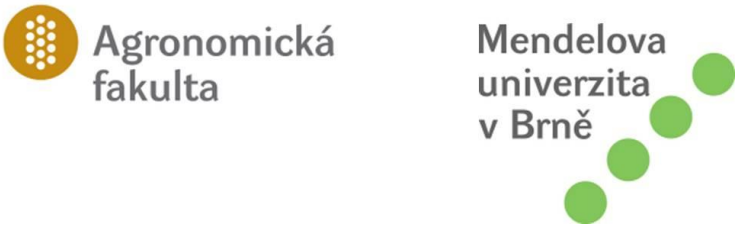
MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2017 **EVA VENUSOVÁ**

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



Aktuální molekulární polymorfizmy genů a molekulární metody analýzy kvality masa u masných plemen skotu

Bakalářská práce

Vedoucí práce:
prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

Vypracovala:
Eva Venusová

Brno 2017

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Aktuální molekulární polymorfismy genů a molekulární metody analýzy kvality masa u masných plemen skotu vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.*

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:……..

……

podpis

Zadání

Poděkování

Před uvedením mé bakalářské práce bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce prof. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za odbornou pomoc, poznatky, rady a trpělivost při tvorbě této bakalářské práce.

Poděkování patří také mé rodině, která mě během celého studia psychicky i finančně podporovala, motivovala a vždy podržela i v těch nejtěžších situacích.

ABSTRAKT

Důvodem zvyšující se náročnosti spotřebitelů stoupá i poptávka po kvalitnějším mase. Na kvalitě masa se podílí velké množství genů spolu s vnějším prostředím. Tudíž bylo cílem bakalářské práce popsat polymorfismy a kandidátní geny asociované u skotu s masnou užitkovostí. V této práci jsou popsány kandidátní geny pro mramorovaní, mezi které patří geny *DGAT1*, thyroglobulin a leptin, u kterých je prokázaný vliv na množství intramuskulárního tuku v mase. Pro křehkost masa jsou popsány geny *CAST* a *CAPN1*. Dále jsou zde popsány geny *MYOD* rodiny, *IGF* rodiny a gen *MSTN*, které se podílejí na růstu svalových vláken a na zmasilosti skotu.

V rámci tématu bakalářské práce jsou zde uvedeny také molekulární metody analýzy a metody selekce, které slouží k detekci vhodných kandidátních genů a jejich polymorfismů ovlivňujících kvalitu hovězího masa.

Klíčová slova: polymorfismy, kvalita masa, mramorování, křehkost, kandidátní geny, molekulární metody analýzy kvality masa

ABSTRACT

Due to increasing demand for quality from costumers also grows up demand for superior meat. On meat quality takes part great number of genes together with outer environment. Thus, goal of my bachelor's thesis is to describe polymorphisms and candidate genes associated with cattle focused for meat yield. In this thesis are described candidate genes for marbling in which belongs genes *DGAT1*, thyroglobulin and leptin where have been proofed an influence on amount of intramuscular fat in meat. In scope of meat tenderness were further described genes *CAST* and *CAPN1*. Other genes associated with on growth of muscle fibers and muscle amount of cattle are of *MYOD* family, *IGF* family and gene *MSTN*.

In terms of the topic of bachelor's thesis are also mentioned molecular methods analyses and selection methods which serves for detection of suitable candidate genes and their polymorphisms influencing quality of cattle meat.

Keywords: polymorphism, meat quality, marbling, tenderness, candidate genes, molecular methods of meat quality analyses.

Obsah

1 Úvod 9
2 Cíl 10
3 Hovězí maso, jeho vlastnosti a kvalita 11
3.1 Chemicko-fyzikální vlastnosti kvality hovězího masa 11
3.1.1 PH masa 11
3.1.2 Barva 12
3.1.3 Chemické složení hovězího masa 12
3.2 Senzoricko-technologické vlastnosti hovězího masa 13
3.2.1 Mramorování masa 13
3.2.2 Křehkost masa 15
3.2.3 Vaznost vody a šťavnatost 15
3.2.4 Vůně a chuť 16
4 Genetika masné užitkovosti 17
4.1 Genom skotu 18
4.2 Genetické markery 19
5 Kandidátní geny kvality masa a jejich polymorfismy (SNP) 21
5.1 Geny zmasilosti 21
5.1.1 MYOD rodina 21
5.1.2 IGF rodina (Inzulínu podobné růstové faktory) 22
5.1.3 MSTN (Myostatin) 24
5.2 Kanditdátní geny mramorování masa 25
5.2.1 DGAT (Diacylglycerol O-acyltransferáza) 25
5.2.2 TG (Thyroglobulin) 26
5.2.3 LEP (Leptin) 26
5.3 Kandidátní geny pro křehkost masa 27
5.3.1 CAST (Kalpastatin) 27

5.3.2 CAPN1 (Kalpain) 28
6 Molekulární metody detekce polymorfizmů kandidátních genů kvality masa 29
6.1 Izolace DNA 29
6.2 PCR – polymerázová řetězová reakce 30
6.3 RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů 31
6.4 Sekvenování genů 31
6.5 DNA čipy – Microarray 33
6.6 Celogenomová Asociační studie (GWAS) 34
7 Využití genetických markerů k zlepšování kvality hovězího masa 35
7.1 Selekce s podporou markerů – MAS 35
7.1.1 Detekce a typy markerů pro MAS 36
7.2 Genomická selekce – GS 36
7.3 Genomové editování 38
7.3.1 Mechanismus editování genu 38
7.3.2 Typy nukleáz 38
7.3.3 Zinc Finger nukleázy 39
7.3.4 TALENs – Transcription activator like effectors 39
7.3.5 Meganukleázy 40
7.3.6 CRISPR/ Cas systém 40
8 Závěr 41
9 Seznam zkratek 43
10 Seznam použité literatury 44

1 ÚVOD

Člověka provází maso už od dob pravěku, kdy pro něj bylo jednou z nejdůležitějších složek jeho jídelníčku a z toho důvodu trávili lidé spoustu času lovem zvěře a následným zpracováním masa. Lidé byly postupně víc nespokojení s tehdejšími podmínkami, tím pádem rostly nároky na vyšší kvalitu masa a začalo se se šlechtěním zvířat. V dnešní době spotřebitelé na trhu požadují maso o nejvyšší kvalitě, tudíž maso zdravotně nezávadné, křehké s vizuálními a senzorickými vlastnostmi (barva, vůně, chuť), které jsou pro zdravé hovězí maso typické. Čím dál více je upřednostňováno maso prorostlé intramuskulárním tukem, který masu dodává lepší chuť a křehkost.

Maso je považováno za nenahraditelnou složku výživy. Z nutričního hlediska je zdrojem bílkovin, které jsou pro nás velmi důležité, nasycených mastných kyselin, vitamínů a minerálních látek. Poslední dobou vniklo spoustu různých trendů, které způsobily snížení spotřeby hovězího masa. Lidé dnes kvůli různým dietám preferují spíše maso kuřecí a krůtí, a to díky jeho nízkému obsahu tuku. Kvůli nízké poptávce hovězího masa, která je aktuálně na svém minimu, došlo v posledních deseti letech v ČR ke snížení počtu stavů hovězího dobytka, k poklesu porážek a tím k celkovému úbytku výroby hovězího masa. Značnou roli hraje i cenová politika, kvůli které je výhodnější maso dovážet ze zahraničí.

Vlastnosti, jako jsou křehkost, šťavnatost a mramorování, jsou ovlivňovány velkých počtem genů a vnějšími faktory (strava apod.). Tyto vlastnosti jsou složité na zlepšování, protože mají nízkou heritabilitu. Proto se při šlechtění dbá na výběr jedince s vysokou genetickou predispozicí, u kterého se předpokládá, že nese geny ovlivňující žádané vlastnosti. K tomu nám v dnešní době slouží molekulárně genetické metody, které umožňují analyzovat genetickou podstatu sledovaných znaků u konkrétního jedince či celé populace. Tyto molekulárně genetické metody umožňují detekci několika kandidátních genu a jejich polymorfismů nesoucích znak pro danou vlastnost.

2 CÍL

Cílem bakalářské práce je popsat nejnovější polymorfismy a geny, které jsou asociovány s masnou užitkovostí a zejména s kvalitou masa u masných plemen skotu. Úkolem je literárně zpracovat a popsat charakteristiku vybraných genů, jejich strukturu, polymorfismy a výsledky asociačních analýz souvisejících s masnou užitkovostí u skotu.

V souvislosti s kvalitou hovězího masa je cílem práce popsat aktuální molekulární metody analýzy kandidátních genů a jejich polymorfismů, které přímo či nepřímo ovlivňují vlastnosti kvality hovězího masa. Ovlivňovanými vlastnostmi jsou křehkost, mramorování, šťavnatost, barva či chuť, na které je v posledních letech kladen čím dál větší důraz.

3 HOVĚZÍ MASO, JEHO VLASTNOSTI A KVALITA

Kvalita masa je určena množstvím dílčích znaků, které spolu interferují. Patří k nim např. chemické složení těla, fyzikálně-chemické vlastnosti, hygienická hodnota, mikrobiální kontaminace a také vizuální a smyslové vlastnosti.

Pochopení toho, co spotřebitelé chtějí a jak tyto požadavky měnit je pro průmysl na konkurenčním trhu velmi složitý. Spotřebitelé stále častěji vyžadují kvalitní a zdravé maso, což je trend, který se projevuje v rostoucím zájmu veřejnosti o nutriční a zdraví podporující hodnoty stravy. To průmyslu umožňuje reagovat na spotřebitele a klást zvýšený důraz na produkci kvalitního masa s výbornými senzorickými vlastnostmi a dobrou nutriční hodnotou.

Mezi žádoucí faktory kvality masa se řadí obsah intramuskulárního tuku, který zvyšuje křehkost a chutnost masa. Bez něj by maso bylo nevýrazné a bez chuti. Naopak nežádoucí je v poslední době maso s vysokým podílem podkožního a mezisvalového tuku, takže se dává přednost spíše masu libovému.

Doba zrání má hlavní vliv na většinu senzorických vlastností masa. Lépe hodnoceno je maso s delší dobou zrání (11 oproti 4 dnům). Intenzita chuti a šťavnatost jsou závislé na věku při porážce, kdy starší zvířata (18 oproti 14 měsícům) mají vyšší hodnoty a jsou celkově mnohem lépe hodnocena. Dalším faktorem je především výživa, kde změna krmné dávky má vliv na výslednou kvalitu masa. Pro posouzení je pak důležitý způsob přípravy masa a jeho tepelné zpracování (Syrůček et al., 2015).

3.1 CHEMICKO-FYZIKÁLNÍ VLASTNOSTI KVALITY HOVĚZÍHO MASA

Fyzikální a chemické vlastnosti jsou objektivními měřítky kvality masa, zahrnující sílu střihu, procento intramuskulárního tuku, konečné pH, myofibrilární fragmentaci, barva libového masa a koncentraci minerálních a stopových prvků.

3.1.1 PH masa

Znalost pH a jeho význam v kvalitě masa je základním prvkem měření kvality masa. V průběhu počátečních posmrtných změn ve svalech skotu, klesá hodnota pH z přibližně 7,0 na 5,4-5,6. Obecně platí, že maso s pH v rozmezí 5,4-5,6 má nejlepší vlastnosti, zatímco zvýšené pH > 6,2 masa má celkově nižší kvalitu a vyznačuje se tím, že má tmavší barvu, slabší aroma a kratší trvanlivost v důsledku zvýšeného růstu bakterií (Lawrie, 1966

in Garrick et al., 2015). Důvodem poklesu pH je tvorba kyseliny mléčné z glykogenu při anaerobní glykolýze. Pokud je počáteční glykogen v mase v malém množství, hodnota pH zůstává vysoká (nad 6,2) a jedná se o vadu DFD (tmavé, tuhé a suché). V případě, že pokles pH je prudký, stává se maso bledé, měkké a vodnaté (vada PSE). To znamená, že konečné pH má významný vliv na barvu, pevnost a vaznost vody, jakož i na narušení myofibrilárních proteinů, křehkost a chuť (Swatland, 2002).

PH masa se podle měření označuje jako pH_1 a pH_2. PH_1 se měří za tepla po 45 minutách po porážce a pH_2 za studena po 24 hodinách po porážce. Měří se pomocí skleněných vpichových elektrod (Swatland, 2002).

3.1.2 Barva

Pro spotřebitele je barva masa je velmi důležitá, protože je faktorem ovlivňujícím rozhodnutí spotřebitele při výběru vhodného kousku na vaření. Barva se ovlivněna červeným barvivem myoglobin, které se nachází ve svalovině.

Protein myoglobin se skládá z 153 aminokyselin a obsahuje strukturu porfyrin. Podobně jako krevní barvivo hemoglobin, váže myoglobin ve své struktuře železo. Výskyt různých odstínů červené barvy v mase souvisí s existencí tří různých forem myoglobinu v mase: deoxymyoglobin (fialovo-červená), oxymyoglobin (jasně červená) a metmyoglobin (nahnědlá/šedočervená). Jejich aktivace je závislá na tlaku kyslíku a na stavu atomu železa (Fe^{2+}, Fe^{3+}) (Leveau, 2008).

