

**MENDELOVA ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2015

HANA GROSOVÁ

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



**Variabilita markeru TG5 a asociace k obsahu intramuskulárního tuku
a marblingu u skotu**

Diplomová práce

Vedoucí práce:

prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.

Vypracovala:

Hana Grosová

Brno 2015

Zpracovaná diplomová práce na téma „**Variabilita markeru TG5 a asociace k obsahu intramuskulárního tuku a marblingu u skotu**“ byla finančně podpořena granty:

CZ.1.05/1.1.00/02.0068 (CEITEC)

NAZV QI91A055 (MZe) – Stanovení asociací mezi genotypy pro gen leptin a jejich využití ke standardizaci tržní jakosti a zvyšování parametrů kvality masné produkce skotu s kombinovanou užitkovostí.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Variabilita markeru TG5 a asociace k obsahu intramuskulárního tuku a marblingu 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:.....

.....

Podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych ráda poděkovala panu prof. RNDr. Aleši Knollovi, Ph.D. za možnost zpracování této diplomové práce a za cenné rady. Manželům Horeckým za ochotu, pomoc, odborné rady a čas, které mi věnovali při zpracování a řešení diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Elišce Dračkové za zpracování vzorků v biotechnologické laboratoři a doc. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D. za statistické zpracování dat. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za důvěru a podporu během studia.

ABSTRAKT

Tato diplomová práce zpracovává problematiku variability markeru TG5 genu *TG* a jeho asociaci k intramuskulárnímu tuku a marblingu masa u skotu. Náhodně vybraná populace, použita pro testování polymorfismů, byla složena z 237 jedinců (býků) plemene českého strakatého skotu ze čtyř českých chovů. Polymerázová řetězová reakce byla použita pro amplifikaci fragmentu *TG* o velikosti 545 bp. Po amplifikaci byly fragmenty štěpeny restriční endonukleázou *Bst*YI. Pro ověření přítomnosti PCR produktu a k identifikaci velikostí fragmentů po štěpení byla použita horizontální agarósová elektroforéza. Poté se u populace vypočetla absolutní a relativní frekvence alel a genotypů, kdy na základě výpočtů byla zjištěna vysoká frekvence alely *T* (25,98%). Na závěr této práce se provedla asociační analýza, kdy nedošlo k prokázání vlivu polymorfismu C422T v 5'promotorové oblasti v genu *TG* na marbling a IMT, ale naopak byl zjištěn průkazný vliv ($p < 0,05$) polymorfismu na obsah kyseliny laurové (C12:0). K průkaznosti se blížila kyselina timnodová a pH masa.

Klíčová slova: skot, IMT, kvalita masa, SNP, MAS, *TG*

ABSTRACT

The variability of the marker TG5 *TG* gene and its association with the intramuscular fat and marbling of meat in cattle was studied. Randomly selected population, composed of 237 individuals (bulls) of the Czech Pied cattle breed from four farms in the Czech Republic, was chosen for testing polymorphisms. Polymerase chain reaction was used to amplify a fragment of *TG* 545 bp in size. After amplification, the fragments digestion was performed using the restriction endonuclease *Bst*YI. To verify the presence of the PCR product and to identify the sizes of digested fragments the horizontal agarose electrophoresis was performed. The population's absolute and relative frequencies of alleles and genotypes were calculated. The calculations revealed a high frequency of the *T* allele (25.98 %). In conclusion, statistical analysis was performed. As a result, the influence of C422T polymorphism in the 5' promoter region of the gene on the *TG* and on the IMT marbling have not been proven, but on the contrary there was detected significant effect ($p < 0.05$) of polymorphism content on the region of Lauric acid (C12:0). The results also reveal some evidence of polymorphism having influence on Timnodonic acid and meat pH.

Keywords: cattle, IMT, meat quality, SNP, MAS, *TG*

OBSAH

1	ÚVOD	11
2	CÍL PRÁCE	12
3	LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	13
3.1	Český strakatý skot	13
3.1.1	Charakteristika plemen.....	13
3.2	Masná užitkovost	13
3.2.1	Charakteristika	13
3.2.2	Marmorování masa:.....	14
3.2.3	Metabolismus lipidů:.....	15
3.3	Genomika	16
3.3.1	Struktura genomu	16
3.3.2	Mapování genomu.....	17
3.3.3	Genom skotu	18
3.4	Genetické markery	19
3.4.1	Charakteristika	19
3.4.2	SNP – single nucleotide polymorphism	19
3.4.3	MAS – Selektce s podporou markerů.....	19
3.5	Vybrané kandidátní geny masné užitkovosti	21
3.5.1	<i>TG</i> – Thyroglobulin.....	21
3.5.2	<i>LEP</i> – Leptin	22
3.5.3	<i>GH</i> - gen růstového hormonu.....	24
3.5.4	<i>SCD</i> – gen pro stearylCoA desaturázu.....	25
3.5.5	<i>STAT5A</i> – gen signálního snímače aktivátoru transkripce	25
3.5.6	<i>DGATI</i> – gen pro diacylglycerol O-acyltransferáza	26
3.5.7	IGF – gen pro inzulínu podobný růstový faktor.....	27
3.5.8	<i>MSTN</i> - myostatin	28

3.5.9	<i>MyoD</i> rodina.....	29
4	MATERIÁL A METODIKA.....	31
4.1	Zvířata.....	31
4.2	PCR (polymerázová řetězová reakce).....	31
4.3	Elektroforéza.....	33
4.4	RFLP.....	33
4.5	Sekvenování PCR produktu.....	34
4.6	Popis analýz masa.....	36
4.6.1	Stanovení celkového obsahu bílkovin v mase.....	36
4.6.2	Stanovení obsahu tuku v mase.....	36
4.6.3	Stanovení pH masa.....	36
4.6.4	Stanovení obsahu popelovin.....	36
4.6.5	Stanovení celkového obsahu bílkovin v mase.....	37
4.6.6	Stanovení barvy masa.....	37
4.6.7	Stanovení obsahu mastných kyselin v mase.....	37
4.7	Frekvence alel a genotypů.....	39
4.8	Asociační analýza.....	40
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	41
5.1	PCR – RFLP.....	41
5.2	Sekvenování PCR produktu.....	42
5.3	Frekvence alel a genotypů u sledované skupiny.....	43
5.4	Asociační analýza.....	45
6	ZÁVĚR.....	49
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	50
8	SEZNAM TABULEK.....	62
9	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	63

1 ÚVOD

Přibližně před 10 – 8 tis. lety př. n. l. v horských oblastech přední Asie došlo k domestikaci prvních zvířat. Od této doby začal člověk využívat selekci pro šlechtění různých vlastností. Selektce (podstata celé evoluce) je hybnou evoluční silou v žádoucím směru nebo vývojem příslušného plemen a je nejdůležitějším faktorem ovlivňující frekvenci alel z geneticko - plemenářského hlediska. Dříve byly jedinci jenom selektováni tzv. klasickými metodami šlechtění, kdy docházelo k výběru na základě jeho fenotypu. Bohužel tyto metody mají omezené možnosti a právě znaky, u kterých nelze odhadnout genetické založení je výběr jedince touto metodou velmi nespolehlivý. Jedná se o znaky vyskytující se například jen u jednoho pohlaví nebo znaky s nízkou heritabilitou (např. reprodukce).

Chovatel se snaží poskytovat jedince s kvalitními reprodukčními a zároveň i produkčními vlastnostmi. Studium kandidátních genů na úrovni DNA je nejdůležitějším krokem pro studium genetického založení znaku. Díky popsaným genetickým markerům je možné využít při selekci zvířat metodu MAS (selektce s podporou markerů). Polymorfismy genetických markerů pomáhají k přesnější optimalizaci selektce jedinců na příslušný znak. Jedince s vhodnými či nevhodnými genotypy (dle požadavků chovatele) lze pomocí geneticko - molekulárních metod snadno vyselektovat. Nejvhodnějším způsobem při selektování jedinců je pro chovatele použít kombinaci složenou z klasických metod šlechtění a genetických markerů.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo provést asociační analýzu jednonukleotidového polymorfismu markeru TG5 v genu *TG* (thyroglobulinu) s parametry kvality hovězího masa (např. IMT, marbling masa). Dalším cílem diplomové práce bylo zpracovat literární přehled k danému tématu zahrnující současný stav dané problematiky, význam a metody studia, geny ovlivňující ukládání a metabolismus intramuskulárního tuku u skotu, se zvláštním zaměřením na charakteristiku genu *TG* (struktura, popsané polymorfismy a jejich asociace k užitkovosti u hospodářských zvířat) a jeho produkt. V neposlední řadě provést základní metody molekulární genetiky (PCR, RFLP, horizontální agarósová gelová elektroforéza) u předem vybraných jedinců, vytvořit databázi na základě jejich genotypů a výsledky statisticky vyhodnotit.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Český strakatý skot

3.1.1 Charakteristika plemen

Český strakatý skot se řadí mezi původní plemena České republiky a patří mezi světovou populaci strakatých plemen se shodným fylogenetickým původem. Z důvodu vynikajících vlastností a širokým využitím je plemeno rozšířené na všech kontinentech. V ČR se nachází přibližně jedna polovina populace z celkového stavu ve světě. Chovný cíl je především zaměřen na kvalitní produkci masa a mléka. V současné době je snaha u mléčné užitkovosti dosáhnout 6000-7500 kg mléka s obsahem bílkovin nad 3,5 % a u masné užitkovosti jatečnou výtěžnost nad 58 % s průměrným denním přírůstkem nad 1300 g. Tyto požadované parametry jsou dosahovány v kvalitních chovech. Požadavky na český strakatý skot jsou směřovány na kombinovanou produkci, střední až větší tělesný rámec, harmonický zevnějšek a dobré osvalení. Chovná užitkovost, zdravotní stav, pravidelná plodnost, vitalita telat, snadné porody, mléčná žláza a konverze krmiva jsou důležitými prvky pro hospodárny chov (Šustáček 2008).

3.2 Masná užitkovost

3.2.1 Charakteristika

Masná užitkovost patří mezi významné užitkové vlastnosti skotu a je úzce spjata, stejně jako mléčná užitkovost, s jeho reprodukcí. Počet telat, která má chovatel k dispozici pro výkrm, udává množství vyprodukovaného jatečného skotu. Nízká plodnost u uniparního skotu a porážková hmotnost jsou dva hlavní faktory, které ovlivňují celkový objem vyprodukovaného skotu chovatelem. Mezi jatečná zvířata se řadí nejen vykrmená zvířata (býci), ale i vyselektovaná zvířata nevhodná k dalšímu chovu (krávy). Masná užitkovost je hodnocena na základě jatečné hodnoty a výkrmnosti (Chládek 2005). Z tohoto důvodu je zařazována mezi kvantitativní genetické vlastnosti. Výživa v průběhu ontogeneze ovlivňuje realizaci genotypu a výslednou produkci jatečných zvířat. Maso dle věkové kategorie a druhu obsahuje 10-25 % bílkovin, 1-5 % minerálních látek, 25-55 % sušiny, 15-45 % tuku a vitamíny A a B. Energetická hodnota 1 kg masa

(v závislosti na obsahu tuku) je 6,3 – 12,6 kJ. Z anatomického hlediska tělo skotu tvoří 15-30 % pojiv. tkáň, 50-60% sval. tkáň a 2 - 20 % tuk. tkáň (Hrouz, Šubrt 2007).

3.2.2 Mramorování masa:

Spotřebitelé v současné době jsou si stále více vědomi vztahu mezi vlastním zdravím a stravou. Díky tomu se zvýšil zájem spotřebitelů o zjišťování nutričních hodnot potravin. U hovězího masa je zvýšená pozornost zaměřena na obsah lipidů, zejména na omega-3 polynenasyceným mastným kyselinám (PUFA), konjugované kyselině linolové (CLA) a nasyceným mastným kyselinám (SFA). Zvláštní pozornost je věnována intramuskulárnímu tuku a vztahu mastných kyselin s kvalitativními parametry masa (Scollan *et al.* 2006). SFA značně ovlivňují zdravotní stav lidí, protože nadměrný příjem těchto kyselin v lidské stravě zvyšuje výskyt cholesterolu v krevní plazmě, rozvoj aterosklerózy, ischemické choroby srdeční a rakoviny (Ward *et al.* 2010). Mramorování masa se vyznačuje jemným rozdělením tuku ve svalové tkáni a úroveň svalové tkáně je důležitým faktorem pro šťavnatost a chuť masa (Herring 2012). U hovězího skotu je po 12 měsících věku viditelné ukládání intramuskulárního tuku a rychlost samotného ukládání se zvyšuje od 15. měsíce až do 24. měsíce. Počáteční vznik viditelného IMT řízen prostřednictvím adipocytů v kombinaci s poklesem růstu svaloviny. Na základě výzkumů má mramorování masa negativní dopad na obsah bílkovin v mase (Lee *et al.* 2010). Mezi kandidátní geny, které jsou odpovědné za mramorování masa, patří např. tyreoglobulin (*TG*), leptin (*LEP*), stearyl-CoA desaturáza (*SCD*), diacylglycerol O-acyltransferáza 1 (*DGAT1*). (Ripoli *et al.* 2010). Složení mastných kyselin v tukové tkáni je důležitým faktorem, který značně ovlivňuje kvalitu, barvu, vůni a křehkost masa. Za složení mastných kyselin jsou odpovědné následující geny: *SCD*, *SREPB-1* a v neposlední řadě gen *FABP4* (Mannen 2011). U různých plemen skotu existují podstatné rozdíly v mramorování masa. Heritabilita se pohybuje v rozmezí 0,13-0,88 se střední hodnotou přibližně 0,45. V důsledku hraje samotné mramorování masa důležitou roli při výběru vhodného plemene i za podmínek, že vztah mramorování s jinými vlastnostmi není konstantní. Výběr populace (jedinců) může kladně ovlivňovat tento znak bez následného zvyšování podkožního tuku a bez negativních účinků ovlivňujících kostru či samotný výkrm skotu. Hodnota podkožního tuku by neměla být brána

jako predikátor pro hodnotu mramorování masa, protože fenotypová korelace mezi těmito dvěma znaky se bude blížit k nule u většiny plemen skotu a genetická korelace mezi mramorováním a podkožním tukem je vyšší. Hodnocení složení těla ultrazvukem poskytuje důležité informace, díky kterým lze předvídat mramorování masa jatečně upraveného těla telat, výkrmného skotu a také zjistit genetický potenciál pro tuto vlastnost u chovných jedinců. V současnosti jsou využívány komerční genetické testy na zjišťování genotypů kandidátních genů masné užitkovosti (Herring 2012).

