

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH**

ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: Zemědělství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Vedoucí katedry: prof. Ing Vladislav Čurn, Ph.D.

Bakalářská práce

Genotypizace lokusu *CSN1S1* a jeho asociační analýza

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing Jindřich Čítek, CSc.

Autor bakalářské práce: Václav Brabec

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

Datum:

Podpis studenta:

Poděkování

Rád bych poděkoval mému vedoucímu práce prof. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc., za odborné vedení a poskytování rad během zpracování práce. Dále bych chtěl poděkovat Ing. Ireně Hoštičkové, Ph.D., za pomoc při práci v laboratoři a její cenné rady. A také Ing. Michaele Brzákové, Ph.D., z VÚŽV Uhřetěves, za pomoc při zpracování výsledků a statistických údajů. Rád bych také poděkoval rodině za její podporu během mého bakalářského studia.

Abstrakt

Cílem práce bylo provedení genotypizace polymorfního lokusu *CSN1S1*, u kterého dochází na exonu XVII v pozici 192 aminokyseliny výsledného proteinu k tranzici A/G. Výsledkem substituce je zaměnění aminokyseliny glycinu za glutamin a vytvoření dvou polymorfních variant, *B* a *C*. Druhým cílem bylo vyhodnocení těchto alel ve vztahu k vlastnostem mléčné užitkovosti, znaků produkce a technologické jakosti mléka. Analýza byla provedena u 234 vzorků dojníc holštýnsko-fríského skotu a českého strakatého skotu, které byly odebrány ve vybraných farmových chovech v Jihočeském kraji. Pro genotypizaci byly použity metody jako PCR a RFLP, pro detekci výsledných genotypů byla použita restriční endonukleáza *HphI*. Následná vizualizace fragmentů proběhla na agarózovém gelu. Genotypy byly nalezeny dva, a to genotyp *BB* a *BC*. Byly sestaveny výsledné frekvence v populaci ze stanovených genotypů $BB=0,888$, $BC=0,112$. Asociační analýza byla vyhodnocena pomocí SAS analytics software. Významný vliv lokusu na sledované vlastnosti nebyl nalezen.

Klíčová slova:

Mléko, mléčné proteiny, genetický polymorfismus, alfa s1 kasein, *CSN1S1*

Summary

The first aim of this work was to genotype polymorphism locus *CSN1S1*. This gene contains a transition in the exon XVII. This transition changes glycine to glutamine in the position 192 of the final protein chain. This substitution creates two polymorphism variants of this gene: variant *B* and *C*. In our study, two genotypes *BB* and *BC* were observed. The second aim of this work was evaluation of the relationship among observed genotypes and milk properties and technological milk traits, e.g. curd firmness. The analysis was performed on 234 samples from Holstein Friesian cattle and Czech fleckvieh cattle sampled on farms in the South Bohemia. Genotyping was performed using molecular biology techniques PCR and RFLP. Restriction endonuclease *HpHI* was used for RFLP. Fragments were visualized on agarose gel. In our monitored population the frequencies of the genotypes *BB* and *BC* were 0,888 and 0,112. Association analysis was performed using SAS analytics software. Provable influence of the *CSN1S1* locus polymorphism on studied traits was not observed.

Key words:

Milk, milk proteins, gene polymorphism, alpha-s1 casein, *CSN1S1*

Obsah:

1 Úvod	8
2 Literární přehled	9
2.1 Mléčná užitkovost.....	9
2.1.1 Mléčná žláza.....	9
2.1.2 Laktace.....	10
2.2 Složení mléka	11
2.2.1 Laktóza.....	12
2.2.2 Lipidy	12
2.2.3 Proteiny	13
2.3 Technologické vlastnosti mléka	13
2.3.1 Vliv genetických vlastností na syřitelnost mléka	14
2.4 Genom skotu.....	14
2.5 Genetické markery	16
2.5.1. Rozdělení markerů dle využití při mapování genomu	16
2.5.2 Genetické markery ve šlechtitelském programu dojného skotu	17
2.6. Geny kódující mléčné bílkoviny.....	20
2.6.1 Vliv polymorfismu mléčných genů na vlastnosti mléka	20
2.7. Komplex kaseinových genů	21
2.7.1 Gen α S2-kasein (<i>CSN1S2</i>).....	21
2.7.2 Gen β -kasein (<i>CSN2</i>).....	22
2.7.3 Gen κ -kasein (<i>CSN3</i>).....	23
2.7.4 Gen α -s1 kasein (<i>CSN1S1</i>)	24
3. Metodika	26
3.1 Cíl práce	26
3.2 Materiál	26

3.3 Laboratorní metody.....	26
3.3.1 Izolace DNA	26
3.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)	27
3.3.3 Nested polymerase chain reaction (nested-PCR).....	27
3.3.4 Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)	28
3.3.5 Metody pro zjištění mléčné užitkovosti a kvantitativních parametrů mléka	29
3.4 Statistické vyhodnocení	30
3.4.1 Modely rovnic	31
4. Výsledky a diskuze.....	34
4.1. Výsledky genotypizace	34
4.2. Genotypové a alelické frekvence	34
4.3 Vliv genotypu alfa s-1 kaseinu na mléčnou užitkovost a složení mléka ...	37
4.4 Vliv genotypu alfa s-1 kaseinu na technologické vlastnosti mléka	39
4.5 Vliv interkace genotyp x plemeno na mléčnou užitkovost	41
4.6 Vliv interakce genotyp x plemeno na technologické vlastnosti mléka	42
4.7 Vliv interakce genotyp x farma na sledované vlastnosti mléka	43
5. Závěr	44
6. Seznam zkratk.....	45
7. Citovaná literatura	46

1. Úvod

Kravné mléko je jeden ze základních pilířů výživy člověka, především zejména u Evropanů a jim příbuzných etnických skupin, kterým se vlivem evoluce zachovala schopnost syntézy enzymu laktázy i v pokročilém věku. Mléko se zpracovává na celou řadu mléčných výrobků po celém světě, především na sýry, které v posledních desetiletích tvoří hlavní cíl pro zpracování mléka. Kvůli celosvětově se zvyšující produkci mléka vznikají studie pro šlechtění dojníc, jak na vyšší výtěžek mléka, tak na jeho složení a faktory ovlivňující jeho následné zpracování.

Vlastnosti genů mléčných proteinů jsou zkoumány z mnoha důvodů. Především pro jejich vliv na výsledné složení proteinů v mléku, tak pro odlišné technologické vlastnosti mléka při jeho dalším zpracování. Polymorfismy, které uvedené změny v těchto genech způsobují, mohou být určitým vodítkem při zkoumání jejich výsledného vlivu. Proto se řada studií zaměřuje na polymorfnní varianty genů kódující mléčné proteiny a sledují jejich korelaci s výslednými vlastnostmi mléka. Některé studie uvádějí, že obzvláště jednotlivé alely u genů *CSN2* a *CSN3* mají značný vliv na složení mléčných proteinů.

V různých studiích se uvádí o možném vlivu genotypů polymorfnního genu *CSN1S1* ve vztahu především k syřitelnosti mléka a jeho odlišnému složení mezi jednotlivými genotypy *CSN1S1* genu.

2 Literární přehled

2.1 Mléčná užitkovost

Mléčná užitkovost se u skotu zařazuje mezi důležité užitkové vlastnosti. Skot dokáže přijaté živiny v krmivu přetvářet na mléčnou bílkovinu dvakrát až dvaapůlkrát účinněji než na maso (Skládanka *et al.*, 2014). Mléko se tvoří v žláznatých buňkách mléčné žlázy ze živin, které jsou do buněk přiváděny krví. Složení kravského mléka a jeho množství během laktace ovlivňuje mnoho faktorů prostředí jako plemeno, výživa, reprodukční cyklus, věk dojnice, technologie chovu, způsob dojení atp. (Matoušek *et al.*, 1996)

Mléčná užitkovost je ovlivňována prostředím, zejména výživou a dědičným založením dojnice. Produkce mléka se ale vyznačuje poměrně malou dědivostí ($h^2 = 0,2-0,3$). Proto je z hlediska rentability chovu dobré zajistit vhodné podmínky prostředí (Matoušek *et al.*, 1996). Produkce mléka je výsledkem činnosti celého organismu dojnice. Je to velice komplexní fyziologická vlastnost, která je závislá na stupni vývoje trávicí, oběhové, nervové a dýchací soustavy, ale také na fázi vývoje žláz s vnitřní sekrecí, především pohlavních žláz (Urban *et al.*, 1997).

2.1.1 Mléčná žláza

Mléčná žláza neboli vemeno bylo šlechtěním značně vyšlechtěno ve statný orgán, který u mléčných plemen dosahuje hmotnosti 20-25kg. Mléčná žláza krávy se nachází na spodině břicha ve stydké krajině a svým kraniálním koncem zasahuje až k pupku, kaudálně poté do mezinoží. V mediánní rovině je vemeno rozděleno mezivemennou brázdou na levou a pravou polovinu. Tyto dvě poloviny jsou poté rozděleny na přední a zadní čtvrtky ventrálně zakončené struky (Marvan *et al.*, 2017).

Veškeré mléko z jednoho struku je vytvářeno v jedné čtvrti vemene. Mléčná žláza je složena ze žláznatého parenchymu a závěsného aparátu (Urban *et al.*, 1997). Žlázový parenchym je složen z početného množství nepatrných lalůčku-lobulů, které jsou

spojeny k sobě intersticiálním vazivem a spolu tvoří žláznaté těleso. Základní jednotkou žláznatého tělesa jsou sekreční alveoly, ve kterých se tvoří sekret - mléko. Během laktace je množství alveolů zvýšené. V 1cm³ žláznatého tělesa se může nacházet až 800 000 těchto alveolů (Marvan *et al.*, 2017). V alveolárních buňkách probíhají složité biochemické procesy, kterých se účastní řada různých enzymů. Důležité látky pro tvorbu mléka jsou prekurzory, které se převážně tvoří mimo mléčnou žlázu, především v játrech ze živin z trávicího ústrojí. Tyto prekurzory jsou poté pomocí krve přiváděny do mléčné žlázy, kde slouží k syntéze mléka (Jelínek *et al.*, 2003).

Mléko z alveolů vyúsťuje do nitrolalúčkového vývodu, který dopravuje mléko do mlékojemu uprostřed žlázy, a poté do mlékojemu uvnitř struku. Ze struku mléko vychází strukovým kanálkem, který je uzavřen strukovým svěračem (Urban *et al.*, 1997). Mléko se ve vemeni vytváří kontinuálně, avšak s různou dynamičností. Nejvíce intenzivní tvorba probíhá po vydojení, kdy klesá vnitrovemenní tlak. Postupujícím naplňováním mléka ve vemeni se vnitrovemenní tlak zvyšuje, tím se zároveň snižuje přítok krve k alveolárním buňkám a tvorba mléka klesá (Skládanka *et al.*, 2014).

2.1.2 Laktace

Laktace je fyziologický proces pro tvorbu a vylučování mléka. Tyto funkce mléčné žlázy spolu těsně souvisí a na sebe navazují, vzájemně se ovlivňují a tvoří základ schopnosti produkce mléka mléčnou žlázou. Laktací se rovněž rozumí období, během kterého zvířata produkují mléko, tj, od období porodu do zaprahnutí. Tedy do časového období kdy ustane sekrece mléka (Jelínek *et al.*, 2003).

Počáteční délka laktace byla krátká z důvodu výživy pouze narozených mláďat. Avšak s postupnou selekcí a genetickým zušlechťováním se podařilo mléčnou výtěžnost zvýšit a laktaci prodloužit až do rozmezí, kdy mnohonásobně překračuje potřeby telete. Tímto krokem bylo umožněno využít množství takto získaného mléka jako potraviny pro lidskou výživu. (Skládanka *et al.*, 2014). První stádium laktace se nazývá laktogeneze a probíhá těsně před a po porodu. Druhé stádium je laktopoeza, která následuje po laktogenezi až do ukončení laktace. (Jelínek, *et al.*, 2003) Laktogenezi se rozumí proces, při kterém alveolární buňky získávají způsobilost syntetizovat a vylučovat mléko. Dělí se na dvě fáze.

V první fázi dochází ke zvyšování aktivity enzymů v mléčné žláze a diferenciaci buněčných organel. Tato fáze se děje před porodem a způsobuje omezenou sekreci mléka. Během druhé fáze dochází k značné sekreci veškerých složek mléka, probíhá těsně před porodem. V této fázi vzniká mlezivo a jeho sekrece pokračuje několik dnů po porodu (Reece *et al.*, 2011).

Mlezivo bývá označováno jako počáteční sekret po porodu, který dojnice produkuje maximálně 6 dní. Liší se jak fyzikálními, chemickými tak i senzoryckými vlastnostmi. Neoznačuje se za mléko a nevyužívá se pro lidskou výživu. Mlezivo je bohaté zejména na proteiny, zvláště na imunoglobuliny, které jsou nepostradatelné pro tele a zajišťují jeho pasivní imunitu. Rozdíl mezi mlezivem a mlékem je i ve vyšší koncentraci karotenu, riboflavinu a vitaminů A a E (Urban *et al.*, 1997).

2.2 Složení mléka

Mléko je dobrým zdrojem bílkovin s vysokou nutriční schopností. Stejně tak tuku, který slouží jako dobrý zdroj energie a esenciálních minerálů a vitamínů (Mullie *et al.*, 2016). Základní složení mléka je dáno obsahem vody, sacharidů, lipidů, proteinů a minerálů. Obsah vody se určuje jako rozdíl hmotnosti celého objemu mléka před a po vysušení. Obsah sacharidů v mléce se nejčastěji vyjadřuje jako obsah samotné laktózy, ale další sacharidy mohou být také zahrnuty. Obsah tuku a proteinů se v mléce stanovuje pomocí standardizovaných metod. V mléce se uvádí procentuálně obsah vody a pevná složka, která se nazývá sušina, tu tvoří souhrn sacharidů, tuků, bílkovin a popelovin (Reece *et al.*, 2011).

U člověka zajistí jeden litr kravského mléka denní potřebu tuků, esenciálních aminokyselin, vápníku, fosforu a mikroelementů, polovinu denní potřeby bílkovin a více než jednu třetinu vitamínů A, C, D a jednu čtvrtinu denní potřeby energie (Jelínek *et al.*, 2003). Mléko je také značným zdrojem vápníku a hořčíku, které zhruba obsahuje v poměru 10:1 (124,2 mg vápníku a 9,9mg hořčíku na 100g mléka) (Hanuš *et al.*, 2008). Hlavní role vápníku v organismu je, že napomáhá normálnímu růstu a vývoji kostí, hořčík se zase účastní spousty biochemických reakcí v celém organismu (Cashman *et al.*, 2006). Kravské mléko zařazujeme mezi kaseinová, obsah kaseinu jakožto hlavní bílkoviny je vyšší než 75 %. Do kaseinových mlék se zařazují další mléka přežvýkavců, jako koza nebo ovce. Mléka, která mají hodnotu kaseinu pod 75 %, se označují jako albuminová (Strapák *et al.*, 2013). Složení mléka

ovlivňuje velká řada faktorů jako je stupeň laktace, věk dojnice, výživa, genetické založení, zdravotní stav mléčné žlázy, proto je zastoupení mléčných složek značně flexibilní (Caroli *et al.*, 2009).

