvedeny v Tabulce 1. V České republice je chováno 1,4 milionů kusů skotu, což je okolo 0,095 % celosvětového stavu (FAO 2018).

U mléčného skotu se provádí detailní kontrola mléčné užitkovosti a kontrola dědičnosti. Výsledky z těchto kontrol jsou podrobně evidovány a poskytují nám velký soubor fenotypových parametrů, se kterým můžeme dále pracovat v genomice.

Sekvencování genomu skotu bylo dokončeno roku 2009 (Zimin et al. 2009). Na tomto projektu se podílelo více než 300 vědců z 25 zemí světa. Úplná sekvence je dostupná online na internetových stránkách NCBI (National Center of Biotechnology Information) - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=cattle>

3.4.1 Stanovení genetického typu skotu

Jedná se o jednoznačné určení identity konkrétního jedince, vnitrodruhové příbuznosti a paternity na základě analýzy DNA. Každý organismus má svoji zcela unikátní sekvenci DNA, kterou obsahují jeho buňky. Sekvence DNA je absolutním průkazem identity daného jedince. Neexistují (kromě jednovaječných dvojčat) dva zcela geneticky identické organismy.

Stanovení genetického typu je podle zákona č. 154/2000 Sb. (plemenářský zákon) povinné u býků před zařazením do plemenitby. Používají se mikrosatelity (neboli STR – Short Tandem Repeats) na chromozomech, jejichž sekvence je natolik jedinečná, že umožňuje jednoznačně identifikovat jedince (Stevanovic et al. 2010).

Laboratoř iGenetiky spadající pod ČMSCH a.s. používá pro stanovení kompletní mezinárodní sadu mikrosatelitů dle doporučení ISAG (BM2113, ETH225, TGLA227, ETH3, ETH10, BM1824, SPS115, TGLA122, TGLA126, TGLA53, INRA023, BM1818). V této laboratoři je možné i ověření původu na základě porovnání genetických typů rodičů a potomka. Výsledek se vyjadřuje v souladu s vyhláškou č. 471/2000 Sb. - podle § 29, odstavce 2. Povinnost úplného ověření původu (tedy po otci i matce) platí pro všechny býky zařazované do plemenitby.

3.4.2 Růstové schopnosti

3.4.2.1 Dvojité osvalení

Svalová hyperplazie nebo fenotyp dvojitého svalstva je dědičný stav u skotu, který je primárně důsledkem nárůstu počtu svalových vláken (hyperplazie) spíše než zvětšení jednotlivých svalových vláken (hypertrofie) ve srovnání s normálním dobyt看em. Je známo přibližně 20 různých typů polymorfizmů myostatinového genu - MSTN, jako jsou delece, substituce nebo inserce. Byly zjištěny u evropských plemen dobytka, což naznačuje vysokou míru mutace. Nejlépe charakterizovaná mutace byla rozpoznávána u plemene belgického modrého. Spočívá v deleci 11 bp v třetím exonu nukleotidů 821-831 včetně, což vedlo k posunu rámce a následné indukci předčasného ukončení translace (Kambadur et al. 1997).

Ve srovnání s normálním dobyt看em mají zvířata s mutací vyšší schopnost přeměny krmiva na svalstvo (lepší konverze), mohou produkovat vyšší procento nejžádanějších kusů masa, čímž snižují podíl kostí. Tato zvířata mají méně tuku a o 20 % více svalů. Avšak mutace myostatinového genu způsobuje i značné problémy, jako například snížení odolnosti vůči stresu, oddálení pohlavní dospělosti, snížení plodnosti, životaschopnosti telete a obtížné porody, které z 98 % probíhají císařským řezem (Fiems 2012; Aiello et al. 2018).

3.4.2.2 MYOD geny

Růstová rychlost a podíl masa jsou dvěma ekonomicky důležitými znaky u zvířat produkujících maso. Kapacita produkce masa u savců souvisí s počtem myofibril ve svalech, jejichž tvorba probíhá ve fázi embryonálního vývoje a je řízena skupinou genů MYOD. MYOD skupina se skládá ze čtyř strukturálně a funkčně souvisejících genů: MYOD1 (MYF3), MYOG (myogenin), MYF5 a MYF6 (herculin) (Fujisawa-Sehara et al. 1990).

MYOD geny se podílejí na vývoji svalů a proliferaci prostřednictvím tvorby svalových vláken během embryonálního vývoje až po jejich pozdější zrání a funkci. Vzhledem k jejich rolím ve vývoji svalových vláken jsou tyto geny považovány za kandidátní geny pro znaky produkce masa (Bhuiyan et al. 2009).

Gen MYOD1 byl mapován v intervalu 37 až 40 cM na chromozomu 15, kde byly lokalizovány QTL pro kvalitu masa a utváření kostry. MYOG gen se nachází na chromozomu 16 (25-73 cM) a označuje QTL pro hmotnost a mramorování jatečně upravených těl. Geny MYF5 byly mapovány v QTL na pozici mezi 0 a 30 cM chromozomu 5, tyto geny jsou pozitivní kandidátní geny pro znaky jatečně upraveného těla u skotu (Casas et al. 2003).

Polymorfismy v kandidátních genech a jejich sdružování s ekonomickými vlastnostmi byly provedeny za účelem zjištění genetického základu výrobních vlastností a vyvinutí markerově asistovaného výběru (Bhuiyan et al. 2009).

3.4.3 Mléčná produkce

3.4.3.1 Gen DGAT1

Diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) je gen, který kóduje enzym, podílející se na syntéze triglyceridů (hlavní složka tuku). Triglyceridy jsou tvořeny vazbou diacylglycerolu s dlouhým řetězcem mastných kyselin (Mohammed et al. 2015).

Bylo prokázáno, že dinukleotidová substituce v genu DGAT1 je příčinou mutace, způsobující změnu obsahu mléčného tuku, bílkovin a výnosu mléka. Tato substituce způsobuje

nahrazením aminokyseliny lysinu (K) alaninem (A) (K232A) (Grisart et al. 2004). Mapovací studie u skotu vedly k identifikaci substituce adenin / adenin na dinukleotid guanin / cytosin v exonu 8 na centromerickém konci bovinního chromozomu, který způsobí záměnu lysinu alaninem. Lysin varianta DGAT1 zvyšuje obsah tuků a bílkovin, zatímco DGAT1 alanin varianta zvyšuje výnosy mléka a bílkovin. Genotyp v místě DGAT1 byl označen jako homozygotní Lys (KK), heterozygotní Lys / Ala (KA) nebo homozygotní Ala (AA) (Bovenhuis et al. 2015; Mach et al. 2012).

Gautier et al. (2007) uvádí, že při studii francouzských plemen, kdy byli testováni býci tří plemen montbeliard, normande a holštýn, se zjistilo, že převládá genotyp AA. U varianty lysin (K alela) v K232A byla přítomna frekvence polymorfismu 0,04 v chovu montbeliard, 0,13 v chovu normande a 0,37 v chovu holštýnů. Jen 14 z 384 testovaných montbeliard býků byly heterozygotní pro K232A a žádný z nich nebyl homozygot pro variantu lysinu (KK). U plemen montbeliard a normande měla většina zvířat homozygotní variantu alaninu (AA). U plemene francouzského holštýna, kde K alela je mnohem častější, přibližně 10 % z býků bylo homozygotních (KK) a 43 % bylo heterozygotních.

3.4.3.2 Kappa – kasein

Kaseiny jsou mléčné bílkoviny tvořící převážný podíl proteinů v mléce (78–82 %), zbylá část (18 – 22 %) připadá na syrovátkové bílkoviny. Jsou rozděleny do čtyř hlavních skupin: α_{S1} -kasein, α_{S2} -kasein, β -kasein a κ -kasein. Geny kaseinu jsou pevně spojeny a děděny jako skupina, takže mohou hrát důležitou roli při výběru markerů pro mléčnou užitkovost. Jsou umístěny na chromozómu 6 v rámci fragmentu o velikosti 200 kb v pořadí α_{S1} , β , α_{S2} a κ . Geny pro α_{S1} , β a α_{S2} kaseiny jsou úzce propojeny a tvoří evolučně související rodinu, zatímco gen κ -kaseinu je od nich nejméně 70 kb vzdálený.

Gen pro mléčný protein κ -kasein se označuje CSN3, dosud bylo popsáno devět variant: A, B, C, E, F, G, H, I a A1, nejčastější jsou alely A a B. Varianty A a B se liší dvěma bodovými mutacemi, které pravděpodobně ovlivňují strukturu proteinových a glykosylačních struktur. Bylo zjištěno, že alela B souvisí s tepelnou odolností, kratší dobou koagulace a micelami různých velikostí, které jsou vhodnější k výrobě sýrů. Výtěžnost sýra od krav s genotypem BB je o 10% vyšší ve srovnání s krávy AA. Alela B κ – Cn nejen přispívá ke zvýšení výtěžku sýra, ale zlepšuje i jeho kvalitu a koreluje s dalšími cennými parametry produkce mléka (obsah bílkovin a výtěžnost mléka) (Kučerová et al. 2005; Azevedo et al. 2008).

Pro rozlišování různých alel se používá metoda PCR-RFLP. DNA se extrahuje z nesrážlivé krve nebo spermatu. Metodou PCR dojde k namnožení určitého úseku DNA. Pro PCR je potřeba DNA vzorek, primer (krátký úsek DNA, který iniciuje PCR reakci, navržený tak, aby se navázal na obě strany části DNA, která bude kopírována), nukleotidové báze, enzym taq DNA polymeráza (katalyzuje syntézu komplementárního řetězce DNA). Reakce probíhá v termocykleru, kde dochází automaticky podle stanoveného programu k dostatečně rychlým změnám teplot. Poté následuje štěpení amplifikovaných DNA úseků pomocí restričních endonukleáz, metoda polymorfismu délky restričních fragmentů (RFLP). Výsledek se zjišťuje pomocí elektroforézy na agarozovém gelu (Soria et al. 2003).

Kučerová et al. (2004) prováděla charakteristiku 37 plemeníků českého strakatého skotu pro gen CSN3. U sledovaných plemeníků byly zjištěny tři genotypy CSN3 – AA, AB a BB s genotypovými četnostmi 38 %, 48 % a 14 % a alelovými četnostmi A 0,61 a B 0,39.

Pokud jsou v chovu používáni plemenní býci s genotypem BB, další generace dojníc bude mít ve své genetické výbavě alespoň jednu alelu B. Čímž se nám v mléce zvedne procento tuku a bílkovin a zvýší se výnosnost mléka.