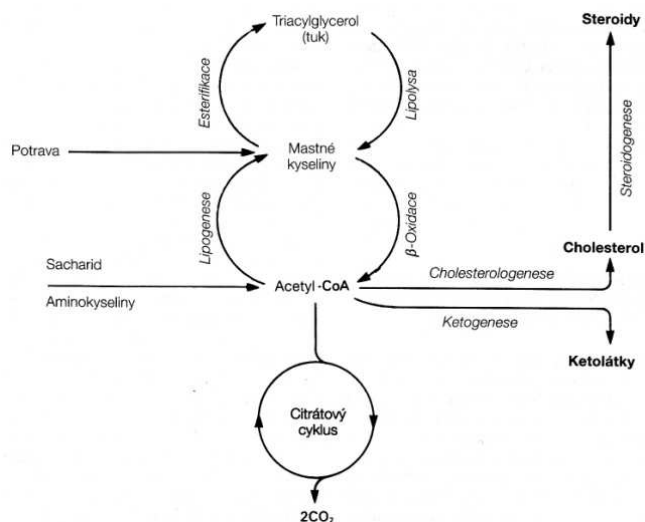
3.2.3 Metabolismus lipidů:

Lipidy, získané z potravy nebo acetyl-CoA vzniklý syntésou de novo ze sacharidů, jsou zdrojem mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Mastné kyseliny mohou být ve tkáních esterifikovány na acylglycerol nebo oxidovány na acetyl-CoA (β -oxidací), přičemž hlavní energetickou rezervu představuje triacylglycerol (tuk).

β -oxidací produkovaný acetyl-CoA se uplatňuje třemi způsoby:

1. Cestou citrátového cyklu je Acetyl-CoA, vzniklý ze sacharidů, úplně oxidován na H_2O a CO_2 . Účinným tkáňovým metabolickým palivem jsou mastné kyseliny, které poskytují významnou energii jak v citrátovém cyklu, tak i v β -oxidaci
2. Pro cholesterol a jiné steroidy je zdrojem uhlíkových atomů
3. Za jistých okolností (např. hladovění) se v játrech tvoří ketolátky, které jsou tkáňové palivo rozpustné ve vodě a stávají se významným zdrojem energie (Mayes 1998).

Obr. 1 Přehled metabolismu mastných kyselin znázorňující hlavní metabolické dráhy a jejich koncové produkty. Ketolátky představují acetacetát, 3-hydroxybutyrát a aceton (Murray 1998)



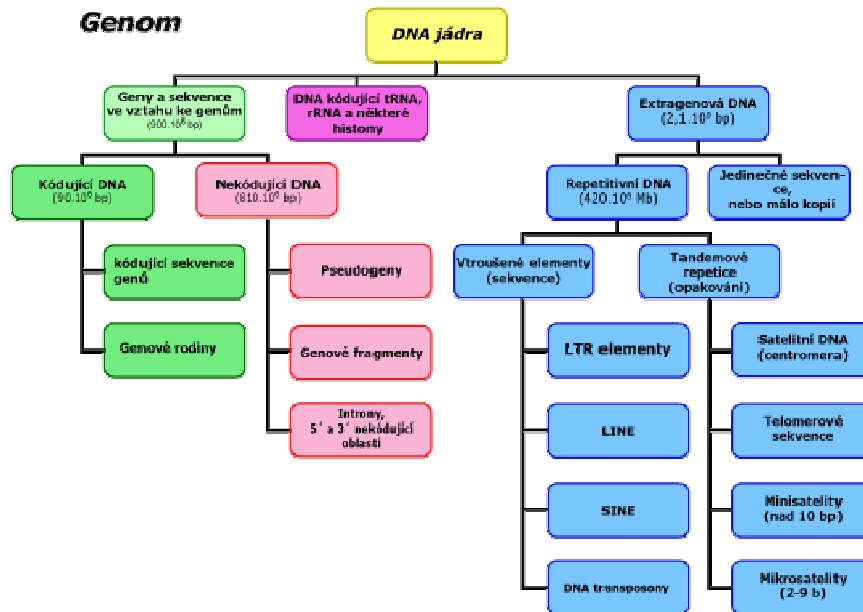
3.3 Genomika

3.3.1 Struktura genomu

Genom určitého organismu je veškerá genetická informace (DNA) uložená v jádře buňky (u některých virů v RNA). Přesněji se jedná o jednu sadu chromozómů, u kterých je popsána kompletní sekvence DNA (př. jedna ze dvou sad v každé somatické buňce diploidního organismu). Na základě znalostí o struktuře genomu eukaryot se rozvíjí studium genomu u hospodářských zvířat. Genom, v případě eukaryot, lze rozdělit na mimojaderný, který je tvořen DNA sekvencemi v semiautonomních organelách, mitochondriích či plastidech a jaderný tvořený genomickou DNA. Genom savců je složen z kódujících a anonymních nekódujících DNA sekvencí genů. Kolem 95% genomu hospodářských zvířat tvoří nekódující sekvence DNA a zbylých 5% je tvořeno strukturálními geny nesoucí genetickou informaci pro syntézu polypeptidových řetězců. Na chromozomu má anonymní nekódující sekvence a každý gen většinou specifické místo tzv. lokus. Retrotranspozony a transpozony jsou výjimkou z důvodu pohyblivých sekvencí (Hruban, Majzlík 2000).

Obr. 2 Schematické znázornění struktury genomu (Urban 2013)

zdroj: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg2/dna2/geny.htm>



3.3.2 Mapování genomu

Na základě vazbové skupiny lze určit lokalizaci určitého genu v chromozomu. Pokud se analyzovaný gen nachází ve vazbě s gen. markerem, může dojít k určení příslušnosti určitého genu, který odpovídá vazbové skupině. Využitím aneuploidí nebo cytologicky detekovatelných chromozomových aberací, lze zjistit přesné umístění určitého genu v příslušné vazbové skupině. Kruhové chromozomové mapy jsou u chromozomů tvořených cirkulární DNA (prokaryonta), zatímco lineární chromozomové mapy jsou u chromozomů eukaryont. Pomocí tříbodového testu se určuje pořadí a relativní vzdálenost genů na chromozomu. Podíl rekombinant vyjadřuje relativní vzdálenost a sílu vazby dvou genů. Konstrukci genetických map, kde dochází k zobrazení sekvence nukleotidů v genech, umožňují metody molekulární genetiky. Hybridizace DNA, restrikční analýza a sekvenční analýza patří mezi nejpoužívanější metody pro sestavování genetických map (Bednář *et al.* 2006).

3.3.3 Genom skotu

V současnosti je k dispozici rozsáhlá genetická mapa složená ze sekvencí různých plemen skotu, kde je zohledňováno prostředí. V Mammalia po myši, kryse a člověku má skot čtvrtý dobře zmapovaný genom z hlediska anonymních DNA polymorfizmů a genů. Díky snadné dostupnosti velkého množství tkáně a velikosti genomu bylo mnoho genů poprvé izolováno právě u skotu. V dnešní době se v genové bance nachází více jak 3300 sekvencí. Genetická mapa skotu je pokryta z 95% anonymními makery. Karyotyp skotu se skládá z 1 páru pohlavních chromozomů a z 29 páru autozomů. V roce 1994 došlo k přečtení první vazbové mapy (Barendse *et al.* 1997).

Roku 1997 Barendse *et al.* zveřejnil vazbovou mapu pokrývající 95% genomu skotu s celkovou velikostí genetické mapy, která byla stanovena na 3532 cM (bez ohledu na pohlaví). Velikost genomu v závislosti na pohlaví spočívá v rozdílu délky autozomální mapy, kdy samičí mapa odpovídá velikosti 3765cM a samčí mapa 3567cM. Rozdíl mezi oběma pohlavím tedy činí 58cM (Barends *et al.* 1997). Délka lidské mapy (3699cM) je velikostně podobná délce vazbové mapy skotu (Gyapayat *et al.* 1994, Hudson *et al.* 1995), avšak obě tyto mapy jsou větší než vazbová mapa myši (1500cM) či prasete (2000 cM) (Barendse *et al.* 1997). Konečná verze komparativní mapy člověk-skot, byla zveřejněna v roce 2005 a genom člověk-skot je z 91% shodný. Průměrná hustota markerů byla stanovena přibližně od 0,7 - do 1,8 markeru / Mbp (Wind *et al.* 2005).

V prosinci 2003 na MedicineSequencing Centre, USA, Houston a BaylorCollege došlo k prvnímu sekvenování genomu skotu. Po roce 2004 došlo k zveřejnění, ve všech přístupných databázích, prvního osekvenovaného konceptu genomu. Náklady na mapování byly odhadnuty na 53 milionů dolarů a podílelo se na něm několik mezinárodních skupin (CSIRO Australia, NationalHuman Genome, Genome Canada, Research Institute aj.). Kráva plemene hereford L1 Dominette 0144 se stala prvním osekvenovaným jedincem. Později se snahou odhalit meziplemenné rozdíly byla sekvenována i další plemena např. aberdeen angus, limousin, holštýnský skot. (Quick *et al.* 2004; Hocquette *et al.* 2007). „Bovine Genomic Sequencing Initiative“ byl v roce 2004 Gibsem *et al.* zveřejněn jako cíl následného sekvenování genomu skotu. V oblasti biochemie, endokrinologie, výživy a reprodukce je možné použít skot jako modelové zvíře pro

lepší pochopení lidského zdraví a pro celkové pochopení lidského organismu (Wind *et al.* 2005).

3.4 Genetické markery

3.4.1 Charakteristika

Genetický marker je snadno detekovatelný, vysoce polymorfní znak vykazující mendelistickou kodominantní dědičnost. Molekulárně genetické markery mohou být v libovolném věku jedince (včetně embryí nebo po smrti jedince) typovány z velmi malého množství tkáně, jsou početné a lze se také k analýze opakovaně vracet i po několika letech (archivace DNA) (Knoll, Vykoukalová 2002). Genetické markery se rozdělují do tří skupin: markery I., II. a III. typu (O'Brien *et al.* 1999).

3.4.2 SNP – single nucleotide polymorphism

SNP jsou jednoduché bodové mutace v sekvenci genomu, převážně bialelického charakteru, zastoupené v hojném počtu v celém genomu. SNP se mohou vyskytovat v intergenových regionech (regiony mezi geny), v kódujících a v nekódujících oblastech genu. Aminokyselinová sekvence proteinu, který je produkován, nemusí být v rámci výskytu SNP v kódující sekvenci nikterak pozměněn. V rámci kódující sekvence se vyskytují dva typy SNP a to synonymní a nesynonymní. Nesynonymní SNP dokáže změnit sekvenci aminokyselin proteinu, zatímco synonymní nemá žádný vliv na proteinovou sekvenci (Charoensook *et al.* 2013).

3.4.3 MAS – Selektce s podporou markerů

Genetické markery slouží pro lepší odhad genetického potenciálu jedince. K detekci specifických DNA variant asociovaných v konkrétním znaku mezi jedinci se používá metoda MAS (Van Eenennaam 2005). Použití této metody je převážně u znaků viditelných až po porážce (např. mramorování masa). Genetickou proměnlivost

způsobují markery, které jsou v blízkosti spojeny s geny. Využitím markerů je zvyšována efektivnost šlechtění zvířat (Jakubec *et al.* 2003). Pro použití metody MAS je důležité mít podrobné znalosti o alelách genů a zaměřit se jen na konkrétní oblast zájmu. Oproti běžným selekčním programům je přínos metody především v neustálém zvyšování selekčního efektu (Eggen 2012). Genetické markery pro geny (tzv. kandidátní geny) i genetické markery pro QTL mohou být využity v selekčních programech (Williams 2005). Snižování inbreedingu, provádět selekci uvnitř rodin a zkrácení generačního intervalu patří mezi přednosti této metody. Určení podílu proměnlivosti vysvětlené markerem, stanovení vazbové mapy (uváděná vzdálenost a pořadí genů), detekce markeru a identifikace jedinců využitých ve šlechtění je základním postupem metody MAS (Van Eenennaam 2005).

3.5 Vybrané kandidátní geny masné užitkovosti

3.5.1 TG – Thyroglobulin

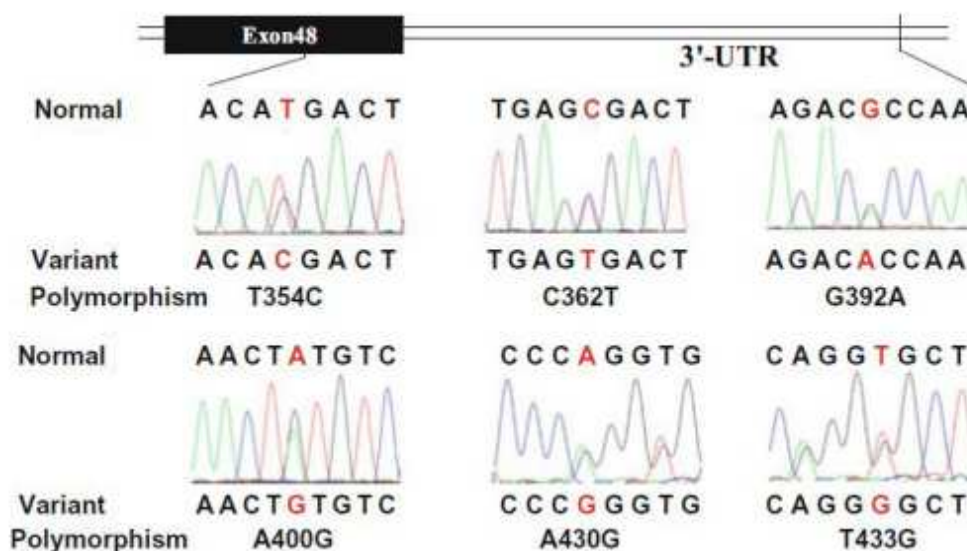
Glykoprotein thyroglobulin je prekursorem thyroidních hormonů T₃ (triiodothyronin) a T₄ (thyroxin), které hrají při diferenciaci a vzniku tukových buněk důležitou roli (Granner 1998). Tento gen je považován za kandidátní gen pro obsah intramuskulárního tuku. Ukládání intramuskulárního tuku a vývoj tukových buněk je v blízkém vztahu s intenzitou metabolismu, kterou ovlivňuje hladina tyroxinu a triiodothyroninu (Mears *et al.* 2001).

Centromerická oblast chromosomu 14 (BTA14) byla lokalizována pro gen thyroglobulin, který kóduje přibližně 8,7 kbm RNA. Gen TG je složen ze 7 exonů a 46 intronů a díky tomu je řazen mezi největší eukaryotické geny, protože celý lokus zabírá více než 200 kb. Samotná velikost genu odpovídá 550bp a z 2731 AMK je složen jeho výsledný protein (Barendse 2005). Exon 9 (1 101 bp) a 10 (588 bp) patří mezi největší exony TG genu, zatímco ostatní exony mají velikost přibližně od 63bp do 240bp. Intron 41 (62,4kb) a 45 (32,4 kb) jsou největší introny tohoto genu (Ensemble 2015). V 5' promotorové oblasti genu se vyskytuje mutace C422T (Hou *et al.* 2012).