Tabulka 1: Složení kravského mléka (Davis *et al.*, 1998)

Voda	87,5 %
Sušina:	12,5 %
Tuk	3,8 %
Bílkoviny	3,3 %
-kasein	2,5 %
-albumin	0,5 %
Imunoglobuliny	0,9 %
Laktóza	4,7 %
Minerální látky	0,7 %

2.2.1 Laktóza

Laktóza, také mléčný cukr, je disacharid tvořený monosacharidy galaktózou a glukózou. V mléce savců zastupuje zdroj snadno využitelné energie. Její sladivost je pouze čtyřicet procent ve srovnání se sacharózou (Kalač *et al.*, 2001). Laktóza se tvoří během laktace v mléčné žláze. Malé množství se však může nacházet i v krevní plazmě (Reece *et al.*, 2011). Syntéza probíhá v epitelových buňkách mléčné žlázy, jako prekurzor laktózy slouží převážně glukóza, ale také glycerol a těkavé mastné kyseliny. Laktóza je jedna z nejméně stabilních složek mléka. Je to aktivní látka, která napomáhá udržování stálého osmotického tlaku mléka (Jelínek *et al.*, 2003).

2.2.2 Lipidy

Lipidy v mléce neboli mléčný tuk se nachází v mléce v emulgovaném stavu a je rozdílný od tuku krevní plazmy. Až sedmdesát pět procent mléčného tuku je syntetizováno v mléčné žláze. Mléčný tuk vzniká z prekurzorů tuku přiváděných krví, jak z krmiva, tak ze zásobních tuků uložených v játrech a tukové tkáni (Jelínek *et al.*, 2003). Lipidy obsažené v mléce se skládají převážně z triacylglycerolů. Syntéza mléčného tuku u přežvýkavců vychází převážně z acetátu a butyrátu

z bacherové fermentace. Tučnost mléka tedy přímo ovlivňují fermentační procesy v bacheru, čím více se tvoří těkavých mastných kyselin v bacheru, tím více bude stoupat úroveň tučnosti mléka (Reece *et al.*, 2011).

2.2.3 Proteiny

Proteiny jsou v mléce ze všech tří hlavních výživových složek zastoupeny nejméně, avšak hrají nepostradatelnou úlohu ve výživě organismu, jako zdroj bílkovin (Strapák *et al.*, 2013). Většina mléčných proteinů se tvoří v epitelových buňkách mléčné žlázy. Velmi malé množství jich proniká přímo z krve dojnice. Většina bílkovin se v mléce vyskytuje převážně v podobě micel (Doležal *et al.*, 2000).

Kravske mléko tvoří dva druhy bílkovin. Kaseinové proteiny, které se dělí na α -s1 kasein, α -s2 kasein, β -kasein, κ -kasein a syrovátkové bílkoviny, které tvoří dva proteiny α -laktoglobulin a β -laktoglobulin (Do *et al.*, 2016). Syntéza proteinů je energeticky náročný proces, proto je důležité dbát na celkový příjem zdrojů potravy na všechny výživové složky. Nedostatečný příjem energie nebo dusíkatých látek mohou značně ovlivňovat obsah bílkovin v mléku a celkový metabolismus dojnice (Doležal *et al.*, 2000).

2.3 Technologické vlastnosti mléka

Světová produkce mléka a mléčných výrobků každým rokem narůstá o 2 % (Visentin *et al.*, 2015). Jen v Evropě a Severní Americe se podíl mléka určeného k výrobě sýrů zvýšil o 10 %. Mléko na výrobu sýra tvoří kolem 50 % celkové produkce mléka na těchto dvou kontinentech (Bittante *et al.*, 2012). Z těchto důvodů je důležité zajistit odpovídající kvalitu mléka jak v prvovýrobě, tak při zpracování. V dnešní době mléčný průmysl disponuje rychlými a levnými metodami, pomocí kterých dokáže vytvořit určitou strategii pro účinnější monitoring kvality mléka před jeho následným zpracováním, např. infračervená spektroskopie (Visentin *et al.*, 2015).

Technologické vlastnosti mléka ustanovují vyhovující kvalitu surového mléka pro další zpracování na mléčné výrobky, určují kvalitu zpracovaných výrobků a míru produkce. Mléko a jeho skladování ovlivňuje celá řada faktorů, které rozhodují o jeho výsledné kvalitě pro zpracování. Nejzásadnější technologické vlastnosti jsou kyselost, kysací schopnost, syřitelnost a tepelná stabilita (Samková *et al.*, 2012).

Mezi další technologické vlastnosti zpracování mléka patří pH, titrační kyselost, počet somatických buněk, mléčné koagulační vlastnosti mléka (MCP – Milk coagulation properties) a koagulace mléka. Pro sýrařské využití také rozhoduje zastoupení tuků a proteinů, především kaseinů (Pretto *et al.*, 2013).

2.3.1 Vliv genetických vlastností na syřitelnost mléka

Proces, který je nejvíce ovlivněn genetickým založením dojnic, je syřitelnost - MCP. Syřitelnost mléka je velice komplexní proces, který spojuje řada metabolických procesů. Mnoho faktorů tento proces ovlivňuje, jak z fyzikálních např. pH, teplota sýřeniny, formy vápníku a fosforu, tak z biologických faktorů, jako jsou pořadí laktace, roční období, plemeno, mléčné proteiny, obsah a zastoupení kaseinových proteinů a polymorfismus v genech kódující mléčné proteiny (Vallas *et al.*, 2010).

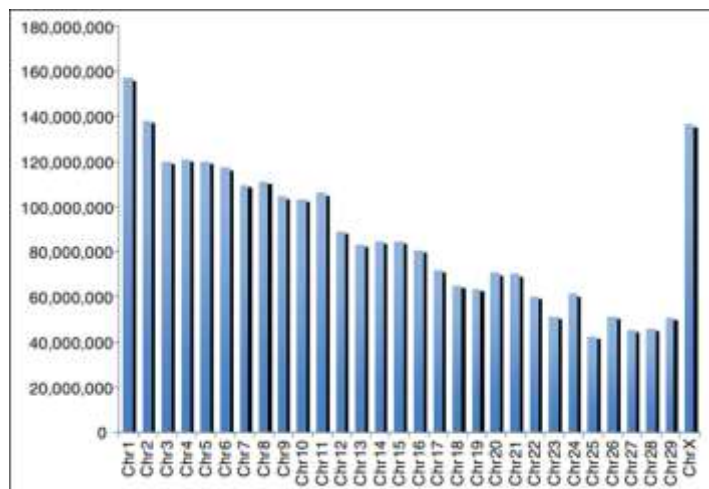
Bylo prokázáno, že množství, podíl a různé alely v kaseinových genech silně ovlivňují hlavní tři vlastnosti syřitelnosti. Jedná se o pevnost sýřeniny (a_{30} , mm), RCT (čas potřebný ke koagulaci mléka syřidlem) a čas zpevnění sýřeniny (a_{20} , mm). Díky variacím v mléčných genech byly pozorovány změny zastoupení proteinů a rozdíly ve vlastnostech syřitelnosti, jak mezi plemeny, tak jedinci stejných plemen (Bittante *et al.*, 2012). V různých vědeckých studiích byl prokázán vysoký vliv kaseinových genů na MCT (Ikonen *et al.*, 2004), (Penasa *et al.*, 2010). Např. změna jedné alely genu κ -kaseinů vede ke zkrácení koagulační doby až o 20 % (Azevedo *et al.*, 2008).

2.4 Genom skotu

Genom skotu byl jeden z největších, který byl kdy osekvenován. Za osekvenováním stál tým mnoha vědců pod záštitou národního ústavu pro zdraví USA a ministerstva zemědělství USA (Elsik *et al.*, 2009). Na výzkumu se podílely dva hlavní týmy, které zvolily odlišné metody sekvenování. Ve výsledku se tyto programy až na malé odchylky shodovaly (Zimin *et al.*, 2009). Výsledky výzkumu vyšly v roce 2009 v odborných časopisech a měly výrazný vliv na další šlechtění skotu. Velikost bovinního genomu je okolo 3 miliard base-pair, které obsahují 22 000 kódujících genů, z toho 14 000 jich je společných se všemi savci. S člověkem má bovinní genom společných 80 % všech genů. (Elsik *et al.*, 2009).

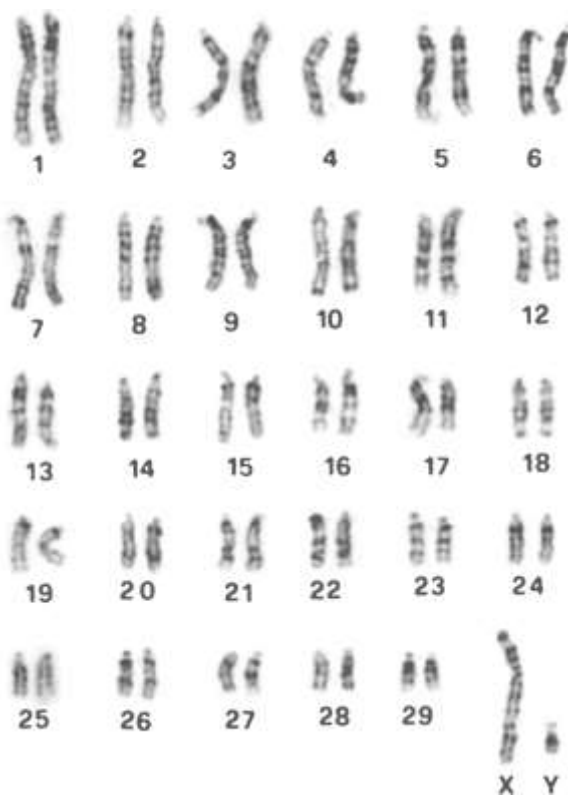
Sekvenace genomu skotu odhalila mnoho významných vlastností různých genů a pomohla objasnit roli spousty genů v organismu, jak genů, které ovlivňují produkční

vlastnosti jako výtěžek mléka, masa, kožešiny. Tak i geny, které ovlivňují řadu biologických funkcí (Gibbs *et al.*, 2009).



Obrázek 1: Zastoupení počtu sekvencí (bp) k jednotlivým chromozomům (Zimin, 2009)

Osekvenování genomu skotu také odhalilo, že skot v posledních desetiletích prodělal rychlý pokles efektivní velikosti populace. Tento pokles zapříčinil právě vysoký nárůst intenzity šlechtění a vznik nových plemen. Během tohoto vývoje došlo ke ztrátě rozmanitosti u řady genů, především genů zapojených ve fungování imunitního systému, laktace a metabolismu. (Elsik *et al.*, 2009)



Obrázek 2: Karyotyp skotu-býka $2n=60$ (Iannuzzi *et al.*, 1996)

2.5. Genetické markery

Genetický marker je gen nebo sekvence DNA, která je známa na chromozomu. Umožňuje identifikaci důležitých znaků určitého druhu. Lze jej popsat jako určitou variantu genu, která může vzniknout během evoluce např. mutací. Jako marker může sloužit SNP (single nucleotide polymorphism) nebo mikrosatelit (Davey *et al.*, 2011). SNP jsou místa v genomu, kde se mohou vyskytovat jeden nebo až dva rozdílné nukleotidy (Brown *et al.*, 2007). V genomu skotu bylo objeveno až 2 miliony SNP mutací (Żukiewicz *et al.*, 2012), (Michelizzi *et al.*, 2011). SNP jsou nejčastější mutace v genomu (Kolbehdari *et al.*, 2008). V genomu se nacházejí zhruba každých 500-1000 bází (Knoll *et al.*, 2002).

I když je variabilita genomu způsobená jednonukleotidovými polymorfizmy jako delecí, substitucí a inzercí vysoká, spousta těchto mutací se nachází mimo kódující oblast a navíc ve výsledném fenotypu tyto mutace nemají vysokou hodnotu (Żukiewicz *et al.*, 2012). Avšak důležitost těchto mutací roste s vlastností jednoduché genotypizace. Jednonukleotidové polymorfizmy se uplatňují jako genetické markery při genotypizaci tzv. QTL (quantitative trait loci) (Kolbehdari *et al.*, 2008). Kvantitativní vlastnost je vlastnost, která má měřitelný fenotypový projev v důsledku genotypu a vnějšího prostředí. QTL jsou lokusy, které disponují více verzemi několika genů (alelami), které spolu korelují a vytváří genotyp určité vlastnosti, který je ovlivňován prostředím (The nature and identification of quantitative trait loci, 2003).

2.5.1. Rozdělení markerů dle využití při mapování genomu

- **1 typ: kódující exprimované geny:** Jsou málo polymorfní a méně použitelné při mapování genomu a studiu diverzity rodin a populací.
- **2 typ: vysoce variabilní sekvence DNA:** Využívají se mikrosatelity a minisatelity. Díky vysokému stupni polymorfizmu jsou mikrosatelity vysoce informativní v populačních studiích a při určování rodičovství jsou hlavním znakem pro mapování genomu.
- **3 typ: jednonukleotidové polymorfizmy (SNP):** mohou ležet uvnitř kódujících genů, ale leží i v nekódujících oblastech např. introny. Využívají se pro populační studie. (Knoll *et al.*, 2002)

2.5.2 Genetické markery ve šlechtitelském programu dojného skotu

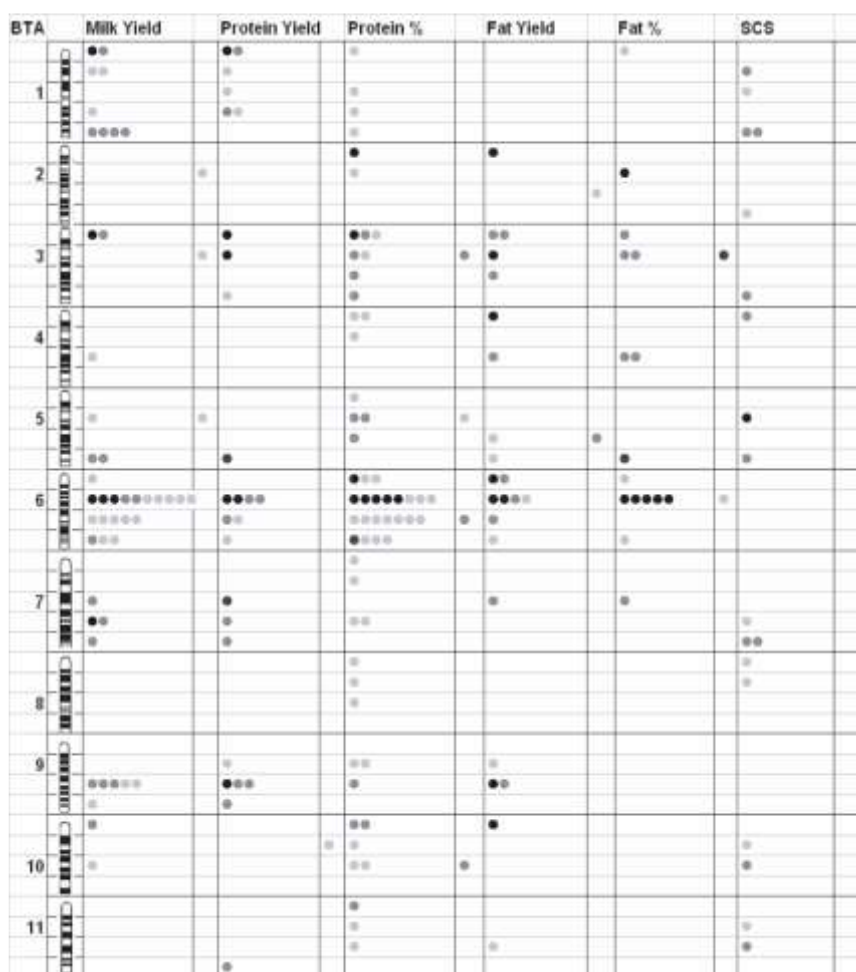
Různé druhy hospodářských zvířat byly po dlouhou dobu selektovány se zaměřením na zlepšující vlastnosti, které by měly hospodářský užitek. Tyto vlastnosti jsou předurčeny komplexem neznámých genů a značným vlivem prostředí. Selekcční strategie byla zaměřena na predikci celkového fenotypu a předešlého rodokmenu pomocí různých statistických metod. Tento model selekce se ukázal jako velmi efektivní, i když je založen na neznámém biologickém modelu a většina genů zapojených v těchto vlastnostech není známa (Boichard *et al.*, 2003).

