



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra potravinářských biotechnologií a kvality zemědělských produktů

Diplomová práce

Vliv polymorfismu vybraných enzymů na zastoupení mastných
kyselin mléčného tuku skotu

Autorka práce: Bc. Martina Svobodová

Vedoucí práce: doc. Ing. Eva Samková, Ph.D.

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

České Budějovice
2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorkou této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích dne

.....
Podpis

Abstrakt

Cílem diplomové práce bylo stanovit genotypy polymorfních variant některých kandidátních lokusů v genech *AGPAT6* a *LEP* a vyhodnotit vliv těchto polymorfních variant na mléčnou užitkovost a na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku. Genotypové a alelové frekvence *AGPAT6* a *LEP* byly zjišťovány u dojnic (n=400) plemene český strakatý skot a jeho kříženek. Byla použita metoda genotypizace pomocí PCR/RFLP. Výsledky ukázaly, že v populaci převažoval genotyp *CT* (*AGPAT6*) a *MM* (*LEP*). Vliv polymorfismů *AGPAT6* a *LEP* na ukazatele mléčné užitkovosti za 1. a 2. laktaci se nepodařilo prokázat. Byl prokázán vliv genotypu *AGPAT6* na zastoupení některých mastných kyselin s krátkým uhlíkovým řetězcem. Vliv genotypu *LEP* na zastoupení mastných kyselin nebyl prokázán. Výsledky této práce umožňují získat příznivější složení mléčného tuku vzhledem k lidskému zdraví.

Klíčová slova: skot, mléčný tuk, mastné kyseliny, polymorfismus, kandidátní lokusy, *AGPAT6*, *LEP*

Abstract

The aim of the diploma thesis was to determine the genotypes of polymorphic variants of some candidate loci in the *AGPAT6* and *LEP* genes and to evaluate the influence of these polymorphic variants on milk yield and milk fatty acid proportions. Genotypic and allele frequencies of *AGPAT6* and *LEP* were determined in dairy cows (n = 400) of the Czech Fleckvieh breed and its crossbreeds. The PCR / RFLP genotyping method was used. The results showed that the *CT* (*AGPAT6*) and *MM* (*LEP*) genotypes predominated in the population. The influence of *AGPAT6* and *LEP* polymorphisms on milk yield indicators for the 1st and 2nd lactation could not be demonstrated. The influence of the *AGPAT6* genotype on the representation of some short-chain fatty acids has been demonstrated. The effect of the *LEP* genotype on fatty acid proportions has not been demonstrated. The results of this work make it possible to obtain a more favorable composition of milk fat with respect to human health.

Keywords: cattle, milk fat, fatty acids, polymorphism, candidate loci, *AGPAT6*, *LEP*

Poděkování

Ráda bych zde poděkovala paní doc. Ing. Samkové, Ph.D. za pomoc a odborné vedení při zpracování mé diplomové práce a děkuji panu prof. Ing. Čítkovi, CSc. za veškeré odborné rady a připomínky.

Diplomová práce byla zpracována s podporou Ministerstva zemědělství ČR (NAZV KUS QJ1510336) a Grantové agentury Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (GAJU 028/2019/Z).

Obsah

Úvod.....	7
1 Literární přehled.....	8
1.1 Mléčný tuk.....	8
1.2 MK v mléce.....	9
1.2.1 Význam MK.....	12
1.2.2 Syntéza MK mléčného tuku.....	13
1.2.3 Faktory ovlivňující zastoupení MK.....	14
1.3 Genetické faktory ovlivňující zastoupení MK a polymorfismy vybraných genů v závislosti na zastoupení MK.....	15
1.3.1 Gen pro stearoyl-CoA desaturázu 1 (<i>SCD1</i>).....	16
1.3.2 Gen pro acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferázu 1 (<i>DGATI</i>).....	17
1.3.3 Gen pro 1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferázu (<i>AGPAT</i>).....	18
1.3.4 Gen pro syntázu MK (<i>FASN</i>).....	20
1.3.5 Gen pro leptin (<i>LEP</i>).....	22
1.3.6 Další geny ovlivňující zastoupení MK.....	23
2 Cíl práce.....	25
3 Materiál a metodika.....	26
3.1 Charakteristika sledovaných farem a dojnic.....	26
3.2 Odběry vzorků mléka a jejich analýza.....	27
3.2.1 Genotypizace.....	30
3.2.2 Složení mléka.....	33
3.2.3 Stanovení MK mléčného tuku.....	33
3.3 Statistické vyhodnocení dat.....	35
4 Výsledky a diskuse.....	36
4.1 Četnosti polymorfismu ve vybraném souboru dojnic českého strakatého plemene a jejich kříženek.....	36
4.1.1 Četnosti polymorfismu <i>AGPAT6</i>	36

4.1.2	Četnosti polymorfismu <i>LEP</i>	40
4.2	Asociační analýza mléčné užitkovosti dojnic českého strakatého plemene a jejich kříženek na 1. a 2. laktaci	44
4.2.1	Analýza mléčné užitkovosti v závislosti na polymorfismu genu <i>AGPAT6</i>	44
4.2.2	Analýza mléčné užitkovosti v závislosti na polymorfismu genu <i>LEP</i>	51
4.3	Asociační analýza zastoupení vybraných MK a jejich skupin u dojnic českého strakatého plemene a jejich kříženek v den odběru.....	57
4.3.1	Analýza zastoupení vybraných MK a jejich skupin v den odběru mléka v závislosti na polymorfismu genu <i>AGPAT6</i>	57
4.3.2	Analýza zastoupení vybraných MK a jejich skupin v závislosti na polymorfismu genu <i>LEP</i>	61
	Závěr	64
	Seznam použité literatury	65
	Seznam grafů.....	73
	Seznam tabulek	75
	Seznam použitých zkratk.....	76

Úvod

Mléčný tuk je důležitou složkou mléka, skládající se především z triacylglycerolů, tj. esterů glycerolu a mastných kyselin. Zastoupení jednotlivých mastných kyselin i jejich vzájemný poměr do značné míry ovlivňují nutriční a technologické vlastnosti mléčného tuku. Mléčný tuk je z větší části tvořen nasycenými mastnými kyselinami (palmitovou, myristovou a laurovou), které zvyšují hladinu LDL cholesterolu v krevní plazmě a jsou rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění. Tento nepříznivý vliv na zdraví člověka je připisován také *trans* nenasyceným mastným kyselinám. Z výše uvedených důvodů je zapotřebí snížit v mléčném tuku zastoupení nasycených mastných kyselin a zvýšit poměr nenasycených mastných kyselin v *cis* konfiguraci.

Zastoupení mastných kyselin v mléce je ovlivněno mnoha faktory, z nichž k nejvýznamnějším patří výživa. Ve výčtu faktorů však nelze opomenout ani genetické vlivy. Polymorfismus kandidátních genů může mít velmi významný vliv na vlastnosti mléčného tuku. Méně známými kandidátními geny, které ovlivňují složení mléčného tuku skotu, jsou *AGPAT6* a *LEP*. Tyto geny kódují enzymy 1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferázu 6 a leptin. Enzym 1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferáza 6 zvyšuje obsah triacylglycerolu v mléce. Leptin má za úkol regulovat obsah tuku v organismu.

Cílem diplomové práce byla genotypizace polymorfních variant kandidátních lokusů v genech *AGPAT6* a *LEP* a vyhodnocení vlivu těchto polymorfních variant na mléčnou užitkovost a na zastoupení mastných kyselin mléčného tuku skotu.

