

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Zemědělské biotechnologie

Katedra: Zootechnických věd

Vedoucí katedry: doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Analýza vybraných kandidátních lokusů
ovlivňujících užitek a zdraví zvířat**

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

Konzultant diplomové práce: Tothová Lucie, Ing.

Autor diplomové práce: Čunátová Štěpánka, Bc.

České Budějovice

2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Štěpánka ČUNÁTOVÁ**
Osobní číslo: **Z13741**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Zemědělské biotechnologie**
Název tématu: **Analýza vybraných kandidátních lokusů ovlivňujících užitek
vlastnosti a zdraví zvířat**
Zadávací katedra: **Katedra zootechnických a veterinárních disciplín a kvality
produktů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Využití molekulárně genetických metod se stává běžnou součástí šlechtění hospodářských zvířat. Jedná se o genotypizaci jednoduchých bodových polymorfismů na čipech, dále potom o genotypizaci kandidátních lokusů - genů velkého účinku. Cílem těchto postupů je určit genotypovou hodnotu zvířete na genové úrovni, což umožňuje zpřesnit selekci a výrazně zkrátit generační interval. Diplomová práce se bude týkat genotypizace kandidátních lokusů.

Cílem diplomové práce je provést genotypizaci dvou kandidátních lokusů s potenciálním vztahem k užitečným vlastnostem resp. zdraví zvířat.

Zavedete metodiku pro laboratorní analýzu dvou kandidátních lokusů. Provedete genotypizaci panelu býků se známou plemennou hodnotou. Výběr lokusů provede vedoucí práce v závislosti na aktuální potřebě tak, aby výsledky bylo možné použít pro zpracování komplexní analýzy. Provedete asociační analýzu vztahu genotypů resp. alel k plemenným hodnotám pro užitečnost, plodnost a zdravotní stav. Datové soubory vyhodnotíte vhodnými statistickými metodami. Provedete interpretaci zjištěných výsledků.

Rozsah grafických prací: 4 tabulky, 2 grafy
Rozsah pracovní zprávy: 40 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

Ciobanu, D., Bastiaansen J. W. M., Lonergan S. M., Thomson H., Dekkers J. C. M., Plastow G. S., Rothschild M. F.: New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality trans in pigs. *Journal of Animal Science* 2004, 82:2829-2839.

Čítek J., Řehout V., Hanusová L., Míková A., Večerek L. (2010). Genetické markery pro kvalitu masa a mléka. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 2010, 29 s.

Huang J., Liu L., Wang H., Zhang C., Ju Z., Wang Ch., Zhong J. (2011). Variants and Gene Expression of the TLR2 Gene and Susceptibility to Mastitis in Cattle. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances* 6(1):51-61.

Kong H. S., Oh J. D. Lee, Hong S. G., Song Y. S., Lee W. I., Kim S. J., Yoo H. C., Lee B. H., Jeon G. J. (2006). Association of polymorphisms in the bovine leptin gene with ultrasound measurements for improving in Korean cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Science* 19(12):1691-1695.

Schenkel F. S., Miller S. P., Ye X., Moore S. S., Nkrumah J. D., Li C., Yu J., Mandell I. B., Wilson J. W., Williams J. L. (2005). Association of single nukleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*, 83(9):2009-20.

Vlášková H., Trešlová H. (2008): Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice. Sborník textů. Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha.

Zima J., Macholán M., Munclinger P., Piálek J. (2004): Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha.

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.**
Katedra zootechnických a veterinárních disciplín a kvality produktů
Konzultant diplomové práce: **Ing. Lucie Tothová**
Katedra zootechnických a veterinárních disciplín a kvality produktů
Datum zadání diplomové práce: **18. března 2014**
Termín odevzdání diplomové práce: **15. dubna 2015**


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentská 13
370 05 České Budějovice


doc. Ing. Miroslav Maršálek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 18. března 2014

Prohlášení

Prohlašuji, že v souladu s 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě 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 prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských prací a systémem odhalování plagiátorů.

Datum.....

.....

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat svému školiteli prof. Ing. CSc. Jindřichu Čítkovi za vedení mé diplomové. Dále děkuji Ing. Lucii Tothové a Ing. Petře Pešinové za cenné rady.

Abstrakt

Cílem práce byla analýza polymorfismu v pozici -371bp (vzhledem k ATG start kodonu) genu *MSTN*, SNP v poloze 1948 bp genu *MYF5* a vliv těchto polymorfismů na křehkost, vaznost, hodnotu pH a barvu masa. K analýze bylo využito 241 vzorků masa býků českého strakatého skotu. Genotypizace genů *MSTN* a *MYF5* byla provedena metodou PCR-RFLP. Pro detekování polymorfismů byly použity restriční endonukleázy *DraI* (pro gen *MSTN*) a *TaqI* (pro gen *MYF5*). Ze stanovených genotypů byly vypočteny jejich frekvence a frekvence alel. U genu *MSTN* byla frekvence genotypů $AA=0,729$, $AB=0,258$, $BB=0,013$ a frekvence alel $A=0,858$, $B=0,142$, pro gen *MYF5* pak byla $AA=0,181$, $AB=0,542$, $BB=0,278$ a frekvence alel $A=0,452$ a $B=0,548$. Pomocí statistické analýzy byl zjištěn vliv (na hladině významnosti $P > 0,05$) genotypů genu *MYF5* na vaznost, hodnotu pH a barvu masa.

Klíčová slova: kandidátní gen, genotyp, genetický polymorfismus, myostatin, *MYF5*

Abstract

The aim of this thesis was to analyze the polymorphism in position -371bp (related to ATG start codone) of *MSTN* gene, SNP in position 1984bp of *MYF5* gene and influence of these polymorphisms on tenderness, water holding capacity, pH and color of meat. Samples (241) of bull meat of Czech pied cattle were used for analysis. PCR-RFLP method was applied to genotype *MSTN* and *MYF5* genes. For polymorphisms detection was used restriction endonucleases *DraI* (for *MSTN* gene) and *TaqI* (for *MYF5* gene). From established genotypes were computed their frequencies and alleles frequencies. The frequencies of genotypes in *MSTN* gene were $AA=0,729$, $AB=0,258$, $BB=0,013$ and alleles frequencies were $A=0,858$, $B=0,142$. The frequencies of genotypes in *MYF5* gene were $AA=0,181$, $AB=0,542$, $BB=0,278$ and alleles frequencies were $A=0,452$ a $B=0,548$. Using statistical analysis, the influence of genotypes of *MYF5* gene on the water holding capacity, pH and the color of meat was determined.

Keywords: candidate gene, genotype, genetic polymorphism, myostatin, *MYF5*

Obsah

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	10
2.1 Struktura savčího genomu a genu	10
2.1.1 Struktura savčího genomu	10
2.1.2 Struktura savčího genu	11
2.2 Lokusy kvantitativních znaků QTL	12
2.2.1 Kandidátní geny	12
2.2.2 Asociační analýza	12
2.2.3 Genetický polymorfismus	13
2.2.4 Genetické markery	13
2.2.5 Mapování QTL	14
2.3 Vývoj svalové tkáně	14
2.4 Vybrané ukazatele jakosti masa	16
2.4.1 Barva	16
2.4.2 Vaznost	17
2.4.3 Síla stříhu (křehkost)	17
2.4.4 Hodnota pH	18
2.5 Vybrané lokusy	18
2.5.1 Myostatin	18
2.5.1.1 Bovinní myostatin	20
2.5.2 Vliv <i>mh</i> fenotypu na jatečné maso	24
2.5.2 <i>MYF5</i>	26
2.5.2.1 Bovinní <i>MYF5</i>	27
3. CÍLE PRÁCE	28
4. METODIKA	29
4.1 Zvířata	29
4.2 Výběr lokusů	29

4.3 Laboratorní analýza.....	29
4.3.1 Izolace DNA.....	29
4.3.2 Metoda PCR/RFLP	29
4.3.3 Elektroforéza.....	31
4.4 Stanovení barvy masa.....	31
4.5 Stanovení vaznosti přidané vody.....	31
4.6 Stanovení síly stříhu	32
4.7 Stanovení hodnoty pH.....	33
4.8 Výpočty	33
4.9 Statistické vyhodnocení.....	33
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	34
5.1 Genotypizace	34
5.1.1 <i>MSTN</i>	34
5.1.2 <i>MYF5</i>	34
5.2 Frekvence genotypů a alel	35
5.3 Asociační analýza mezi studovanými polymorfismy a kvalitou masa	38
6. ZÁVĚR.....	42
7. SEZNAM ZKRATEK	43
8. POUŽITÁ LITERATURA	44

1. ÚVOD

Maso je velmi důležitou a významnou složkou potravin lidí, a to především díky obsahu bílkovin. Produkce masa hraje v Evropě velmi významnou úlohu nejen ve výživě, ale i v ekonomice.

Kvalita masa je jednou z nejdůležitějších vlastností hospodářských zvířat. Stanovení kvality masa vyžaduje analýzy a klasifikace obsahů tuků, složení, křehkosti, zadržování vody, barvy, oxidativní stability. Kvalita masa je též ovlivněna několika faktory, jako jsou plemeno, genotyp, krmivo, manipulace před poražením, samotné poražení, následné chlazení a podmínky skladování.

Objevování genů zodpovědných za kvalitu masa bude mít velký přínos pro jeho producenty. V posledních letech bylo na toto téma provedeno několik studií, které objevily potencionální geny, či místa na chromozómech spojená s kvalitou masa u různých hospodářských zvířat (skot, ovce, prasata a kuřata).

Detekce nových genetických markerů, ve spojení s kvantitativní genetikou, povede ke zlepšení kvality živočišných produktů.

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

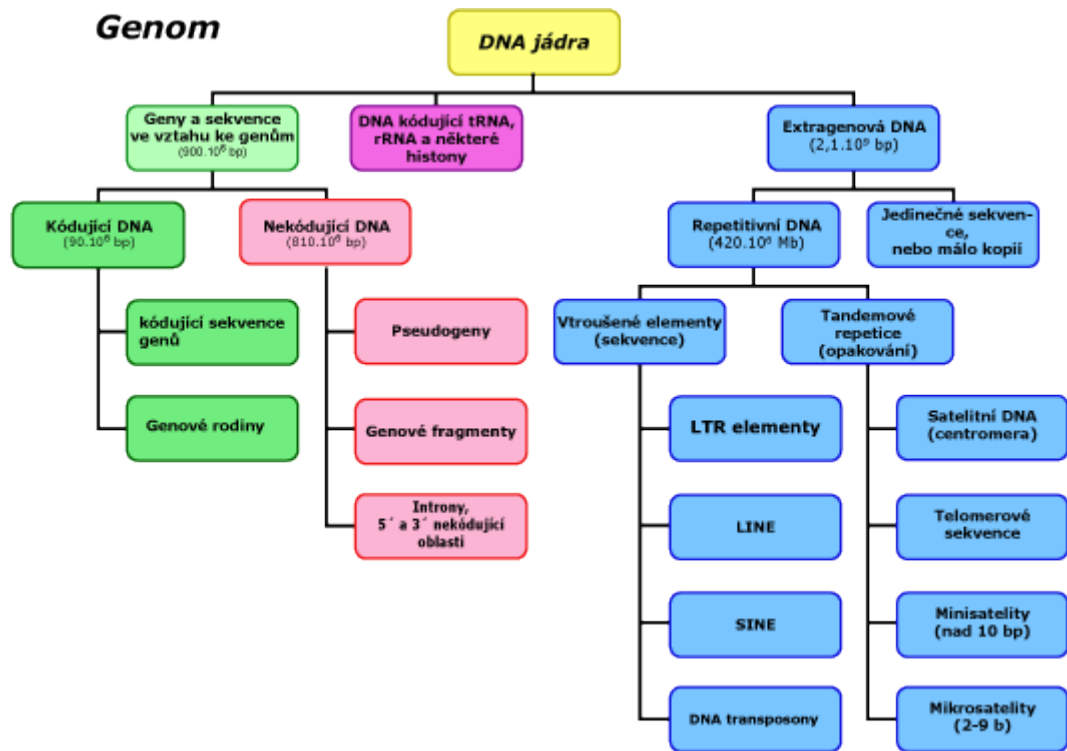
2.1 Struktura savčího genomu a genu

2.1.1 Struktura savčího genomu

Vše, co víme o genomu hospodářských zvířat, vychází z předešlých znalostí struktury eukaryotních genomů, především genomu člověka. Genom člověka, prasete a i skotu tvoří přibližně 3–3,5 miliard bazí (v haploidní buňce), které představují asi 100 000 genů (Little, 2005). Transkribováno je pouze 5-10 % genomu, z nichž jen 2-3 % tvoří exony (kódující oblasti) (Pray, 2008). Genom je segmentovaný na jednotlivé chromozomy, jádro odděleno od cytoplazmy, v cytoplazmě se nachází mitochondriální DNA (kružnicová). Genomy jsou větší s nižší hustotou genů (Lynch, 2006). Neznáme přesný počet genů, ale obecně se uvádí rozmezí velikosti genomu člověka 20 000–25 000 genů (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004).

