

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH
BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Studijní program: N4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra: Katedra zootechnických věd

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

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vliv vybraných kandidátních lokusů na ukazatele jakosti
masa u skotu

Vedoucí diplomové práce: Ing. Lenka Hanusová, Ph. D.

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

Autor: Bc. Halina Steblová

České Budějovice, 2014

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2012/2013

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

Jméno a příjmení: **Bc. Halina STEBLOVÁ**
Osobní číslo: **Z12727**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Živočišná biotechnologie**
Název tématu: **Vliv vybraných kandidátních lokusů na ukazatele jakosti masa u skotu**
Zadávací katedra: **Katedra genetiky, šlechtění a výživy**

Zásady pro vypracování:

Cílem diplomové práce je stanovit vliv vybraných lokusů na jednotlivé ukazatele jakosti masa u skotu. Autor vypracuje literární přehled o jednotlivých vybraných lokusech a jejich potenciálním vlivu na jakost masa. Na získaných vzorcích provede genetickou analýzu pro stanovení genotypu v daných lokusech. Následně statisticky vyhodnotí vliv jednotlivých genotypů na vybrané ukazatele jakosti masa. Získané výsledky následně porovná s výsledky předchozích studií jiných autorů.

Práce bude členěna do kapitol:

- 1) úvod
 - 2) literární přehled - vybrané lokusy s potenciálním vlivem na jakost masa u skotu
 - 3) materiál a metody
 - 4) výsledky a diskuze - genetická analýza u získaných vzorků, statistické vyhodnocení výsledků, porovnání výsledků s výsledky studií jiných autorů
 - 5) závěr - shrnutí zjištěných výsledků, formulace praktických doporučení
- Při zpracování diplomové práce budou dodržena obvyklá formální pravidla.

Rozsah grafických prací: 3 - 5 tabulek, 3 - 10 obrázků
Rozsah pracovní zprávy: 40 - 50 stran textu
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:

- Rempel L.A., Casas E., Schackelford S.D., Wheeler T.L. (2012): Relationship of polymorphisms within metabolic genes and carcass traits in crossbred beef cattle. *J Anim Sci*, 90(4): 1311 - 1316.
- Boukha A., Bonfatti V., Cecchinato A., Albera A., Galls L., Carnier P., Psittante G. (2011): Genetic parameters of carcass and meat quality traits of double muscled Piemontese cattle. *Meat Sci*, 89(1): 84-90.
- Gill J.L., Bishop S.C., McCorquodale C., Williams J.L., Wiener P. (2010): Associations between single nucleotide polymorphisms in multiple candidate genes and carcass and meat quality traits in a commercial Angus-cross population. *Meat Sci*, 86(4): 985-993.
- Reardon W., Muller A.M., Sweeney T., Hamill R.M. (2010): Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Sci*, 86(2): 270-275.
- Esmmailizadeh A.K., Morris C.A., Culler N.G., Kruk Z.A., Lines D.S., Hickey S.M., Dobbie P.M., Bottema C.D., Itchford W.S. (2011): Genetic mapping of quantitative trait loci for meat quality and muscle metabolic traits in cattle. *Anim Genet*, 42(6): 592-599.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.**
Katedra genetiky, šlechtění a výživy
Konzultant diplomové práce: **prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.**
Katedra genetiky, šlechtění a výživy

Datum zadání diplomové práce: **15. února 2013**
Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2014**


prof. Ing. Miloš Šoch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
Katedra genetiky, šlechtění a výživy
L.S.


prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. února 2013

Prohlášení

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

V Českých Budějovicích, 26. 11. 2014

Bc. Halina Steblová

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Ing. Lence Hanusové, Ph. D. za cenné rady a odborné vedení.

Obsah

Abstrakt	7
Abstract	8
1. Úvod	9
2. Cíl práce	10
3. Literární přehled	11
3.1 Ukazatele jakosti hovězího masa	11
3.1.1 Barva	11
3.1.2 Vaznost	13
3.1.3 Křehkost	14
3.1.4 Chutnost	16
3.2 Klasifikace molekulárních genetických markerů	17
3.2.1 Polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)	18
3.2.2 Polymorfismus náhodně amplifikované DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)	19
3.2.3 Polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (Amplified fragment length polymorphism, AFLP)	20
3.2.4 Mikrosatelity	21
3.2.5 Jednonukleotidový polymorfismus (Single nucleotide polymorphism, SNP)	22
3.3 Kandidátní geny pro masnou užitkovost	23
3.4 Gen pro růstový hormon	25
3.4.1 Struktura genu a jeho proteinu	25
3.4.2 Fyziologické funkce	25
3.4.3 Polymorfní místa v genu a jejich vliv na masnou užitkovost ..	26
3.5 Gen pro receptor růstového hormonu	28
3.5.1 Struktura genu a jeho proteinu	28
3.5.2 Fyziologické funkce	29
3.5.3 Polymorfní místa v genu a jejich vliv na masnou užitkovost ..	29
4. Materiál a metodika	31
4.1 Materiál	31
4.2 Izolace DNA	31

4.3 PCR/RFLP	31
4.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)	32
4.3.2 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)	33
4.4 Elektroforéza na agarózovém gelu	34
4.5 Stanovení křehkosti masa pomocí Warner-Bratzlerova testu	35
4.6 Výpočty	35
4.7 Statistické vyhodnocení	36
5. Výsledky	37
5.1 Genotypizace	37
5.2 Frekvence alel a genotypů	39
5.3 Vliv genotypu na sílu ve stříhu (křehkost)	41
6. Diskuse	43
7. Závěr	46
8. Seznam zkratk	47
9. Seznam literatury	49
10. Přílohy	68

Abstrakt

Tato práce byla zaměřena na analýzu polymorfismu v 2141. pozici v exonu 5 genu růstového hormonu (*GH*) a polymorfismu v 257. pozici v exonu 10 genu pro receptor růstového hormonu (*GHR*) a na stanovení vlivu těchto polymorfismů na křehkost masa. K analýze bylo využito 333 vzorků masa býků plemene českého strakatého skotu. Genotypizace lokusů *GH* a *GHR* byla provedena metodou PCR-RFLP. Pro odhalení jednonukleotidového polymorfismu byla u obou genů použita restriční endonukleáza *AluI*. Pro určení křehkosti masa byla použita metoda měření síly ve stříhu podle Warnera a Bratzlera. Hodnoty síly ve stříhu vzorků syrového masa byly naměřeny 14. den po porážce. Poté byl statisticky vyhodnocen vztah mezi genotypy a silou ve stříhu.

Ve sledované populaci se pro lokus *GH* vyskytovalo 166 jedinců s genotypem *LL*, 161 heterozygotů *LV* a 6 homozygotů *VV*. Relativní frekvence genotypů tedy byly 0,499 (*LL*), 0,483 (*LV*) a 0,018 (*VV*). Frekvence alely *L* byla 0,74 a alely *V* byla 0,26.

Pro lokus *GHR* bylo ve sledované populaci zjištěno 178 homozygotů *AA*, 105 heterozygotů *AG* a 50 homozygotů *GG*. Relativní frekvence genotypů byly 0,535 (*AA*), 0,315 (*AG*) a 0,15 (*GG*). Frekvence alely *A* byla 0,692 a alely *G* byla 0,308.

Pomocí statistické analýzy byl zjištěn významný vliv genotypu genu *GH* na sílu ve stříhu, respektive křehkost ($P < 0,05$). Pro lokus *GHR* nebyl zjištěn žádný vliv genotypu na sílu ve stříhu ($P > 0,05$).

Klíčová slova: kandidátní gen, gen růstového hormonu, gen pro receptor růstového hormonu, genetický marker, jakost masa, křehkost, PCR/RFLP

Abstract

This study was aimed on analysis of polymorphism at position 2141 in exon 5 of the growth hormone gene (*GH*) and polymorphism at position 257 in exon 10 of the growth hormone receptor gene (*GHR*) and to determine the influence of these polymorphisms on meat tenderness. To analysis has been used 333 meat samples of Czech Pied bulls. Genotypization of *GH* and *GHR* loci was performed by PCR-RFLP. For detection of single nucleotide polymorphism in both genes was used restriction endonuclease *AluI*. To determine meat tenderness was used the method of measuring shear force by Warner and Bratzler. The shear force values of raw meat samples were measured at day 14 post mortem. Then was statistically evaluated the association between genotypes and shear force.

In the study population occurred for *GH* locus 166 individuals with genotype *LL*, 161 heterozygotes *LV* and 6 homozygotes *VV*. The relative genotype frequencies were thus 0.499 (*LL*), 0.483 (*LV*) and 0.018 (*VV*). The frequency of *L* allele was 0,74 and of *V* allele was 0,26.

For *GHR* locus was found in the study population 178 homozygotes *AA*, 105 heterozygotes *AG* and 50 homozygotes *GG*. The relative frequencies of genotypes were 0.535 (*AA*), 0.315 (*AG*) and 0.15 (*GG*). The frequency of *A* allele was 0,692 and of *G* allele was 0,308.

Using statistical analysis revealed a significant effect of genotype *GH* gene on shear force, tenderness resp. ($P < 0,05$). For *GHR* locus showed no effect of genotype on shear force ($P > 0,05$).

Key Words: candidate gene, growth hormone gene, growth hormone receptor gene, genetic marker, meat quality, tenderness, PCR/RFLP

1. Úvod

V současné době se chovatelé skotu nezaměřují pouze na vyšší výtěžnost masa, ale také na zlepšení jeho kvality. Kvalita masa má pro hovězí průmysl velký význam, protože za vynikající produkty je spotřebitel ochoten více zaplatit. Obecné trendy ve spotřebitelských preferencích jsou ovlivněny vlastnostmi kvality masa, jako jsou křehkost, chutnost, šťavnatost, barva, vůně, vaznost, obsah tuku a živin.

Byla určena řada kandidátních genů jako potenciálně významných pro sensorické a technologické vlastnosti hovězího masa. Markery nalezené v různých kandidátních genech byly identifikovány a začleněny do komerčně dostupných genetických testů na kvalitu masa.

Náplní této práce je stanovit vliv jednonukleotidové substituce C/G v 2141. pozici genu růstového hormonu (*GH*) a jednonukleotidové substituce A/G v 257. pozici genu pro receptor růstového hormonu (*GHR*) na výslednou křehkost masa u jedinců plemene českého strakatého skotu.

2. Cíl práce

Cílem diplomové práce je stanovit vliv vybraných lokusů (*GH* a *GHR*) na křehkost masa u jedinců plemene českého strakatého skotu. Bude vypracován literární přehled o jednotlivých vybraných lokusech a jejich potenciálním vlivu na jakost masa. Na získaných vzorcích bude provedena genetická analýza pro stanovení genotypů v daných lokusech. Následně bude statisticky vyhodnocen vliv jednotlivých genotypů na křehkost masa. Získané výsledky budou porovnány s výsledky předchozích studií jiných autorů.

3. Literární přehled

3.1 Ukazatele jakosti hovězího masa

Hodnocení kvality masa je stanoveno na základě vlastností, mezi něž patří křehkost, barva, šťavnatost, chutnost, textura, stanovení pH, obsah intramuskulárního tuku a vaznost (Reardon *et al.*, 2010).

3.1.1 Barva

Barva masa je velmi nápadný znak, podle kterého spotřebitel posuzuje kvalitu masa a masných výrobků. Třemi hlavními faktory, které ovlivňují barvu masa, jsou obsah myoglobinu, relativní zastoupení jeho derivátů a konečná hodnota pH (pHu) (MacDougall, 1982; Seideman *et al.*, 1984).

Myoglobin je svalové barvivo, sloužící jako zásobárna kyslíku ve svalech. Je tvořen komplexem bílkovinného řetězce globinu a barevné skupiny - hemu. Má větší afinitu ke kyslíku než hemoglobin, který zprostředkovává přenos kyslíku z plic do svalů. Hemoglobin je krevní barvivo, jehož molekulu tvoří čtyři komplexy globinu a hemu. Má čtyřnásobně velkou relativní molekulovou hmotnost než myoglobin. Hemoglobin může být nalezen v mase v různých koncentracích, v závislosti na tom, jak bylo zvíře vykřveno. Z obsahu všech hemových barviv v mase činí jeho podíl 10-30%. Jeho rozdílný podíl závisí jak na absolutním obsahu hemoglobinu, tak na obsahu myoglobinu - je-li ho málo, je podíl hemoglobinu relativně vysoký. V mase různých živočichů je obsah hemových barviv v rozmezí 100-10000 mg.kg⁻¹ a závisí na intravitálních vlivech (Pipek a Jirotková, 2001). Hovězí maso má nejvyšší koncentraci myoglobinu, a proto je tmavší než maso ostatních druhů (Hernández *et al.*, 2006).

Změny barvy masa mají souvislost s reakcemi na atomu železa (Kadlec *et al.*, 2002). Při oxidaci centrálního atomu železa vzdušným kyslíkem, při nízkých parciálních tlacích kyslíku, vzniká kation metmyoglobinu (MetMb⁺) a barva masa se změní na šedohnědou (Pipek a Jirotková, 2001). Tuto barvu pak zákazníci spojují se sníženou kvalitou (Lynch *et al.*, 1986; MacDougall, 1982).

Oxygenace, tedy adice molekuly kyslíku dativní vazbou, probíhá při vyšších parciálních tlacích. Vzniká rumělkově červený oxymyoglobin, jehož centrální

dvojmocný atom železa je pomocí navázaného ligandu (kyslíku) chráněn proti oxidaci (Pipek a Jirotková, 2001) Tato jasně červená barva masa je pro spotřebitele atraktivní (Hernández *et al.*, 2006).

Oxidace kyslíkem probíhá pouze při nízkých parciálních tlacích, při vyšších probíhá přednostně oxygenace. Na centrální atom železa v myoglobinu se kromě kyslíku dativně vážou také různé jiné ligandy. Při navázání ligandu - oxidu uhelného na centrální atom železa vzniká karboxymyoglobin, který je třešňově červený. Při navázání molekuly oxidu dusnatého vzniká nitroxymyoglobin, který je růžově červený (Pipek a Jirotková, 2001).

K tvorbě metmyoglobinu dochází při skladování masa, především v důsledku vzájemného působení hemových barviv a tuků, kdy tyto složky podléhají oxidaci vzdušným kyslíkem (Kadlec *et al.*, 2002). Působením vzduchu a peroxidu vodíku nebo činností enzymů či mikroorganismů nastává další rozpad hemových barviv. Zelená barviva choleglobin, verdoglobin a verdohem se tvoří pokračující oxidací metmyoglobinu. Dále vzniká modrozelený biliverdin, jenž se redukuje na bilirubin, který je zbarven červeně. Laktobacily, které vytvářejí peroxid vodíku, hromadící se a rozkládající hemová barviva, mají také vliv na vytvoření zelených barviv (Pipek a Jirotková, 2001).

Při tepelné úpravě masa v nepřítomnosti dusitanů dochází ke změně barvy masa na hnědou nebo šedohnědou. Je to způsobeno denaturací globinu, po které zpravidla nastává oxidace železa v hemové skupině. Tyto barviva nazýváme hemichromy. Za přítomnosti dusitanů nebo dusičnanů je na železo navázán oxid dusnatý, zabraňující oxidaci a způsobující růžovou barvu masných výrobků (Pipek a Jirotková, 2001).

Světlost masa ovlivňuje zejména hodnota pH (Hector *et al.*, 1992). Čím více se pH přibližuje k izoelektrickému bodu, tím je rozpustnost bílkovin menší. Ty poté vážou málo vody a světlo tak proniká do malé hloubky, odráží se více od povrchových vrstev a tvoří dojem světlejšího masa. Tento proces nastává u tzv. PSE masa, kdy je pH po 45 minutách po porážce nižší než 5,8 (Pipek a Jirotková, 2001). Tmavé, pevné a suché (dark, firm and dry, DFD) maso, je klasifikováno jako maso, jehož hodnota pHu je větší než 6,2 (Hoffman *et al.*, 2007).

Hodnotit barvu masa můžeme posouzením obsahu a stavu hemových barviv. Barva může být také vyjadřována pomocí hodnot L^* , a^* a b^* v systému CIE, kde L^*

vyjadřuje světlost, souřadnice a^* udává vztah mezi červenou a zelenou barvou a souřadnice b^* pak mezi žlutou a modrou (Pipek a Jirotková, 2001).