1 Literární přehled

Mléko je z nutričního hlediska jednou z nejlépe vyvážených potravin. Energetická hodnota mléka závisí na množství uvolněné energie při spalování hlavních živin, tedy bílkovin, tuků a sacharidů. Nejvýznamnějším zdrojem využitelné energie jsou právě lipidy. Ty mají až dvojnásobnou energetickou hodnotu oproti bílkovinám a sacharidům (Dewettick et al., 2008; El-Loly, 2011).

Na mléko je kladena celá řada požadavků. Mezi významné jakostní ukazatele, vztahující se k mléku, patří CPM (celkový počet mikroorganismů), PSB (počet somatických buněk), RIL (rezidua inhibičních látek). Nejvýznamnější jakostní charakteristikou je chemické složení mléka. Součástí sušiny jsou dusíkaté látky, sacharidy a lipidy. Tyto základní živiny jsou nezbytné pro všechny živočichy. V menší míře jsou v sušině mléka obsaženy také minerální látky a biokatalyzátory, tj. vitamíny, hormony a enzymy. Na obsahu těchto látek je závislá biologická hodnota mléka. Z různých úhlů pohledu je velmi důležitou složkou mléka mléčný tuk (Lindmark Månsson, 2008; Samková et al., 2012).

1.1 Mléčný tuk

Lipidy jsou nízkomolekulární přírodní látky, které jsou nerozpustné ve vodě, ale dobře rozpustné v nepolárních organických rozpouštědlech. Lipidy se podle chemického hlediska dělí na homolipidy, heterolipidy a komplexní lipidy. Homolipidy se skládají z mastných kyselin (MK) a alkoholu. V heterolipidech jsou navíc kovalentně vázané různé sloučeniny, např. kyselina fosforečná, kyselina sírová, cukry atd. Komplexní lipidy jsou složeny jak z homolipidů, tak heterolipidů, ale navíc se na ně vážou další části jinými fyzikálními vazbami, např. vodíkovými můstky. Lipidy ovlivňují chuť a texturu potravin (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Hlavní součástí živočišného tuku jsou triacylglyceroly (TAG), které jsou zásobárnou energie. Z názvu je patrné, že se sloučenina skládá z glycerolu a tří zbytků MK. Glycerol je trojsytný alkohol. Podle druhu a místa navázání tří zbytků MK se TAG dělí na jednoduché a složené (smíšené). V jednoduchém TAG jsou na glycerol navázány tři stejné MK a nesou i po příslušné MK název, např. tristearylglycerol. Součástí složených (smíšených) TAG jsou dvě nebo tři různé MK (Peč a Pečová, 2001; Lindmark Månsson, 2008). Pozicí MK v molekule TAG a jejich vzájemném zastoupení lze ovlivnit technologické, sensorické a nutriční vlastnosti mléčného tuku

(Samková et al., 2008b). Funkční vlastnosti mléka jsou ovlivněny nejen složením MK, ale také umístěním MK v glycerolovém řetězci a koncentrací jednotlivých druhů TAG. Tyto vlastnosti se mění mezi ročními obdobími a režimy krmení a jsou do značné míry regulovány dostupností MK a enzymů v organismu (Tzompa-Sosa et al., 2016).

Mléčný tuk má velmi dobrou stravitelnost na rozdíl od jiných živočišných či rostlinných tuků, a to díky navázaným MK (v TAG), které mají krátký (SCFA, *short-chain fatty acids*) až středně dlouhý uhlíkatý řetězec (MCFA, *medium-chain fatty acids*). Tyto MK se lépe resorbují v porovnání s MK s dlouhým uhlíkatým řetězcem (LCFA, *long-chain fatty acids*). Dalším důvodem dobré stravitelnosti je štěpení MK lipázou v TAG nejdříve v poloze 1 a 3, kde jsou právě MK s krátkým uhlíkatým řetězcem (Drbohlav a Vodičková, 2002).

Mléčný tuk obsahuje esenciální MK – linolovou a linolenovou, lipofilní vitamíny (rozpuštěné v tucích), hormony, cholesterol a aromatické látky (Dhiman et al., 2005; Samková et al., 2012). Jeho bod tání je 28–38 °C a bod tuhnutí 15–25 °C (Velíšek a Hajšlová, 2009).

Mléčný tuk se v mléce vyskytuje v podobě tukových kuliček. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,1–15 µm, avšak 90 % z nich má velikost 2–4 µm. V jádru tukové kuličky jsou nepolární TAG. Tvoří 99 % mléčného tuku. Do tohoto jádra jsou zakotvené povrchově aktivní látky, hlavně fosfolipidy a membránové lipoproteiny. Membránové proteiny mají negativní náboj. To je důvodem, proč tukové kapénky v mléčné plazmě „plavou“ a nedojde tak k jejich spojení (Dewettick et al., 2008; El-Loly, 2011).

1.2 MK v mléce

MK jsou vlastně karboxylové kyseliny s alifatickým uhlovodíkovým řetězcem. MK se dělí podle nasycenosti (tj. obsahu dvojných vazeb) na nasycené a nenasycené a také podle skupenství, ve kterém se vyskytují. Označují se buďto systematickými názvy – odvozenými od uhlovodíků se stejným počtem atomů uhlíků (např. butanová) nebo triviálními názvy (např. kyselina máselná), které v běžné praxi převládají (Samková et al., 2008a). Významné MK mléčného tuku jsou vypsány v tabulce 1.1. Nasycené MK (SFA, *saturated fatty acids*) se skládají z 4–60 atomů uhlíků. Počet atomů uhlíků je obvykle sudý a řetězec je rovný, nerozvětvený (Lindmark Månsson, 2008; Samková et al., 2008a). Dále se MK dělí podle počtu uhlíků ve sloučenině, na MK s krátkým

uhlíkatým řetězcem (C4–C6), se středně dlouhým řetězcem (C8–C12), s dlouhým řetězcem (C14–C18), velmi dlouhým (C20–C26) a ultra dlouhým řetězcem (C28–38) (Velíšek a Hajšlová, 2009).

V mléčném tuku přežvýkavců je vyšší obsah MK s krátkým řetězcem. 60 % z celkového obsahu MK tvoří právě nasycené MK. Kyseliny myristová (C14:0), palmitová (C16:0) a stearová (C18:0) se nejvíce vyskytují v mléčném tuku (Samková et al., 2008b; Conte et al., 2010). Rozdíly mezi jednotlivými nenasycenými monoenoovými MK (MUFA, *monounsaturated fatty acids*) jsou v počtu atomů uhlíků, v poloze jediné dvojně vazby a v prostorové konfiguraci. V mléčném tuku je nejvíce zastoupená monoenoová MK kyselina olejová (C18:1 n -9). Součástí nenasycených polyenových MK (PUFA, *polyunsaturated fatty acids*) jsou dvě a více dvojných vazeb. Podle polohy dvojných vazeb a jejich konformací se dále dělí na polyenové MK řady n -3 a n -6. Zde jde o polohu první dvojně vazby od koncové methylové skupiny (Lindmark Månsson, 2008; Samková et al., 2008a). Z celkového obsahu MK tvoří méně než 1 % MK s lichým počtem atomů uhlíků (Samková et al., 2008b).