Barendse *et al.* (1997) ve své studii při zkoumání 264 jedinců (plemeno angus, shorthorn) objevil C/T substituci v DNA sekvenci (pozice 537 bp) v TG genu a metodou SSCP pro daný SNP polymorfismus identifikoval 2 alely. Alela „3“ definuje alelu T (-537bp, GATT), zatímco alela „2“ definuje alelu C (GATC). Na základě jeho výzkumu a výsledků byl zjištěn vztah genotypu TG5 a marbling skóre, kdy vyššího až vysokého marbling skóre dosahovali především homozygotní jedinci 33 (P<0,05). Z této a pozdější studie, která byla provedena také Barendsem *et al.* (2001), bylo odhadnuto, že výsledný marbling fenotypu představuje 6,5 % genotypu TG5 a jedinci s genotypem 22 a 23 dosahovali v průměru nižších hodnot než jedinci s genotypem 33. Ostatní ukazatelé masné užitkovosti na základě výsledků nejsou nikterak ovlivněny C/T polymorfismem v TG genu. Vztah alely T s vyšším marbling skóre potvrdil Barendse *et al.* v roce 2004. Hou *et al.* (2011) identifikoval v 3'UTR oblasti 6 nových SNP polymorfismů, které jsou v asociaci s marbling skóre (T433G, T354C, G392A, A430G, C362T, A400G). V současné době, pro testování marblingu u skotu, je možné zakoupit na trhu komerčně dostupný GeneSTARMarbling test (Barendse 2001b). Na základě

výsledků testu jsou jedinci označeni buď CC – 0STAR, CT – 1STAR, TT – 2STAR nebo pomocí různého počtu hvězdiček podle preferovaných alel (Rincker *et al.* 2006). Vliv *TG5* variant na mléčnou užitkovost nebyla prokázána, i když v centromerické oblasti BTA14 byl lokalizován QTL vztahující se k mléčné produkci. Studie byla provedena na 1279 jedincích holštýnského plemene (Kathib *et al.* 2007).

Obr. 3 Chromatogram vykazující sekvenční variace na pozicích 354 (T354C), 362 (C362T), 392 (G392A), 400 (A400G), 430 (A430G), 433 (T433G) v 3'UTR oblasti genu *TG* (Hou *et al.* 2011)



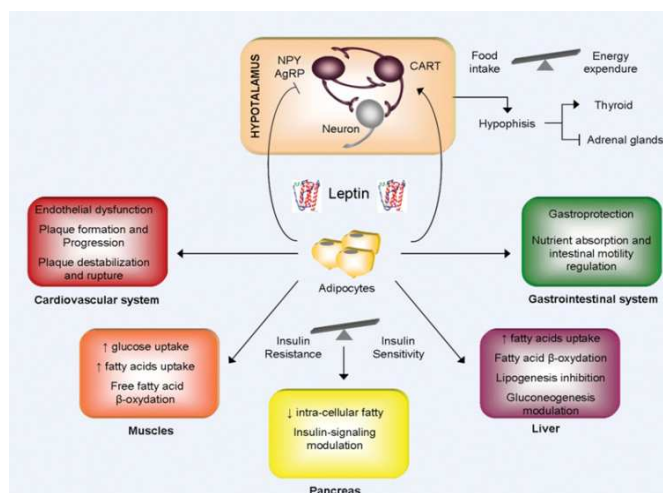
3.5.2 *LEP* – Leptin

Primárně je gen pro leptin exprimován v bílé tukové tkáni a reguluje příjem kr-miva, energetický metabolismus, plodnost a imunitní funkci (Yang *et al.* 2007). Leptin se podílí na regulaci tělesné hmotnosti a na lepší křehkosti masa, která je zlepšována nepřímo přes obsah tuku a svoji terciární strukturou se podobá hematopoetickému cyto-kinu (Glaum *et al.* 1996). Molekula leptinu (16kDA) je tvořena 167 aminokyselinami a má čtyřmístnou helikální strukturu přibližně s 5-6 otáčkami (Sharifzadeh *et al.* 2012). Na základě působení se stal gen *LEP* kandidátním genem pro kvalitu masa a kostry (Chung *et al.* 2008). Při absenci leptinu dochází u jedince k morbidní obezitě. Hormon

v krevním séru má dvě formy: vázanou a volnou. Vázaná forma je vázaná na proteinový nosič, zatímco volná forma je biologicky aktivní (Barash 1996).

Obr. 4 Činnost a sekrece leptinu (Vadacca *et al.* 2015)

zdroj: http://www.nature.com/cmi/journal/v8/n3/fig_tab/cmi201075f1.html



Gen pro leptin je u skotu lokalizován na 4. chromosomu v oblasti BTA4; 4q32 (Sharifzadeh *et al.* 2012). Velikostně odpovídá 16 735 bp a je složen z 2 intronů a 3 exonů (GenBank 2015). Přeneseny do proteinu jsou pouze dva exony a v 2. a 3. exonu je obsažena kódovací oblast leptinu, přičemž exony jsou od sebe vzdáleny 2 kb dlouhým intronem (Zadworny, Kuhnlein 1990).

Leptin hraje důležitou roli v procesech růstu. V 2. exonu byla identifikována záměna thyminu (*T*) za cytosin (*C*). Ve 3. exonu bylo nalezeno 6 SNP, které nemají vliv na kódovanou aminokyselinu. V exonu 2. došlo k záměně aminokyseliny cystein za arginin. Při studii 154 býků v Kanadě bylo prokázáno, že alela *T* je spojována s vyššími hodnotami tuku (Kononoff *et al.* 2005). Schenkel *et al.* 2005 ve své studii prokázal minimální vztah alely *T* s mramorováním masa. Woronuk *et al.* (2012) při své studii zjistil, že alela *T* má vliv na rychlost ukládání hřbetního tuku a na délku výkrmu. Pro dosažení 12 mm hřbetního tuku potřebují jedinci s genotypem *TT* 38 dní, *CT* 42 dní a *CC* 45 dní. Barendse *et al.* 2005 ve svých výsledcích nepotvrdil vztah alely *T* k celkové hodnotě jatečně upraveného těla.

3.5.3 GH - gen růstového hormonu

Růstový hormon je tvořen lineárním polypeptidem o 191 aminokyselinách spojených dvěma disulfidovými můstky (Granner 1998). Svoji funkcí se zapojuje do metabolismu, růstu a fyziologických procesů. Gen pro GH byl na základě svých funkcí navržen jako kandidátní gen pro vlastnosti spojené s produkcí a kvalitou masa. Společně s genem pro GHR (receptor růstového hormonu) působí růstový hormon na neonatální a fetální vývoj osteoblastů a myoblastů (Stasio *et al.* 2002). Proteosyntéza strukturálních bílkovin je ovlivněna bovinním růstovým hormonem, který urychluje průnik aminokyselin do buněk a tím dochází k rychlejšímu začlenění aminokyselin do bílkovinných molekul. Mezi jeho další funkce patří zvyšování hmotnosti kosterních svalů (Ledvina 1993).

Na 19. chromozómu byl u skotu lokalizován gen růstového hormonu, který je složen z 5 exonů a 4 intronů (Lee *et al.* 2013). Tento gen sekvenoval Gordon *et al.* (1983) a Hediger *et al.* (1990). Transkripční délka toho genu činí 1,7 kb. U skotu bylo vyzorováno několik mutací. Dvě mutace jsou lokalizovány na 5. exonu. U první mutace dochází k nukleotidové substituci CTG/GTC na 127. kodónu a byly zde identifikovány alely A a B. Tato substituce způsobuje nahrazení leucinu za valin. U druhé mutace v tomto exonu dochází k substituci ACG/ATG na 172. kodónu charakterizující alelu C. Tato mutace způsobuje změnu threonin na methionin (Stasio *et al.* 2002). Zhang *et al.* (1993) lokalizoval mutaci na 3. intronu identifikující dvě alely C a D.

Ve své práci Di Stasio *et al.* (2003) odhalil v 3. intronu alelu GHI^C s frekvencí 0,842 a alelu GHI^D s frekvencí 0,158. Frekvence alel GHI^A 0,72 a GHI^B 0,28 zjistil v roce 2002 Di Stasio *et al.* ve svém výzkumu.

Tb. 1 Vliv dominance (d) a odhad genové substituce (α) na in vivo znaky

(Di Stasio *et al.* 2003)

Parametry růstu	α	P	d	P
Hmotnost 5kg	1,04	0,71	-0,205	0,96
Hmotnost 7kg	-0,169	0,96	-1,778	0,7
Hmotnost 11kg	0,333	0,94	-0,352	0,95
Denní přírůstek	-0,001	0,97	-0,004	0,8
Výška kohoutku	0,112	0,76	0,358	0,47
Délka trupu	-0,103	0,88	-0,53	0,54

Obvod Hrudníku	1,021	0,14	0,362	0,7
Šířka kohoutku	-0,059	0,53	0,077	0,53
Šířka beder	-0,024	0,76	0,044	0,68
Tloušťka beder	0,037	0,64	0,078	0,47
Profil stehen	-0,025	0,81	0,143	0,31

3.5.4 *SCD* – gen pro stearylCoA desaturázu

Enzym stearyl-CoA desaturáza způsobuje přeměnu nasycených mastných kyselin na jednoduché nenasyčené mastné kyseliny (MUFA). *SCD* ve spojení s NADPH⁺, cytochromu b5 a reduktázy za přítomnosti molekulárního kyslíku zavádí dvojnou vazbu (mezi atomy uhlíku 9 a 10) do acyl-CoA (Ntambi 2003). Dochází k přeměně palmitoyl- a stearyl-CoA na palmitoleoyl- a oleoyl-CoA. Pro syntézu triglyceridů, fosfolipidů a cholesterolových esterů jsou hlavním substrátem MUFA, které jsou vytvořeny pomocí *SCD* enzymu (Keating *et al.* 2006). *SCD* enzym je důležitou součástí endogenní produkce cis-9, -11 trans izomeru konjugované kyseliny linolové. (Bartoň *et al.* 2009). Délka genu *SCD* u skotu odpovídá velikosti 5331 bp a je lokalizován na 26. chromozomu (Castillo 2010). Tento gen se skládá z 6 exonů a 5 intronů (Oh *et al.* 2011).

Campbell *et al.* (2001) ve své studii identifikoval osm jednoduchých nukleotidových polymorfismů (SNP). Taniguchi *et al.* (2004) ve své studii zkoumal SNP c.878T>C substituci, při které dochází k změně aminokyseliny valin (V) na alanin (A). Výzkum byl proveden u japonského černého plemene a byly zde identifikovány všechny tři možné genotypy AA, VA a VV. Svým výzkumem zjistil, že tato mutace snižuje bod tání intramuskulárního tuku (P<0,001) a přispívá k vyššímu % MUFA.

3.5.5 *STAT5A* – gen signálního snímače aktivátoru transkripce

STAT5A je skupina transkripčních faktorů, které zprostředkovávají signály s prolaktinu a růstového hormonu. *STAT5A* aktivuje transkripci genů pro mléčné proteiny a je intracelulárním mediátorem prolaktinu (Flisikowski *et al.* 2003). *STAT5A* je také hlavním mediátorem růstového hormonu působící na cílové geny (Argetsinger, Carter-

Su 1996). Tento gen se vyskytuje ve dvou izoformách A a B, které se od sebe liší karboxylovým koncem molekuly proteinu a jsou kódovány samostatnými geny. Gen byl u skotu lokalizován na pozici 19q17 Na chromozomu 19 jsou také geny *STAT3* a *STAT5B* geny (Seyfert *et al.* 2000). Gen je složen z 19 exonů, které kódují 794 aminokyselin. Receptory pro glukokortikoidy a inzulin jsou synergení s těmito receptory. Tyto receptory se navíc mezi sebou vzájemně ovlivňují (Lechner *et al.* 1997, Chen *et al.* 1996). Gen *STAT5A* se vyznačuje velkým množstvím polymorfismů.

Ve své studii McCracken *et al.* (1997) objevil SNP ve 12. intronu. Flisikowski *et al.* (2003) studoval SNP u plemen polský black and white (BW, n = 30), polský red (PR, n = 30), polský white – back (WHB, n = 15), charolaise (Ch, n = 18), limuzín (L, n = 16), redAngus (RA, n = 10), hereford (H, n = 16) a simental (S, n = 11). Genotypy *CC* a *CT* byly referenční. Pro identifikaci polymorfismu v intronu 6 a exonu 7 v tomto genu byla použita metoda PCR-SSCP. Pomocí této metody byla identifikována substituce nukleotidů *C>T* v poloze 6 853 v genu *STAT5* v 7. exonu. Ve věku 9.– 15. měsíců byla u heterozygotů (*CT*) zjištěna nižší hmotnost o 27,5 – 33,8 kg ve srovnání s homozygoty (*CC*). Homozygoti (*CC*) byly také spojovány s významně rychlejším růstem a lepší konverzí krmiva. Během testu konverze ve 13. a 14. měsíci věku byl denní přírůstek 1,47 kg u homozygotů (*CC*), zatímco u heterozygotů (*CT*) činil denní přírůstek jen 1,26 kg.

3.5.6 *DGATI* – gen pro diacylglycerol O-acyltransferáza

Enzym diacylglycerol O-acyltransferáza, který je kódovaný genem *DGATI*, je důležitým enzymem při syntéze triacylglyceridů. Gen *DGATI* je kandidátním genem pro množství tuku v mléce a pro mramorování masa. Tento gen je složen ze 17 exonů, jeho délka odpovídá 8,6 Kb a byl lokalizován v centromerické oblasti BTA 14 v oblasti QTL pro množství tuku v mléce (Grisart *et al.* 2001). Na zvýšený obsah intramuskulárního tuku ve svalu *m. semitendinosus* má vliv diacylglycerol O - acyltransferáza. Snížená schopnost vytvářet svalový tuk a zastavená produkce mléka u myší způsobuje nefunkční gen *DGATI* (Smith *et al.* 2000).