3.4.3.3 Humanizace mléka

Cílem tohoto zásahu do genetické informace skotu je produkce bílkovin lidského mateřského mléka. Toto mléko by se mohlo využívat jako alternativa pro kojeneckou výživu. U krav by se měla zvýšit produkce lidských proteinů lysozymu a laktoferinu.

Lysozym je baktericidní protein, který chrání kojence před mikrobiálními infekcemi. Příznivě ovlivňuje prospěšnou střevní mikroflóru a posiluje odolnost vůči onemocněním gastrointestinálního traktu u kojenců (Yang et al. 2011). V lidském mléce je průměrná koncentrace lysozymu 0,420 g / l (Montagne et al. 2001), kravské mléko obsahuje pouze 0,013 g / l (Król et al. 2010). Yang et al. (2011) publikovali studii, ve které za pomoci jaderného přenosu somatických buněk (SCNT) generovali transgenní krávy exprimující rekombinantní lidský lysozym (hLZ). Produkce lysozymu v mléce transgenních krav byla až 0,0259 g / l hLZ, což je přibližně dvojnásobek produkce endogenního hovězího lysozymu, avšak pouze 6 % z koncentrace nacházející se v lidském mléce. V množství tuku, bílkovin, laktózy a sušiny mléka, přitom nebyly významné rozdíly mezi transgenním a netransgenním mlékem.

Laktoferin je jednovrstvý glykoprotein vázající železo s molekulovou hmotností 80 kDa, nachází se v mléce, ale také v jiných exokrinních sekretech (slzy, sperma, sliny a cervikální hlen). Protein se syntetizuje granulocyty a epiteliální buňky mléčné žlázy jako odpověď na infekce (mastitida) (Cooper et al. 2015). V lidském mléce jsou koncentrace laktoferinu v rozmezí od 1 do 3 g / l (Montagne et al. 2001), v kravském mléce je průměrná hodnota 105 mg / l (Król et al. 2010). Thomassen et al. (2005) zveřejnili studii, kde použili mikroinjekci pro tvorbu stáda transgenních krav, které v mléce exprimují přibližně 1,5-2,0 g / l rekombinantního lidského laktoferinu (rhLF), což je koncentrace v rozmezí obvykle přítomném v lidském mléce. Druhá skupina vědců (Yu et al. 2010) v Číně použila jinou transgenní techniku. Bovinní fibroblastové buňky byly současně mikroinjektovány s 150 kb BAC (bakteriální umělý chromozóm) nesoucí lidský gen laktoferinu a markerový gen. Byly generovány dvě transgenní krávy, které vylučovaly rhLF ve vyšších hladinách, 2,5 a 3,4 g / l. RhLF měl podobnou proteolytickou citlivost jako přirozený lidský laktoferin a biochemická analýza ukázala, že vlastnosti vazby a uvolňování železa rhLF jsou totožné s vlastnostmi nativního hLF.

Laktoferin a lysozym se nacházejí ve vysokých koncentracích v lidském mléce. Existuje mnoho pozitivních účinků pro kojence, zvláště ochrana před infekcemi a nemocemi gastrointestinálního traktu. Když jsou laktoferin a lysozym společně, mají synergické antimikrobiální vlastnosti. Laktoferin má kationtovou doménu, která umožňuje zvýšit schopnost lysozymu zničit bakterie (Cooper et al. 2015).

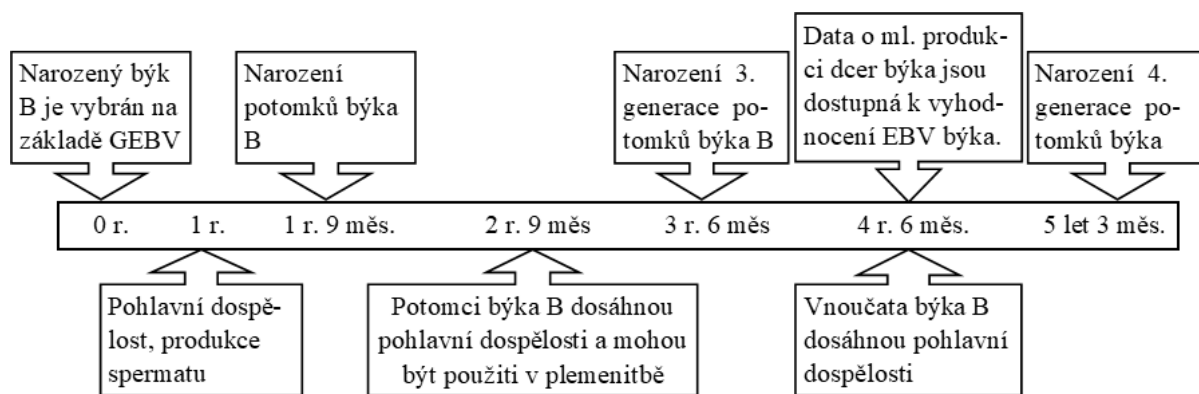
Byl zkoumán vliv produkce rhLF v mléce na zdraví dojnice. Transgenní krávy, které produkují rhLF v mléce, eliminují bakterie *Staphylococcus chromogenes* rychleji ze svých čtvrtí než kontrolní netransgenní dojnice a jsou chráněny před klinickým onemocněním a prodlouženou zánětlivou reakcí způsobenou intramamární infekcí (Simojoki et al. 2010).

Kromě využití v kojenecké výživě má laktoferin další využití ve farmacii. Několik studií naznačuje, že hLF moduluje zánětlivou odezvu, reguluje expresi genů a podporuje růst kostí. Tyto bioaktivity naznačují, že hLF může mít významné terapeutické aplikace, jako je například profylaktická léčba, doplňování výživy a konzervace potravin a / nebo léků (Yang et al. 2008).

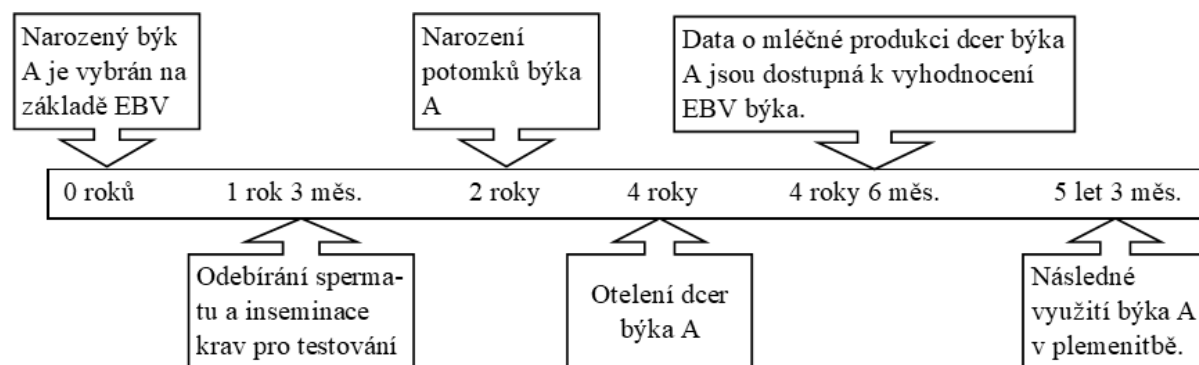
3.4.4 Genomický výběr (selekce)

Příchod sekvencování DNA a vysoce výkonných genomových technologií zapříčinil objevení velkého počtu jednonukleotidových polymorfismů (SNP) u skotu a jiných živočišných druhů. Je popsáno velké množství SNP, které pokrývají genom skotu a vysvětlují většinu genetických variací důležitých znaků. Byly vyvinuty automatizované metody pro genotypizaci SNP, které jsou nyní komerčně dostupné. Díky tomu byl navržen nový způsob šlechtění zvířat nazvaný genomická selekce nebo selekce celého genomu. V praxi se genomová selekce týká výběrových rozhodnutí založených na genomickém odhadu chovné hodnoty (GEBV – genomic estimated breeding values) (Hayes et al. 2009).

V programech pro chov skotu umožňuje genomická selekce chovatelům identifikovat geneticky lepší zvířata v mnohem mladším věku (viz Obrázek 1 a 2).



Obr. 1 Časová osa testování plemeného býka pomocí stanovení průměrné odhadované chovné hodnoty (EBV) (Scheffers & Weigel 2012)



Obr. 2 Časová osa využití plemenného býka při testování pomocí (GEBV) (Scheffers & Weigel 2012)

Z časových os je patrné výrazné zkrácení generačního intervalu, který je nejdůležitějším faktorem ovlivňujícím míru genetické změny v programu šlechtění. Generační interval při použití EBV je 63 měsíců, u GEBV pouze 21 měsíců. Namísto čekání minimálně 4,5 roku na použití býků testovaných na potomcích, je při využití genomické selekce, věk využití býka omezen pouze jeho pohlavní dospělostí.

Chovatelé mohou používat genomické testy i pro většinu svých krav a jalovic pomocí genetických čipů, aby identifikovali ty samice, které získaly nejvýhodnější kombinaci genů od svých rodičů. V současnosti je nejčastěji používán čip o nízké hustotě (LD) s 6 909 SNP a čip střední velikosti (50K) s 54 609 SNP od firmy Illumina. DNA čipy vyrábějí různé firmy (např. Affymetrix, Agilent Technologies, Eppendorf), každá má svůj produkt s různou hustotou a počtem zaznamenávaných SNP.

Genomické testovací služby v současné době nabízejí chovatelské sdružení, inseminační stanice a některé soukromé společnosti. Provedení testu na čipu LD stojí 43 až 55 USD (1 000 – 1 200 Kč) za zvíře a spolehlivost výsledného GEBV je přibližně 60 až 65 %. Čip 50K je nákladnější, od 125 do 135 USD (2 800 – 3 000 Kč) za zvíře, ale spolehlivost je zhruba 70 % (Scheffers & Weigel 2012).

3.4.5 Genetické onemocnění skotu

Genetické onemocnění je onemocnění způsobené vrozenými abnormalitami genů nebo chromozomů. Genetické onemocnění může nebo nemusí být dědičným. Některé genetické poruchy jsou předávány z rodičovských genů, ale jiné jsou vždy nebo téměř vždy způsobeny novými mutacemi nebo změnami DNA. V současnosti jsou k dispozici genetické testy DNA nemocí, na základě metody PCR, které mohou identifikovat nežádoucí alely (Gholap et al. 2014). Nežádoucí alely, způsobující onemocnění, jsou přenášeny hlavně autosomálně recesivní dědičností a jsou často smrtící pro homozygotní zvířata. Pokud je jedinec heterozygot, je přenašečem, ale není u něj patrná žádná porucha stejně jako u dominantního homozygota. Pokud ovšem zkřížíme dva přenašeče, je pravděpodobnost výskytu onemocnění u potomka 25 %, na základě Mendelových zákonů dědičnosti. Rychlá a efektivní identifikace jedinců, kteří jsou nositeli vadných genů, může zabránit ekonomickým ztrátám (Cieplach et al. 2017).