Tabulka 1.1: Významné mastné kyseliny mléčného tuku (Samková et al., 2012)

Uhlíky a umístění vazby	Triviální název	Systematický název
Nasyčené (SFA)		
C4:0	máselná	butanová
C6:0	kapronová	hexanová
C8:0	kaprylová	oktanová
C10:0	kaprinová	dekanová
C12:0	laurová	dodekanová
C14:0	myristová	tetradekanová
C16:0	palmitová	hexadekanová
C18:0	stearová	oktadekanová
C20:0	arachová	eikosanová
C22:0	behenová	dokosanová
Monoenové nenasycené (MUFA)		
C14:1n-5	myristolejová	9 <i>cis</i> -tetradecenová
C16:1n-7	palmitolejová	9 <i>cis</i> -hexadecenová
C18:1n-9	olejová	9 <i>cis</i> -oktadecenová
C18:1n-9	elaidová	9 <i>trans</i> -oktadecenová
C18:1n-7	vakcenová (TVA)	11 <i>trans</i> -oktadecenová
C22:1n-9	eruková	13 <i>cis</i> -dokosenová
C20:1n-11	gadolejová	9 <i>cis</i> -eikosenová
Polyenové nenasycené (PUFA)		
C18:2n-7	rumenová (RA)	9,11 <i>cis</i> -, <i>trans</i> -oktadekadienová
Řada <i>n</i> -6 polyenové nenasycené MK (ω -6)		
C18:2n-6	linolová	9,12 <i>cis</i> -, <i>cis</i> -oktadekadienová
C18:3n-6	γ -linolenová	6,9,12 all- <i>cis</i> -oktadekatrienová
C20:4n-6	arachidonová (ARA)	5,8,11,14 all- <i>cis</i> -eikosatetraenová
Řada <i>n</i> -3 polyenové nenasycené MK (ω -3)		
C18:3n-3	α -linolenová (ALA)	9,12,15 all- <i>cis</i> -oktadekatrienová
C20:5n-3	timnodová (EPA)	5,8,11,14,17 all- <i>cis</i> -eikosapentaenová
C22:6n-3	cervonová (DHA)	4,7,10,13,16,19 all- <i>cis</i> -dokosaheptaenová

1.2.1 Význam MK

Na význam MK lze pohlížet z technologického hlediska. Na texturu či konzistenci mléčného tuku má vliv poměr mezi nasycenými a nenasycenými MK (Haug et al., 2007; Barłowska et al., 2011). K oxidaci dochází při zvýšení množství nenasycených MK (a tedy i většího množství dvojných vazeb) a při snížení množství nasycených MK v mléčném tuku. Této optimalizace poměrů nasycených a nenasycených MK v mléčném tuku lze docílit vhodnými doplňky do krmné dávky (El-Loly, 2011).

Senzorické vlastnosti mléka jsou ovlivňovány chuťovými složkami – aldehydy, methylketony, estery, laktony, sirnými sloučeninami a nižšími MK C4 až C10. Typickou chuť mléčného tuku způsobují také volné MK. Chuťové složky se v mléčném tuku vyskytují ve formě prekurzorů. Tyto prekurzory nejsou stabilní a enzymatickou reakcí, fermentačními pochody nebo zvýšením teploty se z TAG uvolňují (Haug et al., 2007; Samková et al., 2008a). Při míchání a mechanickém namáhání mléka dochází k roztrhnutí, TAG se rozpojí a vznikají volné MK, které způsobují výše zmíněné vady (žluknutí). Také teplota má vliv na technologické vlastnosti MK (El-Loly, 2011). Delší nenasycené MK tvoří s vápníkem nerozpustné soli, a tak se vápník může absorbovat jen částečně (Dostálová a Kadlec, 2014).

Polární lipidy jsou amfifilní molekuly. Obsahují v sobě část hydrofilní (tzv. „hydrofilní hlavičku“) a hydrofobní (dva hydrofobní konce MK). Tato technologická vlastnost přispívá k emulgační schopnosti membrány mléčného tuku (Dewettick et al., 2008; Lindmark Månsson, 2008).

Disperzní stav mléčného tuku má vliv na optické, reologické a technologické parametry mléka, jako je jeho barva, viskozita, vodivost, stabilita emulze a vhodnost pro výrobu sýrů a másla. Navíc má tento stav mléčného tuku značný dopad na technologické procesy ve výrobě mléka. Mléčný tuk ovlivňuje strukturu, sensorické a fyzikálně-chemické vlastnosti mléka (Barłowska et al., 2011; Cecchinato et al., 2019).

MK mají také význam nutriční či výživový. Mléčný tuk je z větší části tvořen nasycenými MK (některé z nich zvyšují hladinu LDL – nízkodenzitní, low density lipoprotein, v krevní plazmě) a z lipoproteinů s vysokým zastoupením TAG (Haug et al., 2007; German et al., 2009). Tuk se ukládá do stěn cév a vznikají aterosklerotické pláty. Ty jsou příznakem aterosklerózy. Mezi zdravotně nepříznivé MK patří kyselina palmitová, myristová a laurová. V mléčném tuku je z 22–35 % zastoupena právě kyselina palmitová. *Trans* nenasycené MK (TFA, *trans fatty acids*) zvyšují hladinu

cholesterolu v krvi a tato vysoká hladina cholesterolu je rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění (CVD). Nejvýznamnější *trans* nenasycenou MK je kyselina elaidová (Haug et al., 2007; German et al., 2009).

Mezi nutričně významné polyenové esenciální MK patří kyselina linolová a α -linolenová v *cis* konfiguraci. Musí být přijímány potravou, a navíc se v lidském těle z těchto kyselin syntetizují další významné MK (Dhiman et al., 2005). Organismus využívá jako prekurzory biologicky aktivních látek MK arachidonovou a EPA – eikosapentaenovou (*highly unsaturated fatty acids*, HUFA). Jde o MK s více jak dvaceti uhlíky a více jak třemi dvojnými vazbami. Odvozeniny z těchto MK se nazývají eikosanoidy a řadí se mezi ně prostaglandiny, prostacykliny, leukotrieny, thromboxany a lipoxiny (Dhiman et al., 2005; Velišek a Hajšlová, 2009). Některé eikosanoidy tvořené z MK řady *n-6* a produkované v nadměrné míře způsobují zdravotní komplikace. Proto by měl být poměr mezi *n-3* a *n-6* maximálně 1:5. Strava moderního Evropana však dosahuje poměru 1:10-14. Přidání EPA a DHA (kyseliny dokosahexaenové) do mléčného tuku by pro konzumenta znamenalo zdravotní prospěch (Haug et al., 2007; Samková et al., 2008a; Barłowska et al., 2011).

1.2.2 Syntéza MK mléčného tuku

Složky mléka v podobě prekurzorů putují krví do sekrečních buněk mléčné žlázy. V těchto buňkách se tvoří mléko dvojným způsobem. Živiny (minerální látky) mohou přecházet přímo z mléka aktivním transportem nebo difúzí do mléka. Druhý způsob je biosyntéza. Při tomto procesu vznikají v sekrečních buňkách mléčné žlázy kasein, laktóza a MK s krátkým řetězcem. Podmínkou pro to, jak moc se bude v mléčné žláze tvořit mléko, je její zásobení krví a také obsah všech živin v krvi (Samková et al., 2008a; Navrátilová et al., 2012; Cecchinato et al., 2019).

Syntéza TAG je základní metabolická cesta důležitá pro skladování a využití energie, absorpci živin, laktaci a metabolismus fosfolipidů (Cao et al., 2006; Vyas et al., 2013). TAG mléčného tuku je syntetizován cestou glycerol-3-fosfátu. Jeho reakce jsou katalyzovány čtyřmi enzymy, konkrétně glycerol-fosfát-acyltransferázou (GPAT), acylglycerol-fosfát-acyltransferázou (AGPAT), fosfohydrolázou kyseliny fosfatidové (PAP) a diacylglycerol-acyltransferázou (DGAT) (Tzompa-Sosa et al., 2016). TAG se syntetizují hlavně z diacylglycerolů v mléčné žláze. Enzym katalyzující tento krok je diglycerid O-acyltransferáza (DGAT) (Lu et al., 2015).