DNA obsahuje jedinečné a repetitivní sekvence nukleotidů. Repetitivní sekvence tvoří velkou část genomu, lze je rozdělit do dvou kategorií na mobilní genetické elementy a tandemové repetice, které se dále dělí do dalších skupin (Iyer a kol, 2011). Schéma struktury genomu je na obrázku č. 1.

Geny, jež mají společného předka a zachovaly si určitou sekvenční a funkční podobnost, označujeme jako genovou rodinu. Existuje 2200 genových rodin, z toho pouze 76 je společných pro všechny organismy. Savci mají mnoho genů v genových rodinách. Příkladem může být globinová genová rodina, kaseinová rodina mléčných proteinů. Součástí genomu jsou i nefunkční kopie genů tzv. pseudogeny (Friedman a Hughes, 2001).

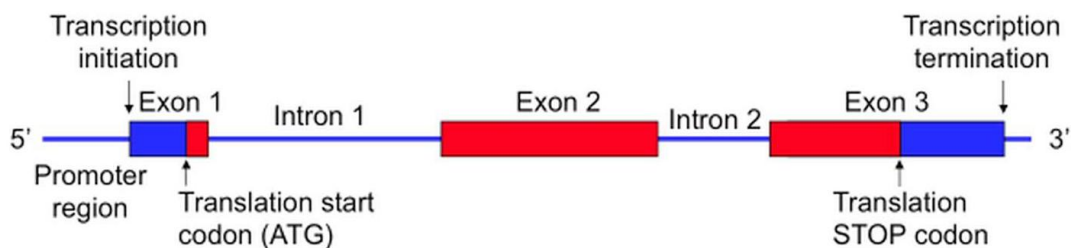


Obr. č. 1: Struktura eukaryotického genomu (<http://user.mendelu.cz/urban/vsg2/dna2/geny.htm>)

2.1.2 Struktura savčího genu

Savčí gen je rozdělen do několika funkčních částí. První částí je promotorová oblast lokalizovaná na 5'- konci. V této oblasti se nachází tzv. TATA-box (-30 Goldberg-Hognessův box), jež slouží ke správnému navázání RNA polymerázy II a tedy k iniciaci transkripce. Další částí je iniciační kodon ATG kódující metionin. Kodon ATG označuje začátek translace všech eukaryotických genů, nachází se většinou v poloze +64. Mezi počátkem transkripce a start kodonem leží tzv. 5'- UTR nepřekládaná oblast. Za start kodonem následují exony oddělené introny, které začínají donorovým a končí akceptorovým místem sestřihu. V posledním exonu se nachází stop kodon, za kterým leží oblast 3'- UTR. V této oblasti je polyadenylační signál představovaný sekvencí AATAAA (Lawson a Spieth., 2006). Obecná struktura genu je zobrazena na obr. č. 2.

Mimo tyto obecné části savčí gen obsahuje další regulační oblasti, vazebná místa transkripčních faktorů (v promotoru), enhacery a silencery transkripce (Koolman a Klaus-Heinrich, 2012).



Obr. č. 2: Struktura genu (<https://www.youtube.com/watch?v=h5HI2OqOJA0>)

2.2 Lokusy kvantitativních znaků QTL

Většina hlavních užitkových vlastností je podmíněna kvantitativními znaky vykazujícími kontinuální proměnlivost (Miles a Wayne, 2008). De Koning a kol. (1999) pojmenovali QTL jako molekulárně-genetický marker, který se nachází mimo hlavní oblast genu pro určitou užitkovou vlastnost, se kterou má ale prokazatelnou spojitost. Jde tedy o oblast na chromozomu obsahující geny ve vazbě ovlivňující kvantitativní znak (Erickson a kol., 2004). Geny, ležící v QTL oblasti, jsou často ovlivněny faktory vnějšího prostředí, heritabilita se pohybuje od 5–50 %. Prozatím neznáme přesný počet, polohu a účinek QTL (Da, 2007). Pokud odpovídají za ekonomicky důležité užitkové vlastnosti, nazývají se ekonomickými významnými lokusy (ETL) (Georges a Massey, 1991).

2.2.1 Kandidátní geny

Jde o geny nacházející se v QTL oblastech, mající výrazný vliv na určitou vlastnost, ovlivňují výsledný fenotyp a podílí se na fenotypové variabilitě. Kandidátní gen může být určen pomocí databází pro modelová zvířata, u nichž byl již prostudován výskyt podobného fenotypu. Zkoumá se pomocí sekvenování, pokud je nalezena mutace, provede se asociační analýza (Berg, 2006).

2.2.2 Asociační analýza

Asociační analýza testuje asociace mezi určitou genetickou variantou, např. polymorfismem genu a daným znakem. Jde tedy o vztah mezi konkrétní alelou,

genotypem nebo haplotypem a daným znakem. Asociační analýzy jsou většinou typu „case-control“ (případová studie), dochází k porovnávání relativního zastoupení daného polymorfismu mezi skupinou jedinců nemanifestující znak a skupinou, která ho projevuje. Nástup nových technologií (např. použití čipů) umožnil současné testování desítek až stovek tisíc jednonukleotidových polymorfismů (SNP) (Bell a kol., 2005).

Dále se provádějí ještě vazebné studie, při kterých se sbírají data od velkého počtu příbuzných jedinců, o nichž se předpokládá, že mají odlišnost v určitém genu či jeho variantách. Tyto varianty ovlivňují vznik daného znaku a následnou analýzu přenosu genetických variant v příbuzenských liniích (Teplan, 2006).

2.2.3 Genetický polymorfismus

Genetický polymorfismus roku 1940 definoval E. B. Ford jako „výskyt dvou a více forem či variant znaku v takové četnosti, kdy vzácnější varianta nemůže být způsobena samotnou náhodnou mutací“. Mutace je v mnoha případech neutrální, v populaci se vyskytuje s minimální frekvencí 1 %. Jiná definice říká, že polymorfismus znamená současnou existenci dvou nebo více mutantních alel genu v populaci. Daný polymorfismus může sloužit jako genetický marker, který umožní mapování pozic genů v chromozómu (Štejfá, 2007).

2.2.4 Genetické markery

Pojem genetický marker označuje úsek DNA o neznámé kódující funkci, se známou fyzicky zmapovanou polohou na chromozómu. Výhodou molekulárně-genetických markerů je jejich velké množství, snadná relativní identifikace, vysoká informativnost a také to, že mohou být detekovány z nepatrného množství tkáně v jakémkoli věku jedince (od embrya až *post mortem*). DNA může být dlouhodobě uchována a lze se tak opakovaně vracet k její analýze i za několik let (Davey a kol., 2011).

3 základní typy genetických markerů:

- Markery kódující exprimované geny (i kandidátní geny pro QTL):
Jsou charakteristické obecně menším výskytem polymorfismů, málo použitelné pro studie diverzity populací a rodin. Využívají se především při komparativním mapováním.

- Vysoce variabilní sekvence DNA:
Řadí se sem mikro- a minisatelity. Mikrosatelity (STR) jsou tandemové repetice krátkých sekvencí nukleotidů (většinou 2-5 nukleotidové repetice). Minisatelity (VNTR) vytváří naproti tomu podstatně delší tandemově se opakující sekvence (9-80). Díky vysokému počtu polymorfismů (velký počet alel) se tyto markery využívají zejména při ověřování parentity.
- Jednonukleotidové polymorfismy (SNP):
SNP jsou bodové mutace (záměna jednoho nukleotidu), které se mohou vyskytovat uvnitř kódujících oblastí DNA. Častěji se však nachází v nekódujících intronech či intergenových úsecích. V genomu se SNP nachází přibližně každých 500 až 1000 bp. Ne vždy vznik SNP uvnitř kódujících sekvencí vede ke změnám sekvencí aminokyselin produkovaného proteinu, a to kvůli jejich nadměrnému počtu (Knoll a Vykoukalová, 2002).

2.2.5 Mapování QTL

Mapování QTL kombinuje hledání asociací mezi alelami markerů a danou užitkovostí, z toho důvodu je potřeba populací zvířat s dostatečně velkou genetickou variabilitou ve sledovaných znacích. Při mapování se v principu postupuje tak, že pomocí mikrosatelitů se označí malý úsek DNA, u kterého se zkoumá, zda nějak ovlivňuje užitkový znak. Při pozitivním výsledku analýzy se v této oblasti hledá gen s potenciálně velkým účinkem na daný znak. Nalezený gen je poté označen jako kandidátní gen (Sa, 2009).

2.3 Vývoj svalové tkáně

Svalstvo se vytváří z mezodermu (střední zárodečný list). Po vytvoření mezodermu následuje jeho diferenciaci, která probíhá v raném embryonálním stádiu společně s vývojem tělních dutin a tělní stěny. Mezodermové buňky myotomu zůstávají v původním epitelovém uspořádání na stejném místě, kde se diferencují na základy kosterních svalů. Myotomové buňky rostou a vyvíjejí se ve vřetenovité myoblasty.

Myogeneze je složitý ontogenetický vývojový proces. Některé embryonální svalové buňky zůstávají nediferencovanými a setrvávají jako nediferencované

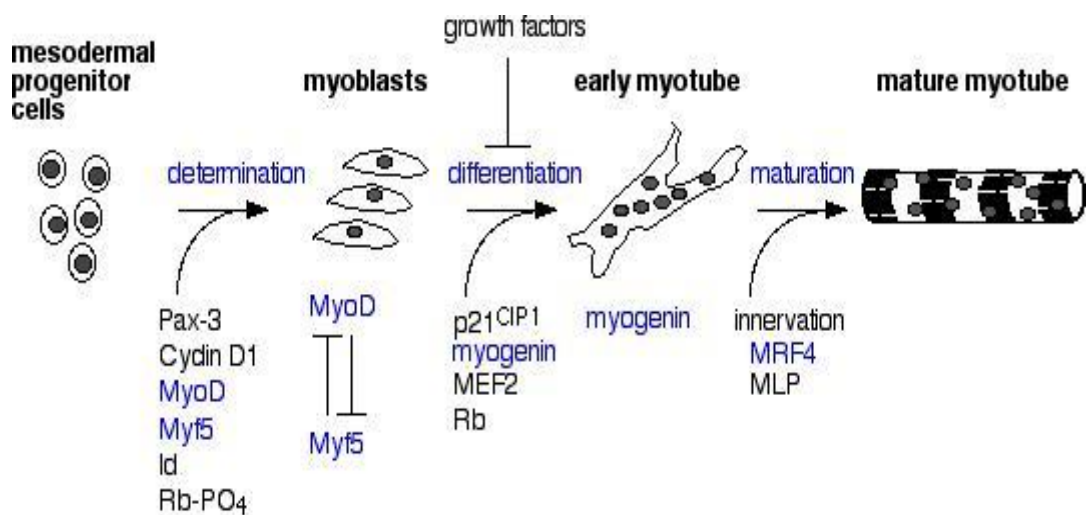
myoblasty až do dospělosti. Z těchto myoblastů se poté vyvíjejí satelitní buňky podílející se na vzniku svalové tkáně.

Myoblasty, které diferencují, jsou řazeny za sebe do řad a dávají tak vznik útvarům nazývaným myotuby. Myotuby se následně během vývoje prodlužují a řadí v podélném směru vedle sebe. Poté dochází k další diferenciaci, vzniká již finální myofibrila (svalové vlákno) (Steinhauser a kol., 2000).