3.1.2 Vaznost

Vaznost je definována, jako schopnost masa vázat vodu vlastní a přidanou. Tato vlastnost má významný vliv na jakost masných výrobků i ekonomiku výroby. Vaznost je možné ovlivnit způsobem, jakým se s masem zachází i různými přísadami. Z technologického hlediska lze vodu rozlišit na volnou a vázanou, a to na základě toho, jestli za daných podmínek z masa volně vytéká nebo ne. V libové svalovině se voda může vázat různým způsobem a s různou pevností. Hydratační voda je vázána nejpevněji. Další podíly vody jsou imobilizovány v síti membrán a filament strukturních bílkovin. Zbytek vody se pohybuje v mezibuněčných prostorech volně (Kadlec *et al.*, 2002). Vaznost lze tedy vyjádřit jako podíl vody vázané (hydratační a imobilizované) k celkovému obsahu vody v mase v % (Pipek a Jirotková, 2001).

Imobilizace je v molekule bílkoviny závislá na nábojích, které ovlivňují poměr přitažlivých a odpuzivých sil mezi jednotlivými strukturními částmi svaloviny. Tímto se prostor pro imobilizaci většího nebo menšího množství vody, uvnitř kterého jsou molekuly vody navzájem propojeny vodíkovými můstky, zvětšuje nebo naopak zmenšuje. Spojování a štěpení příčných vazeb mezi bílkovinnými molekulami zásadně ovlivňuje imobilizaci. Mezi tyto vazby řadíme: příčně iontové vazby přes vícemocné kationty (především Ca, Mg a Fe), vodíkové vazby mezi karbonylovými a iminoskupinami peptidových vazeb, iontové vazby mezi kladně a záporně nabitými skupinami a disulfidové vazby cystinu (Kadlec *et al.*, 2002).

K faktorům, které ovlivňují vaznost, patří především pH, koncentrace solí, obsah některých iontů, intravitální vlivy, průběh posmrtných změn, rozmělnění masa (Pipek a Jirotková, 2001) a stupeň dezintegrace vláken. Hodnota pH se v mase a masných výrobcích pohybuje v rozmezí 4-7. Výrazné minimum vaznosti nastává při hodnotě pH izoelektrického bodu (přibližně 5,0), kdy je počet kladných a záporných nábojů na molekule bílkoviny vyrovnán. Opačně nabitě skupiny se přitahují maximální silou. Ke změně disociace funkčních skupin bílkovin dochází při okyselení nebo zalkalizování svaloviny směrem od izoelektrického bodu. Během

tohoto procesu se mění rozložení kladných a záporných nábojů na molekule bílkoviny, některé příčné elektrostatické vazby se rozštěpí, peptidové řetězce se oddalují a tak se v prostoru mezi nimi imobilizuje více vody. Ke změnám pH masa dochází při posmrtných změnách a některých technologických operacích, kdy je pH záměrně upraveno (Kadlec *et al.*, 2002).

Vliv solí, a tedy vliv aniontu a kationtu na vaznost, je komplikovaný. S rostoucím obsahem soli vaznost svaloviny zpočátku stoupá, dosahuje maxima a poté klesá na původní hodnotu (odbobtnání). Ke snižování vaznosti dochází vlivem vícemocných kationtů (vápenatých, hořečnatých, zinečnatých, železitých aj.). Kationty tvoří mezi peptidovými řetězci příčné vazby a dochází k zesíťování struktury. Imobilizování většího množství vody může nastat, pokud dojde k výměně dvouvalentních iontů za jednovalentní kdy se příčné vazby uvolní. Pro zvýšení vaznosti při výrobě salámů se používá přísadka některých solí slabých vícesytných kyselin (Kadlec *et al.*, 2002).

Mezi intravitální vlivy lze zařadit pohlaví, věk a způsob chovu zvířat. K výrazným změnám vaznosti dochází v závislosti na průběhu posmrtných změn. Nejprve dochází k poklesu v důsledku okyselení a tvorby pevné struktury - *rigor mortis*, poté se zvyšuje v průběhu zrání. Někdy dochází v důsledku odchylného průběhu pH ke vzniku tzv. myopatií, kdy je vaznost buď nízká (PSE maso) nebo vyšší (DFD maso) (Kadlec *et al.*, 2002).

Vaznost masa je možné zjistit různými metodami, mezi něž patří lisovací metoda podle Graua a Hamma, kapilární volumetrie pro zjištění objemu uvolněné šťávy a hodnocení ztráty šťávy samovolným odkapem (tzv. metoda Dripverlust). Využívá se také metody hodnotící ztráty šťávy nebo naopak schopnost udržet vodu při tepelném zpracování (Ingr, 1996).

3.1.3 Křehkost

Křehkost masa je nejdůležitějším znakem kvality masa v hodnocení spotřebitelů (Destefanis *et al.*, 2008; Miller *et al.*, 2001). Spotřebitelé jsou ochotni platit vyšší ceny za hovězí maso, které garantuje patřičnou křehkost (Feldkamp *et al.*, 2005). Problém křehkosti se ovšem týká především hovězího masa, které vyžaduje alespoň 14 dní skladování v chladicích podmínkách pro získání konečné křehkosti. Vepřové maso zraje 5-7 dní a jehněčí 7-10 dní (Koohmaraie a Geesink, 2006). Na

křehkost mají vliv různé předporážkové a poporážkové faktory a jejich vzájemné účinky (Destefanis *et al.*, 2008). K nejdůležitějším předporážkovým faktorům patří věk, druh, pohlaví, plemeno, výživa a stupeň stresu před porážkou. Změny po porážce, zahrnující posmrtnou ztuhlost (*rigor mortis*) a zrání, mají zásadní vliv na křehkost masa (Nowak, 2011). Bylo zjištěno, že během procesu zrání lze rozlišit změny v mikro a ultrastruktuře svalových vláken (zeslabení myofibril, fragmentace, změny v oblasti Z-linií, I- pruhů) a degradaci myofibrilárních a cytoskeletálních proteinů, jako jsou T troponiny, I troponiny, titiny, desminy, dystrofiny, nebuliny, vinkuliny a meta-vinkuliny (Koochmaraie a Geesink, 2006). Tyto změny vedou k získání finální křehkosti masa. Mnoho studií ukázalo, že křehkost masa závisí na enzymech, jako jsou katepsiny a kalpainy. Některé studie naznačují, že za konečnou křehkost mohou být zodpovědné proteasomy, zatímco jiné ukazují, že kaspasy (Bernard *et al.*, 2007; Kemp *et al.*, 2010). Mnoho studií připisují tuto roli systému kalpainů (Neath *et al.*, 2007; Kemp *et al.*, 2010).

Je mnoho faktorů ovlivňujících křehkost masa. Každý z těchto faktorů se opírá o teorie, které se snaží vysvětlit, jaký má daný faktor vliv na křehkost. Mezi čtyři obecné charakteristiky, které jsou považované za nejdůležitější, patří posmrtná proteolýza myofibril, intramuskulární tuk neboli marbling, množství a rozpustnost pojivové tkáně a kontraktilní stav svalu. Tyto faktory také přispívají k rozdílné křehkosti mezi různými svaly ve stejném jatečném těle (Belew *et al.*, 2003).

Fáze tuhnutí masa je způsobená zkracováním sarkomer v průběhu vývoje *rigor mortis* (Wheeler a Koochmaraie, 1994; Koochmaraie *et al.*, 1996). U hovězího masa tento proces nastává v průběhu prvních 24 hodin po porážce (Wheeler a Koochmaraie, 1999). Zatímco fáze tuhnutí je za stejných podmínek obdobná u všech jatečných těl, fáze křehnutí je vysoce variabilní. Jsou zde velké rozdíly v rychlosti a míře posmrtné tenderizace masa. Je známo, že se křehkost masa zlepšuje při uskladnění v chladu v důsledku enzymatické aktivity. Tato enzymatická aktivita ovlivňuje posmrtnou proteolýzu myofibrilárních bílkovin, a má tedy zásadní význam pro křehkost masa (Koochmaraie a Geesink, 2006).

Rychlost a míra posmrtné proteolýzy prostřednictvím kalpainového systému vysvětluje převážnou část pozorovaného zlepšení křehkosti při zrání masa (Koochmaraie, 1994; Taylor *et al.*, 1995). Aktivita těchto proteolytických enzymů je také regulována rychlostí poklesu pH a teploty během vývoje *rigor mortis* (Dransfield, 1994), iontovou silou (Ouali, 1984), oxidací calpainu po porážce (Rowe

et al., 2004), případně dalšími faktory. Účinek kalpainového systému na tenderizaci masa po porážce závisí na rovnováze mezi mírou aktivace a aktivitou, a mírou inaktivace nebo denaturace proteolytických enzymů (Dransfield, 1992). Míra aktivace a aktivita závisí na koncentraci kalpainu I, kalpainu II a jejich inhibitoru kalpastatinu při porážce (Koochmaraie, 1994).

Vliv pojivových tkání na křehkost masa je určen především vývojem tepelně stabilních příčných vazeb stejně jako celkovým obsahem kolagenu (Warner *et al.*, 2010).

Intramuskulární tuk rovněž ovlivňuje křehkost masa. Tento tuk tvoří na řezu svaloviny, mezi svalovými vlákny bílou kresbu, tzv. mramorování neboli marbling (Werner *et al.*, 2010). Vyšší stupeň mramorování byl asociován se zvýšenou chutností vařeného hovězího masa (Smith *et al.*, 1987), ačkoliv obecně představuje rozdíl ve smyslovém vnímání křehkosti hovězího masa pouze 3-10% (Nishimura *et al.*, 1999).

Křehkost může být hodnocena sensoricky nebo objektivně - texturometry nebo tendometry. Veličina naměřená Warnerem a Bratzlerem, síla ve stříhu, je používána nejčastěji (Pipek a Jirotková, 2001).

Marshall (1999) a Burrow *et al.* (2001) ve svých studiích zabývajících se vlivem genetických parametrů na znaky kvality hovězího masa uvádí, že heritabilita křehkosti, která byla stanovena objektivním způsobem jako síla ve stříhu, byla 0,2-0,3.

3.1.4 Chutnost

Chutnost lze definovat jako komplexní vjem chuti a aromatu, na jejímž vytváření se podílejí především extraktivní látky, vznikající v průběhu zrání masa. Významným nosičem těchto látek je tuk, ve kterém je řada extraktivních látek rozpuštěna. Maso s plnou chutí a vůní obsahuje přiměřeně vysoký obsah tuku a procesy posmrtného zrání u něho proběhly v dostatečné míře (Pipek a Jirotková, 2001).

Z hygienických důvodů se chutnost masa hodnotí po jeho tepelné úpravě, typické a nejobvyklejší pro daný druh masa a jeho výsekovou část. Způsob tepelné úpravy může ovlivňovat sensorické znaky. Z toho důvodu se musí dodržovat předepsané konstantní podmínky tepelné úpravy vzorků masa a rovněž podmínky

předkládání a sensorického posuzování masa. Při hodnocení chutnosti se posuzují texturní vlastnosti, jako křehkost, měkkost, tuhost, tvrdost, šťavnatost a jemná nebo hrubá vláknitost. Chuť a vůně patří k nejdůležitějším znakům sensorické jakosti. Hodnotí se jako výrazná, typická, bezvýrazná, prázdňá, netypická, cizí, nepříjemná nebo odporná (Ingr, 1996). Chutnost lze tedy hodnotit sensorickým posouzením, ale také analytickými přístroji (nejčastěji chromatograficky) (Pipek a Jirotková, 2001).

3.2 Klasifikace molekulárních genetických markerů

Markery můžeme rozdělit dle využití při mapování genomu na tři typy. Prvním typem jsou kódující exprimované geny, které mohou být kandidátními geny pro kvantitativní znaky (Quantitative Trait Loci, QTL). Tyto markery mají nízkou hladinu polymorfismu a jsou málo použitelné pro studie diverzity rodin a populací. Využívají se ale významně v komparativním (srovnávacím) mapování. Druhým typem jsou vysoce variabilní sekvence DNA. Zde se využívají především mikro a minisatelity. Vlivem vysokého stupně polymorfismu (velký počet alel) jsou mikrosatelity vysoce informativní v populačních studiích a při určování rodičovství, a jsou základem pro vazbové mapování genů. Tyto markery nemají přímo vliv na variabilitu znaku, ale mohou být ve vazbě s QTL. Třetím typem markerů jsou jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které mohou ležet uvnitř kódujících genů, ale častěji v nekódujících intronech nebo intergenových oblastech. Jsou využitelné pro populační a rodinné studie. Vyskytují se v genomu přibližně každých 500-1000 bp. Význam získávají s rozvojem automatických metod skreeningu (microarrays) (Knoll a Vykoukalová, 2002).

Markery lze také rozdělit dle charakteru svého polymorfismu na polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), polymorfismus v délce sekvence (Simple Sequence Length Polymorphism, SSLP), který zahrnuje mikrosatelity a minisatelity. Sem patří i vzácně se vyskytující delece nebo inserce v intronové části způsobené např. transpozony. Třetím typem markeru je polymorfismus jednotlivých nukleotidů (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Zde se jedná o bodové mutace. Některé mohou být detekovány jako RFLP. V případě, že neexistuje rozpoznávací místo pro restriktázu, lze k detekci použít sekvenování, denaturační gradientovou gelovou elektroforézu (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE) nebo metodu

zvanou polymorfismus konformace jednovláknové DNA (Single Strand Conformation Polymorphism, SSCP). Většinou se jedná o bialelické markery (Knoll a Vykoukalová, 2002).

3.2.1 Polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)

Objevení a izolace restričních endonukleáz v roce 1960 Arberem, Smithem a Nathansem položily základy pro novou třídu genetických markerů: polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP) (Botstein *et al.*, 1980).

Restriční endonukleázy jsou bakteriální enzymy, které rozpoznávají specifické 4, 5, 6, nebo 8 párů bází (bp) dlouhé nukleotidové sekvence, a štěpí DNA všude, kde se tyto sekvence vyskytují. Změny v DNA sekvenci v důsledku inzercí/deleci, substitucí bází nebo přemístění, týkající se restričních míst, mohou mít za následek zisk, ztrátu nebo přemístění restričního místa. Štěpením DNA restričními enzymy se vytvoří fragmenty, jejichž počet a velikost se může mezi jedinci, populacemi a druhy lišit (Liu a Cordes, 2004). Tradičně byly fragmenty separovány pomocí Southern blot analýzy (Southern, 1976), ve které je genomová DNA podrobena elektroforéze na agarózovém gelu, přenesena na membránu a vizualizována hybridizací se specifickými sondami.

Nejnovější analýzy nahradily zdlouhavou Southern blot metodu technikami založenými na polymerázové řetězové reakci (PCR). Jsou-li koncové sekvence pro daný lokus známe, je segment obsahující oblast RFLP amplifikován pomocí PCR. Je-li délkový polymorfismus způsoben relativně velkou delecí nebo inzercí (> cca 100 bp), měla by gelová elektroforéza odhalit rozdíly ve velikosti PCR produktů. Nicméně je-li délkový polymorfismus způsoben substitucí bází v restričním místě, musí být PCR produkty štěpeny restričním enzymem pro odhalení RFLP (Liu a Cordes, 2004).

3.2.2 Polymorfismus náhodně amplifikované DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)

Postupy RAPD byly poprvé vyvinuty v roce 1990 s využitím metody PCR k náhodné amplifikaci anonymních segmentů jaderné DNA se stejným párem 8-10 bp dlouhých primerů. Vzhledem k tomu, že primery jsou krátké a je použita relativně nízká teplota anealingu (často 36-40 °C), pravděpodobnost amplifikace četných produktů je velká, kdy každý produkt (pravděpodobně) představuje různý lokus. Protože je většina jaderného genomu obratlovců nekódující, má se za to, že většina z amplifikovaných lokusů bude selektivně neutrální. Genetická variabilita a divergence v rámci a mezi taxony se posuzuje na základě přítomnosti nebo absence jednotlivých produktů, které závisí na změně v DNA sekvenci v každém lokusu. K RAPD polymorfismu může dojít v důsledku substitucí bází na vazebných místech primerů nebo inserce/delece v oblastech mezi těmito místy (Welsh a McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Potenciální schopnost detekce polymorfismu je relativně vysoká. Typicky může být vyrobeno 5-20 fragmentů s použitím daného páru primerů a několik sad náhodných primerů se může použít ke skenování celého genomu pro diferenciální RAPD fragmenty. Vzhledem k tomu, že každý fragment je považován za bialelický lokus (přítomnost nebo nepřítomnost z amplifikovaného produktu) jsou hodnoty polymorfního informačního obsahu (Polymorphic Information Content, PIC) pro RAPD nižší než ty pro mikrosatelity a SNP. RAPD nemusí být tak informativní jako AFLP, protože je méně lokusů generováno současně (Liu a Cordes, 2004).