K měření barvy se využívá buď kolorimetr, nebo spektrofotometr, který funguje na principu pohlcování světla různých vlnových délek. Podle Commission Internationale d´Eclairage (CIE, 1976), která vyvinula rovnoměrnou kolorimetrickou soustavu, se při měření vykazují hodnoty L* a* b*, kde a* na ose vyznačuje rozmezí barev od zelené (-60) do červené (60), b* rozmezí barev od modré (-60) do žluté (60) a L* jas (100, což je bílá a 0 černá) (Mateescu, 2015).

3.1.3 Chemické složení hovězího masa

Hovězí maso je vysoce výživné. Skládá se ze 75 % vody, 18-22 % bílkovin, 2,5 % tuků a 3,5 % rozpustných látek včetně sacharidů, organické soli, rozpuštěných dusíkatých látek, minerálů a vitamínů (A, B_6, B_{12}, D, E, železo, zinek, selen) (Mateescu, 2015).

Steinhauser et al. (2000) uvádějí, že bílkoviny tvoří nejvýznamnější složku masa jak z nutričního, tak technologického hlediska. Z hlediska nutričního se jedná o tzv. „plnohodnotné“ bílkoviny, a to proto, že obsahují všechny aminokyseliny potřebné pro

lidský organismus. Z technologického hlediska se dělí bílkoviny podle rozpustnosti na sarkoplasmatické bílkoviny (rozpustné ve vodě a slabých solných roztocích), myofibrilární proteiny (rozpustné pouze v solných roztocích) a stromatické (vazivové) bílkoviny (při nízkých teplotách nerozpustné).

Tuky v mase tvoří nejvyšší podíl (99 %). Nachází se převážně v tukových buňkách (adipocytech) v mnoha buněčných místech jako podkožní tuk, intramuskulární a intermuskulární tuk. Drobné kapičky lipidů se rovněž nachází uvnitř svalových buněk, což je častější u červené svaloviny než u bílé (Tume, 2014). Důležitý pro chuť a křehkost masa je intramuskulární tuk, který se nachází mezi svalovými vlákny a tvoří tzv. mramorování masa (Steinhauser et al. 2000). Lipidy v mase se převážně skládají z triacylglycerolů (převážně v adipocytech) a fosfolipidů (ve svalech a adipocytech buněčných membrán). Obsah lipidů se může lišit v závislosti na tučnosti zvířete. Vysoce mramorované a drahé maso plemene wagyu může obsahovat až 40 g tuku / 100 g masa (Tume, 2014).

Maso obsahuje velké množství vitamínů, zejména skupiny B. Důležitý je především vitamín B_{12}, který se vyskytuje pouze v živočišných potravinách. Vitamíny rozpustné v tucích A, D a E jsou obsaženy v tukové tkáni a v játrech. Vitamín C se vyskytuje v mase jen v malém množství, ve vyšším se vyskytuje v krvi a játrech (Steinhauser et. al., 2000).

Steinhauser et al. (2000) uvádějí, že minerální látky tvoří kolem 1 % hmotnosti masa. Většina minerálních látek je rozpustná ve vodě a ve svalovině se nacházejí ve formě iontů. Hovězí maso je významným zdrojem draslíku, vápníku, hořčíku, železa, a navíc důležitým zdrojem zinku. Vápník hraje roli při svalové kontrakci, účastní se reakcí srážlivosti krve a je součástí kostí. Železo je v mase přítomno v barvivu hemoglobinu.

3.2 SENZORICKO-TECHNOLOGICKÉ VLASTNOSTI HOVĚZÍHO MASA

3.2.1 Mramorování masa

Mramorování je jednou z nejdůležitějších vlastností určující kvalitu masa (Obrázek č. 1). Bohatost mramorování bývá často z hlediska spotřebitele primárním faktorem ovlivňujícím nákup masa (Cheng et al., 2015). Termín mramorování udává množství intramuskulárního tuku (IMF) v mase (Leveau, 2008). Ten je velice důležitý pro křehkost a chuť masa (Steinhauser et al., 2000). Mramorování, které je jemně zrnité a rovnoměrně rozmístěné je upřednostňováno před mramorováním, které tvoří větší shluky

intramuskulárního tuku (AMSA, 2015). Ukládání živočišných tuků probíhá v různých fázích růstu. K hlavnímu nástupu ukládání tuku dochází v pubertě a stupeň mramorování při porážce je pak závislý na stadiu pohlavní dospělosti. Nástup puberty je do značné míry závislý na chovu. (Leveau, 2008). Při stejném věku mají pozdní plemena, jako jsou limousine, simental a charolais, tendenci být méně osvalená a méně prorostlá intramuskulárním tukem, než ranná plemena jako je hereford a angus (Wheeler et al., 2005). Sex a kastrace jsou také důležitými faktory pro ukládání tuku, protože prostřednictvím je ovlivňována hladina mužského pohlavního hormonu testosteronu, která má pozitivní efekt na růst svaloviny (Leveau, 2008).

Maso s vyšším podílem mramorování je v mnoha zemích ceněno více než maso libové. Nejvyšší postavení v mramorování má dnes již nejenom v Japonsku produkované maso ze skotu plemene wagyu, které může obsahovat až 50 % intramuskulárního tuku (Steinhauser et al., 2000).

Mramorování masa se hodnotí vizuálním hodnocením nebo chemickou analýzou, jejíž nevýhodou je subjektivita a časová náročnost (Cheng et al., 2015). Tato vizuální hodnocení se provádí nejčastěji na zádovém svalu (Leveau, 2008). Aby se zlepšila přesnost detekce a efektivita, byla vytvořena celá řada moderních technik, včetně spektroskopické techniky, zobrazovací techniky a hyperspektrálního zobrazení (Cheng et al., 2015).

Obrázek č. 1 – Mramorované hovězí maso plemene wagyu. [online] Dostupné z: http://wagyu.org/

3.2.2 Křehkost masa

Křehkost je hodnocena spotřebiteli jako další z nejdůležitějších vlastností kvality masa. Závisí nejen na výrobních faktorech, jako je plemeno, genotyp, věk, strava nebo jatečná hmotnost, ale také na technologických faktorech, jako jsou jatečné podmínky, doba stárnutí a varný proces. Schopnost předvídat křehkost hovězího masa je jedním z problémů, protože křehkost masa je v období po porážce vysoce variabilní a spotřebitelé požadují pevně stanovený výsledný produkt (Calvo et al., 2014). Křehkost je sekundárním důsledkem zvýšení intramuskulárního tuku, jehož podíl se určuje celkovým obsahem tuku odebíraného z žeberního svalu, který se chemicky extrahuje (Mateescu, 2015). Nejvýznamnějším faktorem, který přispívá ke křehkosti masa, je posmrtná proteolýza. Za to jsou zodpovědné proteolytické geny μ-kalpain (*CAPN1*), který má za následek štěpení myofibrilárních proteinů, a jeho inhibitor kalpastatin (*CAST*) regulující proteolýzu (Calvo et al., 2014).

U hovězího dobytka existuje značná rozdílnost měkkosti mezi různými typy svalů. Funkce svalu v živém zvířeti má klíčový význam pro křehkost. Za nejlepší a nejkřehčí maso je považována svíčková (*m. psoas major*). Je to sval, jehož funkcí je stabilizovat hřbet, tudíž není určený k žádnému výraznému pohybu a má nízké množství pojivové tkáně, proto je křehčí. Naopak svaly používané pro pohyb mají více pojivové tkáně a maso je tužší (Leveau, 2008). Síla pojivových tkání je odvozena od kolagenních vláken. Z tohoto důvodu je také křehkost masa ovlivněna kolagenem ve svalu. Kolagenní vlákna jsou rovná, neroztažitelná, nerozvětvená vlákna bílé barvy. Tuhost kolagenu roste s věkem zvířat, proto budou mladší zvířata produkovat maso s vyšší křehkostí (Thu, 2006).

Křehkost se určuje měřením smykové síly v testu Warner-Bratzler, který měří sílu potřebnou pro rozkrojení masa po dozrání po porážce. Síla se odhaduje na rozmezí od 0,86 do2,99 kg u různých plemen skotu. Dřívější měření se podle pana Dikemana a pana Smitha a pohybovaly na horších hodnotách a to kolem 3,22 až 7,39 z roku 1948 a 2,2 až 5,0 z roku 1978 (Mateescu, 2015).

3.2.3 Vaznost vody a šťavnatost

Vaznost vody lze definovat jako schopnost masa udržet svoji vlastní vodu před vnějšími vlivy jako je lisování nebo odstřeďování a popřípadě schopnost vázat vodu přidanou navíc (Swatland, 2002). Vaznost vody hraje klíčovou roli při imobilizaci vody

v masných výrobcích a v mase a tím přispívá k celkové šťavnatosti a křehkosti vařeného masa. Vázat vodu je jedna z důležitých funkčních vlastností svalových bílkovin. Voda v mase existuje buď ve vázané formě nebo ve volném stavu. Vázaná voda je pevně spojená s proteiny přes vodíkové vazby a ovlivněna interakcí povrchových nábojů a polaritou proteinů (Xiong et al., 2014). Volná voda se pak nachází v myofibrilách, v prostoru mezi silnými vlákny myosinu a tenkými vlákny aktinu (Lawries, 2006).

Základním mechanismem uvolňování vody je účinek pH. Když pH klesne na isoelektrický bod svalových proteinů, sníží se negativní elektrostatické odpudivé síly mezi myofilamenty a zmenšuje se vodní prostor v mřížce myofilamentů (Swatland, 2002). Doba, kdy dojde k uvolnění kapaliny, je velmi závislá na době počátku post mortálních změn, teplotě, svalové struktuře, rychlosti proteolýzy a oxidaci proteinů (Lonergan et al., 2005).

Zhoršenou schopnost masa vázat vodu mají za následek vady PSE a DFD. PSE je tzv. bledé, měkké a vodnaté maso. Po porážce dochází k velmi rychlé glykolýze a k nahromadění kyseliny mléčné ve svalovině, což vede k poklesu pH pod 5,8 a ke zvýšení teploty svaloviny nad 42 °C. Při této teplotě dochází k částečné denaturaci proteinů a tím k narušení svalových vláken. Maso uvolňuje velkého množství masové šťávy, což způsobuje problémy v masné výrobě. Tato vada se spíše vyskytuje u strescitlivých prasat. DFD je naopak tmavé, suché a tuhé maso, které je typické právě pro hovězí skot. Vzniká v důsledku vyčerpání zvířete před porážkou. Vyčerpáním dojde ke spotřebě glykogenu, tím pádem nevzniká kyselina mléčná potřebná ke zrání masa. Hodnota pH masa je nad 6,2 a proto se maso snadno kazí.

3.2.4 Vůně a chuť

Chuť masa úzce souvisí s vůní a může být velmi nepříjemná. Chuť se určuje hlavně vodou rozpustnými molekulami, a vůně těkavými sloučeninami rozpustnými v tucích, které nejsou často detekovatelné před ohřevem. Masová aroma se objevuje v průběhu vaření, kdy se tuk taví a stává se náchylnější k chemickým reakcím, jakou jsou autooxidace a rozklad. Karbonylové sloučeniny, alkoholy a nenasycené lipidy mohou způsobovat žluklý zápach (Leveau, 2008). Pocit chuti je způsobeno především netěkavými látkami v potravinách v interakci s chuťovými pohárky na povrchu jazyka a sliznici patra (Demeyer, 2002). Chutnost je často hodnocena pomocí senzorických testů profesionální a natrénované poroty.

4 GENETIKA MASNÉ UŽITKOVOSTI

V posledních letech se uskutečnily velké pokroky, které umožnily hlubší pochopení vztahu mezi genomikou a kvalitou masa. Cílem genomiky je zjistit kompletní složení genetické informace u všech druhů živočichů. Je obtížné zlepšovat důležité vlastnosti kvality masa (křehkost, mramorování), a proto se vědci v současné době snaží hledat geny, které ovlivňují genetický potenciál pro tyto vlastnosti.

V kvalitě masa existují velké rozdíly mezi plemeny skotu i jedinci jednoho druhu, přitom mají stejný počet chromozomů (60). Karyotyp skotu je složený z 29 párů chromozomů a 1 páru pohlavních chromozomů. Každý chromozom obsahuje jednu molekulu DNA, kterou tvoří přibližně 1 milión párů bází (4 báze: A, T, C, G). Úsekem molekuly DNA je lokus. Lokusy, které ovlivňují kvantitativní znaky (tzn. i znaky kvality masa apod.) jsou označovány zkratkou QTL (Quantitative Trait Loci). Geny podílející na fenotypové variabilitě detekované v oblasti QTL, se nazývají „kandidátní geny". (Steinhauser et al., 2000).