Mléčný tuk je syntetizován v mléčné žláze z prekurzorů a MK z krmiva, z jater nebo z tukové tkáně. Pro syntézu MK je zapotřebí, aby krmivo obsahovalo uhlík. MK ho získávají ze dvou zdrojů – z kyseliny octové a z kyseliny β -hydroxymáselné. V bachoru vzniká mléčný tuk, jehož množství a složení je závislé na stupni fermentace. Při tomto procesu jsou produkovány i těkavé MK. Těkavé MK jsou tvořeny při bachorových kvasných procesech ze sacharidů z krmiv a při β -oxidaci MK (z tukové tkáně). Nejvýznamnější těkavou MK je kyselina octová, která se transformuje přes acetyl-CoA, malonyl-CoA a butyryl-CoA a ukládá se do mléčného tuku. Jakmile vznikne více kyseliny octové, zvýší se i množství tuku v mléce (Samková et al., 2008a; Navrátilová et al., 2012). Bakteriemi je v bachoru také produkována kyselina máselná, která se transformuje na kyselinu β -hydroxymáselnou. Acetyl-CoA je základním prekurzorem pro syntézu MK, který vznikne z kyseliny octové nebo oxidací z kyseliny β -hydroxymáselné. Pro syntézu MK je vedle základních substrátů zapotřebí také větší množství vodíku. Ten se získává při syntéze MK z NADPH + H⁺. Reakci urychlují dva enzymy: acetyl-CoA karboxyláza a syntáza MK (Navrátilová et al., 2012). MK s krátkým řetězcem se vážou do 1. a 3. pozice TAG, zatímco MK s dlouhým řetězcem zaujímají 2. pozici (Drbohlav a Vodičková, 2002).

1.2.3 Faktory ovlivňující zastoupení MK

Na složení MK má největší vliv výživa, tedy množství a složení krmné dávky. Složení MK je dále ovlivněno doplňkovými tuky a oleji, podávanými v krmné dávce nebo infuzí rovnou do trávicího traktu. Nedostatek vlákniny, či její nedostatečná strukturovanost mají vliv na snižování obsahu tuku v mléce. V neposlední řadě je podstatný vliv jedince – dojnice, plemeno nebo stádium laktace. Jakmile se zvýší dojivost dojnice, sníží se obsah tuku v mléce. To samé platí pro první půlku laktace. Na konci laktace naopak obsah tuku v mléce roste (Doležal, 2000; Lindmark Månsson, 2008; Samková et al., 2008b).

Mezi další faktory ovlivňující složení MK v mléčném tuku patří například proces syntézy mléčného tuku v závislosti na výživě a konkrétním jedinci, zdravotní stav, technika dojení, sezóna, technologie chovu, zootechnické podmínky, podnebí, aj. Chceme-li změnit složení mléčného tuku dojnic, musí být upraven některý z výše vyjmenovaných faktorů (El-Loly, 2011; Cecchinato et al., 2019). Jakmile je zapotřebí snížit zastoupení nasycených MK, zejména laurové, myristové a palmitové, bere se

v úvahu vliv jedince – tedy plemeno, individualita dojnice nebo stádium laktace. Pro zvýšení nutričně hodnotných polyenových nenasycených MK je nutné přehodnotit skladbu krmné dávky (Samková et al., 2008b). Problematikou faktorů ovlivňující zastoupení MK se také zabývali Hanuš et al. (2018). Také v přehledu Kesek et al. (2014) je představen výzkum týkající se genetických, fyziologických a výživových faktorů ovlivňující MK v kravském mléce.

Mléčný tuk dojnic se skládá z TAG s počtem uhlíků (Cn) mezi 22 a 54 (Gresti et al., 1993; Ruiz-Sala et al., 1996). Většina studií souhlasí s tím, že koncentrace jednotlivých TAG se liší mezi ročními obdobími a režimy krmení (DePeters et al., 2001). Mléčný tuk dojnic na pastvinách je bohatý na nenasycené C18 MK. Má sníženou relativní koncentraci TAG C34, C36, C42, C44 a C46 a má zvýšenou relativní koncentraci TAG C24, C26, C40, C50, C52 a C54 ve srovnání s dojnicemi v zimním období, bez čerstvé píce. Podobný účinek byl zaznamenán u dojnic s olejnatým doplňkem stravy. Celkově se studie shodují, že krmná dávka bohatá na nenasycené C18 MK (jako je doplnění čerstvé trávy nebo řepky) zvyšuje relativní koncentrace TAG C52 a C54 a snižuje relativní koncentraci TAG C34, C42 a C44 (Tzompa-Sosa et al., 2016).

Jak již bylo uvedeno, výživa dojnic může značně změnit složení mléčného tuku. Jsou-li dojnice krmeny nenasycenými polyenovými MK, které pocházejí z pícnin, vede to ke snížení *de novo* syntetizovaných MK a ke zvýšení MK s dlouhým řetězcem v mléčném tuku. Výživa tak ovlivňuje expresi lipogenních genů v mléčné žláze (Duchemin et al., 2013).

Vzhledem k tomu, že výživa není součástí této práce, dále se budu věnovat pouze genetickým faktorům.

1.3 Genetické faktory ovlivňující zastoupení MK a polymorfismy vybraných genů v závislosti na zastoupení MK

Na zastoupení MK v mléce má vliv nejenom výživa, ale i genetika. Je možné genetické zlepšení nutriční kvality mléka na základě profilu MK. Nejúčinnější možností pro výběr pomocí markeru je využití funkčních mutací, které vysvětlují významnou část fenotypové variace. Syntéza MK v mléce je regulována několika klíčovými enzymy. V některých případech bylo popsáno několik polymorfismů spojených se specifickými účinky na složení MK (Li et al., 2015).

Mezi důležité kandidátní geny, pozorované u různých plemen mléčného skotu pro obsah mléčného tuku, patří: gen pro acylCoA: diacylglycerol acyltransferáza 1 (*DGATI*); receptor růstového hormonu (*GHR*) a stearyl-CoA desaturáza 1 (*SCD1*) (Signorelli et al., 2009). Tyto informace jsou shrnuty ve výzkumném přehledu od autorů Kesek et al. (2014). Vliv vybraných genů na užitkové vlastnosti mléka je uveden v tabulce 1.2.

1.3.1 Gen pro stearyl-CoA desaturázu 1 (*SCD1*)

Enzym stearyl-CoA desaturáza 1 se nachází v endoplazmatickém retikulu. Tento enzym katalyzuje reakci, při které se v nasycené MK vytvoří dvojná vazba mezi 9. a 10. atomem uhlíku (Schennink et al., 2008; Mao et al., 2012). Při tomto ději dochází k přeměně nasycených MK na příslušné monoenoové nenasycené MK. Tento děj se nazývá desaturace (Moioli et al., 2007; Inostroza et al., 2013). Tento klíčový krok při tvorbě TAG a esterů cholesterolu ovlivňuje složení mléka a mléčnou užitkovost dojníc (Xu et al., 2018). Stádium laktace má významný vliv na účinek desaturázy a na koncentraci několika MK v mléčném tuku skotu (Kgwatalala et al., 2009).