Proto v posledních desetiletích roste zájem vědců a šlechtitelů o využití poznatků z genomiky (Sonstegard, 2001) jako mapování celého genomu (Oikonomou *et al.*, 2011) a použití genetických markerů ve šlechtění skotu. (Sonstegard *et al.*, 2001). Techniky molekulární biologie poskytují rychlé a jednoduché řešení, jak prokázat, zda daný jedinec je nositelem určité kvantitativní vlastnosti.

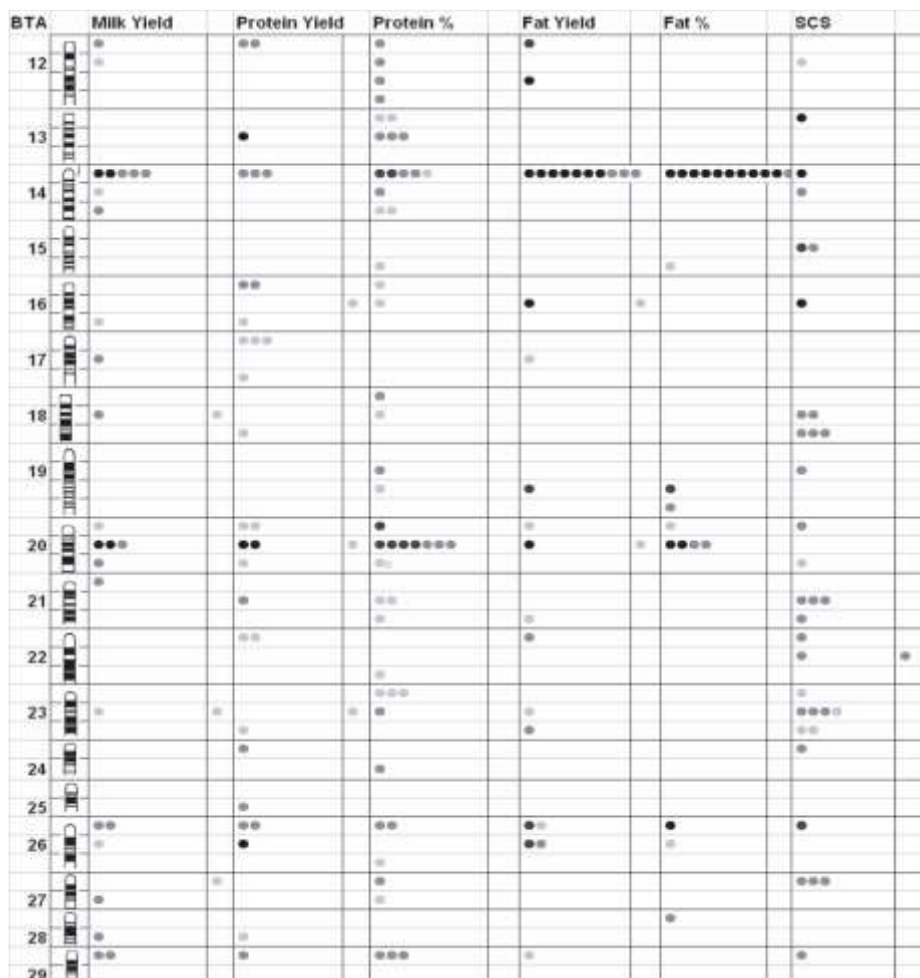
Tyto poznatky se dají využít při následném šlechtění, kdy se geny kvantitativních vlastností využívají jako markery v tzv. MAS programu (Marked Assisted Selection) (Yudin *et al.*, 2015). Metoda MAS umožňuje identifikaci počtu markerů, které jsou rozptýleny v genomu. Pomocí těchto markerů můžeme sledovat spojitost s užitkovými vlastnostmi (Guimarães *et al.*, 2007).

Genomický výběr (Genomic selection) je defakto formou MAS, který shrnuje informace o genetické diverzitě celého genomu. Metoda se zakládá na vyhledávání polymorfismů v SNP a analyzuje celou populaci, nezaměřuje se pouze na jedince. Výhodou genomické selekce je, že jsou zvířata vybrána na počátku života na základě jejich genomické předpovědi (Hayes *et al.*, 2013). Hodnocení genetických markerů, které jsou ve spojitosti s kvantitativními vlastnostmi, je především důležité u zvířat v dospělém věku. Využívá se pro předpověď genů potomků nebo zvířat pouze určitého pohlaví. (mléčná užitkovost, plodnost) (Yudin *et al.*, 2015)

Geny spojené s mléčnou užitkovostí a složením mléčných proteinů se v genomu skotu nacházejí zejména na BTA (*bos taurus* autosome) – 5, 6, 11 a 14 (Caroli *et al.*, 2009). Na BTA 6 se nachází největší počet QTL ovlivňujících dojivost a základní nutriční vlastnosti mléka jako proteiny a lipidy. Na chromozomech 1, 3, 6, 9, 14 a 20 byly také zjištěny QTL, které ovlivňují procentuální zastoupení mléčných proteinů. (Khatkar *et al.*, 2004)



Obrázek 3: Zobrazení QTL pro vlastnosti mléčné užitkovosti skotu BTA 1-11 (Khatkar *et al.*, 2004)



Obrázek 4.: Zobrazení QTL pro vlastnosti mléčné užitkovosti skotu BTA 12-29 (Khatkar *et al.*, 2004)

Na obr. č. 3 jsou znázorněny bovinní autozomy 1–11, na obr. č. 4 jsou znázorněny bovinní autozomy 12–29. Každý chromozom je rozdělen do úseků dlouhých přibližně 30 cm. Jednotlivé tečky ukazují přítomnost QTL a jejich stínění naznačuje statistický význam QTL: • $P < 0,001$, vysoce významné, ◐ $0,001 < P < 0,01$ významné a ◑ $0,01 < P < 0,05$ mírně významné (Khatkar *et al.*, 2004).

Na BTA 6 se nachází kaseinový genový komplex, který kóduje geny α -s1 kasein, α -s2 kasein, κ -kasein a β -kasein (Khatkar *et al.*, 2004). Tyto geny jsou řazeny jako QTL a mají vysokou úroveň polymorfismu, např. u genu β -kasein můžeme nalézt až 12 alel (*A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I*) (Shahlla *et al.*, 2014).

Vědecké práce zabývající se studiem QTL nemají za cíl pouze mapování QTL a objasnění jejich funkce, ale také mají za úkol hledat aplikované využití v šlechtění užitkových zvířat (Viitala *et al.*, 2006).

2.6. Geny kódující mléčné bílkoviny

Až 95 % proteinů v mléku přežvýkavců jako koz, ovcí a skotu je tvořena pouze šesti proteiny, které jsou kódovány stejnojmennými geny. Jedná se o kaseinové geny α -s1 kasein (α -s1 CN, *CSN1S1*), α -s2 kasein (α -s2 CN, *CSN1S2*), β -kasein (β CN, *CSN2*) a κ -kasein (κ -CN, *CSN3*) a geny kódující syrovátkové proteiny α -laktalbumin (α -LA) a β -laktoglobulin (β -LG) (Martin *et al.*, 2002). Zbývající procenta obsahu proteinů tvoří bovinní sérový albumin (BSA), laktoferin (LA), γ -kasein, imunoglobuliny a proteiny, které se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích (Schopen *et al.*, 2009).

Kaseinové geny leží na BTA 6, geny kódující α -laktalbumin leží na BTA 5, a β -laktoglobulin leží na BTA 11. Geny kódující mléčné bílkoviny jsou vysoce polymorfní a vyskytuje se u nich mnoho variant (Caroli *et al.*, 2009). Většina polymorfismu v kaseinových genech je způsobena změnou SNP ve čtecím rámci genu a dochází zde k záměně kódující aminokyseliny. Dále se můžeme setkat s delecemi, např. u genu *CSN1S1* dochází u alely A k početným delecím, které ovlivňují následný sestřih exonů (Gallinat *et al.*, 2013).

2.6.1 Vliv polymorfismu mléčných genů na vlastnosti mléka

Vliv polymorfismu v genech mléčných proteinů byl sledován už v minulém století. Byly objeveny rozdílnosti ve stejných genech a byly objeveny různé haplotypy (Prinzenberg *et al.*, 2003). Jednotlivé polymorfismy také ovlivňují spoustu užitkových vlastností (Ogorevc *et al.*, 2009).

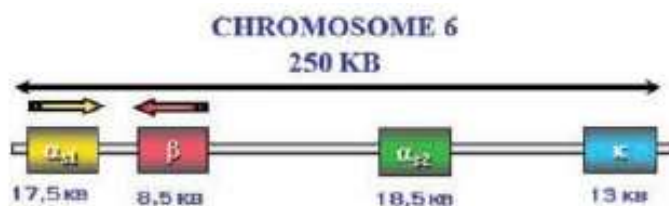
Zásadní vlastnost kterou ovlivňují, je koagulace mléka, což je důležitá vlastnost mléka při výrobě sýrů, kdy dochází vlivem syřidla k mléčnému srážení bílkovin (Bonfatti *et al.*, 2013). Největší vliv na mléčnou koagulaci mají geny α -s1 CN, β CN, κ -CN, β -LBA, toto spojení bylo odhaleno už v minulém století (Aleandri *et al.*, 1990). Např. byly zjištěny rozdílnosti v době koagulace mléka a pevnosti sýřeniny u dojnic Italského Mediteranského skotu, které vlastnily rozdílné alely mléčných genů (Bonfatti *et al.*, 2013).

Polymorfismus u mléčných genů také ovlivňuje procentuální zastoupení mléčných proteinů v mléku (Bonfatti *et al.*, 2011). Jednotlivé alely kaseinové rodiny jsou také spojovány se stravitelností v lidském střevu, alergiemi i kardiovaskulárními

poruchami nebo diabetem (Meier *et al.*, 2019). Důležitou vlastností je také stupeň fosforylace. Jedná se o posttranslační modifikaci, kdy je k proteinu přidělen zbytek kyseliny fosforečné. Stupeň fosforylace má každý kaseinový protein odlišný a slouží ke stabilizaci micelárních struktur (Fang *et al.*, 2016).

2.7. Komplex kaseinových genů

O komplexu kaseinových genů byly v minulosti vedeny značné studie, byly nalezeny souvislosti s jejich vlivem na mléčný výtěžek a koagulačními vlastnostmi. (Velmala *et al.*, 1995), (Threadgill *et al.*, 1990), (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 1990) (Bovenhuis *et al.*, 1992). Kaseinový genový komplex se nachází na BTA 6q 31-33, obsahuje geny α -s1 kasein (*CSN1S1*), α -s2 kasein (*CSN1S2*), β -kasein (*CSN2*) a κ -kasein (*CSN3*). Geny jsou uspořádány v komplexu o přibližné délce 250 kB (Hristov *et al.*, 2014a). Kaseinové geny jsou řazeny mezi QTL a využívají se jako marker při šlechtění skotu pro zlepšení mléčných výtěžků a lepší zastoupení proteinů v mléce (Suchocki *et al.*, 2013).



Obrázek 5: Pořadí kaseinových genů na BTA6 (Caroli *et al.*, 2009)

2.7.1 Gen α S2-kasein (*CSN1S2*)

Gen *CSN1S2* se nachází na BTA 6 a jeho protein tvoří zhruba 10 % z celkových mléčných proteinů. Protein je vysoce fosforylován a tvoří důležitou součást mléčných proteinů, kvůli jeho schopnosti vázat vápník. Protein α -s2 CN obsahuje 11 fosfátových skupin a jeho molekulární hmotnost je 25,2 kDa (Treweek *et al.*, 2011). Také se řadí k proteinům, které podporují antibakteriální schopnosti imunitního systému. (Nilsen *et al.*, 2009).

U genu *CSN1S2* jsou známy 4 alely (*A*, *B*, *C*, *D*) (Shahlla *et al.*, 2014). Alely *B* a *C* byly shledány převážně u jaků a zebu. Alela *D* se nachází v nízké frekvenci a byla nalezena u některých evropských a afrických plemen (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2007).

Nejvíce zastoupena je alela *A*, ta je také nejvíce prozkoumána a nachází se u většiny evropských plemen (Ibeagha-Awemu *et al.*, 2007). Oproti tomu se např. alela *B* nachází u Čínského holštýnského skotu, kde je zastoupena s vysokou frekvencí a tedy fixována na toto plemeno (Zhang *et al.*, 2007). V promotoru a strukturním genu *CSN1S2* dochází ke značnému nárůstu SNP vlivem inserce, delece a substituce. Tyto mutace mohou ovlivňovat regulaci transkripce *CSN1S2* genu. Avšak u kaseinových genů dochází i k hormonální regulaci. Akumulace těchto dvou činitelů regulací a hormonální činnosti následně ovlivňuje množství proteinu v mléce. (Kishore *et al.*, 2013). Např. genotyp *DD* je spojován s vyšším zastoupením proteinu v porovnání s genotypem *GA* (Ardicli *et al.*, 2018).

2.7.2 Gen β -kasein (*CSN2*)

Gen *CSN2* se nachází na chromozomu 6 a bylo objeveno 12 alel (*A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I*) (Caroli *et al.*, 2009). Protein β -kasein tvoří 45 % obsahu všech mléčných proteinů a je tvořen 209 aminokyselinami (Farrell *et al.*, 2004). *CSN2* ovlivňuje ve velkém množství složení mléčného tuku. V komplexu s *CSN3* působí na zastoupení jednotlivých proteinů, a také ovlivňuje syřitelnost a koagulaci mléka při výrobě sýrů (Comin *et al.*, 2008).

β -kasein je také nejdůležitější z rodiny kaseinových proteinů pro tvorbu kaseinových micel, tvoří jejich strukturu a udržuje je v komplexu. Nejčastější alely, které se vyskytují u evropských plemen skotu jsou *A1, A2, A3, B, a C* (Kučerová *et al.*, 2011). *A1* alela je nejvíce hojná u holštýnského a ayrshirského plemene. Naproti tomu vysoká frekvence alely *A2* se nachází u plemen Guernsey a Jersey.