Počet myofibril je především stanoven genetickými faktory a částečně vlivy prostředí, které mohou ovlivnit prenatální myogenezi (Rehfeldt a kol., 2000). Celá myogeneze je kontrolována geny rodiny *MYOD*. Do této rodiny svalově specifických regulačních faktorů patří *MYOD1* (*MYF3*), *MYOG* (*MYF4*, myogenin), *MYF5*, *MYF6* (*MRF4*), geny *IGF* rodiny, do které náleží inzulín podobné růstové faktory *IGF2* a gen myostatin (*MSTN*, *GDF8*) (Davis a kol., 1987).

Geny rodiny *MYOD* kódují vysoce konzervované proteiny bHLH (basic helix-loop-helix), které regulují a dohlížejí na embryologický vývoj svaloviny (Olson, 1990). Funkční aktivita myogeních faktorů se častokrát překrývá. Každý faktor má svou specifickou úlohu v kontrole svalového vývoje. Během embryogeneze se odlišně exprimují (Naidu a kol., 1995).

Gen *MYOD1* spouští diferenciaci fibroblastů na myoblasty a aktivuje gen *MYOG*, který indukují vznik myofibril fúzí myoblastů (Hasty a kol., 1993). Jediný gen *MYOG* je exprimován ve všech svalových buňkách (Wright a kol., 1989). Gen *MYF5* dohlíží na správné mitotické dělení zárodečných buněk, kdežto *MYF6* (*MRF4*) se účastní diferenciaci svalových buněk v myotuby. S počátkem exprese myogeninu se snižuje exprese *MYF5* a *MYOD1*. Poté ustává dělení a buňky začínají fúzovat v samotné myofibrily (Te Pas a kol., 1996). Schematické zobrazení vývoje svalového vlákna je na obr. č. 3.

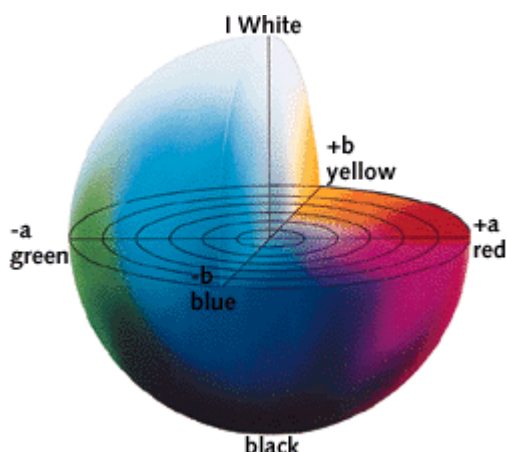


Obr. č. 3: Vývoj svalového vlákna (<http://www.jbc.org/content/277/51/49831/F9.expansion>)

2.4 Vybrané ukazatele jakosti masa

2.4.1 Barva

Barva je velmi důležitý ukazatel. Spotřebitel podle něho posuzuje kvalitu masa a masných výrobků. Barvu masa ovlivňuje konečná hodnota pH (pHu), obsah myoglobinu a jeho derivátů (MacDougall, 1982, Seideman a kol., 1984). Hovězí maso má vůbec nejvyšší koncentraci myoglobinu, a proto je tmavší než maso ostatních druhů (Hernandez a kol., 2006). Změny barvy souvisí s oxidací centrálního atomu železa (myoglobinu) vzdušným kyslíkem, dochází ke vniknutí kationtu metmyoglobinu, a tím k šedohnědému zbarvení masa. Barvu můžeme posoudit pomocí systému CIE hodnotami L*, a*, b*. L* zde udává světlost masa, souřadnice a* vyjadřuje vztah mezi červenou a zelenou barvou, b* pak mezi žlutou a modrou (viz obr. č. 4) (Pipek a Jirotková, 2001).



Obr. č. 4: CIE L*a*b* systém hodnocení barvy masa (<http://grafikpromedia.eu/technologie/cms>)

2.4.2 Vaznost

Pojmem vaznost označuje schopnost masa vázat vodu vlastní a přidanou. Je jí možné ovlivnit přísadami a samotným zacházením s masem. Obecně můžeme vodu z technologického hlediska rozdělit na volnou a vázanou (zda z masa volně vytéká nebo ne) (Kadlec a kol., 2002). Vaznost je tedy stanovena jako podíl vody vázané k celkovému objemu v mase v %. Vaznost ovlivňuje několik faktorů. Mezi ty nejdůležitější patří pH, koncentrace solí, obsah některých iontů, intravitální vlivy, průběh posmrtných změn, rozmělnění masa (Pipek a Jirotková, 2001). Minimální hodnota vaznosti nastává při hodnotě pH izoelektrického bodu (přibližně 5,0). K největším změnám vaznosti však dochází v závislosti na průběhu posmrtných změn. Nejprve hodnota klesá v důsledku okyselení masa a tvorby pevné struktury (*rigor mortis*), poté se zvyšuje vlivem zrání (Kadlec a kol., 2002).

2.4.3 Síla stříhu (křehkost)

Síla stříhu je velmi důležitou vlastností pro sensorické hodnocení masa a jeho technologické zpracování. Pro spotřebitele je jedním z nejdůležitějších znaků kvality masa, za kterou jsou ochotni platit vyšší ceny (viz hovězí maso patřičné křehkosti) (Destefanis a kol., 2008, Feldkamp a kol., 2005). Problémem prodejců a sítí marketů je nedostatečně dlouhé skladování masa v chladících podmínkách pro získání konečné křehkosti. Týká se to především hovězího masa, které vyžaduje alespoň 14 dní. Vepřové maso naproti tomu zraje 5-7 dní a maso jehněčí 7-10 dní. Křehkost ovlivňují různé předporážkové a poporážkové faktory.

Mezi nejdůležitější předporážkové faktory patří věk, druh, plemeno, pohlaví, výživa a úroveň předporážkového stresu. Samotný proces zrání je způsoben posmrtným zeslabením myofibril, proteolytickými enzymy, degradací myofibrilárních a cytoskeletálních proteinů (Koochmaraie a Geesink, 2006).

2.4.4 Hodnota pH

Hodnota pH vyjadřuje míru kyselosti či zásaditosti prostředí. pH masa se pohybuje v rozmezí 4-7. Během posmrtné autolýzy svalové tkáně (20 až 24h po usmrcení) dochází k rozkladu glykogenu, nahromadění kyseliny mléčné a tím ke snížení pH svalové tkáně. Autolýza vykazuje největší intenzitu hned po porážce a dále její intenzita klesá. Posmortální změny v tkáních zvířat závisí na míře rozpadu ATP a glykogenu. Při rozpadu 2/3 původního množství ATP za teploty 4 °C se pH ve svalech výrazně snižuje (Kerry a kol., 2002). Snížením hodnoty pH masa se zmenšuje množství stále ubývajících skupin bílkovin, což se projeví snížením vaznosti vody a jemnosti masa. Hodnota pH ovlivňuje chuť, měkkost, rychlost procesu zrání, pevnost, vaznost a světlost masa (Hector a kol., 1992). Čím blíže je hodnota pH k izoelektrickému bodu, tím je menší rozpustnost bílkovin, které následně vážou málo vody. Světlo proto proniká do malé hloubky, odráží se více od povrchových vrstev a vytváří tak dojem světlejšího masa. To je viditelné u tzv. PSE masa (bledé, měkké, vodnaté), u kterého je hodnota pH po 45 minutách po usmrcení nižší než 5,8 (Pipek a Jirotková, 2001). Pokud je hodnota pH větší než 6,2 je maso klasifikováno jako DFD maso (tmavé, pevné, suché) (Hoffman a kol., 2007).

2.5 Vybrané lokusy

2.5.1 Myostatin

Jedním z nejdůležitějších kandidátních genů hospodářských zvířat je právě myostatin. Je znám jako kandidátní gen pro produkci masa.

Myostatin, nebo-li růstový diferenciační faktor č. 8 (*GDF8* - growth differentiation factor 8), je členem *TGF*-beta rodiny savčích růstových genů, které hrají velmi důležitou roli v regulaci embryogenního vývoje a homeostázi tkání v dospělosti. Myostatin se podílí na změně beta konformace skupiny růstových faktorů, které hrají roli v redukci růstu u savců. Poškození tohoto genu (např.

mutací) vede ke ztrátě funkce proteinu, který *MSTN* kóduje a dále ke vzniku svalové hypertrofie (*mh*), jinak také nazývané dvojí osvalení (Dehnavi a kol., 2012).

Svalová hypertrofie je dědičným projevem u skotu, lidí, ovcí, kuřat, psů apod. (viz obr. č. 5). Název vychází z chybného pojmenování, jelikož nejde o „zdvojení počtů svalů“, ale je výsledkem společné součinnosti hyperplazie (zvýšení počtu svalových buněk) a hypertrofie (zvětšení svalových buněk).

Fenotyp dvojího osvalení je charakterizován menšími proporcemi kostí, zvýšeným objemem svalstva, redukcí obsahu tuků, zvýšenou křehkostí masa, vyšší porodní váhou (Crisá a kol., 2003).

Nedávné studie prokázaly, že myostatin působí jako negativní regulátor myogeneze a inhibuje proliferaci myoblastů během buněčného cyklu myogenní diferenciaci (Dehnavi a kol., 2012).

Myostatin, u dospělých myší a myších ve vývoji, je specificky exprimován v kosterním svalstvu, kde negativně reguluje svalovou hmotu. Inaktivace myostatinu u myší vede k obrovskému nárůstu kosterní svaloviny. Myši s neaktivním myostatinem váží 2-3 krát více než divocí jedinci, právě kvůli zvýšení počtu svalových vláken, bez nárůstu tukové tkáně. Inaktivace myostatinu by tedy mohla sloužit k zvýšení svalové hmoty.

Myostatin byl naklonován a byla zkonstruována cDNA knihovna z RNA izolované z kosterní svalové tkáně. Knihovna byla dále screeningována sondou (myším myostatinem), jehož C koncová oblast je aktivní část molekuly. Po porovnání C koncových oblastí různých druhů, byla zjištěna 100% shoda u myostatinu myšího, krysího, lidského, prasečího, kuřecího a krůtího. U paviánů, skotu a ovcí se C-koncová sekvence lišila pouze třemi aminokyselinami. Vysoký stupeň konzervace sekvence myostatinu napříč druhy naznačuje, že funkce myostatinu je také vysoce konzervována (McPherron a kol., 1997).

Dále komparativní analýzy, zaměřené na existující protein myostatin, poukazují na vysoký stupeň sekvenční konzervace i mezi druhy ovcí. Byl zjištěn jednonukleotidový polymorfismus (SNP) v netranslatovatelném regionu 3 (3'-UTR). Tento SNP je příčinou svalové hypertrofie v evropských chovech.

Jako obrovskou výhodou považujeme to, že pomocí technologie knock out genu myostatin lze dosáhnout skvělých výnosů. V zemědělství by to znamenalo zvýšení produkce masa (Jamshidi a kol., 2014).



Obr. č. 5: Svalová hypertrofie různých druhů (<http://www.skewsme.com/myostatin.html>)

2.5.1.1 Bovinní myostatin

U skotu se myostatin nalézá na 2. chromozomu (BTA2), byl objeven roku 1997 pomocí vazbové analýzy.

Svalová hypertrofie skotu byla již široce zdokumentována. Vyskytuje se s odlišnou frekvencí u mnoha evropských plemen. Pro skot je charakteristická hlavně v hrudní oblasti a zadních čtvrtích a to tak výrazně, že jsou pod kůží viditelné jednotlivé svalové partie. U extrémně osvalených jedinců je vyšší pravděpodobnost výskytu nevyvinutí zevních genitálií (Zahrádková a kol., 2009).

U bovinního myostatinu byl zjištěn překvapivě vysoký počet polymorfismů. Změny na úrovni nukleotidů vedou ke zkrácení proteinového produktu, což vyústí v nedostatek jeho exprese a ve vznik *mh* fenotypu. Plemena s *mh* fenotypem vykazují odlišnosti v intenzitě exprese pravděpodobně kvůli rozdílům zapříčiněným selekčním tlakem. U některých jednotlivců různých plemen neodpovídají jejich fenotypy genotypům (Dunner a kol., 2003).

Dvojitý osvalení, které bylo pozorováno u mnoha plemen skotu za posledních 190 roků, se zdá být děděno jako jediný hlavní autozomální lokus s několika

modifikacemi fenotypové exprese vedoucí k neúplné penetraci znaku (McPherron a kol., 1997).