Gen *SCD1* kóduje klíčový enzym metabolismu lipidů stearyl-CoA desaturázu. *SCD1* je lokalizován na 26. chromozomu *Bos taurus* autosome (BTA26) (Demeter et al., 2009; Mao et al., 2012). Exprimuje se v různých tkáních, mezi nimiž je tuková tkáň a mléčná žláza. *SCD1* je kandidátní gen spojený se zastoupením MK v mléce (Signorelli et al., 2009; Li et al., 2015).

U skotu byly identifikovány dvě izoformy *SCD*: *SCD1* a *SCD5*. *SCD5* se nachází na chromozomu 6 (BTA6) a exprimuje se primárně v mozku (Schennink et al., 2008).

V cDNA sekvenci japonského černého skotu bylo identifikováno v genu *SCD* osm jednonukleotidových polymorfismů (SNP, *single nucleotide polymorphism*). Tyto SNP jsou umístěny na pozicích 702 bp (substituují se zde guanin (G) na adenin (A)) 762 bp (cytosin (C) na thymin (T)) a 878 bp (T na C) v ORF (*open reading frame*, otevřený čtecí rámeček). Dále v oblasti 3'UTR (*untranslated region*, nepřekládaná oblast) jsou SNP umístěny na pozicích 1905 bp (T na C), 3143 bp (C na T), 3351 bp (A na G), 3537 bp (A na G) a 4736 bp (A až G) (Taniguchi et al., 2004).

U skotu v exonu 5 byly detekovány tři SNP v úplné vazebné nerovnováze, které vedou ke dvěma haplotypům. Třetí SNP způsobuje substituci valinu (alela V) na alanin (alela A) na 293. zbytku (A293V) (Moioli et al., 2007; Signorelli et al., 2009). Alela *SCD1* A byla spojena s vyšším obsahem monoenoové nenasycených MK a podmiňuje

expresi alaninu. Alela *V* vede k expresi valinu (Moioli et al., 2007; Schennink et al., 2008). Polymorfismus *SCD1* genotypu *A293V* významně souvisí se složením MK v mléčném tuku a mléčné žláze (Conte et al., 2010; Mao et al., 2012). U polymorfismu alaninu a valinu v *SCD1* (*A293V*) bylo zjištěno, že ovlivňuje složení MK v mléce (Demeter et al., 2009).

Schennink et al. (2008) sledovali u mléčného skotu polymorfismus *SCD1 A293V*, o němž je známo, že mění složení MK v mléce. Alela *SCD1 V* je spojena s nižšími indexy C10, C12 a C14 a s vyššími indexy C16, C18 a CLA (konjugovaná kyselina linolová, C18:2 *cis*-9, *trans*-11) ve srovnání s alelou *SCD1 A*, bez rozdílů v celkovém indexu nenasycení. Dospěli k závěru, že selektivní šlechtění může přispívat k vyšším indexům nenasycení. Ke stejnému závěru došli i Moioli et al. (2007) a Kgwatalala et al. (2009). Gen *SCD1* je tak řazen mezi významné kandidátní geny pro mléčnou užitkovost.

Mléko od dojnic s genotypem *c.878C>T* v genu *SCD* mělo vyšší obsah C14:1, C17:1, C18:1*n*-9 *cis*, C18:1*n*-9 *trans* a celkových monoenoových nenasycených MK, stejně jako vysoké indexy 14:1/14 než jiné genotypy *SCD*. Byl zjištěn vyšší obsah CLA ve vzorcích mléka od dojnic, které měly genotyp *c.878CC* (Inostroza et al., 2013).

Resekvenováním celého kódujícího regionu *SCD* genu skotu bylo identifikováno celkem šest SNP: tři umístěny v exonech (g.10153G>A, g.10213T>C a g.10329C>T) a tři umístěné v intronech (g.6926A>G, g. 8664 G>A a g. 16158G>C). Byl zjištěn významný vliv těchto SNP na obsah C14:0, C14:1, C16:1, C18:2*n*-6, CLA, C14 index a C16 index (Li et al., 2016b).

1.3.2 Gen pro acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferázu 1 (*DGATI*)

Mikrosomální enzym acyl-CoA: diacylglycerol-acyltransferáza 1 (*DGATI*) má důležitou funkci při syntéze mléčného tuku. Katalyzuje poslední krok syntézy TAG z diacylglycerolů a acyl-koenzymu A. *DGAT1* je enzym endoplazmatického retikula. Je exprimována v tenkém střevě, játrech, tukové tkáni a mléčné žláze (Juhlin et al., 2012; Lu et al., 2015; Xu et al., 2018; Pacheco-Pappenheim et al., 2019).

Tento enzym je kódován genem *DGATI*. Gen *DGATI* je mapován poblíž centromery 14. chromozomu (Demeter et al., 2009). Velikost tohoto genu je 14117 bp a skládá se ze 17 exonů (Mohammed et al., 2015). V genu *DGATI* bylo identifikováno několik SNP. První je lokalizován na 8. exonu a je označován jako *K232A*. Dva

nesynonymní SNP způsobují substituci lysinu alaninem v 232. poloze polypeptidu (Signorelli et al., 2009; Xu et al., 2018). K nahrazení dochází na 10433. a 10434. pozici sekvence genu. Dinukleotidová sekvence *GC* kóduje aminokyselinu lysin a dinukleotidová sekvence *AA* alanin (Grisart et al., 2004; Akyüz et al., 2015). Varianta alaninu příznivě ovlivňuje obsah tuku v mléce, který je v porovnání s původním lysinem vyšší (Winter et al., 2002). Polymorfismus lysinu na alanin (*K232A*) zapříčiňuje až 50 % genetické variace v obsahu mléčného tuku a je spojen se složením MK mléka u holštýnského skotu (Schennink et al., 2008; Conte et al., 2010). Alela *K* byla spojována s vyšším obsahem mléčného tuku (%), s vyššími hladinami intramuskulárního tuku ve svalu a s nižší doživostí (kg) u dojného skotu. To má negativní vliv na lidské zdraví (Mao et al., 2012; Lu et al., 2015; Xu et al., 2018). Z hlediska zdraví člověka je žádoucí snížit frekvenci *232K* alely prostřednictvím šlechtitelských programů. Selektivním šlechtěním ve prospěch alely *A* vznikne mléko s vhodnějším složením nasycených MK z hlediska zdraví člověka (Juhlin et al., 2012; Lu et al., 2015).

Polymorfismus *DGATI* má přímý účinek na metabolismus dojnic, a také může nepřímo ovlivnit vlastnosti mléka – konkrétně celkový výdej energie v mléce a následně i energetickou bilanci dojnic. Negativní energetická bilance během rané laktace dojnic s vysokou užitkovostí může vést k metabolickým a reprodukčním poruchám. Musí se tedy pozorovat účinek polymorfismu *DGATI* na celkový energetický výdej v mléce (Bovenhuis et al., 2015). Polymorfismus genu *DGATI* ovlivňuje funkční vlastnosti enzymu DGAT1, např. vyšší aktivitu nebo změnu specifity substrátu pro různé MK, které ovlivňuje složení MK mléka (Grisart et al., 2004; Schennink et al., 2009). Alela *A* je spojena s nižšími indexy C10, C12, C14 a C16 a s vyššími indexy C18, CLA a celkovými indexy, tedy nižší zastoupení nasycených MK (Demeter et al., 2009; Li et al., 2015; Bovenhuis et al., 2016). Navíc *K232A* polymorfismus byl spojen se změnou polohy MK v TAG (Tzompa-Sosa et al., 2016).