Alela *B* se vyskytuje v malé frekvenci a alela *A3* a *C* jsou vzácné. Nejvíce se vyskytují alely *A1* a *A2*. Rozdíl mezi nimi tvoří výměna aminokyseliny v bílkovinovém řetězci, kdy na 67. místě se u *A1* nachází prolin, zatímco u *A2* je nahrazen histidinem. (Kamiński *et al.*, 2007). Alela *A3* je spojována s vysokou výtěžností mléka (Ng-Kwai-Hang *et al.*, 2003), alela *B* je navíc spojována, jak s vysokou výtěžností mléka, tak i jeho kvalitou (Boettcher *et al.*, 2004). Genotyp *AA* byl shledán s vysokým mléčným výtěžkem. Vysoký obsah proteinů bývá spojován s genotypem *BB* (Kučerová *et al.*, 2011).

2.7.3 Gen κ -kasein (*CSN3*)

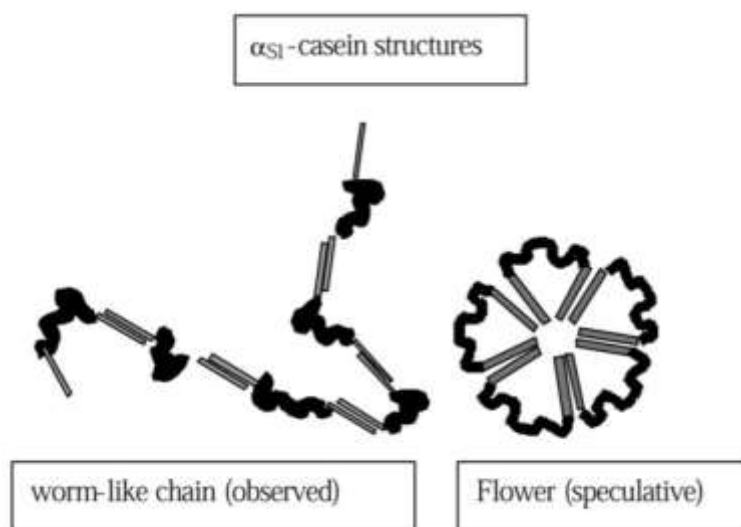
Gen *CSN3* se nachází na 6 BTA a je uložen za *CSNIS2* ve vzdálenosti 70kb. Tvoří zhruba 12 % proteinů mléka. κ -CN je značně odlišný od ostatních kaseinových proteinů, liší se jak ve své struktuře tak vlastnostech. Je důležitý při tvorbě kaseinových micel, kdy napomáhá jejich stabilitě (Azevedo *et al.*, 2008). Gen je dlouhý 13kb a je rozdělen do 9 transkriptových jednotek (5 exonů a 4 introny). Na čtvrtém exonu, který je 517bp dlouhý se nachází 11 SNP, která tvoří 11 různých alel (Adamov *et al.*, 2020). U genu *CSN3* bylo nalezeno 11 alel, jmenovitě *A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J* (Caroli *et al.*, 2009).

Nejvíce jsou zastoupeny alely *A* a *B*, které se od sebe odlišují na pozici 136 a 148 aminokyseliny. Na pozici 136 je threonin zaměněn za izoleucin a na pozici 148 je zaměněna kyselina asparagová za alanin (Anggraeni *et al.*, 2010). Alela *B* je nejvíce spojována s nejlepšími vlastnostmi během výroby sýra, nese vlastnosti pro vyšší odolnost denaturace proteinu a zkracuje dobu koagulace až o 20 %. Také výnos sýru od krav s genotypem *BB* je větší o 10 % než od krav s genotypem *AA*. (Azevedo *et al.*, 2008). Alela *B* je také nejvíce zastoupenou alelou ve všech populacích v mnoha zemích, její genotyp *BB* byl shledán jako nejvíce rozšířený.

Druhým nejrozšířenějším genotypem je *AB*. Tyto genotypy (*BB, AB*) se využívají ve šlechtitelských programech pro ještě větší nárůst frekvence alely *B* kvůli jejím ekonomickým výhodám (Abdel Dayem *et al.*, 2009). Zbylé alely jsou v populacích zastoupeny v nízkých frekvencích a jejich vlastnosti neodpovídají kvalitou vlastnostem alel *A* a *B*. Např. varianta *E* byla asociovaná s nízkým obsahem proteinů a horšími koagulačními vlastnostmi než alela *A* (Heck *et al.*, 2009).

2.7.4 Gen α -s1 kasein (*CSN1S1*)

Gen *CSN1S1* se nachází na BTA 6 a je položen jako první z celého kaseinového komplexu (Caroli *et al.*, 2009). Protein tvoří až 40 % z celkových proteinů v kravském mléce. Je vysoce fosforylován a má vlastnost vázat vápník, proto je z nutričního hlediska velice důležitý. Obsahuje 8 fosfátových skupin a molekulární hmotnost se pohybuje okolo 23,6 kDa (Treweek *et al.*, 2011). Velikost celého genu je cca 17 508bp, skládá se z 19 exonů o velikosti 24-385 bp a 18 intronů o velikosti 90-1967 bp (Koczan *et al.*, 1991). Struktura proteinu viz obrázek.č. 6 se vyskytuje ve dvou formách. První formu tvoří tzv. polymer červovitého tvaru (worm-like chain structure). Druhá forma je spekulativní. Byla zaznamenána pouze v případech, kdy bylo dosaženo vhodných podmínek pro tvorbu této struktury jako pH, iontová síla a nízká hladina iontového vápníku. Označuje se jako květinová (flower structure) (Horne *et al.*, 2002).



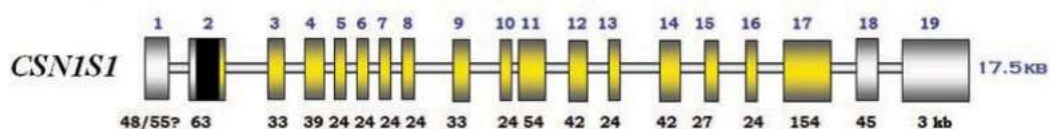
Obrázek 6: Struktura α -s1 kaseinu (Horne, 2002)

U genu *CSN1S1* bylo nalezeno 8 alel (*A, B, C, D, E, F, G a H*) (Caroli *et al.*, 2009). Byla také objevena alela *I*, která nese nukleotidovou substituci na 11. exonu (g.19836A>T). Tato substituce vede ke změně aminokyselin ve výsledném řetězci finální proteinu na 84. pozici. Zde dochází k záměně glutaminu za asparagin (Lühken *et al.*, 2009). Alela *A* se vyskytuje příležitostně a byla nalezena u holštýnsko-fríského skotu, červeného holštýnského skotu a u německého červenostrakatého skotu (Farrell *et al.*, 2004). Alely *F, G, H* byly identifikovány u plemena brown-swiss. Alela *D* byla zjištěna u plemene Holštýnsko-fríského (Caroli *et al.*, 2008).

U *CSN1S1* byla také zjištěna substituce na „5 – flanking region“, kdy dochází v promotrou na 175 bp k záměně A→G. Zvířata s G variantou vykazují vyšší mléčnou užitkovost a vyšší množství α -s1 kaseinu v mléce, oproti variantě s A nukleotidem (Sanders *et al.*, 2006). Genotypy genu *CSN1S1* silně ovlivňují první laktaci (Prinzenberg *et al.*, 2003).

Nejčastější alely jsou B a C. Alela B se nachází v naprosté většině populací 90-95 % (Lühken *et al.*, 2009). Odlišnost mezi těmito alelami je tranzice na exonu XVII na 192 pořadí aminokyselin v koncovém řetězci proteinu. Dochází k záměně glycin za glutamin u alely B, zatímco C kóduje glutamin za glycin (Żukiewicz *et al.*, 2012). Alela C je typická pro předky skotu, jako Jak a Zebu a je původní alelou, ze které vznikly ostatní. (Ardicli *et al.*, 2018). Genotyp CC je také spojován s větším mléčným výtěžkem a odlišným složením proteinů než genotyp BB a BC (Kučerová *et al.*, 2011).

Alela C se vyskytuje s frekvencí 0,15-0,25 u plemen Jersey, Guernsey a Normandského skotu (Lühken *et al.*, 2009). Jedinci s genotypem BC mají oproti genotypu BB vyšší obsah mléčných proteinů a tuku v mléce (Bonfatti *et al.*, 2011), (Schopen *et al.*, 2009). Alela G je spojována s nižším množstvím α -s1 kaseinu v mléce. Ale zato ovlivňuje vyšší obsah κ -kaseinu v mléce a lepší pevnost kaseinových micel (Caroli *et al.*, 2008).



Obrázek 7: Strukturní organizace transkribované části genu *CSN1S1*. (Otevřené části reprezentují introny, šedé části znázorňují 5' a 3' netranslatovatelné oblasti, černá část exon kódující signální peptid, žluté části znázorňují exony kódující výsledný protein) (Caroli *et al.*, 2009)

3. Metodika

3.1 Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo provést asociační analýzu polymorfismu v genu *CSN1S1* k mléčné užitkovosti dojnic a technologické kvalitě kravského mléka.

3.2 Materiál

K analýze bylo vybráno 243 dojnic holštýnského skotu a českého strakatého skotu, z farem v blízkosti Českých Budějovic. Jmenovitě farma Chyšná, Týnice, Pražák, Munice a Sedlec. Ustájení bylo volné. Krmná dávka byla sestavena celoročně z konzervovaných krmiv, kukuřice a travní siláže, sena a jadrné směsi, v různých stájích v různém poměru a kvalitě jednotlivých složek. Na farmě Chyšná bylo odebráno 55 vzorků od holštýnského skotu. Na farmě Týnice bylo odebráno 41 vzorků od dojnic českého strakatého skotu, 52 vzorků od českého strakatého skotu z farmy Sedlec. Z farmy Munice bylo odebráno od obou plemen 35 vzorků a z farmy Pražák bylo odebráno 60 vzorků od českého strakatého skotu. Po odebrání byly vzorky mléka zamrazeny a uskladněny při -20°C.

3.3 Laboratorní metody

3.3.1 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena za pomoci automatického izolátoru, s využitím komerčně dostupného kitu od firmy MagCore pro izolaci DNA z mléka. Následně se změřila kvalita izolované DNA u jednotlivých vzorků pomocí přístroje Nanodrop. Vzorky DNA byly umístěny do chladiřského zařízení pro další analýzu.

3.3.2 Polymerase chain reaction (PCR)

Složení PCR reakce je uvedeno v tab. č. 2, primery byly naředěny: 10 μl primeru + 90 μl H_2O . Výsledné množství primeru bylo 100 μl . Byl zvolen Mastermix, který obsahoval MgCl_2 , dNTP's, Taq polymerázu a pufr (Tris-HCL, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, tween 20). K mastermixu byla přidána PCR H_2O a DNA.

Vzorky byly vloženy do thermocycleru, který byl spuštěn v programu dle: (Ardicli, 2018) : 94°C 3' (94 °C 30s, 63°C 45s, 72°C 1') 40 cyklů, 72°C 10'. Pro amplifikaci reakce byly zvoleny primery dle (Lien *et al.*, 1993), (Ardicli *et al.*, 2018). Výsledná délka amplifikátu byla 344bp.

F: 5'ACAATTCTACCAGCTGGATGCCTATC 3'

R: 5'CACGCTCCACAGTTCCTGAGTAA 3'

Tabulka 2: Složení PCR směsi (první reakce)

Komponent:	Množství (μl)
MasterMIX	5
Primer F	0,625
Primer R	0,625
PCR H_2O	2,75
DNA	1
Celkem	10

3.3.3 Nested polymerase chain reaction (nested-PCR)

Po proběhnutí PCR reakce byla sestavena reakce pro Nested-PCR, bez které by následná RFLP neproběhla. Reakce viz tab. č. 3. Jako templát byl použit PCR produkt z první reakce. Program pro nested PCR byl sestaven dle (Lien *et al.*, 1993). 94°C 3' (94 °C 30s, 66°C 45s, 72°C 1') 40 cyklů, finální elongace byla 10' při 72°. V našem případě sloužil jako primer R, primer z PCR reakce a byl doplněn primerem F, který se nacházel o 94bp blíže k primeru R od původního primeru F. Vlivem reakce došlo ke zkrácení amplifikátu na 250bp. Primery byly sestaveny dle (Lien *et al.*, 1993).

R: 5' CACGCTCCACAGTTCCTGAGTAA 3'

F: 5' CCGGATCCTATTGGCTCTGAGAACGGTG 3'

Tabulka 3: Složení nested-PCR směsi

Komponent	Množství (μl)
MasterMIX	12
Primer F	1
Primer R	1
PCR H ₂ O	10
templát	1
Celkem	25

3.3.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Po proběhnutí Nested-PCR byla sestavena RFLP směs viz tab. č. 4. Jako templát byl použit nested-PCR produkt. Jednotlivé zkumavky byly vloženy do thermocycleru po dobu 16 hodin při 36°C. Genotypizace probíhala dle (Lien *et al.*, 1993), schéma viz obrázek 7. Jako restrikční enzym byl zvolen *Hph*I, který štěpí v pozicích 5'...GGTGA(N)₈↓.... 3' a 5'...CCACT(N)₇↓.... 3'. Genotypy byly vizualizovány na agarósovém gelu pomocí ELFO.

Tabulka 4: Složení RFLP reakce

Komponent	Množství (μl)
Templát	15
Pufr	4
R. enzym	1
H ₂ O	10
Celkem	30

3.3.5 Metody pro zjištění mléčné užitkovosti a kvalitativních parametrů mléka

Data o mléčné užitkovosti byly sestaveny ze záznamů kontrol mléčné užitkovosti u vybraných jednotlivých farem. Údaje o hmotnosti v kg byly zjištěny měřením. Mléčné složení (tuk, bílkoviny, sacharidy) byly zjištěny v laboratoři pomocí infračervené spektroskopie. Technologické vlastnosti mléka byly hodnoceny pomocí fermentační schopnosti mléka tzv. jogurtový test. Sýření mléka bylo měřeno instrumentálně a subjektivně. Alkoholový test byl změřen pomocí titrace mléka 96 % ethanolem.

Jogurtový test byl změřen dle standardů Českého mlékařského průmyslu. Vzorek syrového mléka byl zahřát na 85°C po dobu 5 minut, poté byl zchlazen na 43°C a inokulován pomocí termofilní jogurtové kultury. Inokulovaný vzorek byl inkubován při 43°C po dobu 3,5 hodiny. Výsledky byly zjištěny díky titraci jogurtu pomocí 0,25 mol NaOH.

Subjektivní syřitelnost byla určena pomocí syřidla. Surové mléko se zahřálo na 35°C, po dosažení teploty bylo přidáno 1 % syřidlo, od zaočkování byl měřen RCT do počátku koagulace (tvorby jednotlivých mléčných zrn). Instrumentální syřitelnost byla změřena pomocí nefelometrie.

Alkoholový test, syřitelnost a jogurtový test nejsou zahrnuty v oficiálních standardech pro technologické vlastnosti mléka, ale bývají zahrnuty ve vědeckých publikacích pro snadnější porovnávání výsledků vědeckých prací.

3.4 Statistické vyhodnocení

Výsledky genotypizace pomocí PCR-RFLP byly následně statisticky zpracovány. Byly vypočteny absolutní a relativní frekvence genotypů BB , BC a alel B a C . Poté byla pomocí χ^2 testu testována shoda - skutečných a teoretických genotypových četností.

