MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2015 **Bc. Kristýna KLEMENTOVÁ**

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat

Analýza asociace polymorfismu UASMS2 v genu LEPTIN s intramuskulárním tukem a marblingem u skotu

Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Kristýna KLEMENTOVÁ

Brno 2015

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: **Analýza asociace polymorfismu UASMS2 v genu LEPTIN s intramuskulárním tukem a marblingem u skotu** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.*

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

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

V Brně dne: *25. dubna 2015* **Bc. Kristýna KLEMENTOVÁ**

……..

podpis

PODĚKOVÁNÍ

V první řadě bych velmi ráda poděkovala mému školiteli prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za umožnění psaní práce pod jeho vedením. Dále doc. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za pomoc při statistickém zhodnocení výsledků a rady ohledně provedení výpočtů. Velké poděkování také patří Mgr. Zuzaně Vykoukalové, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a odborné vedení mých prvních kroků v laboratoři a Ing. Elišce Dráčkové za zpracování vzorků do databáze.

Tato práce vznikla v rámci projektu CEITEC - Středoevropského technologického institutu s pomocí výzkumné infrastruktury financované projektem CZ.1.05/1.1.00/02.0068 z Evropského fondu regionálního rozvoje.

ABSTRAKT

Současným trendem v produkci hovězího masa je zlepšování kvality. Kvalita masa je ovlivněna mnoha faktory, např. genetickým pozadím, věkem, výživou, pohlavím, plemenem, okolním prostředím, typem ustájení, atd. Jedním ze sledovaných faktorů kvality hovězího masa je i ukládání intramuskulárního tuku a mramorování. Mramorování má vliv na šťavnatost, křehkost a chuť masa. Tato práce se zabývá vlivem polymorfismu $UASMS2$ v genu leptin na kvalitu hovězího masa, na ukládání intramuskulárního tuku a na mramorování. Studie byla provedena na 174 býcích plemene Český strakatý skot. Pro určení genotypů byla použita metoda sekvenování. Na základě asociační analýzy nebyl zjištěn průkazný vliv na kvalitu masa či ukládání intramuskulárního tuku. Výsledky asociační analýzy byly porovnány s dříve publikovanými odbornými články jiných autorů. Součástí práce je literární rešerše k tématu kandidátních genů, současný stav problematiky, význam a metody studia a geny ukládající tuk u skotu.

Klíčová slova: mramorování, sekvenování, leptin, $UASMS2$, LEP-2470, skot

ABSTRACT

The current trend in beef production is quality improvement. Meat quality is influenced by many factors, eg. genetic background, age, nutrition, sex, breed, environment, housing type, etc. One of these factors is the quality of beef and storage of intramuscular fat and marbling. Marbling has an effect on juiciness, tenderness and flavor of the meat. This paper describes the influence of UASMS2 polymorphism in the gene leptin to the quality of beef meat, storage of intramuscular fat and marbling. The study was conducted on 174 bulls of Czech pied cattle breed. For the determination of genotypes were used sequencing method. Based on the association analysis was detected significant effect on the quality of the meat and intramuscular fat deposition. The results of association analysis were compared with previously published scientific articles by other authors. The work includes a literature review for topic of candidate genes, the current state of the problem, significance and methods for studying genes and storing fat in cattle.

Keywords: Marbling, sequencing, leptin, $UASMS2$, LEP-2470, cattle

OBSAH

Čestné prohlášení iv

Poděkování v

Abstrakt vi

Abstract vi

Obsah ..... - 7 -

1 Úvod ..... - 10 -

2 Cíl práce ..... - 11 -

3 Literární přehled ..... - 12 -

3.1 Kvalita hovězího masa ..... - 12 -

3.1.1 Jatečně upravené tělo (JUT) ..... - 13 -

3.1.2 Hodnocení jatečně upraveného těla ..... - 13 -

3.1.3 Intramuskulární tuk (IMT) ..... - 14 -

3.2 Charakteristika mramorování ..... - 15 -

3.2.1 Makroskopické zhodnocení mramorování a klasifikace ..... - 15 -

3.2.2 Mikroskopické zhodnocení intramuskulárního tuku a mramorování ..... - 19 -

3.2.3 Fyziologické zhodnocení mramorování ..... - 20 -

3.3 Genetické markery a jejich využití ..... - 21 -

3.3.1 Genetické markery ..... - 21 -

3.3.2 Rozdělení markerů při mapování genomu: ..... - 22 -

3.3.3 Markery používané pro asistovanou selekci: ..... - 23 -

3.3.4 Genomová selekce ..... - 23 -

3.4 Geny asociované s ukládáním intramuskulárního tuku ..... - 25 -

3.4.1 Diacylglycerol O-acyltransferáza (DGAT1) ..... - 25 -

3.4.2 Thyroglobulin (TG) ..... - 28 -

3.4.3 Stearoyl – CoA desaturáza (SCD) ..... - 30 -

3.4.4 Fatty acid binding protein 4 (FABP 4) ..... - 33 -
3.4.5 Leptin (LEP) ..... - 35 -
4 Metodika a materiály ..... - 40 -
4.1 Analyzované vzorky ..... - 40 -
4.2 Použité přístroje ..... - 40 -
4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR) ..... - 41 -
4.3.1 Roztoky PCR reakční směsi ..... - 41 -
4.3.2 Pracovní postup ..... - 41 -
4.3.3 Amplifikace probíhala za následujících podmínek ..... - 41 -
4.3.4 Návrh primerů (dle Nkrumah *et al.,* 2005) ..... - 41 -
4.4 Agarozová gelová elektroforéza ..... - 42 -
4.4.1 Pracovní postup: ..... - 42 -
4.4.2 Příprava sekvenační směsi ..... - 42 -
4.4.3 Pracovní postup: ..... - 43 -
4.5 Přečištění sekvenační směsi pomocí SigmaSpin™ Post Reaction Clean-up Columns ..... - 43 -
4.5.1 Pracovní postup: ..... - 43 -
4.6 Sekvenování ..... - 43 -
4.6.1 Pracovní postup: ..... - 43 -
4.7 Metodika chemických analýz ..... - 44 -
4.7.1 Stanovení obsahu sušiny v mase (%) ..... - 44 -
4.7.2 Stanovení celkového obsahu proteinů v mase (%) ..... - 44 -
4.7.3 Stanovení obsahu popelovin (%) ..... - 44 -
4.7.4 Stanovení obsahu intramuskulárního tuku v mase (%) ..... - 44 -
4.7.5 Stanovení svalových pigmentů masa (mg/g) ..... - 45 -
4.7.6 Stanovení pH 48 ..... - 45 -

4.7.7 Stanovení obsahu vaznosti vody masa (%) ..... - 45 -
4.7.8 Stanovení remise masa (%) ..... - 45 -
5 Matematicko-statistické zpracování dat ..... - 46 -
5.1 Výpočet frekvencí alel a genotypu ..... - 46 -
5.2 Genetická rovnováha dle Hardy-Weinbergova zákona ..... - 47 -
5.3 Asociační analýza ..... - 48 -
6 Výsledky ..... - 49 -
6.1 PCR ..... - 49 -
6.2 Sekvenování ..... - 50 -
6.3 Matematicko – statistické zpracování dat ..... - 52 -
6.3.1 Výpočet frekvencí genotypů a alel ..... - 52 -
6.3.2 Test genetické rovnováhy populace dle Hardy-Weinbergova zákona ..... - 53 -
6.3.3 Asociační analýza ..... - 54 -
7 Diskuze ..... - 56 -
8 Závěr ..... - 60 -
9 Seznam použité literatury ..... - 62 -
9.1 Internetové zdroje a databáze genů: ..... - 73 -
10 Seznam zkratek ..... - 75 -
11 Seznam obrázků ..... - 76 -
12 Seznam tabulek ..... - 77 -

1 ÚVOD

Skot patří k jednomu z nejvíce využívaných druhů zvířat pro hospodářské účely. V minulosti byla chována plemena s kombinovanou užitkovostí, zvířata se chovala na produkci mléka i masa. Dospělo se k poznání, že jsou plemena, která jsou více vhodná na produkci mléka a jiná zase na produkci masa. Kvůli rostoucím požadavkům na vyšší užitkovost a produkci došlo k rozdělení na plemena masná, kombinovaná a mléčná. Postupně se plemena skotu začala šlechtit a vytvářejí se mléčná plemena s vyšší mléčnou užitkovostí, masná plemena s dvojím osvalením, či s větším množstvím intramuskulárního tuku.

Posledních několik let klesá spotřeba hovězího masa u nás i ve světě. Proto se šlechtění zaměřuje více na kvalitu. Zvýšením kvality masa se snaží producenti obrátit trend snižující se spotřeby masa.

Hovězí maso nabízí mnoho živin nezbytných a nenahraditelných pro vyváženou stravu. Týká se to hlavně vysoké hodnoty bílkovin, minerálních látek a mastných kyselin. Spotřebitelé kromě nutričních hodnot vyhledávají i vlastnosti jako je měkkost, šťavnatost, chuť a vůně. Trendem poslední doby je zvýšit kvalitu výsledného produktu, aby se zvýšila konzumace masa.

Na kvalitu masa má vliv genetický základ, prostředí i výživa. Z genetického hlediska je kvalita masa polygenní znak, což znamená, že se na finálním produktu podílí expresí mnoho genů.

V současné době se ke zjišťování potenciálu kvality masa využívají markery. Zlepšení kvality můžeme dosáhnout za pomoci markery asistované selekce (MAS), která má velký potenciál. Tato selekce pomáhá zkrátit generační interval a odhalit vhodné geny už v nízkém věku zvířete oproti tradičnímu fenotypovému výběru, kde bychom museli čekat několik let.

Většina ekonomicky důležitých vlastností u hospodářských zvířat jsou znaky, které jsou polygenní a rozptýleny po celém genomu zvířete. Pro urychlení genetického intervalu bylo nezbytné pochopit genetický kód a zjistit, které polymorfismy jsou provázány se sledovanými vlastnosti. V současné době, u výzkumu zaměřeného na mramorování u skotu, se zkoumají geny $DGAT1$, LEP, TG, SCD a $FABP\ 4$. Tyto geny ovlivňují ukládání intramuskulárního tuku (IMT) v mase, některé mají i pozitivní vliv na obsah tuku.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce je provedení asociační analýzy $UASMS2$ polymorfismu v genu LEP (leptinu) s parametry kvality hovězího masa a ukládání intramuskulárního tuku. Analýza je provedena na souboru 174 vzorků od studovaných býků. Je provedeno určení sekvence genotypu polymorfismu $UASMS2$. Následně je provedeno statistické zhodnocení mezi zjištěným genotypem a ukazateli kvality masa. Statistické vyhodnocení je provedeno pomocí analytického softwaru SAS.

Součástí práce je literární zpracování přehledu kandidátních genů, genů ovlivňujících křehkost, vaznost, mramorování a ukládaní intramuskulárního tuku u skotu.

.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Kvalita hovězího masa

Termínem „maso“ bývá nejčastěji označována kosterní příčně pruhovaná svalovina včetně pojivové a tukové tkáně. V současnosti bývá nejčastěji konzumována libová svalovina s nízkým podílem podkožního a intramuskulárního tuku (Zahrádková *et al.,* 2009). Zdrojem masa u nás jsou hospodářská zvířata, jako například krávy, ovce, kozy, prasata a drůbež. U drůbeže se pak definuje, že se droby nezařazují pod termín „maso“ (Adegoke *et al.*, 2005).

Na kvalitu masa má velký vliv stres před porážkou. Stres před porážkou může způsobit např. nejčastější vady masa jako je PSE (pale, soft, and exudative - měkké, bledé a vodnaté maso) či DFD (dark, firm and dry - pevné, suché, tmavé). Jsou to nevratné vady masa, které snižují kvalitu a tržní hodnotu konečného produktu. Podmínky prostředí, které mohou způsobit stres u zvířat, jsou extrémní teploty, vlhkost, světlo, zvuk, omezení pohybu, únava, bolest, hlad a žízeň či stres z nového a neznámého prostředí. Po poražení a vykrvení zvířete se hromadí kyselina mléčná v jatečně upraveném těle. Hromadění kyseliny mléčné způsobuje pokles pH, které ovlivňuje výslednou kvalitu masa. Maso by se mělo uchovávat při teplotě $15\ °C - 16\ °C$. Správné uchovávání a skladování jatečně upraveného těla má vliv na měkkost a chuť masa (Adegoke *et. al*, 2005).

Vliv má i genetické založení zvířete. Genetická faktory ovlivňují živé vývojové rysy, které definují složení těla. Genetické předpoklady mají vliv hlavně na váhu, výšku, obvod hrudního koše, svaly a množství tuku. Při správné volbě genetického výbavy rodičů zvířete může dojít ke zlepšení jatečné hodnoty založené na růstu a stavbě těla a může se rychle zvýšit míra genetického zisku u jatečně upraveného těla. Přesná předpověď hodnoty nebo kvality jatečně upraveného těla na základě složení těla by umožnila brzký výběr vhodných zvířat pro producenty hovězího masa, stejně jako pro inseminační techniky (Afolayan *et al.,* 2007).

V moderní době bývají požadavky na kvalitní maso založené na vysokém procentu libového masa, nízkém procentu obsahu tuku a zachování senzorických vlastností během skladování v chladu (Albertí *et al.,* 2005). Kvalita masa je charakterizována souborem hodnot fyzikální, chemické a v poslední době i senzorické analýzy. Mezi měřené fyzikální charakterizace masa patří např. pH, barva, samovolná ztráta masové šťávy nebo vaznost. Chemické složení masa bývá udáváno obsahem sušiny, bílkovin, tuku, vazivové tkáně, cholesterolu,

jednotlivých mastných kyselin a aminokyselin. Senzorickou analýzou jsou nejčastěji hodnoceny vůně, chuť, křehkost a šťavnatost masa pocházejícího z anatomicky různých částí jatečného těla (Zahrádková *et al.*, 2009).

3.1.1 Jatečně upravené tělo (JUT)

Jatečně upravené tělo skotu je celé tělo, popřípadě dvě poloviny téhož zvířete, po stažení z kůže, bez hlavy, která je oddělena od trupu před prvním krčním obratlem, bez nohou oddělených v kloubu zánártním a zápěstním, bez míchy, bez podkožního loje, bez ledvin, bez orgánů dutiny hrudní, břišní a pánevní vyňatých i s přirostlým lojem. U jalovic bez vemenního loje, u krav bez vemene a přirostlého loje, u samců bez šourkového loje, bez blanité a svalnaté části bránice, bez oháňky.

3.1.2 Hodnocení jatečně upraveného těla

Jatečně upravená těla jsou v současné době hodnoceny podle systému *SEUROP*, který je využíván v Evropě. Tento systém je nastaven tak, aby bral v úvahu faktory kvality jatečně upraveného těla. Hodnocení provádí pracovníci jatek, kteří byli proškoleni v třídění JUT hovězího masa za pomoci fotografických vzorů JUT v systému *SEUROP* (Oliver *et al.,* 2010). Hodnocení podle *SEUROP* systému je výhradně subjektivní podle hodnocení klasifikátora.

Klasifikace je založena na třech znacích: hmotnosti JUT, skóre zmasilosti JUT a skóre tloušťky JUT. Zmasilost jatečně upravených těl je hodnocena podle měřítek 6 tříd (S, E, U, R, O, P). Třída s nejlepším hodnocením je třída označená S. Třída s nejhorší zmasilostí a velkým množstvím tuku je třída P. Při výpočtu třídění jsou písmena zaměňována za číslice od 1 (pro P) až 6 (pro S) (Veselá *et al.,* 2011).

3.1.3 Intramuskulární tuk (IMT)

Ukládání intramuskulárního tuku je do značné míry ovlivněno genetickou informací uloženou v genetickém kódu daného zvířete, avšak částečně je také ovlivněno jeho věkem, výživou a prostředím (Wang *et al.,* 2008)

Obvykle se udává, že se prvně ukládá tuk do oblasti břišní, pak intermuskulární, následně podkožní a nakonec intramuskulární. Nicméně, tuk je ukládán ve větší míře než libová svalovina, v pozdějším věku zvířete se nevyhnutelně zvyšuje množství intramuskulárního tuku (Pethick *et al.,* 2004)

Intramuskulární tuk se obvykle stává viditelným v 11. měsíci věku a procento IMT se zvyšuje od 15. do 24. měsíce věku zvířete (Hocquette *et al.,* 2010).

3.2 Charakteristika mramorování

Marbling, neboli mramorování, je definován jako intramuskulární tuk (IMT), nebo též adipózní tkáň, která je vložena mezi *perimysilum* okolních svalových svazků a je viditelná lidským okem (Warner *et al.*, 2010). Mramorování se objevuje v čerstvém mase jako bílé skvrny či žilky (Albrecht *et al.,* 2006).

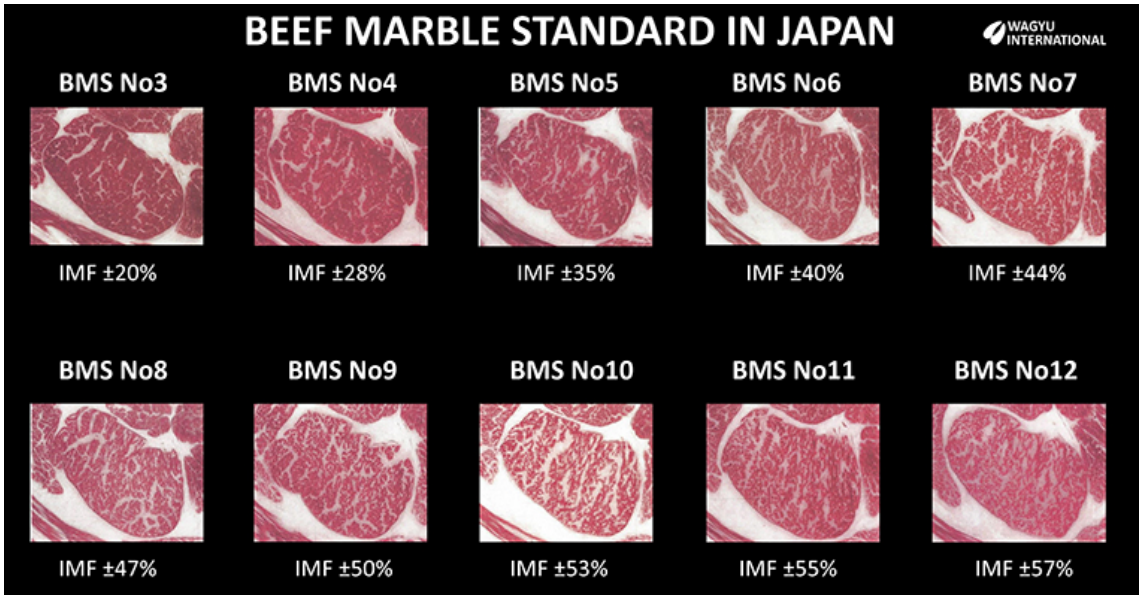
Mramorování je termín používaný v odvětví hovězího průmyslu. Odkazuje na vzhled bílých skvrn nebo pruhů IMT mezi svazky svalových vláken. Pod mikroskopem se jeví mramorování jako specifické tukové „skladiště" s adipocyty vložených do pojivové tkáně v blízkosti krevních kapilár. Mezi plemeny skotu jsou rozdíly nejen v mramorování, ale také ve struktuře, množství a rozdělení tukových „skvrn" ve svalech (Albrecht *et al.,* 2006).