RAPD markery se dědí mendelisticky dominantním způsobem a jsou hodnoceny jako přítomné/nepřítomné. RAPD fragment je vytvořen homozygoty stejně jako heterozygoty, a přestože se intenzita fragmentů může lišit, variace v efektivnosti PCR činí vyhodnocování intenzit fragmentů obtížným. V důsledku toho, rozlišování homozygotních dominantních od heterozygotních jedinců není obvykle možné. Navíc je obtížné určit, zda fragmenty představují různé lokusy nebo alternativní alely jednoho lokusu, takže se může počet zkoumaných lokusů posoudit chybně. To platí zejména v případě, že je RAPD způsoben delecí nebo insercí v lokusu spíše než ve vazebných místech primerů (Liu a Cordes, 2004). Počet RAPD fragmentů viděných v F1 generaci by se měl rovnat součtu fragmentů viděných u

rodičů, za předpokladu rodičovské homozygotnosti v každém lokusu. Polymorfni RAPD pak v F2 populacích segreguje v poměru 3:1 (Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.* 1999).

RAPD mají všechny výhody markerů založených na PCR. Výhodou je také to, že primery jsou komerčně dostupné a nevyžadují předchozí znalost sekvence cílové DNA nebo organizace genu. Mnoholokusové amplifikace mohou být separovány elektroforeticky na agarózovém gelu a barveny ethidium bromidem, ačkoli vyššího rozlišení fragmentů bylo dosaženo diskontinuální polyakrylamidovou gelovou elektroforézou (dPAGE) a barvením stříbrem (Dinesh *et al.*, 1995). Mezi další výhody RAPD patří snadnost, s jakou může být tříděn velký počet lokusů a jednotlivců (Liu a Cordes, 2004).

Mezi nedostatky tohoto typu markeru patří obtížnost prokazování mendelistické dědičnosti lokusů a neschopnost rozlišit homozygoty a heterozygoty. Navíc, přítomnost paralogního PCR produktu (různé oblasti DNA, které mají stejné délky, a tak se zdají být jediným lokusem) limituje použití tohoto markeru. A konečně, RAPD markery vykazují nízkou reprodukovatelnost v důsledku nízké teploty annealingu používané v PCR amplifikaci (Liu a Cordes, 2004).

3.2.3 Polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (Amplified fragment length polymorphism, AFLP)

AFLP je mnoholokusová fingerprinting technika, založená na PCR, která kombinuje silné stránky a překonává slabé stránky metod RFLP a RAPD. Stejně jako RFLP, zahrnuje molekulární podstata AFLP polymorfismů inserce nebo delece mezi restrikčními místy a substituce bází v restrikčních místech. Jako RAPD také zahrnuje substituce bází ve vazebných místech primerů. Unikátní vlastností této metody je přidání adaptérů známé sekvence k fragmentům DNA vytvořených štěpením celé genomové DNA. To umožňuje následnou PCR amplifikaci skupin všech fragmentů pro snadnou separaci gelovou elektroforézou. Její primární cíl, detekce genetické variability, je stejný jako RFLP, ale namísto analýzy jednoho lokusu umožňuje analýzu mnoha lokusů současně (Liu a Cordes, 2004).

Metoda AFLP začíná štěpením celé genomové DNA dvěma enzymy (nejčastěji *EcoRI* a *MseI*). Vzhledem k tomu, že sekvence výsledných DNA fragmentů jsou neznámé, adaptéry známé sekvence jsou ligovány na konce

fragmentů a slouží jako místa pro primery pro PCR amplifikaci. Tento postup má za následek vytvoření milionů fragmentů PCR. Počet amplifikovaných fragmentů je proto snížen přidáním známých bází k 3' PCR primerům. Protože tyto báze přesahují za ligované místo a do fragmentu DNA, primer bude nasedat pouze, pokud bude mít fragment přesnou sekvenci (Vos *et al.*, 1995).

Stejně jako RAPD, se AFLP markery dědí jako dominantní markery, ačkoli nyní je k dispozici sada programů pro kodominantní vyhodnocování AFLP fragmentů. Mezi hlavní přednosti metody AFLP patří vysoký počet (více než 100) odhalených polymorfismů a vysoká reprodukovatelnost díky vysokým teplotám annealingu PCR. Stejně jako RAPD, nevyžaduje tato metoda žádné předchozí molekulární informace, a proto je použitelná pro všechny druhy. Také AFLP fragmenty jsou považovány za bialelické a proto mají relativně nízké PIC skóre. Větší počet lokusů, které mohou být současně vyhodnoceny, ovšem využití AFLP výrazně zvyšuje (Liu a Cordes, 2004).

3.2.4 Mikrosatelity

Mikrosatelity se skládají z více kopií tandemově uspořádaných opakování jednoduché sekvence (SSR, Simple sequence repeats) skládající se z 1-6 párů bází (např. ACA nebo GATA) (Tautz, 1989; Litt a Luty, 1989). Mikrosatelity mají tendenci být rovnoměrně rozloženy v genomu na všech chromosomech a ve všech oblastech chromosomu. Byly nalezeny v kódujících oblastech genů, intronech a v negenových sekvencích. Většina mikrosatelitních lokusů je relativně malých, v rozmezí od několika do několika set repetit. Relativně malá velikost mikrosatelitních lokusů je důležitá pro snadnou genotypizaci pomocí PCR metody (Liu a Cordes, 2004). Obecně lze říci, že mikrosatelity, které obsahují velké množství opakování, jsou více polymorfni. Polymorfismus byl ovšem pozorován také u mikrosatelitů, které měly pouze pět opakování (Karsi *et al.*, 2002).

Polymorfismus mikrosatelitů je založen na rozdílech v délce vzhledem k proměnným počtům opakujících se jednotek obsažených v alelách v daném lokusu. Mutační poměr mikrosatelitů byl zaznamenán vysoký - 10^{-2} na generaci. (Weber a Wong, 1993; Crawford a Cuthbertson, 1996). Předpokládá se, že je způsoben sklouzáváním polymerázy během replikace DNA, které vede k rozdílům v počtu opakujících se jednotek (Levinson a Gutman, 1987; Tautz, 1989). Bez ohledu na

specifické mechanismy mohou mít změny v počtu opakujících se jednotek za následek velké množství alel v každém mikrosatelitním lokusu v populaci. Mikrosatelity se dědí podle mendelistické dědičnosti jako kodominantní markery. Každý mikrosatelitní lokus musí být identifikován a jeho hraniční oblast sekvenována pro konstrukci PCR primerů (Liu a Cordes, 2004).

3.2.5 Jednonukleotidový polymorfismus (Single nucleotide polymorphism, SNP)

Jednonukleotidový polymorfismus (SNP) charakterizuje polymorfismy způsobené bodovými mutacemi. Následkem toho vznikají rozdílné alely, které obsahují alternativní báze v dané pozici nukleotidu na lokusu. Tyto rozdíly v sekvenci způsobené substitucemi bází byly dobře charakterizovány od vzniku sekvenování DNA v roce 1977. Schopnost rychlého genotypování SNP ve velkém počtu vzorků nebyla ovšem možná až do aplikace genové čipové technologie v pozdních 90. letech. SNP se opět stávají ústředním bodem ve vývoji molekulárních markerů, protože jsou nejhojnějšími polymorfismy v každém organismu a odhalují skrytý polymorfismus nedetekovaný jinými markery a metodami (Liu a Cordes, 2004).

Teoreticky může SNP v lokusu vytvářet až čtyři alely, z nichž každá obsahuje v místě SNP jednu ze čtyř bází: A, T, C nebo G. Nicméně v praxi je většina SNP obvykle omezena na jednu ze dvou alel (nejčastěji buď dvou pyrimidinů C/T nebo dvou purinů A/G). SNP markery se dědí jako kodominantní markery (Liu a Cordes, 2004).

Bylo použito několik přístupů k odhalení SNP zahrnující SSCP analýzu (Hecker *et al.*, 1999), heteroduplexní analýzu (Sorrentino *et al.*, 1992) a přímé sekvenování DNA. Sekvenování DNA byl nejpřesnější a nejvíce používaný přístup k odhalení SNP. Náhodné „shotgun“ sekvenování, sekvenování ampliconů s použitím PCR a komparativní EST analýzy patří mezi nejpopulárnější metody sekvenování pro odhalení SNP (Liu a Cordes, 2004).

I přes technologický pokrok je genotypizace SNP stále náročná a vyžaduje specializované vybavení. Tradiční metody vhodné pro SNP genotypizaci zahrnují přímé sekvenování (Cotton, 1993), alelově specifické oligonukleotidy (ASO)

(Malmgren *et al.*, 1996), denaturační gradientovou gelovou elektroforézou (DGGE) (Cariello *et al.*, 1988), analýzu polymorfismu konformace jednovláknové DNA (SSCP) (Suzuki *et al.*, 1990) a ligázovou řetězovou reakci (LCR) (Kalin *et al.*, 1992).

Pro efektivní genotypizaci pomocí nejmodernější techniky je k dispozici několik možností. Obzvláště populární jsou metody, jako hmotnostní spektrometrie (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight, MALDI-TOF) (Ross *et al.*, 1998; Storm *et al.*, 2003), pyrosekvenování (Ahmadian *et al.*, 2000; Alderborn *et al.*, 2000), *TaqMan* alelická diskriminace (Li *et al.*, 2004), real-time (kvantitativní) PCR (Nurmi *et al.*, 2001) a použití genových čipů neboli DNA microarrays (Hacia *et al.*, 1999).

3.3 Kandidátní geny pro masnou užitkovost

Na většině znaků jakosti masa se podílí jak environmentální tak genetická složka (Dikeman *et al.*, 2005) s různou heritabilitou v závislosti na analyzovaném znaku (Wheeler *et al.*, 2004). Geny regulující metabolismus a růst mají potenciál ovlivnit ekonomicky významné znaky (economically relevant traits, ERT) hospodářských zvířat. Polymorfismy v těchto kandidátních genech, které vykazují spojitost s konkrétním ERT, jsou užitečné pro markery asistovanou selekci (MAS) (Sherman a Nkrumah, 2008). Existuje celá řada kandidátních genů pro ERT, níže je uveden stručný přehled těch nejdůležitějších.

Myostatin, také známý jako růstový diferenciační faktor-8 (GDF-8), je členem rodiny transformujících růstových faktorů- β a je negativní regulátor svalového růstu (McPherron *et al.*, 1997; Thomas *et al.*, 2000). Mutace v genu pro myostatin (*MSTN*) způsobuje dvojitě osvalení u skotu (Kambadur *et al.*, 1997; McPherron a Lee, 1997).

Specifický inhibitor kalpainové rodiny endogenních proteáz, kalpastatin, inhibuje normální křehnutí masa při zrání post mortem (Schenkel *et al.*, 2006). Gen pro kalpastatin (*CAST*) se nachází na *BTA7* (Bishop *et al.*, 1993). Polymorfismy v tomto genu byly asociovány se silou ve stříhu, a tedy s křehkostí hovězího masa (Casas *et al.* 2006; Schenkel *et al.* 2006), a také se schopností masa vázat vodu u prasat (Ciobanu *et al.*, 2004). Polymorfismus v genu pro kalpain 1 (*CAPN1*) byl také asociován s křehkostí masa (Page *et al.* 2002).

Polymorfismus lysin/alanin v genu kódujícím diacylglycerol O-acyltransferázu 1 (*DGATI*), mikrosomální enzym katalyzující konečný krok syntézy triglyceridů, byl asociován hlavně s obsahem mléčného tuku (Grisart *et al.* 2002; Winter *et al.* 2002). Bylo ovšem prokázáno, že polymorfismus v *DGATI* měl u skotu také významný vliv na obsah intramuskulárního tuku. Homozygoti lysin/lysin měli podstatně více intramuskulárního tuku než heterozygoti a homozygoti alanin/alanin (Thaller *et al.*, 2003).

Gen *TG* kóduje protein thyroglobulin, který je prekurzorem trijodtyroninu a tetrajodtyroninu, hormonů působících na metabolismus lipidů. Polymorfismus v 5' nepřekládané oblasti genu byl asociován s marbling skóre (Barendse *et al.*, 2004).

Významný je také gen pro stearyl CoA desaturázu (*SCD*), která katalyzuje desaturaci nasycených mastných kyselin na mononenasyčené mastné kyseliny. Genová exprese i alelické variace v genu korelovaly s procentuálním zastoupením mononenasyčených mastných kyselin v japonském černém skotu (Taniguchi *et al.*, 2004).

Gen *LEP* kóduje leptin, který je produkován adipocyty a podílí se na regulaci příjmu krmiva, energetické bilanci, ukládání tuků, kvalitu masa a reprodukci (Houseknecht *et al.*, 1998; Geary *et al.*, 2003). Bovinní *LEP* byl mapován na chromosomu 4 (Stone *et al.*, 1996). Polymorfismy v genu *LEP* byly spojeny s příjmem krmiva, produkcí mléka (Liefers *et al.*, 2002) a protučněním jatečného těla (Buchanan *et al.*, 2002; Nkrumah *et al.*, 2004). Substituce cytosin/thymin (C/T) detekovaná v pozici 528 v promotorové oblasti bovinního *LEP* ukázala, že zvířata s genotypem *TT* měla vyšší marbling skóre než jedinci s genotypy *CC* a *CT* (Nkrumah *et al.*, 2005).

Geny kódující hormony, růstové faktory a jiné regulační proteiny související s tzv. somatotropní osou jsou kandidátními geny pro kvantitativní znaky u hospodářských zvířat. Mezi ně patří například gen růstového hormonu (*GH*), gen pro receptor růstového hormonu (*GHR*), gen transkripčního faktoru Pit-I (Pit-I aktivuje expresi genů *GH* a prolaktinu v předním laloku hypofýzy) a gen kódující inzulinu podobný růstový faktor-I (*IGF-I*) (Maj *et al.*, 2004). Existuje možná souvislost mezi koncentrací růstového hormonu, rychlostí nárůstu svalové hmoty a svalového vlákna a konečnou křehkostí. Z tohoto důvodu byl z výše vyjmenovaných kandidátních genů vybrán pro tuto diplomovou práci gen růstového hormonu a gen pro jeho receptor.

3.4 Gen pro růstový hormon

Růstový hormon (growth hormone, GH) je u zvířat jedním z hlavních regulátorů postnatálního růstu a metabolismu. Tento hormon ovlivňuje růst, tělesnou skladbu, zdraví, produkci mléka a stárnutí jednak přímo, jednak prostřednictvím produkce inzulinu podobného růstového faktoru-1 (IGF-1) (Ho a Hoffman, 1993; Lincoln *et al.*, 1995; Sumantran *et al.*, 1992). Z těchto důvodů je gen kódující GH považován za vhodného kandidáta pro markery asistované selekční programy u skotu za účelem zlepšení masné a mléčné produkce (Parmentier *et al.*, 1999).

3.4.1 Struktura genu a jeho proteinu

Gen pro růstový hormon se nachází na 19. bovinním chromozomu (Taylor *et al.*, 1998). Vyskytuje se pouze v jedné kopii v oblasti 19q26 (Hediger *et al.*, 1995). Je součástí genové rodiny, která obsahuje prolaktin a placentární laktogen. Skládá se z pěti exonů a čtyř intronů a jeho délka je cca 1800 bp (Gordon *et al.*, 1983). Metodami SSCP a RFLP bylo popsáno několik polymorfních oblastí v různých oblastech *GH* genu (Zakizadeh *et al.*, 2006). Mezi dva nejdůležitější polymorfismy patří mutace ve třetím intronu (tranzice T na C), detekovaná restrikcčním enzymem *MspI* a mutace v pátém exonu (transverze C na G, substituce Leu na Val v proteinu), detekovaná restrikcčním enzymem *AluI* (Lucy *et al.*, 1993; Zhang *et al.*, 1993).

Bovinní růstový hormon je protein skládající se ze 190 nebo 191 aminokyselin o molekulové hmotnosti 22 kDa (Dybus, 2002). Strukturu tohoto proteinu tvoří čtyři šroubovice, přičemž čtvrtá má zásadní význam pro vazbu GH s receptory (Secchi a Borromeo, 1997).

3.4.2 Fyziologické funkce

Růstový hormon je vylučován ze somatotropů v předním laloku hypofýzy především pod kontrolou dvou hormonů hypotalamu. Těmito hormony jsou jednak hormon uvolňující růstový hormon (growth hormone releasing hormone, GHRH), který zvyšuje sekreci GH, a dále somatostatin (SS), označovaný také jako faktor inhibující sekreci somatotropinu (somatotropin release-inhibiting factor, SRIF), který sekreci růstového hormonu inhibuje (Nicoll *et al.*, 1986; Etherton a Bauman, 1998).