Vzorce pro relativní výpočet frekvence genotypů:

$$BB^R = BB^A/N$$

$$BC^R = BC^A/N$$

Pro absolutní frekvence alel:

$$B^A = 2 \times BB^A + BC^A$$

$$C^A = 2 \times CC^A + BC^A$$

Pro relativní frekvence alel:

$$B^R = 2 \times BB^A + BC^A / 2 \times N$$

$$C^R = 2 \times CC^A + BC^A / 2 \times N$$

Horní index vyjadřuje ^A absolutní frekvenci, horní index ^R označuje relativní frekvenci, hodnota N vyjadřuje celkový počet jedinců v celé populaci.

K výpočtům vlivu genotypů na vlastnosti mléčné užitkovosti a technologické vlastnosti mléka byl použit statistický program SAS 9.4. (statistical analytical software). Významnost jednotlivých efektů byla otestována pomocí procedur GLM/SAS a MIXED/SAS. Na základě jednotlivých analýz efektů byly sestrojeny a otestovány modelové rovnice pro veškeré vybrané užitkové vlastnosti. Pro parametry mléčné užitkovosti byly zvoleny vlastnosti: množství nadojeného mléka, procenta tuku, tuk v kilogramech, množství bílkovin v kilogramech a procentech. Pro technologické vlastnosti mléka byly zvoleny vlastnosti: jogurtový test, čas sýření (subjektivně), (přístrojově) a alkoholové číslo.

3.4.1 Modely rovnic

Získaná data a jejich vliv na sledované vlastnosti byly statisticky vyhodnoceny pomocí softwaru SAS analytics software. Byly sestaveny modelové rovnice pro jednotlivé vlastnosti. Modely rovnic byly speciálně sestaveny pro statistické vyhodnocení vlivu genotypu na mléčnou užitkovost a technologické vlastnosti mléka. Pro větší prozkoumání interakce byl také zvolen model, u kterého byla zařazena interakce (genotyp x plemeno). Byl analyzován také efekt interakce (genotyp x farma).

Rovnice použité pro výpočet vlivu genotypu na mléčnou užitkovost a technologické vlastnosti mléka:

- $M_{ijklm} = \mu + \text{farma}_i + \text{laktace}_j + \text{genotyp}_k + \text{otec}_l + \text{dojnice}_m + e_{ijklm}$

Kde M_{ijklm} je dojivost za laktaci v kg; genotyp_k je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); farma_i je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); laktace_j je pevný efekt pořadí laktace ($j = 1, 2$); otec_l je náhodný efekt otce; dojnice_m je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); e_{ijklm} je reziduum

- $\text{Bílkovina}_{ijklm} = \mu + \text{farma}_i + \text{laktace}_j + \text{genotyp}_k + \text{otec}_l + \text{dojnice}_m + e_{ijklm}$

Kde Bílkovina_{ijklm} je obsah bílkovin v mléce v %; genotyp_k je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); farma_i je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); laktace_j je pevný efekt pořadí laktace ($j = 1, 2$); otec_l je náhodný efekt otce; dojnice_m je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); e_{ijklm} je reziduum

- $\text{Bílkovina}_{ijklmn} = \mu + \text{farma}_i + \text{laktace}_j + \text{genotyp}_k + \text{otec}_l + \text{dojnice}_m + e_{ijklm}$

Kde $\text{Bílkovina}_{ijklmn}$ je produkce bílkovin v mléce v kg; genotyp_k je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); farma_i je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); laktace_j je pevný efekt pořadí laktace ($j = 1, 2$); otec_l je náhodný efekt otce; dojnice_m je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); e_{ijklm} je reziduum

- $\text{Tuk}_{ijklm} = \mu + \text{farma}_i + \text{laktace}_j + \text{genotyp}_k + \text{otec}_l + \text{dojnice}_m + e_{ijklm}$

Kde Tuk_{ijklm} je obsah tuku v mléce v % ; genotyp_k je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); farma_i je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); laktace_j je pevný efekt pořadí laktace ($j = 1, 2$); otec_l je náhodný efekt otce; dojnice_m je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); e_{ijklm} je reziduum

- $\text{Tuk}_{ijklmn} = \mu + \text{farma}_i + \text{laktace}_j + \text{genotyp}_k + \text{otec}_l + \text{dojnice}_m + e_{ijklm}$

Kde Tuk_{ijklmn} je produkce tuku v mléce v kg ; genotyp_k je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); farma_j je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); laktace_j je pevný efekt pořadí laktace ($j = 1, 2$); otec_l je náhodný efekt otce; dojnice_m je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); e_{ijklm} je reziduum

- $Jogurt_{ijklm} = \mu + farma_i + b_1laktoza + b_2casein + genotyp_j + sezona_k + otec_l + dojnice_m + e_{ijklm}$

Kde $Jogurt_{ijklm}$ je výsledek jogurtového testu; $farma_j$ je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); $genotyp_j$ je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); $sezona_k$ je efekt sezony, fixní efekt, ve třídách $n = 1, \dots, 4$); $b_2casein$ je pevná regrese na obsah kaseinu; $b_1laktoza$ je pevná regrese na obsah laktózy; $otec_l$ je náhodný efekt otce; $dojnice_m$ je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); e_{ijklm} je reziduum

- $Syřsub_{ijkl} = \mu + farma_i + b_1bilkovinap + b_2TPS + genotyp_j + otec_k + dojnice_l + e_{ijkl}$

Kde $Syřsub_{ijkl}$ je výsledek subjektivního testu syřitelnosti; $farma_j$ je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); $b_1bilkovinap$ = pevná regrese na obsah bílkovin v %; b_2TPS = pevná regrese na obsah TPS); $genotyp_j$ je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); $otec_k$ je náhodný efekt otce; $dojnice_l$ je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); e_{ijkl} je reziduum

- $Syřtest_{ijkl} = \mu + farma_i + b_1laktoza + b_1bilkovinap + b_3TPS + genotyp_j + otec_k + dojnice_l + e_{ijkl}$

Kde $Syřtest_{ijkl}$ je výsledek přístrojového testu syřitelnosti; $farma_j$ je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); $b_1bilkovinap$ = pevná regrese na obsah bílkovin v %; b_2TPS = pevná regrese na obsah TPS); $genotyp_j$ je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); $otec_k$ je náhodný efekt otce; $dojnice_l$ je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); $b_1laktoza$ je pevná regrese na obsah laktózy; e_{ijkl} je reziduum

- $Alkcislo_{ijkl} = \mu + farma_i + genotyp_j + otec_k + dojnice_l + e_{ijkl}$

Kde $Alkcislo_{ijkl}$ je výsledek alkoholového testu; $farma_j$ je pevný efekt farmy ($i = 1, \dots, 5$); $genotyp_j$ je pevný efekt genotypu *CSNISI* ($i = 1, 2$); $otec_k$ je náhodný efekt otce; $dojnice_l$ je trvalé prostředí dojnice (opakované měření); e_{ijkl} je reziduum

Pro vyhodnocení interakce (genotyp x plemeno) byly zvoleny stejné vlivy jako ve výpočtu vlivu genotypu, ke kterým byly přidány vlivy; $plem_l$ je pevný efekt plemene ve třídách ($l=1,2,3$); (gen x plem) = interakce mezi plemenem ($plem_j$) a genotypem (gen_k). Rovnice použité pro výpočet interakce (genotyp x plemeno) na mléčnou užitkovost a technologické vlastnosti mléka:

- $Mléko_{ijklmn} = \mu + farma_i + porlak_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times plem)_{kl} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $Bilkovina_{ijklmn} (\%) = \mu + farma_i + laktace_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times plem)_{kl} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$

- $B\dot{il}kovina_{ijklmn} \text{ (kg)} = \mu + farma_i + porlak_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times plem)_{kl} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $Tuk_{ijklmn} \text{ (\%)} = \mu + farma_i + laktace_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times plem)_{kl} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $Tuk_{ijklmn} \text{ (kg)} = \mu + farma_i + laktace_j + genotyp_k + otec_l + dojnice_m + e_{ijklm}$
- $Jogurt_{ijklmn} = \mu + farma_i + b1laktoza + b2casein + genotyp_j + plem_k + (gen \times plem)_{jk} + sezona_l + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $Sy\dot{r}sub_{ijklm} = \mu + farma_i + b1bilkovinap + b2TPS + genotyp_j + plem_k + (gen \times plem)_{jk} + otec_l + dojnice_m + e_{ijklm}$
- $Sy\dot{r}test_{ijklm} = \mu + farma_i + b1laktoza + b2bilkovina_p + b3TPS + genotyp_j + plem_k + (gen \times plem)_{jk} + otec_l + dojnice_m + e_{ijklm}$
- $Alkocislo_{ijklm} = \mu + farma_i + genotyp_j + plem_k + (gen \times plem)_{jk} + otec_l + dojnice_m + e_{ijklm}$

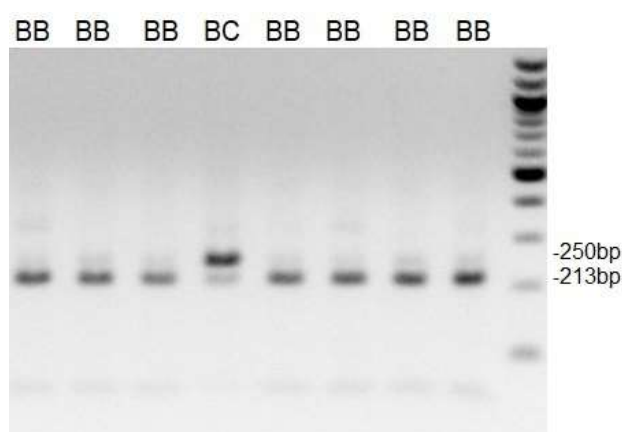
Podobně jako vliv genotyp x plemeno. Byl vyhodnocen vliv (genotyp x farma) na mléčnou užitkovost a technologické vlastnosti mléka: K vlivům byl navíc přidán vliv (gen x farma)_{ij}, který označuje interakci vlivu genotypu s plemenem.

- $Mléko_{ijklmn} = \mu + farma_i + laktace_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times farma)_{ik} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $B\dot{il}koviny_{ijklmn} \text{ (\%)} = \mu + farma_i + laktace_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times farma)_{ik} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $B\dot{il}koviny_{ijklmn} \text{ (kg)} = \mu + farma_i + laktace_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times farma)_{ik} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $Tuk_{ijklmn} \text{ (\%)} = \mu + farma_i + laktace_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times farma)_{ik} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $Tuk_{ijklmn} \text{ (kg)} = \mu + farma_i + laktace_j + genotyp_k + plem_l + (gen \times farma)_{ik} + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $Jogurt_{ijklmn} = \mu + farma_i + b1laktoza + b2casein + gen_j + plem_k + (gen \times farma)_{ij} + sezona_l + otec_m + dojnice_n + e_{ijklmn}$
- $Sy\dot{r}sub_{ijklm} = \mu + farma_i + b1bilkovina_p + b2TPS + gen_j + plem_k + (gen \times farma)_{ij} + otec_l + dojnice_m + e_{ijklm}$
- $Sy\dot{r}test_{ijklm} = \mu + farma_i + b1laktoza + b1bilkovina_p + b2TPS + gen_j + plem_k + (gen \times farma)_{ij} + otec_l + dojnice_m + e_{ijklm}$
- $Alkcislo_{ijklm} = \mu + farma_i + gen_j + plem_k + (gen \times farma)_{ij} + otec_l + dojnice_m + e_{ijklm}$

4. Výsledky a diskuze

4.1. Výsledky genotypizace

Pomocí metody RFLP bylo genotypizováno 242 vzorků DNA. Fragment po reakci PCR byl dlouhý 344bp, po následující nested-PCR byl fragment zkrácen na 250bp. Restrikční enzym *HphI* následně štěpil výsledný fragment na další fragmenty. Alela *B* měla délku 213bp, alela *C* 250bp. Následná vizualizace pomocí ELFO zobrazila genotyp *BB* jako 213bp dlouhý a genotyp *BC* jako 213 + 250bp. Viz obr. č. 7.



Obrázek 7: Vizualizace metody RFLP pomocí ELFO

4.2. Genotypové a alelické frekvence

Pro *CSN1S1* lokus byly sledovány skupiny dojnic, celkem 243 kusů. Bylo identifikováno 27 dojnic s genotypem *BC* a 215 dojnic s genotypem *BB*.

Relativní frekvence jednotlivých genotypů byla 0,888 pro *BB* a 0,112 pro *BC*. Absolutní frekvence alely *B* byla 457 a alely *C* 27. Relativní frekvence alely *B* byla 0,944 a alely *C* 0,056.

Na základě relativní četnosti alel byla posléze vypočítána relativní teoretická četnost genotypů. Pro genotyp *BB* byla četnost 0,893 a pro genotyp *BC* 0,106.

Pomocí relativních četností alel a relativní teoretické četnosti genotypů byla zjištěna výsledná hodnota Chí-kvadrát testu (χ^2). Hodnota odpovídala číslu 0,038. Tato hodnota je nižší než kritická hodnota 5,99. To znamená, že genotypové četnosti lokusu *CSN1S1* ve zkoumané populaci jsou v Hardy-Weinbergerově rovnováze.

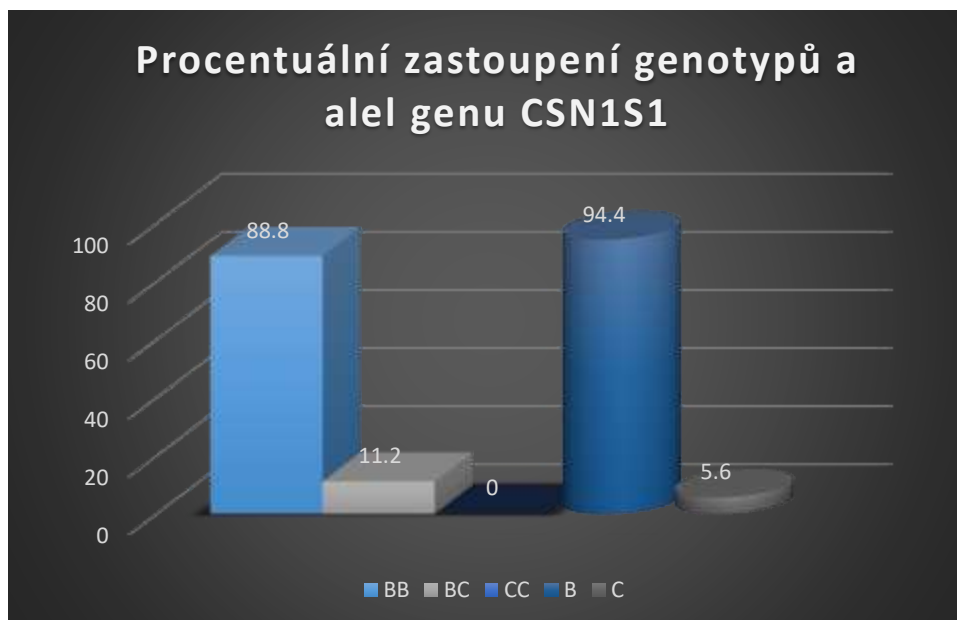
Absolutní, relativní frekvence genotypů a alel byly zpracovány do tabulky 5. Počet je uveden, jak pro jednotlivé farmy, tak pro celkový počet dojnic. Graficky je počet genotypů a alel znázorněn na obrázku 8.

