

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BRNO 2015

NICOLA DARKWAHOVÁ



Genetické markery pro kvalitu hovězího masa
Bákalářská práce

Vedoucí práce:
prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracoval:
Nicola Darkwahová

ZADÁNÍ

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Genetické markery pro kvalitu hovězího masa vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne

Podpis:

Poděkování:

Na tomto místě si dovoluji poděkovat svému vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za odborné vedení. Nemale díky patří mé rodině a hlavně mému příteli Josefovi Bátorovi za silnou podporu při studiu.

ABSTRAKT

Bakalářská práce se zaměřuje na geny asociované se znaky ovlivňující kvalitu hovězího masa. V první části této práce jsou popsány intravitální faktory ovlivňující kvalitu masa u skotu. Druhá část práce pojednává o kandidátních genech s vlivem na kvalitu hovězího masa. Pro křehkost masa to byly geny *CAPNI* a *CAST*, pro složení mastných kyselin gen *SCD* a *FASN* a pro mramorování geny *TG* a *LEP*. V poslední části této práce jsou shrnuty poznatky o genu *LEP* a jeho asociace s marbling hovězího masa a obsahem intramuskulárního tuku.

Klíčová slova: kvalita hovězího masa, *CAPNI*, *CAST*, *SCD*, *FASN*, *TG*, *LEP*

ABSTRACT

Bachelor thesis: Genetic markers for beef quality, focuses on genes associated with traits affecting the beef quality. In the first part of this thesis the intravital factors affecting beef quality. The second part deals with candidate genes affecting the quality of beef. *CAPNI* and *CAST* were for meat tenderness, *SCD* and *FASN* for fatty acid composition and *TG* and *LEP* for marbling. In the last part of this thesis is summarized the findings of the leptin gene and its association with the marbling and intramuscular fat content.

Key words: beef quality, *CAPNI*, *CAST*, *SCD*, *FASN*, *TG*, *LEP*

1 ÚVOD	9
2 CÍL PRÁCE	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	11
3.1 MASO	11
3.1.1 Dělení masa dle stavby svaloviny.....	11
3.1.2 Kvalita masa	11
3.1.2.1 Nutriční hodnota masa.....	12
3.1.2.2 Senzorická jakost.....	13
3.1.2.3 Technologická jakost	13
3.1.2.4 Zdravotní nezávadnost masa	14
3.2 HOVĚZÍ MASO	14
3.3 VLIVY OVLIVŇUJÍCÍ KVALITU MASA	14
3.3.1 Intravitální vlivy	15
3.3.1.1 Vliv pohlaví.....	15
3.3.1.2 Vliv věku zvířat	15
3.3.1.3 Vliv výživy.....	16
3.3.1.4 Vliv způsobu chovu zvířat	16
3.3.1.5 Vliv zdravotního stavu	17
3.3.2 Postmortální vlivy	17
3.3.3 Genetické vlivy	18
3.4 GENETICKÉ MARKERY.....	19
3.4.1 Dělení genetických markerů.....	20
3.4.2 Mapování genu (genomu)	21
3.5 GENETICKÉ MARKERY ASOCIOVANÉ S PRODUKČÍ A KVALITOU HOVĚZÍHO MASA.....	22
3.5.1 Genetické markery asociované s křehkostí masa	22
3.5.1.1 gen <i>CAPN1</i>	23
3.5.1.2 gen <i>CAST</i>	23
3.5.2 Genetické markery asociované se složením mastných kyselin tuku	24
3.5.2.1 gen <i>SCD</i>	24
3.5.2.2 gen <i>FASN</i>	25
3.5.3 Mramorování masa	25
3.5.3.1 gen <i>TG</i>	26
3.5.3.2 gen <i>LFP</i>	27
3.6 MOLEKULÁRNĚ-GENETICKÉ METODY PRO DETEKCI A TESTOVÁNÍ POLYMORFISMŮ DNA.....	28
3.6.1 Elektroforéza (<i>ELFO</i>)	28
3.6.2 Polymerázová řetězová reakce (<i>PCR</i>).....	30
3.6.3 <i>PCR-RFLP</i>	31

4. ZÁVĚR.....	33
5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34
6. SEZNAM OBRÁZKŮ	41
7. SEZNAM ZKRATEK.....	42

1 ÚVOD

Hovězí maso je důležitou a oblíbenou součástí jídelníčku, a to díky vysokému obsahu bílkovin a díky chuti se těší velké oblíbenosti spotřebitelů. V posledních desetiletích však spotřeba hovězího masa klesla. V současné době je produkce hovězího masa silně ovlivněna požadavky spotřebitelů, kteří vyžadují vysoce kvalitní jatečný produkt za co nejnižší cenu. Důležité však je, aby současně byly dodržovány podmínky welfare zvířat, bezpečnost potravin a ochrany životního prostředí.

Pro dosažení vysoce kvalitního hovězího masa nám napomáhá šlechtění zvířat a studium genetik populací prostřednictvím metod molekulární genetiky. Tyto metody nám slouží k odhalení kandidátních genů na úrovni DNA. Genetické markery, které byly označeny za kandidátní, slouží pro detekci lokusu kvantitativních znaků, následné sestavení genetických map a hlavně jejich využití v praxi pro selekci zvířat při jejich šlechtění, cílem je především zvyšování kvality masa.

2 CÍL PRÁCE

Cílem předkládané bakalářské práce bylo studium genů ovlivňující kvalitu hovězího masa se zaměřením na jeho mramorování, křehkost a složení mastných kyselin. Následně je uveden ucelený přehled o kandidátních genech s asociací na kvalitu hovězího masa.

Součástí této práce je i shrnutí informací o genu *LEP* ovlivňujícího obsah intramuskulárního tuku a mramorování masa.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Maso

Maso je důležitou součástí výživy člověka (Ingr, 2003). Je definováno jako všechny části těl živočichů v čerstvém nebo upraveném stavu, které je vhodné k lidské výživě (Steinhauser et al., 1995; Ingr, 2003).

3.1.1 Dělení masa dle stavby svaloviny

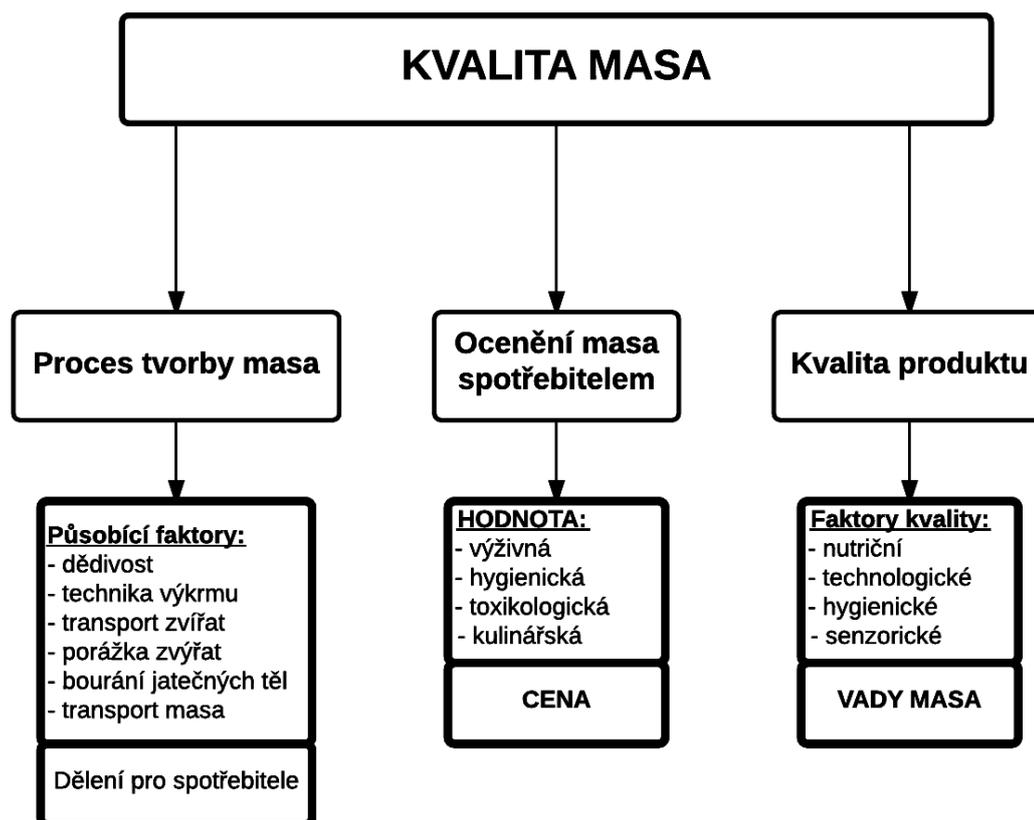
Dle stavby svaloviny se svalovina dělí na:

- **Hladká svalovina**, která je součástí vnitřních dutých orgánů těla, jako je například trávicí trakt či krevní cesta. Důležité je úspořádání hladké svaloviny v trávicím traktu zvířete, pro následné zpracování na obaly masných výrobků. Má velký podíl mezibuněčné hmoty, obsahující hlavně kolagenová a elastická vlákna (Steinhauser et al., 1995).
- **Příčně pruhovaná**, která je z technologického hlediska velmi významná. Základní stavební jednotkou jsou svalová vlákna. Vyznačuje se složitou strukturou (Steinhauser et al., 1995).