Testování genetických nemocí v mladém věku může pomoci vyhnout se ekonomickým ztrátám, ke kterým může dojít z důvodu šíření vadných inseminačních dávek plemenných býků. Proto je nutné studovat genetické choroby a definovat jejich genetickou příčinu / základ, klinické příznaky a četnost výskytu obecně. Poté je možné zajistit strategie, jak proti nim bojovat a vyhýbat se tak ekonomickým ztrátám v odvětví produkce mléka a hovězího masa (Gholap et al. 2014).

3.4.5.1 Komplexní vertebrální malformace (CVM)

Poprvé bylo toto onemocnění popsáno v roce 2001 v Dánsku u holštýnského skotu (Agerholm et al. 2001). Syndrom se projevuje vícečetnými malformacemi předních, méně často zadních končetin (zkrácení či deformace), změny na krčních a hrudních obratlích, což vede k mírné skolióze. Mohou se vyskytovat i srdeční abnormality (hypertrofie první části) či zkrácení krku. Telata se rodí často předčasně s nižší porodní hmotností nebo mrtvá.

Příčiny vzniku CVM je substituce guanin na thymin v poloze 559 v genu SLC35A3. Tento gen SLC35A3 kóduje transportní enzym, ve kterém mutace bázi způsobí substituci aminokyselin valinu za fenylalanin, a tím inhibuje jeho funkci. Tento transportní enzym hraje důležitou roli v mechanismech, které kontrolují tvorbu obratlů od nerozděleného paraxiálního mezodermu. Proto defektní molekula transportéru vede k vertebrálním malformacím (Gholap et al. 2014).

Letální je onemocnění pro jedince s recesivně homozygotní kombinací genu. Heterozygoti jsou přenašeči, nemají žádné příznaky či poruchy. Po genetických testech se zdravý jedinec označuje písmeny TV, přenašeč CVM písmeny CV.

3.4.5.2 BLAD – Syndrom deficience adhesní schopnosti leukocytů u skotu

Nedostatek adheze leukocytů (BLAD) je autosomálně recesivní vrozené onemocnění holštýnského skotu. Toto onemocnění způsobuje bodová mutace genu CD18, který kóduje sekvenci pro syntézu proteinu integrinu. Integrin je membránový receptor nacházející se na povrchu leukocytů, kterým umožňuje migraci do zánětlivé tkáně a jejich adhezi k místu zánětu.

Mutace způsobuje záměnu asparágové kyseliny za glycin v poloze 128 genu CD18. Dochází k poškození struktury integrinu a jeho nefunkčnosti, což vede k poruše imunitní reakce na bakteriální infekci (organismus není schopen bránit se útoku bakterií).

Postižená telata trpí často bakteriálními infekcemi, dochází k pomalému hojení ran a většinou uhynou před dosažením pohlavní dospělosti. Dalšími příznaky může být zakrslý vzrůst nebo zvýšené množství leukocytů v krvi (Nagahata 2004).

Testování se provádí hlavně metodou DNA-PCR. Testování jsou všichni býci před výběrem na IS, vybírají se pouze býci s výsledkem TL (BLAD negativní). Pozitivní výsledek se značí písmeny BL.

3.4.5.3 Charakteristika dalších onemocnění

Chondrodysplazie je vrozená anomálie týkající se defektů genů, které kontrolují chondrogenézi. Tato porucha byla hlášena u mnoha plemen skotu a bylo zaznamenáno zhruba devět různých genetických typů. Je způsobena mutací genu EVC2 na 6 chromozómu, delecí 2 bp v exonu 19 tohoto genu. Tato odchylka vede ke zhoršení vývoje lebky, obratlů a končetin. Aplikace radiografické techniky, genotypizace SNP a Sangerova sekvencování umožňuje najít tuto delecí (Gholap et al. 2014; Cieplach et al. 2017).

Arachnomelie (také pavoučí nohy) je autozomálně recesivní dědičná mutace s úplnou penetrancí. U postižených jedinců vznikají deformace končetin (prodloužené a křehké kosti), malformace páteře (kyfóza a skolióza) a malformace lebky (krátká dolní čelist). Pro homozygotní zvířata je letální, telata hynou po narození. Tato porucha se vyskytuje hlavně u hnědého skotu (švýcarský hnědý, italský hnědý), simentalského skotu a příležitostně u holštýnského plemene. Mutací odpovědnou za "pavoučí nohy", jsou dvě delece bp v genu MOCS1, což způsobuje posun čtecího rámu a předčasný stop kodon. Produktem translace tohoto genu je protein MOCS1, který se účastní transformací uhlíku, síry a dusíku. Mutace v genu MOCS1 znemožňuje jeho funkci. Metoda PCR-RFLP detekuje mutaci genu MOCS1 (Cieplach et al. 2017).

Citrulinémie skotu je metabolická genetická porucha holštýnského skotu, toto onemocnění je autozomálně recesivní a specifické pro plemeno. Zděděná porucha vede k

nedostatku argininosukcinátsyntetázy, což vede k enzymatickému narušení močovinového cyklu. Mutace zahrnuje substituci jedné báze (C-T) v exonu 5, výsledkem je zkrácení peptidového produktu (85 AMK místo 412), čímž se sníží funkční aktivita. Klinická citrulinémie způsobuje amonémii (zvýšení amoniaku v krvi) a příbuzné neurologické příznaky. Postižená telata trpí ataxií, slepotou, křečemi a později hynou (Gholap et al. 2014).

Syndrom zakřiveného ocasu (CTS) je porucha spojená se svalovými a kostními deformacemi. Hlavními klinickými příznaky jsou zpomalení růstu, zvýšený svalový vývoj, odchylka ocasu, strnulá hlava, krátké rovné končetiny, skolióza a centrální obrna. Tento syndrom je pozorován u belgického modrého skotu. Nosiči této mutace, kteří byli odhadnuti na přibližně 25 % populace belgického modrého skotu, jsou žádaní kvůli jejich svalovému vývoji, ale bohužel to způsobuje šíření tohoto syndromu (Ciepłoch et al. 2017).

Glykogenóza V (nedostatek svalové glykogenfosforylázy – GSD V) má autosomální recesivní charakter. Glykogenfosforyláza je odpovědná za uvolňování glukózy z glykogenu štěpením α -1,4 vazby. Zvířata s nedostatkem tohoto enzymu vykazují při zátěži příznaky svalové bolesti. Po fyzické námaze je moč hnědá a průhledná a hladina plazmatické kreatinkinázy se zvyšuje. Tato porucha se týká plemene charolais a její následky mohou být smrtící. Příčinou GSD V je bodová mutace v genu PYGM, který se nachází na chromozomu 29 a kóduje svalovou glykogenfosforylázu. Přejít z cytosinu na tymin v pozici 1468 (c. 1468C > T) v exonu 12 vede k výměně tryptofanu za arginin v kodonu 490, což vede k produkci dysfunkčního polypeptidu. Tato mutace může být detekována použitím metody PCR-RFLP (Čítek et al. 2007).

3.5 Kůň (*Equus caballus*)

V dnešní době se koně ve většině zemí chovají spíše pro sport, zájmové chovy, hipoterapii (hiporehabilitaci), agroturistiku, méně pak pro produkční účely (mléko, maso, srst, žíně) a pracovní využití (tah). Vzhledem k tomu není využití genetiky v chovu koní tak rozšířené a hodnotí se spíše kvalitativní znaky (zbarvení srsti a kůže, genetické onemocnění), před kvantitativními.

Genom koně byl poprvé kompletně přečten v roce 2007 (Wade et al. 2009). Do projektu se zapojilo mnoho vědců různých institucí – Ústav chovu hospodářských zvířat a genetického výzkumu Nadace Vysoké školy veterinární v Hannoveru (TiHo), Ústav genetiky University v Bernu, oddělení analýzy genomu Helmholtzova centra pro výzkum infekcí a Eli and Edythe L. Broad Institute – společné instituce Harvard University a Massachusetts Institute of Technology. K sekvencování byla použita DNA plnokrevné klisny Twilight, která patří Cornellské Univerzitě se sídlem v americké Ithace (ÚZPI 2007). Celá sekvence je dostupná na webových stránkách <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Equus+caballus>.

3.5.1 Stanovení genetického typu (profilu)

Genetický typ (profil) je soubor znaků DNA charakteristických a jedinečných pro daného jedince. S jeho pomocí je možné identifikovat zvíře (např. při krádeži nebo poruše mikročipu) nebo ověřit rodičovství (maternitu/paternitu). Je jedním z možných způsobů označování u koní, dalšími jsou například slovní nebo grafický popis.

Zákon č. 154/2000 Sb. o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon) udává povinnost stanovení genetického typu u hospodářských zvířat. U koní, přesněji u hřebců, vybraných k použití v plemenitbě, u všech hříbat anglických plnokrevníků a klusáků a dále u hříbat narozených po inseminaci nebo po přenosu embryí.

Analýza se provádí ze vzorku krve, stěru sliznic nebo žíní (vytržených s chlupovou cibulkou). Ke stanovení se používají markery STR (neboli mikrosatelity), což jsou tandemové opakující se sekvence 2–7 párů bází. Markery STR mají značnou variabilitu a velké množství polymorfismů, jsou tedy pro tyto účely ideální. Mikrosatelity jsou zjišťovány pomocí PCR. Primery, které jsou na konci 5' označeny fluorescenčním barvivem, se při PCR naváží na DNA a daný úsek amplifikují. Fragmenty se v automatizovaném elektroforetickém přístroji rozdělí a detekují.

Oprávnění provádět ověřování a osvědčování původu a stanovování genetického typu plemenných zvířat u koní v České republice udělilo Ministerstvo zemědělství firmě Genomia, laboratoři iGenetiky (spadá pod ČMSCH) a laboratoři agrogenomiky Mendelu Brno.

3.5.2 Genetická analýza zbarvení

Geny ovlivňující zbarvení srsti a kůže můžeme rozdělit na dvě hlavní skupiny – 1. pokud zprostředkovávají syntézu pigmentu a 2. které působí na melanocyty (pigmentové buňky), jejich rozvoj, diferenciaci a migraci. Změna zbarvení je proto chápána jako účinek modifikovaných genů způsobující změny buď melanocytů nebo syntézy pigmentů nebo nejčastěji vzájemným působením (Rieder et al. 2001).