Znak dvojího osvalení u plemene Belgického modrého segreguje jako jediný lokus pro svalovou hypertrofií (*mh*). Částečně recesivní *mh* mutace má za následek průměrné zvýšení svalové hmoty o 20-25 %, pokles hmotnosti většiny orgánů, snížení intramuskulárního tuku a pojivové tkáně. *Mh* lokus je zde ve vazbě s markerem na bovinním druhém chromozomu. Existuje podobnost fenotypu mezi myšmi s inaktivovaným myostatinem, plemenem Belgického modrého a podobné polohy myostatinu v genetické mapě. Kvůli této podobnosti byl označen bovinní homolog myostatinu jako kandidátní gen pro *mh* lokus. U plemene Piedmontese se vyskytuje také s velkou frekvencí (McPherron a kol., 1997).

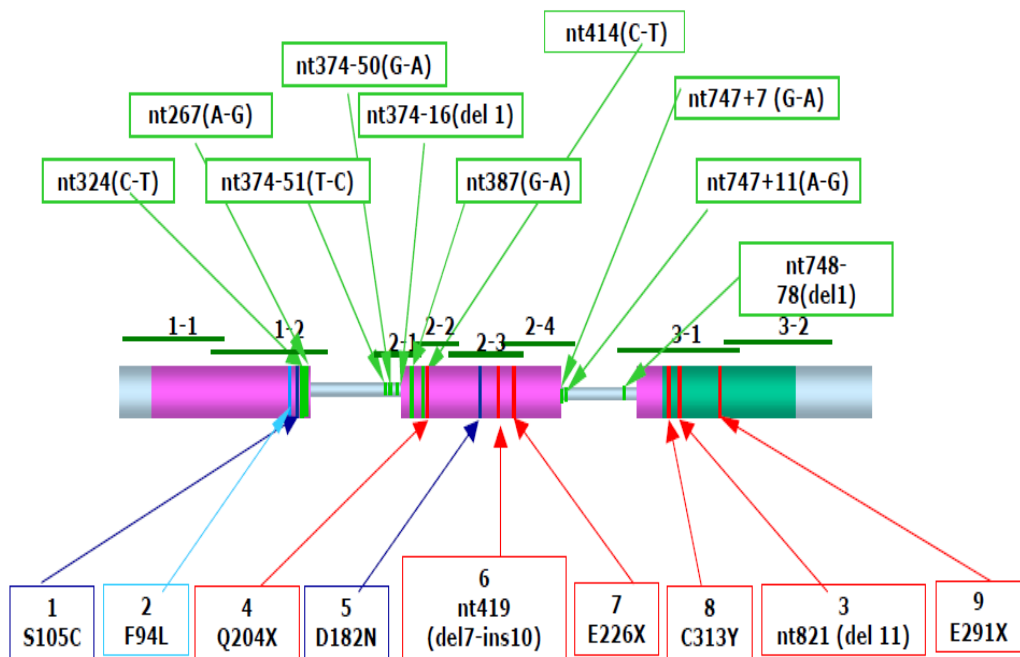
U masných plemen jsou přítomné různé mutace způsobující výskyt různých variant genu v populaci, které tak vytváří značný *MSTN* polymorfismus viz obr. č. 6. Objev mutací vedoucí ke ztrátě funkce myostatinu vyvrátil původní hypotézu, že dvojí odvalení je geneticky homogenní vlastnost (Ménissier, 1982). Je pozoruhodné, že byla identifikována zvířata (zejména plemene Blonde d'Aquitaine), která vykazovala fenotyp dvojího osvalení bez jakékoli změny aminokyselin v sekvenci a bez snížení koncentrace mRNA myostatinu (Karim a kol., 2000).

Doposud popsané mutace v bovinním myostatinu:

1. 11bp delece (nt821(del11))
Způsobuje deleci 11 bp ve 3. exonu, část kde vzniká protein, čímž dojde ke vzniku stop kodonu a ke skončení transkripce. Následkem je tedy zkrácení bioaktivní C-koncové domény proteinu, myostatin tak ztratí svoji funkci negativního regulátora myogeneze a vzniká *mh* fenotyp. Tato mutace se vyskytuje u plemen Belgické modré, Blonde d'Aquitaine, Limousine, Parthenaise, Asturiana a Rubea Gallega.
2. G→A tranzice v pozici 938 bp (C313Y)
Výsledkem je substituce vysoce konzervovaného cysteinu za tyrosin, nalezena u plemen Gasconne a Piedmontese.

3. Inzerce/delece v pozici 419 bp v 2. exonu (nt419(del7-ins10))
Dochází k deleci 7bp a nahrazení zdánlivě nesouvisejícími 10bp v N-koncové oblasti proteinu, která předčasně odhalí stop kodon. Tato mutace byla nalezena u plemene Maine-Anjou.
4. C→T tranzice v pozici 610 bp (Q204X)
Vzniká předčasný stop kodon v N-koncové oblasti na pozici 204. aminokyseliny, vyskytuje se u plemen Charolais a Limousine.
5. G→T transverze v pozici 676 bp (E226X)
Způsobuje také vznik předčasného stop kodonu v N-koncové oblasti na pozici 226. aminokyseliny, objeveno u plemene Maine-Anjou.
6. G→T transverze v pozici 874 bp (E291X)
Následkem je předčasné odhalení stop kodonu v C-koncové bioaktivní oblasti, zjištěna pouze u italského plemene Marchigiana.
7. C→A transverze v pozici 282 bp v 1. exonu (F94L)
Zapřičiňuje substituci konzervativního fenylalaninu za leucin. Touto mutací nevzniká *mh* fenotyp, což je způsobeno malým účinkem mutace v nedůležité části kódující oblasti genu.
8. C→T tranzice v pozici 414 bp v 2. Exonu (n414(C-T))
Má za následek vytvoření předčasného stop kodonu u 138. aminokyseliny bílkovinného řetězce.

V roce 2002 popsal Miranda další dvě mutace v kódujících regionech, nicméně doposud nebyl prokázán jakýkoliv vliv na funkci proteinu. Mutace byly označeny S105C a D128N (Zahrádková a kol., 2009). Přehled mutací u různých plemen je zaznamenán v Tab. I.



Obr. č. 6: Schéma genu myostatin se známými mutacemi. Tiché mutace jsou v zeleném rámečku. Modrý rámeček ohraničuje missense mutace a červeně jsou označeny disruptivní mutace způsobující *mh* fenotyp (Dunner a kol., 2003).

Tab. I: Mutace v genu *MSTN* a jejich výskyt u jednotlivých plemen

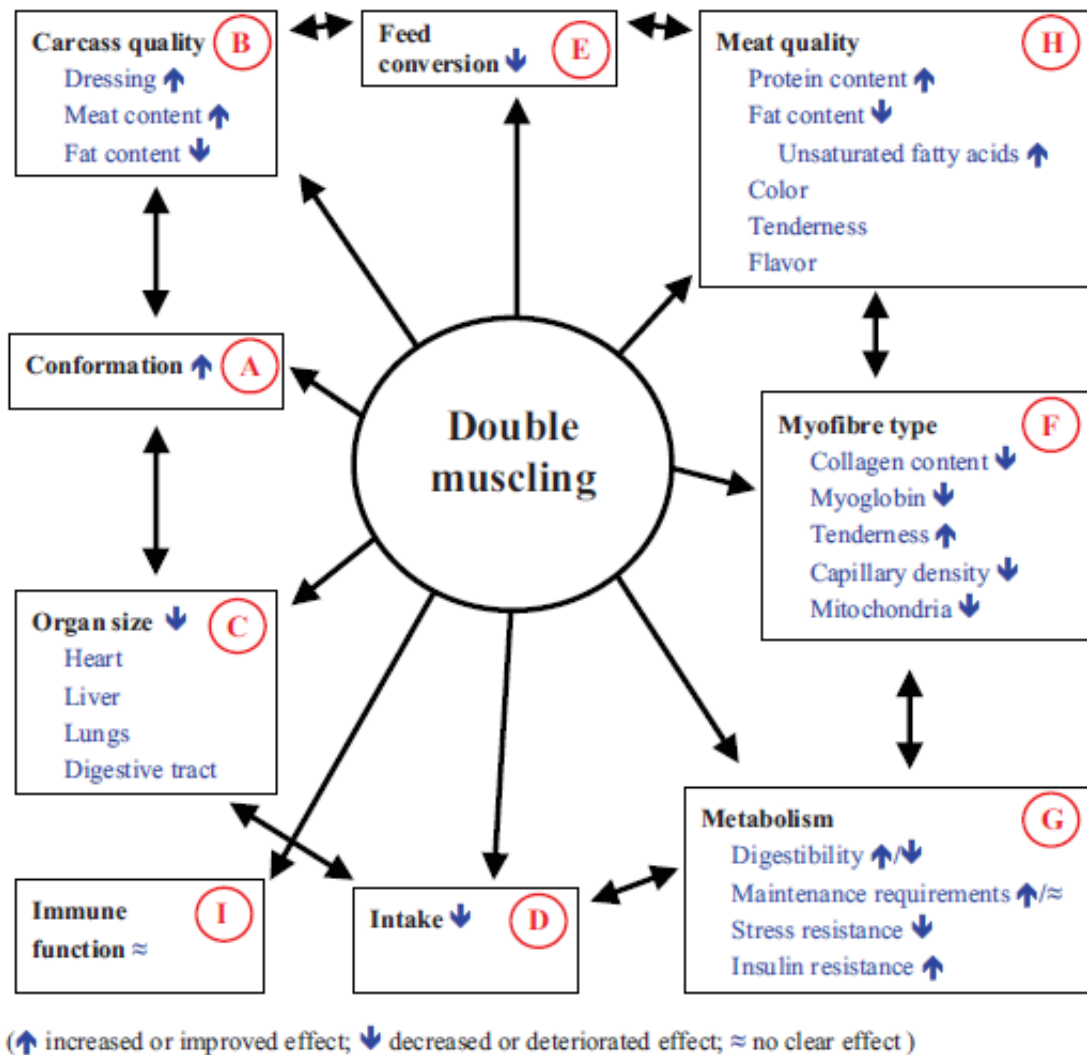
Exon	1	1	2	2	2	2	3	3	3
Polymorfní místo	<i>S105C</i>	<i>F94L</i>	<i>nt414</i>	<i>nt419</i>	<i>Q204X</i>	<i>E226X</i>	<i>nt821</i>	<i>C313Y</i>	<i>E291X</i>
Plemeno									
Charolais	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Belgické modré	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Holštýn	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Aberdeen angus	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Plavé aquitánské	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Galloway	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Gasonne	-	-	+	-	-	-	-	+	-
Limousine	-	+	+	-	+	-	+	-	-
Maine Anjou	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Marchigiana	-	+	+	-	-	-	-	-	+
Salers	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Masný simentál	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Piemontese	-	-	+	-	-	-	-	+	-
South Devon	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Austriana de Valles	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Parthenaise	+	-	-	-	+	+	+	-	-
Pirenaica	-	+	-	+	-	-	+	-	-

Pro zemědělské aplikace existují však určité nevýhody: snížení plodnosti samic s *mh* fenotypem, nižší životaschopnost potomků a pozdější nástup sexuální dospělosti. Mnoho chovatelů se snažilo omezit výskyt *mh* fenotypu, protože s ním často souvisí přítomnost dystokie (stav, kdy není možno porodit ramínka plynulým tahem po porodu hlavičky, ale je nutné použít specifické manévry na uvolnění ramínek). Nicméně zvýšení svalové hmoty a zvýšení efektivity krmiva z velké části kompenzuje tyto nevýhody (McPherron a kol., 1997).

2.5.2 Vliv *mh* fenotypu na jatečné maso

Zvířata s *mh* fenotypem jsou více náchylná k onemocnění dýchacích cest, stresu a dystokii. Vyžadují zvláštní pozornost na ustájení a dobré životní podmínky. Jatečné maso je velmi libové a obsahuje nízký obsah intramuskulárního tuku. Je zde rozdíl i v profilu mastných kyselin. Dvojitě osvalená zvířata obsahují méně nasycených mastných kyselin ve srovnání s normálními jedinci.

Obsah kolagenu v mase je také nižší, takže maso zvířat s *mh* fenotypem bývá většinou křehčí.