Tabulka 5: Absolutní a relativní frekvence genotypů a alel

	Genotypy			Alely	
	<i>BB</i>	<i>BC</i>	<i>CC</i>	<i>B</i>	<i>C</i>
Chyšná (n=52)					
Absolutní četnost	51	1	0,00	103	1
Relativní četnost	0,981	0,019	-	0,99	0,01
Pražák (n=60)					
Absolutní četnost	49	11	0,00	109	11
Relativní četnost	0,817	0,183	-	0,908	0,092
Munice (n=35)					
Absolutní četnost	33	2	0,00	68	2
Relativní četnost	0,943	0,057	-	0,971	0,029
Týnice (n=41)					
Absolutní četnost	33	8	0,00	74	8
Relativní četnost	0,805	0,195	-	0,902	0,098
Sedlec (n=52)					
Absolutní četnost	47	5	0,00	99	5
Relativní četnost	0,904	0,096	-	0,952	0,048
Všechny farmy (n=242)					
Absolutní četnost	215	27	0,00	457	27
Relativní četnost	0,888	0,112	-	0,944	0,056
Relativní teoretická četnost	0,893	0,106	0,0031	-	-
χ^2		0,038			

Podobné výsledky uvádí i Ardicli *et al.* (2018), který ve sledované populaci 168 kusů holštýnských krav objevil 152 zástupců genotypu *BB* a 16 genotypu *BC*. Genotyp *CC* nebyl nalezen. Podobné frekvence zjistil rovněž Zakizadeh *et al.* (2013), který analyzoval holštýnský skot. V populaci 98 dojnic byla frekvence *BB* 0,98 a *BC* genotypu 0,02. Homozygotní genotyp *CC* opět nebyl zaznamenán. Podobné frekvence uvádí také Kučerová *et al.* (2011), která zkoumala populaci 440 dojnic českého strakatého skotu. Prokázala podobné výsledky jako výše uvedené studie, navíc se podařilo identifikovat genotyp *CC*, který byl nalezen ve velmi nízké frekvenci 0,016. *BC* byl nalezen ve frekvenci 0,182. Nejhojnější byl opět genotyp *BB* 0,802.

Pro srovnání Hristov *et al.* (2014b), který analyzoval bulharský šedý skot, našel vyšší zastoupení genotypů *CC* oproti jiným studiím, a to 0,19, genotyp *BB* byl pozorován ve velmi malé frekvenci 0,04. Genotyp *BC* byl zastoupen nejvíce a to ve frekvenci 0,77. Dle Miluchová *et al.* (2009), která genotypizovala slovenský pinzgavský skot, byla frekvence genotypů z 93 testovaných jedinců 0,810 *BB* a 0,120 *BC*, genotyp *CC* se v populaci nevyskytoval. Díky zjištěným údajům můžeme usuzovat, že zastoupení alel a genotypů je silně ovlivněno plemenem.



Obrázek 8: Grafické znázornění pozorovaných frekvencí (%) genotypů (*BB*, *BC*, *CC*) a alel (*B*, *C*)

4.3 Vliv genotypu alfa s-1 kaseinu na mléčnou užitkovost a složení mléka

Při analýze genu *CSN1S1* a jeho vlivu na mléčnou užitkovost a složení mléka byly hodnoceny tyto faktory:

- množství mléka za laktaci (kg)
- tuk (%)
- tuk za laktaci (kg)
- bílkoviny (%)
- bílkoviny za laktaci (kg)

Pro statistické hodnocení bylo použito 210 vzorků, z původně analyzovaných 215. Dojnice pro mléčnou užitkovost byly měřeny 2x. Z tohoto důvodu se $N=425$. Skupiny jsou sestaveny z dvou plemen, holštýnský skot a český strakatý skot.

V tab. č. 6 jsou uvedeny popisné statistiky mléčné užitkovosti v hodnotách kg a % v závislosti na genotypu.

Analýza mléčné užitkovosti byla také provedena pomocí metody nejmenších čtverců (Least Squares Mean, LSM) + směrodatná odchylka (Standard Error) viz tab. č. 7. Vliv genotypu na vlastnosti mléčné užitkovosti pomocí této metody nebyl potvrzen. I když se hodnoty p přibližují hladině významnosti, $P > 0,05$ u bílkovin (%) a (kg). Ve výsledném výpočtu se rozdílnosti mezi genotypy neprojevují. Důvod pro neprokázání korelace genotypů *CSN1S1* v naší studii může být způsoben genetickou stavbou sledovaných populací a silně nevyváženým genotypovým rozdělením mezi populacemi, zejména genotypu *BC*.

Tabulka 6: Popisná statistika pro mléčnou užitkovost

Genotyp	Mléko, kg		Bílkoviny, %		Bílkoviny, kg		Tuk, %		Tuk, kg	
	průměr	s _x	průměr	s _x	průměr	s _x	průměr	s _x	průměr	s _x
<i>BB</i> n=425	8301	2155	3.50	0.23	287.71	66.28	4.17	0.37	344.85	90.45
<i>BC</i> n=54	7029	1093	3.56	0,16	250.09	37.63	4.22	0.26	297.30	51.91

Tabulka 7: Mléčná užitkovost v závislosti na genotypu *CSNISI*

Genotyp	n	Mléko kg		Bílkoviny %		Bílkoviny kg		Tuk %		Tuk kg	
		LSM±SE	p	LSM±SE	p	LSM±SE	p	LSM±SE	p	LSM±SE	p
<i>BB</i>	425	8210±103	0.07	3.491±0,014	0.86	284.2±3.286	0.06	4.17±0.021	0.59	340.21±3.882	1.15
<i>BC</i>	54	7728±262		3.496±0,034		268.18±8.397		4.20±0.060		324,74±10,37 1	

Z tabulek je patrné, že polymorfismus *CSNISI* ve velké míře ukazatele mléčné užitkovosti neovlivňuje. Některé studie uvádějí vyšší procentuální zastoupení bílkovin a tuků v mléce u genotypu *BC* Schopen *et al.* (2009), Bonfatti *et al.* (2011). V našem pozorování však výrazné rozdíly zaznamenány nebyly. Mírné odchylky u genotypů lze sledovat v obsahu tuku (kg) a obsahu bílkovin (kg), kdy se dojnice s genotypem *BB* vyznačovaly vyšší produkcí sledovaných parametrů.

Podobné výsledky zaznamenala i Kučerová *et al.* (2011), která uvádí vyšší produkci tuků, bílkovin a celkového množství mléka v kg u genotypu *BB* oproti genotypu *BC*. V procentuálních údajích se obsah jednotlivých složek lišil minimálně. Podobně jako v naší studii. Ve studii Żukiewicz *et al.* (2012), která porovnávala různé předchozí analýzy, byl zaznamenán vliv genotypů *CSNISI* na mléčnou užitkovost, kde byl vliv genotypu *BB* minimální nebo zcela bez efektu. Odchylky v naší studii lze vysvětlit, malým počtem vzorků pro genotypizaci. Obzvlášť při genotypu *BC*, kdy bylo posouzeno pouze 54 vzorků.

Studie, kterou uvedl Ardici *et al.* (2018), byly zjištěny podobné výsledky. Sledoval celkový mléčný výtěžek, množství bílkovin a tuků v mléce v kg a %, asociace. Korelace mezi ukazateli mléčné užitkovosti a genotypy *BB* a *BC* nebyla nalezena.

Podobné údaje publikoval i Van Eenennaam *et al.* (1991), který sledoval všechny geny kaseinového komplexu, nezaznamenal prokazatelné rozdíly mezi genotypem a složením ukazatelů mléčné užitkovosti. Uvedl, že by alely *CSN1S1* neměly být zařazovány mezi šlechtitelské cíle pro ukazatele jakosti mléka. Šlechtitelé by se měli více zaměřit na alely genů *CSN2* a *CSN3*. Na rozdíl od předchozích studií Boettcher *et al.* (2004) zjistila rozdíly mezi genotypy genu *CSN1S1* a ukazateli mléčné užitkovosti. Avšak asociace zjišťovala vliv haplotypu nikoli jednotlivých genů.

4.4 Vliv genotypu alfa s-1 kaseinu na technologické vlastnosti mléka

Pro analýzu vlivu genu *CSN1S1* na technologické vlastnosti mléka, zejména syřitelnosti, byly zvoleny tyto ukazatele:

- Jogurtový test (ml NaOH)
- Alkoholové číslo (ml C₂H₅OH)
- Čas sýření (subjektivně)
- Čas sýření (přístrojově)

Pro výpočty byly zvoleny smíšené lineární modely, samotný výpočet proběhl pomocí metody REML. Byly vyzkoušeny modely se zařazením různých kombinací efektů a následně vybrána nejlepší kombinace. Samostatný efekt plemene byl pro všechny testované vlastnosti neprůkazný a nebyl započítán do výsledných efektů. Popisné statistiky jsou v tab. č. 8. Výsledky statistické analýzy uvádí tab. č. 9.

Tabulka 8: Popisné statistiky pro technologickou jakost mléka

Genotyp	Jogurtový test, ml NaOH			Syřitelnost subjektivně vteřiny			Syřitelnost přístrojově vteřiny			Alkoholový test ml alkoholu		
	n	průměr	s _x	n	průměr	s _x	n	průměr	s _x	n	průměr	s _x
<i>BB</i>	405	14,87	3,91	436	492,53	213,37	408	312,88	132,13	414	1,02	1,05
<i>BC</i>	54	15,72	4,45	57	447,82	200,84	52	284,65	145,32	55	0,71	0,24

Tabulka 9: Ukazatele technologické vlastnosti mléka v závislosti na genotypu *CSN1S1*

Genotyp	Jogurtový test ml NaOH			Syřitelnost subjektivně vteřiny			Syřitelnost přístrojově vteřiny			Alkoholový test ml alkoholu		
	n	LSM±SE	p	n	LSM±SE	p	n	LSM±SE	p	n	LSM±SE	p
<i>BB</i>	405	15.24 ^a	0.025*	436	470.37	0.764	408	322.60	0,597	414	1,011	0.563
<i>BC</i>	54	13.87 ^b		57	482.75		52	334.71		55	0.896	

Pro hodnocení technologické jakosti mléka bylo použito N=425 vzorků stejně jako u předchozího měření na mléčné vlastnosti. V tab. č. 9, která udává hodnoty pomocí statistické metody nemějších čtverců lze pozorovat nepříliš velký vliv genu *CSN1S1* na technologické vlastnosti mléka. Data u alkoholového testu a obou testů syřitelnosti ukazují, že u námi sledované populace dojníc nedochází k významným rozdílům ve spojitosti mezi jednotlivými genotypy a syřitelností. Avšak tendenci můžeme pozorovat při stanovení kysací schopnosti mléka v jogurtovém testu, kdy se rozdíly mezi genotypy liší téměř o 1,1.

Podobně jako u ukazatelů mléčné užitkovosti, tak i u technologických vlastností mléka, byl zvolen statistický výpočet pomocí metody nejmenších čtverců pro dosažení nejpresnějších výsledků. Avšak hodnota P se ani u ukazatelů syřitelnosti (měřená přístrojově i subjektivně) a alkoholového testu nepřibližuje hladině významnosti > 0,05, tedy vliv genotypu v lokusu *CSN1S1* na technologickou jakost mléka nebyl prokázán.

Odlíšná situace nastala při otestování vzorků mléka na kysací schopnost jogurtovým testem. U genotypu *BB* byl rozdíl téměř o 2 ml oproti *BC*, tím pádem *BC* genotyp udává vyšší rychlost kysání v mléce od dojníc s *BC* než *BB*.

Vliv genotypů na čas sýření uvádí Poulsen *et al.* (2013), kdy genotyp *BC* měl kratší čas sýření a rychlejší zpevnění sýřeniny oproti *BB*. Bonfatti *et al.* (2011) uvádí podobné výsledky u testů na syřitelnost a pevnosti sýřeniny. Také uvádí, že α -s1-*CN* může být v určité korelaci s jinými alelami genů z kaseinové rodiny pro ještě lepší výsledky testů syřitelnosti. Nejlepší hodnocení vykazuje ve spojení s *CSN1S2*, kdy dochází k nejlepším výsledkům RCT (rychlost koagulace sýřeniny).

Naše studie vliv na syřitelnost neprokázala. Vliv genotypů na syřitelnost v naší populaci mohl být ovlivněn různými vlivy, to především malým počtem testovaných vzorků, a to zejména u *BC*, byl by potřebný vyšší počet jedinců s tímto genotypem. Nicméně na základě našich výsledků i předchozích analýz lze mít za to, že vliv polymorfismu v genu *CSN1S1* na ukazatele syřitelnosti není významný.

Studie Jõudu *et al.* (2009) uvádí, že určitá kombinace haplotypů α S1- *CN*, β - *CN*, and κ -*CN*, a β -Lg, vede ke zkrácení doby sýření a rychlejšímu formování sýřeniny. Také více studií uvádí, že na technologické znaky mléka mají větší vliv genotypy *CSN2* a *CSN3*, vlivy jsou také u těchto genů více prozkoumány Ikonen *et al.* (2004), Penasa *et al.* (2010), Azevedo *et al.* (2008)

4.5 Vliv interkace genotyp x plemeno na mléčnou užitkovost

Některé mutace, které zapříčiňují vznik polymorfismu, mohou mít u konkrétních plemen různý projev i když je genotyp stejný. Proto byl pro větší porozumění vlivu polymorfních variant v genu *CSN1S1* stanoven a následně do statistiky započítán, i vliv plemene a faktor (plemeno x genotyp). Modelové rovnice pro výpočet jsou uvedeny v kapitole 3.4.1 Modelové rovnice.

Skupiny podle plemen byly vytvořeny následovně:

Skupina C100 zahrnovala: a) C100
b) Křížence C + R, A, X, H podílem C vyšším jak 75%

Skupina H100 zahrnovala: a) H100
b) Křížence H + X, C podílem H vyšším jak 75 %

Skupina X zahrnovala: křížence, kde podíl hlavního plemene byl nižší než 75 %

Počty ve skupinách pro vyhodnocení mléčné užitkovosti: C100 306 ks, H100 164 ks, X 14ks, N 484.

Tabulka 10: Ukazatele mléčné užitkovosti v závislosti na genotypu *CSN1S1* ovlivněným faktorem plemene.

Genotyp	Plemeno	Mléko		Bílkoviny (%)		Bílkoviny (kg)		Tuk (%)		Tuk (kg)	
		LSM±SM	p	LSM±SM	p	LSM±SM	p	LSM±SM	p	LSM±SM	p
BB	C100	7748±229	0.2178	3.562±0.031	0.7683	274.4±7.442	0.175	4.155±0.051	0.923	320.10±8.950	0.2148
BB	H100	8966±357		3.370±0.047		299.9±11.546		4.154±0.082		373.14±14.238	
BB	X	7926±521		3.608±0.068		285.4±16.83		4.256±0.121		335.06±20.900	
BC	C100	7398±332		3.570±0.044		262.8±10.77		4.196±0.074		310.50±13.073	
BC	H100	7455±938		3.342±0.123		247.14±30.30		4.217±0.220		316.62±37.644	

Efekt interakce genotyp x plemeno byl shledán jako nevýznamný ve všech sledovaných parametrech.

4.6 Vliv interakce genotyp x plemeno na technologické vlastnosti mléka

Pro větší porozumění vlivu polymorfních variant v genu *CSN1S1* na technologické vlastnosti mléka byl stanoven a následně do statistiky započítán i vliv plemene a interakce plemeno x genotyp. Modelové rovnice pro výpočet jsou opět uvedeny v kapitole 3.4.1 Modelové rovnice.