Mechanismus pro řízení sekrece růstového hormonu je známý jako somatotropní osa a zahrnuje kromě GHRH a SRIF také ghrelin (growth hormone secretagogue, GHS), inzulínu podobný růstový faktor-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) a leptin (LEP) (Frohman *et al.*, 2000). Ghrelin stimuluje uvolňování GH prostřednictvím dvojího působení: na hypotalamové GHRH buňky a na somatotropy předního laloku hypofýzy (Korbonits *et al.*, 2004). Leptin ovlivňuje sekreci různých hormonů hypofýzy, včetně GH (Zieba *et al.*, 2003; Moravčíková *et al.*, 2013) tím, že potlačuje jeho sekreci (Roh *et al.*, 2001). V somatotropní ose se cirkulující růstový hormon váže na extracelulární doménu specifických transmembránových receptorů (GHR), které jsou exprimovány v různých tkáních, zejména v játrech (Sorensen *et al.* 1992). Tento proces je signálem pro kaskádu intracelulárních metabolických událostí, které vrcholí produkcí inzulínu podobného růstového faktoru-1 (IGF-1) v cílových tkáních, zejména játrech (Renaville *et al.* 2002). Přímou či nepřímou (stimulací sekrece IGF-1) je GH hlavním regulátorem postnatálního somatického růstu, který stimuluje anaboličké procesy, jako jsou buněčné dělení, skeletální růst a syntéza bílkovin (Curi *et al.*, 2005). V tukové tkáni GH zvyšuje lipolýzu triglyceridů a mění citlivost buněk na inzulín, což vede k diabetickému stavu. Ve svalech GH podporuje narůstání a syntézu proteinů. Biologické účinky růstového hormonu (GH) se týkají řady tkání a metabolismu všech druhů živin: sacharidů, lipidů, proteinů a minerálních látek. Tyto koordinované změny v metabolismu tkání mění rozdělování živin, čímž hrají klíčovou roli ve zvýšení přírůstku nebo produkci mléka (Etherton a Bauman, 1998).

3.4.3 Polymorfní místa v genu a jejich vliv na masnou užitkovost

U hospodářských zvířat bylo odhaleno mnoho polymorfismů v *GH*. Tyto polymorfismy byly následně diskutovány v souvislosti s živočišnou výrobou. Bylo zjištěno, že pátý exon genu pro růstový hormon je polymorfní v kodonu 127. Jedná se zde o substituci cytosinu (C) na guanin (G). Výzkumy (Gordon *et al.*, 1983, Lucy *et al.*, 1993) uvádějí, že se polymorfismus vyskytuje v 2141. místě sekvence. Substituce C na G v této pozici, způsobující změnu aminokyselin z leucinu (Leu, CTG) na valin (Val, GTG) v polypeptidu růstového hormonu, může být identifikována restrikčním enzymem *AluI*. Alela *L* indikuje přítomnost restrikčního místa, zatímco alela *V* ukazuje na jeho nepřítomnost (Hartatik *et al.*, 2013). Změny DNA v exonu 5 genu *GH* ($GH^{Leu127Val}$), které způsobují aminokyselinové substituce,

byly spojeny s vlastnostmi růstu a obsahem tuku u skotu (Ardiyanti *et al.*, 2009a,b; Chrenek *et al.*, 1998; Schlee *et al.*, 1994; Sneyers *et al.*, 1994), ačkoliv asociace nebyly vždy nalezeny (např. Di Stasio *et al.* 2002), nebo byly protichůdné (např. Schlee *et al.*, 1994). Barendse *et al.* (2006) uvádí, že alela *L* byla spojena s nižším stupněm mramorování u plemen angus a shorthorn. Tato alela byla rovněž asociována s mírně vyšším obsahem tuku v kýtě. Shlee *et al.* (1994) ukázali významný vliv genotypu *LV* na masnou užitkovost simentálských býků. Zwierzchowski *et al.* (1998) uvedli, že tělesná hmotnost a kapacita příjmu krmiva byly u mladých fríských býků silně závislé na *GH* genotypu. Heterozygoti *LV* měli nejvyšší hmotnost a největší příjem krmiva. Chrenek *et al.* (1998) zase zjistil, že simentálští býci s genotypem *VV* měli nižší tělesnou hmotnost než býci s genotypy *LL* a *LV*.

V exonu 5 *GH* genu byly objeveny substituce leucinu (Leu, CTG) na valin (Val, GTG) v kodonu 127 a threoninu (Thr, ACG) na methionin (Met, ATG) v kodonu 172. V důsledku toho byly pozorovány tři haplotypy, a sice: haplotyp *A* (Leu-Thr), haplotyp *B* (Val-Thr) a haplotyp *C* (Val-Met). Tudíž existuje 6 možných kombinací genotypů, a to: *AA*, *AB*, *BB*, *AC*, *BC* a *CC* (Chikuni *et al.*, 1997). Alela *C* byla nalezena pouze u plemen japonského černého a japonského hnědého skotu a rozšíření této alely se lišilo mezi jednotlivými regiony v Japonsku (Chikuni *et al.*, 1994; Kono, 2005; Tatsuda *et al.*, 2008). Ve studii Oka *et al.* (2007) a Katoh *et al.* (2008) měla telata japonského černého skotu s genotypem *AA* (*LL*) větší tělesnou hmotnost (body weights, BW) než ty s genotypem *BB* (*VV*). Zdá se, že je to v důsledku větší sekrece GH v reakci na GHRH stimulaci (Katoh *et al.* 2008; Ardiyanti *et al.* 2009a). Pokud jde o složení intramuskulárních mastných kyselin Ardiyanti *et al.* (2009b) uvedl, že jedinci s haplotypem *A* měli větší váhu jatečně upraveného těla (JUT) avšak nižší obsah nenasycených mastných kyselin (unsaturated fatty acid, USFA). Jedinci s haplotypem *C* měli nižší hmotnost JUT nicméně větší obsah USFA. Podle Tatsuda *et al.* (2008) má japonský černý skot s haplotypem *C* rovněž vyšší stupeň mramorování masa. 3-D analýza proteinu typu *C* ukázala, že aminokyselinové zbytky (127Val a 172Met), které jsou přítomné ve třetí a čtvrté šroubovici resp. a jsou důležité pro vazbu s GH receptory, jsou posunuty do hlubších pozic v molekule ve srovnání s těmi u typu *A* (127Leu a 172Thr), z čehož vyplývá změna vazebných interakcí s receptory (Bahrami *et al.*, 2013).

Polymorfismus v intronu 3 genu *GH* byl analyzován pomocí metody PCR-RFLP s použitím restriktčního enzymu *MspI* (Zhang *et al.*, 1993). Analýza odhalila dvě alely *GHI^C* a *GHI^D*. Významné efekty genové substituce byly pozorovány u skotu plemene piemontese, a to ztráta při vaření (cooking losses, CL) a křehkost v 11. dnu, s převahou alely *GHI^C* nad *GHI^D*, indikující jak nižší CL, tak i vyšší křehkost (Di Stasio *et al.*, 2003).

3.5 Gen pro receptor růstového hormonu

Růstový hormon se podílí na mnoha metabolických a fyziologických procesech (Etherton, 2004; Chagas *et al.*, 2007). K dosažení jeho účinků je zapotřebí vazba na jeho receptor (growth hormone receptor, GHR) (Edens a Talamantes, 1998; Zhu *et al.*, 2001). Variace v sekvenci DNA *GHR* genu mohou být tudíž přínosné pro pochopení, jak genotyp ovlivňuje fenotyp pro růst a složení jatečně upraveného těla skotu (Garrett *et al.*, 2008). *GHR* byl proto navržen jako potenciální kandidátní gen pro různé ekonomicky významné vlastnosti u skotu.

3.5.1 Struktura genu a jeho proteinu

U skotu je GHR kódován jedním genem nacházejícím se na 20. chromosomu (Moody *et al.*, 1995). Gen kódující bovinní GHR se skládá z 10 exonů a 9 intronů pokrývajících 365 186 bp dlouhou sekvenci DNA (Garrett *et al.*, 2008). Je zde 9 exonů (číslo 2 - 10) v translatované oblasti a dlouhá 5'-nekódující oblast, která zahrnuje 9 netranslatovaných exonů - 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I (Jiang a Lucy, 2001). Počáteční místo transkripce ATG tohoto genu se nachází v exonu 2 (Garrett *et al.*, 2008). Exony z netranslatované oblasti jsou alternativně sestříhané a každý z nich má své vlastní místo startu transkripce. P1 promotor, zodpovědný za regulaci genové exprese v játrech, je asociován s exonem 1A u skotu (Edens a Talamantes, 1998) a obsahuje polymorfní mikrosatelit (TG)_n umístěný 90 bp „upstream“ od startovacího místa transkripce (Hale *et al.* 2000). Tento element LINE-1, retrotranspozon virového původu, vložený do bovinního *GHR* genu v 5' oblasti je dlouhý přibližně 1,2 kbp (Lucy *et al.*, 1998; Maj *et al.*, 2004).

Receptor růstového hormonu je protein o délce přibližně 620 aminokyselin (Edens a Talamantes, 1998). Je členem superrodiny cytokinin/hematopoetických receptorů. Obsahuje jednu transmembránovou doménu skládající se z 24 aminokyselin, extracelulární doménu vážící hormon a dlouhou cytoplasmatickou doménu (Kopchick a Andry, 2000).

3.5.2 Fyziologické funkce

Receptor růstového hormonu je membránový transmitter pro signální transdukcí růstového hormonu, který reguluje různé metabolické aktivity, včetně buněčného růstu a exprese cytokinových genů (Han *et al.*, 2009).

Působení růstového hormonu na cílové buňky závisí tedy na GH receptoru (GHR) (Burton *et al.*, 1994). Vazba GH na GHR, díky dimerizaci receptoru, způsobuje aktivaci cytoplasmatické tyrosin kinázy 2 (Janus kinase 2, JAK2). Tímto jsou zpřístupněny některé signální dráhy zahrnující STAT5, PI3 kinázu a MAP kinázu, což má za následek různé biochemické a biologické procesy v buňce (Frank, 2001).

3.5.3 Polymorfní místa v genu a jejich vliv na masnou užitkovost

V bovinním *GHR* genu bylo identifikováno několik polymorfních sekvencí. Falaki *et al.* (1996) uvádí devět RFLP-*TaqI* genotypů v sekvencích genu *GHR* kódujících intracelulární C-terminální část receptoru. Moio *et al.* (1998) objevil tři bovinní varianty genu *GHR*, které se liší v délce 3' přilehlé oblasti (311, 320 a 325 bp dlouhé fragmenty) a jednu transverzi C/G v poloze +2313. Hale *et al.* (2000) ukázal souvislost mezi polymorfním TG-opakováním v promotoru P1 a rychlostí růstu u mladého skotu plemene angus. Alela *GT₁₁* byla spojena s nižší rychlostí růstu.

V 5' přilehlé oblasti bovinního *GHR* genu byly identifikovány tři jednonukleotidové substituce rozpoznané jako RFLP s restrikcími endonukleázami *AluI* (A/T), *AccI* (C/T) a *StuI* (C/T) (Aggrey *et al.*, 1999). Polymorfní varianty bovinního *GHR* genu byly také zaznamenány v promotoru P1 pro exon 1A (Ge *et al.*, 1999), dále identifikované jako A/G transverze v pozici -154, rozpoznané jako RFLP s *NsiI* endonukleázou (Ge *et al.*, 2003). Maj *et al.* (2004) zkoumali polymorfní místa

RFLP-*AluI* v pozici -1177, RFLP-*AccI* v pozici -887, RFLP-*NsiI* a nově nalezené RFLP-*Fnu4HI/TseI* (C/T) umístěné v pozici -1104. Stejně jako RFLP-*AluI* a RFLP-*AccI*, také RFLP-*Fnu4HI/TseI* byl umístěn v 1,2 kbp dlouhém LINE-1 elementu. V polymorfním místě *AluI* byla alela (-) příznivá pro hmotnost jatečně upraveného těla a procentuální podíl jatečně cenných částí. Zvířata s genotypy -/- nebo +/- byla lepší ve znacích, jako jsou průměrný denní přírůstek, hmotnost JUT a hmotnost libového masa v JUT. Zvířata s genotypem +/+ pro RFLP-*AccI* polymorfismus měla vyšší procento libového masa v jatečně cenných částech, zatímco ta s genotypem +/+ v polymorfním místě *Fnu4HI/TseI* měla vyšší denní přírůstek a lepší konverzi krmiva. Vyšší procento libového masa v jatečně cenných částech bylo prokázáno u býků s -/- genotypem v místě *NsiI*.

V exonu 10, kódující cytoplasmatickou doménu GHR, byly nalezeny čtyři jednonukleotidové polymorfismy (SNP), které jsou umístěné v pozicích 76 (T/C), 200 (G/A), 229 (T/C) a 257 (A/G) (Ge *et al.*, 2000). SNP v 200. pozici způsobuje substituci aminokyselin Ala/Thr. SNP v 257. pozici (viz. Příloha 1.) způsobuje substituci aminokyselin Ser/Gly. Zbývající dva SNP jsou tiché mutace. Di Stasio *et al.* (2005) analyzovali polymorfismus v 257. pozici u skotu plemene piemontese. V této studii byla alela *GHR*^A asociována s vyššími hodnotami ztráty okapem masa. Pro tuto vlastnost byl rovněž pozorován signifikantní efekt dominance.

V exonu 8 byl nalezen SNP *F279Y*, který způsobuje substituci fenyalaninu na tyrosin v transmembránové doméně GHR (Blott *et al.*, 2003). Bylo prokázáno, že *F279Y* ovlivňuje příjem krmiva, účinnost konverze krmiva a vlastnosti se vztahem k energetickému hospodaření v těle (Banos *et al.*, 2008).

4. Materiál a metodika

4.1 Materiál

K analýze bylo použito 333 vzorků masa býků plemene českého strakatého skotu pocházejících z komerčních chovů. Vzorky byly odebrány v letech 2010 – 2013. Vzorky masa byly uskladněny v mikrozkušnicích v mrazicím boxu při teplotě -20°C.

4.2 Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena lyzačním roztokem. Vzorek masa byl rozmrazen, rozmělněn a vložen do předem označené mikrozkušnice (1,5ml). Poté bylo ke vzorku přidáno 300 µl pufru (Digestive Buffer) (100mM NaCl, 50mM TRIS-HCl, 1% SDS, 50mM EDTA, pH=8) a 10 µl Proteinázy K (100µg/ml). Po krátkém vortexování byl vzorek inkubován 2 hodiny při 50 °C a následně byl inkubován přes noc při 37 °C. Druhý den bylo ke vzorku přidáno 300 µl 5M LiCl a po důkladném roztřepání po dobu nejméně 1 minuty bylo přidáno 600 µl chloroformu. Po 30 minutách promíchávání převrácením byla směs centrifugována (14 000 rpm, 15 min.) a supernatant převeden do nové mikrozkušnice. Ke srážení DNA byla zkumavka naplněna 96% ethanolem a protřepána. Po centrifugaci (14 000 rpm, 5 min.) byl supernatant odstraněn a pelet vysušen. Vyizolovaná DNA byla resuspendována v 100µl TE pufru (10mM TRIS-HCl, 1mM EDTA, pH=7,5) a přes noc uložena v lednici. Třetí den byl výtěžek izolované DNA ověřen elektroforézou na 1% agarózovém gelu a vizualizován pod UV světlem.

4.3 PCR/RFLP

Metoda PCR-RFLP/*AluI* odhalující bodovou mutaci C/G v 2141. pozici v exonu 5 genu pro růstový hormon (*GH*) byla provedena dle metodiky Schlee *et al.* (1994). Metoda PCR-RFLP/*AluI* pro odhalení jednonukleotidového polymorfismu (SNP) A/G v 257. pozici v exonu 10 genu pro receptor růstového hormonu (*GHR*) byla provedena dle metodiky Di Stasio *et al.* (2005).

4.3.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Pro amplifikaci 223 bp dlouhého fragmentu genu *GH* a 342 bp dlouhého fragmentu genu *GHR* byly použity sekvence primerů znázorněné v tab. 1.

Gen	Primer	Sekvence primeru (5' - 3')
<i>GH</i>	GH1 (forward)	-GCT GCT CCT GAG GGC CCT TCG-
	GH2 (reverse)	-GCG GCG GCA CTT CAT GAC CCT-
<i>GHR</i>	GHR-A (forward)	-GCT AAC TTC ATC GTG GAC AAC-
	GHR-B (reverse)	-CTA TGG CAT GAT TTT GTT CAG-

Tab. 1. Sekvence primerů použitých pro PCR.

Složení reakční směsi bylo pro každý gen různé, viz tab. 2. Na chladícím stojánku byl připraven master mix (*Taq* pufr, MgCl₂, dNTP's, primery, H₂O), který byl rozpipetován do jednotlivých, předem označených mikrozkušavek. Poté byla do každé z nich přidána DNA a vzorky byly vloženy do termocykleru (Biometra T3000 thermocykler). Po navolení požadovaného programu a počáteční denaturaci byla přidána *Taq* DNA polymeráza.