Pro DNA analýzu se používá izolovaná DNA z krve, spermatu nebo chlupových folikulů. Genotyp zbarvení následně určí PCR-RFLP analýza.

3.5.2.1 Geny podmiňující základní zbarvení koní

Tři základní barvy koní jsou: Ryzák (Chestnut, sorrel), Hnědák (Bay, brown), Vraník (Black) (Tabulka 1). Tato zbarvení ovlivňují geny MC1R a ASIP. Melanokortin-1-receptor (MC1R) gen se nachází v místě označovaném jako Extension (E) lokus a jeho peptidový antagonist agouti-signaling-protein (ASIP), na lokusu Agouti (A), kontrolují relativní množství melaninových pigmentů u savců. ASIP působí jako antagonist MC1R tím, že zeslabuje působení hormonu stimulujícího melanocyty (α-MSH). Ztráta funkce MC1R má za následek žlutý pigment (pheomelanin), zatímco získání funkčnosti MC1R nebo ztráta funkce ASIP má za následek produkci černého pigmentu (eumelaninu) (Rieder et al. 2001).

Tab. 1 Základní zbarvení u koní (Rieder 2009)

Fenotyp	Genotyp (alely)	Dědičnost
Ryzák (Chestnut, sorrel)	e/e	Autosomálně recesivní Recesivní epistáze vůči alele A
Hnědák (Bay, brown)	E/E ; E/e A/A ; A/a	Autosomálně dominantní
Vraník (Black)	a/a	Autosomálně recesivní

3.5.2.2 Geny ovlivňující zředění základních barev

Jsou čtyři u koně potvrzené lokusy, které jsou zodpovědné za zředění základních barev srsti: Cream (C), Dun (D), Silver Dapple (Z) a Champagne (CH) (Tabulka 2). Chovají se v zásadě dominantním nebo kodominantním způsobem. Ovšem účinky na fenotypy jsou poněkud odlišné, v závislosti na charakteristice buď dominantních, nebo kodominantních alel mezi heterozygotními a homozygotními jedinci.

Tab. 2 Geny způsobující zředění základních barev (Rieder 2009)

Fenotyp	Název lokusu Zkratka genu	Genotyp (alely)	Dědičnost, interakce, asociace
Izabela, plavák (Palomino, buckskin)	Cream (CR) MATP	CR/cr	Neúplná dominance Epistatický k chestnut/sorrel a bay, žádný/nízký epistatický efekt na černou
Cremello, perlino	Cream (CR) MATP	CR/CR	Autosomálně kodominantní Epistatický k černé u homozygotních koní Krémově bílé zbarvení s modrýma očima
Dun	Dun D Neznámý	D/d D/D	Autosomálně dominantní Epistatický ke všem základním barvám Ředění základního zbarvení, výskyt primitivních znaků (pruhy na hřbetě, končetinách)
Silver Dapple	Silver (Z) PMEL 17	Z/Z Z/z	Autosomálně dominantní Epistatický pro bay a black (eumelanin); žádný nebo nízký epistatický efekt u chestnut/sorrel (pheomelanin) Čokoládové až rudé tělo s bílou nebo šedou hřívou a ocasem. U některých plemen náchylnost pro mnohočetné vrozené oční anomálie (MCOA)
Champagne kovový lesk	Champagne (CH) SLC36A1	CH/CH CH/ch	Autosomálně dominantní Epistatický ke všem základním barvám Barva kůže a duhovky očí se může věkem měnit

3.5.2.3 Gen KIT – bílé zbarvení

Původně byl lokus W označován jako původce bílého zbarvení. Homozygotní forma WW je pro jedince letální již v embryonálním stádiu nebo hynou brzy po narození. Tudíž dominantně bílé zbarvení je dáno pouze heterozygotní kombinací alel.

Detekcí mikrosatelitních markerů lokalizovali W lokus na ECA3q (chromozom 3), kde, již byl lokalizován gen KIT. Lokus W byl tak označen jako molekulární marker – genomický – gen KIT (Mau et al. 2004).

KIT gen (proto-onkogenový receptor pro tyrosinkinázu) je spojován s bílým nebo bíle skvrnitým zbarvením v mnoha variantách fenotypu, od několika bílých skvrn (tobiano, sabino, roan) po celoplášťově bílé zbarvení (white) (Kyselová et al. 2017). V současné době, není plně prozkoumán možný pleiotropní účinek KIT mutace u koní. Tento gen má nejvíce alelických variant ze všech genů, které ovlivňují zbarvení u koní. A stále jsou objevovány nové mutace v KIT genu, které mohou způsobovat nové varianty fenotypu (Haase et al. 2009).

Možné projevy genu KIT jejich fenotypy, alely, asociace a dědičnost jsou uvedeny v Tabulce 3.

Tab. 3 Fenotypy koní s mutací genu KIT (Rieder 2009)

Fenotyp	Genotyp (alely)	Asociace	Dědičnost
Bílá (White)	W/W	Letální	Autozomálně
	W/w	Různě rozsáhlá depigmentace	dominantní Epistatický pro všechny barvy
Sabino	SB/SB	Téměř kompletní nebo kompletně bílé zbarvení	Autozomálně dominantní
	SB/sb	Bílé fleky, skvrny	
Tobiano	TO/TO	Fenotypicky nerozlišitelné.	Autozomálně
	TO/to	Pravidelné bílé fleky často s vertikálním rozložením	dominantní
Roan	RN/RN	Považována za letální	Autozomálně
	RN/rn	Rozptýlené bílé chlupy v základní barvě	dominantní

3.5.3 Myostatin gen

Koně, zvláště plnokrevní, mají velmi vysoký poměr svalové hmoty k tělesné hmotnosti (55 %) ve srovnání s jinými druhy savců (30-40 %). Genom plnokrevníků obsahuje možnost pro výběr fenotypu svalové síly (Hill et al. 2010).

Myostatin, také nazývaný jako GDF-8, je členem rodiny transformačního růstového faktoru β , o němž se předpokládá, že se podílí na inhibici růstu svalové hmoty prostřednictvím negativní regulace proliferace i diferenciací myoblastů. Proto myostatin působí na omezení hmotnosti kostních svalů regulováním jak počtu, tak růstu svalových vláken. Varianty genu MSTN jsou asociovány s fenotypy svalové hypertrofie u řady savčích druhů (skot, psi, ovce, myši, člověk) (Binns et al. 2010; Tozaki et al. 2011).

Polymorfismus jednoho nukleotidu (SNP, g.66493737C/T) se nachází v prvním intronu MSTN genu (gen se skládá ze tří exonů a dvou intronů) a ovlivňuje rychlost u plnokrevníků. Homozygotní koně C / C jsou vhodné pro rychlé, krátké vzdálenosti (1000-1600 m); heterozygotní koně C / T mají největší potenciál v závodech na střední vzdálenosti (1400-2400 m); a homozygotní koně T / T mají nejvyšší výdrž (> 2000 m). Retrospektivní hodnocení výkonů na dostihové dráze, fyzického růstu a výkonu ukázalo, že koně C/C a C/T jsou pravděpodobně fyzicky předčasně vyspělí než koně T/T a mají větší úspěch v dostihovém závodě jako 2leté dostihové koně. Přenos polymorfismu genu na další generace má vysokou heritabilitu ($h^2 = 0,94$) a řídí se Mendelovými zákony (Hill et al. 2010; Bower et al. 2012).

3.5.4 Dědičné nemoci u koní

Mnoho zděděných onemocnění je výsledkem jediné genové mutace, která způsobí změny ve fungování těla. Mutace je považována za dominantní, pokud stačí, když hříbě zdědí pouze jednu kopii defektního genu, který způsobuje chorobou. Pokud je mutace recesivní, hříbě

musí zdědit dvě kopie defektního genu, jeden od každého rodiče. Kůň s pouze jednou kopií recesivního genu je nositelem – může být zcela normální, ale je schopen produkovat hřibě s onemocněním, když je spojen s jiným nositelem. Mutace se považuje za neúplně dominantní, pokud je kůň s jednou kopií mutovaného genu postižen mírněji než kůň s dvěma kopiemi.

Většina testů na dědičná onemocnění je specifická pro plemeno a některé organizace vyžadují testování určitých genů před registrací chovných hřebců, aby omezili výskyt určitých onemocnění v populaci (Jefferies 2017).

Každý registrovaný plemeník plemene Quarter horse v USA musí být testován na choroby – polysacharidová myopatie (PSSM1), maligní hypertermie, hyperkalemická periodická paralýza (HYPP), nedostatek enzymů štěpících glykogen (GBED), hereditární equinní regionální dermální astenie (HERDA), letální syndrom bílých hříbat (OLWS).

U Arabských koní se může objevit těžká kombinovaná imunodeficeience (SCID), syndrom levandulového hřiběte (LFS), cerebrální abiotrofie koní (CA) a imunodeficeience u hříbat (FIS).

Dvě nejdůležitější dědičné choroby u chladnokrevných koní jsou polysacharidová polymyopatie (PSSM) a junkční epidermolysis bullosa (JEB).

Teplokrevníky může postihnout syndrom fragilních hříbat teplokrevníků (WFFS).

3.5.4.1 Polysacharidová myopatie (PSSM1)

Polysacharidová myopatie je dominantně autosomální dědičné onemocnění ovlivňující ukládání glykogenu ve svalech koní. Při zvýšené fyzické námaze způsobuje rbdomyolýzu (děj, při kterém se poškozuje svalová tkáň). Klinické příznaky mohou zahrnovat záškuby pokožky, ztuhlost, ztuhlé bolestivé svaly, pocení, slabost a neochotu pohybovat se. Nejvíce je toto onemocnění spojováno s plemeny chladnokrevníků a Quarter Horse (Valberg et al. 2011).

PSSM1 je způsobena genetickou mutací genu GYS1, kdy dojde k substituci bází, což způsobí změnu aminokyselinové sekvence enzymu glykogensyntázy. Tato mutace způsobuje vysoké hladiny glykogensyntázy vzhledem k glykogenovému rozvětujícímu enzymu (GBE). Tento pozměněný poměr glykogensyntázy k GBE vede k molekulám glykogenu s dlouhými řetězci s málopočetným větším, čímž jsou tyto molekuly rezistentní vůči amylázám. A dochází k akumulaci vysokých hladin glykogenu a abnormálního polysacharidu ve svalech koně.