Obr. č. 7: Vliv dvojího osvalení na některé důležité vlastnosti (Fiems, 2012)

Jatečné maso pocházející ze zvířete s *mh* fenotypem je většinou klasifikováno jako výběrové a excelentní podle jednotného evropského systému klasifikace jatečně upravených těl skotu. Dvojitě osvalená zvířata též mají více rychlých glykolytických svalových vláken, jejichž průřez se vyznačuje zvýšeným obsahem glykogenu a sníženým obsahem tuku, myoglobinu, kolagenu, počtu mitochondrií a sníženou kapilární hustotou. Snížený obsah myoglobinu ovlivňuje transport kyslíku a barvu masa. Je dobře známo, že zvířata s *mh* fenotypem mají světlejší maso ve srovnání s normálními jedinci. Větší počet svalových vláken může mít rovněž vliv na rychlejší pokles pH masa po poražení. Dále nižší zásoba glukózy a rychlejší glykolýza mohou urychlit vyčerpání glukózy, zejména ve stresových situacích, což může vést k produkci DFD masa. Zvýšená frekvence DFD masa může být způsobena větší náchylností dvojitě osvalených zvířat k tepelnému stresu. Další typickým jevem je velmi rychlé šedé zbarvení v místě řezu masa krátce po

oříznutí. Vlivem vyšší míry postmortální glykolýzy v kombinaci se zvýšenou svalovou hmotou má maso po porážení vyšší teplotu, v důsledku toho je zvýšen stupeň denaturace bílkovin. Očekává se tedy, že tento jev má nepříznivý vliv na vaznost vody masa (Fiems, 2012).

2.5.2 MYF5

Gen *MYF5* se nachází na 5. chromozómu, přesněji v oblasti 5q2.5 (Soumillion a kol., 1997), část jeho promotoru zasahuje do exonové části genu *MYF6* (Yoon a kol., 1997). Tento gen, spolu s dalšími myogenními regulačními faktory, kontroluje mitotické dělení zárodečných svalových buněk a závisí na něm jejich finální diferenciaci (Braoun a kol., 1989). Jako vůbec první svalově-specifický faktor byl exprimován *in vivo*. *MYF5* je exprimován nejen ve svalových buňkách, ale i v tkáních bez svalů, predipocytech a v neuronech. Nicméně u dospělých jedinců je exprese omezena pouze na satelitní buněčné populace a svalové vřetenka (Zammit a kol., 2004).

Te Pas a kol. (1999) se zabýval polymorfismy *MYF5* a objevil 3 mikrosatelity: dva v promotoru a jeden v 3. intronu. Dále stanovil dva polymorfismy (*PvuII*, *HinfI*) v uzavřené kódující sekvenci. Další 3 mutace byly identifikovány v oblasti promotoru (A65C, C580T, C613T) (Urbanski a kol., 2006).

Exprese *MYF5* je spojena s determinací linie myoblastů. Společně s genem *MYOD* jsou exprimovány v prolifерujících myoblastech. *MYF5* a *MYOD* mají hodně podobné funkce. U myší, pokud chybí jeden z genů (*MYF5* či *MYOD*), probíhá normální svalový vývoj. Avšak absence proteinu *MYF5* má za následek selhání laterální části sklerotomu a jeho nesprávné formování. Jedinci jsou sice normálně osvalení, ale jejich žebra jsou zdeformovaná, což jim znemožňuje dýchat (Braun a kol. 1989, Kišacová a kol., 2006). Myši umírají již v perinatálním období (část fetálního období od 26. týdne vývoje do 4. týdne po porodu) (Francetic a Li, 2011). Firulli a Olson (1997) prokázali, že *MYF5* působí již od osmého dne věku myšího embrya.

2.5.2.1 Bovinní MYF5

U masného skotu byly zjištěny (detailním mapováním) ve třech úsecích pátého chromozómu QTL pro růstové vlastnosti. První region je 0-30 cM, druhý v poloze 55-70cM a třetí 70-80cM.

Gen *MYF5* hraje důležitou úlohu v růstu, vývoji savců a nachází se v QTL oblasti. Hmotnost při narození, průměrný denní přírůstek po odstavu (PWADG) a průměrná denní dávka (ADGF) jsou tři vlastnosti spojené se svalovou tkání u masného skotu.

Pro *MYF5* byla zjištěna u skotu mutace A/G na pozici 1948 bp v druhém intronu (Drögemüller a Kempers, 2000). Pokusy knock outu genu *MYF5* u myši potvrdily teorii o ovlivnění svalového vývoje. Významná asociace mezi SNP a růstovými vlastnostmi naznačuje, že *MYF5* může být jedním z genů, které příčinně ovládají růst skotu, nebo že gen je velmi blízko k původci genu(ů) (Li a kol., 2004). Bylo zjištěno, že jeden ze SNP *MYF5* má významný aditivní vliv na PWADG, *MYF5* se proto dostal na pozici silného kandidátního genu.

3. CÍLE PRÁCE

- Provést genotypizaci dvou kandidátních lokusů s potenciálním vztahem k užitkovým vlastnostem, resp. zdraví zvířat.
- Vypracovat asociační analýzu vztahu genotypů, resp. alel k užitkovosti.
- Datové soubory vyhodnotit vhodnými statistickými metodami.
- Provést interpretaci zjištěných výsledků.

4. METODIKA

Analýza vzorků pro lokusy genů *MSTN* a *MYF5* byla provedena dle Zhang a kol. (2007) pomocí PCR/RFLP.

4.1 Zvířata

K analýze bylo použito 241 vzorků masa českého strakatého skotu, pocházejícího z Výzkumného ústavu pro chov skotu s.r.o. Rapotín. Vzorky byly odebírány v letech 2010-2013. Po odebrání byly uskladněny při -20°C .

4.2 Výběr lokusů

Byly vybrány 2 lokusy *MSTN* a *MYF5*.

4.3 Laboratorní analýza

4.3.1 Izolace DNA

Izolace byla provedena izolátorem s využitím komerčně dostupného kitu (MagCore® Genomic DNA Tissue) pro izolaci DNA z masa.

4.3.2 Metoda PCR/RFLP

PCR:

Reakční směs:

Taq Buffer with KCl (10x)	2,5 μl
MgCl ₂ (25 mM)	3,0 μl
dNTP's (10 mM)	2,5 μl
forward primer (5pmol)	1,0 μl
reverse primer (5pmol)	1,0 μl
Taq DNA polymeráza (1U/ μl)	2,0 μl
DNA	2,0 μl
<u>H₂O</u>	<u>11,0 μl</u>
Σ	25,0 μl

PCR program

94°C – 3 min

94°C – 30 sec

příslušná annealingová teplota – 40 sec

} 39x

72°C – 1 min

72°C – 10 min

10°C – hold

Tab. II: Sekvence primerů, pozice, velikost ampliconů a annealingová teplota

Gen	sekvence primerů	pozice primeru (Genbank)	velikost ampliconů (bp)	annealingová teplota
MSTN	F 5'-CCCTACAGA GGCCAATTCAA -3'	9,142	1,346	63 °C
	R 5'-CTCGCTGTTCTCATTTCAGATC-3'	11,486		
MYF5	F 5'-GATAGCTGGCTGTGAATGAT -3'	966	1,190	60 °C
	R 5'CTGGCAACTGGGGAGAGAGAAG-3'	2,155		

RFLP:

Restrikční směs:

Amplifikát 20,0 µl

Restrikční endonukleáza 1,2 µl

10x Buffer Tango (with BSA) 1,7 µl

Σ 22,9 µl

Tab. III: Gen, typ restriktázy, štěpné produkty, genotyp a podmínky štěpení

Gen	restriktáza	štěpné produkty (bp)	genotyp	podmínky štěpení
MSTN	10 U/ μ l <i>Dra I</i>	505 + 427 + 321 + 93	AA	Inkubace v termostatu minimálně 12 h při teplotě 37 °C
		505 + 365 + 321 + 93	BB	
		505 + 427 + 365 + 321 + 93 + 62	AB	
MYF5	10U/ μ l <i>Taq I</i>	1,190	AA	37 °C
		938+ 207	BB	
		1,190 + 938 + 207	AB	

4.3.3 Elektroforéza

Vizualizace štěpných produktů (genotypů) byla následně provedena pomocí elektroforézy na 3 % agarózovém gelu s ethidium bromidem. Elektroforéza byla nastavena na 150min/ 80V.

4.4 Stanovení barvy masa

Barva masa byla stanovena pomocí spektrofotometru GretagMacbeth Color Eye XTH v barevném systému CIE lab (L^* , a^* , b^*). Každý vzorek byl čtyřikrát proměřen, přístroj poté určil střední hodnotu, se kterou bylo dále pracováno.

4.5 Stanovení vaznosti přidané vody

Vaznost přidané vody byla stanovena dle Ingra (Ingr, 1977). Přibližně 80 g vzorku masa bylo zhomogenizováno se 120 ml destilované vody a 5g NaCl. Jako homogenizátor sloužil laboratorní nožový mlýn. Poté se homogenit vložil do saturační zkumavky (o známé hmotnosti) a zkumavka byla zvážena a uzavřena hliníkovou fólií. Následně se vložila do vodní lázně o teplotě 75 °C po dobu 30 minut. Po půl hodině by sundána hliníková fólie ze zkumavky, která se v převrácené poloze nechala vychladnout a odkapat. Po dalších 30 minutách se zkumavka opětovně zvážila.

Množství vázané vody x (%) bylo vypočteno ze vzorce:

$$x = \frac{250 \cdot (b - 0,4 \cdot a)}{a}$$

a ... hmotnost homogenátu (g) před zahříváním

b ... hmotnost homogenátu (g) po zahřátí, vychladnutí a odkapání

4.6 Stanovení síly stříhu

Síla stříhu masa byla určena pomocí Warner-Bratzlerovy čepel. Tato čepel je 2,94 mm široká, na spodní hraně má otvor ve tvaru písmene V (viz obr. 8). Vzorek byl položen na základní desku, ve které byl uprostřed otvor, kterým procházela sonda směrem dolů. Sonda byla připevněna k ramenu tenzometru. Vzorky byly přerézávány kolmo ke svalovým vláknům. Naměřené hodnoty byly poté automaticky zpracovány softwarem přístroje. Každý vzorek byl proměřen desetkrát, software vypočetl finální hodnotu.



Obr. č. 8: Warner-Bratzlerova čepel (<http://www.andreagaddini.it/wbs.jpg>)

4,7 Stanovení hodnoty pH

Hodnota pH byla stanovena pomocí pH metru se skleněnou vpichovou sondou s tvrzenou špičkou.

4.8 Výpočty

Ze zjištěných genotypů byly vypočteny absolutní frekvence genotypů *AA*, *AB*, *BB* genů *MSTN* a *MYF5*. Následně byly spočteny relativní frekvence genotypů, absolutní a relativní frekvence alel (Tab. IV a V).