Ve své studii Gisart *et al.* (2001) a Winter *et al.* (2002) identifikoval mutaci v pozici 232 (K232A) nacházející se v 8. exonu tohoto genu a také zjistili, že tato mutace má vliv na mléčnou produkci a obsah tuku v mléce. V mutaci K232A dochází k substituci aminokyselin lysin/alanin. Alanin (A) v této poloze zvyšuje obsah proteinu a snižuje obsah tuku v mléce (Winter *et al.* 2002). Naopak lysin (K) v této poloze způsobuje zvýšení obsahu tuku v mléce (Kaupe *et al.* 2004). Gen *DGAT1* by mohl být genetickým markerem pro obsah intramuskulárního tuku v mase, protože hraje důležitou roli v syntéze tuků. V populacích plemene charolais (27ks) a v populacích holštýnského plemene byla sledována mutace K232A s obsahem tuku ve svalech *m. longissimusdorsi* a *m. semitendinosus*. Na základě výsledků výzkumu měla tato mutace vliv jen na obsah intramuskulárního tuku v *m. semitendinosus*. Homozygotní jedinci (AA) a heterozygotní jedinci (AK) měli v obou svalech nižší obsah intramuskulárního tuku oproti homozygotním jedincům (KK). U plemene charolais bylo celkově nižší marbling skóre než u jedinců holštýnského plemene (Thaller *et al.* 2003).

3.5.7 IGF – gen pro inzulínu podobný růstový faktor

IGF-I (inzulínu podobný růstový faktor I) je jednořetězcový polypeptid tvořený 70 aminokyselinami. Signální dráhy IGF zahrnují funkce dvou ligandů (IGF-I, IGF-II), tří buněčných povrchových receptorů (IGF-IR, IGF-IIR, IR) a šesti vysoce afinitních vazebných proteinů (IGFBP), kdy všechny v kombinaci hrají důležitou roli v růstu a vývoji (Liu *et al.* 1993). Pro plodnost a masnou užitkovost je gen *IGF* považován za kandidátní. Protein, tvořený tímto genem, má podobné vlastnosti jako inzulin a řadí se mezi důležité faktory ovlivňující některé metabolické pochody (Ge *et al.* 2001). Na základě výzkumů je možné, že tento gen ovlivňuje konverzi krmiva a obsah libového masa.

Gen *IGF* je u skotu mapován v nekódující oblasti 5. chromozómu (Moody *et al.* 1996). Ve 4. intronu se nachází *IGF* 1/Nru I polymorfismus (Hines *et al.* 1998, Ge *et al.* 2001, Szewczuk *et al.* 2011). Alelické varianty A a B byly vypořizovány u tohoto genu, kdy jedince s genotypem BB charakterizuje jeden restriční fragment o délce 249 bp, jedince s genotypem AA charakterizují dva restriční fragmenty o délce 23 bp a 226 bp

a heterozygotní jedinci *AB* jsou charakterizováni třemi fragmenty o délce 23 bp, 226 bp a 249 bp.

Jedinci s genotypem *BB* (telata) vážila o 12,31 kg méně než jedinci s genotypem *AB*. Na základě těchto výsledků lze vidět vztah mezi genotypy genu *IGF* a růstu, který může v rané fázi ovlivnit příjem krmiva (Szewczuk *et al.* 2011). U plemene angus byla zjištěna frekvence alely *A* 0,64 a *B* 0,36 (Ge *et al.* 2001). Vztah mezi jatečně upraveným tělem a tímto polymorfismem nebyl prokázán.

Tab. 2 Asociace mezi parametry růstu a genotypy genu *IGF* (Chung, Kim 2005)

Genotyp	<i>AA</i>	<i>AB</i>	<i>BB</i>
Porodní hmotnost	23,46±1,41	22,85±1,38	22,38±1,50
Hmotnost ve 3. měsících	70,72±6,71	75,05±5,06	62,74±4,46
Hmotnost v 6. měsících	124,56±11,31	128,72±7,01	123,62±7,53
Hmotnost ve 12. měsících	186,52±18,09	191,33±11,02	189,62±12,65
Denní přírůstek	0,51±0,07	0,52±0,06	0,52±0,06

3.5.8 *MSTN* - myostatin

Myostatin je růstový a diferenciací faktor (*GDF8*), který patří do rodiny transformujících růstových faktorů. Tento gen působí jako negativní regulátor kosterní svalové hmoty, také inhibuje diferenciaci myoblastů, zamezuje tvorbu svalových myofibril u embrya (Gonzalez-Cadavied *et al.* 1998) a patří mezi významné genetické markery. Svoji přítomností zvyšuje křehkost masa, porodní hmotnost zvířete, procento těžkých porodů, snižuje podíl mramorování masa a redukuje podíl intramuskulárního tuku (Karim *et al.* 2000). McPherron *et al.* (1997) ve své studii u myši poprvé detekoval delecii myostatínu u kterých docházelo k hyperplazii (nárůst počtu svalových vláken) a hypertrofii (zvýšená velikost vláken). V prenatalní i v postnatalní fázi se myostatin vyskytuje v kosterním svalstvu. U skotu se tato mutace, způsobující tzv. dvojité osvalení, běžně vyskytuje u plemene charolais, piemontese a belgické modrobílé. Dvojité

osvalení je způsobeno zvýšeným počtem svalových vláken, kdy dochází k nárůstu svalové hmoty v mnoha případech až o 40%. U skotu se na rozdíl od myší, buňky spíše množí, než zvětšují (McPherron, Lee 1998). U skotu bylo identifikováno 9 SNP polymorfismů, ale jen 5 SNP polymorfismů, vyskytujících se v kódující sekvenci, způsobují narušení funkce proteinů (hyperplazii). Ostatní 4 SNP polymorfismy, vyskytující se v intronech, způsobují svalovou hypertrofii a inaktivují protein (Grobet *et al.* 1998).

U skotu je lokalizován gen myostatin na 2. chromozomu a je složen ze 3 exonů a 2 intronů. První exon svojí velikostí odpovídá 506 bp. Svalovou hypertrofii způsobuje 11 bp v kódující sekvenci pro C-koncovou doménu proteinu (Grobet *et al.* 1997). Myostatin má u každého masného plemene jinou charakteristickou mutaci. Ve 3. exonu se mutace vyskytuje u belgického modrobílého plemene, kdy dochází ke zkrácení proteinu v důsledku delece 11bp v pozici 821. Tato mutace je nazývána nt821(dell 1). U plemene charolais se mutace vyskytuje v 2. exonu a u plemene piemontese v 3. exonu (Grobet *et al.* 1998).

Alela *MH* je spojena se zvýšenou porodní hmotností (o 2,4kg), s častým výskytem těžkých porodů, výrazně ovlivňuje hmotnost jatečně upraveného těla, zvyšuje hmotnost těla při porážce (o 14 kg), zvyšuje produkci svalů, snižuje obsah intramuskulárního tuku v mase a ve svalu snižuje obsah nasycených mastných kyselin. (Weiner *et al.* 2002).

3.5.9 *MyoD* rodina

V embryonálním vývoji tvorbu svalových vláken ovlivňuje genová rodina *MyoD* a každý gen z této rodiny má při vývoji svalů danou časovou expresi (Buckingham 1992). Také u svalových vláken ovládají jejich tvorbu a postnatální zrání a funkci (Te Pas, Visscher 1994). V kosterní svalovině kódují tyto geny základní helix-loop-helix. Geny *MYF3*, *MYF4*, *MYF5* a *MYF6* jsou obsaženy v genové rodině *MyoD*. Geny byly stanoveny jako kandidátní geny pro vlastnosti masa u skotu (Gazdová *et al.* 2006).

Na 15. chromozomu u skotu byl lokalizován gen *MYF3*, který je složen z 3 exonů o velikosti 629 bp, 250 bp a 75bp (Chang *et al.* 1995). Na 16. chromozomu

byl lokalizován gen *MYF4*, který při změně struktury nebo odchylky v expresi ovlivňuje proces diferenciaci buněk a tím i kvalitu masa (Buckingham *et al.* 1992). V oblasti 5q2.5 na 5. chromozomu byl lokalizován gen *MYF5* (Soumillion *et al.* 1997).

Zhang *et al.* (2007) ve své studii u čínských plemen skotu jixian a nanyang nezjistil žádné statisticky významné rozdíly mezi genotypy *AA* a *BB*, ale u plemene qinchuan s genotypem *BB* byla vyzorována nižší výška v kříži a v kohoutku oproti jedincům s genotypem *AB*. Vyšší procento svaloviny v jatečně upraveném těle a vyšší obsah intramuskulárního tuku vykazují jedinci s genotypem *BB*. Zatímco vyšší hmotnost v kýtě vykazují jedinci s genotypem *AA* (Kury *et al.* 2002).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Zvířata

Zdrojem genetického materiálu pro genotypizaci byli jedinci plemene Českého strakatého skotu z vybraných chovů v České republice. Genotypováno bylo celkem 237 jedinců, a to z 5 chovů: chov 1 (155 ks), chov 2 (3 ks), chov 3 (2 ks), chov 4 (68 ks) a chov 5 (9 ks).

4.2 PCR (polymerázová řetězová reakce)

Základ metodiky byl převzat z práce původních autorů, ale musel být upraven našim laboratorním podmínkám. Změny byly provedeny v objemu reakční směsi, v podmínkách míchání a v podmínkách amplifikace. Metodou PCR docházelo k amplifikaci fragmentu *TG5* o velikosti 545 bp.

Tab. 3 Použité primery pro gen *TG*

Označení primeru	Sekvence 5' - 3'	Délka [bp]	G+C [%]	Tm [°C]
přímý TG5U2	GGG GAT GAC TAC GAG TAT GAC TG	23	52	58,47
zpětný TG5D1	GTG AAA ATC TTG TGG AGG CTG TA	23	43	59,12

Chemikálie:

- PCR Ultra H₂O (Top-Bio s.r.o., Praha, ČR) – 1,5 ml
- primery (IDT Inc., Coralville, USA) – zásobní roztok 100 pmol/ μl, použitý roztok 10 pmol/μl
- 2 x PPP Master Mix (Top – Bio s.r.o., Praha, ČR)
Složení: 150 mM Tris–HCl (pH 8,8),
40 mM (NH₄)₂SO₄
0,02 % Tween 20, 5 mM MgCl₂
400 μM každý dNTP
100 U/ml Taq DNA polymerázy
barvivo, stabilizátory, aditiva

Tab. 4 Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi

Složka	Množství (1x vzorek)
PPP Master Mix	5 μ l
Přímý primer	0,2 μ l
Zpětný primer	0,2 μ l
dH ₂ O	4,4 μ l
DNA	0,2 μ l
Konečné množství	10μl

Reakční podmínky amplifikace:

- | | | |
|-----------------------|------|----------|
| 1. Úvodní denaturace | 94°C | 5 min. |
| 2. Denaturace | 94°C | 1 min. |
| 3. Annealing | 57°C | 1 min. |
| 4. Elongace | 72°C | 1 min. |
| 5. Závěrečná elongace | 72°C | 7 min. |
| 6. Chlazení | 4°C | ∞ |

*Opakování 2. - 4. kroku 35x

Celkový objem reakční směsi (10 μ l) pro PCR reakci byl míchán na ledu. Jednotlivé složky před i po namíchání byly vždy vortexovány na BioVortex V1 Biosan). K samotné amplifikaci specifických úseků genu *TG* docházelo v automatickém termocykleru PTC-200 (MJ Research Inc.). Po PCR reakci se vzorky využily pro další reakci, nebo se uchovaly při teplotě -20°C. Elektroforeticky se na 3% agarósovém gelu ověřil výsledek PCR reakce.

4.3 Elektroforéza

Horizontální agarózové gelová elektroforéza sloužila ke stanovení přítomnosti PCR produktů a k zjištění genotypů pomocí identifikace velikostí jednotlivých fragmentů, které byly štěpeny odpovídajícím enzymem. V tomto případě štěpil příslušné fragmenty enzym *Bst*YI. Pro stanovení přítomnosti PCR produktu i pro identifikaci fragmentů byl použit 3% agarósový gel o objemu 60 ml. Gel byl vyroben z Agarose SERVA (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Německo) a z TBE pufru (Tris-Borate-EDTA buffer). Pro vizualizaci byl použit ethidium bromid o objemu 0,5 µg/ml (zásobní roztok 5mg/ml) a jako nanášecí pufr byla použita sacharóza složená z 40% sacharózy, vody, 100x TE pufru a bromfenolové modři. Při nanášení markeru a fragmentů po štěpení docházelo vždy k použití nanášecího pufru. U PCR produktu nanášecí pufr nebyl použit z důvodu PPP mixu, který již obsahuje příslušná vizualizační aditiva. Množství PCR produktu nanášeného na gel odpovídalo objemu 4 µl, zatímco objem produktu po RFLP, nanášený na gel, odpovídalo objemu 16,5 µl (15 µl vzorku + 1,5 µl sacharózy). Samotná elektroforéza probíhala v elektroforetické vaně (OMNI-BIO, Brno) ponořená v 1x TBE pufru při napětí 4 V/cm (přístroj: POWER PAC 300, BIO-RAD). Doba elektroforézy odpovídala příslušnému produktu 10 - 30min. Pro určení velikosti fragmentů byly použity DNA hmotností markery o velikosti M50 a M100. Po skončení separace došlo k vizualizaci vzorku pomocí Electronic UV Transilluminator (USA) a fotoaparátu Canon Power Shot G6.

4.4 RFLP

Konečný objem reakční směsi pro fragmentační analýzu byl stanoven na 15 µl. Pro samotnou reakci byl použit enzym *Bst*YI (New England BioLabs Inc., Ipswich, USA), který štěpí v restriční místě 5'...*R*↓*GATCY*...3', kdy *R* = *A* nebo *G* a *Y* = *C* nebo *T*. Fragmenty 295 bp, 178 bp, 72 bp odpovídají po štěpení alele *C* a fragmenty 473 bp, 72 bp po štěpení alele *T*. Inkubace probíhala v automatickém termocykleru PTC-200 (MJ Research Inc.) při teplotě 60°C po dobu jedné noci. Na základě těchto fragmentů lze vyčíst genotypy z agarósového gelu.

Chemikálie:

- NEBuffer 2 (BioLabs New England) – 10x koncentrovaný; objem 1,5ml
- Enzym *Bst*YI (BioLabs New England) – 10,000 U/ml
- dH₂O (Top-Bio s.r.o.) – 1,5ml
- produkt PCR

Tab. 5 Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi

Složka	Množství (1xvzorek)
Produkt PCR	5 µl
Pufr	1,5 µl
Enzym <i>Bst</i> YI	0,1 µl
dH ₂ O	8,4 µl
Konečné množství	15 µl

4.5 Sekvenování PCR produktu

Sekvenování PCR produktu se provádí z důvodu ověření správné identity amplifikovaných fragmentů. Důležité je provést před samotnou přípravou sekvenční reakční směsi purifikaci produktu pomocí MinElute PCR PurificationKit (Qiagen GmbH, Hilden, Německo) spolu s ověřením koncentrace na NanoDropu 200 (ThermoFisherScientific Inc., Waltham, USA). Konečný objem sekvenční reakční směsi byl 10 µl a jeho příprava probíhala pomocí BigDye Terminator Cycle Sequencing v3.1 (Life Technologies Corp., Carlsbad, US) dle manuálu výrobce. Na základě velikosti a koncentrace PCR produktu bylo stanoveno potřebné množství DNA do sekvenční reakční směsi. Od každého sekvenovaného vzorku byly namíchány dvě sekvenční reakční směsi. První směs se namíchala s přímým primerem a druhá směs se zpětným primerem.