<i>GH</i>		<i>GHR</i>	
Komponenta	Objem [μl]	Komponenta	Objem [μl]
<i>Taq</i> pufr	3,0	<i>Taq</i> pufr	2,0
25mM MgCl ₂	1,8	25mM MgCl ₂	1,2
dNTP's	3,0	dNTP's	2,0
primer 1 (GH1)	1,5	primer A (GHR-A)	1,0
primer 2 (GH2)	1,5	primer B (GHR-B)	1,0
DNA	2,0	DNA	1,3
<i>Taq</i> DNA polymeráza	3,0	<i>Taq</i> DNA polymeráza	2,0
H ₂ O	14,2	H ₂ O	9,5
Celkový objem	30,0	Celkový objem	20,0

Tab. 2. Složení reakční směsi PCR pro jeden vzorek.

PCR genu *GH* se vždy skládala z: 2 minut počáteční denaturace při 95°C; 35 cyklů po: 50 sekund denaturace při 95°C, 50 sekund nasedání primerů při 53°C a 50 sekund extenze primerů při 72°C. PCR genu *GHR* se skládala z: 2 minut počáteční denaturace při 95°C; 36 cyklů po: 45 sekund denaturace při 95°C, 30 sekund nasedání primerů při 52,5°C a 50 sekund extenze primerů při 72°C. PCR trvala přibližně 2,5 hodiny a po jejím skončení byla v termocykleru udržována konstantní teplota 4°C. Výtěžek amplifikované DNA byl ověřen pomocí elektroforézy na 2,5% agarózovém gelu a vizualizován pod UV světlem.

4.3.2 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Štěpení produktů PCR bylo provedeno pomocí restrikční endonukleázy *AluI*. Do mikrozkušavek s PCR produkty byl rozpipetován na chladícím stojánku předem připravený master mix složený z pufru a *AluI* pro gen *GH* a pufru, *AluI* a H₂O pro gen *GHR*, viz tab. 3. Poté následovala inkubace přes noc při 37°C. Druhý den byly naštípané fragmenty rozděleny pomocí elektroforézy na 3% agarózovém gelu a vizualizovány pod UV světlem.

<i>GH</i>		<i>GHR</i>	
Komponenta	Objem [μl]	Komponenta	Objem [μl]
Restrikční endonukleáza <i>AluI</i> (10 U/μl)	1,0	Restrikční endonukleáza <i>AluI</i> (10 U/μl)	0,5
pufr (Buffer Tango)	1,7	pufr (Buffer Tango)	1,0
H ₂ O	0	H ₂ O	3,85
PCR produkt	25	PCR produkt	15
Celkový objem	27,7	Celkový objem	20,35

Tab. 3. Složení reakční směsi RFLP pro jeden vzorek.

4.4 Elektroforéza na agarózovém gelu

Agarózový gel byl připraven v závislosti na požadované koncentraci, viz tab. 4.

Agarózový gel [%]	Agaróza [g]	1x TBE pufr [ml]	Ethidium bromid [μl]
1	1,0	100	17
2,5	2,5	100	17
3	3,0	100	17

Tab. 4. Složení agarózových gelů o různé koncentraci.

Elektroforéza probíhala v horizontální elektroforézní aparatuře, ve které byl jako elektrolyt použit 1x TBE pufr (180g TRIS, 55g kyseliny borité, 800ml destilované vody, 40ml EDTA, doplněno destilovanou vodou do objemu 1l). Pro ověření genomové DNA na 1% agarózovém gelu bylo do každé jamky napipetováno 5μl resuspendované DNA obarvené 5μl bromfénolové modří. Doba trvání elektroforézy byla 75 minut při 80V. K separaci molekul DNA, získaných metodou PCR, byla použita elektroforéza na 2,5% agarózovém gelu, trvajícím 45 minut při 120V. Do každé jamky bylo napipetováno 5μl PCR produktu smíchaného s 5μl bromfénolové modří. Pro metodu RFLP byly naštípané fragmenty ověřeny na 3% agarózovém gelu. Do každé jamky bylo vloženo 10μl vzorku obarveného 5μl bromfénolovou modří. Elektroforéza probíhala 90 minut při 80V. K ověření přítomnosti a délky fragmentů produktů PCR a RFLP byl vždy do první nebo poslední jamky napipetován 1μl markeru pUC19 DNA/*Msp*I (*Hpa*II) smíchaného s 5μl bromfénolové modří. Výsledky elektroforézy byly pokaždé vizualizovány pod UV světlem.

4.5 Stanovení křehkosti masa pomocí Warner-Bratzlerova testu

Pro určení křehkosti masa byla použita metoda měření síly ve stříhu podle Warnera a Bratzlera. K analýze byly využity vzorky *musculus longissimus lumborum et thoracis*. Hodnoty síly ve stříhu všech 333 vzorků syrového masa byly naměřeny 14. den po porážce na katedře Speciální zootechniky Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity.

4.6 Výpočty

Z výsledků genotypizace, která byla provedena metodou PCR-RFLP, byly spočteny absolutní frekvence genotypů *LL*, *LV*, *VV* genu *GH* a genotypů *AA*, *AG*, *GG* genu *GHR*. Pomocí výpočtů byly následně určeny relativní frekvence genotypů a absolutní a relativní frekvence alel.

Vzorce pro výpočet relativní frekvence genotypů genu *GH* byly:

$$LL^R = LL^A/N,$$

$$LV^R = LV^A/N,$$

$$VV^R = VV^A/N,$$

pro absolutní frekvence alel byly:

$$L^A = 2xLL^A + LV^A,$$

$$V^A = 2xVV^A + LV^A,$$

pro relativní frekvence alel byly:

$$L^R = 2xLL^A + LV^A/2xN,$$

$$V^R = 2xVV^A + LV^A/2xN,$$

kde horní index ^A označoval absolutní frekvenci, horní index ^R vyjadřoval relativní frekvenci, N byl počet jedinců ve sledované populaci.

Genotypové a alelové frekvence genu *GHR* byly spočítány obdobně, tedy vzorce pro relativní frekvence genotypů genu *GHR* byly:

$$AA^R = AA^A/N,$$

$$AG^R = AG^A/N,$$

$$GG^R = GG^A/N,$$

pro absolutní frekvence alel byly:

$$A^A = 2xAA^A + AG^A,$$

$$G^A = 2xGG^A + AG^A$$

a pro relativní frekvence alel byly:

$$A^R = 2xAA^A + AG^A/2xN,$$

$$G^R = 2xGG^A + AG^A/2xN,$$

kde horní index ^A rovněž vyjadřoval absolutní frekvenci, horní index ^R označoval relativní frekvenci a N byl počet jedinců ve sledované populaci.

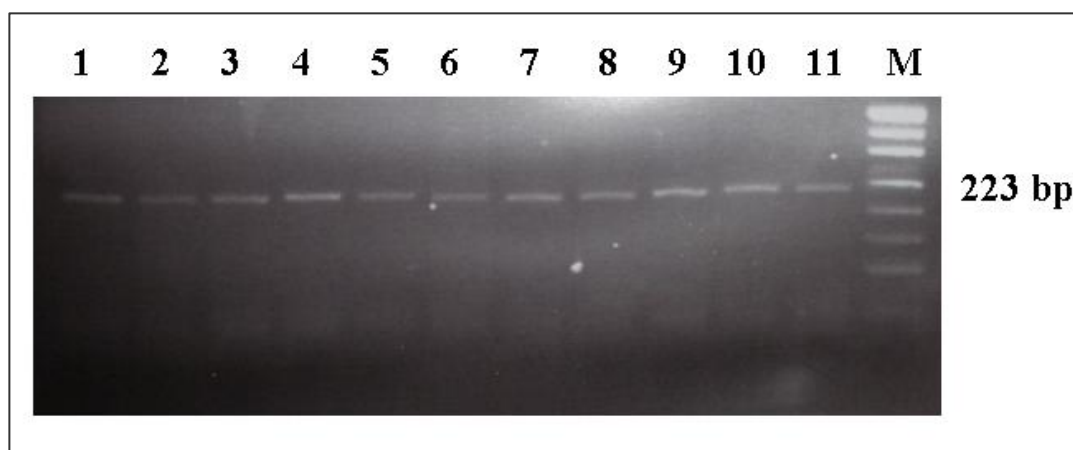
4.7 Statistické vyhodnocení

Funkcí ANOVA v programu Statistica bylo zjištěno, zda mají genotypy jednotlivých genů *GH* a *GHR* vliv na křehkost masa, měřenou jako síla ve stříhu. V tomto programu byla také spočtena průměrná hodnota síly ve stříhu pro každý genotyp.

5. Výsledky

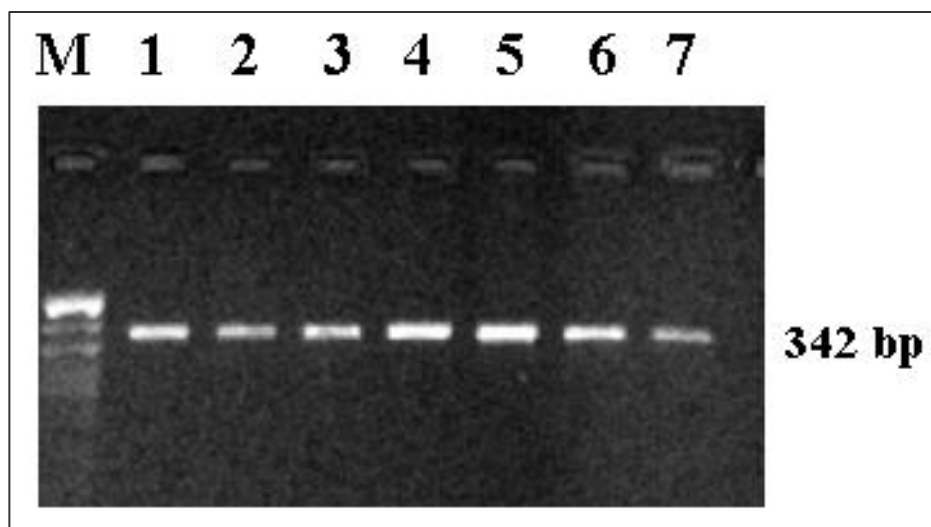
5.1 Genotypizace

Ze všech 333 vzorků masa byla úspěšně vyizolována DNA. Metodou PCR-RFLP/*AluI* byla provedena genotypizace genů *GH* a *GHR*. Fragment genu *GH* amplifikovaný metodou PCR byl dlouhý 223 bp, viz obr. 1.



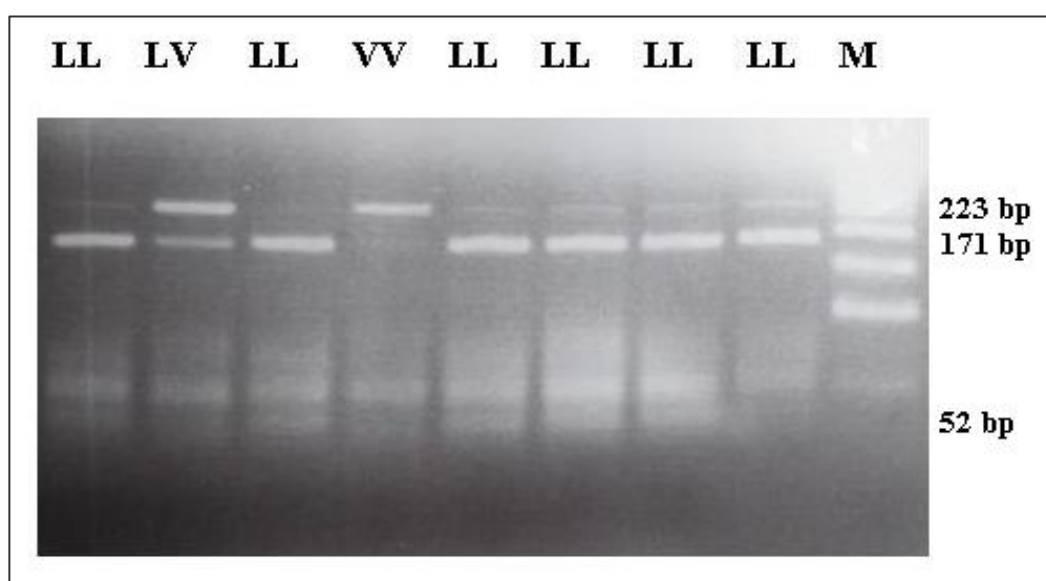
Obr. 1. Gen *GH*: vizualizace PCR produktu po elektroforetické separaci.

Metodou PCR amplifikovaný fragment genu *GHR* se vyznačoval délkou 342 bp, viz obr. 2.



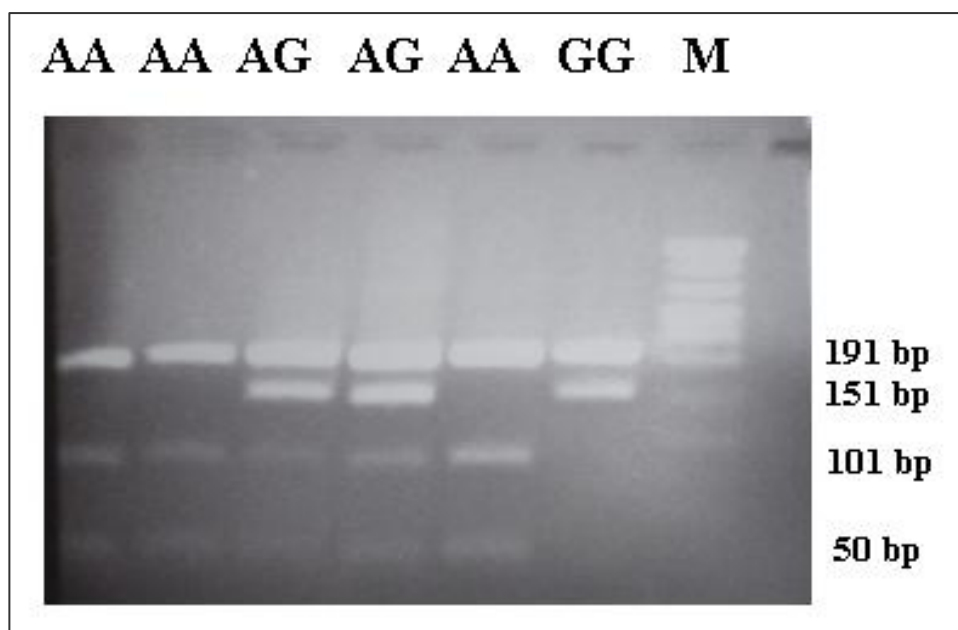
Obr. 2. Gen *GHR*: vizualizace PCR produktu po elektroforetické separaci.

Při metodě RFLP byl pro oba geny použit restriční enzym *AluI*. Alela *L* genu *GH* měla jedno restriční místo pro *AluI*, výsledkem čehož byly dva fragmenty o délce 171 bp a 52 bp. Alela *V* zůstala nesestřížená, takže fragment byl dlouhý 223 bp. U homozygotů s genotypem *LL* byly tedy po elektroforetické separaci na agarózovém gelu přítomny dva fragmenty o délce 171 bp a 52 bp. U jedinců s genotypem *LV* se na agarózovém gelu vyskytovaly tři fragmenty dlouhé 223 bp, 171 bp a 52 bp a u jedinců s genotypem *VV* se nacházel pouze jeden fragment 223 bp dlouhý, viz obr. 3.



Obr. 3. Gen *GH*: vizualizace PCR/RFLP po elektroforetické separaci.

Alela *G* genu *GHR* se skládala ze dvou fragmentů o délce 191 bp a 151 bp. Alela *A* se vyznačovala jedním *AluI* restričním místem navíc, z čehož plynuly tři fragmenty 191 bp, 101 bp a 50 bp dlouhé. U jedinců s genotypem *AA* se po elektroforéze na agarózovém gelu vyskytovaly tři fragmenty o délce 191 bp, 101 bp a 50 bp. U heterozygotů *AG* byly přítomny čtyři fragmenty dlouhé 191 bp, 151 bp, 101 bp a 50 bp a u homozygotů *GG* dva fragmenty 191 bp a 151 bp dlouhé viz obr. 4.



Obr. 4. Gen *GHR*: vizualizace PCR/RFLP po elektroforetické separaci.

5.2 Frekvence alel a genotypů

Ze všech 333 jedinců pro SNP *GH/AluI* bylo 166 homozygotů *LL*, 161 heterozygotů *LV* a pouze 6 homozygotů *VV*. Genotyp *VV* byl tedy nejméně četný s relativní frekvencí 0,018. Relativní frekvence genotypů *LL* a *LV* byly přibližně stejné, a to 0,499 (*LL*) a 0,483 (*LV*). Ve sledované populaci výrazně převažovala alela *L* s frekvencí 0,74 oproti alele *V*, jejíž relativní frekvence byla 0,26. Absolutní i relativní frekvence genotypů a alel jsou uvedeny v tab. 5.