Obsah tuku v mramorování je v negativní korelaci ve vztahu k množství proteinů v hovězím mase (Brackebush *et al.,* 1991). Mramorování má vliv na šťavnatost, křehkost, měkkost a chuť masa. Selekce skotu na vyšší mramorování s sebou přináší zvýšenou křehkost masa. Ta je ovlivněna celou řadou faktorů, například genetickým pozadím, věkem, výživou, pohlavím a plemennou příslušností zvířete. V dnešní době má největší množstvím intramuskulárního tuku japonské plemeno Wagyu (Wang *et al.,* 2008).

3.2.1 Makroskopické zhodnocení mramorování a klasifikace

Jako mramorované maso neoznačujeme vzorky s intermuskulárním tukem, či tukem podkožním, ale pouze s intramuskulárním tukem. Tuk, který je uložen ve svalech, se jeví jako jemný vzor vlnovek v mase – odtud pojem mramorování. Subjektivní hodnocení mramorování tuku je velmi důležitá v obchodním hodnocení hovězího masa. Základním problémem je, že spotřebitel hodnotí maso podle vzhledu a ne podle chuti. Proto většina spotřebitelů raději kupuje libové maso (Wang *et al.,* 2008). Optimální rozmezí intramuskulárního tuku je 2,5 % až 4,5 % tuku. V tomto rozmezí má tuk pozitivní vliv na kvalitu základních faktorů masa. Vliv na senzorické vlastnosti má samozřejmě i rozložení intramuskulárního tuku v tkáni. Subjektivním hodnocení mramorování v určitých bodech především bere v úvahu množství viditelného tuku, tzn. akumulace více než 100 tukových buněk (Albrecht *et al.,* 1996).

Vizuální hodnocení mramorování se může lišit od nuly, což je velmi libové maso, až k 50 % intramuskulárního tuku z celkové plochy, což je maso vysoce mramorované. Systémy hodnocení masa (zejména v Japonsku, USA a Austrálii) rozlišují třídění až do 12 tříd (viz: Obrázek 1). Čím má maso vyšší množství vizuálního tuku, tím má vyšší hodnotu (Harper a Pethick, 2001).



Obrázek 1: Standard mramorování u skotu v Japonsku dle % intramuskulárního tuku (IMT).
Zdroj: Wagyu International, 2014

Mramorovaná tkáň je hodnocena vizuálně za pomocí systému jednotkového stupně či za pomoci použití obrázkových šablon. Každý stupeň mramorování je rozdělen na 100 podjednotek. Obecně jsou výsledky mramorování popsány v desetinách v každém stupni hodnotící šablony (Hale *et al.,* 2013).

Systém šablon je založen na barvě tkáně a rozdílnosti v poměru tučnosti a libovosti masa. Maso s vyšším obsahem intramuskulárního tuku je považováno za kvalitnější a je lépe ohodnoceno (Hale *et al.,* 2013).

V Japonsku se klasifikační normy nezměnily od roku 1988. Stupeň výtěžnosti se stanovuje odhadnutím procentuálního podílu výnosu libového masa na jatečně upraveném těle, který se stanovuje pomocí rovnice, která zahrnuje čtyři měření jatečně upraveného těla. Měření se získávají rozřezáním JUT mezi šestým a sedmým žebrem. Dle výpočtu se stanovují 3 stupně výtěžnosti (viz: Tabulka 1): A, B a C (Jones' Black Gold Farms, 2005).

Tabulka 1: Procentuální vyhodnocení jednotlivých stupňů výtěžnosti

Označení stupně:	Procentuální zastoupení IMT
stupeň A	72 % IMT a výše
stupeň B	69 % IMT a výše
stupeň C	pod 69 % IMT

Zdroj: Jones' Black Gold Farms, 2005

Jakostní stupně se určují na základě mramorování, barvy, jasu, pevnosti, struktury masa, textury masa, lesku a kvality tuku, barvy tuku a kvality masa. Jakostní stupně se stanovují v rámci pěti stupňů jakosti masa (viz: Tabulka 2): 1, 2, 3, 4, 5 (Jones' Black Gold Farms, 2005). Stupně jakosti lze také dělit pomocí slovního hodnocení na výborný, dobrý, průměrný, podprůměrný a špatný (viz: Tabulka 2) (Jones' Black Gold Farms, 2005).

V Austrálii a USA se jatečně upravené tělo hodností podle 12 stupňů indexu mramorování u skotu – B.M.S. (Beef Marble Standard index). Pokud bychom porovnali toto hodnocení s hodnocením v Japonsku, budou se jednotlivé třídy lišit. Porovnání hodnocení kvality masa v Japonsku a v Austrálii a USA je zobrazeno v tabulce 2.

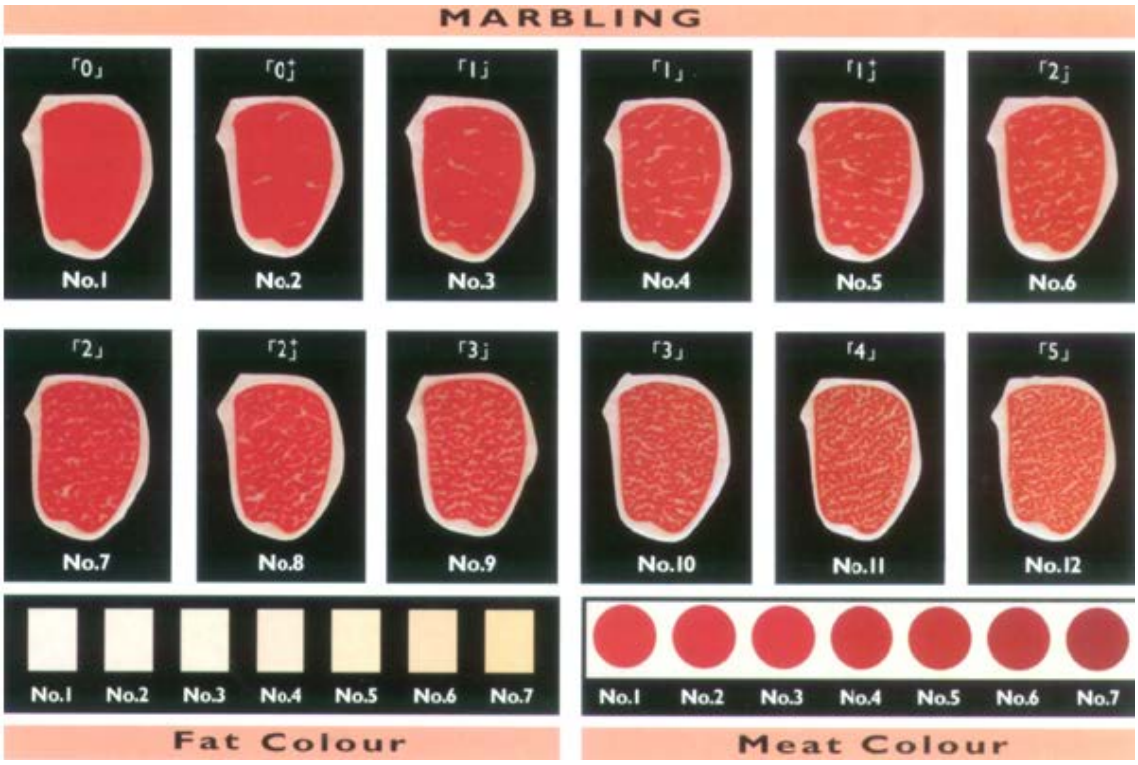
Tabulka 2: Porovnání stupňů hodnocení kvality masa v Japonsku a v USA či Austrálii

Stupně kvality (Japonsko):	Stupeň B.M.S. (USA a Austrálie)
No. 5: výborný	$No.8 - No.12$
No. 4: dobrý	$No.5 - No.7$
No. 3: průměrný	$No.3 - No.4$
No. 2: podprůměrný	$No.2$
No. 1: špatný	$No.1$

Zdroj: Jones' Black Gold Farms, 2005

Pouze barva masa se hodnotí podle sedmi norem. Barevná škála je od čísla 1 až do čísla 7. Pro jatečně upravené tělo jsou pak preferovány stupně 1 až 3 (Jones' Black Gold Farms, 2005).

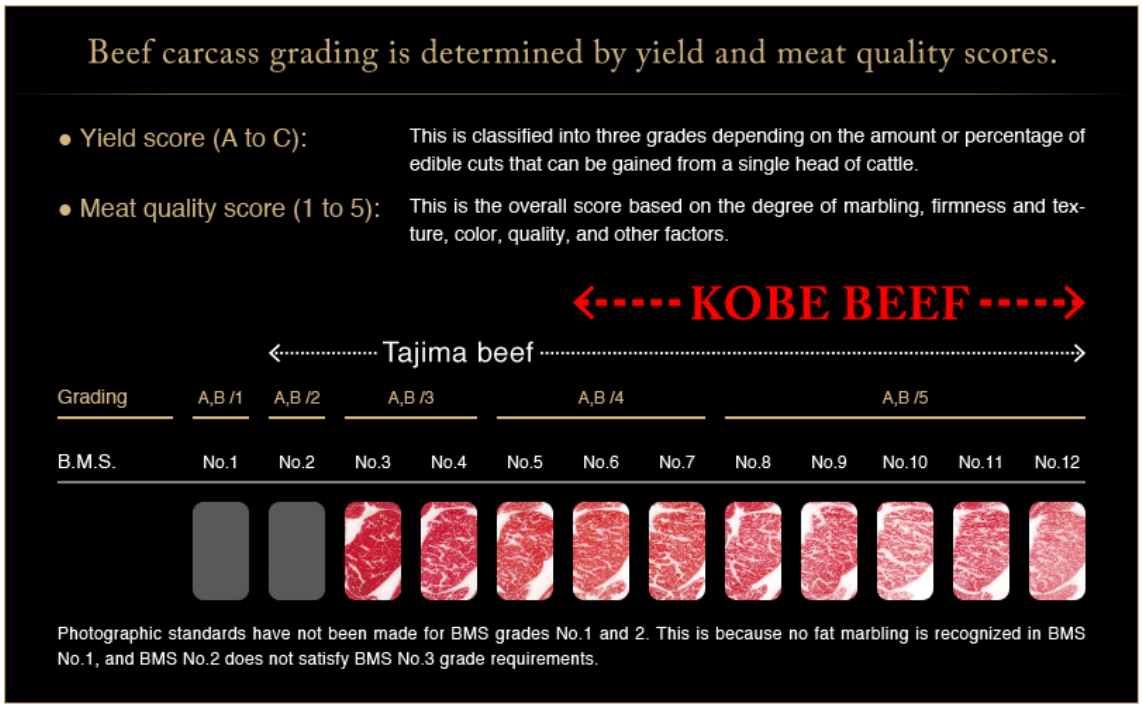
Barva, lesk a kvalita tuku je hodnocena objektivně podle připravených norem. Dělí se na 7 stupňů a nejžádanější je stupeň číslo 1 (Jones' Black Gold Farms, 2005). Systém šablon, 7 tříd barvy masa a 7 tříd barvy tuku, jsou znázorněny na obrázku 2.



Obrázek 2: Systém hodnocení a) mramorování masa, b) hodnocení barvy masa a c) hodnocení barvy tuku

Zdroj: Jones' Black Gold Farms, 2005

Graficky je srovnání jednotlivých škál hodnocení kvality masa zobrazeno na obrázku 3. Toto srovnání nám porovnává kvalifikační normu indexu mramorování u skotu (B.M.S.) se stupni výtěžnosti (pozn.: ve třech stupních výtěžnosti od A po C) a hodnocením kvality masa (pozn.: dle stupně mramorování a dalších faktorů od 1 po 5). Snímky masa na obrázku 3 nebyly pořízeny dle B.M.S., proto nejsou zobrazeny na obrázku snímky pro B.M.S. $No.1$ a B.M.S. $No.2$ (Kobe Beef Marketing & Distribution Promotion Association, 2005)



Obrázek 3 Srovnání hodnocení kvality masa dle stupně výtěžnosti (A, B, C), stupně kvality masa (1, 2, 3, 4, 5) a indexu mramorování u skotu (B.M.S.)
Zdroj: Kobe Beef Marketing & Distribution Promotion Association, 2005

3.2.2 Mikroskopické zhodnocení intramuskulárního tuku a mramorování

Mramorování v mase tvoří tuková tkáň, která je tvořena tukovými buňkami (adipocyty). Adipocyty jsou zakotveny v matrixu pojivové tkáně a vyskytují se v blízkosti kapilární sítě. Od jiných druhů tuků (intramuskulární, podkožní) odlišíme tuk mramorované tkáně mezisvazkovým (interfascikulárním) tukem uloženém ve svalu. Tukové bloky mramorování jsou kulovité buňky s průměrem přibližně $40\ \mu m$ až $90\ \mu m$. Tyto adipocyty mramorovaného masa jsou výrazně menší než buňky jiných tukových tkání. V této době není známo, zda rozdíl velikosti tukových buněk má vliv na funkci svalu. Adipocyty mramorování se vyskytují ve shlucích či ostrůvcích. Ostrůvky jsou rozlišitelné makroskopicky v momentě, kdy se skládají alespoň z 10 – 15 buněk. Ostrůvky adipocytů, tvořené stovkami buněk, se často seskupují kolem dobře vyvinutých kapilár (Harper a Pethick, 2001).

3.2.3 Fyziologické zhodnocení mramorování

V dnešní době není ještě příliš známo, jaké získá zvíře fyziologické výhody, pokud má mramorovanou tkáň ve svalech. Vývoj adipocytů uvnitř svalové tkáně není běžným jevem vyskytujícím se u vyšších savců. Adipocyty mramorované tkáně nijak mechanicky nesouvisí s ukládáním tukových zásob, které pomáhají například medvědům přežít hibernaci, nebo tukovými zásobami vyskytujícími se u migrujících ptáků. Neexistují ani žádné důkazy, které by podporovaly hypotézu, že by mramorovaná tkáň u zvířete měla lepší tepelné účinky. Rozvoj intramuskulárního tuku u vyšších savců se vyskytuje při obnově poranění tkáně, kdy se tkáň při poškození svalu nahrazuje tkání tukovou. Také to platí v případech výskytu nádorů a onemocnění způsobujících růst tukové tkáně ve svalech. Tyto tukové tkáně se z histologického hlediska liší od tuku mramorované tkáně (Harper a Pethick, 2001).

S využitím teorie Occamovi břitvy můžeme dojít k jednoduššímu vysvětlení vzniku mramorování. Mramorování se vyvíjí ve svalu bez specifické funkce a ve svalu žádným způsobem neznevýhodňuje určitého jedince, proto se proti tomuto jevu neobjevil žádný silný evoluční tlak, který by jej potlačoval. Pokud by jedinec byl přítomností mramorování jakkoliv znevýhodněn, evoluční tlak na jeho odstranění by zesílil. Mramorování se tedy pravděpodobně náhodně vyvinulo díky genetické predispozici u jednotlivých linií skotu a jeho procento v současném chovu skotu se zvyšuje díky selekci zvířat (Harper a Pethick, 2001).

3.3 Genetické markery a jejich využití

Myšlenka využití genetických informací v rámci selekce by nemohla vzniknout bez rozvoje molekulární genetiky, jejíž metody dnes mimo jiné umožňují identifikaci a mapování genů, genetických polymorfismů a následnou detekci lokusů kvantitativních znaků (QTL). Tyto metody jsou zásadní pro získávání a aplikaci genetických informací v průběhu markery asistované selekce (MAS).

Samotná MAS vznikla za účelem zlepšení a urychlení selekční odpovědi v populaci, a to přidáním genetické informace k již známým fenotypovým datům jedince (Bobrová, 2003).

Tendence využít genetické markery pro selekci hospodářský zvířat se objevila již na konci 20. století. Velkým milníkem pokroku v selekci za pomocí markerů byl rok 2001, kdy se postoupilo v mapování genomu (Ježková, 2011).

Odhalení genomu velmi napomáhá této metodě při určování daného markeru pro určitý gen, či skupinu genů, které jsou více či méně zodpovědné za projev určité vlastnosti. Pomocí zmapovaného genomu, můžeme určit lokus, kde se daný gen nebo geny nachází a zjistit, jaký marker nám je může označovat a pomoci detekovat.

3.3.1 Genetické markery

Genetický marker je gen nebo úsek na chromozomu, jehož umístění je známé a může být snadno identifikován. Marker musí být polymorfní, rozpoznatelný a identifikace musí být možná bez ohledu na pohlaví, věk, či vývojové stádium. Dále musí být znám způsob dědičnosti.

Markery by měli být spolehlivé a měli by být spojené s cílovými lokusy méně než $5\ cM$. Při použití doprovodných markerů se výrazně zvyšuje spolehlivost určení fenotypu. Dále bychom měli mít dostatečné množství kvalitních markerů. Některé markerové techniky vyžadují velké množství markerů o vysoké kvalitě. Důležitá je i úroveň polymorfismu. V ideálním případě by měl být marker výrazně polymorfní. A v neposlední řadě by neměly být metody příliš drahé, aby se nám tyto postupy vyplatily (Collard a Mackill, 2008).

Použití genetický markerů má svůj význam hlavně ve šlechtění zvířat, např. při markery asistované selekci (MAS).

MAS je proces, při kterém využíváme výsledků testování DNA k selekci jedinců, které chceme následně využít v plemenitbě. MAS poskytuje šlechtitelům výrazné výhody. Umožňuje zvýšit selekční pokrok u znaků, u kterých je těžké dosáhnout lepších pokroků fenotypovou analýzou. Tedy například znaky s nízkou hodnotou heritability, nebo znaky, které je možné zkoumat až po usmrcení jedince (např. kvalita masa, ukládání intramuskulárního tuku, mramorování, atd.). Případně znak, který se projevuje jen u jednoho pohlaví (např. mléčná produkce, aj.) Výhodou použití genetických markerů je, že můžeme požadované znaky detekovat už u rodičů či v nízkém věku jedince, popřípadě už v embryu. Tato detekce umožňuje výrazné zkrácení generačního intervalu, což způsobí rychlejší genetický pokrok. Další nespornou výhodou je zlepšení přesnosti genetické selekce. Na základě identifikace genů můžeme rozpoznat, které zvíře bude vhodnější do daného chovu a na základě analýzy DNA rozhodnout, zda je zvíře v chovu vhodné či ne.

Pomocí genetických markerů také poznáme, zda je jedinec homozygot či heterozygot. Heterozygot se nám při fenotypovém pozorování většinou neprojeví.

3.3.2 Rozdělení markerů při mapování genomu:

Markery I. typu – kódují exprimované geny, které nevykazují vysoký polymorfismus. Mohou být kandidátními geny pro QTL. Tyto markery se využívají při komparativním (srovnávací) mapování.

Markery II. typu – vysoce variabilní sekvence DNA – především mini a mikrosatelity. Jsou to tandemové repetice, které lze snadno detekovat. Díky velkému počtu alel jsou mikrosatelity velmi informativní a napomáhají při určování rodičovství a v populačních studiích. Tyto markery nemají přímý vliv na sledovaný znak, ale mohou být ve vazbě s QTL, proto jsou základem pro vazbové mapování genů.