Tab. 6 Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi

Složka	Množství (1x vzorek)
DNA	11ng (dle velikosti fragmentu PCR produktu)
dH ₂ O	do 10 µl
Primer přímý, zpětný	0,16 µl
Pufř	1,75 µl
Reakční směs	0,5 µl
Konečné množství	10 µl

V termocykleru GeneAmp PCR Systém 9700 (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA) probíhala amplifikace za těchto podmínek:

1. Úvodní denaturace	96°C	1 min.
2. Denaturace	96°C	10 s
3. Annealing	50°C	5 s
4. Elongace	60°C	4 min.
5. Chlazení	4°C	∞

*Opakování 2. - 4. kroku 25x

Pomocí BigDyeXterminatorTMPurificationKit (Life Technologies Corp., Carlsbad, USA) byla hotová sekvenční směs po amplifikaci znovu purifikována. Purifikace se prováděla z důvodu odstranění neinkorporovaných terminátorů neboli značených dideoxynukleotidů. Poté za použití genetického analyzátoru ABI PRISM 3100-*Avant* (LifeTechnologies Copr., Carlsbad, USA) došlo k analýze vzorků pomocí kapilární elektroforézy a následnému vyhodnocení dat programy Sequence Scanner v1.0. a SequenceAnalysis Software v3.7.

4.6 Popis analýz masa

Analýzy složení masa byly provedeny Ing. Eliškou Dračkovou na Ústavu chovu a šlechtění zvířat.

4.6.1 Stanovení celkového obsahu bílkovin v mase

Vzorek masa (2 -5 g) musel být vysoušen až do konstantní hmotnosti a na základě této hmotnosti byla stanovována sušina. Dále byl použit mořský písek (dосуšen při 105°C do konstantní hmotnosti), který se smíchal se vzorkem. Po vychladnutí se znovu vzorek zvažil a stanovila se sušina.

4.6.2 Stanovení obsahu tuku v mase

Látky rozpustné v xylenu, tetrachlórmetanu a éteru jsou považovány za tuk. Po dobu 6 hodin v extrakčním nástavci Soxhletova přístroje byla sušina extrahována etyléterem. Zbytek rozpouštědla po extrakci byl odpařen a v sušárně baňka s tukem byla vysušena a zvážena.

4.6.3 Stanovení pH masa

Hodnotu pH představuje záporný logaritmus vodíkových iontů. Pomocí vpichové kombinované pH elektrody se provádělo stanovení pH v naříznutém vzorku skalpelem (v nepomletém). Po 7 dnech zrání v chladícím boxu bylo provedeno měření hodnoty pH.

4.6.4 Stanovení obsahu popelovin

Po dobu 8 hodin v Muflově peci při teplotě 550°C - 600° C se vzorek spálil a poté se stanovily popeloviny.

4.6.5 Stanovení celkového obsahu bílkovin v mase

Metodou dle Kjeldahla byl stanoven obsah dusíku ve vzorku. Podle vzorce $N \times 6,25$ se obsah dusíku přepočítal na obsah bílkovin. Následně mineralizací se bílkovinný dusík převedl na amoniak, který byl stanoven titračně po destilaci.

4.6.6 Stanovení barvy masa

Spektrofotometr Konica Minolta – 2600d se použil na měření barvy masa vzorků. Hodnoty výsledků byly udávány v jednotkách (L^*), kde je sledován podíl žlutého (b^*), červeného (a^*) spektra a světlost. Tato metoda pro stanovení barvy masa je dle CIELab.

4.6.7 Stanovení obsahu mastných kyselin v mase

Rozpuštěný vyextrahovaný tuk v isooktanu byl homogenizován v ultrazvuku. Poté pod zpětným chladičem došlo k zahřívání směsi, která vznikla po přidání methanolátu sodného. Ve formě methylesterů jsou uvolňovány mastné kyseliny v alkalickém prostředí v důsledku rychlého štěpení esterové vazby lipidických sloučenin. V kyselém prostředí došlo k esterifikaci volných MK a zneutralizovaný nezreagovaný CH_3ONa vznikl přidáním BF_3 . Dále byl isooktan přidán do horké reagenční směsi a nasycený vodný roztok FAMES a NaCl se do isooktanu intenzivně a krátce vytřepal. Metodou kapilární plynové chromatografie se FAMES (Fatty acid methylester), po jeho rozdělení na vodnou a organickou fázi, analyzoval. Na plynovém chromatogramu HP4890 s kapilární kolonou DB-23 (60 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) se provedla analýza MK a teplotní program byl po měření zvolen od 100 °C * 3 min * 10 °C/min * 170 °C * 0 min * 4 °C/min * 230 °C * 8 min * 5 °C/min * 250 °C * 15 min, teplota detektoru 280°C a teplota injektoru 270°C. Nástřik 2 μ l a dusík byl nosným plynem. Plameno - ionizační detektor (FID) byl připojen k výstupu kolony a programem CSW station (verze 1.7, Data Apex) byly finální chromatogramy zpracovány.

Přehled mastných kyselin stanovených ve vyextrahovaném tuku:

- 1. Nasycené mastné kyseliny:** kys. laurová (C12:0), kys. myristová (C14:0), kys. palmitová (C16:0), kys. stearová (C18:0), kys. arachová (C20:0)
- 2. Nenasycené mastné kyseliny monoénové:** kys. myristoolejová (C14:1), kys. palmitoolejová (C16:1), kys. olejová (C18:1, n-9), kys. gadolejová (C20:1)
- 3. Nenasycené mastné kyseliny dienové:** kys. linolelaidová (C18:2, n-6t), kys. linolová (C18:2, n-6c), konjugovaná kys. linolová, CLA (C18:2, n-9)
- 4. Nenasycené mastné kyseliny polyenové:** kys. γ -linolenová (C18:3, n-6), kys. α -linolenová (C18:3, n-3), kys. arachidonová (C20:4, n-6), kys. timnodová, EPA (C20:5, n-3), kys. adrenová (C22:4, n-6), kys. klupanodonová (C22:5, n-6), kys. dokosapentaenová (C22:5, n-3), kys. dokosaheptaenová, DHA (C22:6, n-3)

4.7 Frekvence alel a genotypů

Frekvence alel a genotypů jsou vypočteny dle rovnic:

Tab. 7 Rovnice pro výpočet absolutní frekvenci genotypů
(Snustad & Simmons, 2009)

Genotyp	Absolutní frekvence
<i>AA</i>	D
<i>Aa</i>	H
<i>aa</i>	R
Σ	D+H+R = N

Tab. 8 Rovnice pro výpočet relativní frekvenci genotypů
(Snustad & Simmons 2009)

Genotyp	Relativní frekvence
<i>AA</i>	$d = D / N$
<i>Aa</i>	$h = H / N$
<i>aa</i>	$r = R / N$
Σ	d+h+r = 1

Tab. 9 Rovnice pro výpočet absolutní frekvenci alel
(Snustad & Simmons, 2009)

Alela	Absolutní frekvence
<i>A</i>	P
<i>a</i>	Q
Σ	P + Q = 2N

Tab. 10 Rovnice pro výpočet relativní frekvenci alel
(Snustad & Simmons, 2009)

Alela	Relativní frekvence
<i>A</i>	$p = (2D + H) / 2N = d + 1/2h$
<i>a</i>	$q = (2R + H) / 2N = r + 1/2h$
Σ	$p + q = 1$

Výpočet genetické rovnováhy populace dle Hardy - Weinbergovi rovnováhy (Urban 2015):

$$p^2 \cdot q^2 = \left(\frac{2pq}{2}\right)^2 \approx d \cdot r = \left(\frac{h}{2}\right)^2 \quad \frac{2pq}{\sqrt{p^2 \cdot q^2}} = 2,00 \approx \frac{h}{\sqrt{d \cdot r}} = 2,00$$

4.8 Asociační analýza

Metoda GLM (smíšený lineární model), v programu SAS v8.2 pro windows 9.1.4. (SAS Institute Inc., Cary, USA), byla použita pro výpočet této asociační analýzy.

Použitá rovnice:

$$y_{ijklmn} = \mu + TG_i + chov_j + otec_k + b * (vek)_l + e_{ijklm}$$

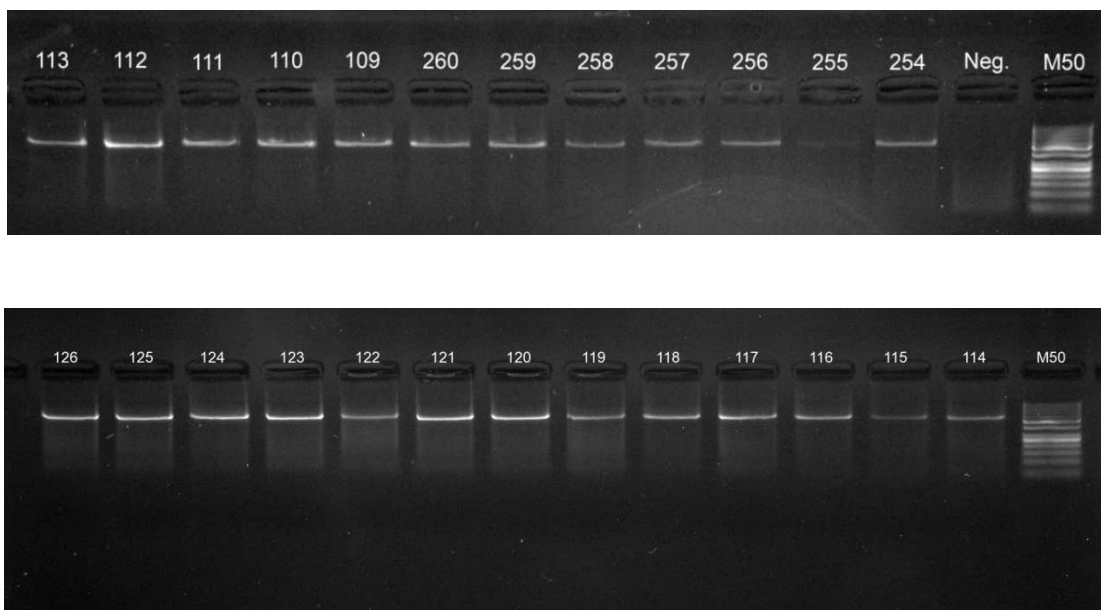
- y_{ijklmn} sledovaný znak
- μ odhadovaný průměr sledovaného znaku
- TG_j pevný efekt genotypu genu ($i = CC, CT, TT$)
- $b * vek_l$ regrese na věk
- e_{ijklmn} náhodná chyba každého pozorování

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

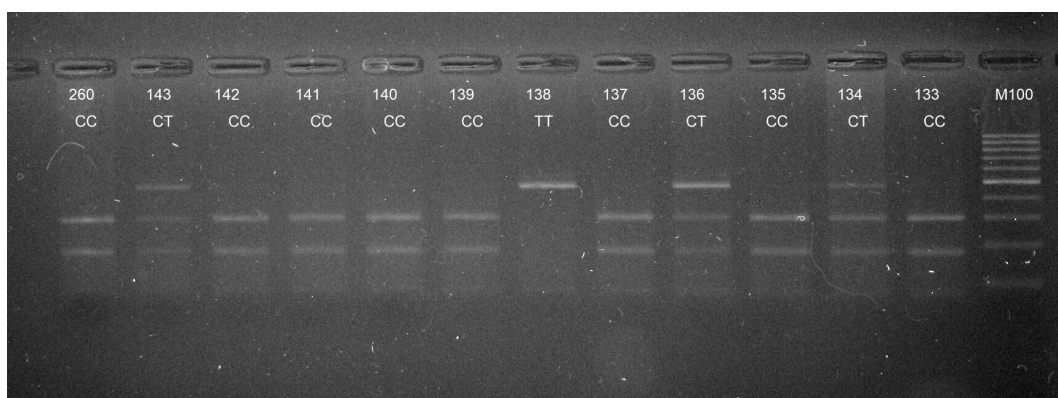
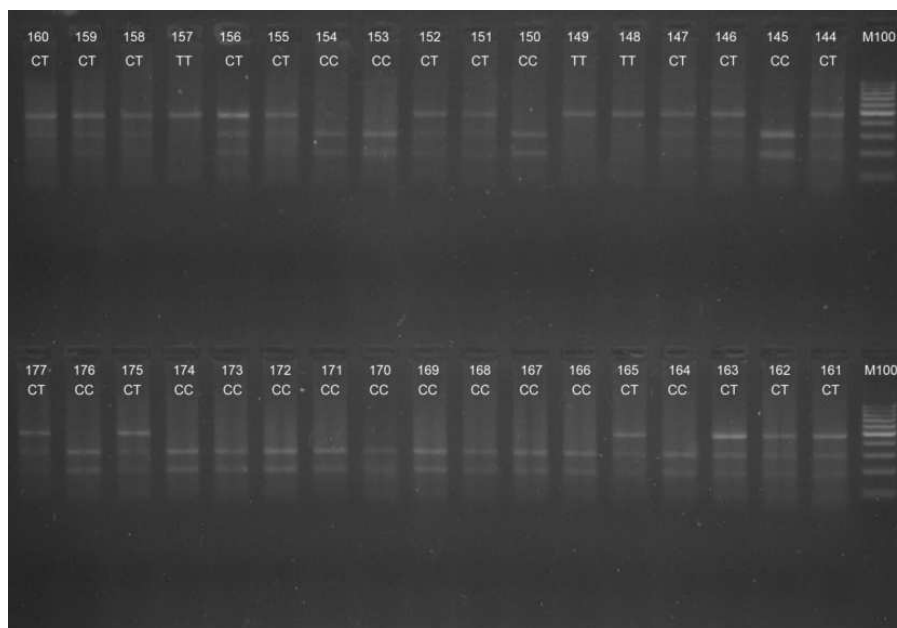
5.1 PCR – RFLP

Metoda PCR byla použita pro amplifikaci úseků genu TG o velikosti 545 bp (viz obr. 7). Metodika reakce byla převzata od původních autorů. Zprvu nedocházelo k správné amplifikaci fragmentů, často nedošlo vůbec k žádné amplifikaci fragmentů, nebo zůstával na agarosovém gelu viditelný smír. Na základě těchto výsledků musela být původní metodika upravena k našim laboratorním podmínkám. V první řadě byl upraven způsob míchání, který po konzultaci následně probíhal na ledu. Pravděpodobně při míchání reakčního mixu za pokojové teploty docházelo k předběžné aktivitě jednotlivých chemikálií a tím poté probíhala amplifikace špatně. Dále byly upraveny jednotlivé amplifikační cykly. Po těchto úpravách probíhala amplifikace správně s jedinou chybou, že negativní vzorky vycházely na gelu pozitivně. Tento problém byl odstraněn po změně laboratorního boxu a zkumavek. Následně po úpravě metodiky byly amplifikované fragmenty, pomocí metody RFLP štěpeny restriční endonukleázou *Bst*YI. Fragmenty, které vznikly štěpením, odpovídaly svoji délkou příslušným alelám (*C*, *T*). Alele *C* přísluší fragmenty o velikosti 295, 178, 72 bp a alele *T* přísluší fragmenty o velikosti 473 a 72 bp (viz obr. 8).