Frekvence	Genotyp			Alela	
	<i>LL</i>	<i>LV</i>	<i>VV</i>	<i>L</i>	<i>V</i>
absolutní	166	161	6	493	173
relativní	0,499	0,483	0,018	0,740	0,260

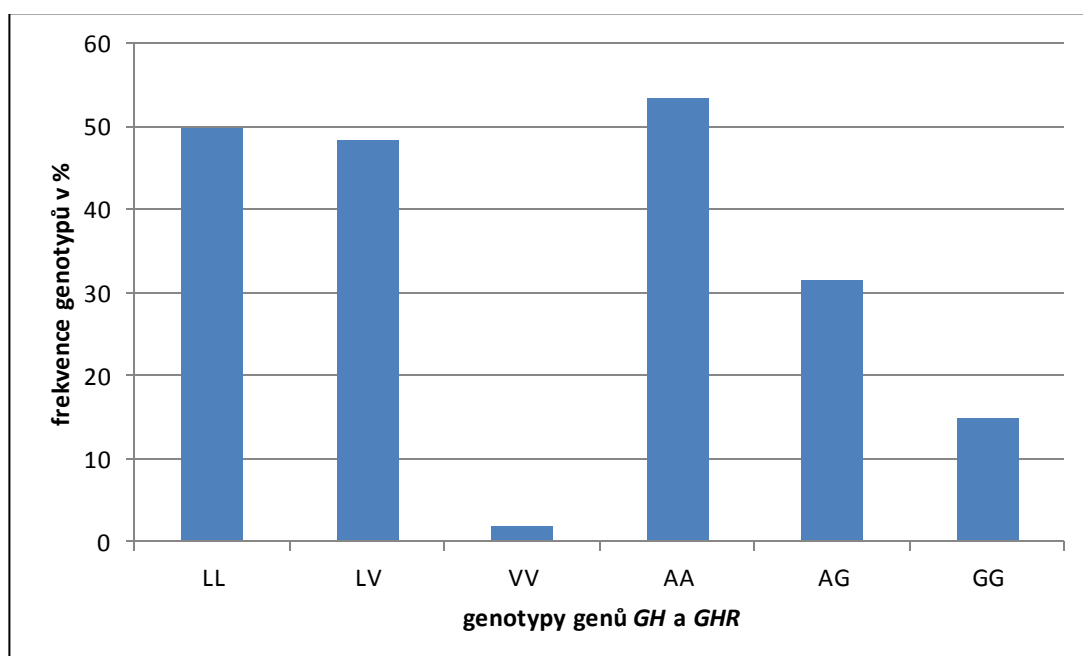
Tab. 5. Absolutní a relativní genotypové a alelické frekvence pro SNP *GH/AluI*.

Pro SNP *GHR/AluI* bylo zjištěno 178 homozygotů *AA*, 105 heterozygotů *AG* a 50 homozygotů *GG*. Nejvíce byl tedy zastoupen genotyp *AA* s relativní frekvencí 0,535, nejméně pak genotyp *GG* s frekvencí 0,15. Relativní frekvence genotypu *AG* byla 0,315. Co se týče zastoupení jednotlivých alel v populaci, byla alela *A* výrazně četnější s relativní frekvencí 0,692, zatímco frekvence alely *G* byla 0,308. Absolutní a relativní frekvence alel a genotypů pro SNP *GHR/AluI* jsou zobrazeny v tab. 6.

Frekvence	Genotyp			Alela	
	<i>AA</i>	<i>AG</i>	<i>GG</i>	<i>A</i>	<i>G</i>
absolutní	178	105	50	461	205
relativní	0,535	0,315	0,150	0,692	0,308

Tab. 6. Absolutní a relativní genotypové a alelické frekvence pro SNP *GHR/AluI*.

V grafu 1. je znázorněno procentuální zastoupení jednotlivých genotypů *LL*, *LV*, *VV* genu *GH* a genotypů *AA*, *AG*, *GG* genu *GHR* ve sledované populaci.



Graf 1. Procentuální zastoupení genotypů genů *GH* a *GHR* ve sledované populaci.

5.3 Vliv genotypu na sílu ve stříhu (křehkost)

V programu Statistica pomocí funkce ANOVA byly vyhodnoceny vztahy mezi genotypy jednotlivých genů a sílou ve stříhu syrového masa měřenou 14. den po porážce. Bylo zjištěno, že síla ve stříhu se v závislosti na genotypu genu *GH* průkazně liší ($P < 0,05$). Výsledky ANOVA pro gen *GH* jsou uvedeny v tab. 7. U genu *GHR* nebyl zjištěn žádný vliv genotypu na sílu ve stříhu ($P > 0,05$), viz tab. 8.

	Součet čtverců (SS)	Stupně volnosti (DF)	Průměrný čtverec (MS)	F	P
Genotypy <i>GH</i>	7,738	2	3,869	3,079	0,047326
Reziduály	414,655	330	1,257		

Tab. 7. Výsledky ANOVA pro lokus *GH*.

	Součet čtverců (SS)	Stupně volnosti (DF)	Průměrný čtverec (MS)	F	P
Genotypy <i>GHR</i>	0,300	2	0,150	0,117	0,889373
Reziduály	422,093	330	1,279		

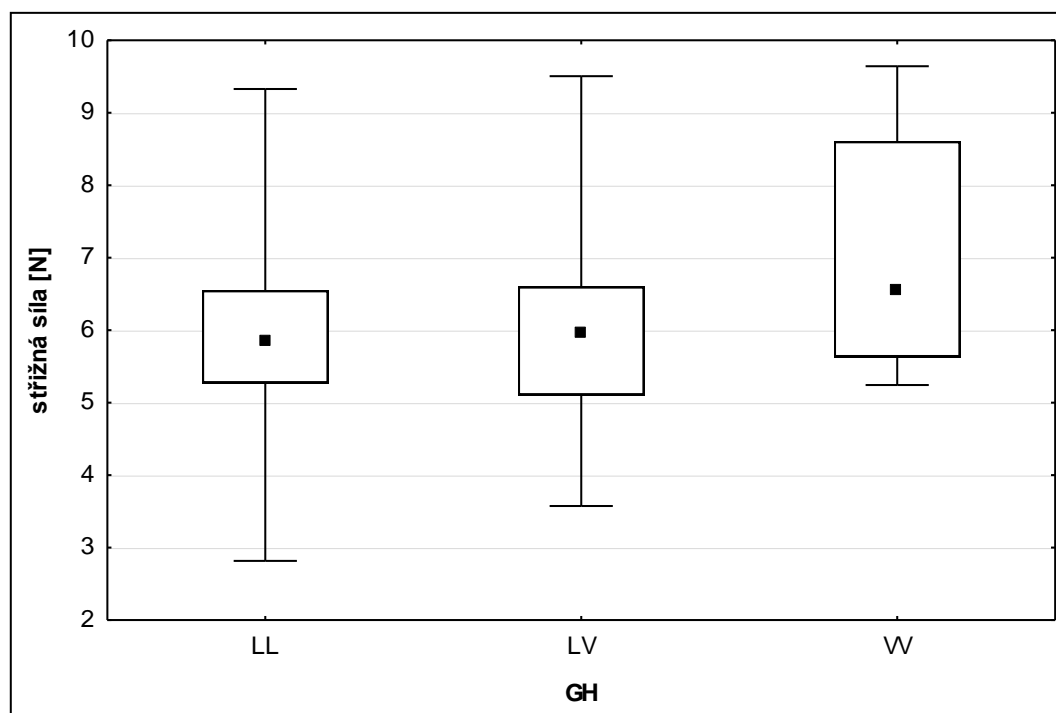
Tab. 8. Výsledky ANOVA pro lokus *GHR*.

V tabulce 9. jsou uvedeny průměrné hodnoty síly ve stříhu pro jednotlivé genotypy. Zatímco průměrné hodnoty síly stříhu u genotypů *AA*, *AG* a *GG* genu *GHR* se téměř nelišily, u genotypů *LL*, *LV* a *VV* genu *GH* byly zjištěny významné rozdíly. Nejnižší hodnota síly ve stříhu byla zaznamenána u genotypu *LL* (5,892416) a u genotypu *LV* byla jen nepatrně vyšší (5,982839). Výrazně vyšší hodnota síly ve stříhu byla však zjištěna u genotypu *VV* (7,032333). Průměrná hodnota síly ve stříhu u genotypu *LL* byla tedy jen o 1,54 % nižší než u genotypu *LV* avšak o 19,35 % nižší než u genotypu *VV*. Genotyp *VV* vyšel tedy z hlediska naměřené síly stříhu, respektive křehkosti, podstatně hůře, ve srovnání s genotypy *LL* a *LV*.

Gen	Genotyp	Počet	Průměrná hodnota síly ve stříhu [N]
<i>GH</i>	<i>LL</i>	166	5,892416
	<i>LV</i>	161	5,982839
	<i>VV</i>	6	7,032333
<i>GHR</i>	<i>AA</i>	178	5,983174
	<i>AG</i>	105	5,936067
	<i>GG</i>	50	5,905600

Tab. 9. Průměrné hodnoty síly ve stříhu u jednotlivých genotypů.

V grafu 2. je zobrazena variabilita naměřených hodnot síly ve stříhu u jednotlivých genotypů genu *GH*. Z grafu je dobře patrné, že u jedinců s genotypem *VV* nebyla 14. den po porážce naměřena nižší hodnota střížné síly, než 5,24.



Graf 2. Znárodnění variability síly stříhu u jednotlivých genotypů genu *GH*. Je zobrazen medián, kvartily a rozsah.

6. Diskuse

Substituce cytosinu (C) na guanin (G) v 2141. pozici v exonu 5 genu *GH* způsobuje záměnu aminokyseliny leucin (Leu, CTG) na valin (Val, GTG) ve 127. pozici polypeptidu růstového hormonu. Ve sledované populaci 333 býků českého strakatého skotu se pro daný lokus vyskytovalo 166 jedinců s genotypem *LL*, 161 heterozygotů *LV* a 6 homozygotů *VV*. Substituce adeninu (A) na guanin (G) v 257. pozici v exonu 10 genu *GHR* způsobuje záměnu aminokyseliny serin (Ser, AGC) na glycin (Gly, GGC) v polypeptidu receptoru růstového hormonu. Ve sledované populaci bylo pro tento lokus zjištěno 178 homozygotů *AA*, 105 heterozygotů *AG* a 50 homozygotů *GG*.

Zatímco četnost jedinců s genotypy *LL* a *LV* byla téměř stejná, 49,9% (*LL*) a 48,3% (*LV*), počet homozygotů *VV* byl výrazně nižší, pouze 1,8%. K velmi podobnému výsledku dospěla také Moravčíková *et al.* (2013) u populace slovenského strakatého skotu, ve které četnost homozygotů *LL* byla 48%, heterozygotů *LV* 46% a homozygotů *VV* 6%. U kříženců plemene limousine byl zaznamenán dokonce nulový výskyt homozygotů *VV* (Hartatik *et al.*, 2013). V mnou sledované populaci býků českého strakatého skotu, byla zjištěna výrazná převaha alely *L*, jejíž frekvence byla 0,74. Frekvence alely *V* byla pak 0,26. K podobným výsledkům dospělo více autorů u různých plemen skotu. Di Stasio *et al.* (2002) zjistil u plemene piemontese frekvenci alely *L* 0,72 a alely *V* 0,28. Také u jiných masných plemen, jako jsou angus a shorthorn měla alela *L* vyšší frekvenci než 0,7 (Barendse *et al.*, 2006). Grochowska *et al.* (1999) zaznamenala u holštýnsko-fríského skotu frekvence *L* 0,69 a *V* 0,31 a Schlee *et al.* (1994) zjistil frekvence *L* 0,68 a *V* 0,32 u býků plemene simentál, což je plemeno příbuzné s českým strakatým skotem. Kemenes *et al.* (1999) studoval sedm různých plemen, z toho čtyři patřící do skupiny *Bos taurus* a tři do skupiny *Bos indicus*. Zatímco u skupiny *B. taurus* měl lokus *GH* obě alely (*L* i *V*), u skupiny *B. indicus* nebyla alela *V* nalezena. U plemene charolais pak byla zjištěna největší frekvence alely *V* (0,28) ze všech studovaných plemen. K rozdílným výsledkům oproti výše zmíněným však dospěla Neubauerová (2000) u plemen česká červinka, český strakatý skot, černostrakatý skot a německý černostrakatý skot. U prvních dvou zmíněných plemen byla zjištěna mírná převaha alely *V*, konkrétně u české červinky byla frekvence alely *V* 0,509 a u českého strakatého skotu 0,558. U plemen černostrakatý skot a německý černostrakatý skot

byla frekvence alely *V* ještě vyšší, a to 0,7 u černostrakatého a 0,833 u německého černostrakatého skotu.

V souvislosti se SNP v 257. pozici genu *GHR* bylo v této práci zjištěno, že víc jak polovina jedinců ve sledované populaci, konkrétně 53,5% měla genotyp *AA*. Heterozygotní genotyp *AG* pak mělo 31,5% jedinců a genotyp *GG* mělo pouze 15% býků. Tomu odpovídala i vyšší frekvence alely *A*, která byla 0,692 a nižší frekvence alely *G* (0,308). K velmi podobným výsledkům dospěla Hradecká *et al.* (2006), která provedla genotypizaci u stejného plemene, tedy českého strakatého skotu. Počet homozygotů *AA* byl téměř stejný, konkrétně 54,2%, pouze heterozygotů *AG* bylo nepatrně více (38,3%) a homozygotů *GG* méně (7,5%). Olenski *et al.* (2010) zaznamenal u holštýnsko-fríského skotu vyšší počet jedinců s genotypem *AA* (79,1%) a velmi malý počet homozygotů *GG* (0,6%). Frekvence alely *A* u tohoto plemene byla tedy vysoká (0,891) a alely *G* nízká (0,109). Ge *et al.* (2000) provedl genotypizaci u masného plemene angus, kde frekvence alely *A* byla rovněž výrazně vyšší (0,78) oproti frekvenci alely *G* (0,22). K zcela jiným výsledkům došel Ribeca *et al.* (2014) u mladých býků plemene piemontese. Nejvíce jedinců bylo heterozygotního genotypu *AG*, konkrétně 49% poté bylo 30% jedinců genotypu *GG* a nejméně jedinců bylo homozygotního genotypu *AA*. Tomu odpovídaly i frekvence alel, kdy vyšší frekvenci měla alela *G* (0,55) a nižší alela *A* (0,45). Zdá se tedy, že mezi různými plemeny skotu jsou frekvence alel a genotypů pro daný lokus velmi variabilní.

V této práci byl rovněž zjištěn průkazný vliv genotypu genu *GH* na křehkost masa, měřenou jako síla ve stříhu. Maso jedinců s genotypem *VV* bylo méně křehké, než maso jedinců s genotypy *LL* a *LV*. Negativní vliv genotypu *VV* zaznamenal také Chrenek *et al.* (1998) u býků plemene simmental. Býci s genotypem *VV* měli podstatně nižší tělesnou hmotnost a průměrný denní přírůstek, než býci s genotypy *LL* a *LV*. Pozitivní vliv genotypů *LL* a *LV* a negativní účinek genotypu *VV* potvrzují také jiní autoři, jako Schlee *et al.* (1994) a Oprzadek *et al.*, (2005). Ve studii Schlee *et al.* (1994) vykazoval heterozygotní *LV* genotyp býků plemene simmental lepší hodnoty než *LL* a *VV* pro jatečnou výtěžnost a „meat value” (index, který zahrnoval jatečnou výtěžnost a klasifikační skóre). V souvislosti s klasifikačním skóre byl ovšem genotyp *LL* významně lepší než *LV* a *VV*. Oprzadek *et al.* (2005) u fríských býků zjistili, že heterozygoti *LV* měli vyšší tělesnou hmotnost a větší kapacitu příjmu krmiva. Homozygoti *LL* spolu s heterozygoty *LV* souviseli také s vyšší jatečnou

výtěžností ve srovnání s homozygoty *VV*. Na druhou stranu Zwierzchowski *et al.* (2001) ve své práci uvedl, že býci černostrakatého skotu s genotypem *VV* měli větší hmotnost a vykazovali vyšší denní přírůstek než jedinci s genotypy *LL* a *LV*. Barendse *et al.* (2006) zkoumal asociaci mezi substitucí C/G genu *GH* a obsahem tuku u plemen angus a shorthorn. Homozygoti kódující valin zde měli nižší výšku tuku u kýty, avšak vyšší stupeň mramorování.