3.1.2 Kvalita masa

Kvalita masa je obvykle měřena až po porážce zvířete (Gill et al, 2010; Marschall, 1999). Určuje se na základě její zdravotní nezávadnosti, jakosti a ceně. Selhání jakéhokoliv z výše zmíněných faktorů způsobuje snížení zájmu spotřebitele o potravinu. Každý z faktorů působí na zákazníka jinak rychle, i když v první řadě je u konzumenta rozhodující při nákupu cena masa. Pro účely lidské výživy je bráno maso poživatelné, jehož jakost je výslednicí jakostních charakteristik a jejich vzájemných interakcí. Jinými slovy lze jakost masa vyjádřit jako souhrn vlastností, které by mělo maso mít pro naplnění funkcí, pro které je určen a to při nejnižší tržní ceně (Steinhauser et al., 1995).

Vzhledem k tomu, že se už v dnešní době již moderní technologie nespokojí pouze se zjištěnými jakostmi masa a jejich jednotlivými složkami, byly vyvinuty různé technické možnosti pro zjišťování jakostních znaků masa již v průběhu jatečného zpracování zvířat. Výsledky nám napomáhají při následném rozhodnutí o uplatnění masa (Steinhauser et al., 1995).



Obr.1 Hlediska hodnocení a kvality masa (Šubrt, Hrouz, 2011)

3.1.2.1 Nutriční hodnota masa

Nutriční hodnota masa je dána souhrnem obsahu energie a živin v mase a míry jejich využitelnosti lidským organismem (Steinhauser et al., 1995). Je tedy hlavně dána jeho chemickým složením, které ovlivňuje kvalitu a použitelnost nejen masa, ale i tuku. Chemickým složením nejsou myšleny jen základní komponenty, jako jsou bílkoviny, popeloviny či sušina tuku, ale i obsah esenciálních aminokyselin, poměr nasycených a nenasyčených vyšších mastných kyselin v tuku vitamínů apod. (Šubrt, Hrouz, 2011).

Maso je i důležitým zdrojem minerálních látek, tedy hlavně železa, fosforu a vápníku. Je nutné si uvědomit, že je nejen důležité tyto nutriční faktory přijímat, ale i schopnost lidského organismu ho využít (Steinhauser, 1995).

3.1.2.2 Senzorická jakost

Senzorická jakost je smyslová vlastnost masa, kterou lze označit za nejvýznamnější jakostní ukazatel, který spolu s nezávadností masa a cenou masa, rozhoduje o úspěchu masa na trhu. V první řadě spotřebitel hodnotí maso dle vzhledu, kdy velkou roli hraje právě čistota masa a jeho úprava, dále přítomnost a podíl vazivových tkání, prarostlost masa tukem, poměr svalové, tukové a případně kosterní tkáně a v neposlední řadě barva masa (Steinhauser et al., 1995).

Intenzita barvy masa je podmíněna obsahem myoglobinu a hemoglobinu ve svalové tkáni, který je podmíněn věkem, pohlavím, druhem i plemenem zvířete. Prarostlostí masa tukem myslíme jeho mramorování, kdy se hodnotí zejména rozložení a velikost tukových kapének mezi svalovými snopci (Šubrt, Hrouz, 2011). Chuť a vůni masa lze hodnotit až po jeho tepelné úpravě. Při chuti se hodnotí hlavně textura a šťavnatost masa (Steinhauser et al., 1995).

3.1.2.3 Technologická jakost

Technologická jakost vychází ze dvou základních hledisek. Na jednu stranu musí jakost masa umožňovat dosažení ekonomických předpokladů produkce masných výrobků a na druhou stranu musí umožnit dosáhnout výrobku takové jakosti, aby na trhu mohly být konkurenceschopné (Steinhauser et al., 1995). Technologické zpracování úzce souvisí s biochemickými procesy probíhající v mase po porážce zvířete. Většinou jsou ovlivňovány rychlostí poklesu pH v mase, obsahem tuku a například i obsahem vazivových tkání. K těmto faktorům je však důležité zařadit i vliv dopravy, příprava zvířete na porážku, způsob porážky, zpracování zvířat na jatkách a další (Šubrt, Hrouz, 2011).

3.1.2.4 Zdravotní nezávadnost masa

Základním prvkem rozhodující o vhodnosti a použitelnosti masa je jeho zdravotní nezávadnost (Steinhauser et al., 1995). Přítomnost mikroorganismů a reziduí látek v zemědělské výrobě jsou negativními faktory mající vliv na trvanlivost masa a masných výrobků. Jsou to hygienicko-toxiologické faktory, které mohou ovlivňovat kvalitu a zdravotní nezávadnost masa (Steinhauser et al., 1995; Šubrt, Hrouz 2011).

3.2 Hovězí maso

Hovězí maso bylo nejvíce konzumovaným masem do šedesátých let minulého století. Od poloviny šedesátých let se jeho spotřeba postupně snižovala, důsledkem bylo šlechtění prasat pro vysokou zmasilost a nižší protučnělost masa. Od devadesátých let bylo množství konzumace hovězího masa byla nižší než konzumace drůbežího masa, jenž produkuje ekonomicky a s lepšími senzoryckými a kulinárními vlastnostmi. Avšak hlavními faktory přispívající ke změně spotřeby hovězího masa, tedy poklesu jeho spotřeby, jsou rozdílné produkční náklady, rozdílná plodnost zvířat a především rozdílné doby dosažení porážkové hmotnosti (Ingr, 2004). Náklady na produkci hovězího masa jsou relativně vysoké, přesto jejich vysoká cena neodpovídá požadované jakosti (Ingr,2003).

3.3 Vlivy ovlivňující kvalitu masa

V dnešní době jsou na výrobu hovězího masa a výrobky z něj kladeny čím dál vyšší nároky. Kvalita masa je ovlivňována různými faktory a to jak intravitálními, tak i postmortálními a genetickými (Ingr, 2003).

Maso mladého skotu je charakterizováno jako jemně vláknité, světlé, bledě červené, přiměřeně pevné konzistence s malým obsahem šťávy a s vazivem málo prorostlé tukem. Naproti tomu je maso dospělého skotu vyznačováno tmavě červenou barvou, silně vláknité, tuhé, suché a chudé tukem ve svalovině. Žirní voli mají hrubě vláknité maso, poměrně tuhé, živě červeně hnědé, po uskladnění tmavě cihlově červené. Maso žirných volů je silně prorostlé tukem, tudíž je na řezu mramorované (Steinhauser et al., 1995).

3.3.1 Intravitální vlivy

Intravitálními vlivy myslíme vlivy působící na zvíře během jeho života (Ingr, 2003). Tyto vlivy ovlivňují jakost masa, mění jeho vlastnosti a působí na jeho zdravotní a biologickou hodnotu včetně hygienické nezávadnosti. Mezi tyto vlivy řadíme plemenitbu, způsob výkrmu, chov, pohlaví, věk, stimulanty růstu, přítomnost cizorodých látek, zdravotní stav, použití léčiv, ale i přepravu a zacházení se zvířetem před porážkou. (Steinhauser et al., 1995).

3.3.1.1 Vliv pohlaví

Vliv pohlaví na jakost masa je dána rozdílností metabolismu organismu samic a samců (Ingr, 2003). Na rozdíl od samců metabolismus samic spotřebovává energii úsporněji a tím část své energie využije jako reverzní tuk, který bude v budoucnu sloužit pro vývoj plodu nebo překonání nepříznivých podmínek. Z toho důvodu je maso samic více tučné než maso samců (Steinhauser et al., 1995). Obecným pravidlem je, že plemena mléčného skotu dosahují pohlavní dospělosti dříve než plemena s intenzivnějším růstem svaloviny a větším tělesným rámcem, protože raná pohlavní dospělost u jalovic je korelovaná pozitivně s produkcí mléka a ukládání tuku, a negativně s tělesným rámcem a růstem svaloviny (Jakubec et al., 2010).

3.3.1.2 Vliv věku zvířat

Senzorickou i technologickou jakost masa ovlivňuje i věk zvířat, jež má u skotu velký význam (Ingr, 2003). Jedním z nejdůležitějších ukazatelů věku je vaznost masa, která se přibývajícím věkem zvířat se snižuje. S přibývajícím věkem se mění i chemické složení a dynamika růstu jednotlivých tkání (Steinhauser et al., 1995). V době růstu dochází obvykle k trojnásobnému až čtyřnásobnému zvětšení svalových vláken, což má vliv zejména na vláknitost masa (Frelich, 2001).

V období tzv. jatečné zralosti se ukončuje vývoj svaloviny a nastává růst depotního tuku, proto je toto období nejvhodnější pro porážku zvířete na produkci masa. U skotu se k jatečným účelům využívá několik jatečných kategorií. Nejmladší kategorií

jsou telata, jejichž mladé maso je méně výrazné z důvodu nízkého obsahu extraktivních látek, ale naopak má příznivé dietetické vlastnosti a lepší stravitelnost (Steinhauser et al., 1995). Nejpočetnější kategorií v ČR jsou krávy vyřazené z chovu, jež naleznou využití jako výsekové maso. Příčinou je klesající zájem o hovězí maso a rozpor spotřebitelů mezi jeho vysokou cenou a nízkou jakostí (Ingr, 2003).