Obr. 5 PCR produkty po amplifikaci (3% agarosový gel)



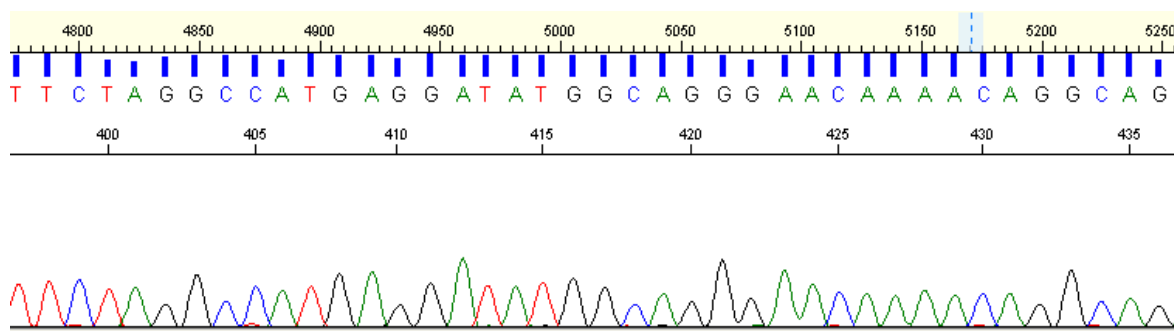
Obr. 6 Štěpené fragmenty enzymem *Bst*YI (3% agarósový gel)



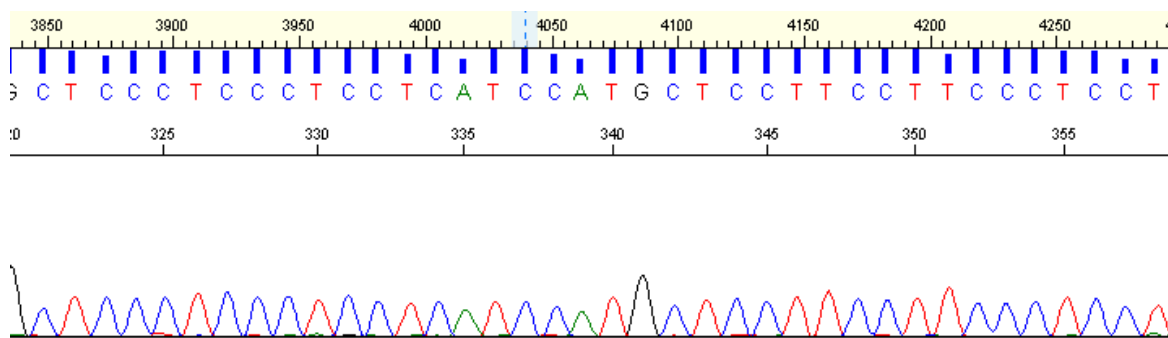
5.2 Sekvenování PCR produktu

Samotné přímé sekvenování PCR produktu bylo prováděno pro ověření identity amplifikovaných fragmentu genu *TG*. Za použití genetického analyzátoru ABI PRISM 3100-*Avant* (Life Technologies Copr., Carlsbad, USA) došlo k analýze vzorků pomocí kapilární elektroforézy a následnému vyhodnocení dat (výstupy) programy Sequence Scanner v1.0. a SegenceAnalysis Software v3.7.

Obr. 7 Ukázka sekvence genu *TG* v programu Sequence Scanner v1.0



Obr. 8 Ukázka sekvence genu *TG* v programu Sequence Scanner v1.0



5.3 Frekvence alel a genotypů u sledované skupiny

Frekvence alel a genotypů byla počítána u 231 jedinců (býků). Počítala se absolutní a relativní frekvence alel a genotypů genu *TG* (viz tabulka).

Tab. 11 Vypočet absolutní a relativní frekvence genotypů

Genotypy	Absolutní	Relativní
<i>CC</i>	123	0,533
<i>CT</i>	96	0,416
<i>TT</i>	12	0,052
Celkem	231	1

Tab. 12 Výpočet absolutní a relativní frekvence alel

Alela	Absolutní	Relativní
<i>C</i>	342	0,7408
<i>T</i>	120	0,2598
Celkem	462	1

Výpočet genetické rovnováhy:

$$\frac{2 \cdot 0,7408 \cdot 0,2597}{\sqrt{0,549 \cdot 0,0674}} = 2$$

$$\frac{0,4156}{\sqrt{0,533 \cdot 0,0519}} = 2,5$$

Absolutní a relativní frekvence alel a genotypů byly vypočteny z předem určených genotypů genu *TG*. Ve sledované populaci na základě výsledků frekvencí lze odvodit, že nejvíce vyskytující se genotyp ve skupině byl *CC* (53,25%), poté genotyp *CT* (41,56%) a nejméně se vyskytoval genotyp *TT* (5,19%). Alela *C* (74,08%) je početnější v této populaci než alela *T* (25,98%). Chung *et al.* (2007) v populaci korejského skotu publikoval frekvenci genotypu *TT* na úrovni 13% u sledovaného SNP v *TG* genu. Předchozí studie uvádějí frekvenci *TT* genotypu u skotu v rozmezí 6,7% - 18,9%. Z tohoto vyplývá, že výskyt genotypu *TT* získaný ve sledované populaci je mírně podprůměrný.

Naopak získané frekvence alel v této práci se přibližují frekvencím u korejské populace publikovaným Chung *et al.* (2007) - frekvence alely *C* 64,1%, alely *T* 35%. Takto vysokou frekvenci alely *T* publikoval také Anton *et al.* (2011) u plemen angus a Casas *et al.* (2007) u plemene wagyu (*T* 31%) spolu s populací složenou z plemen hereford, angus, red angus, simmental, gelbvieh, limousin a charolais (*T* 24%). U bráhmanského skotu publikoval Casas *et al.* (2005) frekvenci genotypu *CC* 94,6% a frekvence alely *C* 96,6% a alely *T* 3,4%, což se neshoduje s frekvencemi získané v této práci. Důvodem je vyšší frekvence alely *T* u sledované populace v této práci. Podobné frekvence genotypů a alel, které publikoval Casas *et al.* (2005), publikovali také

Bonilla *et al.* (2010) u indického a taurinského skotu a Panniere *et al.* (2010) u plemene hereford. Studovaná populace v této práci není na základě výsledků v genetické rovnováze ($2 \approx 2,5$).

5.4 Asociační analýza

Tabulka 13 udává počet zvířat, průměrné hodnoty, rozptyl, směrodatné odchylky, minimální a maximální hodnoty proměnných, které byly analyzovány.

Tab. 13 Popisná analýza proměnných

Znak	N	Průměr	σ^2	σ	Min.	Max.
Sušina (%)	255	25,234	1,313	1,146	21,840	29,930
IMT (%)	255	1,994	1,156	1,075	0,260	7,860
Bílkoviny (%)	255	21,21	0,485	0,696	19,02	22,72
N-látky (%)	255	3,392	0,012	0,112	3,040	3,640
Popeloviny (%)	255	1,080	0,002	0,048	0,830	1,240
Barva (%)	255	3,852	0,576	0,759	2,033	6,395
pH	255	5,645	0,072	0,269	5,410	6,840
C12:0	175	0,071	0,00049	0,022	0,034	0,206
C14:0	175	2,683	0,213	0,461	1,411	4,035
C14:1	175	0,424	0,033	0,183	0,085	1,127
C16:0	175	28,00	3,632	1,906	21,09	32,03
C16:1	175	2,958	0,511	0,715	1,134	5,013
C18:0	175	19,47	9,100	3,017	12,94	27,90
C18:1, n9c	175	40,68	10,39	3,223	26,91	48,28
C18:2, n6t	175	3,683	2,744	1,657	1,807	16,37
C18:3, n6	175	0,126	0,001	0,037	0,012	0,298
C18:3, n3	175	0,427	0,014	0,118	0,185	1,350
C18:2, n9	175	0,201	0,005	0,068	0,039	0,346
C20:0	175	0,147	0,003	0,054	0,083	0,496

C20:1	175	0,177	0,002	0,042	0,082	0,322
C20:4, n6	175	0,522	0,349	0,590	0,049	5,376
C20:5, n3	175	0,055	0,008	0,089	0,004	0,630
C22:4, n6	175	0,100	0,013	0,112	0,010	0,954
C22:5, n6	175	0,062	0,010	0,100	0,004	0,736
C22:5, n3	175	0,156	0,028	0,168	0,013	1,275
C22:6, n3	175	0,05	0,006	0,076	0,004	0,584

***Poznámka k tabulce:**

n = počet zvířat, σ^2 = rozptyl, σ = směrodatná odchylka, Min. = minimální hodnota, Max. = maximální hodnota

Tab. 14 Asociace genotypu *TG* se sledovanými znaky

Znak	Genotyp polymorfismu			Průkaznost		
	CC (n = 123) LSM ±SE	CT (n = 96) LSM ±SE	TT (n = 12) LSM ±SE	CC-CT	CC-TT	CT-TT
Sušina (%)	25,57 ± 0,256	25,27 ± 0,274	25,21 ± 0,406	0,062	0,295	0,868
IMT (%)	2,29 ± 0,253	2,11 ± 0,269	1,99 ± 0,396	0,249	0,359	0,711
N-látky (%)	3,39 ± 0,025	3,40 ± 0,023	3,40 ± 0,041	0,387	0,774	0,911
Pop. (%)	1,08 ± 0,011	1,08 ± 0,011	1,08 ± 0,016	0,603	0,987	0,792
Barva (%)	3,96 ± 0,152	3,83 ± 0,161	3,78 ± 0,236	0,131	0,348	0,825
pH (%)	5,58 ± 0,061	5,58 ± 0,064	5,72 ± 0,092	0,992	0,062	0,062
C12:0	0,074 ± 0,007	0,067 ± 0,008	0,071 ± 0,010	0,042	0,717	0,524
C14:0	2,74 ± 0,163	2,69 ± 0,168	2,82 ± 0,215	0,564	0,622	0,439
C14:1	0,52 ± 0,064	0,54 ± 0,066	0,57 ± 0,085	0,573	0,426	0,602
C16:0	29,12 ± 0,678	29,08 ± 0,700	29,12 ± 0,890	0,879	0,999	0,942
C16:1	2,92 ± 0,250	3,03 ± 0,258	3,00 ± 0,331	0,339	0,731	0,904
C18:0	18,31 ± 1,010	17,71 ± 1,043	17,84 ± 1,336	0,206	0,630	0,893
C18:1,n9c	41,60 ± 1,120	42,21 ± 1,155	41,573 ± 1,49	0,245	0,982	0,557
C18:2,n6t	3,05 ± 0,588	3,04 ± 0,606	2,98 ± 0,779	0,975	0,908	0,920
C18:3,n6	0,12 ± 0,013	0,13 ± 0,013	0,14 ± 0,017	0,545	0,141	0,237

C18:3,n3	0,40 ± 0,043	0,40 ± 0,044	0,39 ± 0,056	0,899	0,779	0,827
C18:2,n9	0,21 ± 0,023	0,21 ± 0,024	0,22 ± 0,030	0,552	0,744	0,537
C20:0	0,15 ± 0,019	0,14 ± 0,020	0,12 ± 0,025	0,302	0,229	0,481
C20:1	0,18 ± 0,015	0,19 ± 0,015	0,17 ± 0,020	0,145	0,666	0,253
C20:4, n6	0,40 ± 0,211	0,42 ± 0,218	0,46 ± 0,280	0,800	0,780	0,876
C20:5, n3	0,039 ± 0,031	0,02 ± 0,032	0,07 ± 0,041	0,105	0,314	0,073
C22:4, n6	0,08 ± 0,040	0,08 ± 0,0414	0,11 ± 0,053	0,860	0,410	0,362
C22:5, n6	0,06 ± 0,034	0,04 ± 0,036	0,08 ± 0,045	0,254	0,403	0,163
C22:5, n3	0,13 ± 0,060	0,13 ± 0,061	0,19 ± 0,079	0,813	0,321	0,268
C22:6, n3	0,04 ± 0,026	0,02 ± 0,027	0,06 ± 0,033	0,203	0,295	0,096

* **Poznámka k tabulce:**

n = počet jedinců, LSM ± SE = Least squares means ± standard error,
n3 = omega-3 mastné kyseliny, n6 = omega-6 mastné kyseliny

Glykoprotein thyroglobulin je prekursorem thyroidních hormonů T₃ (triiodothyronin) a T₄ (thyroxin), které hrají při diferenciaci a vzniku tukových buněk důležitou roli (Granner 1998). Za kandidátní gen pro obsah intramuskulárního tuku je považován thyroglobulin. Ukládání intramuskulárního tuku a vývoj tukových buněk je v blízkém vztahu s intenzitou metabolismu, kterou ovlivňuje hladina tyroxinu a triiodothyroninu (Mars *et al.* 2002).