Markery III. typu – označují se jako jednonukleotidové polymorfismy – SNP (single nukleotide polymorphism). Tyto SNP mohou ležet v kódujících oblastech genů. Častěji je ale nalezneme v nekódujících intronech či ve vmezeřených oblastech. Jednonukleotidové mutace jsou velmi časté, vyskytují se v genomu přibližně každých $500\ bp$ až $1\ 000\ bp$, a proto je využíváme jako markery pro kandidátní geny u hospodářských zvířat (Dvořák a Vrtková, 2001).

3.3.3 Markery používané pro asistovanou selekci:

Markery bychom mohly rozdělit i podle vhodnosti pro markery asistovanou selekci. Rozdělujeme je podle významnosti informace o příčinné mutaci, přímé a nepřímé markery.

Přímé markery – Přímé markery mohou být rozdělovány podle 2 typů polymorfismů na funkční a přímé markery. Funkční marker je přímo příčinná mutace, přímý marker je polymorfismus přímo v kódující sekvenci pozorovaného genu.

Nepřímé markery - Druhým typem jsou polymorfismy, které nemají přímý vliv na projev znaku, ale jsou ve vazbě s QTL. Můžeme je označit za **nepřímé markery**. Tyto markery podle praktického využití rozdělujeme na dva typy: LD markery (linkage disequilibrium – nerovnovážná vazba) a LE markery (linkage equilibrium – rovnovážná vazba). LD markery se vyznačují vazbovou nerovnováhou k mutaci či QTL. Vyskytují se v blízkosti mutace v rozmezí $1\ cM$ až $5\ cM$, proto pravděpodobnost rekombinace je téměř nulová. LE markery jsou ve vazbové rovnováze ke QTL. Avšak od mutace jsou více vzádleny než LD markery. Proto může dojít k rekombinaci. Tyto markery mají význam především v populaci, kde byly objeveny. Pro markery asistovanou selekci je nejvhodnější využít markery přímé.

Rozdílné typy markerů můžeme využít i v rozdílných metodách šlechtění či selekce. Přímé markery se používají u genů asistované selekce (GAS), LD markery se používají při metodě LD-MAS, která se moc neliší od geny asistované selekce. LE markery se využívají na LE-MAS, v populaci, ve které byly markery zjištěny (Dekkers, 2004; Urban, 2015).

3.3.4 Genomová selekce

Podstata genomové selekce spočívá ve využití genetických markerů označovaných jako SNP. V rámci velké populace se vyberou nejlepší, průměrná a nejhorší zvířata. Následně se vytvoří jejich DNA profily pomocí stanovení jejich SNP. Statisticky významně korelované SNP s užitkovostí se vytipují a syntetizují se pro ně oligonukleotidové čipy. Nakonec se specifickou vizualizací vazby SNP čipu potvrdí, nebo vyvrátí přítomnost požadovaného SNP v DNA profilu konkrétního testovaného zvířete.

Býci se do šlechtitelského programu genomové selekce vybírají podle testu průměrných plemenných hodnot rodičů. Mladý býček získá polovinu genetické výbavy od matky a polovinu od otce. Ale dva potomci po stejných rodičích nezdědí zcela stejnou genetickou

informaci. Pomocí genomové plemenné hodnoty však můžeme zjistit, zda býček dostal vhodné geny pro určitou užitkovou vlastnost či ne.

Genomová plemenná hodnota nám velmi usnadňuje výběr „správných" býčků do plemenitby. Není třeba řadit je to tří typů: testant, čekatel a prověřený plemeník. Metoda plemenné hodnoty nám dává velmi dobré informace o plemeníkovi. Její nevýhodou je však doba téměř pěti let, kdy čekáme na výsledky a možnost začlenit býka do plemenitby. Při použití genomové selekce je možné vybrat již v rané fázi ta nejvhodnější zvířata z velké skupiny potomků špičkového plemeníka, a to pouze za pomoci „přečtení" SNP v genotypu zvířete.

Technologie genomové selekce byla poprvé představena na konci 90. let 20. století. V té době byla tato myšlenka ještě zcela nereálná, protože náklady na analýzu SNP byly značně vysoké. Od roku 2006 ovšem společnost CRV začala jako první na světě využívat genomovou selekci ve šlechtitelském programu. Nejprve pracovala s referenční populací 1 500 prověřených býčků a téměř 3 000 SNP. V roce 2008 již začala pracovat s téměř 60 000 SNP, což nám ukazuje, že se odvětví genomové selekce poměrně rychle rozvíjí (Marková, 2009).

3.4 Geny asociované s ukládáním intramuskulárního tuku

Postupný vývoj molekulární biologie, genetiky, statistiky a metod vyhodnocování umožnil odhalit geny, které jsou důležitým ukazatelem a zlepšovatelem masné užitkovosti, např. mramorování masa. Mramorování masa je znak, který vyjadřuje množství intramuskulárního tuku. Tento tuk lze makroskopicky pozorovat mezi svalovými vláky ve svalových snopcích (Wheeler *et al.,* 1987)

Ukládání intramuskulárního tuku je důležitá vlastnost pro kvalitu masa, protože ovlivňuje šťavnatost, chuť a jemnost masa. Mramorování je kvantitativní vlastnost, které je ovlivňována několika geny a okolním prostředím. Už v minulosti se vědci snažili odhalit kandidátní geny, které ovlivňují ukládání intramuskulárního tuku. V současné době se ve spojitosti s touto tématikou studují diacylglycerol O-acyltransferáza ($DGAT1$), leptin (LEP), Fatty acid binding protein 4 ($FABP4$) a thyroglobulin (TG) geny, jejichž polymorfismy byly spojeny s ukládáním intramuskulárního tuku (Ripoli *et al.,* 2013).

Za pomoci asociační analýzy byly identifikovány další kandidátní geny s vlivem na kvalitu masa hospodářských zvířat. Jsou to geny melanocortin 4 receptor ($MC4R$), myogenin, myostatine, homogentisate 1,2-dioxygenase (HGD), calcium channel voltage-dependent alpha 2/delta subunit 1 ($CACNA2D1$), calpastatin ($CAST$), stearoyl-CoA desaturase ($SCD1$) a fat mass and obesity associated genes (FTO)(Yuan *et al.,* 2013).

Jedním z hlavních regulátorů postnatálního vývoje je růstový hormon GH (growth hormone). Tento hormon ovlivňuje tělesnou skladbu jedince, produkci mléka a zdravotní stav. Gen růstového hormonu byl navrhnut jako jeden z kandidátních genů pro vlastnosti související s kvalitou masa. Gen GH kóduje růstový hormon, který společně s GHR (growth hormone receptor - receptor růstového hormonu) působí na vývoj myoblastů a osteoblastů (Jammes a Djiane, 1996).

3.4.1 Diacylglycerol O-acyltransferáza ($DGAT1$)

Gen $DGAT$ je kandidátní gen, který ovlivňuje mramorování masa, obsah tuku v mase a v mléce. Bylo prokázáno, že je spojená s obsahem mléčného tuku u různých plemen skotu, např. Holštýnský skot, Jersey, aj. (Winter *et al.,* 2002), zároveň bylo zjištěno, že má také

pozitivní vliv na obsah intramuskulárního tuku např. u plemene Holštýn a Charolais (Thaller *et al.,* 2003)

Gen $DGAT$ kóduje mikrosomální enzym Diacylglycerol O-acyltransferázu, který se ve velké míře podílí na metabolismu triacylglyceridů. Jeho produkty se přímo podílí na syntéze triglyceridů. Diacylglycerol O-avyltransferáza má vliv především na ukládání lipoproteinů a tvorbu tukové tkáně. Hlavní účinek má na sval *musculus semitendimosus*, kde napomáhá zvyšování obsahu intramuskulárního tuku ve tkáni (Smith *et al.,* 2000). Triacylglyceroly (TAG) jsou hlavním zásobníkem pro skladování energie u eukaryot. Rovněž slouží jako zásobárna mastných kyselin pro syntézu biomembrán a může vést k obezitě v důsledku nadměrného hromadění tukové tkáně. Rodina diacylglycerol acyltransferázy jsou nedílnou součástí membránových proteinů, které katalyzují poslední krok a rychlost biosyntézy triacylgylcerolů v eukazyotických organismech (Cao, 2011).

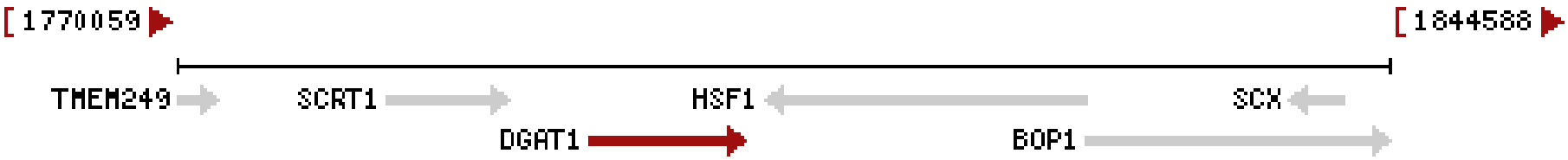
$DGAT$ geny se nachází u mnoha druhů organismů. Známé jsou u savců (Cases *et al.,* 2001) i rostlin (Shockey *et al.,* 2006). Zvířata se sníženou aktivitou $DGAT$ jsou odolnější vůči obezitě, ale mají sníženou mléčnou produkci (Cao, 2011). Snížena mléčná produkce byla prokázána u myší s nefunkčním genem $DGAT1$. Tyto myši nebyly schopné syntetizovat mléko a měli nižší schopnost vytvářet svalový tuk (Smith *et al.,* 2000).

Gen $DGAT$ se u skotu nachází na chromozomu 14 (Ripoli, 2006), je velký $8{,}6\ kb$ a obsahuje 17 exonů a 16 intronů (viz.: Obrázek 4 a Obrázek 5). Exony jsou o délce v rozmezí od $42\ bp$ až po $436\ bp$. $DGAT$ přepisované do mRNA (mediátorová RNA) obsahuje 275 bází v oblasti $5´UTR$, $1\,470\ bp$ kódujících bílkoviny, 489 aminokyselin, $275\ bp$ v $3´UTR$ oblasti, včetně polyadenylačního signálu $AATAAA$. Kódující oblast genu $DGAT$ je u lidí a skotu shodná z $89{,}5\ \%$, pořadí aminokyselin v proteinu je shodné z $92{,}5\ \%$. Všechny introny, které se shodují s pravidlem $GT - AG$ a jsou striktně zachovány v genetickém řetězci u člověka i skotu (Grisart *et al.,* 2002).

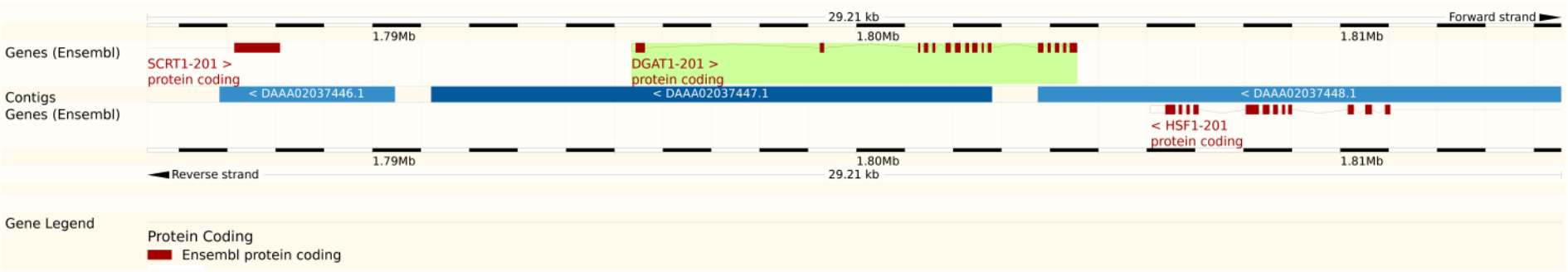
Tabulka 3: Lokace bovinního genu $DGAT1$ na chromozomu 14

Název genu:	Genomová sestava:	Chromozom:	Umístění:
$DSGAT1$	Bos_tauus_UMD_3.1.1 (GCF_000003055.6)	14	AC_000171.1 (1795425..1804838)

Zdroj: GenBank, Gene ID: 282609



Obrázek 4: Lokace bovinního genu DGAT1 na chromozomu 14
Zdroj: GenBank, Gene ID: 282609, 2015



Obrázek 5: Struktura bovinního genu *DGAT1*
Zdroj: Ensembl: ENSBTAG00000026356, 2015

Polymorfismus $K232A$ se nachází v genu $DGAT$ v 8. exonu, v rozdílnosti na pozici $10\ 433\ bp$ a $10\ 434\ bp$. Jedná se o dinukleotidovou záměnu v genu, AA za GC. V důsledku této dinukleotidové záměny dochází ke změně 232. aminokyseliny, kdy dochází k záměně aminokyseliny lysin za alanin. U této záměny byl prokázán velký vliv na obsah mléčného tuku a dalších vlastností mléka. Lysin je asociován s vyšším obsahem tuku v mléce než alanin (Winter *et al.,* 2004). U studie zkoumající polymorfismus $K232A$, která byla prováděna na 28 kusech holštýnského skotu a 27 kusech Charolais. Výsledkem studie bylo zjištění pozitivního vlivu lysinu na pozici 232 na ukládání intramuskulárního tuku ve svalech *musculus longissmus dorsi* a *musculus semitendinosus*. Průkazný statistický rozdíl byl zjištěn pouze mezi homozygoty lysin/lysin (Thaller *et al.,* 2003). Při porážce bylo zjištěno vyšší procento intramuskulárního tuku u varianty lysin/lysin v genu $DGAT1$ (Sorensen *et al.,* 2006).

3.4.2 Thyroglobulin (TG)

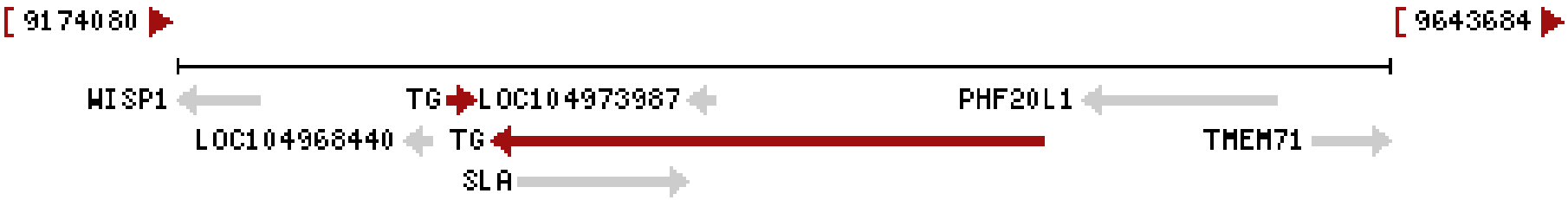
Gen thyreoglobulinu (TG) kóduje glykoproteinový hormon thyreoglobulin, který je syntetizován ve folikulárních buňkách štítné žlázy. TG je molekulární prekurzor pro hormony štítné žlázy, thyroidní hormony, tzn. triodothyronin ($T3$) a tetraiodothyronin ($T4$) (Barendse, 1999; Hou *et al.,* 2011). Hormony $T3$ a $T4$ hrají významnou roli v regulaci a metabolismu tuku. Ovlivňují také růst a diferenciaci tukových buněk. TG byl mapován na oblasti QTL a je považován za kandidátní gen. Genetická variabilita v promotorové oblasti genu TG se široce využívá při markery asistované selekci. Zde se používají k předvídání úrovně mramorování a kvality hovězího masa (Hou *et al.,* 2011).

Bovinní gen thyroblobulin je lokalizován na dlouhém raménku 14. chromozomu, přesné lokace $14q12 - q15$ (GenBank, Gene ID: 280706, 2015).

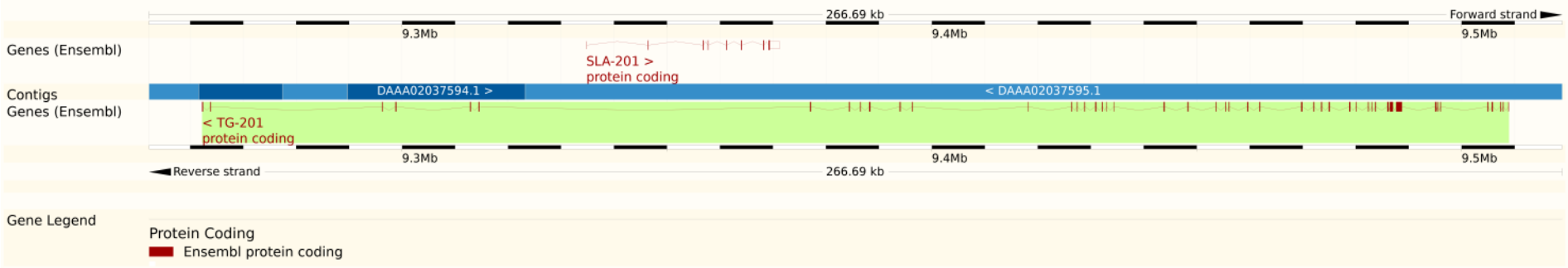
Tabulka 4: Lokace bovinního genu TG na chromozomu 14

Název genu:	Genomová sestava:	Chromozom:	Umístění:
TG	Bos_taurus_UMD_3.1.1 (GCF_000003055.6)	14	AC_000171.1 (9278156..9281192) , (9296197..9508938, complement)

Zdroj: GenBank, Gene ID: 280706, 2015

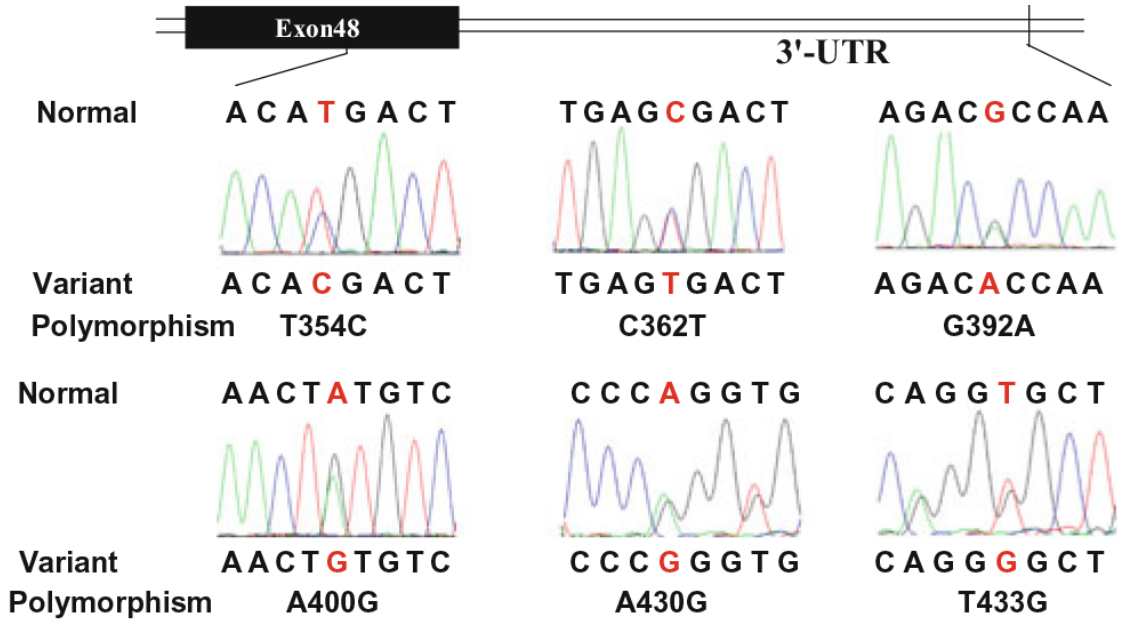


Obrázek 6: Lokace bovinního genu *TG* na chormosomu 14
Zdroj: GenBank, Gene ID: 280706, 2015



Obrázek 7: Struktura bovinního genu *TG*
Zdroj: Ensembl: ENSBTAG00000007823, 2015

U polymorfismu v $5'UTR$ oblasti v genu TG byla identifikována korelace s mramorováním. Tento polymorfismus může být využit pro selekci zvířat na mramorování nebo chovných zvířat určených pro výkrm. Očekávaný je i vliv na tloušťku tuku na JUT, podíl tuku v tkáních i mléce (Folley a Malpress, 1948; Barendse, 1999). V roce 2011 Hou (Hou *et al.,* 2011) dále publikoval práci, ve které identifikoval 6 nových SNP v $3'UTR$ oblasti genu TG (viz: Obrázek 8). Asociační analýza objevila polymorfismy $T354$, $G392A$, $A430G$ a $T433G$. Tyto 4 jednonukleotidové polymorfismů jsou asociovány se zvýšeným mramorováním v mase. (Hou *et al.,* 2011)



Obrázek 8: Chromatogramy SNP v 3´UTR oblasti bovinního genu TG
Zdroj: Hou *et. al.,* 2011

3.4.3 Stearoyl – CoA desaturáza (SCD)

Stearoyl – CoA desaturáza (SCD) je kódována genem SCD. SCD je enzym odpovědný za konverzi nasycených mastných kyselin na mononenasycené mastné kyselin (MUFAs - monounsaturated fatty acids) (Smith *et al.,* 1998). SCD se nachází v endoplazmatickém retikulu a katalyzuje oxidaci spektra acyl-CoA vložením dvojné vazby mezi uhlíky 9 a 10 (Gábor *et al.,* 2009). Potlačení aktivity desaturázy vede k akumulaci kyseliny stearové v hovězí tukové tkáni, což může způsobit podstatné zvýšení tvrdosti tuku. Složení mastných kyselin v hovězím tuku má vliv na vzhled mramorování, měkkost tuku a chuť masa (Smith *et al.,* 1998).