Masná užitkovost je podmíněna polygenně, tedy velkým množstvím genů malého účinku, a zároveň je do jisté míry ovlivněna prostředím. *Dědivost* (h^2 = heritabilita), která je důležitým genetickým parametrem pro odhad plemenné hodnoty a pro výběr zvířete, je definována jako podíl celkové fenotypové variance ve vlastnosti populace, která je vysvětlena pomocí genetické variability. Vlastnosti s vyšší dědivostí se tedy dokáží rychleji vyšlechtit než znaky s nízkou dědivostí (Lambe et al., 2014).

Dědivost nabývá hodnot na stupnici od 0 do 1 a její číselná hodnota může být zvýšena či snížena. Zvýšení vyplývá ze snížení variability prostředí nebo ze zvýšení genetické rozdílnosti mezi jedinci. Naopak pokles vyplývá ze zvýšení proměnlivosti prostředí nebo ze snížení genetické rozdílnosti. Obecně platí, že dědivost kompozice kostry je středně vysoká, ale senzorické vlastnosti ovlivňující kvalitu masa jsou naopak nízké (s malou genetickou variabilitou a velkou variabilitou prostředí) a lze je hůře zlepšovat v populaci (Lambe et al., 2014, Massey et al.,).

Genetické parametry pro kvalitu masa se také mohou lišit v závislosti na typu měřeného svalu vzhledem k rozdílům podmínek (např. stres během přepravy či na jatkách) nebo metod zpracování (např. klimatizace, závěsná metoda) (Tabulka č. 1). Zejména genetické parametry pro křehkost masa se liší (Tabulka č. 2), a to pravděpodobně proto, že se jedná

o velmi složitý znak, který závisí na mnoha faktorech (změna pH, teploty, post mortu, glykolýze a zpracování) a interakcemi mezi nimi (Lambe et al.,2014).

Tabulka č.1 Heritabilita chemicko-fyzikálních vlastností masné užitkovosti (Mateescu, 2015)

Vlastnost	Heritabilita = h^2	Počet odhadů	Rozsah
% IMT	0,47	7	0,34 - 0,77
Síla střihu	0,28	7	0,09 - 0,42
Aktivita kaplastatinu	0,26	2	0,07 - 0,45
Konečné pH	0,02	1	0,02 - 0,02
Odrážlivost barvy	0,13	2	0,13 - 0,13
Síla střihu po 7 dnech	0,22	2	0,14 - 0,29
po 14 dnech	0,17	2	0,14 - 0,20
po 21 dnech	0,06	1	0,06
po 35 dnech	0,46	2	0,28 - 0,63

Tabulka č.2 Heritabilita senzorických vlastností masa (Mateescu, 2015)

Vlastnost	Heritabilita = h^2	Počet odhadů	Rozsah
Křehkost	0,25	9	0,06 - 0,46
Šťavnatost	0,22	9	0,00 - 0,46
Intenzita příchutě	0,1	8	0,00 - 0,32
Žádoucí chuť	0,32	1	0,32

4.1 GENOM SKOTU

Genom je definovaný jako soubor veškeré genetické informace, která je uložená v DNA organismu. K sekvenování genomu skotu se používá kombinace hierarchického sekvenování a metody shotgun (WGS – whole-genome shutgun).

V roce 2009 byl osekvenován genom skotu krávy plemene hereford. Podle nejnovějších údajů ze dne 19.11. 2015 (NCBI, 2017a) je celková sekvence délky genomu (poslední verze genomu Btau_5.0.1) 2 724 980 740 bp, a je 19× pokryt. Bylo popsáno 21 514 genů kódujících proteiny a 5 563 nekódujících genů. Sekvence genomu dále obsahuje 39 053 proteinů a 99 714 790 jednonukleotidových polymorfismů. Podle sestavení genomu UMD3.1 (Ensembl.org, 2017) je odhadováno na 19 994 kódujících genů a 3 825 nekódujících genů.

4.2 GENETICKÉ MARKERY

Genetická variabilita na úrovni DNA může být zjišťována nepřímo pomocí genetických markerů. Genetické markery jsou segmenty DNA se známou polohou v genomu, které můžou být identifikované pomocí molekulárně genetických laboratorních testů, tzv. genotypování. Rozborem vzorků DNA, která lze získat jednoduše z tkání, krve nebo masa, lze detekovat alelu každého genetického markeru.

Genetické markery se staly nástroji pro určování lokusů kvantitativních vlastností (QTL). Metodiky používané pro genetické hodnocení jsou založeny na předpokladu, že kvantitativní vlastnosti jsou ovlivňované nekonečným počtem genů malého aditivního účinku. Nicméně byly identifikované geny nebo QTL s mírnými účinky. Největších pokroků bylo dosaženo při identifikaci ETL (Economic Trait Loci), lokusy ovlivňující vlastnosti, které jsou důležité pro ekonomiku živočišné výroby (Navajas, 2014).

Uvádí se 3 typy markerů:

1. *Markery I. typu* jsou kódující exprimované geny, které se vyznačují nízkou hladinou polymorfismu. Kvůli tomu jsou málo využívané ke studiu diverzity rodin a využívají se spíše ke komparativnímu mapování (Vykoukalová et al., 2002).
2. *Markery II. typu* jsou vysoce variabilní sekvence DNA. Jedná se o mikro a minisatelity, které jsou charakteristické vysokým stupněm polymorfismu. Jedná se o velmi informativní mikrosatelity, které se používají při určování rodičovství, v populačních studiích a jsou základem pro mapování vazeb genu (Vykoukalová et al., 2002). Nicméně genotypování tohoto typu markeru je poměrně drahé a obtížné, proto se v dnešní době využívá spíš markery typu III (Navajas, 2014).
3. *Markery III. typu* jsou označovány jako jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které mohou ležet v kódujících exonech, ale častěji v nekódujících intronech či v intergenových oblastech. Využívají se pro populační a rodinné studie (Vykoukalová et al., 2002). Je jich hojný počet a genotypování vykazuje nízkou míru chyb při nízkých nákladech současných technologií (Navajas, 2014).

V některých případech je markerem gen nebo fragment DNA v genu. Pokud se jedná o tento případ, jde o přímý marker, jehož znalostí určíme přímo alelu cílového genu. Avšak ve většině případů jsou genetickými markery nefunkční neutrální geny, které jsou s genem spojené (nepřímé markery). Nepřímý marker se nachází v blízkosti genu, kde jejich vzdálenost určuje délka vazby. U vzdálenosti D $^{1}/_{4}$ 10 cm je 83 % závěrů správně,

ale 17 % případů naznačuje nesprávnou alelu požadovaného genu. Čím bližší bude vzdálenost mezi markerem a genem, tím budou správnější výsledky. Přesto, že jsou tyto markery nefunkční, mohou poskytnout cenné informace jak pro identifikaci cílového genu, tak pro selekci znaku, který nás zajímá (Navajas, 2014).

5 KANDIDÁTNÍ GENY KVALITY MASA A JEJICH POLYMORFISMY (SNP)

Polymorfismus – výskyt dvou nebo více variant znaku v populaci jedinců, přičemž nejméně dvě z těchto variant se vyskytují s četností více než 1 % (Snustad et al., 2009).

5.1 GENY ZMASILOSTI

Rychlost růstu a libové maso jsou dva ekonomicky důležité rysy u zvířat určených k produkci masa. Tvorba masa závisí na počtu svalových vláken ve svalech, které jsou regulované geny *MYOD* rodiny, *IGF* rodiny a myostatinem.

5.1.1 MYOD rodina

Rodina *MYOD* se skládá ze čtyř strukturálně a funkčně souvisejících genů: *MYOD1* (*MYF3*), *MYOG* (myogenin), *MYF5* a *MYF6* (herculin). Všechny tyto čtyři geny jsou složeny ze tří exonů a sdílejí homologii v rámci kódující oblasti základních helix-loop-helix (bHLH) proteinů. *MYOD* geny jsou zapojeny do vývoje svalů prostřednictvím tvorby svalových vláken během embryonálního vývoje až po jejich postnatální zrání a funkci. Tyto geny jsou považovány za kandidátní geny pro produkci masa vzhledem k jejich roli ve vývoji svalových vláken (Bhuiyan et al., 2009). Přístup k těmto kandidátním genům umožňuje identifikaci SNP v genech, které jsou spojeny s cílovými vlastnostmi a můžou mít vliv na změny ve fenotypu. Výzkumy dokazují, že zvířata, která mají vyšší počet středně velkých svalových vláken, produkují ve výsledku maso lepší kvality.

MYOD 1 je mapován na 37 až 40 cM intervalu na BTA15, kde jsou umístěny QTL pro křehkost masa a kostru (Bhuiyan et al., 2009). *MYOG* gen se nachází na BTA16 a několik QTL pro jatečnou hmotnost a mramorování jsou lokalizovány v intervalu 25-73 cM. *MYF5* byl také mapován v pozici QTL, a to mezi 0-30 cM na BTA5 (Bhuiyan et al., 2009). *MYF6* gen se nachází na BTA5 a působí proti *MYOD1* (antagonista), aby řídil diferenciaci pluripotentních embryonálních buněk do myogenní línie. Má vliv na aktivitu kontraktilních vláken kosterního svalstva, a taktéž na jejich vývoj (Du et al., 2013).

5.1.1.1 Polymorfismy MYOD rodiny

Ve studii bylo pro screening DNA polymorfismů vybráno 24 zvířat ze sedmi různých plemen skotu. Amplifikace a sekvenování čtyř *MYOD* genů sedmi různých plemen skotu odhalil čtrnáct polymorfismů (Tabulka č.3). Byly identifikovány čtyři DNA

polymorfismy v genu *MYOD1*, z nichž se dva SNP (g.691CNA a g.783GNA) nachází na exonu 1, jeden SNP (g.1274GNA) v intronu a jeden (g.2271CNG) v 3´-UTR oblasti. G.783GNA SNP byla nesynonymní mutace, která nahrazuje aminokyselinu glycin (GGC) za serin (AGC) v polypeptidovém řetězci. Další čtyři SNP byly zjištěny v *MYOG* genu. Jeden polymorfismus (g.511GNC) se nachází v exonu 1, dva SNP (g.1111CNG a g.1752CNT) v intronech 1 a 2 a jeden (g.2417CNT) v oblasti 3´-UTR. G.511GNC polymorfismus kóduje záměnu aminokyseliny alanin (GCG) na prolin (CCG) v proteinu MYOG. Tři SNP byly detekovány v *MYF5* genu, z nichž g.1911ANG SNP byl identifikován v intronu 2 a dva další (g.2434CNT a g.2630GNA) v oblasti 3´-UTR. Co se týče *MYF6* genu, zde byl detekován jeden polymorfismus (g.2417CNT), a to v oblasti 3´-UTR (Bhuiyan et al., 2009).

Tabulka č.3 Identifikace SNPs genů MYOD rodiny u skotu (Bhuiyan et al., 2009)

Gen	Umístění	Sekvence	SNP pozice	Změna AMK
MYOD1	Exon 1	GAAGG(C/A)CTGCA	g.691C > A	synonymní
	Exon 1	GCAGC(G/A)GCGAA	g.783G > A	missense(Gly>Ser)
	Intron 1	agttggg(g/a)agtcgggg	g.1274G > A	neaplikovatelné
	3´-UTR	CCTCC(C/G)CCATG	g.2271C > G	nekódující
MYOG	Exon 1	CCCAG(G/C)CGGCG	g.511G > C	missense(Ala>Pro)
	Intron 1	ccttgaat(c/g)aggggttc	g.1111C > G	Neaplikovatelné
	Intron 2	cagaatag(c/t)tgcttccaa	g.1752 C > T	Neaplikovatelné
	3´-UTR	GCTGC(C/T)CTTTG	g.2417C > T	Nekódující
MYF5	Intro 2	tgggtttc(a/g)aaggtggt	g.1911A > G	Neaplikovatelné
	3´-UTR	GGGGC(C/T)GTTCA	g.2434C > T	Nekódující
	3´-UTR	GTTAA(G/A)TAAAA	g.2630G > A	Nekódující
MYF6	Exon 1	GAACA(T/C)GTCCT	g.183T > C	Synonymní
	Exon 1	CGGCG(G/A)AAGGC	g.285G > A	Synonymní
	3´-UTR	GTTAC(C/T)TTAATA	g.1313C > G	Nekódující

5.1.2 IGF rodina (Inzulínu podobné růstové faktory)

Růstové faktory podobné inzulínu jsou členy velké superrodiny u mnoha druhů obratlovců. IGF1 a IGF2 jsou malé polypeptidy, které podporují buněčnou diferenciaci, proliferaci, migraci a inhibují apoptózu. IGF1 a IGF2 jsou klíčovými regulátory

proliferace a diferenciace myogenních buněk při vývoji plodu v embryonálním stádiu. (Ruvinsky, 2015).