Skupiny plemen byly stejné jako v kapitole 4.5

Počty ve skupinách pro vyhodnocení technologických vlastností mléka C100 306 ks, H100 186 ks, X 13 ks, N 505 ks.

Tabulka 11: Ukazatele technologických vlastností mléka v závislosti na genotypu *CSN1S1* ovlivněným faktorem plemene.

Genotyp	Plemeno	Jogurtový test (ml NaOH)		Vločkovitost - subjektivně (vteřiny)		Vločkovitost přístrojově (vteřiny)		Alkoholový test (ml alkoholu)	
		LSM±SM	p	LSM±SM	p	LSM±SM	p	LSM±SM	p
BB	C100	16.53±0.537	0.2634	573.1±50.56	0.281	309.1±30.43	0.2461	1.055±0.247	0.546
BB	H100	14.47±0.392		416.1±59.81		343.5±35.93		0.870±0.374	
BB	X			548±91.192		278.8±57.14			
BC	C200	15.55±0.779		571.4±63.29		308.6±37.44		1.030±0.316	
BC	H200	11.85±1.317		577.7±156.0		434.5±82.60		0.525±0.584	

Také u technologických vlastností mléka byl efekt plemene neprůkazný i jako interakce genotyp x plemeno. Lepší výsledky nabízely modely bez interakce.

U testu vločkovitosti subjektivně byl efekt interakce s efektem bez interakce srovnatelný. Pro naši studii ovšem nepřináší zásadně odlišné výsledky.

4.7 Vliv interakce genotyp x farma na sledované vlastnosti mléka

Pro získání více informací ohledně genotypových variant a jejich vlivu na sledované vlastnosti byl sestaven vliv farmy na genotyp *CSN1S1*. Vliv farmy symbolizuje prostředí, ve kterém dojnice žijí, to se může mezi jednotlivými farmami v různých ohledech lišit. Rozdílné prostředí ovlivňuje expresi různých genů a jejich účinek. Prostředí bylo zařazeno do rovnic a vyhodnoceno. U námi sledovaných genotypů však vliv farmy pozorován nebyl. Výsledky můžeme odůvodnit nízkou rozdílností v prostředí mezi jednotlivými farmovými chovy.

5. Závěr

Cílem práce bylo genotypizovat vybranou populaci dojnic českého strakatého skotu a holštýnského skotu pro polymorfismus v lokusu *CSN1S1*. Pro genotypizaci byly použity metody PCR, nested PCR a RFLP. Pro štěpení PCR produktů byla použita restriční endonukleáza *HphI*. Druhým cílem bylo určit frekvence genotypů ve sledované populaci a zhodnotit vliv výsledných genotypů na technologické vlastnosti mléka.

Genotypové frekvence byly zastoupeny v nepřiměřeném poměru vůči genotypu *BC*, který se v celosvětovém měřítku vyskytuje v menším množství. Nebyl zjištěn statisticky významný vliv genotypu v genu *CSN1S1* na ukazatele mléčné užitkovosti. Rovněž u ukazatelů technologické jakosti mléka nebyl statisticky významný vliv prokázán. Výjimka zde byla kysací schopnost mléka (jogurtový test). Dále nebyla zjištěna interakce mezi genotypem a plemenem, jak u ukazatelů mléčné užitkovosti, tak u technologické jakosti mléka, tzn. genotyp v *CSN1S1* genu má stejný efekt u holštýnského i českého strakatého skotu. Vliv genotyp x farma také nebyl potvrzen.

Závěrem lze konstatovat, že sledovaný polymorfismus v genu *CSN1S1* nemá na ukazatele mléčné užitkovosti a technologické jakosti mléka významný vliv. Gen *CSN1S1* byl ale zatím analyzován méně často, než ostatní geny kódující mléčné proteiny. Bylo by proto vhodné analýzy opakovat a rovněž jej analyzovat jako součást haplotypu ostatních kaseinových genů.

6. Seznam zkratek

MCP – koagulační vlastnosti mléka

RCT – čas pevnosti sýřeniny

SNP – jednonukleotidový polymorfismus

QTL – lokusy kvantitativních vlastností

MAS – Marked asistation selection

BTA – *Bos taurus* autozóm

REML – maximální odhad pravděpodobnosti

CN – kasein

CSN1S1 – alpha s1 kasein

CSN1S2 – alpha s2 kasein

CSN2 – beta kasein

CSN3 – kappa kasein

PCR – polymerázová řetězová reakce

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

ELFO – gelová elektroforéza

7. Citovaná literatura

- ABDEL DAYEM, A.M.H., Karima Gh.M. MAHMOUD, M.F. NAWITO, M.M. AYOUB a Samah F. DARWISH, 2009. Genotyping of kappa-casein gene in Egyptian buffalo bulls. *Livestock Science* [online]. **122**(2-3), 286-289. DOI: 10.1016/j.livsci.2008.09.010. ISSN18711413.
- ADAMOV, Nikola, Branko ATANASOV, Ksenija ILIEVSKA, Martin NIKOLOVSKI, Monika DOVENSKA, Vladimir PETKOV a Toni DOVENSKI, 2020. Allele and Genotype Frequencies of the Kappa-Casein (CSN3) locus in Macedonian Holstein-Frisian Cattle. *Macedonian Veterinary Review*. Skopje, **2**(43). DOI: 10.2478/macvetrev-2020-0013.
- ALEANDRI, R., L.G. BUTTAZZONI, J.C. SCHNEIDER, A. CAROLI a R. DAVOLI, 1990. The Effects of Milk Protein Polymorphisms on Milk Components and Cheese-Producing Ability. *Journal of Dairy Science*. **73**(2), 241-255. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(90)78667-5. ISSN 00220302.
- ANGGRAENI, A, C SUMANTRI, A FARAJALLAH a E ANDREAS, 2010. Kappa-Casein Genotypic Frequencies in Holstein-Friesian Dairy Cattle in West Java Province. *Media Peternakan*. **33**(2), 61-67. DOI: 10.5398/medpet.2010.33.2.61. ISSN 01260472.
- ARDICLI, Sena, Bahadir SOYUDAL, Hale SAMLI, Deniz DINCEL a Faruk BALCI, 2018. Effect of STAT1, OLR1, CSN1S1, CSN1S2 , and DGAT1 genes on milk yield and composition traits of Holstein breed. *Revista Brasileira de Zootecnia*. **47**(0). DOI: 10.1590/rbz4720170247. ISSN 1806-9290.
- AZEVEDO, A.L.S., C.S. NASCIMENTO, R.S. STEINBERG et al., 2008. Genetic polymorphism of the kappa-casein gene in Brazilian cattle. *Genetics and Molecular Research*. **7**(3), 623-630. DOI: 10.4238/vol7-3gmr428. ISSN 16765680.
- BITTANTE, G., M. PENASA a A. CECCHINATO, 2012. Invited review: Genetics and modeling of milk coagulation properties. *Journal of Dairy Science* [online]. **95**(12), 6843-6870. DOI: 10.3168/jds.2012-5507. ISSN 00220302.
- BOETTCHER, P.J., A. CAROLI, A. STELLA, S. CHESSA, E. BUDELLI, F. CANAVESI, S. GHIROLDI a G. PAGNACCO, 2004. Effects of Casein Haplotypes on Milk Production Traits in Italian Holstein and Brown Swiss Cattle. *Journal of Dairy Science* [online]. **87**(12), 4311-431. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73576-6. ISSN 00220302.
- BOICHARD, Didier, Cécile GROHS, Florence BOURGEOIS et al., 2003. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*. **35**(1), 77-101. DOI: 10.1051/gse:2002037. ISSN 0999-193X.
- BONFATTI, V., A. CECCHINATO, L. GALLO, A. BLASCO a P. CARNIER, 2011. Genetic analysis of detailed milk protein composition and coagulation properties in Simmental cattle. *Journal of Dairy Science*. **94**(10), 5183-5193. DOI: 10.3168/jds.2011-4297. ISSN 00220302.

- BONFATTI, V., M. GERVASO, R. ROSTELLATO, A. COLETTA a P. CARNIER, 2013. Protein composition affects variation in coagulation properties of buffalo milk. *Journal of Dairy Science*. **96**(7), 4182-4190. DOI: 10.3168/jds.2012-6333. ISSN 00220302.
- BOVENHUIS, Henk, Johan A.M. VAN ARENDONK a Siem KORVER, 1992. Associations Between Milk Protein Polymorphisms and Milk Production Traits. *Journal of Dairy Science* [online]. **75**(9), 2549-2559. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(92)780175. ISSN 00220302.
- BROWN, T. A., 2007. *Klonování genů a analýza DNA: úvod*. První. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 978-802-4417-196.
- CAROLI, A., S. CHESSA, F. CHIATTI, D. RIGNANESE, B. MELÉNDEZ, R. RIZZI a G. CERIOTTI, 2008. Short Communication: Carora Cattle Show High Variability in α s1-Casein. *Journal of Dairy Science*. **91**(1), 354-359. DOI: 10.3168/jds.2007-0420. ISSN 00220302.
- CAROLI, A.M., S. CHESSA a G.J. ERHARDT, 2009. Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle. *Journal of Dairy Science*. **92**(11), 5335-5352. DOI: 10.3168/jds.2009-2461. ISSN 00220302.
- CASHMAN, Kevin D., 2006. Milk minerals (including trace elements) and bone health. *International Dairy Journal*. **16**(11), 1389-1398. DOI: 10.1016/j.idairyj.2006.06.017. ISSN 09586946.
- COMIN, A., M. CASSANDRO, S. CHESSA et al., 2008. Effects of Composite β - and κ -Casein Genotypes on Milk Coagulation, Quality, and Yield Traits in Italian Holstein Cows. *Journal of Dairy Science*. **91**(10), 4022-4027. DOI: 10.3168/jds.2007-0546. ISSN 00220302.
- DAVEY, John W., Paul A. HOHENLOHE, Paul D. ETTER, Jason Q. BOONE, Julian M. CATCHEN a Mark L. BLAXTER, 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics* [online]. **12**(7), 499-510. DOI: 10.1038/nrg3012. ISSN 1471-0056.
- DAVIS, Richard C. L. a James K. DRACKLEY, 1998. *The Development, Nutrition, and Management of the Young Calf*. First. Ames: Iowa State University Press. ISBN 0813829801.
- DO, Andrew B., Kristina WILLIAMS, Ondulla T. TOOMER a Gudrun A. BROCKMANN, 2016. In vitro digestibility and immunoreactivity of bovine milk proteins. *Food Chemistry*. **190**, 581-587. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.05.113. ISSN 03088146.
- DOLEŽAL, Oldřich, 2000. *Mléko, dojení, dojírny*. 1.vyd. Praha: Agrospoj.
- ELSIK, C. G., R. L. TELLAM, K. C. WORLEY et al., 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science*. **324**(5926). DOI: 10.1126/science.1169588. ISSN 0036-8075.

FANG, Z.H., M.H.P.W. VISKER, G. MIRANDA, A. DELACROIX-BUCHET, H. BOVENHUIS a P. MARTIN, 2016. The relationships among bovine α S-casein phosphorylation isoforms suggest different phosphorylation pathways. *Journal of Dairy Science* [online]. **99**(10), 8168-8177. DOI: 10.3168/jds.2016-11250. ISSN 00220302.

FARRELL, H.M., R. JIMENEZ-FLORES, G.T. BLECK et al., 2004. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. *Journal of Dairy Science*. **87**(6), 1641-1674. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6. ISSN 00220302.

GALLINAT, J.L., S. QANBARI, C. DRÖGEMÜLLER, E.C.G. PIMENTEL, G. THALLER a J. TETENS, 2013. DNA-based identification of novel bovine casein gene variants. *Journal of Dairy Science*. **96**(1), 699-709. DOI: 10.3168/jds.2012-5908. ISSN 00220302.

GIBBS, R. A., J. F. TAYLOR, C. P. VAN TASSELL et al., 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science*. **324**(5926). DOI: 10.1126/science.1167936. ISSN 0036-8075.

GUIMARÃES, Elcio P., 2007. *Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. ISBN 978-92-5-105717-9.

HANUŠ, O et.al, 2008. *Výrobní zemědělská praxe a potravinářské biotechnologické úpravy pro zvýraznění pozitivních zdravotních vlivů mléka a mléčných výrobků: sborník příspěvků = Agricultural Production Practice and Food Biotechnological Manipulations for Support of Positive Health Impacts of Milk and Milk Products : proceedings of contributions : Rapotín, 8.10.2008*. Rapotín: Výzkumný ústav pro chov skotu. ISBN 978-80-87144_03-9.

HAYES, Ben J., Harris A. LEWIN a Michael E. GODDARD, 2013. The future of livestock breeding: genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends in Genetics*. **29**(4), 206-214. DOI: 10.1016/j.tig.2012.11.009. ISSN 01689525.

HECK, J.M.L., A. SCHENNINK, H.J.F. VAN VALENBERG, H. BOVENHUIS, M.H.P.W. VISKER, J.A.M. VAN ARENDONK a A.C.M. VAN HOOIJDONK, 2009. Effects of milk protein variants on the protein composition of bovine milk. *Journal of Dairy Science*. **92**(3), 1192-1202. DOI: 10.3168/jds.2008-1208. ISSN 00220302.

HORNE, David S, 2002. Casein structure, self-assembly and gelation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* [online]. **7**(5-6), 456-461 [cit. 2020-04-05]. DOI: 10.1016/S1359-0294(02)00082-1. ISSN 13590294.

HRISTOV, P.I, D.R TEOFANOVA, B.S NEOV, L.I ZAGORCHEV a G.A RADOSLAVOV, 2014b. Population structure of two native Bulgarian cattle breeds with regard to CSN3 and CSN1S1 gene polymorphism. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. Stara Zagora: Faculty of Veterinary Medicine, Trakia University, **17**(1), 18-24. ISSN 1311-1477.

HRISTOV, P., D. TEOFANOVA, I. MEHANDZHIYSKI, A. YOVEVA a G. RADOSLAVOV, 2014a. Genotyping of Endemic for Rhodopa Mountains Shorthorn Rhodopean Cow Breed. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* [online]. **26**(1), 12-15. DOI: 10.5504/50YRTIMB.2011.0003. ISSN 1310-2818.

IANNUZZI, L., 1996. G- and R-banded prometaphase karyotypes in cattle (*Bos taurus* L.). *Chromosome Research*. **4**(6), 448-456. DOI: 10.1007/BF02265052. ISSN 0967-3849.

IBEAGHA-AWEMU, E.M., E.-M. PRINZENBERG, O.C. JANN, G. LÜHKEN, A.E. IBEAGHA, X. ZHAO a G. ERHARDT, 2007. Molecular Characterization of Bovine CSN1S2B and Extensive Distribution of Zebu-Specific Milk Protein Alleles in European Cattle. *Journal of Dairy Science*. **90**(7), 3522-3529. DOI: 10.3168/jds.2006-679. ISSN 00220302.

IKONEN, T., S. MORRI, A.-M. TYRISEVÄ, O. RUOTTINEN a M. OJALA, 2004. Genetic and Phenotypic Correlations Between Milk Coagulation Properties, Milk Production Traits, Somatic Cell Count, Casein Content, and pH of Milk. *Journal of Dairy Science* [online]. **87**(2), 458-467. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73185-9. ISSN 00220302.