1.3.3 Gen pro 1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferázu (*AGPAT*)

Mikrosomální enzym 1-acylglycerol-3-fosfát-O-acyltransferázy (*AGPAT*) je zásadní pro biosyntézu glycerolipidů i biosyntézu TAG u eukaryot v mléčné žláze (Bionaz et al., 2008; He et al., 2011). Tento enzym je lokalizován výhradně v endoplazmatickém retikulu. *AGPAT* (*GPAT*, EC 2.3.1.15) katalyzuje první krok syntézy *de novo*

kyseliny lysofosfatidové (LPA) na kyselinu fosfatidovou (PA) a tento enzym patří do skupiny acyltransferáz-LPAAT (acyltransferáza kyseliny lysofosfatidové) (Cao et al., 2006; He et al., 2011).

Rodina enzymů *AGPAT* katalyzuje mezistupeň v syntéze TAG (probíhá postupným přidáváním mastných acylových skupin ke glycerol-3-fosfátu), který převádí 1-acylglycerol-3-fosfát na 1,2-diacylglycerol-3-fosfát (Littlejohn et al., 2014). U savců existují dvě hlavní biochemické dráhy pro biosyntézu TAG: 1) cesta monoacylglycerolů, která hraje důležitou roli při absorpci živin v tenkém střevě a 2) cesta glycerol-3-fosfátu (G3P), která je zodpovědná za většinu syntézy TAG *de novo* (Cao et al., 2006; Vyas et al., 2013). Absence tohoto enzymu vede k nedostatečně vyvinutému mléčnému epitelu a produkci mléka, které neobsahuje diacylglyceroly a TAG (Beigneux et al., 2006).

Gen *AGPAT* je lokalizován na BTA27. Na základě analýzy konzervovaných sekvencí (motivy I – IV) z více glycerolipidových acyltransferáz u čtyř druhů organismů (člověk, myš, *Drosophila melanogaster* a *Caenorhabditis elegans*) byla rodina genu *AGPAT* rozdělena do osmi podskupin (izoforem). Všechny *AGPAT* geny mají podobnou aminokyselinovou sekvenci. Tyto izoformy lze od sebe odlišit podle subcelulární lokalizace, citlivosti na *N*-ethylmaleimid (NEM) a preferencí substrátu (Beigneux et al., 2006).

AGPAT1 a *AGPAT2* patří do stejné podskupiny. Bylo u nich prokázáno, že přeměňují kyselinu lysofosfatidovou na kyselinu fosfatidovou. *AGPAT3*, *AGPAT4* a *AGPAT5*, o nichž se uvádí, že mají velmi slabé aktivity *AGPAT*, tvoří dvě odlišné podskupiny (Beigneux et al., 2006).

GPAT3 je členem rodiny acyltransferáz. Tento gen je exprimován v tkáních, ve kterých dochází k aktivnímu metabolismu lipidů, jako je tuková tkáň, tenké střevo, ledviny a srdce. Nadměrná exprese *GPAT3* v savčích buňkách vede ke zvýšené tvorbě TAG, nikoli však fosfolipidů. *GPAT3* je lokalizován na endoplazmatickém retikulu (Cao et al., 2006; Bionaz et al., 2008).

Dosud bylo identifikováno více genů *AGPAT*, ale *AGPAT6* se jeví jako nejhojněji exprimovaná izoforma v mléčné žláze skotu, přičemž její exprese silně koreluje se stádiem laktace (Littlejohn et al., 2014). *AGPAT6* lze považovat za kandidátní gen pro regulaci syntézy glycerolipidů, produkce tuku a celkového složení mléka (He et al., 2011). *AGPAT6* odpovídá přibližně 60 % veškeré *AGPAT* mRNA, následují *AGPAT1* a *AGPAT3*. Tato skupina kandidátních kauzálních polymorfismů je lokalizovaná

v 5'UTR exonu a intronu jednoho genu 1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferáza 6 (*AGPAT6*). Byly genotypizovány dvě *AGPAT6* varianty substituce g.36211257GA> T. Nejpravděpodobnějším kauzálním kandidátním genem se jeví opakovaná expanze GGC g.36198118GGC v exonu 1. Dosud nebylo prokázáno, zda inserce g.36198118GGC, substituce g.36211257GA> T nebo jakákoli jiná přidružená reakce má nějaký biologický dopad na genovou expresi *AGPAT6* a na syntézu mléčného tuku v mléčné žláze. Nejvíce byl exprimován gen *AGPAT6* s 10 až 25× vyššími průměrnými fragmenty na kilobázi exonových modelů na milion mapovaných hodnot exprese. Zvýšením genové exprese genu *AGPAT6* dojde k odpovídajícímu zvýšení množství enzymu *AGPAT6*, což má za následek zvýšení TAG v mléce (Littlejohn et al., 2014). Předpokládaná velikost *AGPAT6* po štěpení 38 aminokyselin signálního peptidu je 48 kDa a molekulová hmotnost *AGPAT2* je 31 kDa. *AGPAT6* (456 aminokyselin) je větší než *AGPAT1* (285 aminokyselin) a *AGPAT2* (278 aminokyselin) (Beigneux et al., 2006).

Stejná alela, která byla spojena se zvýšenou expresí genu *AGPAT6* a celkovým obsahem mléčného tuku, byla spojena se zvýšeným podílem C16 MK (Littlejohn et al., 2014).

Vedle genu *AGPAT6* byl objeven také další nový gen značený jako *AGPAT8*, což je nejbližší homolog *AGPAT6*. Jak *AGPAT6*, tak *AGPAT8* obsahují sekvence v motivech I – IV, které je odlišují od ostatních členů rodiny (Beigneux et al., 2006).

U genu kódujícího savčí mitochondriální rezistentní enzym GPAT1 (*mtGPAT1*, *GPAM*) bylo prokázáno, že hraje klíčovou roli při syntéze jaterních TAG. Také bylo prokázáno, že savčí mikrosomální aktivita GPAT představuje 80–90 % celkové aktivity GPAT ve většině tkání a 50–80 % celkové aktivity v játrech (Cao et al., 2006).

1.3.4 Gen pro syntázu MK (FASN)

Syntáza MK (FASN) je multifunkční polypeptidový enzym, který je součástí lipoproteinu v buňkách. Hraje ústřední roli v *de novo* lipogenezi u savců (Roy et al., 2006; Alim et al., 2014; Shi et al., 2019). Katalyzuje většinu enzymatických kroků syntézy MK. Syntéza MK je proces výroby *de novo* MK z uhlíků odvozených od aminokyselin (Suburu et al., 2014). Enzym FASN má sedm aktivních míst, která pomáhají katalyzovat syntézu MK. Při syntéze se použije jeden acetyl-CoA a postupně se přidává sedm malonyl-CoA molekul k výrobě šestnácti uhlíkaté nasycené MK palmitové C16:0 v přítomnosti NADPH (Roy et al., 2005; Alim et al., 2014). Kyselina

palmitová je primárním produktem FASN, což představuje asi 90 % výtěžku produktu enzymu. FASN však také produkuje kyselinu myristovou a kyselinu stearovou. Exprese FASN je pozorována v různých tkáních např. v játrech, tucích, plicích a mozku. FASN je kritickým regulátorem systémové energetické homeostázy, aterosklerotických lézí, obezity vyvolané stravou, cukrovky, zánětu a srdečního stresu (Suburu et al., 2014).