IGF1 je považován spolu s růstovým hormonem (GH) za kandidátní gen pro růst a kvalitu masa u skotu, protože hrají hlavní roli při regulaci růstu a vývoje. Účinky *IGF1* byly pozorovány v několika tkáních, včetně kostí, svalové a tukové tkáně. Tyto účinky vyplívají ze stimulace buněčné proliferace a metabolických procesů spojených s uložením proteinů (Pereira et al., 2005). Gen *IGF1* je lokalizován na 5. chromozomu, jeho délka je 154 bp a obsahuje 6 exonů (NCBI, 2017a). Gen *IGF1* má dva polymorfismy nacházející se v oblasti promotoru: CA_n mikrosatelit a substituci T/C. neboli SNP IGF1/*Sna*BI. Mikrosatelit je spojován s poporodní hmotností u telat plemene hereford, ale nebyl nalezen v chovech plemene nellor, canchim, a simental/ angus kříženců. Co se týče SNP IGF1/*Sna*BI, tak ten je považován za potencionální molekulární marker spojený s tukem v mléce, bílkovinou, výškou hřbetního tuku a přírůstkem hmotnosti v průběhu prvních 20 dnů po odstavení (Reyna et al., 2010).

IGF2 je silný růstový a diferenciační faktor podílející se na růstu a vývoji savců (Huang et al., 2014). Je lokalizován na 29. chromozomu a obsahuje 10 exonů (NCBI, 2017a). U genu *IGF2* byly zjištěny čtyři polymorfismy, které se ukázaly být spojené s kohoutkovou výškou, délkou těla, šířkou hrudníku a tělesnou hmotností. Jsou to SNP (G17A), SNP2 (C220T), SNP3 (A221G), SNP4 (A1393G), které se nachází v intronu 8 (Huang et al., 2014) (Tabulka č. 4).

Tabulka č.4 Polymorfismy genu IGF2 u skotu (Huang et al., 2014). dbSNP číslo – číslo jednonukleotidového polymorfismu v databázi. DBS SNP – vzdálenost od předchozího SNP

SNPs	Varianta	Umístění	dbSNP číslo	Změna AMK	DPS SNP
1	G17A	Intron 8	ss#647298811	nekódující	0
2	C220T	Intron 8	ss#647298816	nekódující	203
3	A221G	Intron 8	ss#647298818	nekódující	1
4	A1393G	Intron 8	ss#647298820	nekódující	1172

5.1.3 MSTN (Myostatin)

Myostatin zvaný zpočátku také jako růstový a diferenciační faktor 8 (GDF8), je členem skupiny transformačního růstového faktoru β super rodiny GDF. Myostatin je negativním regulátorem, který zamezuje množení svalových buněk jak v raném embryonálním stadiu, tak i v celém vývoji (Beerman, 2014). Myostatin inhibuje množení myoblastů zastavením buněčného cyklu v G1 fázi a zároveň jejich diferenciaci. Také udržuje satelitní buňky v klidovém stavu. Co se týče biologické funkce, tak ta se neomezuje pouze na potlačení růstu kosterního svalstva, ale také hraje roli v regulaci syntézy bílkovin a regulaci metabolismus glukózy. Účinek myostatinu na množství tukové tkáně nebyl ještě tak úplně prokázán, ale je zřejmé, že má vliv na její snížení. Bioaktivita myostatinu není výhradně zprostředkována zvýšenou syntézou nebo uvolněním z kosterního svalstva, ale vyžaduje proteolytické štěpení prekurzorem. Příkladem je propeptid follistatin a GASP-1, který zabraňuje myostatinu navázání receptoru a tím i jeho aktivitu (Swatland, 2014).

Gen myostatinu má vliv na dědičné onemocnění zvané dvojité osvalení. Tohle onemocnění se vyskytuje u několika plemen skotu, ale nejvíce je zastoupeno u belgického modrého skotu a piemontského skotu. Identifikace dvojího osvalení byla dlouhou dobu založena na vizuálním hodnocení stupně mh – svalové hypertrofie. Tímto způsobem se ale dalo přesně určit pouze normální a homozygotní dvojí osvalení, ne heterozygotní zvířata (Swatland, 2014, Beerman, 2014).

V roce 1997 několik výzkumných skupin odhalilo genetickou příčinu dvojího osvalení mutacemi v genu myostatinu. Na pokusu s myšmi se ukázalo, že jedinci, kteří měli gen myostatinu knock-outovaný (zablokovaný), měly dvakrát až třikrát zvýšenou svalovou hmotu (Beerman, 2014).

Gen pro myostatin byl je lokalizován na centromerickém konci 2. chromozomu (Swatland, 2014). Sekvenováním myostatinu z DNA dvojího osvalení belgického modrého skotu bylo zjištěna delece 11 párů bází, která ve třetím exonu způsobuje posun čtecího rámce v aktivní C-koncové oblasti genu, a to vede k nefunkčnosti bílkoviny myostatinu (Swatland, 2014). Posun čtecího rámce je způsobený mutací p. D273RfsX13, která se kromě belgického modrého skotu vyskytuje u plemen blonde d'Aquitaine, limousine a south devon. Mutace má za následek předčasný terminační STOP kodon, což vede ke krácení peptidového řetězce. Následně byly zjištěny další 4 mutace způsobené předčasným terminačním STOP kodonem: tři jednonukleotidové substituce (p. Q204X

v charolais a limousine, p. E226X v maine-anjou, p. E291X v marchigiana) a mutace p. F140X v maine-anjou, kde dochází k deleci 7 párů bází, které jsou nahrazeny nepříbuzným úsekem 10 párů bází. U piemontského skotu se našla na třetím exonu mutace p. C313Y, která zaměňuje bázi G na A, což způsobuje změnu cysteinu na tyrosin (Mateescu, 2015).

5.2 KANDITDÁTNÍ GENY MRAMOROVÁNÍ MASA

5.2.1 DGAT (Diacylglycerol O-acyltransferáza)

Gen diacylglycerol O-acyltransférázy (*DGAT1*) kóduje mikrozomální enzym DGAT, který katalyzuje konečný krok syntézy triacylglycerolů (Li et al., 2013). Gen *DGAT1* se nachází na BTA14, který obsahuje QTL ovlivňující intramuskulární tuk. Je považovaný za kandidátní gen nejen pro obsah tuku v mléce, ale uvádí se, že i pro množství intramuskulárního tuku v hovězím mase (Leveau, 2008). Sekvence genu *DGAT1* je dlouhá 1745 bp a obsahuje 17 exonů (NCBI, 2017a).

V genu *DGAT1* byla nalezena nesynonymní dinukleotidová substituce K232A. Sledováním substituce lysin/alanin, byla zjištěna spojitost s obsahem tuku v mléce a obsahem intramuskulárního tuku v pološlašitém svalu (*semitendinosus muscle*). Zvířata s heterozygotním *DGAT1* genotypem (AAGC) vykazovala vyšší obsah intramuskulárního tuku a vyšší hodnoty mramorování než ti s homozygotním genotypem (GCGC) (Li et al., 2013).

Bartoň et al. (2015) prokázali, že polymorfismus g.10433_10434delinsAA má určitý vliv na množství intramuskulárního tuku v hovězím mase. Cílem jejich studie bylo stanovení polymorfismů u populace vykrmovaných Českých strakatých býků. Polymorfismus g.10433_10434delinsAA byl mapován na exonu 8. Bylo zjištěno, že frekvence minoritní alely *K* (0,058) byla nižší než frekvence alely *A* (genotypové frekvence: *AA* = 0,885, *AK* = 0,111 a *KK* = 0,003). Podobně nízké frekvence K alely byly hlášeny v populacích německého a čínského simentalu. Na rozdíl od toho byla podstatně vyšší frekvence alely *K* (0,40) pozorována u holštýnských krav. V této studii byla nalezena pouze dvě zvířata z 679 býků s genotypem KK. Protože byly frekvence alel velice nízké, nebylo v této studii možné provést plnohodnotnou asociační studii.

5.2.2 TG (Thyroglobulin)

Hormony štítné žlázy tyroxin (T_4) a trijodtyronin (T_3) hrají klíčovou roli v regulaci metabolismu látek a mají vliv na ukládání tuků. Thyroglobulin je prekurzorem hormonů štítné žlázy a je syntetizován z folikulárních buněk štítné žlázy (Zhang et al., 2015). Gen thyroglobulin byl mapován na 14. chromozomu a je považován za kandidátní gen, protože je spojen s výsledky mramorování a ukládáním tuku v hovězím mase. Některé alely tohoto genu vykazují pozitivní vliv na růst zvířat a také na obsah tuku (Mateescu, 2015).

Bylo vybráno celkem 237 kusů skotu (včetně simmental, angus, hereford, charolais, limousine, qinchuan, luxi a jinnan), kteří byli chovaní v provinciích Vnitřního Mongolska a Hebei. Zvířata vážila přibližně 405 kg, ve věku 30 měsíců a byla krmena 195 dní. Bylo zjištěno, že dobytek s TT nebo CT genotypem mají vyšší hodnoty mramorování než dobytek s CC genotypem (Zhang et al., 2015). Frekvence příznivé T alely byla označena jako nejvyšší v chovu skotu wagyu (Mateescu, 2015). Uvádí se také spojitost mezi TG5 a intramuskulárním tukem (IMF) v malé populaci složená z red angus, charolais, limousine a maďarského strakatého plemene. Nicméně jiné studie naopak neuvádí spojitost mezi TG5 markerem a IMF nebo získaly opačný výsledek. Vzhledem k omezení markeru TG5 vyvinulo několik studií nové SNP markery v genu *TG* (Zhang et al., 2015).

Dále byly ve studii pomocí metody sekvenování DNA identifikovány čtyři jednonukleotidové polymorfismy v 5´ v nepřekládané oblasti genu *TG* (T1355C, G1356A, T1531C, a C1548A). Analýza ukázala, že T1355C SNP byl spojen s procentem masa (MP) ($P < 0,05$). Zvířata s genotypem TC mají vyšší MP než zvířata s genotypem TT ($P < 0,05$). Byla rovněž zjištěna významná souvislost mezi G1356A polymorfismem a mezi živou hmotností (LW) a svalovinou bederní oblast (LMA) ($P < 0,05$). Zvířata s genotypem GG mají vyšší LW a LMA než zvířata s genotypem AA ($P < 0,05$). Nicméně nebyla prokázána významná souvislost mezi čtyřmi SNP a hodnotou mramorování. Výsledek této studie poskytuje nové důkazy o tom, že SNP v 5´ hraniční oblasti genu *TG* mohou být užitečnými markery v MAS hovězího dobytka (Zhang et al., 2015).

5.2.3 LEP (Leptin)

Leptin je peptidový hormon produkovaný především bílou tukovou tkání a v menší míře placentou a kosterním svalstvem. Hraje roli při ukládání glykogenu a transportu glukózy a je aktivní zejména v mozkové tkáni v oblasti hypotalamu. Tato oblast mozku se podílí na regulaci příjmu krmiva a to tak, že omezuje příjem potravy (Leveau, 2008).

Krom toho se podílí na ukládání tuku v mase a tím na kvalitě masa. Zvyšujícím se množství tukové tkáně se zvyšuje i množství leptinu (Corva et al., 2009). Gen *leptinu* se také označuje jako „obézní gen“, protože jeho absence vede k obezitě. Markery genu *leptinu* jsou již určeny pro selekci s podporou markerů (MAS) hovězího skotu.

Gen *leptinu* je u skotu umístěn na 4. chromozomu a po přepsání do peptidu obsahuje 167 aminokyselin (Leveau, 2008). Celkovou délku sekvence *leptinu* tvoří 2930 bp (NCBI, 2017a).

V genu *leptinu* bylo zjištěno několik SNP, které jsou spojeny s ukládáním tuku a mramorováním. Byla sbírána data 253 kusů volů plemen brangus, brahman a nellor. Data byla sbírána v průběhu dvou po sobě jdoucích výkrmových cyklů ze dvou farem v jihovýchodní provincii Buenos Aires, Argentina. Gen *leptinu* má 3 exony a 2 introny. Exon 1 je velmi krátký (34 bp) a je součástí 5´ UTR. Z toho důvodu nebyl sekvenován. Byl sekvenován Exon 2 (877-1342 bp) a Exon 3 (2961 bp), na kterých byly nalezeny 2 polymorfismy (Corva et al., 2009). Polymorfismus pojmenovaný Ex2FB, což je nesynonymní substituce lokalizovaná v exonu 2. V této substituci dochází k přechodu cytosinu na tymin a tím se aminokyselina arginin mění na cystein (Leveau, 2008). Výsledky ukazují, že T alela je spojena s výškou hřbetního tuku. Druhým polymorfismem je UASMS2 nacházející se v promotorové oblasti genu (Corva et al., 2009). UASMS2 je umístěn v poloze 258 v genu pro *leptin*. Zvířata s homozygotním genotypem T/T vykazují vyšší mramorování než ty, které nesou heterozygotní C/T a homozygotní C/C genotypy (Leveau, 2008).

5.3 KANDIDÁTNÍ GENY PRO KŘEHKOST MASA

5.3.1 CAST (Kalpastatin)

Gen *CAST* kóduje enzym kalpastatin, který je specifickým inhibitorem proteáz závislých na vápníku (i-kalpain a m-kalpain). Tento proteolytický systém hraje klíčovou roli v procesu, ke kterému dochází v průběhu křehnutí v post mortu (Calvo et al., 2014). Gen *CAST* byl mapován na BTA7 v poloze 117, 8 cM (Kubiak et al., 2009). Sekvenování genu *CAST* ukázalo, že gen obsahuje 30 exonů a je dlouhý 705 bp (NCBI, 2017a).