Barendse *et al.* (2010) ve své studii zveřejnil polymorfismus C4227 genu *TG*, který má vliv na marbling skóre a množství IMT u skotu. Na základě jeho výzkumu a výsledků byl zjištěn vztah genotypu TG5 a marbling skóre, kdy vyššího až vysokého marbling skóre dosahovali především homozygotní jedinci *TT* (P<0,05) (Barendse *et al.* 1997). Z této a pozdější studie, která byla provedena také Barendsem *et al.* (2001), bylo odhadnuto, že výsledný marbling fenotypu představuje 6,5% genotypu TG5 a jedinci s genotypem *CC* a *CT* dosáhli v průměru nižších hodnot než jedinci s genotypem *TT*. Burrell *et al.* (2004) také potvrdil, že genotyp *TT* je spojen s vyšším stupněm marbling skóre u masného skotu. Thaller *et al.* (2003) ve své práci zjistil,

že genotyp *TT* má vliv na intramuskulární tuk pouze v *musculus longissimus* u holštýnského skotu. Casas *et al.* (2007) potvrdil vztah genotypu *TT* ($p < 0,02$) s množstvím intramuskulárního tuku u wagyho plemene. Jedinci také s genotypem *TT* vykazovaly vyšší marbling skóre. Zatímco Shin & Chung (2007) ve své studii u korejského skotu vyvrátil významnou spojitost genotypu *TT* s vyšším marbling skóre. Jedinci s genotypem *CC* a *CT* ($p < 0,05$) vykazovaly vyšší hodnoty mramorování. Casas *et al.* (2005) ve své studii u brahmanského skotu (467 jedinců) nepotvrdil vliv alely *T* na množství intramuskulárního tuku, ale zjistil spojitost tohoto polymorfismu s výškou tuku nad dvanáctým žebrem ($p < 0,05$). Je nutné brát v úvahu, že se v populaci vyskytovalo pouze 18 jedinců s genotypem *CT* a 7 jedinců s genotypem *TT*. Ricker *et al.* (2006) nenašel u plemen simental, pomocí komerčně dostupného DNA testu GeneSTAR, žádný vztah polymorfismu k jatečně upravenému tělu skotu a k intramuskulárnímu tuku. V roce 2007 Eenennaam *et al.* ve své studii nepotvrdil vztah marbling skóre s tímto polymorfismem (C422T). Žádnou spojitost s obsahem IMT v *m.sm.* (*musculus semimembranosus*) a v *m.l.l.* (*musculus longissimus lumborum*) také publikoval ve své studii Pannier *et al.* (2010), kdy zkoumaná populace byla tvořena kříženci plemene holštýnského skotu, limousin, hereford, charolaise a masného simentálu.

Ve výsledcích této práce byl nalezen rozdíl pouze (viz. tabulka 14) mezi genotypy *CC-CT* v obsahu kyseliny laurové ($p < 0,05$). Kyselina timnodová ($p < 0,073$) a pH masa ($p < 0,062$) se hodnotami blížily k průkaznosti. V této práci není viditelný vliv polymorfismů genu *TG* na IMT ve sledované populaci, jak také publikovali ve své v práci Ricker *et al.* (2006), Eenennaam *et al.* (2007) a Pannier *et al.* (2010). Avšak alela *C* ($p < 0,249$) má nepatrné tendence zvyšovat množství IMT. Na základě těchto výsledků i srovnání s literaturou, nelze tento marker doporučit k využití v selekci. Jedná se o kvantitativní znaky, které jsou ovlivňovány i dalšími geny, jejichž variabilitu neznáme a také rozdílnými faktory prostředí.

6 ZÁVĚR

Hlavní cílem diplomové práce bylo zvládnutí základních molekulárně genetických metod pro genotypizaci zkoumané populace (PCR, RFLP, horizontální agarosová elektroforéza).

Dalším cílem bylo stanovit absolutní a relativní frekvence alel a genotypů. Kdy ve sledované populaci byla stanovena vysoká frekvence alely *T* (25,98 %). Naopak frekvence genotypu *TT* byla stanovena jen na 5,19 %. Dle Hardy - Weinbergovi rovnováhy není tato sledovaná populace v genetické rovnováze.

Fragment genu *TG* o velikosti 548 bp byl detekován díky primerům, které byly publikovány původními autory. U genu *TG* byl nalezen průkazný rozdíl pouze mezi genotypy *CC-CT* v obsahu kyseliny laurové ($p < 0,05$). Kyselina timnodová a pH masa se výslednými hodnotami blížily k průkaznosti ($p < 0,1$). Pro chovatele je toto zjištění velice užitečné, protože tato kyselina patří mezi tzv. PUFA kyseliny (omega 3 nenasyčené mastné kyseliny), které mají pozitivní vliv např. na kardiovaskulární systém, upravují rheologické vlastnosti krve, stabilizují myokard nebo snižují ischemické poškození. Vliv polymorfismů genu *TG* na IMT a marbling masa není viditelný, avšak tendence zvyšovat množství IMT má alela *C* ($p < 0,249$).

Chovatelé mají vysoké požadavky na obsah IMT, který ovlivňuje křehkost, šťavnatost a celkovou kvalitu masa. Proto na základě výsledků této práce je vhodné si ponechat v tomto stádě jedince obsahující v genotypu alespoň jednu alelu *C* (genotyp *CC* nebo *CT*), která má nepatrný vliv na zvyšování IMT a množství mastné kyseliny laurové ve sledované populaci.

7 POUŽITÁ LITERATURA

Argetsinger L.S., Cartes-Su C., 1996: *Growth hormone signalling mechanisms: involvement of the tyrosine kinase JAK2*. Hormone Research, 45: 22-24. ISSN 0301-0163.

Barash I.A., Chung C.C., Weigle D.S., Ren H., Kabigting E.B., Kujper L.J., 1996: *Leptin is a metabolite signal to the reproductive system*. Endocrinology, 137: 3144-3147. ISSN 1945-7170.

Bartoň L., Kott T., Řehák D., Zahradková R., Kottová B., 2009: *The polymorphisms of stearoyl-CoA desaturase (SCD1) and sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) genes and their association with the fatty acid profile of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls*. Meat Science, 85: 15-20. ISSN 0309-1740.

Bednář J., Kuciel J., Vyhnánek T., 2006: *Genetika*. Brno: MZLU, 158 s. ISBN 8071578622.

Barendse W., Bunch R.J., Harrison B.E., 2005: *The LEP C73T missense mutation is not associated with marbling and fatness traits in a large gene mapping experiment in Australian cattle*. Animal Genetics, 36: 86 – 88. ISSN 1365-2052.

Barendse W., Vaiman D., Kemp S.J., Sugimoto Y., Armitage S.M., Williams J.L., Sun H.S., Eggen A., Agaba M., Aleyasin S.A., Band M., Bishop M.D., Buitkamp J., Byrne K., Collins F., Cooper L., Coppettiers W., Denys Drinkwater R.D., Easterday K., Elduque C., Ennis S., Erhardt G., Ferretti L., Flavin N., Gao Q., Georges M., Gurung R., Harlizius B., Hawkins G., Hetzel J., Hirano T., Hulme D., Jorgensen C., Kessler M., Kirkpatrick B.W., Konfortov B., Kostia S., Kuhn C., Lenstra J.A., Leveziel H., Lewin H.A., Leyhe B., Lil L., Martin Burriel I., McGraw R.A., Miller J.R., Moody D.E., Moore S.S., Nakane S., Nijman I.J., Olsaker I., Pomp D., Rando A., Ron M., Shalom A., Teale A.J., Thieven U., Urquhart B.G.D., Vage D.I., Van de Weghe A., Varvio S., Velmala R., Vilkki J., Weikard R., Woodside C., Womack J.E., Zanotti M., Zaragoza P., 1997: *A medium-density Genetic Linkage Map of the Bovine Genome*. Mammalian Genome, 8: 21 – 28. ISSN 1432-1777.

Barendse W., Bunch R., Thomas M., Armitage S., Baund S., Donaldson N., 2005: *The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle*. Australian Journal of Experimental Agriculture, 44: 669-674. ISSN 0816-1089.

Barendse W., 1997: *Assessing lipid metabolism, International patent application PC-TA/AU98/00882* [online]. International patent publication WO 99/23248. ISBN 9280506013 [cit. 2015- 25-02]. Dostupné na: <http://ep.espacenet.com>

Barendse W., Bunch R., Thomas M., Armitage S., Baud S., Donalds N., 2001: *The TG5 marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle* [online]. Livestock library. ISBN 2044-3870 [cit. 2015 - 25-02]. Dostupné na: www.beef.crc.org.au/Publications/MarblingSym/Day1/Tg5DNA

Barendse W., 2001: *Gene tests offer selection tool for marbling*, Farming Ahead, 109: 66-67. ISSN 1038 -1678.

Buckingham M., 1992: *Making muscle in mammals*. Trends in Genetics, 8: 144-149. ISSN 0168-9525.

Campbell E.M.G., Gallanger D.S., Davis S.K., Taylor J.F., Smith S.B., 2001: *Rapid communication: Mapping of the bovine stearoyl-coenzyme Adenaturase (SCD) gene to BTA26*. J. Anim. Sci., 79, 1954-1955, ISSN 1740-0929.

Castillo J.A., Pabón M.L., Olivera M., Carulla J.E., 2010: *Role of stearoyl CoA desaturase on conjugated Linoleic acid concentration in bovine milk: review*. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias, 23: 493 – 500. ISSN 2265-2958.

Di Stasio L., Brugiapaglia A., Destefanis G., Albera A., Sartore S., 2003: *GHI as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle*. J. Anim. Breed. Genet., 120: 358-361. ISSN 1439-0388.

Eenennaam A., 2005: *Marker – Assisted Selection in Beef Cattle* [online], Animal science. ISSN 1740-0929 [cit. 2015- 23-02]. Dostupné na: <http://animalscience.ucdavis.edu>

Eggen A., 2012: *The development and application of genomic selection as a now breeding paradigm*. Animal Frontiers., 2: 10-15. ISSN 2160-6056.

Ensemble, 2015: *Struktura genu TG*. Databáze online [cit. 2015- 25-02] Dostupné na: www.ensembl.org

Flisikowski K., Oprzadek J., Dymnicki E., Zwierzchowski L., 2003: *New polymorphism in the bovine STAT5A gene and its association with meat production traits in beef cattle*. Animal Science Papers and Reports, 21: 147-157. ISSN 0860-4037.

Gazdová V., Verner J., Humpolíček P., 2006: *Geny MYOD rodiny v masné užítkovosti prasat plemene české bílé ušlechtilé*. Acta fylotechnica et zootechnica, 9-10. ISSN 1336-9245.

Ge W., Davis M.E., Hines H.C., Irvin K.M., Simmen R.C.M., 2001: *Association of genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle*. Journal of Animal Science, 79: 1757-1762. ISSN 1740-0929.

GenBank, 2015: *Struktura genu LEP*. Databáze online [cit. 2015- 25-02]. Dostupné na: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Gibbs R., Weinstock G., 2004: *Bovine Genomic Sequencing Initiative* [online]. USDA. ISSN 0748-1284 [cit. 2015- 18-02]. Dostupné na: www.usda.gov

Glaum S.R., Hara M., Bindokas V.P., Lee C.C., Podonsky K.S., Bell G.I., Miller R.J., 1996: *Leptin, the obese gene product, rapidly modulates synaptic transmission in the hypothalamus*. Molecular Pharmacology, 50: 230-235. ISSN 1521-0111.

Gonzalez-Cadavid N.F., Taylor W.E., Yarasheski K., Sinha-Hikim I., Ma K., Ezzat S., Shen R., Lalani R., Asa S., Mamita M., Nair G., Arves S., Bhasin S., 1998: *Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting*. PNAS, 95: 14938-14943. ISSN 1091-6490.

Gordon D.F., Quick D.P., Erwin C.R., Donelson J.E., Maurer R. A., 1983: *Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene*. Mol. Cell. Endocrinol., 33: 81-95. ISSN 0303-7207.

Granner D. K., 1998: *Hormony štítné žlázy*, s. 525 - 527. In: Murray R. K.,: Harperova biochemie. H&H, 824 s. ISBN 8085787385.

Granner D. K., 1998: *Hormony štítné žlázy*, s. 534-535. In: Murray R. K.,: Harperova biochemie. H&H, 824 s. ISBN 8085787385.

Grisart B., Coppieters W., Farnir F., Karim L., Ford Ch., Berzi P., 2001: *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*. Cold Spring Harb, 12: 222-231. ISSN 2157-1422.

Grobet L., Ponclet D., Royo L.J., Brouwers B., Pirottin D., Michaux C., Menissier F., Zanotti M., Dunner S., Georges M., 1998: *Molecular definitiv of an allelic series of nutations disrupting the myostatin fiction and causing double-muscling in cattle*. Mammalian Genome, 9: 210-213. ISSN 1432-1777.

Grobet L., Martin L.J.R., Pronclet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoberlin A., 1997: *A deletion in the bovine myostatin gene cause the double-muscléd phenotyp in cattle*. Nature Genetics, 17: 71-74. ISSN 1061-4036.

Gyapay G., Morisette J., Vignal A., Dib C., Fizames C., Millaseau P., 1994: *The 1993-1994 Genethon human genetic linkage map*. Nature Genet., 7: 246-339. ISSN 1471-0056.

Hediger R., Johnson S.E., Barendse W., Drinkwater R.D., Moore S.S., Hetzel J., 1990: *Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-qter in cattle and to 11q25-qter in sheep by in situ hybridization*. Genomics, 8:171-174. ISSN 0888-7543.

Herring A. D., 2012: *Genetics aspekt of marbling in beef carcasses* [online].
[cit. 2015- 18-02]. Dostupné na: <http://www.cabpartners.com/articles/news/222/CAB-Review-of-Marbling.pdf>

Hines H.C., Ge W., Zhao Q., Davis M.E., 1998: *Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor I loci with lactation traits in Holsteins*. Animal Genetics, 29: 63. ISSN 1365-2052.

Hrouz J., Šubrt J., 2007: *Obecná zootechnika*, Brno: MZLU, 205 s. ISBN 9788073751159.

Hruban V., Majzlík I., 200: *Obecná genetika*, Praha, 301 s. ISBN 8021306009.

Hudson T.J., Stein L.D., Gerety S.S., Ma J., Castle A.B., Silva J., 1995: *An STS-based map of the human genome*. Science, 270: 1945- 1954. ISSN 0036-8075.

Hou G.Y., Yuan Z.R., Zhou H.L., Zhang L.P., Li J.Y., Gao X., Wang D.J., Gao H.J., Xu S.Z., 2011: *Association of thyroglobulin gene variants with carcass and meat quality traits in beef cattle*. Molecular Biology Reports, 38: 4705 – 4708.
ISSN 0301-4851.

Houquette J. F., Lehnerte S., Barendse W., Cassar-Malek I., Picard B., 2007: *Recent Advances in Cattle Functional Genomics and their Application to Beef Quality*. Animal, 1: 1597-173. ISSN 1751-7311.

Chang K.Ch., Fernandes K., Chantler, P.D., 1995: *Cloning and in vivo expression of the pig MyoD gene*. J. Muscle Res. Cell Motil, 122: 2074-2080. ISSN 1573-2657.

Charoensook R., Knorr Ch., Brenig B., Gatphayak K., 2013: *Thai pigs and cattle production, genetic diversity of livestock and strategies for preserving animal genetic resources* [online]. Maejo International Journal of Science and Technology. ISSN 1905-7873 [cit. 2015- 18-02]. Dostupné na: www.mijst.mju.ac.th/vol7/113-132.pdf

Chen K.S., Paladugu A., Aldaz C.M., Gould M.N., 1996: *Cloning and chromosomal localization of the rat STAT5 and Yy1 genes*. Cytogenetics and Cell Genetics, 74: 277-280. ISSN 1424-859X.