3.3.1.3 Vliv výživy

Rychlost růstu jatečného skotu není důležitý pouze z biologického, ale i z ekonomického hlediska, tudíž je velmi důležitá správná výživa a krmení. Některé složky krmiva mohou výrazně zhoršovat chuť a vůni masa. Kvalita masa může být do určité míry ovlivněna nevyváženou kvantitativní a kvalitativní krmnou dávkou a tzv. monodietami (Ingr, 2003). Krmná dávka by měla být tvořena z 60-75 % výživové hodnoty objemových krmiv s 18-20 % hrubé vlákniny v sušině (Frelich, 2001).

Nevyváženost některých živin v krmné dávce způsobuje fyziologický hlad, který má za následek nedostatečnou tvorbu masa a tím zhoršení její kvality. Při výkrmu na masnou užitkovost jsou vhodná málo vodnatá krmiva s velkým obsahem extraktivních látek. Obsah tuku v krmivu může zhoršit jakost masa a sádla masného skotu, proto by jeho množství v krmivu nemělo přesáhnout 4 % obsahu krmiva. Intenzita výkrmu ovlivňuje obsah tuku v jatečně upraveném těle, kdy při neomezeném krmení se dosáhne maximálního přírůstku tělních tkání dříve a zároveň dochází k relativně vysokému obsahu tuku v jatečném těle. Restringovaným krmením se zpomalí růst a dosáhne se, při stejné jatečné hmotnosti zvířete, relativně vysokého podílu svaloviny a zároveň požadovaného obsahu tuku (Steinhauser et al., 1995).

3.3.1.4 Vliv způsobu chovu zvířat

Dalším aspektem, jenž významně ovlivňuje jakost a množství tvorby masa, je způsob chovu. Velkým rozdílem je, zda jsou zvířata chována na pastvě nebo jsou ustájená. Rozdílnost se projevuje v jejich fyzické aktivitě, intenzitě výkrmu, v rozdílném sociálním chování a sexuální aktivitě zvířat. Následkem je rozdílná ekonomika při výkrmu, rychlost růstu, chování a hlavně jakost masa. Zvířata pasená

jsou v nejpřírodnějších podmínkách a tím i lépe odolávají fyzickým i zdravotním vlivům a lépe snášejí předporážkový stres (Ingr, 2003).

Nevýhodou je, že pasený skot mívá žlutější barvu loje v důsledku vyššího obsahu karotenoidů z pastvy tzv. lipochromatóza. Ustájeným zvířatům se dostává lepší péče a díky vyšší intenzitě krmení se dosahuje vyššího hmotnostního přírůstku. Nevýhodou tohoto způsobu chovu je velký odklon od přirozených podmínek a potřeb organismu zvířete způsobených moderní technikou. Proto se v dnešní době požaduje dodržování biologických pohledů na chov zvířat. Součástí způsobu chovu je i třídění jedinců do skupin při ustájení. Při dělení by se mělo přihlížet na hmotnost, věk a plemennou příslušnost zvířete. Do takto vzniklé skupiny se již při jejich výkrmu nepřidávají další zvířata a nemělo by docházet k reorganizaci. Po dosažení požadované živé hmotnosti je celá skupina společně převedena na jatka (Steinhauser et al., 1995).

3.3.1.5 Vliv zdravotního stavu

Kromě výše uváděných vlivů je potřeba zohlednit i vliv zdravotního stavu zvířete. Zhoršený zdravotní stav zvířete negativně ovlivňuje příjem a využití krmiv, snižuje se denní přírůstek, který může vést až k nutným porážkám či k úhynům zvířat. Acidóza a ketóza jsou časté alimentární poruchy působící negativně na jakost masa. Důsledkem je nižší výtěžnost masa při bourání, maso může mít i acetonový zápach a stává se nepoživatelným. Nižší použitelnost masa zvířat napadených parazitárně mohou mít i zvířata poraněná při nakládce, přepravě, vykládce nebo v předporážkovém ustájení. Tyto zranění mají příčinu i v technických nedostacích prostředí chovu, nebo častou nedbalostí a bezohledností pracovníků v provozu (Ingr, 2003).

3.3.2 Postmortální vlivy

Hovězí maso je též ovlivňováno postmortálním zráním, které má vliv na biochemické, organoleptické a technologické vlastnosti (Šubrt et al., 2012). Postmortální procesy v mase jsou rozdílné z hlediska rychlosti, intenzity a výsledného projevu (Ingr, 2003). Nakládání s jatečným tělem poražených zvířat, zvláště jejich chlazení, vyzávání a metody zavěšení, mají též vliv na senzoricou kvalitu masa (Kuciel et al., 2004). Po usmrcení jatečného zvířete dochází k autolytickým změnám ve

svalovinně. Probíhají anaerobní podmínky, snižuje se teplota tkání, hromadí se metabolické produkty. Rozkladem glykogenu vzniká meziprodukt kyselina mléčná, která svou zvýšenou koncentrací ve svalovinně snižuje pH prostředí (Steinhauser et al., 2000).

Nízké pH v masě je často spojováno s bledou barvou, měkkostí a nízkou schopností masa vázat vodu (Marschall, 1999). Závislost barvy čerstvého masa je především v jeho pH. Dalšími procesy *post mortem*, jenž mají vliv na barvu, jsou teplota při skladování, PO₂ (parciální tlak kyslíku), ale též i druh svaloviny. Vysoké teploty a nízké pH upřednostňují autooxidaci a tvorbu metmyoglobinu. Naopak nízké teploty a vysoké PO₂ podporují pronikání kyslíku do masa a zvyšují hloubku oxymoglobinu na povrchu. Vysoké pH, které zvyšuje spotřebu kyslíku ve svalové tkáni, upřednostňuje redukci myoglobinu a s tím spojené tmavé zbarvení masa (DFD; Jakubec et al., 1998).

Tuhost či křehkost masa může být ovlivněna různými faktory. Proto je velmi důležité, aby se při ošetřování jatečného trupu po porážce dodržovala určitá pravidla. Dle Marsh a Leet (1966) rychlé chlazení masa, kdy je docilováno teploty svaloviny přibližně 10°C při pH vyšším než 6,0, vede ke zhoršení křehkosti masa. Dalšími faktory jsou například zkrácená doba *post mortem*, stáří myofibrilárních proteinů, či množství a druh pojivové tkáně. Pravidlem je, že maso mladých zvířat je křehčí než zvířat starších, protože během jejich věku dochází ke snižování obsahu kolagenu v těle. Důležité je si však uvědomovat, že obsah kolagenu není ovlivňován pouze věkem, ale i jedincem, plemenem a pohlavím (Bailey et al., 1974; Jakubec a kol., 1998).

3.3.3 Genetické vlivy

Výrazným faktorem ovlivňujícím kvalitu masa je plemenná příslušnost a genetické šlechtění, která souvisí s užitkovostí skotu. Jatečný skot se dle užitkovosti dělí na plemena mléčná, masná a s kombinovanou užitkovostí (Ingr, 2003). Šlechtěný masný užitkový typ je nejvhodnější zdrojem masa. Je hodnocen jako skot se schopností dobré produkce masa při vysoké intenzitě růstu. Charakterizuje se mohutně vyvinutým svalstvem, jemnou kostrou, vysokou jatečnou výtěžností a produkuje kvalitní maso. Avšak v dnešní době je od skotu požadována vysoká produkce mléka a současně i dobrá

kvalita masa, z toho důvodu se nejvíce využívá kombinovaný užitkový typ skotu (Frelich, 2001).

Výše popsané intravitální vlivy mohou ovlivňovat u jednotlivých zvířat pouze jejich vnější projev vlastností neboli jejich fenotyp. Avšak genotyp, jenž je genetickým základem, je dán genotypem rodičů jedince. Každý se svým genotypem pak vytváří populaci se souborem genů, který je v populaci označován jako genofond. Cílem šlechtění je pro chovatele dosažení vyššího ekonomického efektu z chovu. Přitom je důležité si uvědomit, že efekt šlechtění se projevuje až s určitým časovým zpožděním (Mikšík, Žižlavský, 2005).

Intenzita chuti, šťavnatosti a měkkosti masa jsou nejčastěji studovanými senzoryckými vlastnostmi hovězího masa, a jsou vysoce geneticky propojené navzájem (Marschall, 1999). Dřívější přehledy genetických parametrů produkce masa skotu obsahovaly mnoho vypočtených odhadů hodnot pro skladbu jatečného těla, ale relativně málo parametrů pro technologickou a senzoryckou kvalitu. Současné poznatky již zahrnují genetické parametry pro znaky přímo se vztahující na vzhled a kvalitu hovězího masa (Kuciel et al., 2004).

3.4 Genetické markery

Genetický marker je gen nebo úsek na chromozomu, kde je známa jeho konkrétní poloha a díky tomu ho lze využít jako orientační bod při mapování nových mutací. Gen, který je využit jako marker, se výrazně projevuje ve fenotypu (Dvořák et al., 2005). Mají známý způsob přenosu genetických informací. Z malého množství tkáně lze zjistit genetický marker, a to v jakémkoliv věku a pohlaví jedinců. Musí však být polymorfni. Vzhledem k tomu, že se markery vyznačují kodominantním vztahem různých alel jednoho genu, lze u nich určit i jejich heterozygotní genotyp. Neboť jsou jednoduše zjistitelné a můžeme díky nim označit lokus kvantitativních znaků neboli QTL (quantitative trait locus) a určit jejich umístění v jednotlivých chromozomech (Kuciel et al., 2004).