Calvo et al. (2014) uvádí, že celkově bylo nalezeno v genu *CAST* sedm polymorfismů lokalizovaných v 3´UTR oblasti. SNP g.98579663ANG (CAST_5) je spojován s křehkostí masa v několika studiích, které zjistily, že alela G je spojena s menší křehkostí

hovězího masa. G.98545188TNA polymorfismus (CAST_4) nebyl dříve popsán, ale byl vybrán pro analýzu díky své poloze uprostřed genu v intronu 12. SNP g.98533962CNG (CAST_1) byl také spojen s mramorováním a ukázalo se, že alela C je spojena s vyšší křehkostí masa.

Pro identifikaci možných mutací, které mění sekvenci aminokyselin v kalpastatinu, byla sekvenována cDNA z osmi zvířat. Ze sekvenování 2822 bp cDNA bylo nalezeno 23 SNP. Z nalezených SNP byly CAST_2 (g.98535683ANG) a CAST_3 (g.98535716GNA) lokalizované na exonu 7 a měnily pozici aminokyselin v pozicích p.Thr182Ala (CAST_2) a p.Glu193Lys (CAST_3). Ukázalo se, že substituce g.98535683ANG polymorfismu, by mohla mít vliv na interakci mezi regiony kalpastatin, L-domény a kalpain, a tím by pak mohla generovat stabilnější spojení mezi kalpainem a kalpastatinem (Calvo et al., 2014).

5.3.2 CAPN1 (Kalpain)

Gen *CAPN1* kóduje velkou podjednotku μ-kalpain, o níž se předpokládá, že je jedním z nejdůležitějších enzymů podílejících se na křehnutí masa post mortem (Soria et al., 2010). Přesněji je to cysteinová proteáza, jejíž činnost je zcela závislá na vápníku. Štěpí myofibrilární proteiny a tím zvyšuje křehkost masa v post mortu (Cheong et al., 2008).

U masného skotu byl gen *CAPN1* mapován na 29. chromozomu. Gen je složen z 22 exonů a 21 intronů, jejichž sekvenováním bylo objeveno několik SNP. Většina SNP byla nalezena v intronech nebo byla synonymní substitucí (Soria et al., 2010). Délku sekvence genu *CAPN1* tvoří 2948 bp (NCBI, 2017a), kde bylo nalezeno 12 polymorfismů. Mezi nimi byly nalezeny 4 polymorfismy, dvě nesynonymní substituce SNP (G316A v exonu 9 a V530I v exonu 14) a dva intronové SNP (C4685T a C4751T), které mají významný vliv na křehkost masa (Cheong et al., 2008). U SNP 316 dochází k záměně Ala za Gly a v případě SNP 530 je výměna Ile za Val (Soria et al., 2010).

6 MOLEKULÁRNÍ METODY DETEKCE POLYMORFIZMŮ KANDIDÁTNÍCH GENŮ KVALITY MASA

6.1 IZOLACE DNA

Nejprve je potřeba DNA izolovat v nativním stavu z přirozeného materiálu v dostatečném množství a čistotě, aby bylo možné provádět další analýzy (Rosypal et al., 2002). Vstupním materiálem můžou být kultury bakterií nebo eukaryotických buněk, vzorky rostlinných tkání či pletiv, buněčné organely nebo virové částice (Šmarda et al., 2008). Nukleovou kyselinu je potřeba zbavit veškerých nečistot a látek, které by bránily účinnému působení enzymů používaných k analýze (Rosypal et al., 2002). Existuje velké množství metod purifikace nukleových kyselin, ale všechny mají stejný základ.

K uvolnění vnitřního obsahu buněk je nutné vyvolat lyzi buněčné stěny. Způsob vyvolání rozkladu buněčné stěny závisí na typu buňky. Stěny bakteriálních buněk se většinou rozrušují lysozymem a současně s ním se používají detergenty (např. laurylsíran sodný) nebo chelatační činidla (např. EDTA), která vážou dvojmocné kationty a také inhibují deoxyribonukleázy (DNázy). Lyzi živočišných buněk, kterým chybí buněčná stěna, lze vyvolat šetrnějšími metodami, např. slabými neiontovými detergenty. Po rozrušení buněčné stěny je v lyzátu obsažena směs DNA, RNA, proteinů, lipidů, sacharidů a uhlovodíků. RNA se z purifikované DNA odstraní za pomocí ribonukleáz (RNáz). Pro odstranění proteinů z buněčného lyzátu se používají proteázy, nebo také hojně používaná extrakce pufrem: roztokem fenolu, nebo směsí fenolu a chloroformu. Tyto organické látky způsobují tvorbu dvou vrstev (fází). Důkladným promícháním směsi dojde k denaturaci proteinů a jejich vysrážení (Šmarda et al., 2008). Sraženinu proteinů pak dále lze centrifugovat a tím se docílí rozdělení těžší organické fáze tvořené fenolem, mezifáze tvořené rozloženými proteiny a zbytky buněk a lehčí vodné fáze v nichž jsou rozpuštěné nukleové kyseliny. Nukleové kyseliny z vodného roztoku, který byl získán centrifugací, se dále vysráží ethanolem nebo izopropanolem (Rosypal et al., 2002). Účinnému vysrážení DNA napomáhá snížení teploty na -70 °C a přidání solí. Po odpaření etanolových par se DNA rozpustí ve vodném roztoku s pufrem a uchovává se obvykle při 4 °C. Teplota závisí na velikosti nukleové kyseliny a její konformaci (Šmarda et al., 2008).

Posledním krokem je stanovení koncentrace a čistoty nukleových kyselin, který se může provádět spektrofotometrickou metodou nebo fluorescenční metodou.

6.2 PCR – POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE

Polymerázová řetězová reakce (PCR – Polymerase Chain Reaction) je citlivá a jednoduchá enzymatická metoda založená na rychlém namnožení konkrétních úseků DNA, na kterou přišel v roce 1985 americký biochemik Kary B. Mullis. V roce 1993 mu pak byla udělena pro jeho průkopnickou práci Nobelova cena za chemii (yourgenome.org., 2016).

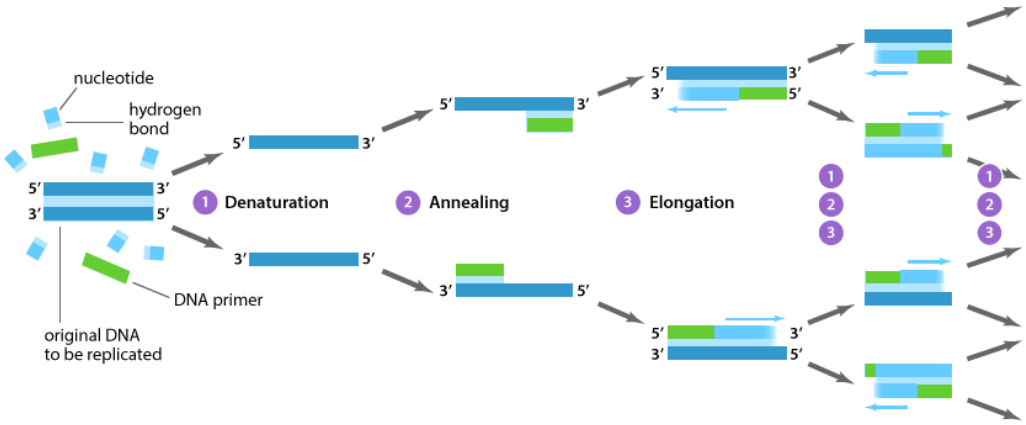
Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků DNA ve směru 5′→3′ prostřednictvím DNA-polymerázy. Vybraný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3′-konce směřují proti sobě (Šmarda et al., 2008). Primery jsou obvykle uměle připravené oligonukleotidy o délce 18-30 bází (Rosypal et al., 2002). Přidáním DNA-polymerázy a nukleotidů se aktivuje syntéza nových vláken na obou protilehlých matricových řetězcích. K syntéze DNA se využívají termostabilní polymerázy izolované z termofilních organizmů, např. *Taq* polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje (Šmarda et al., 2008). V závislosti na teplotě se v reakci střídají tři kroky (Obrázek č. 2):

- **Denaturace** – pokud se dvouřetězcová DNA zahřívá při 96 °C, dá se rozdělit na dvě samostatná vlákna.
- **Annealing** – snížení teploty na 30-65 °C, aby se primery mohly připojit k templátové DNA.
- **Elongace** – zvýšení teploty na 65-75 °C, aby došlo k syntéze nových vláken pomocí DNA-polymerázy (Garibyan et al., 2013).

Reakce se provádí v zařízení zvaném termocykler, v němž je v určitých časových intervalech automaticky mění teplota. Přesné hodnoty teploty a dobu trvání je třeba optimalizovat (Šmarda et al., 2008). S každým opakováním (20-30 cyklů) těchto tří kroků se počet zkopírovaných úseků DNA zdvojnásobí. Výsledkem je pak obrovské množství kopií fragmentů DNA nebo genu, který umožňuje detekci a identifikaci genových sekvencí pomocí vizuální techniky (Garibyan et al., 2013).

Přítomnost fragmentů DNA se v reakční směsi dokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarovém nebo polyakrylamidovém gelu, nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase. Podrobná analýza polymorfismů v produktech PCR může být dále provedena hybridizací DNA čipy, stanovením sekvence DNA, denaturační

gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE), metodou ELISA apod. (Šmarda et al., 2008).



Obrázek č. 2 Schéma kroků PCR. [online] (cit. 3. 4. 2017). Dostupné z: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php

6.3 RFLP – POLYMORFISMUS DÉLKY RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů je rozdíl v homologních sekvencích DNA, které mohou být detekovány přítomností fragmentů různých délek po štěpení vzorků DNA speciálními restrikčními endonukleázami (NCBI, 2017b). Jejich podstatou jsou buď mutace, které vedou k vytvoření nebo ztrátě rozpoznávacích míst pro restrikční endonukleázy, nebo vznikají jako důsledek přítomnosti různého počtu opakujících se sekvencí, delecí, inzercí nebo přestaveb v určitých oblastech chromozómu. Rozdíly ve velikosti a počtu restrikčních fragmentů jsou u různých jedinců odlišné a lze je snadno detekovat pomocí elektroforézy, které může být doplněna hybridizací se specifickými sondami pro polymorfní oblasti genomu. Metoda RFLP patří mezi starší metody, která stále využívá pro nejrůznější aplikace jako např. identifikace osob (otisky prstů) (Šmarda et al., 2008).

6.4 SEKVENOVÁNÍ GENŮ

Cílem sekvenování DNA je stanovení primární struktury neboli pořadí nukleotidů v molekulách DNA. K prvnímu průlomu sekvenování došlo v 70. letech, kdy bylo prvně přečteno několik krátkých fragmentů DNA. Teprve v druhé polovině 70. let dva týmy nezávisle na sobě vyvinuly skutečné sekvenační metody (Sangerova a Maxam-

Gilbertova), které byly publikovány v r. 1977. Tyto dvě metody existují dodnes, avšak používanější je spíše Sangerova metoda, neboť Maxam-Gilbergova se kvůli své vyšší náročnosti neprosadila.

- ENZYMATICKÉ SEKVENOVÁNÍ (Sangerovo sekvenování)

Tato metoda je pro svou praktičnost v současnosti nejběžněji používanou metodou sekvenování DNA. Při sekvenování enzymatickou metodou je DNA, jejíž sekvence má být stanovena, použita jako matrice pro syntézu komplementárních řetězců různé délky za použití DNA-polymerázy (Rosypal et al., 2002). Syntéza řetězce na matricové DNA je zahájena v místě, kde je připojen sekvenčně specifický primer a ukončen v místě, kde je začleněn místo normálního deoxyribonukleosidtrifosfátu jeho analog 2′,3′ - dideoxyribonukleosidtrifosfád (ddNTP). Ten působí jako koncový inhibitor syntézy DNA, protože díky absenci 3′OH skupiny, nemůže DNA-polymeráza navázat další nukleotid. Při vhodně zvoleném poměru nukleotidů a jejich analogů v reakční směsi bude výsledkem reakce soubor řetězců s různou délkou, zakončených právě tam, kde se náhodně začlenil ddNTP (Šmarda et al., 2008).

Reakce se také provádí ve čtyřech oddělených vzorcích. Každý vzorek obsahuje:

1. Molekulu DNA, jejíž sekvence má být stanovena.
2. Primer připojující se k části molekuly DNA nebo k místu připojení vektoru (u klonované DNA).
3. Směs obsahující 4 normální nukleotidy, z nichž je jeden radioaktivně označený, a jeden ze čtyř dideoxynukleotidů.
4. DNA-polymeráza (Rosypal et al., 2002).