Proto můžeme gen SCD považovat za jeden z genů odpovědných za složení mastných kyselin (Taniguchi *et al.,* 2004).

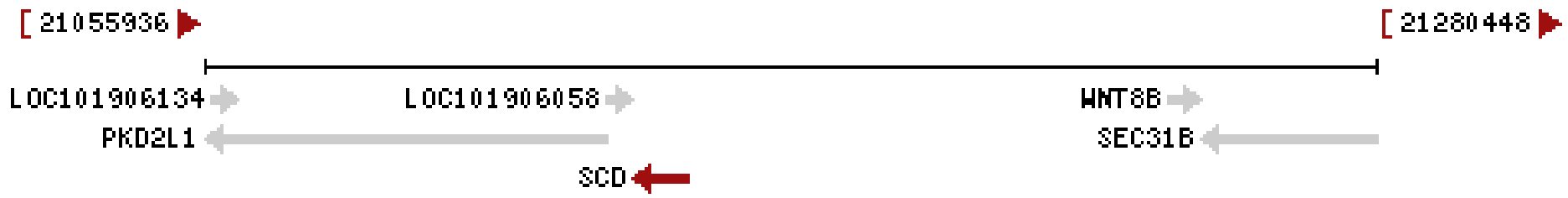
Bovinní gen SCD se nachází na 26. chromozomu, přesněji $26q21$. Jeho velikost se pohybuje okolo $15\ kb$, obsahuje 6 intronů, v rozmezí velikosti $131\ bp$ až $4\ 047\ bp$, a 5 intronů, o velikosti v rozmezí od $600\ bp$ až po $3\ 700\ bp$. Tato struktura genu je stejná u lidí i hlodavců (Ntambi, 2013).

Tabulka 5: Lokace bovinního genu SCD na chromozomu 26

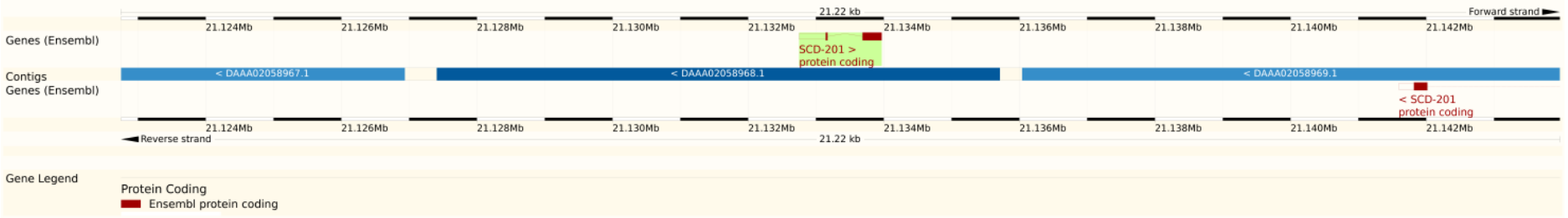
Název genu:	Genomová sestava:	Chromozom:	Umístění:
SCD	Bos_taurus_UMD_3.1.1 (GCF_000003055.6)	26	AC_000183.1 (21137945..21148317, complement)

Zdroj: GenBank, Gene ID: 280924, 2015

V roce 2004 Taniguchi (Taniguchi *et al.,* 2004) popsal 8 SNP v genu SCD u japonského černého skotu. Jednalo se o substituce $G702A$, $C762T$ a $T878C$ v ORF oblasti (open reading frame – otevřený čtecí rámec), $T1905C$, $C3143T$, $A3351G$, $A3537G$ a $A4736G$ v $3'UTR$ oblasti. SNP $T878C$ způsobuje nahrazení aminokyseliny valin za alanin v proteinu SCD. Tato záměna ovlivňuje složení mastných kyselin a teplotu tání IMT (Taniguchi *et al.,* 2002). Rozdíly v enzymové aktivitě SCD u savců mohou mít vliv na celou řadu fyziologických klíčových změn, včetně buněčné diferenciace, citlivosti na inzulín, může ovlivňovat rychlost metabolismu, adipocity, rakovinu a obezitu (Oh *et al.,* 2013).



Obrázek 9: Lokace bovinního genu SCD na chromozomu 26
Zdroj: GenBank, Gene ID: 280924, 2015



Obrázek 10: Struktura bovinního genu SCD
Zdroj: Ensembl: ENSBTAG00000047957, 2015

3.4.4 Fatty acid binding protein 4 (*FABP* 4)

Gen *FABP* 4 se nachází na 14. chromozomu. Lokace genu *FABP* 4 je zobrazena na obrázku 11.

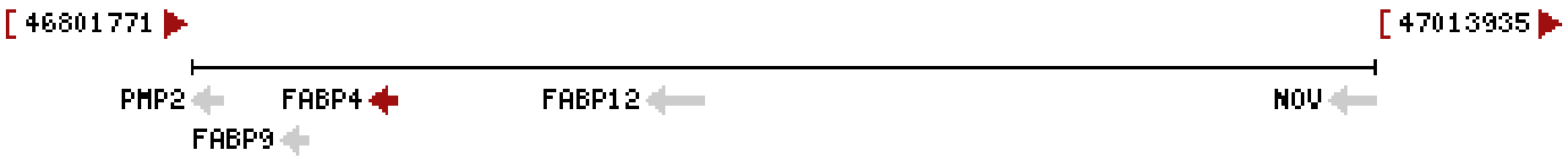
Tabulka 6: Lokace bovinního genu *FABP* 4 na chromozomu 14

Název genu:	Genomová sestava:	Chromozom:	Umístění:
***FABP* 4**	Bos_taurus_UMD_3.1.1 (GCF_000003055.6)	14	AC_000171.1 (46833665..46838053, complement)

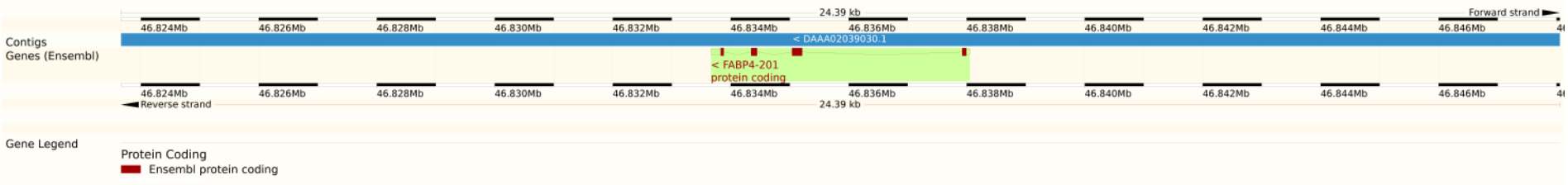
Zdroj: GenBank, Gene ID: 281759, 2015

Fatty acid binding protein 4 (čtvrtý protein vázající mastné kyseliny) patří do malé skupiny vysoce konzervovaných cytoplazmatických proteinů, které se váží dlouhým řetězcem na mastné kyseliny a jiné hydrofobní ligandy (Kaikaus *et al.,* 1990). Mezi hlavní funkce cytoplasmatických proteinů patří příjem mastných kyselin, jejich transport a metabolismus. *FABP* 4 hraje důležitou roli v regulaci homeostázy lipidů a glukózy (Damcott *et al.,* 2004). Washingtonská univerzita, ve spolupráci s několika společnostmi, zjistila souvislost bovinního genu *FABP* 4 s mramorováním a obsahem podkožního tuku u F2 populace kříženců plemen Wagyu a Limousin (Michal *et al.,* 2006).

Protein *FABP* 4 má nezbytnou funkci v regulaci lipidů a udržení glukózové homeostázy za pomoci receptorů peroxizómů aktivovaných proliferázou (PPARs – peroxisome proliferactivated receptors). Tyto receptory jsou lokalizovány v buněčném jádru (Damcott *et al.,* 2004). *FABP* 4 a *FABP* 5 byly určeny jako kandidátní geny pro obezitu (Michal *et al.,* 2006).



Obrázek 11: Lokace bovinního genu FABP 4 na chromozomu 14
Zdroj: GenBank, Gene ID: 281759, 2015



Obrázek 12: Lokace bovinního genu FABP 4 na chromosomu 14
Zdroj: ENSEMBL: ENSBTAG00000037526, 2015

3.4.5 Leptin (*LEP*)

Leptin (*LEP*) je peptidový hormon syntetizovaný a vylučovaný bílými adipocity. Podílí se na regulaci příjmu krmiva, výdeje energie, plodnosti, rozmnožování a reprodukci, produkci mléka, imunitní funkci, konverzi krmiva a na regulaci energetické rovnováhy. Má také vliv na tělesný tuk a tělesnou hmotnost. (Hauseknecht *et al.,* 1998; Pannier *et al.,* 2009; Kaygisiz *et al.,* 2011). Byl také prokázán vliv na křehkost masa. Křehkost je přitom nepřímo ovlivněna obsahem tuku v mase (Glaum *et al.,* 1996). Exprese genu leptin je regulována hmotností tukové tkáně, výživou a hormony, jako jsou například inzulín a růstový hormon (*GH* – growth hormone). Receptory pro leptin jsou lokalizovány mimo jiné v oblasti hypotalamu, kde jsou produkovány somatostatin a růstový hormon ovlivňující faktor, přesněji 2 primární regulátory růstového faktoru. Vliv leptinu na regulaci přijmu potravy a výdeje energie má svoji roli v růstových procesech. Leptin je silný regulátor, který působí centrálními i periferními cestami. Mohl by mít vliv i na tělesnou hmotnost (Kulig a Kmieć, 2009).

Gen kódující leptin je lokalizován na bovinním chromozomu 4 (Trakovická *et al.,* 2013), je velký 16 735 *bp*, kóduje 167 aminokyselin (Taniguchi *et al.,* 2002). Skládá se ze 3 exonů a 2 intronů. Pouze 2 exony jsou přeneseny do proteinů. Kódující úsek genu leptin (501 nukleotidů) je obsažen v exonu 2 a 3 (Trakovická *et al.,* 2013).

Tabulka 7: Lokace bovinního genu *LEP* na chromozomu 14

Název genu:	Genomová sestava:	Chromozom:	Umístění:
LEP	Bos_taurus_UMD_3.1.1 (GCF_000003055.6)	4	AC_000161.1 (93249792..93266624)

Zdroj: GenBank, Gene ID: 280836, 2015

Obezita není sama o sobě velký problém pro zdraví zvířat v zemědělství. Problémem je změna složení těla. Pro chovatele a vědce je hlavním cílem upřednostnit zvyšování efektivity produkce a narůstání libového masa. Kromě toho je potřeba, organismus zvířete udržet v rovnováze, při přijmu krmiva a energie. To může zlepšit růst zvířete, rozmnožování, laktaci, celkový zdravotní stav a pohodu jedince (Hauseknecht *et al.,* 1998).

Obrázek 13: Lokace bovinního genu LEP na chromozomu 4
Zdroj: GenBank, Gene ID: 280836, 2015

Obrázek 14: Lokace bovinního genu LEP na chromosomu 4
Zdroj: ENSEMBL: ENSBTAG00000014911, 2015

Výzkum obezity a její léčba má rozsáhlé použití na modelových zvířatech. Gen leptin byl poprvé objeven a popsán u myší výzkumným týmem Jeffreyho Friedmanna na Rockefellerově univerzitě v New Yorku v roce 1994 (Gura, 1997). Nejstarší modely označené ob/ob myši se používali v roce 1950 (Ingalls *et al.,* 1996). Ob/ob myši jsou recesivní homozygoti (tzn.: neprodukují žádný leptin), kteří mají za následek u sterilních myší obsah tuku převyšující 50 % (Hauseknecht *et al.,* 1998). Vada v genu leptin u pokusných jedinců i u divoké formy myši způsobovala, že když myši hladověly, tak ukládaly až trojnásobek tělesného tuku oproti myším s funkčním genem (Tessanne, 1999). Později se zjistilo, že tyto myši byly také hyperglykemické (Hauseknecht *et al.,* 1998). Absence leptinu může vést k morbidní obezitě. Tukové buňky sekretují leptin do krevního séra (Hauseknecht *et al.,* 1998). Leptin cirkuluje v krevním séru ve volné i ve vázané formě. Volná forma leptinu je biologicky aktivní. Vázaná forma leptinu má funkci proteinového nosiče. Leptin je uvolňován do krve a krevním řečištěm transportován do mozku, kde má výraznou roli v syntéze glykogenu a glukózy. V mozku ovlivňuje centrum, které se podílí na regulaci příjmu potravy (Barash, 1996). Stimuluje či inhibuje uvolnění neurotransmiterů, například neuropeptidu Y (NPY), jenž působí na snižování příjmu krmiva, stimulaci tvorby tepla či povzbuzení tělesné aktivity. Tímto procesem dojde k redukci tukové tkáně nebo bude ovlivňovat jiný endokrinní proces, který povede se snížení syntézy a sekrece leptinu adipocyty (Hauseknecht *et al.,* 1998).

Polymorfismy v kódující oblasti genu leptin u skotu jsou spojovány s koncentrací séra leptinu, příjmu potravy, dojivostí a tělesnou kondicí (Nkrumah *et al.,* 2005). V genu leptin bylo také odhaleno několik SNP (Buchanan *et al.,* 2002; Nkrumah *et al.,* 2005). Polymorfismy byly nalezeny v exonu 2 (Buchanan *et al.,* 2002) a v promotoru genu leptin (Nkrumah *et al.,* 2005).

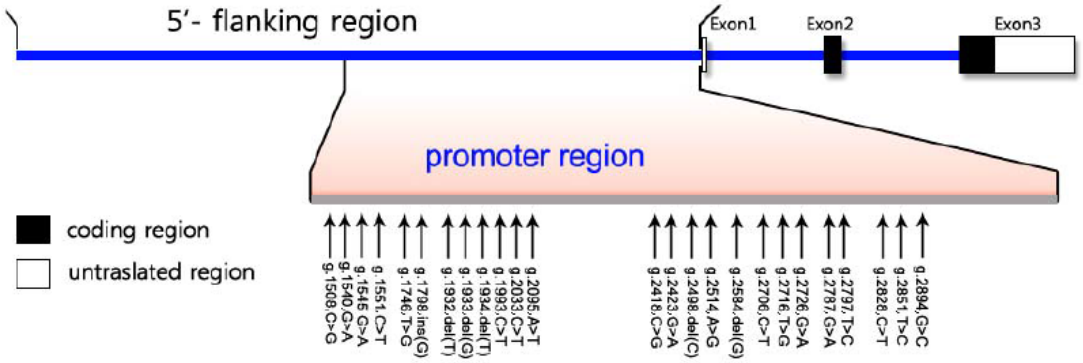
V genu leptin bylo popsáno pět SNP: $E2FB$, $E2JW$, $UASMS1$, $UASMS2$ a $UASMS3$ (Schenkel *et al.,* 2005). V exonu 2 byly popsány 2 SNP: $E2FB$ a $E2JW$ (Buchanan *et al.,* 2002). V promotoru genu leptin byly objeveny 3 SNP: $UASMS1$, $UASMS2$, $UASMS3$ (Nkrumah *et al.,* 2005). Analýzou smíšeného modelu bylo zjištěno, že SNP v genu leptin jsou spojeny s počátkem kosterního růstu (výška: $A1457G$; délka: $A59V$), plodností ($UASMS1$; $UASMS2$; $A1457G$; $A59V$) a mléčnou produkcí ($A59V$) (Clempson *et al.,* 2011). Název a lokace jednotlivých SNP je znázorněno v tabulce 8.

Tabulka 8: Shrnutí názvů a lokací SNPs v genu leptin

Gen	BTA	Pojmenování SNP	Identifikátor SNP	Umístění SNP	zdroj
Leptin	4	$UASMS1$	rs 110058647	Promoter	Nkrumah *et al.* (2005)
		$UASMS2$	rs 109406937	Promoter	Nkrumah *et al.* (2005)
		$A1457G$	rs 319607411	Promoter	Liefers *et al.* (2005)
		$C963T$	rs 109956567	Promoter	Liefers *et al.* (2005)
		$A252T$	rs 29004487	Exon 2	Lagonigro *et al.* (2003)
		$E2FB$	rs 29004488	Exon 2	Buchanan *et al.* (2002)
		$A59V$	rs 29004508	Exon 3	Liefers *et al.* (2003)
Leptin receptor	3	$T945M$	ss 319607410	Exon 2	Liefers *et al.* (2004)
Neuropeptide Y	4	$NPY1$	ss 319607412	Intron 2	Sherman *et al.* (2008)

Zdroj: Clempson *et al.* (2011)

V promotoru genu leptin se nachází $UASMS1$ na pozici $C207T$, $UASMS2$ na pozici $C528T$ a $UASMS3$ na pozici $C1759G$ (Nkrumah *et al.,* 2005) – viz obrázek 15.