Na základě genotypů daných markerů lze provádět selekci rodičů s cílem vytvoření jedinců s vlastnostmi, které budou ekonomicky výhodné (Kuciel et al., 2004).

Proto není překvapením, že v dnešní době jsou markery stále více využívány pro selekci a výběr zvířat. Přesto vždy dochází k rozhodování, zda je vhodné určitou užitkovou vlastnost selektovat pomocí genetických markerů (Gazdová et al., 2007). Využívání jednotlivých markerů může být však problémem, jelikož výsledný fenotypový znak je podmíněn velkým množstvím genů, z nichž některé mají větší vliv na příslušný znak a jejich efekty při stanovení jednotlivých markerů nelze podchytit (Knoll, Vykoukalová, 2012). Pro rozhodnutí se využívá tzv. genetických zisků, které vyjadřují závislost na podílu aditivního působení genů na celou proměnlivost znaku, tedy různé produkční charakteristiky dosahují i různých hodnot koeficientu heritability (dědivosti). Z hodnoty koeficientu můžeme usoudit, z jak velké míry je znak ovlivněn genotypově, jak jej můžeme ovlivnit výživou či prostředím (Gazdová et al., 2007).

3.4.1 Dělení genetických markerů

Genetické markery asociované s různě užitkovými vlastnostmi hospodářských zvířat, jsou stále doplňovanou oblastí genetiky. Těchto poznatků je využíváno při moderních metodách šlechtění (Dvořák et al., 2005). Jejich současné dělení je následující:

Markery I. typu jsou kódující exprimované geny s nízkou hladinou polymorfizmu (Knoll, Vykoukalová, 2002). Tvoří přibližně třetinu poznaných genů. Jsou málo využitelné pro studium diverzity rodin a populací, protože není znám počet genů determinující určitý znak (neznáme řízení a regulaci určitého genu), a proto se využívají pouze pro komparativní mapování (Kuciel et al., 2004)

Markery II. typu jsou vysoce variabilní sekvence DNA s využitím mikro a minisatelitů (geny s opakovanou sekvencí nukleotidů). Mohou být ve vazbě s QTL (Knoll, Vykoukalová, 2002). Jsou využívány pro identifikaci a mapování QTL a pro určení parentity. Jsou druhově specifické, ale jejich funkce není dosud známá a jsou bez vlivu na variabilitu znaku (Kuciel et al., 2004).

Markery III. typu jsou označovány jako jednonukleotidové polymorfizmy neboli SNP (Single nukleotid Polymorphism), které bývají uvnitř kódujících genů, ale častěji v nekódujících intronech (Knoll, Vykoukalová, 2002). Jedná se o jednu změnu báze nukleotidu (bodovou mutaci) s frekvencí alel dosahující jednoho procenta nebo

vyšší. Ze všech polymorfismů DNA tvoří asi 98 % a slouží pro poskytování informací o variabilitě genu v rodinách, liniích a populacích. Jsou to perspektivní genové markery produkčních vlastností rostlin a zvířat (Kuciel et al., 2004).

Genetické markery mají velký význam pro růst a masnou užitkovost skotu. Při výzkumu genetických markerů je hlavní snahou vypracování genetických map a poznání, kde jsou lokusy uloženy na chromozomech. Lokusy se podílejí na kvantitativních užitkových znacích u skotu. Zajímá nás, jaká je variabilita těchto QTL (různé alely) a jak různé alely QTL ovlivňují užitkovost. Lokusy, které ovlivňují hmotnost telat při narození, jsou uloženy na chromozomech č. 5, 8, 21. Na chromozomech č. 9 a 19 jsou uloženy lokusy, které ovlivňují postnatální růst (Dvořáková, 2007).

3.4.2 Mapování genu (genomu)

Cílem mapování lokusů pro kvantitativní znaky (QTL) v populacích, je identifikace genu či markeru, které mohou být nadále využity ve šlechtění prostřednictvím markerů podporované selekce (MAS; Matějčková et al., 2012). MAS (marker assisted selection) je založen na zvýšení genetického zisku oproti tradičním selekčním postupům (Abdel-Azim, Freeman, 2002). Genetická mapa představuje tedy schéma genoforu ve tvaru úsečky (lineární genofor), na níž je zaznamenáno umístění jednotlivých genů (Rosypal et al., 1989).

Aplikací různých metod jsou vytvářeny dvě různé, ale vzájemně komplementární mapy: fyzikální a genetické. **Fyzikální mapy** jsou cytogenetické struktury, jejichž schéma znázorňuje uspořádání DNA sekvencí genomu získané fyzikálně chemickými metodami. Udává přesné umístění genů na chromozomech. Za **genetické mapy**, též zvané vazbové, sdružuje geny do vazbových skupin, ve kterých je vzdálenost mezi geny či markery dána jako funkce frekvence meiotických crossing-overů mezi nimi (Dvořák, 1997).

Význam mapování spočívá ve využití poznatků z mapování v selekci tzv. MAS. Obecně z biologického hlediska jde však o poznání organizace a regulace exprese všech genů, které tvoří genom zvířat. Z pohledu genetického jde o identifikaci bodové mutace

ve strukturním genu nebo o identifikaci jiných diferencí v určitých úsecích genetické informace (Dvořák, 1997).

Cílem mapování genomu, je tedy identifikování a klonování genů ovlivňujících ETL (economic trait locus) metodou pozičního klonování. Používá se pro geny, které podmiňují nějaký znak a přitom funkce a produkce tohoto genu nejsou známy (Dvořák, 1997)

3.5 Genetické markery asociované s produkcí a kvalitou hovězího masa

Produkce masa je důležitým zdrojem živočišných bílkovin, které hrají velkou roli pro lidskou výživu. Proto selekční programy v chovu skotu zaměřené na produkci masa musí být vedeny na ty znaky, které se podílejí na efektivnější produkci. Jednotlivé ukazatele produkce masa jsou podmíněny polygeny, i když v současnosti známe některé jejich genetické markery, které se do určité míry podílejí na postupné fenotypové proměnlivosti (Kuciel et al., 2004).

3.5.1 Genetické markery asociované s křehkostí masa

Křehkost masa je jedním z nejdůležitějších faktorů vedoucích ke spokojenosti zákazníků při konzumaci hovězího masa. Po porážce zvířete nastává *rigor mortis* (postmrtnému ztuhnutí), kdy maximální tuhost je mezi 12-24 hod po porážce. Procesy křehčení masa při *post mortem* jsou způsobeny enzymatickou degradací myofibrilárních a souvisejících enzymů. Při nižších teplotách se zpomalují procesy post mortem a tudíž i zkřehčování masa (Koochmaraie, 1996).

Calpain proteolytický systém (CAP) je řazen mezi faktory, jenž jsou zodpovědné za procesy křehčení masa při post mortem (Casas et al., 2006). Calpain proteolytický systém se skládá z μ -calpainu a m-calpainu a jejich inhibitoru calpastatinu (Čítek, 2010). Calpastatin a calpain jsou tedy enzymy podílející se na procesech zrání jatečných půlek skotu a jsou produktem genu CAP, neboli markeru pro křehkost masa (Dvořák et al., 2005).

Calpain je jediný proteolytický systém, který má všechny vlastnosti, které jsou nezbytné pro dosažení postmortálních změn, kde výsledkem je křehké maso. Tento systém však není jediný, který je odpovědný za výsledek tohoto procesu. Dalšími faktory jsou například rychlost změny pH, nebo pokles teploty během stavu *rigor mortis* rovněž iontové síly svým působením ovlivňují finální křehkost masa (Koochmaraie, Killefer, 1994).

Gen *CAST* je inhibítozem proteázy CAPN (Casas et al., 2006). Hlavní funkcí obou proteáz v masu je tedy degradace většiny myofibrilárních proteinů *post mortem*, kromě aktinu a myosinu (Čítek, 2010).

3.5.1.1 gen *CAPN1*

Calpain je též znám pod názvem μ -calpain či calpain 1. Jedná se o kalcium aktivní neutrální proteázu 1, která je produkována genem *CAPN1*. Tato proteáza je pravděpodobně hlavním enzymem působícím na křehčení masa při procesech *post mortem* (Koochmaraie, 1996). Calpain 1 produkuje enzymy, které štěpí myofibrilární proteiny při procesech *post mortem* a tím zvyšuje křehkost masa (Casas et al., 2006).

Gen *CAPN1* byl zkoumán jako kandidátní gen pro lokus kvantitativního znaku (QTL). Byly zjištěny dva jednonukletidové polymorfismy (SNP) v intronu 12, které byly použity pro mapování *CAPN1* na telomerickém konci 29. bovinního chromosomu (BTA29). Jedná se o oblast, kde se vyskytuje i QTL pro křehkost masa (Smith et al., 2000). Gen pro *CAPN1* se skládá z 22 exonů a 21 intronů, přičemž bylo nalezeno 38 jednonukleotidových polymorfismů (SNP), z nichž se za nejpravděpodobnější SNP s vlivem na křehkost masa považuje CAPN530 v exonu 14 (Čítek, 2010).