JELÍNEK, Pavel a Karel KOUDELA, 2003. *Fyziologie hospodářských zvířat*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7644-1.

JÕUDU, Ivi, Merike HENNO, Sirje VÄRV, Haldja VIINALASS, Tõnu PÜSSA a Tanel KAART, 2009. THE EFFECT OF MILK PROTEINS ON MILK COAGULATION PROPERTIES IN ESTONIAN DAIRY BREEDS. *VETERINARIJA IR ZOOTECHNIKA*. Estonian University of Life Sciences, Institute of Veterinary Medicine and Animal Sciences, **68**(46), 14-19. ISSN 1392-2130.

KALACĚ, Pavel, 2001. *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. ISBN 80-704-0520-1.

KAMIŃSKI, Stanisław, Anna CIEŚLIŃSKA a Elżbieta KOSTYRA, 2007. Polymorphism of bovine beta-casein and its potential effect on human health. *Journal of Applied Genetics* [online]. **48**(3), 189-198. DOI: 10.1007/BF03195213. ISSN 1234-1983.

KHATKAR, Mehar S., Peter C. THOMSON, Imke TAMMEN a Herman W. RAADSMA, 2004. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: review and meta-analysis. *Genetics Selection Evolution*. **36**(2), 163-190. DOI: 10.1051/gse:2003057. ISSN 0999193X.

KISHORE, Amit, M. SODHI, M. MUKESH, B. P. MISHRA a R. C. SOBTI, 2013. Sequence analysis and identification of new variations in the 5'-flanking region of α S2-casein gene in Indian zebu cattle. *Molecular Biology Reports* [online]. **40**(7), 4473-4481. DOI: 10.1007/s11033-013-2539-x. ISSN 0301-4851.

KNOLL, Aleš a Zuzana VYKOUKALOVÁ, 2002. *Molekulární genetika zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů)*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7616-6.

- KOCZAN, Dirk, G. HOBOM a H.M. SEYFERT, 1991. Genomic organisation of the bovine alpha-S1 casein gene. *Nucleic Acids Research* [online]. **19**(20), 5591-5596. DOI: 10.1093/nar/19.20.5591. ISSN 0305-1048.
- KOLBEHDARI, D., Z. WANG, J.R. GRANT et al., 2008. A Whole-Genome Scan to Map Quantitative Trait Loci for Conformation and Functional Traits in Canadian Holstein Bulls. *Journal of Dairy Science*. **91**(7), 2844-2856. DOI: 10.3168/jds.2007-0585. ISSN 00220302.
- KUČEROVÁ, J., A. MATĚJÍČEK, Jandurová OM et al., 2011. Milk protein genes CSN1S1, CSN2, CSN3, LGB and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science* [online]. **51**(6), 241-247. DOI: 10.17221/3935-CJAS. ISSN 12121819.
- LIEN, Sigbjørn, Stanisław KAMIŃSKI, Peter ALESTRÖM a Sissel ROGNE, 1993. A Simple and Powerful Method for Linkage Analysis by Amplification of DNA from Single Sperm Cells. *Genomics* [online]. **16**(1), 41-44. DOI: 10.1006/geno.1993.1137. ISSN 08887543.
- LÜHKEN, G., A. CAROLI, E. M. IBEAGHA-AWEMU a G. ERHARDT, 2009. Characterization and genetic analysis of bovine α s1 -casein I variant. *Animal Genetics* [online]. **40**(4), 479-485. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2009.01861.x. ISSN 02689146.
- MARTIN, Patrice, Ma?gorzata SZYMANOWSKA, Lech ZWIERZCHOWSKI a Christine LEROUX, 2002. The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminant milks. *Reproduction Nutrition Development*. **42**(5), 433-459. DOI: 10.1051/rnd:2002036. ISSN 0926-5287.
- MARVAN, František, 2017. *Morfologie hospodářských zvířat*. Vydání šesté. Praha: Česká zemědělská univerzita v Praze v nakladatelství Brázda. ISBN 978-80-213-2751-1.
- MATOUŠEK, Václav a kol., 1996. *Speciální zootechnika*. První. České Budějovice: JU ZF České Budějovice. ISBN 80-7040-153-3.
- MEIER, Saskia, Paula KORKUĆ, Danny ARENDS a Gudrun A. BROCKMANN, 2019. DNA Sequence Variants and Protein Haplotypes of Casein Genes in German Black Pied Cattle (DSN). *Frontiers in Genetics*. **10**. DOI: 10.3389/fgene.2019.01129. ISSN 1664-8021.
- MICHELIZZI, Vanessa N., Xiaolin WU, Michael V. DODSON, Jennifer J. MICHAL, Jorge ZAMBRANO-VARON, Derek J. MCLEAN a Zhihua JIANG, 2011. A Global View of 54,001 Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) on the Illumina BovineSNP50 BeadChip and Their Transferability to Water Buffalo. *International Journal of Biological Sciences* [online]. **7**(1), 18-27. DOI: 10.7150/ijbs.7.18. ISSN 14492288.

- MILUCHOVÁ, M., A. TRAKOVICKÁ a M. GÁBOR, 2009. Analysis of polymorphism of alpha s1 casein of Slovak Pinzgau cattle by PCR-RFLP. : *Lucrări Științifice - Zootehnie și Biotehnologii, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara*. Timișoara: Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară a Banatului Timișoara, **42**(2), 284-287. ISSN 1221-5287.
- MULLIE, Patrick, Cécile PIZOT a Philippe AUTIER, 2016. Daily milk consumption and all-cause mortality, coronary heart disease and stroke. *BMC Public Health*. **16**(1). DOI: 10.1186/s12889-016-3889-9. ISSN 1471-2458.
- NG-KWAI-HANG, K. F. a F. GROSCLAUDE, 2003. Genetic Polymorphism of Milk Proteins. *Advanced Dairy Chemistry—1 Proteins*. Boston, MA: Springer US, 739-816. DOI: 10.1007/978-1-4419-8602-3_22. ISBN 978-0-306-47271-8.
- NG-KWAI-HANG, K.F., H.G. MONARDES a J.F. HAYES, 1990. Association Between Genetic Polymorphism of Milk Proteins and Production Traits During Three Lactations. *Journal of Dairy Science* [online]. **73**(12), 3414-3420. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(90)79038-8. ISSN 00220302.
- NILSEN, Heidi, Hanne OLSEN, Ben HAYES, Erling SEHESTED, Morten SVENDSEN, Torfinn NOME, Theo MEUWISSEN a Sigbjørn LIEN, 2009. Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle. *Genetics Selection Evolution*. **41**(1), 41. DOI: 10.1186/1297-9686-41-24. ISSN 1297-9686.
- OGOREVC, J., T. KUNEJ, A. RAZPET a P. DOVC, 2009. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. *Animal Genetics*. **40**(6), 832-851. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2009.01921.x. ISSN 02689146.
- OIKONOMOU, G., G. MICHAILIDIS, A. KOUGIOUMTZIS, M. AVDI a G. BANOS, 2011. Effect of polymorphisms at the STAT5A and FGF2 gene loci on reproduction, milk yield and lameness of Holstein cows. *Research in Veterinary Science*. **91**(2), 235-239. DOI: 10.1016/j.rvsc.2011.01.009. ISSN 00345288.
- PENASA, M., M. CASSANDRO, D. PRETTO, M. DE MARCHI, A. COMIN, S. CHESSA, R. DAL ZOTTO a G. BITTANTE, 2010. Short communication: Influence of composite casein genotypes on additive genetic variation of milk production traits and coagulation properties in Holstein-Friesian cows. *Journal of Dairy Science* [online]. **93**(7), 3346-3349. DOI: 10.3168/jds.2010-3164. ISSN 00220302.
- POULSEN, N.A., H.P. BERTELSEN, H.B. JENSEN et al., 2013. The occurrence of noncoagulating milk and the association of bovine milk coagulation properties with genetic variants of the caseins in 3 Scandinavian dairy breeds. *Journal of Dairy Science*. **96**(8), 4830-4842. DOI: 10.3168/jds.2012-6422. ISSN 00220302.

- PRETTO, Denis, Massimo DE MARCHI, Mauro PENASA a Martino CASSANDRO, 2013. Effect of milk composition and coagulation traits on Grana Padano cheese yield under field conditions. *Journal of Dairy Research* [online]. **80**(1), 1-5. DOI: 10.1017/S0022029912000453. ISSN 0022-0299.
- PRINZENBERG, E.-M., C. WEIMANN, H. BRANDT, J. BENNEWITZ, E. KALM, M. SCHWERIN a G. ERHARDT, 2003. Polymorphism of the Bovine CSN1S1 Promoter: Linkage Mapping, Intragenic Haplotypes, and Effects on Milk Production Traits. *Journal of Dairy Science*. **86**(8), 2696-2705. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(03)73865-X. ISSN 00220302.
- REECE, William O., 2011. *Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3282-4.
- SAMKOVÁ, Eva, 2012. *Mléko: produkce a kvalita: Milk: production and quality : vědecká monografie*. 1. vyd. České Budějovice: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-383-7.
- SANDERS, K., J. BENNEWITZ, N. REINSCH, G. THALLER, E.-M. PRINZENBERG, C. KÜHN a E. KALM, 2006. Characterization of the DGAT1 Mutations and the CSN1S1 Promoter in the German Angeln Dairy Cattle Population. *Journal of Dairy Science* [online]. **89**(8), 3164-3174. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(06)72590-5. ISSN 00220302.
- SHAHLA, N Mir, Ullah OBAID a Sheikh RIAZUDDIN, 2014. Genetic polymorphism of milk protein variants and their association studies with milk yield in Sahiwal cattle. *African Journal of Biotechnology*. **13**(4), 555-565. DOI: 10.5897/AJB2013.13216. ISSN 1684-5315.
- SCHOPEN, G.C.B., J.M.L. HECK, H. BOVENHUIS, M.H.P.W. VISKER, H.J.F. VAN VALENBERG a J.A.M. VAN ARENDONK, 2009. Genetic parameters for major milk proteins in Dutch Holstein-Friesians. *Journal of Dairy Science*. **92**(3), 1182-1191. DOI: 10.3168/jds.2008-1281. ISSN 00220302.
- SKLÁDANKA, Jiří, 2014. *Chov strakatého skotu*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-258-8.
- SONSTEGARD, T. S., C. P. VAN TASSELL a M. S. ASHWELL, 2001. Dairy cattle genomics: Tools to accelerate genetic improvement?. *Journal of Animal Science*. **79**(-). DOI: 10.2527/jas2001.79E-SupplE307x. ISSN 0021-8812.
- STRAPÁK, Peter a kol., 2013. *Chov hovädzieho dobytka*. Prvé. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitr. ISBN 9788055209944.
- SUCHOCKI, T., J. SZYDA a Q. ZHANG, 2013. Modelling QTL effect on BTA06 using random regression test day models. *Journal of Applied Genetics* [online]. **54**(1), 49-60. DOI: 10.1007/s13353-012-0114-0. ISSN 1234-1983. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13353-012-0114-0>

- The nature and identification of quantitative trait loci: a community's view, 2003. *Nature Reviews Genetics*. **4**(11), 911-916. DOI: 10.1038/nrg1206. ISSN 1471-0056.
- THREADGILL, David W. a James E. WOMACK, 1990. Genomic analysis of the major bovine milk protein genes. *Nucleic Acids Research* [online]. **18**(23), 6935-6942. DOI: 10.1093/nar/18.23.6935. ISSN 0305-1048.
- TREWEEK, Teresa M., David C. THORN a William E. PRICE, 2011. The chaperone action of bovine milk α S1- and α S2-caseins and their associated form α S-casein. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **510**(1), 45-52. DOI: 10.1016/j.abb.2011.03.012. ISSN 00039861.
- URBAN, František, 1997. *Chov dojeného skotu: [reprodukce, odchov, management, technologie, výživa]*. Praha: Apros. ISBN 80-901-1007-X.
- VALLAS, M., H. BOVENHUIS, T. KAART, K. PÄRNA, H. KIIMAN a E. PÄRNA, 2010. Genetic parameters for milk coagulation properties in Estonian Holstein cows. *Journal of Dairy Science* [online]. **93**(8), 3789-3796. DOI: 10.3168/jds.2009-2435. ISSN 00220302.
- VAN EENENNAAM, Alison a Juan Fernando MEDRANO, 1991. Milk Protein Polymorphisms in California Dairy Cattle. *Journal of Dairy Science* [online]. **74**(5), 1730-1742. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(91)78336-7. ISSN 00220302.
- VELMALA, R, J VILKKI, K ELO a A MÄKI-TANILA, 1995. Casein haplotypes and their association with milk production traits in the Finnish Ayrshire cattle. *Animal Genetics* [online]. **26**(6), 419-425. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1995.tb02694.x. ISSN 02689146.
- VIITALA, Sirja, Joanna SZYDA, Sarah BLOTT, Nina SCHULMAN, Martin LIDAUER, Asko MÄKI-TANILA, Michel GEORGES a Johanna VILKKI, 2006. The Role of the Bovine Growth Hormone Receptor and Prolactin Receptor Genes in Milk, Fat and Protein Production in Finnish Ayrshire Dairy Cattle. *Genetics*. **173**(4), 2151-2164. DOI: 10.1534/genetics.105.046730. ISSN 0016-6731.
- VISENTIN, G., A. MCDERMOTT, S. MCPARLAND, D.P. BERRY, O.A. KENNY, A. BRODKORB, M.A. FENELON a M. DE MARCHI, 2015. Prediction of bovine milk technological traits from mid-infrared spectroscopy analysis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* [online]. **98**(9), 6620-6629. DOI: 10.3168/jds.2015-9323. ISSN 00220302.
- YUDIN, N. S. a M. I. VOEVODA, 2015. Molecular genetic markers of economically important traits in dairy cattle. *Russian Journal of Genetics*. **51**(5), 506-517. DOI: 10.1134/S1022795415050087. ISSN 1022-7954.
- ZAKIZADEH, S., E.M. PRINZENBERG, M. REISSMANN, S.R. MIRAEI ASHTIANI, P. REINECKE a G. EHRARDT, 2013. CSN1S1 gene: Allele frequency, and the relationship with milk production traits in three indigenous cattle breeds and holstein. *IRANIAN JOURNAL OF APPLIED ANIMAL SCIENCE*. Department of animal science, Higher educational complex of jihad-e-agriculture, kalantari highway, mashhad, Iran, **3**(3), 497-502.

ZHANG, R. F., H. CHEN, C. Z. LEI, X. T. FANG, Y. D. ZHANG, S. R. HU a L. H. SU, 2007. Association between PCR-RFLP Polymorphisms of Five Gene Loci and Milk Traits in Chinese Holstein. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. **20**(2), 166-171. DOI: 10.5713/ajas.2007.166. ISSN 1011-2367.

ZIMIN, Aleksey V, Arthur L DELCHER, Liliana FLOREA et al., 2009. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. *Genome Biology*. **10**(4). DOI: 10.1186/gb-2009-10-4-r42. ISSN 1465-6906.

ŻUKIEWICZ, Agata et al, 2012. Genetic Factors of Milk Yield in Dairy Cattle – Advances in the Quest for Universal Markers. *Israel Journal of Veterinary Medicine*. Israel: Israel Veterinary Medical Association, 82-91.