Tab. IV: Výpočet frekvencí genotypů:

genotyp	absolutní frekvence	relativní frekvence
<i>AA</i>	D	$d = \frac{D}{N}$
<i>AB</i>	H	$d = \frac{H}{N}$
<i>BB</i>	R	$d = \frac{R}{N}$
Součet	D+H+R=N	d+h+r=1

Tab. V: Výpočet frekvencí alel:

Alela	absolutní frekvence	relativní frekvence
<i>A</i>	P=2D+H	$p = \frac{2D+H}{2N} = \frac{P}{2N}$
<i>B</i>	Q=2R+H	$q = \frac{2R+H}{2N} = \frac{Q}{2N}$
Součet	P+Q=2N	p+q=1

4.9 Statistické vyhodnocení

Zjištěná data byla vyhodnocena pomocí základních charakteristik popisné statistiky (aritmetický průměr, směrodatná odchylka, F-test), dále pomocí testu hypotéz o průměrech (ANOVA). Dále byla provedena analýza rozptylu, jež slouží ke zjištění vlivu kategoriálních proměnných (např. genotyp) na kvantitativní proměnnou (pH, vaznost, síla stříhu, barva). Testuje se nulová hypotéza, zda existují či neexistují statistické rozdíly mezi průměry několika skupin.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

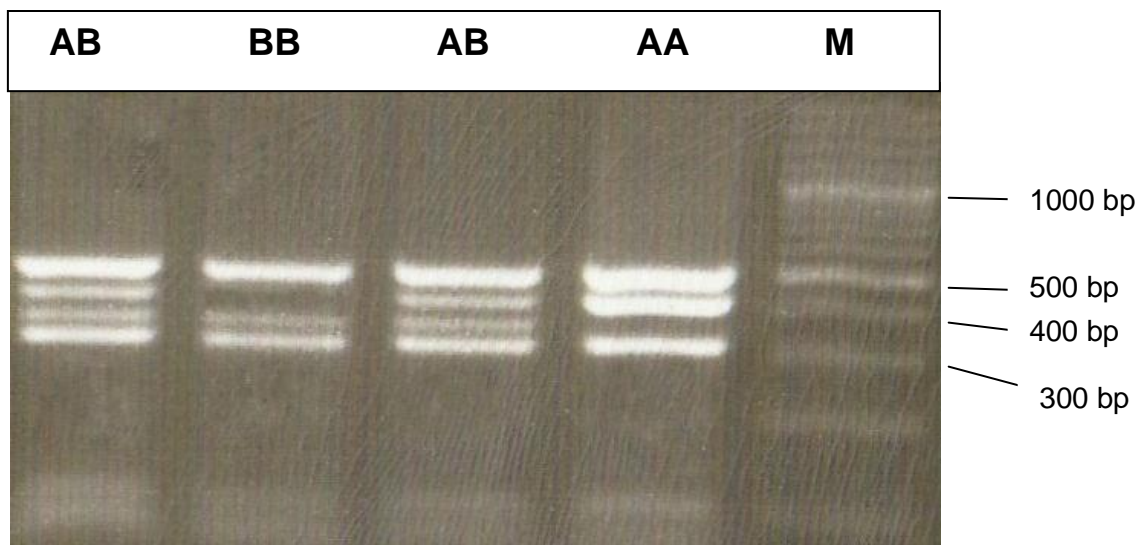
5.1 Genotypizace

5.1.1 *MSTN*

Restrikční enzym *DraI* štěpí *MSTN* v polymorfním místě, které je způsobené T/A transverzí v poloze -371bp (vzhledem k ATG start kodonu). Cílová sekvence

restriktázi je:
$$\begin{array}{c} 5' \dots TTT \nabla AAA \dots 3' \\ 3' \dots AAA \blacktriangle TTT \dots 5' \end{array}$$
 Restrikcí poté vznikají 3 genotypy AA

(505 + 427 + 321 + 93), AB (505 + 427 + 365 + 321 + 93 + 62), BB (505 + 365 + 321 + 93) viz obr. č. 9 (Crisá a kol., 2003). Jako marker byl použit GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder.



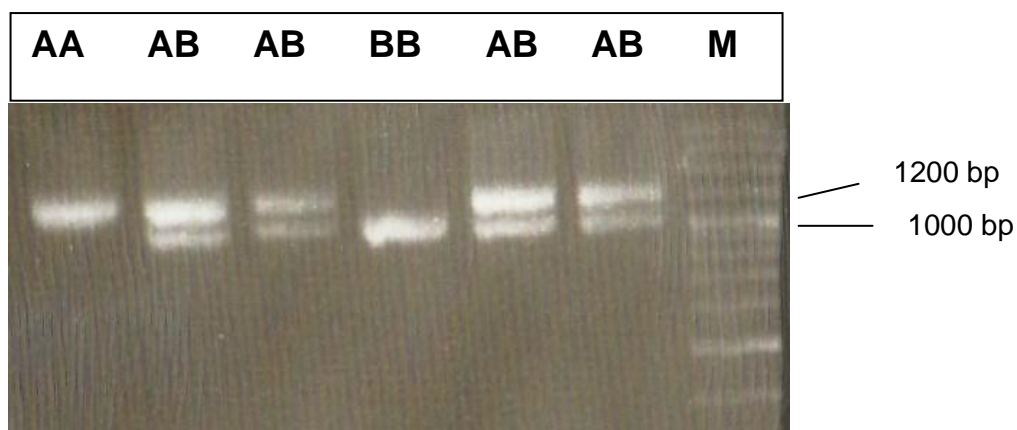
Obr. č. 9: Vizualizace genu *MSTN* (foto autorka)

5.1.2 *MYF5*

Pro gen *MYF5* byla použita restriktáza *TaqI*, která specificky štěpí SNP (A/G) v poloze 1948 bp v 2. intronu. Cílová sekvence restriktázi je:

$$\begin{array}{c} 5' \dots T \nabla CGA \dots 3' \\ 3' \dots AGC \blacktriangle T \dots 5' \end{array}$$

Opět po štěpení vzniknou genotypy AA (1190), AB (938+ 207), BB (1190 + 938 + 207) viz obr. č. 10 (Li a kol., 2004). Jako marker byl použit GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder.



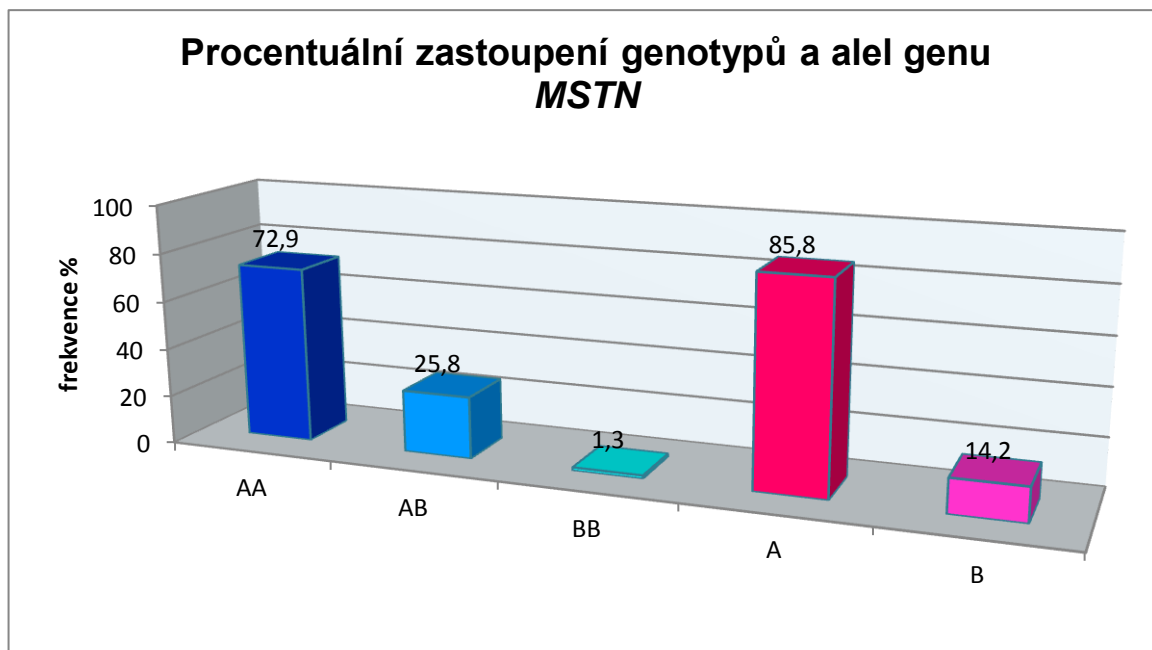
Obr. č. 10 : Vizualizace genu *MYF5* (foto Štěpánka Čunátová)

5.2 Frekvence genotypů a alel

Tab. VI: Frekvence genotypů a alel

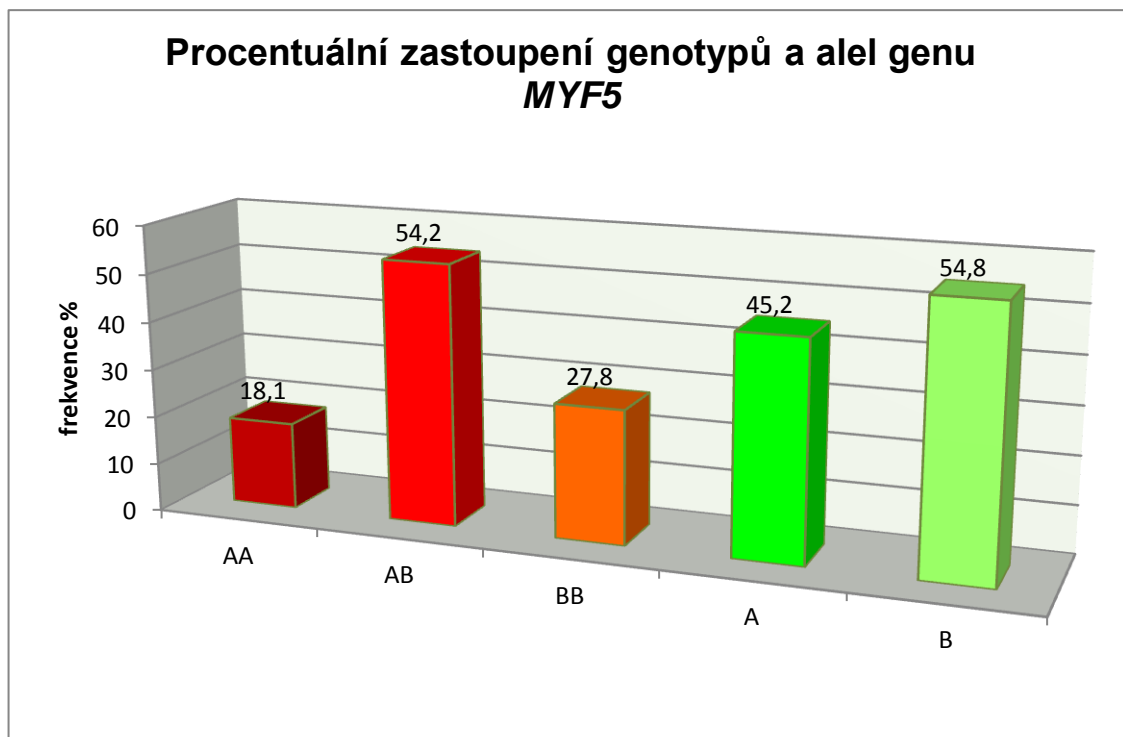
<i>MSTN</i>	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>
Abs.frekvence	167	58	3
Pozorované frekvence	0,729	0,258	0,013
Očekávané frekvence	0,736	0,244	0,020
		$\chi^2 = 0,332^{NS}$	
Alely		$A = 0,858$	$B = 0,142$
<i>MYF5</i>	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>
Abs.frekvence	41	123	63
Pozorované frekvence	0,181	0,542	0,278
Očekávané frekvence	0,204	0,495	0,300
		$\chi^2 = 0,866^{NS}$	
Alely		$A = 0,452$	$B = 0,548$

NS = rozdíl nejsou statisticky významné



Obr. č. 9: Grafické znázornění pozorovaných frekvencí (%) genotypů (*AA*, *AB*, *BB*) a alel (*A*, *B*) genu *MSTN*

Procentuální zastoupení jednotlivých genotypů a alel genu *MSTN* je zobrazeno v grafu na obr. č. 9. Jak je na první pohled patrné, genotyp *AA* se vyskytoval nejčastěji (72,9 %). Samotná alela *A* byla přítomna u 85,8 %, kdežto alela *B* pouze u 14,2 % vzorků. Genotyp *BB* byl pozorován pouze u 3 vzorků a *AB* u 25,8 %. Podobných výsledků genotypizace bylo dosaženo u 3 čínských plemen (Nayang, Qinchuan a Jiaxian). U Nayang a Qinchuan genotyp *BB* nebyl zjištěn ani u jednoho vzorku, u Jiaxian byla frekvence genotypu velmi malá (0,009). Frekvence genotypu *AA* byla u čínských plemen větší (v porovnání se zjištěnou frekvencí). Pohybovala se v rozmezí od 0,910 – 0,946 (mnou zjištěná 0,729) (Zhang a kol., 2007).



Obr. č. 10: Grafické znázornění pozorovaných frekvencí (%) genotypů (*AA*, *AB*, *BB*) a alel (*A*, *B*) genu *MYF5*

Co se týče genotypů (*AA*, *AB*, *BB*) a alel (*A*, *B*) genu *MYF5*, bylo procentuální zastoupení alel celkem vyvážené. Alela *A* byla zjištěna u 45,2 % vzorků a *B* u 54,8 % (viz obr. č. 10). Nejčastěji byl pozorován genotyp *AB* a to s frekvencí 0,542 (viz Tab. VIII), po něm následoval *BB* (0,300) a nejméně *AA* s frekvencí 0,204. Genotypy *AA*, *AB*, *BB* genu *MYF5* byly rovněž genotypizovány u plemen Nayang, Qinchuan a Jiaxian. Oproti *MSTN* se však výsledky více odlišovaly. U všech třech čínských plemen se nejčastěji vyskytoval genotyp *BB* a to s frekvencí v rozmezí 0,541 – 0,695. Opak také byl samotný výskyt alel. U všech třech již zmíněných čínských plemen měla jasnou převahu alela *B* oproti alele *A*. Podobných závěrů bylo dosaženo i u korejského plemene Hanwoo, kde frekvence alely *A* měla hodnotu 0,330 a *B* 0,670 (Chung a Kim, 2005).