3.5.1.2 gen *CAST*

Calpastatin je součástí kalcium-dependentního proteázového systému (Knoll, Vykoukalová, 2012). Je uložen na 7. bovinním chromosomu (BTA7; Čítek, 2010). Je to přirozeně se vyskytující protein, který inhibuje μ -calpain a m-calpain při procesech zrání masa *post mortem* (Schenkel et al., 2006). Bylo popsáno 12 SNP, z toho pouze 4 mají za následek změnu aminokyseliny (Čítek, 2010). Vyšší aktivita *CAST* způsobuje redukci křehkosti masa (Schenkel et al., 2006).

3.5.2 Genetické markery asociované se složením mastných kyselin tuku

Složení mastných kyselin (MK) v tukové tkáni hovězího masa je důležitým znakem související s kvalitou masa včetně jeho chuti a křehkosti. Obsah MK v hovězím mase je ze zdravotního hlediska konzumenta vnímán jako rizikový faktor. Na druhou stranu by určité MK obsažené v hovězím mase mohly mít příznivý účinek na lidské zdraví. Zatímco u výživy lze jasně prokázat vliv na profil mastných kyselin podkožního a intramuskulárního tuku, genetické faktory, které určují profil mastných kyselin, jsou stále ještě definovány (Mannen, 2011). Byly prokázány poměrně významné rozdíly v zastoupení mastných kyselin mezi různými plemeny skotu nebo jedinci téhož plemene. Ty mají s největší pravděpodobností genetický základ a jsou odrazem rozdílů v genotypu, expresi genů a proteinů nebo aktivity enzymů, podílející se na syntéze, přeměně nebo transportu MK v organismu (De Smet et al., 2004; Bartoň et al., 2013). Během posledního desetiletí byly některé geny, zodpovědné za složení masných kyselin u skotu, zjištěny v řadě zahraničních studií (např. Mannen, 2011; Bartoň et al. 2010). Nogi et al. (2011) ve svých studiích uvádí, že selekci skotu na obsah MK v tuku je možné i bez negativního dopadu na další užitkové znaky.

3.5.2.1 gen *SCD*

Genetický polymorfismus stearoyl-CoA desaturáza (*SCD*) je jedním z genů asociovaných se složením mastných kyselin (Mannen, 2011). Enzym je kódován genem *SCD*, ten se u skotu vyskytuje ve dvou isoformách – *SCD1* exprimován hlavně v adiposní tkáni a *SCD5* exprimovaný zejména v mozku (Bartoň et al., 2013).

Funkcí *SCD* je přeměna nasycených mastných kyselin (SFA) na příslušné mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA) inzercí dvojné vazby na pozici mezi uhlíky 9 a 10. Dále se podílí na produkci isomeru *cis* 9 *trans* 11 konjugované kyseliny linolové. U této kyseliny se předpokládají značně příznivé zdravotní účinky, ty byly však bezpečně prokázány jen na zvířecích modelech (Bartoň et al., 2013).

S ohledem na jeho rozhodující roli při oxidaci mastných kyselin je gen *SCD* určen jako kandidátní gen při změnách složení mastných kyselin (Mannen, 2011). Kromě jeho působení v adiposní tkáni bylo zjištěno jeho působení v mléčné žláze, ve

které ovlivňuje zastoupení mastných kyselin v mléce (Conte et al., 2010; Bartoň et al., 2013).

3.5.2.2 gen *FASN*

Syntáza mastných kyselin (*FASN*) je protein významný při tvorbě lipidů u savců. Gen *FASN* je asociován s kvalitou mléka a masa. Jeho funkcí je katalyzace mastných kyselin s dlouhým řetězcem, nejen v dospělosti, ale i v průběhu embryonálního vývoje zvířete (Bartoň et al., 2013).

Je významným kandidátním genem pro obsah tuku v mléce i pro kvalitu masa. Je uložen na 29. chromozomu (BTA29) a jeho mutace může způsobovat předčasné ukončení nasycených mastných kyselin (SFA) ve prospěch polynenasycených (PUFA) a mononenasycených (MUFA) mastných kyselin (Bartoň et al., 2013).

3.5.3 Mramorování masa

Přítomnost tuku mezi svalovými snopci je definováno jako mramorování masa neboli marbling (Šubrt, Hrouz, 2011). Ukládání tuku ve svalech je důležitou vlastností masa (Platter et al., 2005; Yang et al., 2006). Různé studie se zabývali změnami růstu souvisejících s mramorováním (marbling) masa nebo ukládání intramuskulárního tuku. Robelin (1986) poskytnul vynikající přehled o vývoji tukové tkáně u skotu. Bruns et al. (2004) zjistil, že skóre mramorování (hustota tukových skvrn v mase) a intramuskulární tuk postupně narůstá během růstu zvířete. Mramorování masa je jednou z vlastností určující kvalitu i cenu masa. Pro jeho dosažení je potřeba dodržování nejen správného výkrmu, ale i daný jedinec musí mít i genetické předpoklady pro jeho tvorbu (Marcinková, Beran, 2011).

Hodnotí se zejména jeho rozložení a velikost tukových kapének (Šubrt, Hrouz, 2011). Jinými slovy ho můžeme definovat jako malou tukovou skvrnu viditelnou na plošném řezu masa (Obr.2). Tukovou skvrnu obecně nazýváme intramuskulárním tukem. Jeho stanovení probíhá až po porážce zvířete, kdy se posuzuje místo mezi 12. a 13. žebrem a následně se určí tzv. skóre mramorování (Gazdová et al, 2007).

V dnešní době spotřebitelé vyhledávají maso s vyšším skórem mramorování, protože vyšší obsah intramuskulárního tuku dodává masu lepší chuť, šťavnatost, vůni a hlavně požitelnost po tepelné úpravě (Gazdová et al., 2007).

Mramorování je ovlivněno polygeně, což znamená, že za jeho fenotypový projev zodpovídá více genů, z nichž každý má jinou intenzitu projevu (Gazdová et al., 2007).



Obr. 2. Mramorování hovězího masa (vlastní, foto pořízené v prodejně STEINEX a.s.)

3.5.3.1 gen *TG*

Gen *TG* je považován za kandidátní gen ovlivňující mramorování masa (Barendse, 1999). U skotu je gen *TG* lokalizován na chromozomu 14 (Thaller et al., 2003). Produkty tohoto genu ovlivňují metabolismus tuků a růst těchto buněk. Z různých zdrojů byl prokázán vliv mutace na mramorování masa (Gazdová et al., 2007).

Je prekurzorem hormonů štítné žlázy známé při endokrinní roli u metabolismu tuků. Již půl století je známo, že hormony štítné žlázy jsou spojeny s ukládáním tukových buněk ve svalu. Kromě toho, že se hormony podílí na diferenciaci adipocitů, mají vliv i na rychlosti metabolismu a to má vliv na množství energie dostupné pro ukládání (Barendse, 1999).

3.5.3.2 gen *LEP*

Leptin je hormon, který je v chovu a výkrmu zvířat nejčastěji spojován s energetickou funkcí v organismu (Šubrt et al., 2012). Lze ho označit jako kandidátní gen související s obsahem intramuskulárního tuku, mramorováním, křehkostí a senzoricou jakostí masa. Jedná se o protein, který je hlavně produkován především bílou tukovou tkání (Orrú et al., 2011; Šubrt et al., 2012).

Popis a funkce genu *LEP*

Svým působením ovlivňuje gen *LEP* sekreci růstového hormonu a též působí na tkáně a na endokrinní systém (Knoll, Vykoukalová 2002). Z biologického hlediska je významný zejména při potlačování hladu při snižování příjmu potravy a při zvyšování intenzity metabolismu. Svým vlivem stimuluje vnitřní procesy svalových buněk, čímž se zvyšuje citlivost svalů na inzulín, snižuje se hladina cukru ve svalech (Šubrt et al., 2012). Působení leptinu na CNS má za důsledek vyslání signálu s cílem dosažení poklesu výdeje energie a tudíž i snížení příjmu potravy. Naopak nízká produkce leptinu svědčí o nízké tukové zásobě, tudíž dochází k vyslání signálu do CNS pro zvýšení příjmu potravy (Lawrence, 2012). Kromě toho leptin podporuje růst a dělení buněk, hlavně leukocytů a účastní se regulace vývoje plodu a pubertálního vývoje organismu. Kromě zmíněného inzulínu má leptin vliv i na další regulační látky, jako je glukagon, hormony štítné žlázy, růstový faktor a další (Šubrt et al., 2012).

Leptin částečně cirkuluje v krvi navázaný na plazmatické bílkoviny. Koncentrace leptinu v krvi predikuje složení jatečného těla u vykrmovaného skotu a odpovídá růstu svalových vláken (Lawrence, 2012).

Tuková tkáň je hlavním zdrojem pro produkci leptinu, ten je však produkován i jinými periferními tkáněmi včetně žaludku, placenty a prsních žláz. Kde je sekretován leptin do kolostra. Expze leptinu je do určité míry zprostředkovávána hormony, například zvýšená hladina inzulínu zvyšuje množství leptinu v těle zvířete a naopak se hladina leptinu snižuje při nízké či žádné hladině inzulínu. Dalším příkladem je zvýšená hladina glukokortikoidů, které podporují syntézu leptinu z tukové tkáně, nebo testosteron, který tvorbu leptinu naopak inhibuje (Lee, Fried, 2009; Lawrence, 2012).