Obrázek 15: Mapa SNP v promotorové části genu leptin u skotu na chromozomu 4
Zdroj: Chung *et al.* (2008)

3.4.5.1 Polymorfismus UASMS2 v genu leptin

Polymorfismus $UASMS2$, který je také označován jako polymorfismus $LEP - 2470$, je lokalizován v promotorové části na pozici 528 v bovinním genu leptin (GenBank Accession No. AB070368). V polymorfismu $UASMS2$ dochází k mononukleotidové substituci C za T (Nkrumah *et al.,* 2004; Nkrumah *et al.,* 2005).

Varianty polymorfismu mají významný vliv na příjem krmiva, rychlost růstu, živou hmotnost při porážce, porodní hmotnost, chování, tloušťku hřbetního tuku, mramorování a koncentraci leptinového séra (Nkrumah *et al.,* 2005).

Genotyp TT je velmi vzácný, v populaci se vyskytují pouze $2\ \%$ (Clempson *et al.,* 2011). Genotyp TT v polymorfismu $UASMS2$ má vliv na nejvyšší rychlost tělesného růstu, zároveň má i prokazatelně významný vliv na zvýšenou koncentraci leptinového séra (Nkrumah *et al.,* 2005). Bylo ovšem zjištěno, že genotyp TT má negativní vliv na zabřezávání jalovic (Clempson *et al.,* 2011)

Zároveň T alela leptinu SNP, $UASMS2$, byla významně spojena se zvýšením celkové chuti, s odhadovaným rozdílem mezi homozygotních genotypů TT (Gill *et al.,* 2009).

Gill (Gill *et al.,* 2009) zjistila, že jedinci s genotypem CC mají méně tuku obklopující svíčkovou než jedinci s genotypy CT a TT. Toto zjištění je v souladu s předchozím textem, kde bylo zjištěno, že SNP $UASMS2$ je významně spojen s výškou hřbetního tuku a mramorovacím skóre. Zvířata s genotypem TT mají vyšší hodnoty pro oba znaky. Proto je pravděpodobné, že zvířata s genotypem TT mají chutnější masa, protože tuk ovlivňuje chuť masa (Gill *et al.,* 2009).

4 METODIKA A MATERIÁLY

Metodika a postup práce byl proveden dle postupu Nkrumaha (Nkrumah *et al.,* 2005).

4.1 Analyzované vzorky

Použité analyzované vzorky DNA, byly získány na Ústavu morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomické fakulty Mendelovy Univerzity v Brně. Soubor vzorků se skládal ze 174 vzorků DNA izolovaných z krve, které pocházely od býků plemene český strakatý skot.

4.2 Použité přístroje

- Automatický termální cykler GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems*)
- Centrifuga Mikro 120 (*Hettich Zentrifugen*)
- CentriVap Concentrator (*LABCONCO*)
- Electronic UV Transilluminator (*Ultra-Lum, Inc.*)
- Fotoaparát Powershot G6 (*Canon*)
- UltraCam - Digital Imaging (*Ultra-Lum, Inc.*)
- Votrex Bio Vortex V1 (*Biosan*)
- Sekvenátor 3100-Avant Genetic Analyzer (*Applied Biosystems*)

.

4.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

4.3.1 Roztoky PCR reakční směsi

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro PCR reakci

Složka	Množství
H_2O	$2{,}000\ \mu l$
PPP mix bez Mg^{2+}	$3{,}125\ \mu l$
Mg^{2+}	$0{,}375\ \mu l$
Přímý primer 1A	$0{,}125\ \mu l$
Zpětný primer 1B	$0{,}125\ \mu l$
Celkové množství	$\mathbf{5{,}750\ \mu l}$

4.3.2 Pracovní postup

1. PCR reakční směs byla připravena na ledu podle tabulky 9 a řádně promíchána.
2. Reakční směs (MasterMix) byla rozpipetována do mikrozkumavek po $5{,}75\ \mu l$.
3. Do mikrozkumavek bylo přidáno $0{,}5\ \mu l$ testované DNA, obsah zkumavek byl důkladně zvortexován.
4. PCR proběhlo v automatickém termálním cykleru GeneAmp PCR System 9700.

4.3.3 Amplifikace probíhala za následujících podmínek

$95\ °C/2\ min$; 30 cyklů ($95\ °C/20\ s$, $62\ °C/30\ s$, $72\ °C/20\ s$); $72\ °C/7\ min$, $4\ °C/\infty$.;

Vzorek PCR produktu byl nanesen na 4% agarózový gel (viz: kapitola 4.4 Agarozová gelová elektroforéza) pro ověření průběhu PCR. Zbytek produktu byl uchován v chladu při teplotě $4\ °C$.

4.3.4 Návrh primerů (dle Nkrumah *et al.*, 2005)

- Přímý primer ($5´\ AGG\ TGC\ CCA\ GGG\ ACT\ CA\ 3´$)
- Zpětný primer ($5´\ CAA\ CAA\ AGG\ CCG\ TGT\ GAC\ A\ 3$)

4.4 Agarozová gelová elektroforéza

4.4.1 Pracovní postup:

1. Naváženo $1{,}8\ g$ agarózy a rozvařeno pomocí mikrovlnné trouby v $60\ ml$ TBE pufru.
2. Za občasného promíchání byl roztok nechán v odvětrávané digestoři do zchladnutí.
3. Do roztoku bylo přidáno $12\ \mu l$ Ethidium bromidu.
4. Výsledný roztok byl nalit do předem připravené vaničky s hřebínky. Gel se nechal $20\ min$ až $25\ min$ ztuhnout.
5. Vanička s gelem byla přesunuta do elektroforetické aparatury, která byla naplněna TBE pufrem. Do první jamky byl nanesen DNA M50 hmotnostní marker, pro určení PCR fragmentů.
6. Do zbylých jamek bylo naneseno ideální množství vzorků DNA.
7. Elektroforéza probíhala při napětí $4\ Vcm$ po dobu $20\ min$ až $25\ min$.
8. Po skončení elektroforézy byly vzorky vizualizovány pomocí Electronic UV Transilluminator (*Ultra-Lum, Inc.*). A pořízen záznam pomocí fotoaparátu Canon Power ShotG6.

4.4.2 Příprava sekvenační směsi

Tabulka 10: Složení sekvenační směsi

složka	množství
voda	$6{,}04\ \mu l$
RR	$1{,}00\ \mu l$
pufr	$1{,}50\ \mu l$
Zpětný primer	$0{,}16\ \mu l$
Celkové množství	$\mathbf{8{,}70\ \mu l}$

4.4.3 Pracovní postup:

1. Reakční směs byla připravena podle tabulky 10.
2. Směs byla rozpipetována do zkumavek po $8{,}7\ \mu l$ a přidáno $0{,}5\ \mu l$ PCR produktu.
3. Směs byla zvortexována a následně přečištěna pomocí SigmaSpin™ Post Reaction Clean-up Columns (pozn.: rozepsáno v následující kapitole)

4.5 Přečištění sekvenační směsi pomocí SigmaSpin™ Post Reaction Clean-up Columns

4.5.1 Pracovní postup:

1. Kolonka byla vložena do čisté $2\ ml$ zkumavky a centrifugována $2\ min/2\ 800\ rpm$.
2. Odcentrifugovaná kolonka byla vložena do čisté $2\ ml$ zkumavky a do kolonky bylo napipetováno $15\ \mu l$ sekvenační směsi.
3. Kolonka byla opětovně vložena do centrifugy a centrifugována $4\ min/2\ 800\ rpm$.
4. Po centrifugaci byla kolonka odstraněna a obsah zkumavky přepipetován do $0{,}5\ ml$ zkumavky.
5. Na závěr byla ve vakuu odpařena voda (pomocí přístroje CentriVap Concentrator (LABCONCO)) a přidáno $10\ \mu l$ pormamidu. Směs byla zvortexována.
6. Zkumavka byla vložena na termobath inkubátor a zahřáta na $95\ °C$ po dobu $2\ min$.

4.6 Sekvenování

4.6.1 Pracovní postup:

1. Vzorky byly analyzovány pomocí automatického sekvenátoru 3 100 - Avant Genetic Analyzer
2. Pro vyhodnocení výsledných sekvencí byl použit program Sequence Scanner Software v.1.0.

4.7 Metodika chemických analýz

Chemické analýzy a zpracování vzorků provedla v biotechnologické laboratoři Ing. Eliška Dráčková.

4.7.1 Stanovení obsahu sušiny v mase (%)

Obsah sušiny byl stanoven vysoušením homogenizovaného vzorku masa do konstantní hmotnosti. Původní hmotnost vzorku byla $5\ g$.Vzorek byl smíchán s mořským pískem a vysušen při $1\,051\ °C$ po dobu $2\ hodin$. Následně byl vzorek sušen při $60\ °C$ po dobu $4\ hodin$ a poté byl sušen při $105\ °C$ po dobu $6\ hodin$ do konstantní hmotnosti. Po vychladnutí byl vzorek zvážen. Obsah sušiny byl vypočítán z rozdílů hmotnosti vzorku původní navážky a po vysušení.

4.7.2 Stanovení celkového obsahu proteinů v mase (%)

Obsah dusíku byl stanoven metodou dle Kjeldahla. Tato metoda se skládá ze tří navazujících částí, mineralizace, destilace a titrace. Při mineralizaci je dusík převeden na síran amonný. Destilace umožní přeměnu soli amoniaku na amoniak a titrace je provedena slabou kyselinou sírovou. Zjištění obsah dusíku je přepočten na obsah bílkovin pomocí koeficientu $N \times 6{,}25$.

4.7.3 Stanovení obsahu popelovin (%)

Stanovení obsahu popelovin probíhá se vzorku $1\ g$ až $2\ g$ masa. Vzorek se postupně spaloval v peci při teplotě $550\ °C$ až $600\ °C$ po dobu $8\ hodin$. Po vychladnutí byl vzorek zvážen a zjištěn obsah popelovin.

4.7.4 Stanovení obsahu intramuskulárního tuku v mase (%)

Na zjištění obsahu tuku byla použita extrakční metoda dle Soxhleta. Metoda spočívá v extrakci rozemletého nebo vysušeného vzorku. Na tuto metodu byl použit vzorek z předchozího stanovování sušiny. Tento vzorek byl extrahován s deithyletherem po dobu $6\ hodin$. Po extrakci byl v odvětrávané digestoři odpařen zbytek ethedu a následně byl při $105\ °C$

sušen po dobu $1\ hodiny$. Obsah vzorku byl stanoven odečtením rozdílů váhy vzorku před analýzou a po provedení analýzy.

4.7.5 Stanovení svalových pigmentů masa (mg/g)

Pro stanovení svalových pigmentů byla použita metoda dle Homseye. Tato metoda využívá skutečnosti, že v okyseleném acetonu se rozpouštějí všechna hemová barviva, zatímco v neutrálním acetonu se z hemových barviv rozpouští pouze nitroxyhemochrom. Na tuto metodu byl použit homogenizovaný vzorek masa o hmotnosti $10\ g$. Do vzorku byl přidán okyselený roztok acetonu a následně byla provedena filtrace. Poté byla na spektrofotometru provedena absorbance. Standart byl změřen na okyseleném roztoku acetonu. Výsledek byl přepočten na miligramy myoglobinu v $1\ g$ svaloviny.

4.7.6 Stanovení pH 48

Hodnota pH 48 byla zjišťována $48\ hodin$ po porážce zvířete na jatkách. Tato hodnota byla zjištěna pomocí pH metru WTW se dvěma elektrodami. Jedna elektroda měří teplotu a druhá pH.

4.7.7 Stanovení obsahu vaznosti vody masa (%)

Homogenizovaný vzorek masa o hmotnosti $2\ g$ byl na filtračním papíře Whatman č. 2 vložen mezi dvě skleněné destičky. Tyto destičky byly zatíženy závažím o hmotnosti $500\ g$ po dobu $5\ minut$. Následně byl vzorek zvážen. Úbytek hmotnosti vzorku masa po vylisování vyjadřoval procentuální vaznost vody.

4.7.8 Stanovení remise masa (%)

Remise masa vyjadřuje podíl odraženého světla dopadajícího na povrch masa. Čím je maso světlejší, tím větší podíl světla se odrazí, u tmavého masa dochází k pohlcování světla. U vzorku byl proveden rovný řez těsně před měřením. Měření bylo provedeno ve středu vzorku za použití přístroje Spekol 11 při vlnové délce $522\ nm$.

5 MATEMATICKO-STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

5.1 Výpočet frekvencí alel a genotypu

Tabulka 11: Výpočet frekvencí genotypů

Genotypy	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
AA	D	$d = \frac{D}{N}$
Aa	H	$\mathrm{h} = \frac{\mathrm{H}}{N}$
aa	R	$\mathrm{r} = \frac{R}{N}$
Součet	$D + H + R = N$	$d + h + r = 1$

Zdroj: Urban (2008)

Tabulka 12: Výpočet frekvencí alel

Alely	Absolutní frekvence	Relativní frekvence
A	$P = 2D + H$	$p = \frac{2D + H}{2N} = \frac{P}{2N}$
a	$Q = 2R + H$	$q = \frac{2R + H}{2N} = \frac{Q}{2N}$
Součet	$P + Q = 2N$	$p + q = 1$

Zdroj: Urban (2008)

Kde platí, že:

- D, H, R absolutní frekvence genotypů
- d, h, r relativní frekvence genotypů
- P, Q absolutní frekvence alel
- p, q relativní frekvence alel
- N absolutní frekvence všech jedinců

5.2 Genetická rovnováha dle Hardy-Weinbergova zákona

Dle Hardy-Weinbergova zákona platí, že zjištěný stav frekvencí genotypu vyjadřuje následující rovnice:

$$1 = p^2 + 2pq + q^2 \quad (1)$$

Na vyhodnocení byl použit statistický test dobré shody - χ^2 (chí kvadrát) test:

$$x^2_{(\alpha;n-p-1)} = \sum \frac{(P-O)^2}{O} \quad (2)$$

Kde platí, že:

- P pozorovaná četnost genotypů
- O *o*čekávaná četnost genotypů
- Σ suma
- α hladina významnosti
- $n - p - 1$ výpočet stupně volnosti

5.3 Asociační analýza

Asociační analýza byla provedena za pomoci programu SAS 8.2 (SAS Institute Inc.) Pevný efekt byl: genotyp polymorfismu UASMS2, rok, efekt chovu. K vyhodnocení výsledků byla navržena následující rovnice:

$$y_{ijklm} = \mu + Lep_i + rok_j + chov_k + otec_l + e_{ijklm} \quad (3)$$

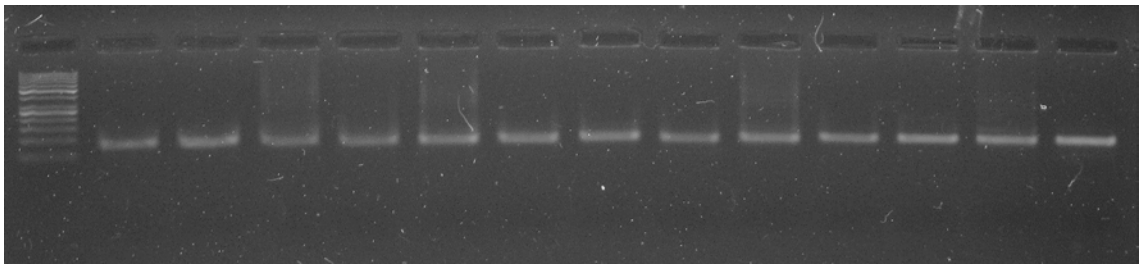
Kde platí, že:

- y_{ijklm} sledovaný znak
- μ odhadovaný průměr sledovaného znaku
- Lep_i pevný efekt i-tého genotypu genu
- rok_j pevný efekt j-tého roku
- $chov_k$ pevný efekt k-tého chovu
- $otec_l$ náhodný efekt l-tého otce
- e_{ijklm} náhodná chyba každého pozorování

6 VÝSLEDKY

6.1 PCR

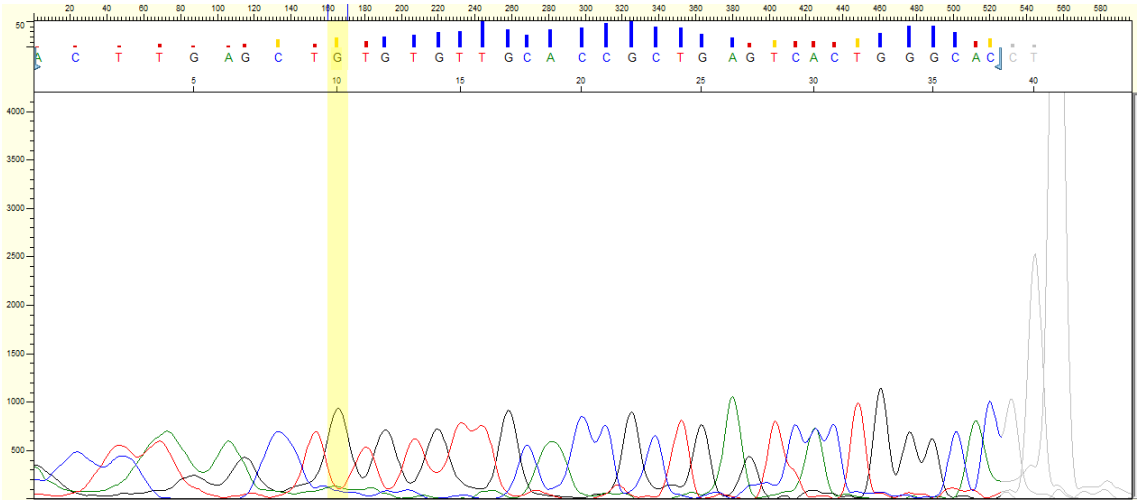
Polymorfismus $UASMS2$ v genu Leptin amplifikován pomocí polymerázové řetězové reakce. Gen leptin se nachází u skotu na 4. chromozomu, na lokusu $4q32$. Amplifikovaný polymorfismus $UASMS2$ se nachází v promotoru genu leptinu na pozici $528\ bp$. Výsledný množený fragment byl o délce $79\ bp$. Pro ověření amplifikovaného PCR produktu byla využita horizontální agarózová elektroforéza. K vizualizaci byl použit ethydiumbromid. Na obrázku 16 jsou viditelné namnožené fragmenty vzorků.