Genotyp GYS1 koně je určen pomocí PCR-RFLP metody, je zkoumáno 230 bp segmentu DNA obsahující GYS1. Genotypy jsou zaznamenány jako homozygotní normální – n/n (kdy nebyla zjištěna mutace) heterozygotně postižené – P1/ n (přenašeč PSSM na potomky) nebo homozygotně postižené (P1/ P1) (Baird et al. 2010).

Koně s pozitivním výsledkem mutace GYS1 by měli mít řízenou dietu (omezení krmiv s vysokým obsahem cukru) a konzistentní cvičení, aby se zabránilo nástupu onemocnění.

3.5.4.2 Syndrom fragilních hříbat teplokrevníků (WFFS)

WFFS je dědičná autozomálně recesivní porucha (projeví se o recesivního homozygota) způsobená jednou mutací genu PLOD1, která postihuje teplokrevníky a příbuzná plemena koní. O mutaci v PLOD1 je známo, že způsobuje podobnou poruchu u lidí známou jako Ehlers-Danlosův syndrom VI (EDSVI). Dr. N. Winand (2011) objevil bodovou mutaci (c.2032G>A; p.Gly678Arg) v genu PLOD1, který kóduje enzym lysylhydroxyláza 1 a modifikuje

AMK lysin na hydroxylysin. Hydroxylysin je nezbytný pro správnou funkci a pevnost kolagenových vláken.

Zasažené hříbě vykazuje extrémní kožní křehkost charakterizovanou roztrhnutím, vředy, hematomy, laceracemi a seromy. Malé kožní léze se mohou objevit kdekoli na těle. Klouby končetin jsou laxní a hyperextenzní (Monthoux et al. 2015).

3.5.4.3 Charakteristika dalších onemocnění

Nedostatek enzymů štěpících glykogen (GBED) je letální stav způsobený neschopností těla skladovat glykogen, což vede k progresivní slabosti a selhání orgánů. Způsobuje ho mutace na ECA26 a je to autozomálně recesivní porucha (Valberg & Mickelson 2006)

Hereditární equinní regionální dermální astenie (HERDA), je způsobena recesivní mutací genu na ECA1. Jedná se o poruchu pojivové tkáně. Nedostatečná přilnavost uvnitř vrstev kůže, kvůli genetické poruše kolagenu, který drží kůži na svém místě. Způsobuje křehkou kůži, která se snadno roztrhá a je tak pomalá k léčení a náchylná k infekcím. Na tuto poruchu neexistuje lék a eutanázie je často nejhumánnější možností (White et al. 2004).

Hyperkalemická periodická paralýza (HYPP) se vyznačuje záchvaty svalové slabosti, třesu, paralýzy a ve vážných případech může skončit respiračním kolapsem nebo srdečním selháním. HYPP je dominantní porucha, což znamená, že budou ovlivněny jak homozygotní pozitivní (HH), tak i heterozygotní (nH) koně (Rudolph et al. 1992).

Letální syndrom bílých hříbat (OLWS) je recesivní mutace způsobená abnormalitou na ECA17. Vyskytuje se u hříbat, která se narodila téměř nebo čistě bílá, v trávicím traktu nemají vyvinuté nervy, což znemožňuje zpracování potravy. Úhyn následuje několik hodin po narození (Metallinos et al. 1998; Santschi et al. 1998).

Těžká kombinovaná imunodeficiencie (SCID) je recesivní dědičné onemocnění arabských koní. Zvířata s tímto zděděným stavem nemají schopnost produkovat bílé krvinky a tím jsou náchylné k infekci. První příznaky onemocnění se objevují ve věku mezi dvěma a osmi týdny. Hříbata obvykle uhynou v pátém měsíci věku v důsledku nedostatku B a T lymfocytů (Wiler et al. 1995).

U arabských koní se objevuje i syndrom levandulového hříběte (LFS), dochází k recesivní mutaci na ECA1. Narozená hříbata mají světlou barvou srsti (často se zdá stříbrná nebo levandulová) a fatální neurologické příznaky (záchvaty). Tato hříbata obvykle hynou nebo jsou utracena do několika dní po porodu (Finno et al. 2009; Brooks et al. 2010)).

Cerebrální abiotrofie (CA) koní je recesivní genetická porucha, vznikající v důsledku mutace na ECA2, postihující arabské koně. Postižená hříbata jsou nemotorná, trpí třesem hlavy a mají široký postoj. Tyto a další příznaky obvykle vyžadují eutanazii (Jefferies 2017).

Junkční epidermolysis bullosa (JEB) postihují koně Belgického koně (Baird et. al 2003), koně Saddlebred (Graves et al. 2009) a příbuzné těchto plemen. Tato autozomálně recesivní dědičná porucha je způsobena mutací, která inhibuje schopnost těla produkovat určité bílkoviny, zodpovědné za držení kůže na těle. To vede k tvorbě puchýřů a smrtelným infekcím. Hříbata hynou kvůli infekcím nebo z humánních důvodů eutanázií během 3-8 dnů od narození (Finno et al. 2009).

3.6 Prasata (*Sus scrofa*)

Prase je ekonomicky významným jatečným zvířetem, přibližně 40 % veškerého masa konzumovaného po celém světě je maso vepřové. Prasata také slouží jako důležitý modelový organismus kvůli jejich podobnosti s lidmi na anatomické, fyziologické a genetické úrovni, což je velmi užitečné pro studium různých lidských nemocí (Fang et al. 2012). Na světě je chováno okolo 1 miliardy kusů prasat. Necelá polovina celkových stavů je chována v Číně (Tabulka 5). Ročně se na světě vyprodukuje okolo 119 milionu tun masa (FAO 2018).

Zkoumání genetiky zvířat se v chovu prasat začalo používat na začátku 20. století. Během minulého století poskytl vývoj populace a kvantitativní genetické teorie nové nástroje pro předpovídání chovatelských hodnot a umožnil pozoruhodné zvýšení genetického pokroku. Ve výrobě vepřového masa se začala ve 40. let aplikovat kvantitativní genetika prostřednictvím selekčních indexů a systematickým křížením. Později následoval příchod smíšených modelových postupů, jako je BLUP. Od konce 80. a 90. let, byly snahy o nalezení kvantitativních lokusů znaků (QTL), které by byly spojené se znaky hospodářského zájmu. V lednu 2014 bylo identifikováno celkem 9862 QTL pro 653 odlišných znaků. Bohužel, se v chovu prasat nepoužívají. Výjimku tvoří RYR1 gen (ryanodinového receptoru1) nebo HAL-1843 ® test pro určení genů odpovědných za účinek stresu na produkci masa. Kromě toho, některé další úspěšné studie identifikovaly některé další zajímavé geny pro chov prasat, například gen estrogenních receptorů (ESR), inzulin růstového faktoru 2 (IGF2) nebo leptinový receptor. Použití QTL nebo markerově asistovaného výběru v intenzivním chovu prasat je menší a je používán pouze jako doplňkový nástroj standardního smíšeného modelu genetického hodnocení (Ibáñez-Escriche et al. 2014).

Projekt sekvencování celého genomu prasat byl zahájen na počátku roku 2003 a ukončen roku 2009, iniciovaný byl Consortiem pro sekvencování genomu prasat (SGSC), ten se skládal z akademických, vládních a průmyslových institucí. Úplná sekvence je dostupná online na internetových stránkách NCBI (National Center of Biotechnology Information) - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/84/> (Schook et al. 2005; Archibald et al. 2010).

3.6.1 Stanovení genetického typu prasat

Správný původ plemenných zvířat je předpokladem účinného chovného programu u všech druhů hospodářských zvířat včetně prasat. V České republice je určování genotypu a kontrola původu pro chovatelské účely prováděno podle zákona č. 154/2000 Sb. Genetický typ je určován pomocí mikrosatelitních markerů metodou PCR. Princip stanovení je stejný jako u výše zmíněných druhů.

Laboratoř iGenetiky provádějící stanovení genetického typu používají sadu mikrosatelitních markerů: 387A12F, S0655, SBH1, SBH2, SBH4, SBH10, SBH13, SBH18, SBH19, SBH20, SBH22, SBH23.

3.6.2 Gen ryanodinového receptoru (RYR1 gen)

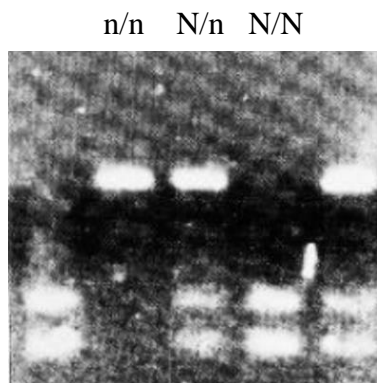
Gen RYR1 (CRC – calcium release channel nebo také HAL) reguluje transport vápníku přes stěnu svalových buněk. Recesivní mutace v genu RYR1 souvisí s vyšší citlivostí na stresové stavy a indukci maligní hypertermie u prasat s negativními účinky na kvalitu masa

(pH₄₅, konečné pH, barva, vodní kapacita, ztráta odkapem, citlivost, ztrát vařením a smyslové vlastnosti) (Fujii et al. 1991; Koćwin-Podsiadła 2003). Maligní hypertermie se projevuje zvýšenou teplotou, třesem, cyanózou, tuhnutím svalů a následným úhynem. Maligní hypertermie je součástí prasečího stresového syndromu (PSS).

Spouštěčem pro PSS je vystavení prasat různým stresovým vlivům jako například špatné zacházení, přehánění, transport nebo vysoká koncentrace zvířat na malém prostoru. Po úhynu nebo porážce prasete se PSS projevuje jakostními odchylkami masa (PSE, DFD) (Bečková a Daněk 2004).

Fujii et al. (1991) vyvinuli rychlý, jednoduchý a přesný molekulární test pro detekci PSS, který může rozlišovat mezi třemi PSS genotypy (NN – stresu odolný jedinec, Nn – stresu odolný, ale je přenašečem citlivosti a nn – jedinec citlivý ke stresu) s přesností se blíží 100 procent.

Louis et al. (1992) poskytují obecný přehled kroků použitých v stanovení genotypu PSS pomocí molekulárních metod. Molekulární test může být proveden z DNA izolované ze svalové tkáně, chlupů, tukové tkáně nebo krve. V laboratoři se izoluje DNA z buněk. Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) je vyrobeno tisíce kopií daného úseku DNA. Úsek DNA se pak štěpí restriční enzymy. Obvykle jeden enzym rozpoznává mutantní gen PSS, zatímco jiný rozpoznává normální gen PSS. Po zkrácení DNA se vzorek umístí do gelového materiálu a vystaví se elektrickému proudu (gelová elektroforéza). Po této expozici fragmenty DNA produkují charakteristické páskování pro genotyp NN, Nn a nn. Odlišné vzory páskování umožňují laboratoři určit genotypu PSS zvířete (Obrázek 3). Pokud je postup řádně dodržován a nenastane znečištění vzorku přesnost testu je 100%.