Polymorfismus a lokalizace genu *LEP*

U skotu bylo pro gen *LEP* nalezeno velké množství polymorfizmů, především SNP, z nichž některé jsou asociovány s příjmem a konverzí krmiva, růstem a kvalitou masa. Leptin ovlivňuje především ukládání intramuskulárního tuku a mramorování masa. Výsledky však nejsou u všech zkoumaných souborů a populací zvířat úplně konzistentní (Lawrence, 2012).

Bovinní gen *LEP* byl mapován na lokusu 4q32 na 4. chromozomu (Pomp et al., 1997; Taniguchi et al., 2002; Giblin et al., 2010). Je to 16kDa hormon (Nkrumah et al., 2005), složený ze 167 aminokyselin (Orrú et al., 2011), rozprostřený ve 3 exonech (Pomp et al., 1997; Taniguchi et al., 2002; Giblin et al., 2010).

Bylo zjištěno 6 izoforem leptinu, z nichž pouze forma Ob-Rb obsahuje intercelulární strukturu pro aktivaci buněčných signálů, vyskytuje se v hypotalamu a endometriu. Zbylých 5 forem se podílí na transportu leptinu v organismu (Dráčková et al., 2012).

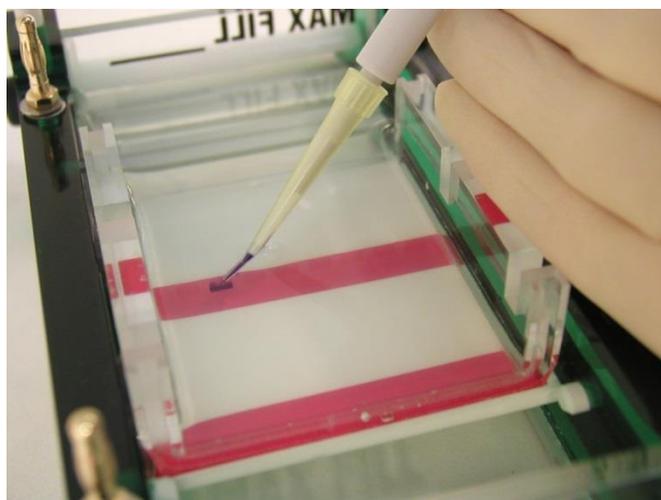
3.6 Molekulárně-genetické metody pro detekci a testování polymorfizmů DNA

Molekulárně genetické metody ve šlechtění slouží k identifikaci genetických markerů, konstrukci genetických map a k lokalizaci genů podílejících se na užitkovosti zvířat (QTL, ETL, kandidátní geny; Knoll, Vykoukalová, 2002).

3.6.1 Elektroforéza (ELFO)

Jedná se o jednu z nejdůležitějších technik, pomocí které je možno separovat nukleové kyseliny. Je to fyzikálně-chemická metoda sloužící, která především slouží k dělení látek v elektrickém poli. Zařízení používané pro tuto metodu se skládá z elektroforetické vany s anodou, katodou a pufrem, z vlastního držáku gelu, ve kterém probíhá samostatná separace, a z externího zdroje stejnoměrného napětí (Knoll, Vykoukalová, 2002).

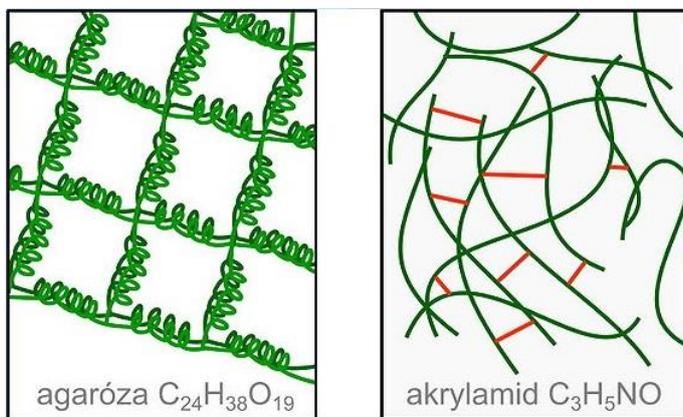
Roztavený gel se nalije do vaničky (agarázové ELFO) nebo mezi skla (polyakrylamidová ELFO), kde se nechá ztuhnout. Do gelu, před jeho zatuhnutím, se umístí tzv. hřeben s definovanou šířkou, který vytváří jamky. Jamky slouží pro umístění vzorků (Obr. 3). DNA migruje směrem k anodě (+ pól). Rychlost pohybu studované DNA závisí jednak na jejich vlastnostech (molekulová hmotnost - velikost, elektrický náboj, prostorové uspořádání), na vlastnostech nosiče (gelu), prostředí (pufri) a na přivedeném napětí. Obecně platí, že molekuly větší velikosti a složitější prostorové struktury prochází gelem pomaleji, tj. zůstávají blíže místu nanesení vzorků (startu). Pro separaci molekul o určité velikosti je třeba volit správnou koncentraci gelu (Knoll, Vykoukalová, 2002).



Obr. 3 Nanášení vzorku do horizontální elektroforézy
(<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Elfo.jpg>)

Rozdíl mezi agarázovou elektroforézou a polyakrylamidovou elektroforézou spočívá ve složení gelu (Obr. 4). Zatímco prostředí pro dělení u agarázové ELFO slouží agarázový gel, připravující se rozvařením agarázového prášku v elektroforetickém pufri, u polyakrylamidové ELFO je gel tvořený polyakrylamidem (PA). Ten se tvoří polymerací monomerů akrylamidu křížově sesíťovaného pomocí látky bis-akrylamid. Koncentrace agarázového gelu i PA gelu určuje velikost pórů a tudíž i propustnost DNA určité velikosti. Na rozdíl od agarového gelu je dělicí schopnost PA gelu natolik velká, že dokáže separovat molekuly DNA, jejichž velikost se liší až 500 krát. Může rovněž

pojmout mnohem větší množství DNA, než gely agarázové. DNA získané z PA gelů jsou extrémně čisté (Knoll, Vykoukalová, 2002)



Obr. 4 Schéma agarázového (vlevo) a akrylamidového (vpravo) gelu
(<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektrofor%C3%A9za>)

Elektroforetické gely lze zobrazit metodou barvení gelů. Nejpoužívanější metodou je barvení agarázového gelu ethidiumbromidem (EtBr). Využívá se při ní fluorescenční vlastnosti molekuly EtBr, které je vmezežené do vlákna nukleových kyselin (Knoll, Vykoukalová, 2002).

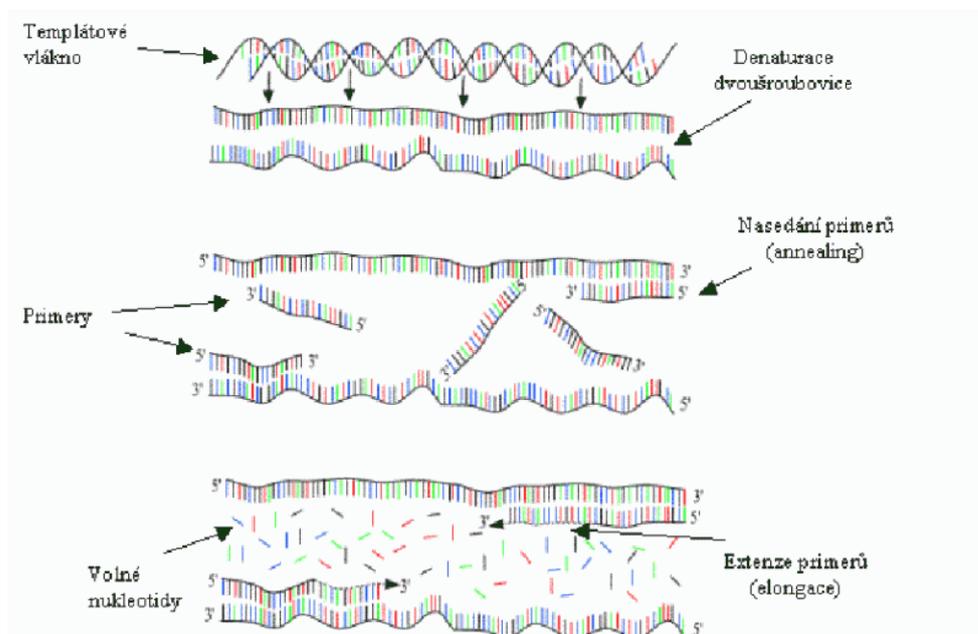
3.6.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR byla popsána v roce 1985 Saiki et al., jako molekulárně-genetická metoda sloužící pro získání dostatečného množství DNA, která v některých svých modifikacích může sloužit k přímé identifikaci polymorfizmů či je dále využita k různým analýzám (Knoll, Vykoukalová, 2002)

Principem metody je extenze primerů a geometrická amplifikace (namnožení) molekul DNA, kde dochází k cyklickému opakování tří kroků, které se liší pouze různými teplotními podmínkami. Syntézu DNA řízenou templátem (matricovou DNA) katalyzuje syntézu obou komplementárních vláken extenzí (prodlužováním) dvou primerů (jednořetězcových oligonukleotidů) připojených ke komplementárním řetězcům na protilehlých koncích templátu. Umístěním obou primerů tak ohraničuje amplifikovaný úsek DNA. Každý cyklus PCR zahrnuje teplotní denaturaci DNA, připojení primerů (annealing) a syntézu DNA (elongance). V každém cyklu se

množstvím DNA zdvojnásobí množství templátu pro následující cyklus (Saiki et al, 1985; Knoll, Vykoukalová, 2002).