Co se týče lokusu *GHR*, v této práci nebyl zjištěn žádný vliv genotypu na sílu ve stříhu, respektive křehkost. To se shoduje s výsledky jiných studií. Di Stasio *et al.* (2005) provedl výzkum u býků plemene piemontese, kde byla měřena síla ve stříhu 1., 3., 7. a 11. den po porážce. Také on nezaznamenal žádný vliv genotypu na křehkost, měřenou jako síla stříhu, v ani jednom dni měření. Jediný významný efekt substituce A/G pozoroval u ztrát odkapem ve 3. den, kdy alela A byla asociována s vyššími hodnotami. Ribeca *et al.* (2014) provedl rozsáhlou studii, jejímž cílem bylo zjistit vztah mezi 10 kandidátními geny (včetně *GHR*) a hmotností a stavbou jatečně upraveného těla (JUT), hmotností JUT/věk při porážce a ukazateli kvality masa (pH, barva, ztráta při vaření, ztráta odkapem a síla ve stříhu) u mladých býků plemene piemontese. Rovněž on nezaznamenal ve své práci vliv genotypu genu *GHR* na sílu stříhu tepelně upravených vzorků masa měřenou 8. den po porážce. Substituce v *GHR* byla asociována pouze s vlastnostmi jako: hmotnost JUT/věk při porážce, stavba jatečného těla a pH masa 8. den po porážce. Také Reardon *et al.* (2010) zkoumal vliv tohoto SNP v genu *GHR* na smyslové a technologické znaky kvality masa u kříženců *Bos taurus*. Ve své práci zjistil vliv genotypu na barvu masa, obsah proteinů ve svalech a obsah intramuskulárního tuku. Nicméně asociace mezi genotypem a silou ve stříhu, měřenou 14. dní po porážce, zde rovněž nebyla zaznamenána.

7. Závěr

V genu růstového hormonu (*GH*) a genu pro receptor růstového hormonu (*GHR*) bylo nalezeno více polymorfních míst a některé byly asociovány s ukazateli jakosti hovězího masa. Tato práce byla zaměřena na dvě polymorfní místa, konkrétně na polymorfismus v exonu 5 genu *GH*, způsobující záměnu aminokyseliny leucinu na valin v polypeptidu růstového hormonu, a polymorfismus v exonu 10 genu *GHR*, způsobující substituci aminokyseliny serinu na glycin v polypeptidu receptoru růstového hormonu. Na základě provedené genotypizace pomocí molekulárně-genetických metod, byly zjištěny frekvence genotypů a alel pro oba lokusy. Poté byl statisticky vyhodnocen vztah mezi genotypy a ukazatelem jakosti masa – křehkostí, měřenou jako síla ve stříhu syrového masa 14. den po porážce.

Pokud jde o potenciální marker v 2141. pozici genu *GH*, byl zde zjištěn průkazný vliv genotypu na sílu ve stříhu. U jedinců s genotypem *VV* byla naměřena vyšší průměrná hodnota síly ve stříhu než u heterozygotů *LV* a homozygotů *LL*. Maso homozygotů *VV* bylo tedy podstatně méně křehké. S ohledem na velmi malé zastoupení těchto homozygotů ve sledované populaci (pouze 1,8 %) by bylo vhodné rozšířit testovanou populaci a tím i zvýšit počet jedinců s tímto genotypem, aby byla statistická analýza více průkazná.

Pokud se jedná o SNP v 257. pozici genu pro receptoru růstového hormonu, nebyl zde zjištěn žádný vliv genotypu na sílu ve stříhu. Z tohoto hlediska se tedy tento jednonukleotidový polymorfismus v genu *GHR* nejeví jako využitelný marker pro sílu ve stříhu, respektive křehkost.

8. Seznam zkratek

AFLP - Amplified fragment length polymorphism

Ala - alanin

ASO - Allele-Specific Oligonucleotide

bp - base pair

BW - body weight

CAPN1 - calpain 1

CAST - calpastatin

CL - cooking losses

DFD - dark, firm, and dry

DGAT1- diacylglycerol O-acyltransferase 1

DGGE - Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DNA - deoxyribonucleic acid

dNTP - deoxyribonucleotide triphosphate

dPAGE - discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid

ERT - economically relevant traits

EST - Expressed sequence tag

GH - growth hormone

GHR - growth hormone receptor

GHRH - growth hormone releasing hormone

GHS - growth hormone secretagogue

Gly - glycin

IGF-I - insulin-like growth factor-1

JAK2 - Janus kinase 2

JUT - jatečně upravené tělo

LCR - Ligase chain reaction

LEP - leptin

Leu - leucin

LINE-1 - long interspersed element-1

MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight

MAP - mitogen-activated protein kinase

MAS - marker-assisted selection

Met - methionin
MSTN - myostatin
PCR - polymerase chain reaction
PI3 - phosphoinositide-3 kinase
PIC - Polymorphic Information Content
PSE - pale, soft and exudative
QTL - Quantitative Trait Loci
RAPD - Random amplified polymorphic DNA
RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism
SCD - stearyl CoA desaturase
Ser - serin
SNP - Single Nucleotide Polymorphism
SRIF - somatotropin release-inhibiting factor
SS - somatostatin
SSCP - Single Strand Conformation Polymorphism
SSLP - Simple Sequence Length Polymorphism
SSR - Simple sequence repeats
STAT5 - signal transducer and activator of transcription 5
TG - thyroglobulin
Thr - threonin
USFA - unsaturated fatty acid
Val - valin

9. Seznam literatury

Aggrey S. E., Yao J., Sabour M. P., Lin C. Y., Zadworny D., Hayes J. F., Kunlein U. (1999) Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins. *J. Hered.*, 90: 148-151.

Ahmadian A., Gharizadeh B., Gustafsson A. C., Sterky F., Nyren P., Uhlen M., Lundeberg J. (2000) Singlenucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing. *Anal. Biochem.*, 280: 103-110.

Alderborn A., Kristofferson A., Hammerling U. (2000) Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing. *Genome Res.*, 10: 1249-1258.

Ardiyanti A., Abe F., Kobashikawa H., Hirayama T., Sugino T., Suzuki K., Katoh K. (2009a) Plasma hormone and metabolite concentrations involved in the somatotropic axis of Japanese Black heifers in association with growth hormone gene polymorphism. *Domestic Animal Endocrinology*, 37: 243-249.

Ardiyanti A., Oki Y., Suda Y., Suzuki K., Chikuni K., Obara Y., Katoh K. (2009b) Effects of GH gene polymorphism and sex on carcass traits and fatty acid compositions in Japanese Black cattle. *Animal Science Journal*, 80: 62-69.

Banos G., Woolliams J. A., Woodward B. W., Forbes A. B., Coffey M. P. (2008) Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 3190-3200.

Barendse W., Bunch R., Thomas M., Armitage S., Baud S., Donaldson N. (2004) The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44: 669 – 674.

Barendse W., Bunch R. J., Harrison B. E., Thomas M. B. (2006) The growth hormone 1 GH1:c.457C>G mutation is associated with intramuscular and rump fat distribution in a large sample of Australian feedlot cattle. *Animal Genetics*, 37: 211-214.

Belew J. B., Brooks J. C., McKenna D. R., Savell J. W. (2003) Warner-Bratzler shear evaluations of 40 bovine muscles. *Meat Science*, 64: 507-512.

Bernard C., Cassar-Malek I., Le Cunff M., Dubroeuq H., Renard G., Hocquette J. F. (2007) New indicators of beef sensory quality revealed by expression of specific genes. *J. Agr. Food Chem.*, 55: 5229-5237.

Bishop M. D., Koochmaraie M., Killefer J., Kappes S. (1993) Restriction-fragment-length-polymorphisms in the bovine calpastatin gene. *Journal of Animal Science*, 71: 2277.

Blott S., Kim J. J., Moisisio S. *et al.* (2003) Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*, 163: 253-266.

Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.*, 32: 314-331.

Brahami A., Ardiyanti A., Tonosaki K. *et al.* (2013) Haplotype C of growth hormone (GH) gene in Japanese Black cattle: Structure of GH protein and a novel method for detection of the gene. *Animal Science Journal*, 84: 802-804.

Buchanan F. C., Fitzsimmons C. J., Van Kessel A. G., Thue T. D., Winkelman-Sim C., Schmutz S. M. (2002) Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.*, 34: 105-116.

- Burrow H. M., Moore S. S., Johnston D. J., Barendse W., Bindon B. M. (2001) Quantitative and molecular genetic influences on properties of beef: a review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 41: 893-919.
- Burton J. L., McBride B. W., Block E., Glimm D. R., Kenelly J. J. (1994) A review of bovine growth hormone. *Can. J. Anim. Sci.*, 74: 167- 201.
- Cariello N. F., Scott J. K., Kat A. G., Thilly W. G., Keohavong P. (1988) Resolution of a missense mutant in human genomic DNA by denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing using in vitro DNA amplification. *Am. J. Hum. Genet.*, 42: 726-734.
- Casas E., White S. N., Wheeler T. L., Shackelford S. D., Koohmaraie M., Rile D. G., Chale C. C., Johnson D. D., Smith P. L. (2006) Effects of calpastatin and mu-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. *J. Anim. Sci.*, 84: 520-525.
- Chagas L. M., Bass J. J., Blanche D., Burke C. R., Kay J. K., Lindsay D. R., *et al.* (2007) Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 90: 4022-4032.
- Chikuni K., Fukumoto Y., Tanabe R., Muroya S., Ozawa S. (1997) A simple method for genotyping the bovine growth hormone. *Anim Genet.*, 28: 230-2.
- Chikuni K., Nagatsuma T., Tabata T., *et al.* (1994) Genetic variants of the growth hormone gene in Japanese cattle. *Anim. Sci. Technol.*, 65: 340-6.
- Chrenek P., Kmet J., Sakowski T., Vasicek D., Huba J., Chrenek J. (1998) Relationship of growth hormone genotypes with meat production traits of Slovak Pied bulls. *Czech Journal of Animal Science*, 43: 541-544.
- Ciobanu D. C., Bastiaansen J. W. M., Lonergan S. M., Thomsen H., Dekkers J. C. M., Plastow G. S., *et al.* (2004) New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs. *Journal of Animal Science*, 82: 2829-2839.

Cotton R. G. (1993) Current methods of mutation detection. *Mutat. Res.*, 285: 125-144.

Crawford A. M., Cuthbertson R. P. (1996) Mutations in sheep microsatellites. *Genome Res.*, 6: 876-879.

Curi R. A., Oliveira H. N., Silveira A. C., Lopes C. R. (2005) Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of IGF1 and GHR on growth and carcass traits in beef cattle. *Animal Genetics*, 36: 58-62.

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

Dikeman M. E., Pollak E. J., Zhang Z., Moser D. W., Gill C. A., Dressler E. A. (2005) Phenotypic ranges and relationships among carcass and meat palatability traits for fourteen cattle breeds, and heritabilities and expected progeny differences for Warner-Bratzler shear force in three beef cattle breeds. *Journal of Animal Science*, 83: 2461-2467.

Dinesh K. R., Chan W. K., Lim T. M., Phang V. P. E. (1995) RAPD markers in fishes: an evaluation of resolution and reproducibility. *Asia-Pac. J. Mol. Biol. Biotechnol.*, 3: 112-118.

Di Stasio L., Brugiapaglia A., Destefanis G., Albera A., Sartore S. (2003) GH1 as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120: 358-361.

Di Stasio L., Destefanis G., Brugiapaglia A., Albera A., Rolando A. (2005) Polymorphism of the GHR gene in the cattle and relationship with meat production and quality. *Animal Genetics*, 36: 138-140.

Di Stasio L., Sartore S., Albera A. (2002) Lack of association of GH1 and POU1F1 gene variants with meat production traits in Piemontese cattle. *Animal Genetics*, 33: 61-64.

Dransfield E. (1992) Modelling post-mortem tenderisation-III: Role of calpain I in conditioning. *Meat Science*, 31: 85-94.

Dransfield E. (1994) Modelling post mortem tenderisation-V: Inactivation of calpains. *Meat Science*, 37: 391-409.

Dybus A. (2002) Associations between Leu/Val polymorphism of growth hormone gene and milk production traits in Black-and-White cattle. *Arch. Tierz. Dummerstorf*, 45: 421-428.

Edens A., Talamantes F. (1998) Alternative processing of growth hormone receptor transcripts. *Endocrinology Review*, 19: 559-582.

Etherton T. D. (2004) Somatotropic function: The somatomedin hypothesis revisited. *J. Anim. Sci.*, 82: 239-244.

Etherton T. D., Bauman D. E. (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiol. Rev.*, 78: 745-761.

Falaki M., Gengler N., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Formigoni A., Burny A., Portetelle D., Renaville R. (1996) Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *J. Dairy Sci.*, 79: 1446-1453.

Feldkamp T. J., Schroeder T. C., Lusk J. L. (2005) Determining consumer valuation of differentiated beef steak quality attributes. *J. Muscle Foods*, 16: 1-15.

Frank S. J. (2001) Growth hormone signalling and its regulation: Preventing too much of a good thing. *Growth Hormone and IGF Research*, 11: 201-212.

Frohman L. A., Kineman R. D., Kamegai J., *et al.* (2000) Secretagogues and the somatotrope: signalling and proliferation. *Recent Prog. Horm. Res.*, 55: 269-290.

Garrett A. J., Rincon G., Medrano J. F., Elzo W. A., Silver G. A., Thomas W. G. (2008) Promoter region of the bovine growth hormone receptor gene: Single nucleotide polymorphism discovery in cattle and association with performance in Brangus bulls. *Journal of Animal Science*, 86: 3315-3323.

Geary T. W., McFadin E. L., MacNeil M. D. *et al.* (2003) Leptin as a predictor of carcass composition in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 81: 1-8.

Ge W., Davis M. E., Hines H. C., Irvin K. M. (1999) Two-allelic DGGE polymorphism detected in the promoter region of the bovine GHR gene. *Anim. Genet.*, 30: 71.

Ge W., Davis M. E., Hines H. C., Irvin K. M. (2000) Rapid communication: single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. *Journal of Animal Science*, 78: 2229-2230.

Ge W., Davis M. E., Hines H. C., Irvin K. M., Simmen R. C. M. (2003) Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. *J. Anim. Sci.*, 81: 641-648.

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

Grisart B., Coppieters W., Farnir F., *et al.* (2002) 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*, 12: 222-231.

Grochowska R., Zwierzchowski L., Snochowski M., Reklewski Z. (1999) Stimulated growth hormone (GH) release in Friesian cattle with respect to GH genotypes. *Reproduction Nutrition Development*, 39: 171-180.

Hacia J. G., Fan J. B., Ryder O., Jin L., Edgemon K., Ghandour G., Mayer R. A., *et al.* (1999) Determination of ancestral alleles for human single-nucleotide polymorphisms using high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Genet.*, 22: 164-167.

Hale C. S., Herring W. O., Shibuya H., Lucy M. C., Lubahn D. B., Keisler D. H., Johnson G. S. (2000) Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of growth hormone receptor gene. *Journal of Animal Science*, 78: 2099-2104.

Han S. H., Cho I. C., Kim J. H. *et al.* (2009) A GHR Polymorphism and Its Associations with Carcass Traits in Hanwoo Cattle. *Genes and Genomics*, 31: 35-41.

Hartatik T., Volkandari S. D., Rachman M. R, Sumadi (2013) Polymorphism leu/val of growth hormone gene identified from limousin cross local cattle in Indonesia. *Procedia Environmental Sciences*, 17: 105-108.

Hecker K. H., Taylor P. D., Gjerde D. T. (1999) Mutation detection by denaturing DNA chromatography using fluorescently labeled polymerase chain reaction products. *Anal. Biochem.*, 272: 156-164.

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

Hediger R., Johnson S. E., Barendse W., Drinkwater R. D., Moore S. S., Hetzel J. (1995) Assignment of the growth hormone gene locus to 19q26-ter in cattle dan to 11q25-ter in sheep by in situ hybridization. *Genomics*, 8: 171.

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

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

Ho K. K. Y., Hoffman D. M. (1993) Aging and growth hormone. *Horm. Res.*, 40: 80-86.

Houseknecht K. L., Baile C. A., Matteri R. L., *et al.* (1998) The biology of leptin: a review. *Journal of Animal Science*, 76: 1405-1420.

Hradecká E., Řehout V., Čítek J. (2006) The polymorphism of growth hormone receptor gene in Holstein and Czech Pied bulls. *Acta fytotechnica et zootechnica-Mimoriadne číslo*, 224-226.

Ingr I. (1996) Technologie masa. Brno, MZLU, 273 s. ISBN 80-7157-193-8.