Výpočtem χ^2 testu pro oba dva geny bylo zjištěno, že populace je v Hardy-Weinberově rovnováze. Vypočtené hodnoty byly porovnány s tabulkovou hodnotou (5,99) pro 2 stupně volnosti na hladině významnosti $P = 0,05$. Tento výsledek naznačuje, že zatím neprobíhá na genech *MSTN* a *MYF5* selekce, nebo již byla rovnováha v populaci ustavena.

5.3 Asociační analýza mezi studovanými polymorfismy a kvalitou masa

Tab. VII: Průměrné hodnoty, směrodatné odchylky, F-test jakostních vlastností masa jednotlivých genotypů *MSTN*

<i>MSTN</i>				
	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>	<i>F-test</i>
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	
síla stříhu 1. den	5,366 ± 1,418	5,080 ± 1,593	6,907 ± 0,836	1,217
síla stříhu 14. den	5,503 ± 1,329	5,414 ± 1,625	6,138 ± 1,269	2,159
L barva 1. den	37,087 ± 3,482	37,068 ± 3,122	35,597 ± 2,084	0,627
L barva 14. den	37,295 ± 3,749	36,797 ± 3,467	37,143 ± 1,264	1,147
a barva 1. den	6,171 ± 1,747	6,051 ± 1,786	8,497 ± 1,035	0,690
a barva 14. den	7,784 ± 2,245	7,608 ± 2,549	8,650 ± 2,377	0,596
b barva 1. den	5,274 ± 1,624	5,269 ± 1,553	6,303 ± 0,463	1,872
b barva 14. den	6,876 ± 2,102	6,713 ± 2,060	6,177 ± 1,743	0,369
vaznost 1. den	45,047 ± 36,551	48,998 ± 41,043	25,488 ± 3,903	3,236*
vaznost 14. den	56,794 ± 38,344	63,333 ± 41,540	63,333 ± 41,540	1,992
pH 1. den	5,771 ± 0,424	5,826 ± 0,467	5,560 ± 0,046	2,445
pH 14. den	5,785 ± 0,436	5,846 ± 0,469	5,567 ± 0,057	2,598

* = vliv faktoru na hladině významnosti $P < 0,05$

Křehkost hovězího masa je geneticky řízena třemi geny (myostatin, calpain, calpastatin), které mohou být exprimovány premortálně či postmortálně. Genetický efekt myostatinu je premortální. Polymorfismy *MSTN* zodpovědné za dvojí osvalení jsou spojovány se zvýšenou křehkostí masa a to zejména u plemen Piedemontese a Belgického modrého. Větší křehkost je nejspíše způsobena snížením pojivové tkáně ve svalech. Zkusili jsme tedy zjistit, zda i nedestruktivní mutace *MSTN* má nějaký vliv na křehkost masa. Nicméně, nebyl zjištěn žádný statisticky významný vliv viz Tab. VII.

Myostatin též ovlivňuje metabolismus glukózy a hromadění tuku (Kärst a kol., 2013). Bylo také zjištěno, že zvýšený obsah tuku v oblasti břicha se shoduje se zvýšenou expresí genů *MSTN* a *CAST*. Podkožní tuk má vliv na křehkost masa, u kterého způsobuje pomalejší pokles postmortální teploty a pH (Bagatoli a kol., 2013). U prasat bylo prokázáno, že nízká hodnota pH negativně ovlivňuje vaznost. Nízká vaznost je poté pravděpodobně výsledkem kyselého prostředí, které má vliv na proteolýzu buněčných proteinů (Kärst a kol., 2013). U hodnoty pH a i barvy však nebyla prokázána žádná statistická významnost.

Přestože byl prokázán vliv *MSTN* na vaznost na hladině významnosti $P < 0,05$, není tento údaj průkazný, jelikož je velikost směrodatné odchylky obrovská (viz Tab. VII). To je nejspíše způsobeno tím, že genotyp *BB* byl pozorován pouze u třech vzorků a průměr hodnoty pro vaznost byla poloviční ve srovnání s genotypy *AA* a *AB*.

Tab. VIII: Průměrné hodnoty, směrodatné odchylky, F-test jakostních vlastností masa jednotlivých genotypů *MYF5*

MYF5				
	AA	AB	BB	F-test
	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$	$\bar{x} \pm s_x$
síla stříhu 1. den	5,607 ± 1,287	5,633 ± 1,422	4,770 ± 1,469	0,814
síla stříhu 14. den	5,757 ± 1,439	5,628 ± 1,336	5,198 ± 1,455	0,880
L barva 1. den	37,041 ± 3,231	36,900 ± 3,512	37,123 ± 3,050	0,072
L barva 14. den	36,483 ± 3,275	37,560 ± 4,065	36,949 ± 2,877	3,148*
a barva 1. den	6,495 ± 1,887	6,411 ± 1,719	5,797 ± 1,616	0,547
a barva 14. den	8,569 ^a ± 2,170	7,811 ± 2,122	7,219 ^b ± 2,634	6,190*
b barva 1. den	5,405 ± 1,677	5,464 ± 1,483	4,993 ± 1,643	0,972
b barva 14. den	7,359 ± 1,863	6,928 ± 2,040	6,297 ± 2,148	2,087
vaznost 1. den	34,970 ^a ± 25,693	41,309 ^b ± 34,284	57,719 ^c ± 43,621	11,733*
vaznost 14. den	47,255 ± 29,678	53,991 ± 35,915	69,168 ± 43,551	11,585*
pH 1. den	5,676 ± 0,309	5,728 ^a ± 0,385	5,913 ^b ± 0,492	10,209*
pH 14. den	5,686 ± 0,320	5,743 ± 0,392	5,910 ± 0,510	11,321*

* = vliv faktoru na hladině významnosti $P < 0,05$

a, b, c, = průměry označené různými malými písmeny se statisticky liší ($P < 0,05$)

MYF5 je považován za kandidátní gen pro produkci a kvalitu masa. Jeho biologická úloha spočívá v diferenciaci kosterních svalů a ovládání tvorby myofibril. Hmotnost libového masa skotu, prasat a jiných zvířat závisí na množství myofibril (Indriulyté a Miceikiené, 2010).

Polymorfismus *MYF5* byl zkoumán již v dřívějších výzkumech, kde byly zjištěny asociace s růstovými vlastnostmi u kanadského skotu, růstem, průměrným denním přírůstkem a s vývojem kostry u korejského skotu (plemeno Hanwoo), růstovými vlastnostmi u čínského plemene Qinchuan (Ujan a kol., 2011). Vliv

polymorfismů *MYF5* na růstové a kosterní vlastnosti byl zjištěn i u prasat a kuřat (Yin a kol., 2011).

Nízká hladina exprese genu *MYF5* (u skotu plemene Wagyu) v primárních buněčných kulturách nejspíše ovlivňuje vývoj intramuskulárních adipocytů (tukových buněk). Vzniká tak fenotyp vysokého mramorování typický právě pro plemeno Wagyu (Coles a kol., 2015).

Gen *MYF5* oproti *MSTN* měl vliv na více jatečných vlastností masa. Bylo zjištěno působení genu *MYF5* na barvu L^* syrového masa 14. den po porážení, ale tento vliv nebyl patrný mezi jednotlivými genotypy. Nelze tedy říci, že zvíře s genotypem *AA* by mělo maso světlejší než *AB* zvíře (viz Tab. VIII).

Dále byla prokázána statistická významnost na hladině $P < 0,05$ u barvy a^* , která byla rovněž mezi genotypy *AA* a *BB*. Zvířata s genotypem *AA* by tak měla mít podle výsledků červenější maso oproti jedincům s genotypem *BB*.

Další vlastností, na níž měl gen *MYF5* statistický vliv, byla vaznost syrového masa 1. a 14. den po porážení. Vaznost syrového masa 1. den po porážení byla dosti rozdílná mezi jednotlivými genotypy, ale opět je zde stejný problém s velikostí směrodatných odchylek, kvůli kterým by byla získaná data těžko dále interpretovatelná.

Statistická významnost na hladině $P < 0,05$ se projevila rovněž u pH syrového masa 1. a 14. den po usmrcení.

6. ZÁVĚR

Cílem této práce bylo genotypizovat vybraný panel býků českého strakatého skotu pro polymorfismy ve 2 lokusech, *MYF5* a *MSTN*. Byla použita metoda PCR-RFLP. Štěpení PCR produktů bylo provedeno pomocí restričních endonukleáz *DraI* a *TaqI*. Dalším úkolem bylo u zkoumaných vzorků určit genotypy, jejich frekvence a frekvence alel. U kandidátní genů *MSTN*, *MYF5* byly dále sledovány asociace mezi jednotlivými genotypy a vybranými jatečnými vlastnostmi masa (barva, křehkost, vaznost, pH).

Byl zjištěn statistický vliv genu *MSTN* na vaznost masa. Avšak početně malé zastoupení genotypu *BB* a velké výkyvy mezi jednotlivými průměry vedly v konečné fázi k velkým standardním chybám. U ostatní vlastností nebyla prokázána statistická významnost ovlivněná genem *MSTN*.

Jinak tomu bylo u genu *MYF5*, u kterého byl zjištěn vliv na barvu L^* (světlost masa) a a^* (vztah mezi zelenou a červenou barvou) syrového masa 14. den po poražení, vaznost syrového masa 1. a 14. den po poražení, hodnota pH syrového masa 1. a 14. den po poražení.

Kandidátní geny *MSTN* a *MYF5* si zaslouží další pozornost. V budoucnu by mohly být použity ve šlechtění s cílem zlepšení kvality masa.

7. SEZNAM ZKRATEK

ADGF	- average daily gain on feed
ATP	- adenosine triphosphate
bHLH	- basic helix-loop-helix
cDNA	- complementary DNA
DFD	- dark, firm, dry
DNA	- deoxyribonucleic acid
ETL	- economic trait loci
<i>GDF</i>	- growth differentiation factor
<i>IGF</i>	- insulin-like growth factor
mRNA	- messenger ribonucleic acid
<i>MSTN</i>	- myostatin
<i>MYF4</i>	- myogenin (myogenic factor 4), MYOG
<i>MYF5</i>	- myogenic factor 5
<i>MYF6</i>	- myogenic factor 6
<i>MYOD</i>	- myogenic differentiation
PCR	- polymerase Chain Reaction
PSE	- pale, soft, exudative
PWADG	- pre-weaning average daily gain
QTL	- quantitative trait loci
RFLP	- restriction fragment length polymorphism
RNA	- ribonucleic acid
SNP	- single nucleotid polymorphism
STR	- short tandem repeat
TGF	- transforming growth factor
UTR	- untranslated region
VNTR	- variable number of tandem repeat

8. POUŽITÁ LITERATURA

Bagatoli, A., Gasparino, E., Soare, M. A. M., Amaral, R. M., Macedo, F. A. F., Voltolini, D. M., Vesco, A. P. Expression of calpastatin and myostatin genes associated with lamb meat quality. *Genet. Mol. Res.* 2013, Vol. 12: 6168-6175

Bell, Ch. G., Walley, A. J., Froguel, P. The genetics of human obesity. *Nature Reviews Genetics.* 2005, Vol. 6: 221-234

Berg, F. Genetic analysis of fat metabolism in domestic pigs and their wild ancestor. *Acta Universitatis Upsaliensis, Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations.* 2006, 164 p., ISBN 91-554-6623

Braun, T., Buschhausen-Denker, G., Bober, E., Tannich, E., Arnold, H. H. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. *EMBO J.* 1989, Vol. 8: 701-709

Coles, Ch. A., Wadeson, J., Leyton, C. P., Sidell, J. P., Greenwood, P. L., White, J. D., McDonagh, M. B. Proliferation Rates of Bovine Primary Muscle Cells Relate to Liveweight and Carcase Weight in Cattle. *Plos One.* 2015, Vol. 10: 1-14