Reakční směs kromě DNA, která bude amplifikována, obsahuje pufr pro DNA polymerázu, směs nukleotidů (dNTP), pár primerů specifických pro cílovou sekvenci, termostabilní DNA polymerázu (většinou Taq) a různá aditiva zvyšující účinnost či specifitu reakce. PCR probíhá při inkubaci vzorků při třech teplotách, které odpovídají třem krokům v amplifikačním cyklu a to denuraci, annealing a elongaci (Knoll, Vykoukalová, 2002).



Obr 5. Polymerázová řetězová reakce (PCR) (<http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probiotickyh-mikroorganismu>)

3.6.3 PCR-RFLP

Z důvodu pracnosti samostatné metody RFLP (polymorfismus délky restrikčních fragmentů) byla vytvořena modifikace, která vznikla spojením s PCR. Pomocí RFLP se identifikují alely na základě přítomnosti nebo absence specifického restrikčního místa. Pomocí PCR se na základě genomové DNA amplifikuje specifická sekvence. Tento úsek DNA se štěpí panelem restrikčních endonukleáz. V případě bodové mutace v restrikčním místě toto místo zaniká nebo naopak vzniká nové. To má za následek vznik úseků DNA různé velikosti, které jsou separovány na agarózovém

gelu. Vizualizace DNA se provádí pomocí ethidiumbromidu (Knoll, Vykoukalová, 2002).

Tato metoda je vhodná pro detekci genů s větším polymorfizmem nebo nekódující sekvence. Výhodou této metody je její nenáročnost a možnost určení místa mutace. Naopak nevýhodou je, že pravděpodobnost detekce mutace je relativně nízká a je závislá na počtu použitých enzymů (Knoll, Vykoukalová, 2002)

4. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo vytvoření uceleného přehledu o genetických markerech asociované s kvalitou hovězího masa. Po nastudování materiálů a jejich následném zpracování v této bakalářské práci se domnívám, že největší vliv na kvalitu hovězího masa mají genetické předpoklady, výživa zvířete a procesy post mortem.

Mramorování masa je důležitým ukazatelem celkové kvality masa. Z užitkových typů mají masná plemena lepší mramorované maso než plemena mléčná. Studie doposud nepopsaly všechny jednotlivé faktory působící na marbling masa. Z molekulárně-genetického hlediska byly popsány geny LEP a TG, které byly označeny za kandidátní geny ovlivňující ukládání intramuskulárního tuku. Křehkost masa je ovlivněna řadou faktorů, kde mezi nejdůležitější bychom mohli zařadit věk zvířete. S přibývajícím věkem zvířete se snižuje křehkost a tím i šťavnatost masa.

Díky tomu, že spotřebitel zvyšuje své nároky na kvalitu hovězího masa, lze předpokládat vývoj ve studiích kandidátních genů mající vliv na kvalitu masa. Lze očekávat, že by v budoucnu mohly markery usnadnit selekci zvířat při šlechtitelských programech.

5. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ABDEL-AZIM, G., FREEMAN, A. E. (2002): Superiority of QTL-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *J. Dairy Sci.*, vol. 85, p. 1869-1880.
- BAILEY, A. J., ROBINS, S. P., BALIAN, G. (1974): Biological significance of the intermolecular crosslinks in collagen. *Nature*, vol. 251, p. 105-109.
- BARENDSE, W. J. (1999): Assessing lipid metabolism. WO1999023248 A1. Web: <https://www.google.com/patents/WO1999023248A1?cl=en&dq=barendse+TG&hl=cs&sa=X&ei=IeozVebbH4mBywP-mIDgAg&ved=0CEEQ6AEwBA>.
- BARHAM, B. L., BROOKS, J. C., BLANTON, J. R., HERRING, A. D., CARR, M. A., KERTH, C. R., MILLER, M. F. (2003): Effect of growth implants on consumer preceptions of meat tenderness in beef steers. *Journal of Animal Science*, vol. 81, p. 3052-3056.
- BARTOŇ, L., KOTT, T., BUREŠ, D., ŘEHÁK, D., ZAHRÁDKOVÁ, R., KOTTOVÁ, B. (2010): The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Science*, vol. 85, p. 15-20.
- BARTOŇ, L., BUREŠ, D., KOTT, T. (2013): Využití kandidátních genů k modifikaci profilu mastných kyselin v tukové tkáni českého strakatého skotu: certifikovaná metodika. Výzkumný ústav živočišné výroby, Praha. 19 s. ISBN 978-80-7403-110-6.
- BRUNS, K. W., PRITCHARD, R. H., BOGGS, D. L. (2004): The relationships among body weight, body composition, and intramuscular fat content in steers. *Journal of Animal Science*, vol. 78, p. 1315-1322.

- BUCHANAN, F. C., FITZSIMMONS, C. J., VAN KESSEL, A. G., THUE, T. D.,
WINKELMAN-SIM, D. C., SCHUMTZ, S. M. (2002): Association of a
missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin
mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*, vol. 34, p. 105-116.
- CASAS, E., WHITE, S. N., WHEELER, T. L., SHACKELFORD, S. D., et al. (2006):
Effects of calpastatin and μ -calpain markers in beef cattle on tenderness traits
1,2. *Journal of Animal Science*, vol. 84, p. 520-525.
- CONTE, G., MELE, M., CHESSA, S., CASTIGLION, B., SERRA, A., PAGNACCO,
G., SECCHIARI, P. (2010): Diacylglycerol Acyltransferase 1, Stearoyl-CoA
Desaturase 1, and Sterol Regulatory Element Binding Protein 1 Gene
Polymorphisms and Milk Fatty Acid Composition in Italian Brown Cattle.
Journal of Dairy Science, vol. 93, p. 753-763.
- ČÍTEK, J. (2010): Genetické markery pro kvalitu masa a mléka: certifikovaná
metodika. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice. 29 s.
ISBN 978-80-7394-254-0.
- DE SMET, S., RAES, K., DEMEYER, D. (2004): Meat fatty acid composition as
affected by fatness and genetic factors: a review. *Animal Research*, vol. 53,
num. 2, p. 81-98.
- DRÁČKOVÁ, E., ŠUBRT, J., DUFEK, A. (2012): Asociace mezi ukazateli kvality
masa a genotypem pro leptin u býků českého strakatého skotu. In Šubrt, J. &
Filipčík, R. Šlechtění na masnou užitkovost a aktuální otázky produkce
jatečných zvířat. 1. vyd. Mendelova univerzita v Brně, Brno. s. 94-98. ISBN
978-80-7375-645-1.
- DVOŘÁK, J. (1997): Molekulární genetika zvířat. Mendelova zemědělská a lesnická
univerzita v Brně, Brno. 80 s. ISBN 80-7157-253-5.
- DVOŘÁK, J., JAKUBEC, V., FRELICH, J., BARTOŇ, L., JEŽKOVÁ, A., BJELKA,

- M. (2005): Populačně genetické aspekty šlechtění masného skotu. Využití genetických metod ve šlechtění skotu na masnou užitkovost a její ovlivnění faktory prostředí. s. 5-21. ISBN 80-903-143-7-6.
- DVOŘÁKOVÁ, J. (2007): Růst a faktory, které jej ovlivňují. *Náš chov*. Roč. 67 č. 4, s. 54-58.
- FRELICH, J. (2001): Chov skotu. Jihočeská univerzita, České Budějovice. 211 s. ISBN 80-7040-512-0.
- GAZDOVÁ, V., FILKULOVÁ, J., DÉDUCHOVÁ, V. (2007): Využití selekce s pomocí genetických markerů v chovu skotu. *Náš chov*, roč. 67 č. 4,
- GIBLIN, L., BUTTLER, S. T., KEARNEY, B. M., WATERS, S. M., CALLANAN, M. J., BERRY, D. P. (2010): Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian cattle sires. *BMC Genetics*. vol. 73, no. 11.
- GILL, J. L., BISHOP, S. C., McCORQUODABLE, C., WILLIAMS, J. L., WIENER, P. (2010): Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Science*, vol. 86, p. 985-993.
- INGR, I. (2003): Produkce a zpracování masa. Mendelova univerzita v Brně, Brno. 202 s. ISBN 80-7157-719-7.
- INGR, I (2004): Jakou perspektivu má hovězí maso v naší výživě? *Český svaz zpracovatelů masa* [online]. [cit. 2015-04-28]. Dostupné z: <http://www.cszm.cz/clanek.asp?typ=1&id=896>.
- JAKUBEC, V., ŘÍHA, J., GOLDA, J. (1998): Šlechtění masných plemen skotu. Výzkumný ústav pro chov skotu. 177 s.