Chládek G., 2005: *Masná užítkovost*, s. 81. In: Žižlavský J.: *Chov hospodářských zvířat*. Brno: MZLU, 209 s. ISBN 8071576158.

Chung E.R., Shin S.C., Shin K.H., Chung K.Y., 2008: *SNP Discovery in the Leptin Promoter Gene and Association with Meat Quality and Carcass Traits in Korean Cattle*. Asian-Australian Journal of Animal Science, 21: 1689 – 1695. ISSN 1011-2367.

Chung E.R., Kim W.T., 2005: *Association of SNP Marker in IGF-I and MYF Candidate Genes with growth Traits in Korean Cattle*. J. Anim. Sci., 18: 1061-1065. ISSN 1740-0929.

Jakubec H., Říha J., Majzlík I., Bjelka M., 2003: *Teorie a praxe selekce hospodářských zvířat*, Rapotín, 154 s. ISBN 8090314325.

Kaupe B., Winter A., Fries R., Erhardt G., 2004: *DGAT1 polymorphism in Bos indicus and Bos taurus cattle breeds*. Journal of Dairy Research, 71: 182 – 187. ISSN 1469-7629.

Karim L., Coppiteters W., Grobet L., Valentini A., Georgers M., 2000: *Convenient genotyping of six myostatin mutations causing doublemuscling in cattle usány a multiplex oligonucleotide ligation assay*. Animal Genetics, 31: 396-399. ISSN 1365-2052.

Keating A.F., Kennelly J.J., Zhao F.Q., 2006: *Characterization and regulation of the bovine stearyl-CoA denaturase gene promoter*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 344: 233-240. ISSN 1090-2104.

Khatib H., Zaitoun I., Chang Y. M., Maltecca C., Boettcher P., 2007: *Evaluation of association between polymorphism within the thyroglobulin gene and milk production traits in dairy cattle*, J. Animal. Breed. Genet. 124, 26-28. ISSN 1439-0388.

Knoll A., Vykoukalová Z., 2002: *Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfismů DNA genů)*. Brno: MZLU, 100 s. ISBN 80-7157-616-6.

Kononoff P.J., Deobald H.M., Stewart E.L., Laycock A.D., Marquess F.L.S., 2005: *The effect of a leptin single nucleotide polymorphism on quality grade, yield grade, and carcass weight of beef cattle*. Journal of Animal Science, 83: 927 – 932. ISSN 1740-0929.

Kury J., Kapelanski W., Cieslak D., Pierzchala M., Grajewska S., Bocian M., 2002: *Are polymorphism in non-coding regions of porcine MyoD genes suitable for Predicting meat and fat deposition in the carcass?*. Animal Science Papers and Reports, 20: 245-254. ISSN 0860-4037.

Lee S.H., Gondro C., Werf J., Kim N.K., Lim D.J., Park, E.W., Oh S.J., Gibson J.P., Thompson J.M., 2010: *Use of a bovine genome array to identify new biological pathways for beef marbling in Hanwoo (Korean Cattle)*. BMC Genomics, 11: 623. ISSN 1471-2164.

Lee J.H., Lee Y.M., Lee J.Y., Oh D.Y., Jeong D.J., Kim J.J., 2013: *Identification of Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) of the Bovine Growth Hormone (bGH) Gene Associated with Growth and Carcass Traits in Hanwoo*. Asian Australas. J. Anim. Sci., 26: 1359-1364, ISSN 1976-5517.

Ledvina M., 1993: *Biochemie*. Karolinum UK: Praha, 390 s. ISBN 80-7066-757-5.

Lechner J., Welte T., Doppler W., 1997: *Mechanism of interaction between the glucocorticoid receptor and STAT5: role of DNA-binding*. Immunobiology Journal, 198: 112-123. ISSN 0171-2985.

Liu J.P., Baker J., Perkins A.S., Robertson E.J., Efstratiadis A., 1993: *Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-I) and type I IGF receptor (Ighr)*. Cell, 75: 59-72. ISSN 0092-8674.

Mannen H., 2011: *Identification and utilization of genes associated with beef qualities*. Animal Science Journal, 82: 1 – 7. ISSN 1740-0929.

Mayes A. P., 1998: *Přehled intermediálního metabolismu*, s. 161-164. In: Murray R. K.: Harperova biochemie. H&H, 824 s. ISBN 8085787385.

McCracken J.Y., Molenaar A.J, Snell R.J., Davey H.W., Wilkins R.J., 1997: *A polymorphic TG repeat present within the bovine STAT5A gene*. Animal Genetics, 28: 453-464. ISSN 1365-2052.

McPherron A.C., Laeler A.M., Lee S.J., 1997: *Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member*. Nature, 387: 83-90. ISSN 0028-0836.

McPherron A.C., Lee S.J., 1998: *Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene*. Proceedings of the National Academy of Sciences in the United States of America, 94: 12457-12461. ISSN 1091-6490.

Mears, G.F.J., Mir P.S., Bailey D.R.C., Jones S.D.M., 2001: *Effect of Wagyu genetics on marbling backfat and circulating hormones in cattle*. Can. J. Anim. Sci., 81: 65-73. ISSN 1918-1825.

Moody D.E., Pomp D., Barendse W., 1996: *Linkage mapping of the bovine insulin-like growth factor-1 receptor gene*. Mammalian Genome, 7: 168-169. ISSN 1432-1777.

Ntambi J. M., Miyazaki M., 2003: *Regulation of stearyl-CoA desaturases and role in metabolism*. Progress in Lipid Research, 43: 91–104, ISSN 0163-7827.

O'Brien S.J., Menotti-Raymond M., Murphy W.J., Nash W.G., Wienberg J., Stanyon R., Copeland N.G., Jenkins N.A., 1999: *The Promise of Comparative genomics in Mammals*. Science, 286: 458-480. ISSN 0036-8075.

Oh D.Y., Lee Y.S., Yeo J.S., 2011: *Identification of the SNP (Single Nucleotide Polymorphism) of the Stearyl-CoA Desaturase (SCD) Associated with Unsaturated Fatty Acid in Hanwoo (Korean Cattle)*. Asian-Australian Journal of animal Science, 24 (6): 757–765. ISSN 1976-5517.

Quick J., Spurling J., 2004: *Bovine Genome sequenced* [online]. USDA. ISSN 0748-1284 [cit. 2015- 15-03]. Dostupné na:
<http://www.usda.gov/wps/portal/usda/usdamobile?contentid=2004/10/0432.xml>

Rincker C.B., Pyatt N.A., Berger L.L., Faulkner D.B., 2006: *Relationship among Gene-STAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental Steers*. Journal of Animal Science, 84: 686 – 693. ISSN 1740-0929

Scollan N., Hocquette J.F., Nuernberg K., Dannenberger D., Richardson I., Moloney A., 2006: *Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality*. Meat Science, 74: 17 – 33. ISSN 0309-1740.

Seifert H., Pitra C., Meyer L., Brunner R.M., Wheeler T.T., Molenaar A., McCracken J.Y., Herrmann J., Thiesen R.M., Schwerin M., 2000: *Molecular characterization of STAT5A- and STAT5B-encoding genes reveals extended intragenic sequence homogeneity in cattle and mouse and different degrees of divergent evolution of various domains*. Journal of Molecular Evolution, 50: 550-561. ISSN 1432-1432.

Sharifzadeh A., Doosti A., 2012: *Investigation of leptin gene polymorphism in iranian native cattle*. Bulg. J. Vet. Med., 15: 86-92. ISSN 131-3543.

Schenkel F.S., Miller S.P., Moore S.S., Nkrumah J.D., Li C., Yu J., Mandell I.B., Wilton J.W., Williams J.L., 2005: *Association of single nukleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle*. Journal of Animal Science, 83: 2009 – 2020. ISSN 1740-0929.

Smith J., Lewis A., Wiener P., Williams J., 2000: *Genetic variaton in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon*. Animal Genetics, 31: 306-309. ISSN 1365-2052.

Snustad P.D., Simmons M.J., 2009: *Genetika*. Masarykova univerzita: Brno. 871 s. ISBN 9788021048522.

Soumillion A., Erkens J.H.F., Lenstra J.A., Rettenberger G., Te Pas M.F.W., 1997: *Genetic variation in the porcine myogenin gene locus*. Mamm. Genome., 8: 37-38. ISSN 1432-1777.

Stasio L. Di., Startore S., Albera A., 2002: *Lack of association of GHI and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle*. Animal Genetics, 33: 61–64. ISSN 1365-2052.

Szewczuk M., Zych S., Czerniawska-Piatkowska E., 2011: *Association between IGF1/TasI polymorphism and milk traits of Polish Holstein Friesian cows*. Archiv fuer Tierzucht, 54: 10-17. ISSN 0003-9438.

Taniguchi M., Mannen H., Oyama K., Shimakura Y., Oka A., Watanabe H., Kojima T., Komatsu M., Harper G.S., Tsuji S., 2004: *Differences in stearyl-CoA desaturase mRNA levels between Japanese Black and Holstein cattle*. Livestock Production Science, 87: 215 – 220. ISSN 1871-1413.

Te Pas M.F.W., Visscher A.H., 1994: *Genetics regulativ of meat production by embryonic muscle formation – a review*. Journal of Animal Breeding and Genetics, 111: 404-412. ISSN 1439-0388.

Thaller G., Kühn C., Winter A., Ewald G., Bellmann O., Wegner J., Zühlke H., Fries R., 2003: *DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition cattle*. Animal Genetics, 34: 354-357. ISSN 1365-2052.

Urban T., 2013: *Schématické znázornění struktury genomu*. Databáze online [cit. 2015-25-02]. Dostupné na: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg2/dna2/geny.htm>

Vadacca *et al.*, 2015: *Činnost a sekrece leptinu*. Databáze online [cit. 2015- 25-03]. Dostupné na: http://www.nature.com/cmi/journal/v8/n3/fig_tab/cmi201075f1.html

Ward R.E., Woodward B., Otter N., Doran O., 2010: *Relationship between the expression of key lipogenic enzymes, fatty acid composition, and intramuscular fat content of Limousin and Aberdeen Angus cattle*. Livestock Science, 127: 22 – 29. ISSN 1871-1413.

Weiner P., Smith J.A., Lewis A.M., Woolliams J.A., Williams J.L., 2002: *Muscle related traits in cattle: the role of the myostatin gene in the South Devon breed*. Genetics Selection Evolution, 34: 221-231. ISSN 1297-9686

Williams J. L, 2005: *The Use of Marker – Assisted Selection in Animal Breeding and Biotechnology* [online], Rev. sci. tech OFF. int. Epiz., ISSN 0253-1993 [cit. 2015-26-02]. Dostupné na: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.131.6791&rep=rep1&type=pdf>

Wind A.E., Larkin D.M., Green Ch.A., Elliott J.S., Olmstead C.A., Chiu R., Schein J. E., Marra M.A., 2005: *A High-resolution whole-genome Cattle-Human Comparative Map Reveals Details of Mammalian Chromosome Evolution*. PNAS, 102: 18526-18531. ISSN 1091-6490.

Winter A., Kramer W., Werner F.A.O., Kollers S., Kata S., Durrstewity G., Buitkamp J., 2002: *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.* PNAS, 99: 9300-9304. ISSN 1091-6490.

Woronuk G.N., Marquess F.L., James S.T., Palmer J., Berryere T., Deobald H., Howie S., Kononoff P.J., 2012: *Association of leptin genotypes with beef cattle characteristics.* Animal Genetics: doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02320.x. ISSN 1365-2052.

Yang D., Chen H., Wang X., Tian Z., Tang L., Zhang Z., Lei C., Zhang L., Wang Y., 2007: *Association of polymorphism of leptin gene with body weight and body size indexes in Chinese indigenous cattle.* Journal of Genetics and Genomics, 34: 400-5. ISSN 1673—8527.

Zadworny D., Kuhnelein V., 1990: *The identification of the Kappa Kasein genotype in Holstein dairy cattle using Polymerase Chain Reaction.* Theoretical and Applied Genetics, 80: 631-634. ISSN 1432-2242.

Zhang H.M., Maddock K.C., Browns D.R., Denise S.K., Ax R.L., 1993: *Bovine growth hormone gene frequencies in samples of U.S. AI bulls.* J. Anim. Sci., 71: 93. ISSN 1740-0929.

Zhang R.F., Chen H., Lei C.Z., Zhang C.L., Lan X.Y., Zhang Y.D., Zhang H.j., Bao B., Niu H., Wang X.Z., 2007: *Association between Polymorphism of MSTN and MYF5 Genes and Growth Traits in Three Chinese Cattle Breeds.* Asian-Australasian journal of animal science, 20: 1798-1840. ISSN 1740-0929.

8 SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Vliv dominance (d) a odhad genové substituce (α) na in vivo znaky (Di Stasio <i>et al.</i> 2003)
Tab. 2	Asociace mezi parametry růstu a genotypy genu <i>IGF</i> (Chung, Kim 2005)
Tab. 3	Použité primery pro gen <i>TG</i>
Tab. 4	Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi
Tab. 5	Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi
Tab. 6	Koncentrace jednotlivých složek reakční směsi
Tab. 7	Rovnice pro výpočet absolutní frekvence genotypů (Snustad & Simmons 2009)
Tab. 8	Rovnice pro výpočet relativní frekvence genotypů (Snustad & Simmons 2009)
Tab. 9	Rovnice pro výpočet absolutní frekvence alel (Snustad & Simmons 2009)
Tab. 10	Rovnice pro výpočet relativní frekvence alel (Snustad & Simmons 2009)
Tab. 11	Výpočet absolutní a relativní frekvence genotypů
Tab. 12	Výpočet absolutní a relativní frekvence alel
Tab. 13	Popisná analýza proměnných
Tab. 14	Asociace genotypu <i>TG</i> na sledované znaky

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1** Přehled metabolismu mastných kyselin znázorňující hlavní metabolické dráhy a jejich koncové produkty. Ketolátky představují acetacetát, 3-hydroxybutyrát a aceton (Murray 1998)
- Obr. 2** Schematické znázornění struktury genomu (Urban 2013)
- Obr. 3** Chromatogram vykazující sekvenční variace na pozicích 354 (T354C), 362 (C362T), 392 (G392A), 400 (A400G), 430 (A430G), 433 (T433G) v 3'UTR oblasti genu *TG* (Hou *et al.* 2011)
- Obr. 4** Činnost a sekrece leptinu (Vadacca *et al.* 2015)
- Obr. 5** PCR produkty po amplifikaci (3% agarósový gel)
- Obr. 6** Štěpené fragmenty enzymem *Bst*YI (3% agarósový gel)
- Obr. 7** Ukázka sekvence genu *TG* v programu Sequence Scanner v1.0
- Obr. 8** Ukázka sekvence genu *TG* v programu Sequence Scanner v1.0