Obr. 3 Výsledek elektroforézy (Louis et al. 1992)

Molekulární test byl patentován Univerzitou v Torontu. Licencování pro komerční laboratoře a chovatele jsou k dispozici prostřednictvím Innovation Foundation, Toronto, Ontario Kanada.

Gen RYR1 má vztah k vyššímu obsahu libového masa, tudíž se objevuje hlavně u „supermasných“ plemen jako pietrain nebo belgická landrasa. Pomocí molekulární genetiky byly u těchto plemen vyšlechtěny stres rezistentní linie.

3.6.3 Rendment Napole gen (RN gen)

Tento gen je také běžně označován jako "gen kyselého masa" nebo "Hampshirský faktor", kvůli nízkému konečnému pH masa, a protože tento gen byl primárně pozorován u

čistokrevných jedinců nebo kříženců plemene hampshire. Negativní účinky genu RN na kvalitu vepřového masa vedou k ekonomickým ztrátám.

Na rozdíl od RYR1 genu, kde se projevuje recesivní alela s účinky na působení stresu a kvalitu masa, gen RN je úplně dominantní. Tato dominance znamená, že kopie genu RN, kterou jedinec zdědil pouze od jednoho z rodičů, může způsobit špatnou kvalitu masa. RN gen identifikován v chovu Hampshire má dvě alely, dominantní mutantní alely RN⁻ a recesivní normální RN⁺ alely.

RN gen ovlivňuje hladinu glykogenu ve svalech. Maso z prasat RN má nízkou konečnou hodnotu pH (měřeno 24 hodin po porážce), sníženou schopnost zadržovat vodu a poskytuje nižší výtěžnost zpracovaného masa. Tyto účinky jsou důsledkem 70% zvýšení obsahu svalového glykogenu u RN⁻ (RN⁻ / rn⁺ nebo RN⁻ / RN⁻) zvířat.

Test pro RN⁻ mutace je používán k odstranění mutace z chovů, kde je používáno plemeno hampshire a tento genetický test představuje další významný dodatečný nástroj pro použití chovately prasat ke zlepšení kvality masa (Hamilton et al. 2000; Davoli & Braglia 2007).

3.6.4 Rezistence vůči PRRS viru

Reprodukční a respirační syndrom prasat (PRRS) je jedním z ekonomicky nejdůležitějších infekčních onemocnění postihujících prasata po celém světě. "Záhadná choroba prasat" byla poprvé pozorována téměř současně v Severní Americe a Evropě koncem osmdesátých let (Burkard et al. 2017).

PRRS způsobuje reprodukční poruchy prasnic a prasniček (potraty, mumifikace plodu) a respirační onemocnění u selat a prasat ve výkrmu. Etiologické agens PRRS, virus porcinního reprodukčního a respiračního syndromu (PRRSV) je RNA virus, který obsahuje jednovláknový RNA genom o velikosti přibližně 15 kilobází. PRRSV je geneticky rozdělen na dva genotypy, evropský (genotyp 1) a severoamerický (genotyp 2). Vyvíjí se s vysokou evoluční rychlostí a vykazuje vysoký stupeň genetické a antigenní variability, což brání efektivní kontrole a ochraně očkovaním (Prather et al. 2017; Yang et al. 2018).

PRRSV má ale úzký hostitelský buněčný tropismus, omezený na buňky linie monocytů / makrofágů. Na povrchu makrofágů (zejména v respiračním systému), bylo popsáno místo kam se virus připojuje – CD163. CD163 má řadu biologických funkcí, včetně zprostředkování systémového zánětu a odstranění hemoglobinu z krevní plazmy. Extracelulární část CD163 tvoří devět domén proteinu scavenger receptor cysteine-rich (SRCR). Osm domén SRCR se podílí na různých biologických funkcích, ale SRCR5 nebyla spojena s žádnou zvláštní funkcí, kromě interakce s PRRSV. Proto se Burkard et al. (2017) ve své studii zaměřili na generování prasat s definovanou delecí CD163 SRCR5 a na posuzování citlivosti makrofágů těchto prasat na infekci PRRSV.

Burkard et al. (2017) prostřednictvím cílené sekvence sestavili podrobný model prasečího CD163 lokusu. CD163 je kódován 16 exony, exony 2 až 13, kódují SRCR domény proteinu. SRCR5 je kódován exonem 7. Byla proto vyvinuta editační strategie pro vynětí exonu 7 za použití systému pro editaci genomu CRISPR / Cas9. CRISPR / Cas9 metoda byla aplikována na 39 prasečích zygot, narodilo se 32 selat, z čehož u 4 (12,5 %) byla prokázána

delece exonu 7 v genu CD163. Vymazání SRCR5 neprokázalo žádné nežádoucí účinky u prasat udržovaných za standardních podmínek chovu s normálními přírůstky.

Výsledky této studie ukazují, že živá prasata nesoucí deleci CD163 SRCR5 jsou zdravá a udržují hlavní biologické funkce proteinu, zatímco delece činí cílové buňky PRRSV rezistentní vůči infekci tímto virem (Burkard et al. 2018).

3.7 Genetické laboratoře

Testy se provádí na objednání, na což má každá laboratoř svůj formulář, kde je možné objednat i více vyšetření zároveň. Vzorkem pro analýzu může být krev, kterou odebere veterinární lékař do zkumavky s EDTA nebo chlupy nejčastěji z chvostu ocasu (u koní žíně) vytržené s chlupovými cibulkami. Vzorky se mohou poslat poštou, předat osobně nebo u některých laboratořích je možné objednat si svoz vzorků. Doba dopravy by ale neměla přesáhnout 3 dny. Dále jsou uvedeny některé české genetické laboratoře, které provádějí genetické testy na objednání.

Laboratoř iGenetiky spadající pod ČMSCH a.s. (Českomoravská společnost chovatelů) sídlící v obci Hradištke, nabízí genetické testy pro skot, koně, prasata, ovce, kozy a psy. Nabídka služeb a pokyny k odběru vzorků jsou dostupné na webové stránce <https://www.cmsch.cz/laboratore/li-laborator-igenetiky/>.

Genomia s.r.o. je soukromá akreditovaná genetická laboratoř sídlící v Plzni, zabývající se genetickým testováním osob, zvířat a patogenů. Internetové stránky <https://www.genomia.cz/cz/>.

Genetická laboratoř LAMGen spolupracující s laboratořích agrogenomiky Mendelovy univerzity v Brně. Provádí genetické testy skotu, koní, prasat a psů. Webová stránka <https://www.lamgen.cz/>.

Vemodia a.s. je laboratoř veterinární molekulární diagnostiky sídlící v Praze. Celá nabídka je dostupná na <https://www.vemodia.cz>.

Nabídky od laboratořích jsou uvedeny v následujících tabulkách odděleně pro skot (Tabulka 4), koně (Tabulka 5) a prasata (Tabulka 6)

Tab. 4 Nabídka genetických testů skotu

		Lab. iGenetiky	Genomia s.r.o.	LAMGen
Stanovení gen. typu		✓	-	✓
Ověřování původu		✓	-	✓
Genetické onemocnění	BLAD	✓	✓	-
	CVM	✓	-	-
Dvojitě osvalení		✓	-	✓
Kappa kasein		✓	✓	-
Beta kasein		✓	-	-
SNP (genomická selekce)		✓	-	-
Free-martinismus		-	✓	-

Tab. 5 Nabídka genetických testů pro koně

		Lab. iGenetiky	Genomia s.r.o.	LAMGen	Vemodia a.s.
Stanovení gen. typu		✓	✓	✓	✓
Ověřování původu		✓ *	✓	✓	✓
Genetické onemocnění	SCID	✓	-	-	✓
	WFBS	-	✓	-	✓
	Další	-	-	-	✓
Zbarvení a kvalita srsti		-	✓	✓	✓

* jediná laboratoř v ČR, která má pověření General studbook ověřovat původ anglického plnokrevníka

Tab. 6 Nabídka genetických testů prasat

	Lab. iGenetiky	LAMGen
Stanovení gen. typu	✓	✓
Ověření původu	✓	✓
Citlivost na stres – MHS	✓	✓

Ve vyspělých zemích po celém světě je různý počet různě kvalifikovaných laboratoří pro provádění genetických testů pro chovatele nebo veterináře, ale i se zaměřením na výzkum. Jednou z nejznámějších a neprestížnějších je UC Davis, zaměřující se na veterinární medicínu. UC Davis je samostatnou jednotkou Kalifornské univerzity veterinární medicíny v Davisu a je mezinárodně uznávaným průkopníkem a expertem na testování zvířat na bázi DNA. VLG (Veterinary genetics laboratory) podporuje výzkum zaměřený na zlepšení zdravotního stavu a šlechtění široké škály zvířat – kočky, psi, koně, prasata, skot, ovce, kozy, ale i osli, bizoni, vodní buvoli, yaci, vlci. Webová stránka je <https://www.vgl.ucdavis.edu/index.php>.

4 Závěr

Bližší zkoumání genetické informace zvířat pomocí molekulární genetiky poskytuje důležité informace pro chovatelskou praxi. Jedná se o informace dostupné už ve velmi mladém věku, které umožňují stanovení plemenné hodnoty zvířete. Podle výsledků genetických testů můžeme sestavovat rodičovské páry, tak aby nový jedinec měl námi požadovaný fenotyp určitého znaku. Také umožňují předcházet dědičným onemocněním, tím brání jejich šíření v populaci a ekonomickým ztrátám. Stanovení genetických typů u plemenných zvířat umožňuje ověření původu potomků, což je důležité pro kontrolu dědičnosti. Genetické testy jsou na objednání dostupné v několika laboratořích po celé České republice i ve světě.

Šlechtění hospodářských zvířat lze usměrnit podrobnějším studiem genetické podstaty užitkových vlastností, na které je kladen velký důraz. Stále jsou geny, u nichž účinek v organismu není prokázán. Výzkum v oblasti molekulární genetiky pokračuje a jsou vyvíjeny a zkoušeny nové diagnostické i experimentální metody.