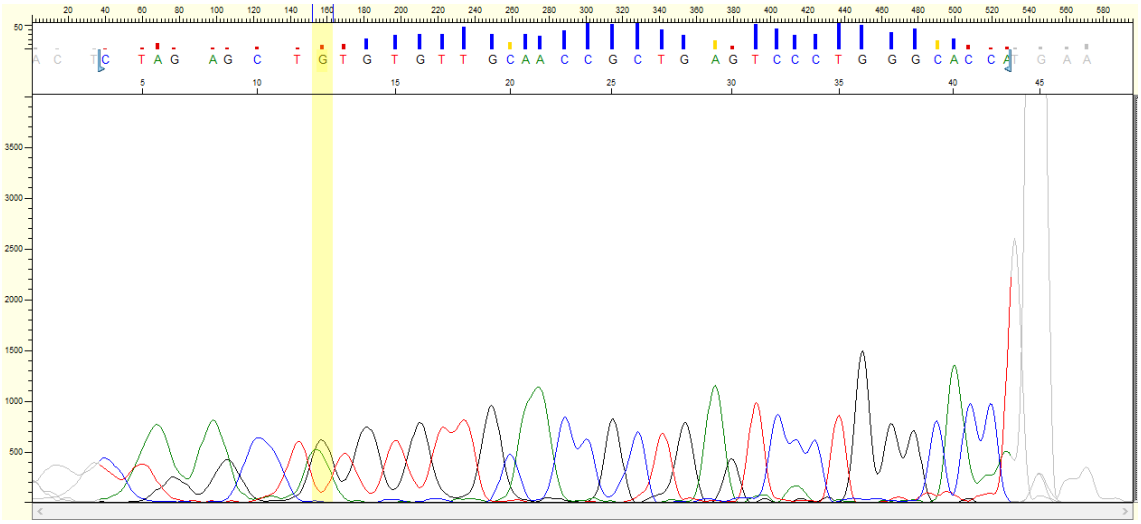
Obrázek 16: Ověření amplifikovaného vzorku DNA, gen leptin. Fragmenty jsou naneseny na 4 % agarózovém gelu a vizualizovány pomocí barviva ethydiumbromid

6.2 Sekvenování

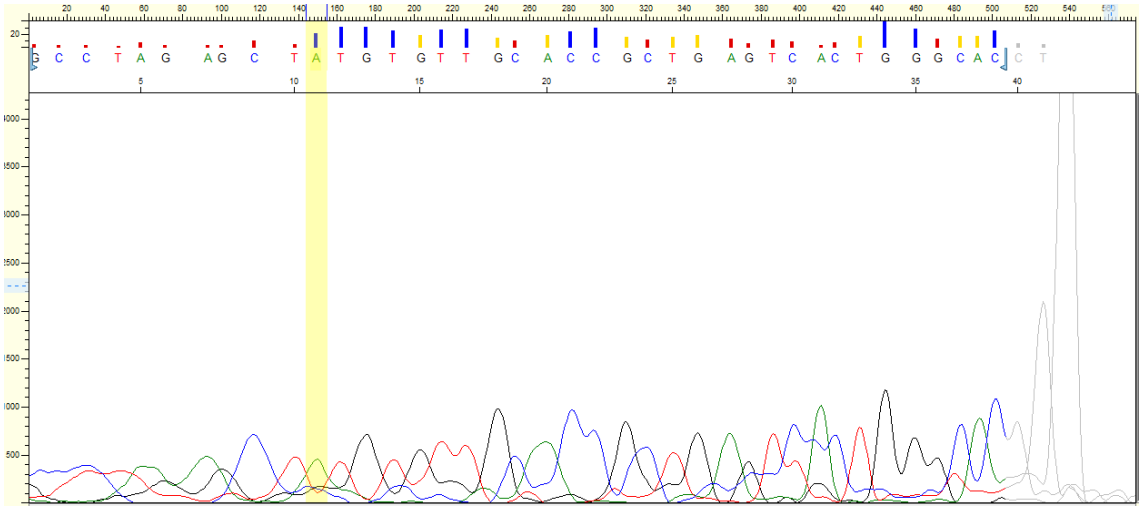
Pro zjištění genotypů sledovaného polymorfismu *UASMS2* byla použita metoda sekvenování PCR produktů. Pro vyhodnocení sekvenovaných fragmentů byl použit Seq scanner 2. Obrázek 17, obrázek 18 a obrázek 19 zobrazují výstupy ze sekvenátoru.



Obrázek 17: Ukázka homozygota CC v polymorfismu *UASMS2* v genu leptin při použití zpětného primeru



Obrázek 18: Ukázka homozygota CT v polymorfismu *UASMS2* v genu leptin při použité zpětného primeru



Obrázek 19: Ukázka homozygota TT v polymorfismu UASMS2 v genu leptin při použité zpětného primeru

Na přiložených obrázcích ze softwaru Seq scanner 2 je znatelný výrazný šum na pozadí vzorků.

6.3 Matematicko – statistické zpracování dat

6.3.1 Výpočet frekvencí genotypů a alel

Zkoumaná populace obsahovala 174 jedinců. U všech jedinců byl stanoven genotyp. Pro určení absolutních a relativních frekvencí genotypu a alel byly použity rovnice z tabulek v kapitole 5.1 Výpočet frekvencí alel a genotypu.

Tabulka 13: Frekvence genotypů v polymorfismu *UASMS2*

Genotypy	absolutní frekvence	relativní frekvence
CC	113	0,649
CT	59	0,339
TT	2	0,012
Celkem:	**174**	**1,000**

Tabulka 14: Frekvence alel v polymorfismu *UASMS2*

Alely	absolutní frekvence	relativní frekvence
C	285	0,819
T	63	0,181
Celkem:	**348**	**1,000**

V pozorované populaci byl nejvíce zastoupen genotyp CC s 113 jedinci. Heterozygot CT byl zastoupen četností 59 jedinců a homozygot TT byl zastoupen nejméně, pouze 2 jedinci. Frekvence genotypů je CC 64,9 %, CT 33,9 % a TT 1,2 %. V populaci byla více zastoupena alela C s četností 81,9 %, alela T má četnost pouze 18,1 %.

6.3.2 Test genetické rovnováhy populace dle Hardy-Weinbergova zákona

Tabulka 15: Stanovení genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona

Hardy-Weinbergova rovnováha

	CC	***CT***	***TT***	**součet**
pozorované absolutní frekvence	113	59	2	174
Očekávané relativní frekvence	0,671	0,297	0,033	1,000
Očekávané absolutní frekvence	67,1	29,7	3,3	100,0
$\chi 2$	31,4	28,9	0,5	**60,8**

Tabulka 16: Porovnání vypočítaných hodnot χ^2 testu s tabulkovými hodnotami

	Stupně volnosti					
Hladina významnosti	1	2	3	4	5	Výsledná hodnota χ^2
0,05	3,84	5,99	7,81	9,48	11,07	60,8
0,01	6,35	9,21	11,34	13,27	15,08	60,8

Zdroj: Urban (2008)

Výpočet stupně volnosti (df) pro gen se třemi genotypy a dvěma alelami je:

- df $počet\ znaků - počet\ kategorií - 1$
- df $n - p - 1$
- df $3 - 1 - 1 = 1$

Porovnáním vypočítané hodnoty χ^2 s tabulkovými hodnotami se dospělo k závěru, že vypočítaná hodnota je vyšší než 5. stupeň volnosti pro obě hodnoty (0,01 a 0,05), což znamená, že je průkazný rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi, a proto se nulová hypotéza zamítá. Populace pro daný lokus není v genetické rovnováze.

6.3.3 Asociační analýza

Při asociační analýze nebylo pracováno se souborem vzorků 174 kusů, ale pouze 170 kusů. Čtyři vzorky byly odstraněny, protože v celkovém souboru se vyskytovali u daného chovu pouze po dvou jedincích. Tito jedinci negativně ovlivňovali výsledky.

V následující tabulce 17 jsou souhrnně uvedeny počty kusů při analýze, průměrné hodnoty, směrodatné odchylky, střední kvadratické odchylky (rozptyl), minimální a maximální hodnoty analyzovaných znaků.

Tabulka 17: Popisná asociační analýza hodnocených znaků

Znak	počet kusů	průměr	σ	σ2	MIN	MAX
Sušina	170	25,29	1,62	1,27	21,84	31,15
IMT	170	2,04	1,83	1,35	0,26	10,71
Bílkoviny	170	21,18	0,54	0,74	18,25	22,72
N-látky	170	3,39	0,01	0,12	2,92	3,64
Popeloviny	170	1,08	0,00	0,05	0,89	1,21
Vaznost	170	81,02	14,35	3,79	73,11	95,70
Barva	170	3,89	0,60	0,78	2,25	6,40
pH	170	5,64	0,07	0,26	5,41	6,84
Remise	170	4,34	2,13	1,46	1,40	9,70

Pozn.: IMT – intramuskulární tuk

kde:

- σ směrodatná odchylka
- σ2 rozptyl
- MIN minimální hodnota
- MAX maximální hodnota

V následující tabulce jsou zobrazeny výsledky, jak polymorfismus $UASMS2$ v genu leptin ovlivňuje sledované znaky kvality masa.

Tabulka 18: Vliv genotypu $UASMS2$ na sledované znaky

Znak	Genotyp polymorfismu $UASMS2$ genu LEP			Průkaznost		
	CC ($n = 111$)	CT ($n = 57$)	TT ($n = 2$)	$CC - CT$	$CC - TT$	$CT - TT$
	$LSM \pm SE$	$LSM \pm SE$	$LSM \pm SE$			
Sušina (%)	25,49±0,15	25,24±0,19	25,83±0,83	0,2155	0,6816	0,4845
IMT (%)	2,10±0,16	1,99±0,19	1,57±0,83	0,5841	0,5337	0,6186
N-látky (%)	3,40±0,013	3,40±0,017	3,46±0,08	0,9558	0,4576	0,4673
Popeloviny (%)	1,088±0,004	1,090±0,005	1,117±0,025	0,7891	0,26	0,2879
Vaznost (%)	81,19±0,45	80,05±0,53	80,09±2,22	0,0525	0,6254	0,986
Barva (%)	4,053±0,084	4,05±0,10	4,33±0,45	0,9832	0,5419	0,5371
pH (%)	5,62±0,03	5,58±0,037	5,49±0,16	0,4175	0,4377	0,5639
Remise (%)	4,18±0,20	4,22±0,24	4,49±0,90	0,8446	0,7279	0,7627

Pozn.: IMT – intramuskulární tuk

kde:

- N počet kusů
- $LSM \pm SE$ metoda nejmenších čtverců ± standartní chyba (Least squares means ± standard error)

Při statistickém porovnání vlivu genotypu na intramuskulární tuk, byla zjištěna hodnota p mezi genotypy $CC - CT$: $p = 0{,}5841$, mezi genotypy $CC - TT$: $p = 0{,}5337$ a mezi genotypy $CT - TT$: $p = 0{,}6186$. Z těchto výsledků vyplývá, že nelze na studované populaci statisticky prokázat vysokou průkaznost nebo průkaznost vlivu genotypu $UASMS2$ v genu leptin na ukládání intramuskulárního tuku a mramorování.

Metodou nejmenších čtverců byly vypočteny hodnoty $LSM \pm SE$ pro genotyp CC: $2{,}10 \pm 0{,}16$, pro genotyp CT: $1{,}99 \pm 0{,}19$ a pro genotyp TT: $1{,}57 \pm 0{,}83$. Tyto výsledky by upřesnily vliv genotypu $UASMS2$ na ukládání intramuskulárního tuku, pokud by byla prokázána statistická průkaznost.

7 DISKUZE

Gen leptin je u skotu umístěn na 4. chromozomu (Trakovická *et al.,* 2013), je velký $16\,735\ bp$, kóduje 167 aminokyselin (Taniguchi *et al.,* 2002). Skládá se ze 3 exonů a 2 intronů (Trakovická *et al.,* 2013). Kromě polymorfismu $UASMS2$ se v promotorové části nachází polymorfismy $UASMS1$ a $UASMS3$ (Nkrumah *et al.,* 2005). Schenkel (Schenkel *et al.,* 2005) mimo výše zmíněné popsal dále v exonu 2 v genu leptin dva polymorfismy: $E2FB$ a $E2JW$. Těmito polymorfismy se zabýval i Buchanan (Buchanan *et al.,* 2002). Dalšími polymorfismy v bovinním genu leptin se zabýval Liefers. V promotorové části zkoumal polymorfismy $A1457G$ a $C963T$ (Liefers *et al.,* 2005), v exonu 2 polymorfismus $T945M$ (Liefers *et al.,* 2003) a v exonu 3 polymorfismus $A59V$ (Liefers *et al.,* 2004). S exonem 2 dále pracoval Lagonigro (Lagonigro *et al.,* 2003), který popsal polymorfismus $A252T$. Analýzou smíšeného modelu bylo zjištěno, že s počátkem kosterního růstu jsou spojeny polymorfismy $A1457G$; který ovlivňuje výšku, polymorfismus $A59V$, který ovlivňuje délku. Polymorfismy $UASMS1$; $UASMS2$; $A1457G$; $A59V$ ovlivňují plodnost a polymorfismus $A59V$ ovlivňuje mléčnou produkci (Clempson *et al.,* 2011).

Účelem studie bylo prokázat průkaznou asociaci mezi genotypy v polymorfismu $UASMS2$ v promotorové části genu leptin na ukládání intramuskulárního tuku a mramorování u plemene Český strakatý skot.

Při výpočtu frekvencí genotypů a alel byla studována populace 174 býků Českého strakatého skotu. V této populaci se nejčastěji vyskytoval homozygot s genotypem CC s celkovým počtem 113 jedinců. Dále byl zastoupen heterozygot CT s četností 59 jedinců a homozygot TT s četností pouze 2 jedinci. Relativní frekvence genotypů byla stanovena pro genotyp CC: $64{,}9\ \%$, pro genotyp CT: $33{,}9\ \%$ a pro genotyp TT: $1{,}2\ \%$. Relativní frekvence alely C ve sledované populaci byla zastoupena s četností $81{,}9\ \%$ a alela T s četností $18{,}1\ \%$.

Giblin (Giblin *et al.,* 2010) kvantifikovala vztah mezi 10 novými a známými SNP v genech kódujících leptin a leptinové receptory s výkonnostními rysy. Pozorovaná populace obsahovala 848 plemeníků holštýnského plemene. Jedním z pozorovaných SNP byl i polymorfismus $UASMS2$. Dílčím výstupem práce byla genotypová frekvence. Giblin (Giblin *et al.,* 2010) uvádí, že genotyp CC se v populaci vyskytuje $77\ \%$, CT: $24\ \%$ a TT: $1\ \%$.

Gill (Gill *et al.,* 2009) ve své práci pracovala s populací 443 kusů skotu. U této populace došla k výsledkům četnosti genotypů CC: $38\ \%$, CT: $50\ \%$ a TT: $12\ \%$. Frekvence alely C

byla vypočítána na $63\ \%$ a frekvence alely T na $37\ \%$. Ve své práci dále publikovala, že nebylo možné úspěšně zjistit genotyp u všech zvířat. Zejména u polymorfismu $UASMS1$ nebylo možné zjistit 17 genotypů.

Schenkel (Schenkel *et al.,* 2005) ve své práci pracoval s populací složenou z plemen Abrdeen angus, Limousin, Charolais, Simmental a jiných plemen. U plemene Aberdeen angus, s velikostí populace 43 kusů, stanovil frekvenci alely C: $73{,}3\ \%$ a alely T: $26{,}7\ \%$. U plemene Limousin, s velikostí populace 30 kusů, stanovil frekvenci alely C: $65{,}5\ \%$ a alely T: $34{,}5\ \%$. U plemene Charolais, s velikostí populace 11 kusů, stanovil frekvenci alely C: $77{,}3\ \%$ a alely T: $22{,}7\ \%$. U plemene Simmental, s velikostí populace 68 kusů, stanovil frekvenci alely C: $69{,}8\ \%$ a alely T: $30{,}2\ \%$. U ostatních plemen, s velikostí populace 959 kusů, stanovil frekvenci alely C: $74{,}4\ \%$ a alely T: $25{,}6\ \%$. Pro všech 1 111 kusů tedy vyplývá průměrná frekvence alely C: $73{,}8\ \%$ a alely T: $26{,}1\ \%$ (Schenkel *et al.,* 2005).

Relativní genotypové frekvence zjištěné v předkládané práci je možné srovnat s výsledky práce Giblin (Giblin *et al.,* 2010). Relativní fenotypovou frekvenci lze srovnat s výsledky práce Schenkel (Schenkel *et al.,* 2005) pro plemeno Charolais.

V předkládané práci se v populaci Českého strakatého skotu vyskytovali pouze 3 jedinci s genotypem TT. Absolutní frekvence pro genotyp TT byla stanovena na $1{,}2\ \%$. Clampson (Clempson *et al.,* 2011) pro tento genotyp uvádí, že je četnost výskytu v populaci pouze $2\ \%$. Tento genotyp je v populaci vzácný, což odpovídá i zjištění této práce.

Asociační analýza byla provedena na populaci 170 kusů, 4 jedinci byli ze statistiky vyloučeni, protože se ve dvou chovech vyskytovali pouze 2 jedinci. Tito jedinci negativně ovlivňovali analýzu. Vliv genotypů $UASMS2$ v genu leptin, na ukládání intramuskulárního tuku a mramorování, byl vyhodnocen v programu SAS 8.2. Statisticky vysoká průkaznost by byla ověřena, pokud by hodnota $p < 0{,}01$, průkaznost by byla ověřena, pokud by hodnota $p < 0{,}05$. Při statistickém porovnání vlivu genotypu na intramuskulární tuk, byla zjištěna hodnota p mezi genotypy $CC - CT$: $p = 0{,}5841$, mezi genotypy $CC - TT$: $p = 0{,}5337$ a mezi genotypy $CT - TT$: $p = 0{,}6186$. Z těchto výsledků vyplývá, že nelze na studované populaci statisticky prokázat vysokou průkaznost nebo průkaznost vlivu genotypu $UASMS2$ v genu leptin na ukládání intramuskulárního tuku a mramorování.

Metodou nejmenších čtverců byly vypočteny hodnoty $LSM \pm SE$ pro genotyp CC: $2{,}10 \pm 0{,}16$, pro genotyp CT: $1{,}99 \pm 0{,}19$ a pro genotyp TT: $1{,}57 \pm 0{,}83$. Z těchto vý-

sledků, pokud by se kladně projevila statistická průkaznost mezi genotypy na ukládání intramuskulárního tuku, by bylo vyvozeno, že alela C zvyšuje ukládání intramuskulárního tuku. To ovšem nelze říct, neboť nebyla zjištěna žádná statistická průkaznost.

Oproti zjištěným výsledkům v této práci Geary (Geary *et al.,* 2003) prokázal, že hladina leptinového séra je významně spojena s vlastnostmi jako je mramorování, výška hřbetního tuku, ledvinového tuku, pánevního tuku a srdečního tuku. Spojitost mezi hladinou leptinového séra a polymorfismem $UASMS2$ potvrdil ve své práci Nkrumah (Nkrumah *et al.,* 2005), kde také prokázal, že alela T je významně spojena s koncentrací leptinového séra. Pro koncentraci leptinového séra uvádí, že vyšší byla u zvířat s genotypem TT oproti zvířatům s genotypem CC, zvířata s genotypem CT měla také vyšší koncentraci leptinového séra než jedinci s genotypem CC. Dále také prokázal, že v průběhu testovacího období měla zvířata s genotypem TT vyšší metabolickou středovou hodnotu než zvířata s genotypem CC. Průměrný denní přírůstek byl vyšší u zvířat s genotypem TT a CT než s genotypem CC.