Jiang H. L., Lucy M. C. (2001) Involvement of hepatocyte nuclear factor-4 in the expression of the growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in bovine liver. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 15: 1023-1034.

Kadlec P., *et al.* (2002) Technologie potravin I. Praha, VŠCHT, 300 s. ISBN 80-7080-509-9.

Kalin I., Shephard S., Candrian U. (1992) Evaluation of the ligase chain reaction (LCR) for the detection of point mutations. *Mutat. Res.*, 283: 119-123.

Kambadur R., Sharma M., Smith T. P., Bass J. J. (1997) Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Res.*, 7: 910-916.

Karsi A., Patterson A., Feng J., Liu Z. J. (2002) Translational machinery of channel catfish: I. A transcriptomic approach to the analysis of 32 40S ribosomal protein genes and their expression. *Gene*, 291: 177-186.

Katoh K., Kouno S., Okazaki A., Suzuki K., Obara Y. (2008) Interaction of GH polymorphism with body weight and endocrine functions in Japanese Black calves. *Domestic Animal Endocrinol.*, 34: 25-30.

Kemenes P. A., Regitano L. C. D., Rosa A. J. D., Packer I. U., Razook A. G., Figueiredo L. A., *et al.* (1999) Kappa-casein, beta-lactoglobulin and growth hormone allele frequencies and genetic distances in Nelore, Gyr, Guzera, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genetics and Molecular Biology*, 22: 539-541.

Kemp C. M., Sensky P. L., Bardsley R. G., Buttery P. J., Parr T. (2010) Tenderness- An enzymatic view. *Meat Sci.*, 84: 248-256.

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

Kono S. (2005) Comparison of growth traits in different lines and GH genotypes of Japanese Black steers. *Proc. Japan Soc. Anim. Nutr. Metab.*, 49: 1-17.

Koohmaraie M. (1994) Muscle proteinases and meat ageing. *Meat Science*, 36: 93-104.

Koohmaraie M., Doumit M. E., Wheeler T. L. (1996) Meat toughening does not occur when rigor shortening is prevented. *Journal of Animal Science*, 74: 2935-2942.

Koohmaraie M., Geesink G. H. (2006) Contribution of postmortem muscle biochemistry to the delivery of consistent meat quality with particular focus on the calpain system. *Meat Science*, 74: 34-43.

Kopchick J. J., Andry J. M. (2000) Growth hormone (GH), GH receptor and signal transduction. *Mol. Genet. Metab.*, 71: 293-314.

Korbonits M., Goldstone A. P., Gueorguiev M., *et al.* (2004) Ghrelin - a hormone with multiple functions. *Front. Neuroendocrinol.*, 25: 27-68.

- Levinson G., Gutman G. A. (1987) High frequency of short frameshifts in poly-CA/GT tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.*, 15: 5323-5338.
- Li B., Kadura I., Fu D. J., Watson D. E. (2004) Genotyping with TaqMAMA. *Genomics*, 83: 311-320.
- Liefers S. C., te Pas M. F. W., Veerkamp R. F., van der Lende T. (2002) Associations between leptin gene polymorphism and production, liveweight, energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. *J. Dairy Sci.*, 85: 1633-1638.
- Lincoln D. T., Sinowatz F., el-Hifnawi E., Hughes R. L., Waters M. (1995) Evidence of a direct role for growth hormone (GH) in mammary gland proliferation and lactation. *Anat. Histol. Embryol.*, 24: 107-115.
- Litt M., Luty J. A. (1989) A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44: 397-401.
- Liu Z. J., Cordes J. F. (2004) DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1-37.
- Liu Z. J., Li P., Argue B., Dunham R. A. (1998) Inheritance of RAPD markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*) and their F1, F2 and backcross hybrids. *Anim. Genet.*, 29: 58-62.
- Liu Z. J., Li P., Argue B. J., Dunham R. A. (1999) Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, 174: 59-68.
- Lucy M. C., Hauser S. D., Eppard P. J., Krivi G. G., Clark J. H., Bauman D. E., Colier R. J. (1993) Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 10: 325-333.

- Lucy M. C., Johnson G. S., Shibuya H., Boyd C. K., Herring W. O. (1998) Rapid communication: polymorphic (GT)_n microsatellite in the bovine somatotropin receptor gene promoter. *Journal of Animal Science*, 76: 2209-2210.
- Lynch N. M., Kastner C. L., Kropf D. H. (1986) Consumer acceptance of vacuum packaged ground beef as influenced by product color and educational materials. *Journal of Food Science*, 51: 253.
- MacDougall D. B. (1982) Changes in the colour and opacity of meat. *Food Chemistry*, 9: 75-88.
- Maj A., Oprzadek J., Oprzadek A., Dymnicki E., Zwierzchowski L. (2004) Polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene and its association with meat production traits in cattle. *Animal Research*, 53: 503-514.
- Malmgren H., Gustavsson J., Tuvemo T., Dahl N. (1996) Rapid detection of a mutation hot-spot in the human androgen receptor. *Clin. Genet.*, 50: 202-205.
- Marshall D. M. (1999) The genetics of meat quality. In R. Fries and A. Ruvinsky. *The genetics of cattle*, 605-636. Wallingford: CABI Publishing. ISBN 0-85199-258-7.
- McPherron A. C., Lee S. J. (1997) Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 94: 12457-12461.
- McPherron A. C., Lawler A. M., Lee S. J. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387: 83-90.
- Miller M. F., Carr M. F., Ramsey C. B., Crockett K. L., Hoover L. C. (2001) Consumer thresholds for establishing the value of beef tenderness. *J. Anim. Sci.*, 79: 3062-3068.

Moisio S., Elo K., Kantanen J., Vilkki J. (1998) Polymorphism within the 3'-flanking region of the bovine growth hormone receptor gene. *Anim. Genet.*, 29: 55-57.

Moody D. E., Pomp D., Barendse W., Womack J. E. (1995) Assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. *Anim. Genet.*, 26: 341-343.

Moravčíková N., Trakovická A., Navratilová A. (2013) Genetic diversity in populations of Slovak Spotted cattle based on single nucleotide polymorphisms analyses. *Acta Biochimica Polonica*, 60: 807-810.

Neath K. E., Del Barrio A. N., Lapitan R. M., Herrera J. R. V., *et al.* (2007) Protease activity higher in postmortem water buffalo meat than Brahman beef. *Meat Sci.*, 77: 389-396.

Neubauerová V. (2000) Detection of the polymorphism of genetic markers in cattle [online]. [cit. 2014-11-06]. Dostupné z: http://xarquon.jcu.cz/zf/veda_a_vyzkum/svoc_a_dsp/svoc/2000/sbdsp/asekzoo/Neubauerov%E1.rtf.

Nicoll C. S., Mayer G. L., Russell S. M. (1986) Structural features of prolactin and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocrinology Revue*, 7: 169-203.

Nishimura T., Hattori A., Takahashi K. (1999) Structural changes in intramuscular connective tissue during the fattening of Japanese black cattle: Effect of marbling on beef tenderization. *Journal of Animal Science*, 77: 93-104.

Nkrumah J. D., Li C., Yu J., Basarab J. A., Guercio S., Meng Y., Murdoch B., Hansen C., Moore S. S. (2004) Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, growth, feed efficiency, feeding behavior and carcass merit. *J. Anim. Sci.*, 84: 211-219.

Nkrumah J. D., Li C., Yu J., Hansen C., Keisler D. H., Moore S. S. (2005) Polymorphism in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior and measures of carcass merit. *J. Anim. Sci.*, 83: 20-28.

Nowak D. (2011) Enzymes in Tenderization of Meat-The System of Calpains and Other Systems-a Review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 61: 231-237.

Nurmi J., Kiviniemi M., Kujanpaa M., Sjoroos M., Ilonen J., Lovgren T. (2001) High-throughput genetic analysis using time-resolved fluorometry and closed-tube detection. *Anal. Biochem.*, 299: 211-217.

Oka A., Iwaki F., Iwamoto E., Tatsuda K. (2007) Effects of growth rate during the early fattening period on growth, carcass characteristics, and circulating hormones in the different growth hormone genotypes of Japanese Black steers. *Anim. Sci. J.*, 78: 142-50.

Olenski K., Suchocki T., Kaminski S. (2010) Inconsistency of associations between growth hormone receptor gene polymorphism and milk performance traits in Polish Holstein-Friesian cows and bulls. *Animal Science Papers and Reports*, 28: 229-234.

Oprzadek J., Flisikowski K., Zwierzchowski L., Juszczuk-Kubiak E., Rosochacki S., Dymnicki E. (2005) Associations between polymorphism of some candidate genes and growth rates, feed intake and utilisation, slaughter indicators and meat quality in cattle. *Arch. Tierz., Dummerstorf*, 48: 81-87.

Ouali A. (1984) Sensitivity to ionic strength of Mg-Ca-enhanced ATPase activity as an index of myofibrillar ageing in beef. *Meat Science*, 11: 79-88.

Page B. T., Casas E., Heaton M. P., Cullen N. G., Hyndman D. L., *et al.* (2002) Evaluation of singlenucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science*, 80: 3077-3085.

Parmentier I., Portetelle D., Gengler N., Prandi A., Bertozzi C., Vleurick L., Gilson R., Renaville R. (1999) Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. *Domest. Anim. Endocrin.*, 17: 139-148.

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

Reardon W., Mullen A. M., Sweeney T., Hamill R. M. (2010) Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. *Meat Science*, 86: 270-275.

Renaville R., Hammadi M., Portetelle D. (2002) Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 351-360.

Ribeca C., Bonfatti V., Cecchinato A., Albera A., Gallo L., Carnier P. (2014) Effect of polymorphisms in candidate genes on carcass and meat quality traits in double muscled Piemontese cattle. *Meat Science*, 96: 1376-1383.

Roh S. G., Nie G. Y., Lonergan K., Gertler A., Chen C. (2001) Direct modification of somatotrope function by long-term leptin treatment of primary cultured ovine pituitary cells. *Endocrinology*, 142: 5167-5171.

Ross P., Hall L., Smirnov I., Haff L. (1998) High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.*, 16: 1347-1351.

Rowe L. J., Maddock K. R., Lonergan S. M., Huff-Lonergan E. J. (2004) Oxidative environments decrease tenderization of beef steaks through inactivation of microcalpain. *Journal of Animal Science*, 82: 3254-3266.

Schenkel F. S., Miller S. P., Jiang Z., Mandell B. I., Ye X., Li H., Wilton W. J. (2006) Association of a single nucleotide polymorphism in the calpastatin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.*, 84: 291-299.

Schlee P., Graml R., Rottmann O., Pirchner F. (1994) Influence of growth-hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 111: 253-256.

Secchi C., Borromeo V. (1997) Structure and function of bovine growth hormone. Bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. *Journal of Chromatography B*, 688: 161-177.

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

Sherman E. L., Nkrumah J. D., Murdoch B. M., *et al.* (2008) 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*, 86: 1-16.

Smith G. C., Savell J. W., Cross H. R., Carpenter Z. L., Murphey C. E., Aalhus J. L. (1987) Relationship of USDA quality grades to palatability of cooked beef. *Journal of Food Quality*, 10: 269-286.

Sneyers M., Renaville R., Falaki M., *et al.* (1994) TaqI restriction fragment length polymorphisms for growth hormone in bovine breeds and their association with quantitative traits. *Growth Regul.*, 4: 108-112.

Sorensen M. T., Chaudhuri S., Louveau I., Coleman M. E., Etherton T. D. (1992) Growth hormone binding proteins in pig adipose tissue: number, size and effects of pGH treatment on pGH and bGH binding. *Domestic Animal Endocrinology*, 9: 13-24.

Sorrentino R., Poticchio I., Ferrara G. B., Tosi R. (1992) A new approach to HLA-DPB1 typing combining DNA heteroduplex analysis with allele-specific amplification and enzyme restriction. *Immunogenetics*, 36: 248-254.

Southern E. M. (1976) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98: 503-517.

Stone R. T., Kappes S. M., Beattie C. W. (1996) The bovine homologue of the obese gene maps to chromosome 4. *Mamm. Genome*, 7: 399-400.

Storm N., Darnhofer-Patel B., van den Boom D., Rodi C. P. (2003) MALDI-TOF mass spectrometry-based SNP genotyping. *Methods Mol. Biol.*, 212: 241-262.

Sumantran V. N., Tsai M. L., Schwartz J. (1992) Growth hormone induces c-fos and c-jun expression in cells with varying requirements for differentiation. *Endocrinology*, 130: 2016-2024.

Suzuki Y., Orita M., Shiraishi M., Hayashi K., Sekiya T. (1990) Detection of ras gene mutations in human lung cancers by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. *Oncogene*, 5: 1037-1043.

Taniguchi M., Utsugi T., Oyama K., Mannen H., Kobayashi M., Tanabe Y., *et al.* (2004) Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 15: 142-148.

Tatsuda K., Oka A., Iwamoto E., Kuroda Y., Takeshita H., Kataoka H., Kouno S. (2008) Relationship of the bovine growth hormone gene to carcass traits in Japanese black cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 125: 45-49.

Tautz D. (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, 17: 6463-6471.

Taylor J. F., Coutinho L. L., Herring K. L., Gallagher D. S., Brenneman R. A., Burney N., *et al.* (1998) Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. *Animal Genetics*, 29: 194-201.

Taylor R. G., Geesink G. H., Thompson V. F., Koohmaraie M., Goll D. E. (1995) Is Z-disk degradation responsible for postmortem tenderization? *Journal of Animal Science*, 73: 1351-1367.

Thaller G., Kuhn C., Winter A., *et al.* (2003) DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics*, 34: 354-357.

Thomas M., Langley B., Berry C., Sharma M., Kirk S., *et al.* (2000) Myostatin, a negative regulator of muscle growth, functions by inhibiting myoblast proliferation. *J. Biol. Chem.*, 275: 40235-40243.

Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeay M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.*, 23: 4407- 4414.

Warner R. D., Greenwood P. L., Pethick D. W., Ferguson D. M. (2010) Genetic and environmental effects on meat quality. *Meat Science*, 86: 171-183.

Weber J. L., Wong C. (1993) Mutation of human short tandem repeats. *Hum. Mol. Genet.*, 2: 1123-1128.

Welsh J., McClelland M. (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 7213-7218.

Wheeler T. L., Cundiff L. V., Shackelford S. D., Koohmaraie M. (2004) Characterization of biological types of cattle (Cycle VI): Carcass, yield, and longissimus palatability traits. *Journal of Animal Science*, 82: 1177-1189.

Wheeler T. L., Koochmaraie M. (1994) Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. *Journal of Animal Science*, 72: 1232-1238.

Williams J. G. K., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, 18: 6531-6535.

Winter A., Kramer W., Werner F. A. O., Kollers S., Kata S., Durstewitz G., *et al.* (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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 9300-9305.

Zakizadeh S., Rahimi G., Mirae-Ashtiani S. R., Nejati-Javaremi A., *et al.* (2006) Analysis of Bovine Growth Hormone Gene Polymorphisms in Three Iranian Native Breeds and Holstein Cattle by RFLP-PCR. *Biotechnology*, 5: 385-390.

Zhang H. M., Brown D. R., DeNise S. K., Ax, R. L. (1993) Rapid communication: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene. *J. Anim. Sci.*, 71: 2276.

Zhu T., Goh E. L. K., Graichen R., Ling L., Lobie P. E. (2001) Signal transduction via the growth hormone receptor. *Cell. Signal.*, 13:599-616.

Zieba D. A., Amstalden M., Morton S., Gallino J. L., Edwards J. F., Harms P. G., Williams G. L. (2003) Effects of leptin on basal and GHRHstimulated GH secretion from the bovine adenohypophysis are dependent upon nutritional status. *J. Endocrinol.*, 178: 83-99.

Zwierzchowski L., Lukaszewicz M., Dymnicki E., Oprzadek J. (1998) Polymorphism of growth hormone, κ -casein (CASK), and β -lactoglobulin (BLG) genes in growing Friesian cattle, *Anim. Sci. Papers Reports*, 16: 61-68.

Zwierzchowski L., Oprzadek J., Dymnicki E., Dzierzbicki P. (2001) An association of growth hormone, κ -casein, β -lactoglobulin, leptin, and Pit-1 loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 19: 65-77.

10. Přílohy

Příloha 1. Schématické znázornění některých polymorfních míst v genu *GHR*. Zvýrazněná mutace označena jako A/G S555G se nachází na 257. pozici v exonu 10 genu *GHR*.



Zdroj: Olenski K., Suchocki T., Kaminski S. (2010) Inconsistency of associations between growth hormone receptor gene polymorphism and milk performance traits in Polish Holstein-Friesian cows and bulls. *Animal Science Papers and Reports*, 28: 229-234.