5 Literatura

- Aiello, D., Patel, K., Lasagna, E. 2018. The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Animal genetics* **49**: 505-519.
- Agerholm, J. S., Bendixen, C., Andersen, O., Arnbjerg, J. 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. *Journal of veterinary diagnostic investigation* **13**: 283-289.
- Archibald, A. L., Bolund, L., Churcher, C., Fredholm, M., Groenen, M. A., Harlizius, B., Uenishi, H., Wang J., Schook L. B. 2010. Pig genome sequence-analysis and publication strategy. *BMC genomics* **11**: 438.
- Azevedo, A. L. S., Nascimento, C. S., Steinberg, R. S., Carvalho, M. R. S., Peixoto, M. G. C. D., Teodoro, R. L., Machado, M. A. 2008. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research* **7**: 623-630.
- Baird, J. D., Millon, L. V., Dileanis, S., Penedo, M. C. T., Charlesworth, A., Spirito, F., Meneguzzi, G. 2003. Junctional epidermolysis bullosa in Belgian draft horses. *Proc Am Assoc Equine Practit* **49**: 122-126.
- Baird, J. D., Valberg, S. J., Anderson, S. M., McCue, M. E., & Mickelson, J. R. 2010. Presence of the glycogen synthase 1 (GYS1) mutation causing type 1 polysaccharide storage myopathy in continental European draught horse breeds. *Veterinary Record* **167**: 781-784.
- Balajee, A. S., Hande, M. P. 2018. History and Evolution of Cytogenetic Techniques: Current and Future Applications in Basic and Clinical Research. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **836**: 3-12
- Bečková R., Daněk, P. 2004. Vliv stresu na užítkovost prasat. *Náš chov* **64**: 37–39.
- Bhuiyan, M. S. A., Kim, N. K., Cho, Y. M., Yoon, D., Kim, K. S., Jeon, J. T., Lee, J. H. 2009. Identification of SNPs in MYOD gene family and their associations with carcass traits in cattle. *Livestock Science* **126**: 292-297.
- Binns, M. M., Boehler, D. A., Lambert, D. H. 2010. Identification of the myostatin locus (MSTN) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA. *Animal genetics* **41**: 154-158.
- Bovenhuis, H., Visker, M. H. P. W., van Valenberg, H. J. F., Buitenhuis, A. J., van Arendonk, J. A. M. 2015. Effects of the DGAT1 polymorphism on test-day milk production traits throughout lactation. *Journal of dairy science* **98**: 6572-6582.
- Bower, M. A., McGivney, B. A., Campana, M. G., Gu, J., Andersson, L. S., Barrett, E., Davis C., Mikko S., Stock F., Voronkova V., Fahey A. G., Lindgren G., MacHugh D. E.,

- Sulimova G. Bradley, D. G. 2012. The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse. *Nature communications* **3**: 643.
- Brooks, S. A., Gabreski, N., Miller, D., Brisbin, A., Brown, H. E., Streeter, C., Antczak, D. F. 2010. Whole-genome SNP association in the horse: identification of a deletion in myosin Va responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS genetics* **6**: e1000909
- Brown, T. A. 2007. Klonování genů a analýza DNA: úvod. Univerzita Palackého. Olomouc.
- Burkard C, Lillico SG, Reid E, Jackson B, Mileham AJ, Ait-Ali T. 2017. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathog* **13**: e1006206.
- Burkard, C., Opriessnig, T., Mileham, A. J., Stadejek, T., Ait-Ali, T., Lillico, S. G., Archibald, A. L. 2018. Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to PRRSV-1 infection. *Journal of virology* **92**: e00415-18
- Casas, E., Shackelford, S. D., Keele, J. W., Koohmaraie, M., Smith, T. P. L., Stone, R. T. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Journal of animal science* **81**: 2976-2983.
- Cieplach, A., Rutkowska, K., Oprządek, J., Poławska, E. 2017. Genetic disorders in beef cattle: a review. *Genes & genomics* **39**: 461-471.
- Cooper, C. A., Maga, E. A., Murray, J. D. 2015. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic research* **24**: 605-614.
- Čítek J, Řehout V, Večerek L, Hájková J. 2007. Genotyping glycogen storage disease type II and type V in cattle reared in the Czech Republic. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* **54**: 257–259.
- Davoli, R., Braglia, S. 2007. Molecular approaches in pig breeding to improve meat quality. *Briefings in functional genomics and proteomics* **6**: 313-321.
- Fang, J., Zhu, X., Wang, C., Shanguan, L. 2016. Applications of DNA Technologies in Agriculture. *Current Genomics* **17**: 379–386.
- Fang, X., Mou, Y., Huang, Z., Li, Y., Han, L., Zhang, Y., Feng, Y., Chen, Y., Jiang, X., Zhao, W., Sun, X., Xiong, Z., Yang, L., Liu, H., Fan, D., Mao, L., Ren, L., Liu, C., Wang, J., Li, K., Wang, G., Yang, S., Lai, L., Zhang, G., Li, Y., Wang, J., Bolund, L., Yang, H., Wang, J., Feng, S., Li, S., Du, Y. 2012. The sequence and analysis of a Chinese pig genome. *GigaScience* **1**: 16-26.
- Fiems, L. O. 2012. Double muscling in cattle: Genes, husbandry, carcasses and meat. *Animals* **2**: 472-506.

- Finno, C. J., Spier, S. J., Valberg, S. J. 2009. Equine diseases caused by known genetic mutations. *The Veterinary Journal* **179**: 336-347.
- Foxman B. 2012. Molecular Tools. Page(s) 79-97 in Foxman B. editors. *Molecular Tools and Infectious Disease Epidemiology*. Academic Press. Cambridge.
- Fujisawa-Sehara, A., Nabeshima, Y., Hosoda, Y., Obinata, T. 1990. Myogenin contains two domains conserved among myogenic factors. *Journal of Biological Chemistry* **265**: 15219-15223.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., De Leon, S., Khanna, V. K., Weiler, J. E., MacLennan, D. H. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* **253**: 448-451.
- 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.
- Gholap, P. N., Kale, D. S., Sirothia, A. R. 2014. Genetic diseases in cattle: A review. *Research Journal of Animal, Veterinary and Fishery Sciences* **2**: 24-33.
- Graves, K. T., Henney, P. J., Ennis, R. B. 2009. Partial deletion of the LAMA3 gene is responsible for hereditary junctional epidermolysis bullosa in the American Saddlebred Horse. *Animal genetics* **40**: 35-41.
- Grisart, B., Farnir F., Karim L. 2004. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**: 398-403.
- Hamilton, D. N., Ellis, M., Miller, K. D., McKeith, F. K., Parrett, D. F. 2000. The effect of the Halothane and Rendement Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs. *Journal of Animal Science* **78**: 2862-2867.
- Haase, B., Brooks, S. A., Tozaki, T., Burger, D., Poncet, P. A., Rieder, S., Leeb, T. 2009. Seven novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Animal genetics* **40**: 623-629.
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., Goddard, M. E. 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of dairy science* **92**: 433-443.
- Heather, J. M., Chain, B. 2016. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. *Genomics* **107**: 1-8.
- Hill, E. W., Gu, J., Eivers, S. S., Fonseca, R. G., McGivney, B. A., Govindarajan, P., MacHugh, D. 2010. A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PloS one* **5**: e8645.

- Chen A. Y., Chen A. 2013. Fluorescence In Situ Hybridization. *Journal of Investigative Dermatology* **133**: 1-4.
- Ibáñez-Escriche, N., Forni, S., Noguera, J. L., Varona, L. 2014. Genomic information in pig breeding: Science meets industry needs. *Livestock Science* **166**: 94-100.
- Kappes, S. M. 1999. Utilization of gene mapping information in livestock animals. *Theriogenology* **51**: 135-147.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P., Bass, J. J. 1997. Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome research* **7**: 910-915.
- Koćwin-Podsiadła, M., Kurył, J., Krzęcio, E., Zybert, A., Przybylski, W. 2003. The interaction between calpastatin and RYR1 genes for some pork quality traits. *Meat Science* **65**: 731-735.
- Kolmodin, L. A., Birch, D. E. 2002. Polymerase Chain Reaction. Page(s) 3–18 in Chen B., Janes H. W., editors. *PCR Cloning Protocols*. Humana Press. Tatowa, New Jersey.
- Król, J., Litwinczuk, Z., Brodziak, A., Barłowska, J. 2010. Lactoferrin, lysozyme and immunoglobulin G content in milk of four breeds of cows managed under intensive production system. *Pol J Vet Sci* **13**: 357-61.
- Kučerová, J., Němcová, E., Štípková, M., Vrtková, I., Dvůrák, J., Frelich, J., Maršálek, M. 2005. Vliv markerů CSN3 a ETH10 na parametry mléčné užitkovosti u českého strakatého skotu. *Journal of Central European agriculture* **5**: 303-308.
- Louis, C. F., W. E. Remple, C. F. Kennedy, L. R. Irvin, J. R. Mickelson. 1992. The molecular genetic diagnosis of porcine stress syndrome. *Amer. Assoc. Swine Prac* **3**:13
- Mach, N., Blum, Y., Bannink, A., Causeur, D., Houee-Bigot, M., Lagarrigue, S., Smits, M. A. 2012. Pleiotropic effects of polymorphism of the gene diacylglycerol-O-transferase 1 (DGAT1) in the mammary gland tissue of dairy cows. *Journal of dairy science* **95**: 4989-5000.
- Mau C., Poncet P. A., Bucher B., Stranzinger G., Rieder S. 2004: Genetic mapping of dominant white (W), a homozygous lethal condition in the horse (*Eguus caballus*). *Journal of Animal Breeding and Genetics* **121**: 374-383.
- Maxam, A. M., Gilbert, W. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**: 560-564.
- Metallinos, D. L., Bowling, A. T., Rine, J. 1998. A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung disease. *Mammalian Genome* **9**: 426-431.
- Miles, C., Wayne, M. 2008. Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* **1**: 208

- Mohammed S.A., Rahamtalla S.A., Ahmed S.S., Elhafiz A., Dousa B.M., Elamin K.M., Ahmed M.K.A. 2015. DGAT1 Gene in Dairy Cattle. *Global Journal of Animal Scientific Research* **3**: 191-198.
- Montagne, P., Cuilliere, M. L., Mole, C., Bene, M. C., Faure, G. 2001. Changes in lactoferrin and lysozyme levels in human milk during the first twelve weeks of lactation. Page(s) 241-247 in Newburg D. S., editors. *Bioactive components of human milk*. Springer, Boston, MA.
- Monthoux, C., de Brot, S., Jackson, M., Bleul, U., Walter, J. 2015. Skin malformations in a neonatal foal tested homozygous positive for Warmblood Fragile Foal Syndrome. *BMC veterinary research* **11**: 12.
- Nagahata, H. 2004. Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. *Journal of Veterinary Medical Science* **66**: 1475-1482.
- Oliván, M., González, J., Bassols, A., Díaz, F., Carreras, R., Mainau, E., Hollung, K. 2018. Effect of sex and RYR1 gene mutation on the muscle proteomic profile and main physiological biomarkers in pigs at slaughter. *Meat science* **141**: 81-90.
- Prather, R. S., Whitworth, K. M., Schommer, S. K., Wells, K. D. 2017. Genetic engineering alveolar macrophages for host resistance to PRRSV. *Veterinary microbiology* **209**: 124-129.
- Rieder, S. 2009. Molecular tests for coat colours in horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **126**: 415-424.
- Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B., Guerin G. 2001. Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome* **12**: 450–455
- Rudolph, J. A., Spier, S. J., Byrns, G., Rojas, C. V., Bernoco, D., Hoffman, E. P. 1992. Periodic paralysis in quarter horses: a sodium channel mutation disseminated by selective breeding. *Nature genetics* **2**: 144.
- Salem, M. S. Z. 2015. Formal genetic maps. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* **16**: 101-116.
- Sanders, S. J., Mason, C. E. 2016. The Newly Emerging View of the Genome. Page(s) 3-26 in Lehner T., Miller B. L., State M. W., editors. *Genomics, Circuits, and Pathways in Clinical Neuropsychiatry*. Academic Press, Cambridge.
- Sanger, F., Coulson, A. R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology* **94**: 441-448.