Nkrumah (Nkrumah *et al.,* 2005) studoval polymorfismus $UASMS2$ u skupin zvířat převážně složených z plemen Angus, Charolais, Galloway, Hereford, Holštýnský skot, Brown Swiss a Simmental. Ve svém článku prokázal, že alela T je spojena s výškou hřbetního tuku - zvířata s alelou T v polymorfismu $UASMS2$, měla vyšší hřbetní tuk než zvířata s alelou C. Zároveň Nkumah (Nkumah *et al.,* 2005) uvádí, že alela T je spojena s vyšším mramorovacím skóre ve srovnání s alelou C. Výrazné zvýšení tělesné hmotnosti u zvířat s alelou T je spojeno s mírným poklesem libového sama, i když tyto rozdíly nebyly statisticky významné. Konverze krmiva se u jednotlivých skupin genotypů nelišila.

Gill (Gill *et al.,* 2009) dále zjistila, že zvířata s genotypem CC měla podstatně méně tuku okolo panenky ve srovnání se zvířaty s genotypem CT a TT. To potvrzuje zjištění Nkrumaha (Nkrumaha *et al.,* 2005), že genotyp TT je významně spojen s výškou hřbetního tuku a mramorovacím skóre. Zvířata s genotypem TT měla pro oba tyto znaky vyšší hodnoty. Zároveň Gill (Gill *et al.,* 2009) zjistila, že zvířata s genotypem TT mají podstatně vyšší celkové skóre chuti než zvířata s genotypem CC nebo CT.

Gill (Gill *et al.,* 2009), Schenkel (Schenkel *et al.,* 2005) a i Nkumah (Nkumah *et al.,* 2005) potvrdili asociaci polymorfismu $UASMS2$ ve spojitosti s mramorovacím skóre a živé porážkové hmotnosti. Na druhou stranu se v práci Clempsona (Clempson *et al.,* 2011) tyto asociace nepodařilo potvrdit stejně jako to nepotvrzují předkládané výsledky této práce.

Clempson (Clempson *et al.,* 2011) ve své studii zkoumal vliv polymorfismu $UASMS2$ ve vztahu k reprodukci a zabřezávání jalovic. Zjistil, že jalovice s genotypem TT mají horší plodnost než jalovice s genotypy CC a CT. Zároveň prokázal, že zvířata s genotypem TT potřebují k zabřeznutí více péče než heterozygoti CT. Pouze 11 krav z celkového počtu 205 kusů se otelilo. Zvířata s genotypem TT v polymorfismu $UASMS1$ měla vyšší plodnost než homozygoti TT v polymorfismu $UASMS2$. Clempson (Clempson *et al.,* 2011) dále prokázal, že je slabá asociace mezi $UASMS2$ a začátkem luteální aktivity.

Jak bylo výše zmíněno, obsah intramuskulárního tuku u skotu je polygenní vlastnost. Proto se průkaznost nemusela projevit při asociační analýze, neboť může být ovlivněna více geny či polymorfismy a polymorfismus $UASMS2$ má samostatně jen malý vliv. Výsledky této práce mohou být též ovlivněny typem chovu, prostředím či krmnými dávkami. Tyto aspekty chovu vybraných jedinců nebyly zahrnuty ve vstupních datech, a proto nemohly být zohledněny v asociační analýze. Ale je známo, že okolní prostředí má vliv na fenotyp. Dalším faktorem, který mohl ovlivnit výsledky, může být i plemenná příslušnost. V této studii se jednalo o plemeno Český strakatý skot. V jiných srovnávaných studiích se pracovalo s populacemi jiných plemen, proto výsledky mohou být odlišné.

Na tuto práci lze navázat studií, která by zkoumala společné působení více kandidátních genů a polymorfismů ovlivňujících kvalitu masa IMT a mramorování u skotu.

8 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zvládnutí techniky a provedení asociační analýzy polymorfismu $UASMS2$ v genu leptin s parametry kvality hovězího masa a ukládání intramuskulárního tuku.

Dalším cílem práce bylo určení sekvence genotypu polymorfismu $UASMS2$ a provedení statistického zhodnocení mezi zjištěným genotypem a ukazateli kvality masa. Statistické vyhodnocení bylo provedeno za pomocí softwaru SAS.

Byla provedena rešerše literatury s ohledem na vybrané geny s vlivem na intramuskulární tuk a mramorování u skotu. Z literatury vyplývá, že vliv na ukládání intramuskulárního tuku mají geny $DGAT1$, TG, SCD, $FABP\ 4$ a LEP. Z vybraných zdrojů nebyl zjištěn vliv jiných genů. Tato práce byla zaměřena převážně na vliv genu leptin a polymorfismu $UASMS2$ na mramorování. Gen $DGAT$ zvyšuje mléčnou produkci a obsah tuku v mléce. Gen TG napomáhá růstu a diferenciaci tukových buněk. Potlačení aktivity genu SCD vede k akumulaci kyseliny stearové v hovězí tukové tkáni, což způsobuje zvýšení tvrdosti tuku. Gen $FABP\ 4$ reguluje homeostázi lipidů a glukózy.

Gen leptin reguluje příjem krmiva, výdej energie, plodnost, rozmnožování a reprodukci, produkci mléka, imunitní funkce, konverzi krmiva a energetickou rovnováhu. Hladina leptinového sera ovlivňuje vlastnost masa jako například mramorování, výšku hřbetního tuku, ledvinového tuku, pánevního tuku a srdečního tuku. V genu leptin bylo popsáno 5 SNP. V exonu 2 byly popsány 2 SNP ($E2FB$, $E2JW$), v exonu 3 byl popsán 1 SNP ($A59V$) a v promotoru byly popsány 3 SNP ($UASMS1$, $UASMS2$ a $UASMS3$). Vliv na ukládání intramuskulárního tuku byl zjištěn u polymorfismu $UASMS2$.

Na populaci 170 býků byla provedena asociační analýza. Ve sledované populaci se vyskytovali býci plemene Český strakatý skot. Cílem asociační analýzy bylo potvrzení nebo vyvrácení asociace mezi polymorfismem $UASMS2$ a mramorováním u skotu.

Byl proveden výpočet frekvencí genotypů a alel v polymorfismu $UASMS2$. Ze získaných hodnot byl proveden test genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona a χ^2. Vypočítaná hodnota byla porovnána s tabulkovými hodnotami a bylo zjištěno, že hodnota je vyšší než 5. stupeň volnosti pro obě hodnoty ($0{,}01$ a $0{,}05$), což znamená, že je průkazný rozdíl mezi porovnanými a očekávanými četnosti, a proto byla nulová hypotéza zamítnuta. Znamená to, že populace pro daný lokus není v genetické rovnováze.

Tato práce dále zkoumala vliv polymorfismu $UASMS2$ na více znaků vztahovaných ke kvalitě hovězího masa. Zkoumanými znaky byly: sušina, IMT, N-látky, popeloviny, vaznost, barva, pH a remise. Výsledky asociační analýzy neukázali žádný průkazný či vysoce průkazný vliv polymorfismu $UASMS2$ v genu leptin na intramuskulární tuk. Tento výsledek se neshoduje s většinou odborných studií. Naopak se shoduje s výsledkem studie provedené Clampsonem (Clampson *et al.,* 2011), ve které také nebyl prokázán vliv polymorfismu $UASMS2$ a ukládání intramuskulárního tuku.

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ADEGOKE, G. O. a K. O. FALADE. Quality of meat. *Journal of Food: Agriculture and Environmen*. 2005, Vol 3, no. 1, s. 87-90. DOI: 10.1007/s11947-008-0126-2.

- AFOLAYAN, R. A., W. S. PITCHFORD, M. P. B. DELAND a W. A. MCKIERNAN. Breed variation and genetic parameters for growth and body development in diverse beef cattle genotypes. *Animal*. 2007, vol. 1, issue 01, s. 13-. DOI: 10.1017/S1751731107257933. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1751731107257933

- ALBERTÍ, P., G. RIPOLL, F. GOYACHE, F. LAHOZ, J. L. OLLETA, B. PANEA a C. SAÑUDO. Carcass characterisation of seven Spanish beef breeds slaughtered at two commercial weights. *Meat Science*. 2005, vol. 71, issue 3, s. 514-521. DOI: 10.1016/j.meatsci.2005.04.033. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174005001737

- ALBRECHT, E., F. TEUSCHER, K. ENDER a J. WEGNER. Growth- and breed-related changes of muscle bundle structure in cattle. *Journal of Animal Science*. 2006, vol. 84, issue 11, s. 2959-2964. DOI: 10.2527/jas.2006-345. Dostupné z: http://www.journalofanimalscience.org/content/84/5/1067

- ALBRECHT, E., J. WEGNER a K. ENDER. A New Technique for Objective Evaluation of Marbling in Beef. *Fleischwirtschaft*. 1996, roč. 76, č. 11, s. 1145-1148. Dostupné z: http://www.muskel-und-fett.de/pdf/A%20New%20Technique%20for%20Objective%20Evaluation%20of%20Marbling%20in%20Beef.pdf

- BARASH, I. A. Leptin is a metabolic signal to the reproductive system. *Endocrinology*. 1996, vol. 137, issue 7, s. 3144-3147. DOI: 10.1210/en.137.7.3144.

- BARENDSE, W. J. *Assessing lipid matabolism* [patent]. Australia. PCT/AU98/00882, WO 99/23248. Uděleno 14. 5. 1999. Zapsáno 23. 10. 1998. Dostupné z: https://www.lens.org/images/patent/AU/9616598/A1/19990722/AU_1998_096165_A.pdf

- BOBROVÁ, O. *Vyhodnocení asociací genetických marker s užitkovostí v komerční populace prasat*. Brno, 2003. Dostupné z: https://is.mendelu.cz/dok_server/slozka.pl?id=39926;download=44646. Doktorská Disertační práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. Vedoucí práce Josef Dvořák.

- BRACKEBUSCH, S. A., F. K. MCKEITH, T. R. CARR a D. G. MCLAREN. Relationship between longissimus composition and the composition of other major muscles of the beef carcass. *Journal of Animal Science*. 1991, č. 69, s. 631-640. Dostupné z: http://www.journalofanimalscience.org/content/69/2/631

- BUCHANAN, F. C., C. J. FITZSIMMONS, A. G. VAN KESSEL, T. D. THUE, D. C. WINKELMAN-SIM a S. M. SCHMUTZ. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*. 2002, vol. 34, issue 1, s. 105-116. DOI: 10.1051/gse:2001006. Dostupné z: http://www.edpsciences.org/10.1051/gse:2001006

- CAO, H. Structure-Function Analysis of Diacylglycerol Acyltransferase Sequences from 70 Organisms. *BMC Research Notes*. 2011, vol. 4, issue 1. DOI: 10.1186/1756-0500-4-249.

- CASES, S., S. J. STONE, P. ZHOU, E. YEN, B. TOW, K. D. LARDIZABAL, T. VOELKER a R. V. FARESE. Cloning of DGAT2, a Second Mammalian Diacylglycerol Acyltransferase, and Related Family Members. *Journal of Biological Chemistry*. 2001-10-19, vol. 276, issue 42, s. 38870-38876. DOI: 10.1074/jbc.M106219200. Dostupné z: http://www.jbc.org/cgi/doi/10.1074/jbc.M106219200

- CLEMPSON, A. M., G. E. POLLOTT, J. S. BRICKELL, N. E. BOURNE, N. MUNCE a D. C. WATHES. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*. 2011, vol. 94, issue 7, s. 3618-3628. DOI: 10.3168/jds.2010-3626. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030211003596

- COLLARD, B. C. Y., D. J. MACKILL, J. D. KELLY, P. N. MIKLAS, P. ARÚS, J. MORENO-GONZÁLEZ, Y. XU, Y. XU, R. JOHNSON, Y. XU, G. BEN-ARI a U. LAVI. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2008, vol. 363, issue 1491, s. 163-184. DOI: 10.1007/978-94-015-9211-6.

- DAMCOTT, C. M., S. P. MOFFETT, E. FEINGOLD, M. M. BARMADA, J. A. MARSHALL, R. F. HAMMAN a R. E. FERRELL. Genetic variation in fatty acid-binding protein-4 and peroxisome proliferator-activated receptor γ interactively influence insulin sensitivity and body composition in males. *Metabolism*. 2004, vol. 53, issue 3, s. 303-309. DOI: 10.1016/j.metabol.2003.10.010. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026049503005043

- DEKKERS, J. C. M. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. *Journal of Animal Science*. 2004, Vol. 82, no. 13_suppl, E313-E328. DOI: /2004.8213_supplE313x. Dostupné z: http://www.psas-web.net/documents/ask_psas/Dekkers%20BLUP%20paper.pdf

- DVOŘÁK, J. a I. VRTKOVÁ. *Malá genetika prasat II*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Ústav genetiky, 2001, 91 s. ISBN 80-715-7521-6.

- FOLLEY, S. J. a F. H. MALPRESS. Chapter XV: Hormonal control on mammary growth. IN PINCUS, Gregory. *The hormones. physiology, chemistry and applications*. New York: Academic Press, 1948, 695 – 743. ISBN 9780123957122.

- GÁBOR, M., A. TRAKOVICKÁ a M. MILUCHOVÁ. Polymorphism of stearoyl-coenzyme a desaturase gene in Slovak Pinzgau cattle. *Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii: Lucrari stiintifice Zootehnie si Biotehnologii*. 2009, roč. 42, č. 2, s. 249-254.

- GEARY, T. W., E. L. MCFADIN, M. D. MACNEIL, E. E. GRINGS, R. E. SHORT, R. N. FUNSTON a D. H. KEISLER. Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. Journal of Animal Science. 2003, č. 81, s. 1-8. Dostupné z: http://www.journalofanimalscience.org/content/81/1/1

- GIBLIN, L., S. T. BUTLER, B. M. KEARNEY, S. M. WATERS, M. J. CALLANAN a D. P. BERRY. Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires. *BMC Genetics*. 2010, vol. 11, issue 1. DOI: 10.1186/1471-2156-11-73.

- GILL, J. L., S. C. BISHOP, C. MCCORQUODALE, J. L. WILLIAMS a P. WIENER. Association of selected SNP with carcass and taste panel assessed meat quality traits in a commercial population of Aberdeen Angus-sired beef cattle. *Genetics Selection Evolution*. 2009, vol. 41, issue 1, s. 36-. DOI: 10.1186/1297-9686-41-36. Dostupné z: http://www.gsejournal.org/content/41/1/36

- GLAUM, S. R., M. HARA, V. P. BINDOKAS, C. C. LEE, K. S. POLONSKY, G. I. BELL a R. J. MILLER. Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmision in the hypothalamus. Molecular Pharmacology. *Molecular Pharmacology*. 1996, Vol. 50, no. 2, 230 - 235. Dostupné z: http://molpharm.aspetjournals.org/content/50/2/230.full.pdf

- GRISART, B. a M. NORDBORG. Positional Candidate Cloning of a QTL in Dairy Cattle: Identification of a Missense Mutation in the Bovine DGAT1 Gene with Major Effect on Milk Yield and Composition.*Genome Research*. 2002, vol. 12, issue 2, s. 222-231. DOI: 10.3410/f.1008034.101306.

- GURA, T. Molecular Biology: Obesity Sheds Its Secrets. *Science*. 1997, vol. 275, issue 5301, s. 751-753. DOI: 10.1126/science.275.5301.751.

- HALE, D. S., K. GOODSON aj. W. SAVELL. USDA Beef Quality and Yield Grades. DEPARTMENT OF ANIMAL SCIENCE TEXAS A&M AGRILIFE EXTENSION SERVICE COLLEGE STATION, TX 77843-2471. *Texas A&M University: Department of Animal Science* [online]. March 8, 2013. 2013 [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: http://meat.tamu.edu/beefgrading/

- HARPER, G. S. a D. PETHICK. The physiology of marbling: what is it, and why does it develop?. In: JONES, N. *Marbling Symposium 2001: All you need to know about marbling*. Armindale, NSW, Australia: The Cooperative Research Centre for Cattle and Beef Quality, 2001, s. 36-45.

- HOCQUETTE, J. F., F. GONDRET, E. BAÉZA, F. MÉDALE, C. JURIE a D. W. PETHICK. Intramuscular fat content in meat-producing animals: development, genetic and nutritional control, and identification of putative markers. *Animal*. 2010, vol. 4, issue 02, s. 303-. DOI: 10.1017/S1751731109991091. Dostupné z: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S1751731109991091

- HOU, G., Z. YUAN, H. ZHOU, L. ZHANG, J. LI, X. GAO, D. WANG, H. GAO a S. XU. Association of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle. *Molecular Biology Reports*. 2011, vol. 38, issue 7, s. 4705-4708. DOI: 10.1007/s11033-010-0605-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s11033-010-0605-1

- HOUSEKNECHT, K. L., C. A. BAILE, R. L. MATTERI a M. E. SPURLOCK. The Biology of Leptin: a review. *Journal of Animal Science*. 1998, č. 76, 1405 – 1420. DOI: /1998.7651405x. Dostupné z: https://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/pdfs/76/5/1405

- CHUNG, E. R., S. C. SHIN, K. H. SHIN a K. Y. CHUNG. SNP Discovery in the Leptin Promoter Gene and Association with Meat Quality and Carcass Traits in Korean Cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2008, vol. 21, issue 12, s. 1689-1695. DOI: 10.5713/ajas.2008.80112.

- INGALLS, A. M., M. M. DICKIE a G. D. SNELL. Obese, a new mutation in the house mouse. *Obesity Research*. 1996, vol. 4, issue 1, s. 101-101. DOI: 10.1002/j.1550-8528.1996.tb00519.x.

- JAMMES, H. a DJIANE. Le récepteur de la GH peut-il constituer un marquer de la variabilité des capacités de croissance entre types génétiques?: Etude chez leb ovin e tle lapin. *INRA Productions Animales*. 1996, roč. 9, č. 3, s. 228-231. Dostupné z: http://www6.inra.fr/productions-animales/content/download/4758/45385/version/2/file/Prod_Anim_1996_9_3_12.pdf

- JEŽKOVÁ, A. Využít genomiku v chovu dojnic. In: *Náš chov* [online]. Profi Press s. r. o., 6. 5. 2011 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: http://naschov.cz/vyuzit-genomiku-v-chovu-dojnic/

- KAIKAUS, R. M., N. M. BASS, R. K. OCKNER, Judith STORCH a Robert K. OCKNER. Functions of fatty acid binding proteins: studies with fluorescent ligands. *Experientia*. 1990, vol. 46, issue 6, s. 3-9. DOI: 10.1007/978-1-4615-3936-0_1.

- KAYGISIZ, A, C. BENGI a S. CILEK. Investigation of leptin gene polymorphisms in east Anatolian red Anatolian and Black Cattle and Determination of genetic distance from Brown Swiss cattle. The Journal of Animal & Plant Sciences. 2011, roč. 21, č. 2, s. 121-125.