Jako primery mohou být použity krátké restrikční fragmenty, nebo synteticky připravené oligonukleotidy o délce přibližně 18 bází. Častěji je však sekvenován fragment DNA klonovaný do vektoru. Vektory bývají pro sekvenování cíleně upravené a obsahují po obou stranách mnoho klonovacích míst, k nimž se připojují univerzální sekvenovací primery, pomocí nichž lze sekvenovat oba řetězce naklonované DNA s libovolnou sekvencí (Rosypal et al., 2002).

Nejnovější variantou enzymové metody je automatické sekvenování, při němž se sekvence odečítá a vyhodnocuje z gelu automaticky. Automatické sekvenování umožňuje stanovit a zpracovat sekvence DNA mnohem rychleji než při standartních postupech.

Rozdílem od klasické enzymové sekvenace je to, že:

1. Syntéza DNA probíhá metodou asymetrické polymerázové řetězové reakce v termocykleru s využitím *Taq* DNA-polymerázy.
2. K označování reakčních produktů se používají 4 různé fluorescenční (neradioaktivní) značky.
3. Detekce produktů sekvenace probíhá v průběhu elektroforézy automaticky pomocí laserového detektoru napojeného k počítači, který z pořadí pruhů v drahách přímo vyhodnocuje sekvenci DNA (Rosypal et al., 2002)

6.5 DNA ČIPY – MICROARRAY

DNA technologie Microarray je jednou z nových technologií ve vědě a medicíně, která umožňuje vědcům analyzovat expresi mnoha genů v jediné reakci rychle a účinně. Používá se také pro detekci polymorfismů a genomových mutací DNA. Na základě znalosti sekvence genomu je možné začít zkoumat expresi jakéhokoliv genu v organismu.

Mikročipy jsou technologie, ve které jsou tisíce nukleových kyselin vázaných na povrch a slouží k měření relativní koncentrace sekvencí nukleových kyselin ve směsi pomocí hybridizace a následné detekci hybridizačních událostí (Bumgarner, 2013). Testy mikročipů jsou založeny na hybridizaci jednořetězcových molekul značených fluorescenční značkou, nebo fluoresceinem, s komplementární molekulou připojenou k pevnému nosiči. Pevným nosičem může být skleněné mikroskopické sklíčko, křemíkový čip nebo nylonová membrána (Zhou et al., 2004). Využívá se tisíce sond, které se skládají buď z cDNA vytištěných na povrchu nebo kratších oligonukleotidů syntetizovaných nebo uložených na povrchu. Velikosti bodů v mikročipu jsou obvykle menší než 200 mikronů (Simon et al., 2003).

Pomocí těchto mikročipů lze diagnostikovat různá onemocnění jako jsou srdeční onemocnění, duševní choroby, infekční choroby a zejména rakovinu. Mikročipy jsou také široce využívány pro detekci SNP jak u lidí, tak u hospodářských zvířat. Podle Lazzaroni et al. (2007) se SNP u skotu detekují pomocí systému Illumina a Affymetrix. Systém Illumina je založen na optických vláknech 96-ti individuálních polí, z nichž každé pole může pojmout 1536 různých oligonukleotidových sond. Z tohoto důvodu může mít 96 jedinců za pár hodin genotypovaných několik desítek tisíc lokusů. Čipy Affymetrix na rozdíl od Illumina fungují tak, že kopírují kratší sekvence DNA pro detekci alel než Illumina čipy (Bush et al., 2012). Mezi nejmodernějšími Illumina SNP čipy pro skot patří:

BovineHD BeadChip (více jak 777,000 SNPs), BovineSNP50 BeadChip (více než 54,000 rovnoměrně rozložených SNPs) a Bovine3K BeadChip (nabízí 2,900 speciálních SNP) (Illumina, 2010). Illumina čipy jsou dražší, ale za to mají lepší přesnost (Bush et al., 2012).

Mikročipy mají řadu omezení, takže by vzhledem k omezenosti čipů bylo mnohem výhodnější měřit všechny druhy DNA nebo RNA, které jsou v konkrétním vzorku, pomocí sekvenačních technologií, které se dokonce díky rychlému poklesu nákladů staly cenově srovnatelné s mikročipy. Na rozdíl od DNA čipů není totiž sekvenování závislé na předchozí znalosti nukleových kyselin (Bumgarner, 2013).

6.6 CELOGENOMOVÁ ASOCIAČNÍ STUDIE (GWAS)

Celogenomové asociační studie se používají k vyhledávání kandidátních genů nebo genomových regionů, které se podílejí na specifickém onemocnění nebo vlastnostech. Genomové asociační studie byly umožněny díky dostupnosti čipových technologií (Illumina a Affymetrix) (Bush et al., 2012). Umožňují identifikaci jednonukleotidových polymorfismů spojených s velkým efektem genů, které například u hovězího skotu ovlivňují vlastnosti kvality masa. Jsou totiž významným nástrojem pro identifikaci genů způsobujících náchylnost k složitým poruchám. Tyto rysy a nemoci jsou označované jako „složité“ protože oba genetické a enviromentální faktory přispívají k riziku citlivosti (Lewis et al., 2012).

Význam genetické asociace může být vykládán jako:

1. Přímá asociace, ve které je genotypovaný SNP pravou příčinou fenotypu způsobující náchylnost k onemocnění, či přímo ovlivňuje danou vlastnost.
2. Nepřímá asociace, kdy vliv SNP není přímo kauzální, ale místo toho je SNP ve vysoké vazebné nerovnováze (LD) s kauzálním SNP v QTL oblasti, který souvisí s fenotypem (Bush et al., 2012).

Vazebná nerovnováha (LD) je vlastnost SNP na úseku genomové sekvence, která popisuje, do jaké míry jsou alely jednoho SNP dědičná nebo v korelaci s alelou jiného SNP v populaci (Bush et al., 2012).

3. Falešně pozitivní výsledek, který bývá obvykle matoucí a vede k další studii.

Rozlišení mezí přímou a nepřímou asociací je náročná a může vyžadovat opakovanou sekvenci kandidátních genů a všech dostupných polymorfismů s cílem potvrdit příčinu nemocí či vlastností (Lewis et al., 2012).

7 VYUŽITÍ GENETICKÝCH MARKERŮ K ZLEPŠOVÁNÍ KVALITY HOVĚZÍHO MASA

7.1 SELEKCE S PODPOROU MARKERŮ – MAS

Proces s využitím informací získaných od DNA markerů, předpovídají genetické hodnoty nejlepších zvířat, kteří mají být použiti jako rodiče příštích generací. Informace DNA markerů by měla přispět k zlepšení výběru a k zrychlení pokroku co se týče identifikace zvířat nesoucích žádoucí geny pro daný znak (Navajas, 2014).

Master Assisted Selection (MAS) se používá hlavně v situacích, kdy je přesnost selekce nízká, např. u znaků s nízkou dědivostí, při zjišťování odolnosti proti nemocem (drahé a nákladné testování), vlastnosti zjišťované v pozdějším věku (záznamy vlastností, které nebyly k dispozici v době selekce), vlastnosti po porážce apod. Selekce se používá k získání vysoké přesnosti výběru telat nebo časných embryí (Meuwissen, 2003).

Nedávný technologický pokrok v kombinaci se snížením nákladů vyvolal vyšší zájem o aplikaci MAS u hospodářských zvířat než v dřívějších letech. Úspěšná aplikace MAS vyžaduje pokrok v těchto 5 oblastech:

- Mapování genu – identifikace a mapování genů a genetických polymorfismů.
- Genotypizace markerů – genotypy velkého počtu jedinců pro velký počet markerů v rozumné cenové hladině, sloužící jak pro detekci QTL, tak pro aplikaci MAS.
- Detekce QTL – detekce a odhad identifikovaných genů a genetických markerů s ekonomickými znaky.
- Genetické hodnocení – integrace fenotypových dat ve statistických metodách pro odhad plemenné hodnoty jedinců v chovné populaci.
- MAS – vývoj šlechtitelských strategií a programů pro využití molekulárně genetické informace při selekci a rozmnožovacích programech.

(Dekkers et al., 2007)

Podle Meuwissen (2003) se systém MAS se skládá z následujících kroků:

- Je potřeba najít největší statisticky významné QTL v celém oskenovaném genomu;
- S ohledem na tyto významné QTL se dál provádí selekce polygenů (zbývající, často menší neoznačené geny).

Tyto polygeny nemůžou být ignorovány, protože tvoří velkou část celkové genetické rozdílnosti.

7.1.1 Detekce a typy markerů pro MAS

Podle Dekkers et al. (2007) byly vypozorovány 3 typy genetických lokusů:

- Přímé markery – lokus, pro nějž může být funkčním polymorfismem genotyp;
- LD-markery – lokus v celé populaci LD s funkční mutací;
- LE-markery – lokusy v celé populaci, které jsou ve vazebné rovnováze s funkční mutací. Mohou být použity pro detekci QTL a MAS na základě rodiny LD.

7.2 GENOMICKÁ SELEKCE – GS

GS je založena na předpovědi plemenných hodnot (GEBV – Genome-wide Predicted Breeding Values). Myšlenkou genomické selekce je vynechat velmi přísné testování pro detekci QTL a jednoduše odhadnout dopady všech genů, nebo chromozomálních poloh zároveň (Meuwissen et al., 2001).

Metodu genomické selekce poprvé navrhli Meuwissen et al. (2001). Ti vyvinuli analytický rámec pro výpočet celkových genomických hodnot udávaných v genomových mapách s vysokou hustotou markerů (Van der Beek, 2007).

Poslední vývoj v DNA technologiích vedly k detekci tisíců SNP, což umožnilo husté pokrytí genomu, za cenově přijatelné náklady genotypizace (Tabulka č. 5). Husté pole SNP čipů bylo vyvinuto pro mnoho druhů hospodářských zvířat, která jsou komerčně dostupná (Navajas, 2014).

Tabulka č. 5 SNP čipy k dispozici pro skot, prasata a ovce (Navajas, 2014)

Druh	Název produktu	Počet SNP	Společnost
Skot	BovineSNP50K	54 001	Illumina
	Bovine3K	2 900	Illumina
	BovineLD	6 090	Illumina
	BovineHD	777 962	Illumina
	Axiom Genome-Wide BOS 1 Array	648 855	Affymerix
Prase	PorcineSNP60	62 163	Illumina
Ovce	OvineSNP50	54 241	Illumina

Genomická selekce poskytuje jednotnou koncepci. Protože celý genom je analyzován současně, tak není potřeba znát QTL pro identifikaci genů (Van der Beek, 2007). Způsob předpokládá, že celý genom využívá všechny dostupné variace vazebné nerovnováhy kvantitativních znaků, k nimž je ve vazbě alespoň jeden marker (Goddard et al., 2007). Použití informace z markerových map je limitována vazbou mezi markery a QTL. Je potřeba, aby tato vazba byla stanovena pro celou rodinu, která se selektuje na základě genomické selekce (Meuwissen et al., 2001).

Přesnost odhadu genomické informace, která slouží k realizaci genomické selekce, závisí na velikosti a vzdálenosti LD mezi markery a QTL, na počtu fenotypů a genotypů v populaci, dědivosti sledovaných znaků a na distribuci QTL efektů.

Podle Navajas (2014) může být realizace genomické selekce definována ve dvou krocích:

1. SNP výsledky jsou odhadovány na tréninkové populaci, která zahrnuje zvířata s genomickými daty a rovněž informace o příslušných vlastnostech.
2. Použití odhadovaných výsledků, které předpovídají genomickou hodnotu plemenných zvířat.

Při použití genomové informace, je možné odhadnout genetickou hodnotu pouze ze vzorku DNA velmi mladých zvířat. Tyto informace umožňují dřívější rozhodování o výběru a možnost zvýšení počtu zvířat s informacemi o jejich přínosu, která bude mít pozitivní vliv na intenzitu selekce a zkrácení generačního intervalu (Navajas, 2014).

Genomická plemenná hodnota (GEBV) se vypočítá jako součet účinků velkého množství genetických markerů, nebo haplotypů těchto markerů v celém genomu, čímž se potenciálně zachytí všechny lokusy kvantitativních znaků, které se podílí k vývoji znaku (Hayes et al., 2009).

K přesnému stanovení efektů QTL je potřeba velkého počtu mapovaných jedinců populace se známým fenotypem. Podle Meuwissena et al. (2001) je přesnost genomické plemenné hodnoty pro vlastnost s dědivostí 0,5, při počtu 2000 jedinců, vyšší než při polovičním počtu jedinců. U vlastností s nižší dědivostí se předpokládá ještě větší počet genotypovaných jedinců.

7.3 GENOMOVÉ EDITOVÁNÍ

Editace genomu neboli editace genomu s upravenou nukleázou (GEEN) využívá k vložení, smazání nebo nahrazení DNA v živém organismu uměle naprogramované nukleázy, tzv. „molekulární nůžky“. V současnosti existují 4 druhy používaných nukleáz: meganukleázy, zincfinger nukleázy (ZFNs), transkripční aktivátor efektorových nukleáz (TALEN), metoda CRISPR (Elvidge, 2016, Meader et al., 2016).