- Santschi, E. M., Purdy, A. K., Valberg, S. J., Vrotsos, P. D., Kaese, H., Mickelson, J. R. 1998. Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mammalian Genome* **9**: 306-309.
- Saraswathy N., Ramalingam P. 2011. Genome mapping. Page(s) 77-93 in Saraswathy N., Ramalingam P., editors. *Concepts and Techniques in Genomics and Proteomics*. Elsevier Publishers, Amsterdam.
- Shah, M., Varshney, P., Patel, P., Patel, D., Meshram, D. 2013. Cytogenetic mapping techniques: An approach to genome analysis. *Research & Reviews in BioSciences* **7**: 209–219.
- Schaeffer, L. R. 2006. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of animal Breeding and genetics* **123**: 218-223.
- Schefers, J. M., & Weigel, K. A. 2012. Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs. *Animal Frontiers* **2**: 4-9.
- Schook, L. B., Beever, J. E., Rogers, J., Humphray, S., Archibald, A., Chardon, P., Milan D., Rohrer G., Eversole, K. 2005. Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome. *International Journal of Genomics* **6**: 251-255.
- Simojoki, H., Hyvönen, P., Orro, T., Pyörälä, S. 2010. High concentration of human lactoferrin in milk of rhLf-transgenic cows relieves signs of bovine experimental *Staphylococcus chromogenes* intramammary infection. *Veterinary immunology and immunopathology* **136**: 265-271.
- Soria, L. A., Iglesias, G. M., Huguet, M. J., Mirande, S. L. 2003. A PCR-RFLP test to detect allelic variants of the Bovine Kappa-Casein gene. *Animal Biotechnology* **14**: 1-5.
- Stevanovic, J., Stanimirovic, Z., Dimitrijevic, V., Maletic, M. 2010. Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). *Czech J Anim Sci* **55**: 221-226.
- Thomassen, E. A., van Veen, H. A., van Berkel, P. H., Nuijens, J. H., Abrahams, J. P. 2005. The protein structure of recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows closely matches the structure of human milk-derived lactoferrin. *Transgenic research* **14**: 397-405.
- Tozaki, T., Sato, F., Hill, E. W., Miyake, T., Endo, Y., Kakoi, Gawahara H., Hirota K., Nakano Y., Namboh Y., Kurosawa, M. 2011. Sequence variants at the myostatin gene locus influence the body composition of Thoroughbred horses. *Journal of Veterinary Medical Science* **73**: 1617-1624.

- Valberg, S. J., McCue, M. E., Mickelson, J. R. 2011. The interplay of genetics, exercise, and nutrition in polysaccharide storage myopathy. *Journal of Equine Veterinary Science* **31**: 205-210.
- Valberg, S. J., Mickelson, J. 2006. Glycogen branching enzyme deficiency. In *Proceedings of the 52nd Annual American Association of Equine Practitioners Convention, San Antonio* **52**: 351-353
- Van Dijk, E. L., Auger, H., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in genetics* **30**: 418-426.
- Wade, C. M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., Blöcker, H. 2009. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science* **326**: 865-867.
- Wakchaure, R., Ganguly, S., Praveen, P. K., Kumar, A., Sharma, S., Mahajan, T. 2015. Marker assisted selection (MAS) in animal breeding: a review. *Drug Metab Toxicol* **6**:127-131
- Wasfi, A., Awwad, F., Ayesh, A. I. 2018. Graphene-based Nanopore Approaches for DNA Sequencing: A Literature Review. *Biosensors and Bioelectronics* **119**: 191-203
- White, S. D., Affolter, V. K., Bannasch, D. L., Schultheiss, P. C., Hamar, D. W., Chapman, P. L., Veneklasen, G. O. 2004. Hereditary equine regional dermal asthenia ('hyperelastosis cutis') in 50 horses: clinical, histological, immunohistological and ultrastructural findings. *Veterinary dermatology* **15**: 207-217.
- Wiler, R., Leber, R., Moore, B. B., VanDyk, L. F., Perryman, L. E., Meek, K. 1995. Equine severe combined immunodeficiency: a defect in V (D) J recombination and DNA-dependent protein kinase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**: 11485-11489.
- Williams, J. L. 2005. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* **24**: 379.
- Winand N. 2011. Identification of the causative mutation for inherited connectivetissue disorders in equines. United States Department Of Commerce Application, USA. US 20140186835 A1
- Yang, H., Zhang, J., Zhang, X., Shi, J., Pan, Y., Zhou, R., Wu, Z. 2018. CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral research* **151**: 63-70.
- Yang, P., Wang, J., Gong, G., Sun, X., Zhang, R., Du, Z., Dai, Y. 2008. Cattle mammary bioreactor generated by a novel procedure of transgenic cloning for large-scale production of functional human lactoferrin. *PloS ONE* **3**: e3453.

- Yang, B., Wang, J., Tang, B., Liu, Y., Guo, C., Yang, P., Dai, Y. 2011. Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *PloS ONE* **6**: e17593.
- Yu, T., Guo, C., Wang, J., Hao, P., Sui, S., Chen, X., Dai, Y. 2010. Comprehensive characterization of the site-specific N-glycosylation of wild-type and recombinant human lactoferrin expressed in the milk of transgenic cloned cattle. *Glycobiology* **21**: 206-224.
- Zimin, A. V., Delcher, A. L., Florea, L., Kelley, D. R., Schatz, M. C., Puiu, D. Marçais, G. 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome biology* **10**: R42.

6 Internetové zdroje

- Animal genetics. 2015. Equine Genetic Disease Testing. Animal genetics. Available from https://www.animalgenetics.us/equine/Genetic_Disease/Index.asp#_ (accessed February 2019).
- FAO. 2018. Production – Live animals. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QA> (accessed November 2018).
- Genomia. 2017. DNA profilování koní. Equichannel. Available from <http://www.equichannel.cz/dna-profilovani-koni> (accessed February 2019).
- Jefferies A. 2017. Genetic tests for horses. Equus. Available from <https://equusmagazine.com/horse-world/appliedgenetics> (accessed February 2019)
- Kyselová J., Svatoňová-Jochová M., Czerneková V., Ječmínková K. 2017. Jak se určují genetické predispozice pro barvy u koní aneb molekulárně-genetické testy pro chovatele a majitele koní a jejich zdravotní význam. Equichannel. Available from <http://www.equichannel.cz/jak-se-urcuji-geneticke-predispozice-pro-barvy-u-koni> (accessed January 30).
- Tiwari V.K., Faris J.D., Friebe B., Gill B.S. 2016. Genome Mapping. Reference Module in Food Science. Available from <https://www.sciencedirect.com/referencework/9780081005965/food-science> (accessed srpen 2018)
- ÚZPI. 2007. Genom koně plně dešifrován. Agris. Available from http://www.agris.cz/zemedelstvi/genom-kone-plne-desifrovan?id_a=152561 (accessed January 2019).

7 Seznam použitých zkratek a symbolů

A – Adenin
AMK – aminokyselina
ASIP – agouti-signaling-protein
BAC – bakteriální umělý chromozóm
bp – páry bází
BLAD – syndrom deficiencie adhezní schopnosti leukocytů u skotu
BLUP – best linear unbiased prediction
C – cystein
cDNA – complementary cDNA
cM – centimorgan
CVM – komplexní vertebrální malformace
ČMSCH – Českomoravská společnost chovatelů
dATP – deoxyadenosin trifosfát
dCTP – deoxycytidin trifosfát
DFD – dark, firm, dry (vada masa)
DGAT1 – diacylglycerol O-acyltransferase 1
dGTP – deoxyguanosin trifosfát
DNA – deoxyribonukleová kyselina
dTTP – deoxythymidin trifosfát
EBV – průměrná odhadovaná chovná hodnota
EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová
EST – exprimovaná sekvenční značka
G – guanin
GEBV – genomický odhad chovné hodnoty
GSD V – nedostatek svalové glykogenfosforylázy
HERDA – hereditární equinní regionální dermální astenie
hLZ – lidský lysozym
HYPP – hyperkalemická periodická paralýza
KIT gen – proto-onkogenový receptor pro tyrosinkinázu
MAS – marker-assisted selection
MC1R – melanokortin-1-receptor
MSTN gen – myostatinový gen
mRNA – messengerová RNA
MYOD – myoblast determination protein
NCBI – National Center of Biotechnology Information
PCR – polymerázové řetězové reakce
PRRS – reprodukční a respirační syndrom prasat
PRRSV – virus porcinního reprodukčního a respiračního syndromu
PSE – pale, soft, exudative (vada masa)
PSS – prasečí stresový syndrom
PSSM1 – polysacharidová myopatie
QTL – quantitative trait loci

RFLP – restriction fragment length polymorphism
rhLF – lidský laktoferin
RN gen – rendment napole gen
RNA – ribonukleová kyselina
RYR1 gen – ryanodinového receptoru 1 gen
SCID – těžká kombinovaná imunodeficiencie
SMRT – single molecule real-time
SNP – single nucleotide polymorphisms
SRCR – scavenger receptor cysteine-rich
STR – Krátké tandemové repetice (short tandem repeats)
STS – Místo označené sekvence (sequence tagged site)
T – thymin
WFSS – syndrom fragilních hřbat teplokrevníků