Gen je převážně exprimován v tukové tkáni a enzym se nachází převážně v mléčné žláze a tukové tkáni. Gen *FASN* je lokalizován na chromozómu 19 BTA19 (19q22) a je dlouhý 18824 bp. Obsahuje 42 exonů a 41 intronů (Shi et al., 2019). Bylo objeveno několik lokalit kvantitativního znaku (QTL, *quantitative trait locus*) ovlivňujících obsah mléčného tuku. QTL je lokus, který souvisí s variací kvantitativního znaku ve fenotypu populace organismů. V *FASN* genu existuje několik SNP: 1. substituce G>C v nepřekládaném exonu 1 (g. 763 G>C), 2. změna potenciálního místa vazacího transkripčního faktor Sp1 a 3. substituce A>G v exonu 34 (g. 16009A>G), která určuje nekonzervativní substituci threoninu alaninem (Schennink et al., 2009; Alim et al., 2014; Li et al., 2016a).

Alelově specifické zesílení SNP ve *FASN* odhalilo významné frekvenční rozdíly pro oba polymorfismy u holštýnského skotu s vysokými a nízkými šlechtitelskými hodnotami obsahu mléčného tuku. U intragenních haplotypů obsahujících exon 1 (alely G a C) a exon 34 (alely A a G) byly studovány polymorfismy a byla zjištěna existence vazebné nerovnováhy mezi těmito SNP ($D_{CG} = 0,048, P < 0,001$) (Roy et al., 2006).

U skotu bylo zjištěno, že variace genu *FASN* jsou spojeny s řadou mléčných znaků, jako například obsah mléčného tuku, celkový obsah sušiny, maximální produkce mléka, index MK (C14) v mléce a celkové složení MK. Tato zjištění naznačují, že *FASN* hraje důležitou roli v metabolismu MK (Shi et al., 2019).

V genu *FASN* skotu s genotypem g.17924GG byl prokázán vysoký obsah C14:0, C16:0, C18:0, C18:1n-9 *trans*, C18:1n-9 *cis* a monoenových nenasycených MK (Inostroza et al., 2013).

1.3.5 Gen pro leptin (*LEP*)

Leptin je protein vylučovaný tukovou tkání. Jeho úkolem je regulovat obsah tuku v organismu. Jeho molekulová hmotnost je 16 kDa (Taniguchi et al., 2002). Podílí se na regulaci příjmu krmiva, energetické bilance, plodnosti a imunitních funkcí (Javanmard et al., 2010).

Gen pro *LEP* je umístěn na chromozomu 4. Tento gen je složen ze tří exonů a dvou intronů, avšak pouze ze dvou exonů je možný překlad do proteinové sekvence. Jeho velikost je přibližně 18,9 kb. Na exonu 2 a 3 je umístěn kódující úsek dlouhý 501 nukleotidů (Liefers et al., 2002).

Gen kódující *LEP* má velikost 16735 bp a kóduje 167 aminokyselin (Taniguchi et al., 2002). Tomuto genu se jinak také říká gen obezity, zkráceně Ob gen. Gen *LEP* je potenciální kandidátní gen pro regulaci poměru tukové tkáně a libové svaloviny u skotu. Tento kandidátní gen je tak označován jako jeden z genetických faktorů ovlivňující tzv. mramorování, hlavní ukazatel kvality masa (Taniguchi et al., 2002). Javanmard et al. (2010) uvádí asociaci mezi jednotlivými pěti nukleotidy polymorfismu v genu *LEP* a příjmem potravy s tukovými vlastnostmi.

Pro leptin byl genotypizován polymorfismus *Sau3AI*. Tento SNP je umístěn v intronu 2 mezi dvěma exony (Liefers et al., 2002). Analýza sekvence *Sau3AI* v genu *LEP* odhalila polymorfismus v poloze 1560, ve kterém došlo k záměně *C* na *T* (Javanmard et al., 2010). Skot s genotypem *Sau3AI-AB* denně produkuje o 1,32 kg mléka více a zkonsumuje o 0,73 kg krmiva více ve srovnání s genotypem *AA*. Genotyp *AB* je preferován oběma kandidátními geny (Javanmard et al., 2010). Použitím doplňkového krmiva během otelení skotu s genotypem *Sau3AI* došlo k lepší užitkovosti stáda. Asociace genetických markerů s lepším reprodukčním výkonem je velmi zajímavá. Tento fakt by mohl být použit při výběru podporujícího markeru ke zlepšení reprodukce hovězího masa (Almeida et al., 2003). Druhý polymorfismus se nachází v 3. exonu genu *LEP* a způsobuje záměnu aminokyselin alaninu na valin (Liefers et al., 2002).

1.3.6 Další geny ovlivňující zastoupení MK

Gen pro receptor růstového hormonu (GHR)

Receptor růstového hormonu je protein o 620 aminokyselinách a patří do rodiny cytokin-hematopoetinových receptorů (Moody et al., 1995). Růstový hormon (GH, *growth hormone*) hraje klíčovou roli při regulaci růstu, zahájení a udržování laktace. GH štěpí živiny zvýšením lipolýzy a glukoneogeneze během rané laktace. Účinky růstového hormonu jsou zprostředkovány jeho receptory (GHR, *growth hormone receptor*). Receptory pro GH se nacházejí v mnoha tkáních. Největší koncentrace GHR je však v játrech (Kobayashi et al., 1999).

Gen pro *GHR* je u skotu lokalizován na 20. chromozomu (Moody et al., 1995). Gen *GHR* je považován za silný poziční a funkční kandidátní gen pro svou pozici v QTL. Několik mutací bylo lokalizováno v *GHR*, a to jak v 5' UTR, tak v kódující oblasti (Signorelli et al., 2009). Nesynonymní SNP v exonu 8, který způsobuje substituci fenylalaninu za tyrosin (*F279Y*), ukázal významné účinky na dojivost a složení mléka. SNP pozitivně přispěl ke snížení skóre počtu somatických buněk (PSB) a to vedlo ke zvýšení odolnosti proti mastitidě. Byla prokázána asociace tohoto polymorfismu na obsah kaseinu a laktózy (Rahmatalla et al., 2011). Dále byl tento SNP spojen s produkcí masa. Polymorfismus byl popsán v promotorové oblasti, stejně tak jako čtyři SNP byly nalezeny v exonu 10. Tyto SNP kódují cytoplazmatickou doménu GHR a jsou umístěny na pozicích 76 (T / C), 200 (G / A), 229 (T / C) a 257 (A / G). Na pozicích 200 a 257 jsou substituovány aminokyseliny Ala / Thr a Ser / Gly, zatímco další dvě záměny jsou tichými mutacemi (Di Stasio et al., 2005).

Gen pro SREBP1

Sterol regulační prvek vázající protein-1 (SREBP1) je klíčovým faktorem kontrolujícím expresi *SCD1* a dalších genů podílejících se na katabolismu tuků (Xu et al., 2018).

SREBP-1 gen je umístěn na 19. chromozomu (BTA19). Kóduje faktor transkripce tak, že reguluje hladinu exprese genu *SCD1* a jiných genů metabolismu lipidů. Podílí se na regulaci syntézy mléčných lipidů. Genotyp *SREBP-1* o 84 bp, který způsobil přítomnost dlouhé (typ L) a krátké (typ S) alely, byl odhalen PCR amplifikací v intronu 5 (Conte et al., 2010).