- KULIG, H. a M. KMIEĆ. Association between leptin gene polymorphisms and growth traits in Limousin cattle. *Russian Journal of Genetics*. 2009, vol. 45, issue 6, s. 738-741. DOI: 10.1134/S1022795409060131. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1134/S1022795409060131

- LAGONIGRO, R., P. WIENER, F. PILLA, J. A. WOOLLIAMS a J. L. WILLIAMS. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Animal Genetics*. 2003, vol. 34, issue 5, s. 371-374. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.01028.x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-2052.2003.01028.x

- LIEFERS, S. C., M. F. W. TE PAS, R. F. VEERKAMP, Y. CHILLIARD, C. DELAVAUD, R. GERRITSEN a T. VAN DER LENDE. Association of leptin gene polymorphisms with serum leptin concentration in dairy cows. *Mammalian Genome*. 2003, vol. 14, issue 9, s. 657-663. DOI: 10.1007/s00335-003-2275-y. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00335-003-2275-y

- LIEFERS, S. C., R. F. VEERKAMP, M. F. W. TE PAS, C. DELAVAUD, Y. CHILLIARD a T. LENDE. A missense mutation in the bovine leptin receptor gene is associated with leptin concentrations during late pregnancy. *Animal Genetics*. 2004, vol. 35, issue 2, s. 138-141. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2004.01115.x.

- LIEFERS, S. C., R. F. VEERKAMP, M. F. W. TE PAS, Y. CHILLIARD a T. VAN DER LENDE. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows.*Domestic Animal Endocrinology*. 2005, vol. 29, issue 1, s. 227-238. DOI: 10.1016/j.domaniend.2005.02.009. Dostupné z:http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0739724005000196

- MARKOVÁ, M. Selekce na úrovni DNA: Co si vlastně představit pod pojmem genomová selekce?. *Chov skotu*. 2009, roč. 2009, únor 2009, s. 3. Dostupné z:http://www.crvcz.cz/Portals/0/Files/Nabidka/genomova_selekce_02_2009.pdf

- MICHAL, J. J., Z. W. ZHANG, C. T. GASKINS a Z. JIANG. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. *Animal Genetics*. 2006, vol. 37, issue 4, s. 400-402. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2006.01464.x. Dostupné z: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2052.2006.01464.x

- NKRUMAH, J. D., C. LI, J. B. BASARAB, S. GUERCIO, Y. MENG, B. MURDOCH, C. HANSEN a S. S. MOORE. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. *Canadian Journal of Animal Science*. 2004, vol. 84, issue 2, s. 211-219. DOI: 10.4141/a03-033.

- NKRUMAH, J. D., C. LI, J. YU, C. HANSEN, D. H. KEISLER a S.S. MOORE. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *Journal of Animal Science*. 2005, Vol. 83, no. 1, s. 20-28. DOI: /2005.83120x. Dostupné z: http://dx.doi.org//2005.83120x

- NTAMBI, J. M. Chapter 3: stearoyl-CoA Desaturase-1 is a Biological regulator of Energy Homeostasis. IN JAMES M. NTAMBI, James M.editor. *Stearoyl-CoA Desaturase Genes in Lipid Metabolism*. New York, NY: Springer New York, 2013, 27 - 36. ISBN 146147969x.

- OH, D., M. JIN, Y. LEE, J. HA, B. KIM, J. YEO aj. LEE. Identification of Stearoyl-CoA Desaturase (SCD) Gene Interactions in Korean Native Cattle Based on the Multifactor-dimensionality Reduction Method. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 2013, vol. 26, issue 9, s. 1218-1228. DOI: 10.5713/ajas.2013.13058.

- OLIVER, A., J. A. MENDIZABAL, G. RIPOLL, P. ALBERTÍ a A. PURROY. Predicting meat yields and commercial meat cuts from carcasses of young bulls of Spanish breeds by the SEUROP method and an image analysis system. *Meat Science*. 2010, vol. 84, issue 4, s. 628-633. DOI: 10.1016/j.meatsci.2009.10.022. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174009003428

- PANNIER, L., T. SWEENEY, R. M. HAMILL, F. IPEK, P. C. STAPLETON a A.M. MULLEN. Lack of an association between single nucleotide polymorphisms in the bovine leptin gene and intramuscular fat in Bos taurus cattle. *Meat Science*. 2009, vol. 81, issue 4, s. 731-737. DOI: 10.1016/j.meatsci.2008.11.014. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0309174008003811

- PETHICK, D. W., G. S. HARPER a V. H. ODDY. Growth, development and nutritional manipulation of marbling in cattle: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 2004, vol. 44, issue 7. DOI: 10.1071/ea02165.

- RIPOLI, M. V., P. CORVA a G. GIOVAMBATTISTA. Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. *Research in Veterinary Science*. 2006, vol. 80, issue 3, s. 287-290. DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.07.006. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0034528805001530

- RIPOLI, M. V., A. ROGBERG-MUÑOZ, J. P. LIRON a G. GIOVAMBATTISTA. Development of typing methods based on pyrosequencing technology fot the analysis of six bovine genes related to marbling.*Journal of Basic & Applied Genetics*. 2013, Vol. 24, Issue 2, s. 46-54. Dostupné z: http://www.scielo.org.ar/pdf/bag/v24n2/v24n2a05.pdf

- SHERMAN, E. L., J. D. NKRUMAH, B. M. MURDOCH, C. LI, Z. WANG, A. FU a S. S. MOORE. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. *Journal of Animal Science*. 2007-09-18, vol. 86, issue 1, s. 1-16. DOI: 10.2527/jas.2006-799. Dostupné z:http://www.journalofanimalscience.org/cgi/doi/10.2527/jas.2006-799

- SHOCKEY, J. M., S. K. GIDDA, D. C. CHAPITAL, J. C. KUAN, P. K. DHANOA, J. M. BLAND, S. J. ROTHSTEIN, R. T. MULLER a J. M. DYER. Tung Tree DGAT1 and DGAT2 Have Nonredundant Functions in Triacylglycerol Biosynthesis and Are Localized to Different Subdomains of the Endoplasmic Reticulum. *The Plant Cell*. 2006, vol. 18, issue 9, s. 2294-2313. DOI: 10.1105/tpc.106.043695.

- SCHENKEL, F. S., S. P. MILLER, X. YE, S. S. MOORE, J. D. NKRUMAH, C. LI, J. YU, I. B. MANDELL, J. W. WILTON a J. L. WILLIAMS. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *Journal of Animal Science*. 2005, roč. 83, č. 9, s. 2009-2020. DOI: /2005.8392009x. Dostupné z: http://dx.doi.org//2005.8392009x

- SMITH, S. B., A. YANG, T. W. LARSEN a R. K. TUME. Positional analysis of triacylglycerols from bovine adipose tissue lipids varying in degree of unsaturation. *Lipids*. 1998, vol. 33, issue 2, s. 197-207. DOI: 10.1007/s11745-998-0196-8.

- SMITH, S. J., S. CASES, D. R. JENSEN, H. C. CHEN, E. SANDE, B. TOW, D. A. SANAN, J. RABER, R. H. ECKEL a R. V. FARESE. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nature Genetics*. 2000, vol. 25, issue 1, s. 87-90. DOI: 10.1038/75651.

- SORENSEN, B., C. KÜHN, F. TEUSCHER, F. SCHNEIDER, R. WESELAKE aj. WEGNER. Diacylglycerol acyltransferase (DGAT) activity in relation to muscle fat content and DGAT1 genotype in two different breeds of Bos Taurus. *Archiv Fur Tierzucht: Archives of Animal Breeding*. 2006, Vol. 49, no. 4, s. 351-356. Dostupné z: http://muskel-und-fett.de/pdf/Diacylglycerol%20acyltransferase%20(DGAT)%20activity%20in%20relation%20to%20to.pdf

- TANIGUCHI, M., T. UTSUGI, K. OYAMA, H. MANNEN, M. KOBAYASHI, Y. TANABE, A. OGINO a S. TSUJI. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*. 2004-2-1, vol. 15, issue 2, s. 142-148. DOI: 10.1007/s00335-003-2286-8. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s00335-003-2286-8

- TANIGUCHI, Y., T. ITOH, T. YAMADA a Y. SASAKI. Genomic Structure and Promoter Analysis of the Bovine Leptin Gene. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*. 2002, vol. 53, issue 2, s. 131-135. DOI: 10.1080/15216540211465.

- TESSANNE, K. *Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle*. 1999. Dostupné z: http://hdl.handle.net/1811/55815. Honors Research Project. The Ohio State University. College of Food, Agricultural, and Environmental Sciences. Vedoucí práce H. C. Hines & M. E. Davis.

- THALLER, G., C. KUHN, A. WINTER, G. EWALD, O. BELLMANN, J. WEGNER, H. ZUHLKE a R. FRIES. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle.Animal Genetics. 2003, vol. 34, issue 5, s. 354-357. DOI: 10.1046/j.1365-2052.2003.01011.x.

- TRAKOVICKÁ, A., N. MORAVČÍKOVÁ a R. KASARDA. Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle. *Acta biochimica Polonica*. 2013. Warszawa: Polish Academy of Sciences, Committee of Biochemistry, roč. 60, č. 4, s. 783-787.

- URBAN, T. Genetika populací: organizace genetické variability - Hardy - Weinbergův princip. In: URBAN, Tomáš. *Virtuální svět genetiky 3: Genetika populací a kvantitativních znaků* [online]. Brno: AF MENDELU, 2008, 3. 2. 2015 [cit. 2015-04-25]. Dostupné z: http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/pop/popul4b.html

- VESELÁ, Z., L. VOSTRÝ a P. ŠAFUS. Linear and linear-threshold model for genetic parameters for SEUROP carcass traits in Czech beef cattle. *Czech Journal of Animal Science*. 2011, roč. 59, č. 9, s. 414-425.

- WANG, Y. H., N. I. BOWER, A. REVERTER, S. H. TAN, N. DE JAGER, R. WANG, S. M. MCWILLIAM, L. M. CAFE, P. L. GREENWOOD a S. A. LEHNERT. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. *Journal of Animal Science*. 2008-09-12, vol. 87, issue 1, s. 119-130. DOI: 10.2527/jas.2008-1082. Dostupné z: http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/abstracts/87/1/119

- WARNER, R. D., P. L. GREENWOOD, D. W. PETHICK, D. M. FERGUSON a John L. WILLIAMS. Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science*. 2010, vol. 86, issue 1, s. 21-60. DOI: 10.1007/978-0-387-79382-5_2.

- WHEELER, T. L., G. W. DAVIS, B. J. STOECKER a C. J. HARMON. Cholesterol Concentration of Longissimus Muscle, Subcutaneous Fat and Serum of Two Beef Cattle Breed Types. *Journal of Animal Science*. 1987, Vol. 65, no. 6, s. 1531-1537. DOI: 10.2134/jas1987.6561531x. Dostupné z: https://dl.sciencesocieties.org/publications/jas/abstracts/65/6/JAN0650061531

- WINTER, A., A. ALZINGER a R. FRIES. Assessment of the gene content of the chromosomal regions flanking bovine DGAT1. *Genomics*. 2004, vol. 83, issue 1, s. 172-180. DOI: 10.1016/S0888-7543(03)00238-6. Dostupné z: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0888754303002386

- WINTER, A., W. KRAMER, F. A. O. WERNER, S. KOLLERS, S. KATA, G. DURSTEWITZ, J. BUITKAMP, J. E. WOMACK, G. THALLER a R. FRIES. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, vol. 99, issue 14, s. 9300-9305. DOI: 10.1073/pnas.142293799.

- YUAN, Z., J. LI, J. LI, X. GAO, H. GAO a S. XU. Effects of DGAT1 gene on meat and carcass fatness quality in Chinese commercial cattle. *Molecular Biology Reports*. 2013, vol. 40, issue 2, s. 1947-1954. DOI: 10.1007/s11033-012-2251-2. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/s11033-012-2251-2

- ZAHRÁDKOVÁ, R. *Masný skot: od A do Z*. 1. vydání - dotisk. Praha: Český svaz chovatelů masného skotu, 2009, 397 s. ISBN 978-80-254-4229-6.

9.1 Internetové zdroje a databáze genů:

- Ensembl: Gene: DGAT1 [online]. March 2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?g=ENSBTAG00000026356;r=14:1795351-1804562;t=ENSBTAT00000037423

- Ensembl: Gene: TG [online]. March 2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?g=ENSBTAG00000007823;r=14:7658632-7894999;t=ENSBTAT00000010295

- *Ensembl: Gene: SCD* [online]. March 2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?db=core;g=ENSBTAG00000047957;r=26:21132751-21133969;t=ENSBTAT00000064053

- Ensembl: Gene: FABP 4 [online]. March 2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?g=ENSBTAG00000037526;r=14:46833665-46838053;t=ENSBTAT00000000079

- *Ensembl: Gene: LEP* [online]. March 2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Gene/Summary?g=ENSBTAG00000014911;r=4:93249874-93266624;t=ENSBTAT00000019853

- GenBank. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GenBank: Gene ID: 282609 [online]. 19-Apr-2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/282609

- GenBank. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GenBank: Gene ID: 280706 [online]. 18-Apr-2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280706

- GenBank. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *GenBank: Gene ID: 280924* [online]. 18-Apr-2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280924

- GenBank. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GenBank: Gene ID: 281759 [online]. 18-Apr-2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281759

- GenBank. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. *GenBank: Gene ID: 280836* [online]. 18-Apr-2015. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280836

- Kobe Beef. KOBE BEEF MARKETING & DISTRIBUTION PROMOTION ASSOCIATION. [online]. 2005 [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: http://www.kobe-niku.jp/en/contents/about/definition.html

- Making the Grade. JONES' BLACK GOLD FARMS. Black Gold Farms [online]. 2005. [cit. 2015-03-30]. Dostupné z: http://www.blackgoldfarms.com.au/grading.html

- Wagyu International: Wagyu around the World - Japan. BENNET, S. WAGYU INTERNATIONAL. *Wagyu International* [online]. 2013 [cit. 2015-04-29]. Dostupné z: http://www.wagyuinternational.com/global_Japan.php

10 SEZNAM ZKRATEK

• SAS		statistický program SAS
• PSE	pale, soft, and exudative	měkké, bledé a vodnaté maso
• DFD	dark, firm and dry	pevné, suché a tmavé maso
• JUT		Jatečně upravené tělo
• SEUROP		systém hodnocení kvality masa
• IMT		Intramuskulární tuk
• B.M.S.	Beef Marble Standard index	index mramorování u skotu
• QTL	Quantitative traid loci	detekce lokusů kvantitativních znaků
• MAS	Marker assisted selection	markery asistovaná selekce
• SNP	single nukleotide polymorphysmus	jednonukleotidové polymorfismy
• bp	base pair	párů bazí
• LD marker	linkage disequilibrium marker	markery nerovnovážné vazby
• LE marker	linkage equilibrium marker	markery rovnovážné vazby
• GAS	gene assisted selection	geny asistované selekce
• DGAT1		diacylglycerol O-acyltransferáza
• LEP		leptin
• TG		thyroglobulin
• SCD		stearol – CoA desaturáza
• FABP 4	Fatty acid binding protein 4	4. protein vázající mastné kyselny
• GH	growth hormone	růstový hormon
• GHR	growth hormone receptor	receptor růstového hormonu
• UTR	untranslated region	nepřekládaná oblast
• MUFAs	monounsaturated fatty acids	mononasycené mastné kyseliny
• ORF	open reading frame	otevřený čtecí rámec
• PPARs	peroxisome proliferactived receptors	receptory peroxizómů aktivovaných proliferázou

11 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Standard mramorování u skotu v Japonsku dle % intramuskulárního tuku (IMT).....- 16 -

Obrázek 2: Systém hodnocení a) mramorování masa, b) hodnocení barvy masa a c) hodnocení barvy tuku.....- 18 -

Obrázek 3 Srovnání hodnocení kvality masa dle stupně výtěžnosti (A, B, C), stupně kvality masa (1, 2, 3, 4, 5) a indexu mramorování u skotu (B.M.S.) .....- 19 -

Obrázek 4: Lokace bovinního genu DGAT1 na chromozomu 14.....- 27 -

Obrázek 5: Struktura bovinního genu $DGAT1$.....- 27 -

Obrázek 6: Lokace bovinního genu TG na chormosomu 14 .....- 29 -

Obrázek 7: Struktura bovinního genu TG .....- 29 -

Obrázek 8: Chromatogramy SNP v 3´UTR oblasti bovinního genu TG .....- 30 -

Obrázek 9: Lokace bovinního genu SCD na chromozomu 26 .....- 32 -

Obrázek 10: Struktura bovinního genu SCD .....- 32 -

Obrázek 11: Lokace bovinního genu FABP 4 na chromozomu 14.....- 34 -

Obrázek 12: Lokace bovinního genu FABP 4 na chromosomu 14.....- 34 -

Obrázek 13: Lokace bovinního genu LEP na chromozomu 4.....- 36 -

Obrázek 14: Lokace bovinního genu LEP na chromosomu 4 .....- 36 -

Obrázek 15: Mapa SNP v promotorové části genu leptin u skotu na chromozomu .....- 38 -

Obrázek 16: Ověření amplifikovaného vzorku DNA, gen leptin. Fragmenty jsou naneseny na 3 % agarózovém gelu a vizualizovány pomocí barviva Ethydiumbromid .....- 49 -

Obrázek 17: Ukázka homozygota CC v polymorfismu $UASMS2$ v genu leptin při použití zpětného primeru.....- 50 -

Obrázek 18: Ukázka homozygota CT v polymorfismu $UASMS2$ v genu leptin při použité zpětného primeru.....- 50 -

Obrázek 19: Ukázka homozygota TT v polymorfismu UASMS2 v genu leptin při použité zpětného primeru.....- 51 -

12 SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Procentuální vyhodnocení jednotlivých stupňů výtěžnosti ..... - 17 -

Tabulka 2: Porovnání stupňů hodnocení kvality masa v Japonsku a v USA či Austrálii. - 17 -

Tabulka 3: Lokace bovinního genu $DGAT1$ na chromozomu 14 ..... - 26 -

Tabulka 4: Lokace bovinního genu TG na chromozomu 14 ..... - 28 -

Tabulka 5: Lokace bovinního genu SCD na chromozomu 26 ..... - 31 -

Tabulka 6: Lokace bovinního genu $FABP\ 4$ na chromozomu 14 ..... - 33 -

Tabulka 7: Lokace bovinního genu LEP na chromozomu 14 ..... - 35 -

Tabulka 8: Shrnutí názvů a lokací SNPs v genu leptin ..... - 38 -

Tabulka 9: Složení reakční směsi pro PCR reakci ..... - 41 -

Tabulka 10: Složení sekvenační směsi ..... - 42 -

Tabulka 11: Výpočet frekvencí genotypů ..... - 46 -

Tabulka 12: Výpočet frekvencí alel ..... - 46 -

Tabulka 13: Frekvence genotypů genu LEP ..... - 52 -

Tabulka 14: Frekvence alel genu LEP ..... - 52 -

Tabulka 15: Stanovení genetické rovnováhy dle Hardy-Weinbergova zákona ..... - 53 -

Tabulka 16: Porovnání vypočítaných hodnot $\chi 2$ testu s tabulkovými hodnotami ..... - 53 -

Tabulka 17: Popisná asociační analýza hodnocených znaků ..... - 54 -

Tabulka 18: Vliv genotypu $UASMS2$ na sledované znaky ..... - 55 -