Crisá, A., Marchitelli, C., Savarese, M. C., Valentini, A. Sequence analysis of myostatin promoter in cattle. *Cytogenet Genome Research.* 2003, Vol. 102:48-52

Da, R. A centennial celebration for quantitative genetics. *Evolution.* 2007, Vol. 61:1017-1032

Davey, J. W., Hohenlohe, P. A., Etter, P. D., Boone, J. O., Catchen, J. M., Blaxter, M. L. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nature.* 2011, Vol. 12: 499-510

Davis, R. L., Weintraub, H., Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 1987, Vol. 51: 987-1000

De Koning, D. J., Janss, L. L. G., Rattink, A. P., Van Oers, P. A. M., de Vries, B. J., Groenen, M. A. M., Van der Poel, J. J., de Groot, P. N., Brascamp, E. W., Van Arendok, J. A. M. Detection of quantitative trait loci for backfat thickness and intramuscular fat content in pigs (*Sus strofa*). *Genetics.* 1999, Vol. 152: 1679-1690

Dehnavi, E., Azari, M. A., Hasani, S., Nassiry, M. R., Mohajer, M., Ahmadi, A. K., Shahmohamadi, L., Yousefi, S. Polymorphism of Myostatin Gene in Intron 1 and 2

and Exon 3, and Their Associations with YearlingWeight, Using PCR-RFLP and PCR-SSCP Techniques in Zel Sheep. *Biotechnology Research Internationa*. 2012: 1-5

Destefanis, G., Brugiapaglia, A., Barge, M. T., Molin, E. Relationship between beef consumer tenderness perception and Warner-Bratzler shear force. *Meat Sci*. 2008 Vol. 78: 153-156

Drögemüller, C., Kempers, A. A Taqi PCR-RFLP at the bovine myogenic factor (*MYF5*) gene. *Animal Genetics*. 2000, Vol. 31: 1-146

Dunner, S., Miranda, M. E., Amigues, Y., Cañon, J., Georges, M., Hanset, R., Williams, J. Ménissier, F. Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle Leeds. *Genet. Sel*. 2003, Vol. 35: 103-118

Erickson, D. L., Fenster, Ch. B., Stenien, H. K., Price, D. Quantitative trait locus analyses and the study of evolutionary process. *Molecular Ecology* . 2004, Vol. 13: 2505–2522

Fiems, L. O., Double Muscling in Cattle: Genes, Husbandry, Carcasses and Meat. *Animals*. 2012, Vol. 2: 472-506

Firulli, A. B., Olson, E. N. Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity. *Trends Genet*. 1997, Vol. 13: 364-369

Francetic, T., Li, Q. Skeletal myogenesis and *Myf5* activation. *Landes Bioscience*. 2011, Vol. 2: 109-114

Friedman, R., Hughes, A. Gene Duplication and the Structure of Eukaryotic Genomes. *GenomeRes*. 2001, Vol.11: 373-381

Georges, M., Massey, J. M. Velogenetics, ort he synergistic use of marker assisted selection and germ-line manipulation. *Theriogenology*. 1991, Vol. 35: 151-159

Hasty, P., Bradley, A., Morris, J. H., edmondson, D. G., Venuti, J. M., Olson, E. N., Klein, W. H. Muscle deficiency and neonatal dech in mice with a target station in the myogenin gene. *Nature*. 1993, Vol. 364: 501-506

Hector, D. A., Brew-Graves, C., Hassen, N., Ledward, D. A. Relationship between myosin denaturation and the colour of low voltage-electrically-stimulated beef. *Meat Science*. 1992, Vol. 31: 299-307

Hernández, B., Lizaso, G., Horcada, A., Beriain, M. J., Purroy, A. Meat colour of fighting bulls. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 2006, Vol. 14: 90-94

Hoffman, L. C., Kroucamp, M., Manley M. Meat quality characteristics of springbok (*Antidorcas marsupialis*). 1: Physical meat attributes as influenced by age, gender and production region. *Meat Science.* 2007, Vol. 76: 755-761

Chung, E. R., Kim, W. T. Association of SNP Marker in *IGF-I* and *MYF5* Candidate Genes with Growth Traits in Korean Cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2005, Vol. 18: 1061-1065

Indriulyté, R., Miceikiné, I., *MYF5* Gene Influence on Fattening and Meat Traits in Pigs. *Veterinarija ir Zootechnika.* 2010, Vol. 52

Ingr, I. Technologie živočišných výrobků II: Návod do cvičení. Praha:SNP, 1977, 100 p.

Jamshidi, S., Karani, S., Goudarzi, M. Study Polymorphism Myostatin Gene in Mehraban's Sheep Using PCR-RFLP Method. *Sci.Int(Lahore).* 2014, Vol. 26: 1129-1135

Kadlec P., a kol. Technologie potravin I. Praha, VŠCHT. 2002, 300 p. ISBN 80-7080-509-9

Karim, L., Coppieters, W., Grobet, L., Valentini, A., Georges, M. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Animal Genetics.* 2000, Vol. 31: 396–399

Kärst, S., Strucken, E. M., Schmitt, A. O., Weryich, A., Villena, F. P., Yang, H., Brockman, G. A. Effect of the myostatin locus on muscle mass and intramuscular fat content in a cross between mouse lines selected for hypermuscularity. *BMC Genomics.* 2013, Vol. 14: 1-12

Kerry, J., Kerry, J., Ledward, D. Meat processing: improving quality. Woodhead Pub. 2002, 464 p. ISBN 08-493-1539-5

Kišacová, J., Kúbek, A., Trakovická, A. Genetický polymorfizmus génu *MYF-5* u hovädzieho dobytku. *Acta fytotechnica et zootechnica.* 2006: 204-207

Knoll, A., Vykoukalová, Z. Metody molekulární genetiky (Metody detekce polymorfizmů DNA genů). MZLU Brno. 2002, 100 p. ISBN 80-7157-616-6

- Koohmaraie, M., Geesink, G. H. Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*. 2006, Vol. 74: 34-43
- Koolman, J., Klaus-Heinrich, R. Barevný atlas biochemie. Grada Publishing a.s. 2012, 498 p. ISBN: 978-80-247-2977-0
- Lawson, D., Spieth, J. Overview of gene structure. *WormBook*.2006, Vol. 18: 1-10
- Li, C., Basarb, J., Snelling, W. M., Benkel, B., Murdoch, B., Hansen, C., Moore, S. S. Assessment of positional candidate genes *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *J. Anim. Sci.* 2004, Vol. 82:1–7
- Little, P. F. R. Structure and function of the human genome. *Genome Research*. 2005, Vol. 15: 1759-1766
- Lyer, B. V. S., Kenward, M., Arya, G. Hierarchies in eukaryotic genome organization: Insights from polymer theory and simulations. *BMC Genomics*. 2011, Vol. 4: 1-14
- Lynch, M. The Origins of Eukaryotic Gene Structure. *Mol. Biol. Evol.* 2006, Vol. 23: 450–468
- MacDougall, D. B. Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*. 1982, Vol. 9: 75-88.
- McPherron, A. C., Lee, S. J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1997, Vol. 94: 12457-12461
- Me'nissier, F. Present state of knowledge about the genetic determination of muscular hypertrophy or the double muscled trait in cattle. *Veterinary Medicine and Animal Science*. 1982, Vol. 16: 387–428
- Miles, C. M., Wayne, M. Quantitative Trait Locus (QTL) Analysis. *Nature Education*. 2008, Vol. 1: 208
- Naidu, P. S., Ludolph, D. C., To, R. Q., Hinterberger, T. J., Konieczny. S. F. Myogenin and *MEF2* function synergistically to aktive the *MRF4* promoter during myogenesis. *Molecular and Cellular Biology*. 1995, Vol. 15: 2707-2718
- Nowak, D. Enzymes in Tenderization of Meat-The System of Calpains and Other Systems-a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2011, Vol. 61: 231-237.

Olson, E. N. MyoD family: a paradigm for development?. *Genes Dev.* 1990, Vol. 4: 1454-461

Pipek, P., Jirotková, D. Hodnocení jakosti, zpracování a zbožiznalství živočišných produktů. Část III. Hodnocení a zpracování masa, drůbeže, vajec a ryb. České Budějovice, ZF JU, 2001, 136 p. ISBN 80-7040-490-6.

Pray, L. Eukaryotic genome complexity. *Nature Education.* 2008, Vol. 1: 96

Rehfeldt, C., Fiedler, I., Dietl, G., Ender, K. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livestock Production Science.* Vol. 66: 177-188

Sa, A. QTL Mapping, A Few Key points. *International Journal of Applied Research in Natural Products.* 2009, vol. 2: 1-3

Seideman S. C., Cross H. R., Smith G. C., Durland P. R. Factors associated with fresh meat color: a review. *Journal of Food Quality.* 1984, Vol. 6: 211-237

Soumillion, A., Erkens, J. H. F., Lenstra, J. A., Rettengerger, G., Te Pas, M. F. W. Assignment of the porcine loci for *MYOD1* to chromosome 2 and *MYF5* to chromosome 5. *Animal Genetics.* 1997, Vol. 28: 37-38

Steinhouser, L. Produkce masa. Last. Tišnov. 2000, p. 465., ISBN 80-900260-7-9

Štejf, M., a kol. Kardiologie – 3., přepracované a doplněné vydání. Grada Publishing a.s. 2007, 722 p. ISBN: 978-80-247-1385-4

Te Pas, M. F., Soumillion, A., Harders, F. L., Verburg, F. J., Van den Bosch, T. J., Galesloot, P., Meuwissen, T. H. Influences of myogenin genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness and lean weight of pigs. *J Anim Sci.* 1999, Vol. 77: 2352-2356

Te Pas, M. F., Soumillion, A., Van den Bosh, T. J., Veninga, G., Meuwissen, T. H. E. association between polymorphism in the porcine myogenin gene locus and growth trans. In 47th Annual Meeting of EAAP, 26-29 August 1996, Lillehammer, Norway

Teplan, V. a kol. Praktická neurologie. Grada Publishing a.s. 2006, 496 p. ISBN: 80-247-1122-2

- Ujan, J. A., Zan, L. S., Wang, H. B., Ujan, S. A. The Effect of Myogenic Factor 5 Polymorphism on the Meat Quality in Chinese Bos Taurus. *Agriculturae Conspectus Scientificus*. 2011, Vol. 2011: 373-377
- Urbánski, P., Pierzchala, M., Kamyczek, M., Rózycki, M., Kuryl, J. Relations between the polymorphism in the coding and 5'-flanking regions of the porcine *MYOD1* and *MYF5* genes and productive traits in pigs. *Journal of Animal and Feed Sciences*. 2006, Vol. 15: 225–235
- Wright, W. E., Sassoon, D.A., Lin, V.K. Myogenin, a factor regulating myogenesis has a domain homologous to MyoD. *Cell*. 1989, Vol. 56: 607 - 617
- Yin, H., Zang, Z., Lan, X., Zhao, X., Wang, Y., Zhu, Q. Association of *MYF5*, *MYF6* and *MyOG* Gene Polymorphisms with Carcass Traits in Chinese Meat Type Quality Chicken Populations. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2011, Vol. 10: 704-708
- Yoon, J. K., Olson, E. N., Arnold, H. H., Wold, B. J. Different *MRF4* knockout alleles differentially disrupt *MYF5* expression: cis-regulatory interactions at the *MRF4/MYF5* locus. *Developmental Biology*. 1997, Vol. 188: 349-362
- Zahrádková, R., a kol. Masný skot od A do Z. Český svaz chovatelů. 2002, 397 p. ISBN: 978-80-254-4229-6
- Zammit, P. S., Carvajal, J. J., Golding, J. P., Morgan, J. E., Summerbell, D., Zolnericks, J., Partridge, T. A., Rigby, P. W. J., Beauchamp, J. R. *Myf5* expression in satellite cells and spindles in adult muscle is controlled by separate genetic elements. *Developmental Biology*. 2004, Vol. 273: 454–465
- Zhang, R. F., Chen, H., Lei, C. Z., Zhang, C. L., Lan, X. Y., Zhang, Y. D., Zhang, H. J., Bao, B., Niu, H., Wang, X. Z. Association between Polymorphisms of *MSTN* and *MYF5* Genes and Growth Traits in Three Chinese Cattle Breeds. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 2007, Vol. 20: 1798 – 1804