7.3.1 Mechanismus editování genu

Endonukleázy jsou proteiny schopné rozpoznat specifické sekvence nukleotidů a následně štěpit obě vlákna DNA. Slouží k vytváření dvouřetězcových zlomů (DSBs) na určených místech v genomu, čímž vyvolávají přirozené endogenní procesy vedoucí k opravě zlomů. Zlomy jsou obvykle opravovány jedním ze dvou hlavních cest: homologní rekombinací (HR) nebo nehomologním spojováním volných konců (NHEJ) (Meader et al., 2016).

7.3.2 Typy nukleáz

Tyto nukleázy jsou univerzálně použitelné pro všechny typy buněk nebo organismů, které využívají metody k opravě DNA. V dnešní době existují čtyři hlavní nukleázy pro indukci specifických DSB.

Pro genetické modifikace zvířat určených pro produkci masa jsou rozhodující dvě věci. Zaprvé, aby byly prováděny pouze definované změny na specifických genetických lokusech. To je velice důležité proto, aby bylo zajištěno, že u zvířat dojde pouze k očekávanému fenotypu, bez žádných jiných změn, které by mohly vést k nežádoucím účinkům zdraví u spotřebitelů (např. produkce alergenů v důsledku náhodné genové fúzi nebo aktivaci genů neočekávanými způsoby). Druhé je efektivita a přesnost, se kterou mohou být tyto definované genetické změny zavedeny do genomu hospodářských zvířat. (Tan et al., 2012).

Existují 3 typy úprav genomů, které umožňují efektivní transgenezi u zvířat bez neočekávaných výsledků.

1. Přidání přesně definované sekvence, která bude zvířeti udělovat novou vlastnost. V tomhle případě není důležité aktuální umístění genu.
2. Úprava genu tak, že je gen buď inaktivován, nebo se převede na považovanou alelu.

3. Přidání genu do specifického místa v genomu pro expresi proteinu pod vedením původního genu, nebo umístění genu v místě předem určeným, aby byla umožněna účinná genová exprese (Tan et al., 2012).

7.3.3 Zinc Finger nukleázy

ZF nukleázy (ZFN) patří do třídy upravených proteinů vázajících DNA, které umožňují cílené úpravy genomu vytvořením dvouřetězcových zlomů v DNA na předem specifikovaných místech (Sigma-Aldrich, 2017). Tato třída nukleáz se ukázala být v posledních letech velmi univerzální a efektivní (Carrol, 2011).

Zinkové prsty byly poprvé popsány u žáby Drápatky vodní (*Xenopus leavis*). Nejužitečnější typ zinkového prstu je Cys2His2, ve kterém každá jednotka z 30 aminokyselin váže jeden atom zinku. Každý zinkový prst se skládá ze dvou funkčních domén. Jedná se o polypeptid skládající se z dvou antiparalelně orientovaných beta řetězců a jednoho alfa helixu. Cílová místa pro vazbu ZFN jsou tvořeny ze dvou vazebných míst, které jsou 5-7 bp dlouhou sekvencí, která je rozpoznávána štěpící doménou FokI. Výhodou je narušení nebo integrace jakéhokoliv genomického místa. Provedené mutace jsou trvalé a dědičné a dá se pracovat v různých savčích buňkách somatického typu (Carrol, 2011).

7.3.4 TALENs – Transcription activator like effectors

TAL efektorové nukleázy jsou tvořené DNA vazebnými motivy, které se nacházejí v proteinech sekretovaných rostlinnými patogeny bakterií rodu *Xanthomonas* (Tan et al., 2012). TAL efektory se specificky vážou na centrální sérii vazebných domén. Tyto domény obvykle obsahují 1,5 až 33,5 tandemových repetic a jejich délku tvoří 34 vysoce konzervovaných aminokyselin, kromě dvou aminokyselin v pozicích 12 a 13, které jsou pojmenované jako RVD (repeat-variable diresidues). RVD jsou zodpovědné za specifické rozpoznání dvouvláknové DNA nebo DNA.RNA hybridu. Pomocí experimentálních a bioinformačních výzkumů byly nalezeny RVD oblasti. RVD oblasti zahrnují NI (Asn a Ile), A (adenin), HD (His a Asp), T (thymin), MC (methylovaný cytosin), NH (Asn a His), G (guanin), NN (Asn a Asn) a NS (Asn a Ser) se specificitou pro všechny čtyři báze (A, T, C, G) (Deng et al., 2014).

TALE byly navrženy tak, že díky záměnám aminokyselin jsou schopné se vázat na téměř jakékoliv sekvence DNA organismů (Reyon et al., 2012). Podle Tana et al. (2012)

jsou tyto umělé TAL efektory zaměřeny na konkrétní místa DNA, která aktivují transkripci či regresi.

Jednoduchost návrhu TALEN vyvolává neočekávanou možnost, že by mohla být realizovatelná genová modifikace celého genomu, ale v současné době to není běžně dostupné, rentabilní a neexistuje metoda pro konstrukci. Ale i tak se jednoduchost jeví jako důležitá potencionální výhoda této technologie (Reyon et al., 2012). Díky snadné aplikaci této metody mají TALE nukleázy výhodu oproti ZFN.

7.3.5 Meganukleázy

Meganukleázy mohou být rozděleny do pěti rodin, a to na základě jejich sekvence a struktury. Patří sem rodiny jako LAGLIDADG, Gly-YIG, HNH, His-Cys a PD-(D/E)XK. Nejvíce prostudovanou rodinou je LAGLIDADG, která byla nalezena ve všech organismech. Obvykle je kódovaná v intronech nebo v inteinech (úsek uvnitř proteinu, který je schopný vlastní autokatalytickou aktivitu), ale existují i volně (Silva et al., 2011).

Byla stanovena hypotéza, že meganukleázy mají tzv. „životní cyklus“. Podle této hypotézy meganukleázy začínají jako „invazivní“ nukleázy, které jsou schopny mobilizovat vlastní kódující sekvenci, poté na „invazi“ získají aktivitu z RNA maturázy, aby zvládly sestřih jejich intronů. V průběhu doby se aktivita „invazivních“ nukleáz ztrácí a zanechává si pouze funkci RNA maturázy. V konečné fázi se už neuskutečňuje šíření intronu a intron je ztracen. (Silva et al., 2011). Tyto nukleázy jsou velmi přesné a účinné, i když jejich naprogramování je časově náročné. Nevýhodou je, že těchto nukleáz je známo poměrně málo, takže tím je snížený i počet cílových sekvencí.

7.3.6 CRISPR/ Cas systém

CRISPR systém byl objeven v bakteriích, kde systém funguje podobně jako u imunitního systému při boji proti invazi virů. Krátké úseky cizorodé DNA jsou začleněny do CRISPR lokusů v bakteriálním genomu a slouží jako „paměť“ předchozí infekce (yourgenome, 2016). Lokusy CRISPR jsou přepisovány a upravovány do crRNA. Během interference vytváří endonukleáza Cas9 komplex, který je řízený pomocí crRNA a tracrRNA (neboli trans-aktivační crRNA) ke štěpení specifických sekvencí cizorodé DNA (Richter et al. 2012). Vazebný účinek je založený na gRNA a tří nukleotidové sekvenci NGG zvané PAM sekvence. Pro genomové editování vyžaduje CRISPR systém minimálně Cas9 nukleázy a gRNA. Výhodou používání CRISPR je rychlá a nákladově efektivní editace genomu různých organismů (yourgenome, 2016).

8 ZÁVĚR

Maso je důležitou složkou potravy člověka. Jeho kvalita je pro spotřebitele velmi důležitá, proto se věnuje velká pozornost právě šlechtění plemen s výbornou zmasilostí a vysokým podílem intramuskulárního tuku, který masu dodává tu správnou chuť. Křehkost a mramorování jsou významnými ukazateli kvality masa. I když jsou tyto vlastnosti považovány jako kvantitativní, jsou prokázány průkazné asociace genů s kvalitou masa. Senzorické vlastnosti mají nízkou heritabilitu a tím jsou hůř vyhodnotitelné a geneticky zlepšovatelné. Proto je potřeba vzít v úvahu vliv prostředí, výživu, technologii zpracování, dobu zrání masa apod.

Bakalářská práce je zaměřena na vybrané geny a jejich polymorfismy, jejíž vliv na kvalitu masa byl prokázaný v asociačních studiích. Z ekonomického hlediska jsou považovány za důležité rysy produkce masa rychlost růstu a množství libového masa. Pro tyto vlastnosti byly vybrány geny *MYOD* rodiny, *IGF* rodiny a gen myostatinu. *MYOD* rodina je tvořena čtyřmi geny: *MYF3*, *MYOG*, *MYF5*, *MYF6*. Tyto geny se podílejí na tvorbě svalových vláken, a to hlavně v embryonálním stádiu. *IGF* rodina zahrnuje gen *IGF1* a *IGF2* jejichž funkcí je proliferace a diferenciace myogenních buněk taktéž v embryonálním stádiu. Gen myostatin má opačnou funkci, takže zamezuje tvorbě svalových buněk v embryonálním i celém vývoji. Je prokázáno, že má vliv na onemocnění zvané dvojí osvalení, kterým trpí hlavně piemont a belgický modrý skot.

Za kandidátní geny pro mramorování jsou považovány geny *DGAT1, TG* a leptinu. U genu *DGAT1* byly nalezeny dva polymorfismy související s ukládáním tuku v mase. V *TG* genu bylo zjištěna příznivá alela *T*, která ovlivňuje vyšší mramorování. Nejvyšší frekvence *T* alely je u skotu wagyu, jehož maso obsahuje kolem 40-50 % intramuskulárního tuku. Dále byly nalezeny další 4 polymorfismy, které sice měly vliv na živou hmotnost, ale nebyl prokázán vliv na mramorování. Leptin je považován za regulátor příjmu potravy a tím se podílí na ukládání tuků v mase.

Křehkost masa je velmi složitá na hodnocení, protože na ní působí spoustu jiných vlivů. Nejvýznamnějším faktorem je posmrtná proteolýza, za kterou odpovídají geny *CAPN1* a jeho inhibitor *CAST*.

Další část práce se zabývá aktuálními molekulárními metodami, kterými je možno určité geny detekovat a podle nichž lze selektovat jedince s vysokou genetickou predispozicí. Ke šlechtění a zlepšení výběru zvířat s nejlepší genetickou hodnotou se

používá selekce s podporou markerů (MAS) a genomická selekce (GS). MAS je používaná u znaků s nízkou dědivostí a k získání vysoké přesnosti při výběru. Myšlenkou GS je naopak vynechat přísné testování jednotlivých genetických markerů pro detekci QTL a odhadnout účinky tisíce genetických markerů (SNP) a QTL celého genomu zároveň. Díky analýze celého genomu současně není potřeba znát individuální efekt QTL pro detekci genu, a tudíž poskytuje jednotnou koncepci založenou na využívání reálné celogenomové variability pro odhad genomické plemenné hodnoty. V současnosti se díky novým technologiím a osekvenování celého genomu skotu spíše využívá genomická selekce u dojeného skotu i v ČR a v zahraničí i u masného skotu.

9 SEZNAM ZKRATEK

QTL – Lokus kvantitativních znaků

ETL – Economic Trait Loci – Lokus ekonomických znaků

KG – Kandidátní gen

SNP (Single nucleotide polymorphism) – Jednonukleotidový polymorfismus

GS – Genomic Selection – Genomická selekce

MAS – Marker Assisted Selection – Selekce s podporou markerů

GEBV – Genomic Breeding Value – Genomická plemená hodnota

DSBs – Double-Stranded Breaks – Dvouřetězcové zlomy

HDR – Homology directed repair – Homologní přímá oprava

ssODNs – Jednovláknové oligonukleotidy

bHLH – Základní helix-loop-helix

TG – Thyroglobulin gen

LEP – Leptin gen

IMF – (Intramuscular fat) - Intramuskulární tuk

LW – (Live weight) – Živá hmotnost

LMA – Svalovina bederní oblasti

GWAS – (Genome-Wide association studies) – Celogenomová asociační studie

HR – Homologní rekombinace

NHEJ – Nehomologní spojení volných konců

PAM – (Protospacer adjacent motif) – PAM sekvence

10 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Abm (2017): *Polymerase Chain Reaction (PCR) – An Introduction*. [online] (cit. 3. 4. 2017). Dostupné z: https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/polymerase_chain_reaction_introduction.php

American meat science association (2015): *What is marbling?* [online] (cit. 1. 3. 2017). Dostupné z: http://www.meatscience.org/students/meat-judging-program/meat-judging-news/article/2015/11/28/what-is-marbling

Bartoň L., D. Bureš, T. Kott, D. Řehák (2016): Associations of polymorphisms in bovine *DGAT1*, *FABP4*, *FASN*, and *PPARGC1A* genes with intramuscular fat content and the fatty acid composition of mucsle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Science* 114 (2016): 18–23. doi: 10.1016/j.meatsci.2015.12.004

Beermann D.H. (2014): *Growth of Meat Animals – Endocrinology*. In: Dikeman M., Carrick D. (2014): *Encyklopedia of Meat Sciences*. 1st and 2nd Ed, 1697 s. ISBN: 978-0-12-384731-7

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 (2009) 292–297. doi: 10.1016/j.livsci.2009.05.019.