- JAKUBEC, V., BEZDÍČEK, J., LOUDA, F. (2010): Selekce - inbriding - hybridizace. Agrovýzkum Rapotín s.r.o., Rapotín. 382 s. ISBN 978-80-87144-22-0.
- KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z. (2002): Molekulární genetiky zvířat: (metody detekce polymorfizmů DNA genů). Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno. 100 s. ISBN 80-7157-616-6.
- KNOLL, A., VYKOUKALOVÁ, Z. (2012): Genetické markery pro šlechtění na efektivní produkci kvalitního masa u skotu. In Šubrt, J. & Filipčík, R. Šlechtění na masnou užitkovost a aktuální otázky produkce jatečných zvířat. 1. vyd. Mendelova univerzita v Brně, Brno. s. 19-25. ISBN 978-80-7375-645-1.
- KOOHMARAIE, M., KILLEFER, J. (1994): Bovine Skeletal Muscle Calpastatin: Cloning, Sequence Analysis, and Steady-State mRNA Expression. *Journal of Animal Science*, vol. 72, p. 606-614.
- KOOHMARAIE, M. (1996): Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science*, vol. 43. p. 193-201.
- KUCIEL, J., BEDNÁŘ, J., URBAN, T. (2004): Genetika zemědělských produktů: (vybrané kapitoly k přednáškám). Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Brno. 135 s. ISBN 80-7157-767-7.
- LAWRENCE, T. (2012): Leptin: long-term regulation of food intake. In Lawrence, T., Fowler, V. & Novakofski, J. *Growth of farm animals*. 3rd ed. Wallingford: CABI. P. 167-169. ISBN 978-1-84593-558-0.
- LEE, MJ., FRIED, S. K. (2009): Integration of hormonal and nutrient signals that regulate leptin synthesis and secretion. *American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism* Published, vol. 296, no. 6, p. E 1230-E 1238.
- MANNEN, H. (2011): Identification and utilization of genes associated with beef qualities. *Animal Science Journal*, vol. 82, p. 1-7.

- MARCINKOVÁ, A., BERAN, O. (2011): Vyšší ziskovost výroby hovězího masa. Farmář. Roč. 17, č. 7, s. 30-32.
- MARSH, B. B., LEET, N. G. (1966): Studies in Meat Tenderness. III. The Effects of Cold Shortening on Tenderness. Journal of Food Science, vol. 31, p. 450-459.
- MARSCHALL, D. M. (1999): The genetics of meat quality. In Fries, R. & Ruvinsky, A. The Genetics of Cattle. Wallingford: CABI Publishing, p. 605-636. ISBN 0-85199-258-7.
- MATĚJÍČKOVÁ, J., ŠTÍPKOVÁ, M., SAHANA, G., KOTT, T., KYSELOVÁ, J., KOTTOVÁ, B., ŠEFROVÁ, J., KREJČOVÁ, M., MELČOVÁ, S. (2012): Mapování QTL se vztahem k produkčním parametrům. Náš chov. Roč. 72 č. 12, s. 23-24.
- MIKŠÍK, J., ŽIŽLAVSKÝ, J. (2005): Chov skotu: (přednášky). 2. vyd. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno. 149 s. ISBN 80-7157-883-5.
- NKRUMAH, J. D., LI, C., YU, J., HANSEN, C., KEISLER, D. H., MOORE, S. S. (2005): Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behaviour, and measures, of carcass merit. Journal of Animal Science, vol. 83, p. 20-28.
- NOGI, T., HONDA, T., MUKAI, F., OKAGAKI, T., OYAMA, K. (2011): Heritabilities and genetic correlations of fatty acid compositions in longissimus muscle lipid with carcass traits in Japanese Black cattle. Journal of Animal Science, vol. 89, p. 615-621.
- ORRÚ, L., CIFUNI, G. F., PIASSENTIER, E., CORAZZIN, M., BOVOLENTA, S., MOIOLI, B. (2011): Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the LEP and SCD1 genes on the fatty acid profile of muscle fat in simmental bulls. Meat Science, vol. 87, p. 344-348.

- PLATTER, W. S., TATUM, J. D., BELK, K. E., KOONTZ, S. R., CHAPMAN, P. L., SMITH, G. C. (2005): Effects of marbling and shear force on consumers' willingness to pay for beef strip loin steaks. *Journal of Animal Science*, vol. 83, p. 890-899.
- POMP, D. ZOU, T., CLUTTER, A. C., BARENDSE, W. (1997): Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal of Animal Science*, vol. 75, p. 1427.
- ROBELIN, J. (1986): Growth of adipose tissue in cattle: partitioning between depots, chemical composition and cellularity. A review. *Livest. Prod. Sci.*, vol. 14, p. 349-364.
- ROSYPAL, S., ODEHNAL, A., ROSYPALOVÁ, A., VONDREJS, V. (1989): *Molekulární genetika. 2. přeprac. a dopln. vyd. SNP, Praha. 351 s. ISBN 80-04-23117-9.*
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A., ARNHEIM, N. (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, vol. 20, p. 1350-1354.
- SCHENKEL, F. S., MILLER, S. P., JIANG, Z., MANDELL, I. B., YE, X., LI, H., WILTON, W. (2006): Association of a single nucleotide in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, vol. 84, p. 291-299.
- SMITH, T. P., CASAS, E., REXROAD, C. E., KAPPES, S. M., KEELE, J. W. (2000): Bovine CAPN1 maps to a region of BTA29 containing a quantitative trait locus for meat tenderness. *Journal of Animal Science*, vol. 78, p. 2589-2594.

- STEINHAUSER, L., a kol. (1995): Hygiena a technologie masa. Last, Brno. 643 s. ISBN 80-900260-4-4.
- STEINHAUSER, L., a kol. (2000): Produkce masa. Last, Tišnov. 464 s. ISBN 80-900260-7-9.
- ŠUBRT, J., HROUZ, J. (2011): Obecná zootechnika Vyd. 3., nezměn. Mendelova univerzita v Brně, Brno. 205 s. ISBN 978-80-7375-511-9.
- ŠUBRT, J., BUŇKA, F., BEZDÍČEK, J., DUFEK, A., DRAČKOVÁ, E., FILIPČÍK, R. (2012): Vztahy genotypů býků českého strakatého skotu pro leptin a obsahu volných aminokyselin v čerstvém mase. In Šubrt, J. & Filipčík, R. Šlechtění na masnou užitkovost a aktuální otázky produkce jatečných zvířat. 1. vyd. Mendelova univerzita v Brně, Brno. ISBN 978-80-7375-645-1.
- TANIGUCHI, Y., ITOH, T., YAMADA, T., SASAKI, Y. (2002): Genomic structure and promoter analysis of the bovine leptin gene. IUBMB Life, vol. 53, p. 131-135.
- THALLER, G., KÜHN, C., WINTER, A., EWALD, G., BELLMANN, O., WEGNER, J., ZÜHLKE, J., FRIES, R. (2003): DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. Animal Genetics, vol. 34, p. 354-357.
- YANG, XJ., ALBRECHT, E., ENDER, K., ZHAO, R. Q., WEGNER, J. (2006): Computer image analysis of intramuscular adipocytes and marbling in the longissimus muscle of cattle. Journal of Animal Science, vol. 84, num. 12, p. 3251-3258.

6. SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr 1. Hlediska hodnocení a kvality masa

(Šubrt, J., Hrouz, J. (2011): Obecná zootechnika. vyd. 3., nezměn. MZLU v Brně, Brno. 205 s. ISBN 978-80-7375-511-9)

Obr 2. Marbling hovězího masa

(vlastní, foto pořízené v prodejně STEINEX a.s.)

Obr 3. Nanášení vzorku do horizontální elektroforézy

(<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Soubor:Elfo.jpg>)

Obr 4. Schéma agarázového a akrylamidového gelu

(<http://www.wikiskripta.eu/index.php/Elektrofor%C3%A9za>)

Obr 5. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

(<http://www.chempoint.cz/vyuziti-polymerazove-retezove-reakce-pcr-pro-detekci-probiotickych-mikroorganismu>)

7. SEZNAM ZKRATEK

CAPN1 – calpain 1 (calcium-activated neutral protease 1)

CAST – calpastatin

CNS – central nervous system (centrální nervová soustava)

DNA – deoxyribonucleotide acid (deoxyribonukleová kyselina)

dNTP – deoxyribonucleotide triphosphate (deoxyribonukleosidtrifosfát)

ELFO – elektroforéza

EtBr – ethidium bromid

ETL – Economic Trait Locus (lokus ekonomických znaků)

LEP – leptin

MAS – Marker Assisted Selection (selekce pomocí markerů)

PA – polyakrylamid

PCR – polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)

PRC-RFLP – polymerase chain reaction – restriction fragment length polymorphism

QTL – Quantitative trait locus (lokus kvantitativních znaků)

SCD – stearyl-CoA desaturase

SNP – Single Nucleotide Polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)

TG – thyroglobulin

SFA – saturated fatty acid (nasycené masné kyseliny)

MUFA – monounsaturated fatty acid (mononenasycené masné kyseliny)

PUFA – polyunsaturated fatty acid (polynenasycené masné kyseliny)

PO₂ – parciální tlak kyslíku

DFD – dark, firm, dry (tmavé, tuhé, suché)

BTA – bovinní chromosom

MK – masné kyseliny

FASN – fatty acid syntase

RFLP – restriction fragment length polymorphism (polymorfizmus délky restrikčních fragmentů)