Bishop M.D., Kappes M.S., Keele W.J., Stone T.R., Sunden L.F.S., Hawkins A.G., Toldo S.S., Fries R., Grosz M. D., Yoo J., Beattie C.W. (1994): A Genetic Linkage Map fot Cattle, *Genetics*, 136, 619-639

Bumgarner R. (2013): DNA microarrays: Types, Applications and their future. *Curr Protoc Mol Biol*. 2013 Jan; 0 22: Unit–22.1. doi: 10.1002/0471142727.mb2201s101

Bush S.W., Moore J.H. (2012): Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Comput. Biology* 8(12): e1002822. doi: 10.1371/journal.pcbi.100282

Calvo J.H., Iguácel L.P., Kirinus J.K., Serrano M., Rippol G., Casasús I., Joy M., Peréz-Velasco L., Sarto P., Albertí P., Blanco M. (2014): A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin (CAST) gene associated with beef tenderness. *Meat Science* 96 (2014) 775–782. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.10.003

Carroll D. (2011): Genome Engineering With Zinc-Finger Nucleases. *Genetics*. 2011 Aug; 188(4): 773–782. doi: 10.1534/genetics.111.131433

Corva P.M., Macedo F.G.V., Soria L.A., Mazzucco J.P., Motter M., Villarreal E.L., Schor A., Mezzadra C.A., Melucci L.M., Miquel M.C. (2009): Effect of leptin gene polymorphism on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. *Genet Mol Res.* 2009 Feb 3;8(1):105-16.

Demeyer D. (2002): *Quality control of fermented meat products*. In: Kerry J., Kerry J., Ledward D. (2002): *Meat processing improving quality*. 475 s. ISBN: 1 85573 666 7 (e-book)

Deng D., Yan Ch., Wu J., Pan X., Yan N. (2014): Revisiting the TALE repeat. *Protein Cell* 2014, 5(4):297. doi: 10.1007/s13238-014-0035-2

Du X.H., Gan Q.F., Yuan Z.R., Gao X., Zhang L.P., Gao H.J., Li J.Y., Xu S.Z. (2013): Polymorphism of MyoD1 and Myf6 genes and associations with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Genetics Molecular Research* 2013 Dec 13;12(4):6708-17. doi: 10.4238/2013.December.13.4.

Elvidge K., PhD (2016): *Genome editing shows promise as Duchenne therapy*. [online] (cit. 11. 1. 2017). Dostupné z: https://www.duchennefoundation.org.au/newsroom/research-news/genome-editing-shows-promise-duchenne-therapy/

Ensembl.org (2017). *Cow assembly and gene annotation*. [online] Ensembl.org (cit. 10. 4. 2017). Dostupé z: http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Annotation

Garibyan L., Avashia N. (2013): Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. March 2013, Pages 1–4. doi:10.1038/jid.2013.1

Goddard M. E., Hayes B. J. (2007): Genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 2007 Dec;124(6):323-30., doi: 10.1111/j.1439-0388.2007.00702.x

Guimaraes E.P., Ruane J., Scherf B.D., Sonnino A., Dargie J.D. (2007): *Marker-Assisted Selection – Current status and future perspectives in crop, livestock, forestry and fish.* 168-228 s. ISBN 978-92-5-105717-9

Hayes B.J., Bowman P.J., Chamberlain A.J., Goddard M.E. (2009): Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges, *Journal of Dairy Science.* 2009 Feb;92(2):433-43. doi: 10.3168/jds.2008-1646.

Huang Y.Z., Zhan Z.Y., Li X.Y., Wu S.R., Sun Y.J., Xue j., Lan X.Y., Lei C.Z., Zhang C.L., Jia Y.T., Chen H. (2014): SNP and haplotype analysis reveal IGF2 variants associated with growth traits in Chinese Qinchuan cattle. *Molecular Biology Reports* 2014 Feb;41(2):591-8. doi: 10.1007/s11033-013-2896-5.

Cheng W., Cheng J.H., Sun D.W., Pu H. (2015): Marbling Analysis for Evaluating Meat Quality: Methods and Techniques. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. Vol.14,2015. doi: 10.1111/1541-4337.12149

Cheong S.H., Yoon D.H., Park L.B., Kim H.L., Bae S.J., Namgoong S., Lee H.W., Han S.Ch., Kim J.O., Cheong I.Ch., Shin D.H. (2008): A single nucleotide polymorphism in CAPN1 associated with marbling score in Korean cattle. *BMC Genetics*. 2008, doi: 10.1186/1471-2156-9-33.

Illumina.com (2010): *Revolutionizing genetics in the cattle industry*. [online] (cit. 12. 3. 2017). Dostupné z: https://www.illumina.com/Documents/products/brochures/BovineProductBrochure.pdf

Knoll A. a Vykoukalová Z. (2002): *Molekulární genetika zvířat*. MZLU v Brně, 168 s. ISBN: 80-7157-616-6

Kubiak J.E., Flisikowski K., Wicin´ska K., Połoszynowicz J., Rosochacki S. (2009): Identification of the new polymorphisms in the promoter region of the CAST gene in cattle. *Meat Science* 82 (2009) 278–283. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.01.001

Lawrie R.A., Ledward D.A. (2006): *Lawrie´s meat science*. Seventh edition. ISBN: 978-1-84569-159-2

Lazzaroni C., Gigli S., Gabina D. (2007): *Evaluation of carcass and meat quality in cattle and sheep*. ISBN: 978-90-8686-022-7

Leveau C. (2008): Candidate genes for beef quality – allele frequencies in Swedish beef cattle. *Department of Animal Breeding and Genetics Department of Food Science* PDF

Lewis M.C., Knight J. (2012): Introduction to Genetic Association Studies. *Cold Spring Harbor Protocols*; 2012; doi:10.1101/pdb.top068163

Li X., Ekerljung M., Lundström K., Lundén A. (2013): Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1, and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat Science* 2013 Jun;94(2):153-8. doi: 10.1016/j.meatsci.2013.01.010.

Lonergan H.E., Lonergan S.M. (2005): Mechanism od water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*.Volume 71, Issue 1, September 2005, Pages 194–204, doi: 10.1016/j.meatsci.2005.04.022

Maeder M.L., Gersbach Ch. A. (2016): *Genome-editing Technologies for Gene and Cell Therapy*. *Molecular Therapy* 2016 Mar; 24(3): 430–446. doi: 10.1038/mt.2016.10.

Massey J.W., Vogt D.W. (1993): *Heritability and Its Use in Animal Breeding.* [online] (cit. 25. 3. 2017). Dostupné z: http://extension.missouri.edu/p/G2910

Mateescu R.G. (2015): *Genetics of Meat Quality*. In: Garrick D.J., Ruvinsky A. (2015): *The Genetics of Cattle.* Cabi; 2nd Edn, 640 s. ISBN: 1780642210, PDF

Meuwissen T.H.E. (2003): *Genomic Selection: The future of marker assisted selection and animal breeding.* [online] (cit. 10. 1. 2017). Dostupné z: http://www.fao.org/biotech/docs/Meuwissen.pdf

Meuwissen T.H.E., Goddard M.E., Hayes B.J. (2001): Prediction of Total Genetic Value Using Genome – Wide Dense Marker Maps. *Genetics*. 2001 Apr; 157(4): 1819–1829. [online] (cit. 10. 1. 2017). Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461589/pdf/11290733.pdf

Navajas E.A. (2014): *Animal Breeding and Genetics – DNA Markers and Marker-Assisted Selection in Genomic Era*. In: Dikeman M., Carrick D. (2014): *Encyklopedia of Meat Sciences*. 1st and 2nd Ed, 1697 s. ISBN: 978-0-12-384731-7

NCBI (2017a): National Center for Biotechnology Information. [online] (cit. 15. 3. 2017). Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov

NCBI (2017b): *Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP).* [online] (cit. 20. 3. 2017). Dostupné z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml

Pereira A.P., Alencar M.M., Oliviera H.N., Correia L., Regitano A. (2005): Association of GH and IGF-1polymorphisms with growth traitsin a synthetic beef cattle breed. *Genetics and Molecular Biology*, 28, 2, 230-236 (2005). doi: 10.1590/S1415-47572005000200009

Reyna X.F.R., Montoya H.M., Castrellón V.V., Rincón A.M.S., Bracamonte M.P., Vera W.A. (2010): Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genet. Mol. Res*. 9 (2): 875-883 (2010). doi: 10.4238/vol9-2gmr745

Reyon D., Tsai Q.S., Khayter C., Foden A.J., Sander D.J., Joung J.K. (2012): FLASH Assembly of TALENs Enables High-Throughput Genome Editing. *Nat Biotechnol*. 2012 May; 30(5): 460–465. doi: 10.1038/nbt.2170

Richter C., Chang J.T., Fineran C. (2012): Function and Regulation of Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / CRISPR Associated (Cas) Systems. *Viruses* 2012, *4*(10), 2291-2311; doi:10.3390/v4102291

Ruvinsky A. (2015): Developmental Genetics. In: Garrick D.J., Ruvinsky A. (2015): *The Genetics of Cattle*. Cabi; 2nd Edn, 640 s. ISBN: 1780642210, PDF

Sigma-Aldrich (2017): *What Is ZNF Technology?* [online] (cit. 29. 3. 2017). Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/life-science/zinc-finger-nuclease-technology/learning-center/what-is-zfn.html

Silva G., Poirot L., Galleto R., Smith Ju., Montoya G., Duchateau P., Paques F. (2011): Meganucleases and Other Tools for Targered Genome Engineering: Perspectives and Challenges fot Gene Therapy. *Current Gene Therapy* 2011 Feb; 11(1): 11–27. doi: 10.2174/156652311794520111.

Simon M.R., Korn E.L., McShane L.M., Radmacher M.D., Wright G.W., Zhao Y. (2003): *Design and Analysis od DNA Microarray Investigation*. ISBN 978-0-387-21866-3

Soria L.A., Corva P.M., Huguet M.J., Miño S., Miqual M.C. (2010): Bovine μ-calpain (CAPN1) gene polymorphism in Brangus and Brahman Bulls. *Journal of Basic & Applied Genetics*, (2010) 21 (1): 61-69. ISSN: BAG 1666-0390.

Steinhauser L. a kol (2000): *Produkce masa*. 460 s., ISBN: 80-900260-7-9

Swatland H.J. (2002): *On-line monitoring of meat quality*. In: Kerry J., Kerry J., Ledward D. (2002): *Meat processing improving quality*. 475 s. ISBN: 1 85573 666 7 (e-book)

Syrůček J., Prokůpková L., Kouřimská L., (2015): *Výroba a kvalita masa v ČR*. ISSN: 0027-8068

Tan S.W., Carlson D.F., Walton M.W., Fahrenkrug S.C., Hackett P.B. (2012): Precision Editing of Large Animals Genomes. *Adv Genet*. 2012; 80: 37–97. doi: 10.1016/B978-0-12-404742-6.00002-8.

Thu T.N.D. (2006): Meat quality: understanding of meat tenderness and influence of fat content on meat flavour. *Science & Technology Development*. Vol 9, No.12–2006. doi:10.1.1.566.3810

Tume R.K. (2014): *Human Nutrition – Macronutrients in Meat.* In: Dikeman M., Carrick D. (2014): *Encyklopedia of Meat Sciences*. 1st and 2nd Ed, 1697 s. ISBN: 978-0-12-384731-7

Van der Beek S. (2007): *Effect of Genomic Selection on National and International Genetic Evaluations*. *Journal Interbull*. 115-118 s.

Wagyu (2017): *American Wagyu Association*. [online] (cit. 20. 3. 2017). Dostupné z: http://wagyu.org/

Wheeler, T.L., Cundiff, L.V., Shackleford, S.D., Koohmaraie, M. (2005): *Characterization of biological types of cattle (Cycle VII)*: *carcass, yield and longissimus palatability traits.* J. Anim. Sci. 83:196-207.

Yourgenome (2016): *What is CRISPR-Cas9?* [online] (cit. 5. 4. 2017). Dostupné z: http://www.yourgenome.org/facts/what-is-crispr-cas9

Yourgenome.org (2016): *What is PCR (polymerase chain reaction)?* [online] (cit. 3. 4. 2017). Dostupné z: http://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction

Zhang L.P., Gan Q.F., Hou G.Y., Gao H.J., Li J.Y., Xu S.Z. (2015): Investigation of TG gene variants, and meat quality traits in Chinese steers. *Genetics and Molecular Research.* 14 (2): 5320-5326 (2015). doi: 10.4238/2015.May.22.2

Zhou J., Thompson K.D., Xu Y., Tiedje J.M. (2004): *Microbial functional genomics.* 141-147 s., ISBN: 0-471-07190-0

Zimin V.A., Delcher A.L., Florea L., Kelley R.D., Schatz M.C., Puiu D., Hanrahan F., Pertea G., Tassell P.C., Sonstegard T.S., Marcais G., Roberts M., Subramanian P., Yorke J.A., Salzberg L.S. (2009): A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus. Genome Biology*, doi:10.1186/gb-2009-10-4-r42