Tabulka 1.2: Vybrané polymorfismy s vlivem na znaky mléčné užitkovosti

Název genu (proteinu)	Polymorfismus	Vliv na užitkové znaky	Zdroj
<i>SCD1</i> (stearoyl-CoA desaturáza 1)	g.10329C>T	C10:0 (↓), C12:0 (↓), C14:0 (↓), C18:1 <i>trans</i> -11 (↑)	Moioli et al. 2007 Schennink et al. 2008
	g.10153G>A	% tuku, % proteinu (↑)	Kulig et al. 2009 Li et al. 2016b
	c.878T>C	C14:1, C17:1, C18:1 <i>n</i> -9 <i>trans</i> , C18:1 <i>n</i> -9 <i>cis</i> a MUFA, vyšší obsah <i>cis</i> -9, <i>trans</i> -11 CLA (↑)	Taniguchi et al. 2004 Inostroza et al. 2013
	10433-10434	% tuku (↑), % proteinu (↑), % C18:1 (↓), % CLA (↓)	Schennink et al. 2008
<i>AGPAT</i> (1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferáza)	g.36175805C>T g. 36155097C>T g.36211257GA>T g.36198118GGC	% tuku (↑)	Littlejohn et al. 2014
<i>FASN</i> (syntáza MK)	g.763G>C	% tuku (↑)	Roy et al. 2005
	g.16009A>G	% tuku (↑)	Roy et al. 2006
	g.17924A>G	C14:0, C16:0, C18:0, C18:1 <i>n</i> -9 a MUFA (↑)	Inostroza et al. 2013
<i>LEP</i> (leptin)	g.1560C>T	Výtěžnost mléka (↑)	Javanmard et al. 2010
<i>GHR</i> (receptor růstového hormonu)	<i>F279Y</i>	Dojivost, složení a výtěžnost mléka (↑)	Rahmatalla et al. 2011

↑ - zvýšení; ↓ - snížení

2 Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo stanovit genotypy polymorfních variant některých kandidátních lokusů vybraných enzymů a vyhodnotit vliv těchto polymorfních variant na zastoupení MK mléčného tuku skotu.

Diplomová práce byla vypracována v rámci projektů:

QJ1510336

Výzkum a podpora produkce zdravotně a spotřebitelsky benefičních mléčných výrobků cílenou selekcí a modifikací profilu MK mléčného tuku.

GAJU-028/2019/Z

Genetika, zdraví zvířat a biologicky a senzoryicky aktivní látky jako základní předpoklad kvalitních potravin a zemědělských surovin.

3 Materiál a metodika

3.1 Charakteristika sledovaných farem a dojnic

Do projektu byly vybrány čtyři farmy ležící v Jihočeském kraji v nadmořské výšce od 395 do 585 m n. m. (tabulka 3.1). Ve všech farmách je stájový způsob chovu a dojnice jsou dojeny 2× denně.

Tabulka 3.1: Základní charakteristika chovů a počet sledovaných dojnic

Chov	Nadmořská výška	Počet dojnic	Podíl (%)
Chov A	420	17	4
Chov B	395	77	19
Chov C	396	219	55
Chov D	585	87	22

Analýza zahrnovala celkem 400 dojnic, ve které bylo 259 dojnic českého strakatého skotu (C100) a 141 kříženek s minimálně 50% podílem českého strakatého skotu (C50X) (tabulka 3.2).

Tabulka 3.2: Rozložení četností genotypů sledovaných dojnic českého strakatého plemene

Označení	Počet dojnic	Podíl (%)
C100 (český strakatý skot)	259	65
C50X (kříženky)	141	35
z toho: (různý podíl)		100
s plemenem Ayrshire	40	28
s plemenem Red Holštýn	65	46
s plemenem Holštýn	12	9
s jiným plemenem	24	17
Celkem	400	100

3.2 Odběry vzorků mléka a jejich analýza

Většina dojnic (57,2 %) byla během odběru na první laktaci. Ostatní byly na 2. až 5. laktaci. Pro výzkum byly od každé dojnice odebrány tři vzorky mléka: 1) pro analýzu DNA, 2) zastoupení MK a 3) pro stanovení kvality mléka. Pro získání DNA bylo mléko odebíráno přímo z mléčné žlázy. Vzorky 2 a 3 byly dopraveny v chladičím boxu do laboratoří Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích (ZF JU) a před vlastním zpracováním a analýzou byly skladovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky pro stanovení kvality mléka byly zaslány do laboratoře Českomoravské společnosti chovatelů (ČMSCH). Údaje o mléčné užitkovosti dojnic na první, resp. druhé laktaci byly získány z databáze plemenic společnosti Plemdat s.r.o. (tabulka 3.3). Přehled o užitkovosti celé sledované populace v den odběru je zaznamenán v tabulce 3.4.

Tabulka 3.3: Údaje o celé 1. a 2. laktaci získané z databáze plemenic

Ukazatel	n	\bar{x}	s_x	Minimum	Maximum	v (%)
Délka (1. laktace) (den)	376	295	15	243	305	4,9
Dojivost (kg)	376	6856	1096	3910	10172	16,0
Tuk (%)	376	4,14	0,31	3,39	5,28	7,6
Tuk (kg)	376	283	46	153	426	16,2
Bílkoviny (%)	376	3,59	0,18	3,01	4,07	4,9
Bílkoviny (kg)	376	246	39	141	347	15,7
P2:1	375	93,24	9,65	63,00	129,00	10,4
Index stáda	374	100,82	15,32	57,00	154,00	15,2
Délka (2. laktace) (den)	345	294	16	240	305	5,4
Dojivost (kg)	345	7633	1228	3681	11138	16,1
Tuk (%)	345	4,10	0,34	3,31	5,40	8,2
Tuk (kg)	345	312	50	122	446	16,1
Bílkoviny (%)	345	3,58	0,18	3,05	4,06	5,1
Bílkoviny (kg)	345	272	42	134	379	15,3
P2:1	344	84,76	10,71	52,00	131,00	12,6
Index stáda	343	100,41	14,99	47,00	137,00	14,9

n = počet dojnic; \bar{x} = průměr; s_x = směrodatná odchylka; v = variační koeficient = $(s_x/\bar{x}) \times 100$

Tabulka 3.4: Údaje o celodenní mléčné užitkovosti v den odběru

Ukazatel	n	\bar{x}	s_x	Minimum	Maximum	v (%)
Pořadí aktuální laktace	262	1,2	0,6	1,0	5,0	48,9
Laktační den	262	183	104	11	609	56,8
Dojivost (kg)	266	21,4	5,8	3,3	35,7	27,2
Tuk (%)	245	4,38	0,78	2,15	8,48	17,7
Bílkoviny (%)	245	3,68	0,30	2,80	4,95	8,1
Laktóza (%)	245	5,15	0,18	4,42	5,51	3,6
Tuk/Bílkoviny	245	1,19	0,20	0,56	2,25	16,6
Tuk/Laktóza	245	0,85	0,16	0,44	1,74	19,1
Počet somatických buněk (tis./ml)	207	148	199	17	1482	134,1
Močovina (mg/100 ml)	256	20,5	5,6	9,9	38,1	27,3
Kyselina citronová (%)	253	0,21	0,02	0,15	0,28	11,8
Aceton (mmol/l)	253	0,10	0,07	0,01	0,36	66,0
Kyselina β -hydroxymáselná (mmol/l)	253	0,03	0,03	0,01	0,20	81,6
Volné mastné kyseliny (mmol/100g tuku)	251	0,93	0,34	0,12	1,97	36,4

n = počet dojnic; \bar{x} = průměr; s_x = směrodatná odchylka; v = variační koeficient = $(s_x/\bar{x}) \times 100$

Data byla získána na základě kontroly užitkovosti z laboratoře Českomoravské společnosti chovatelů, a.s.

3.2.1 Genotypizace

Izolace DNA z mléka

Ze vzorků mléka byla izolována DNA za použití automatického analyzátoru a komerčního kitu od firmy MagCore[®]. Pomocí spektrometru byla změřena kvalita a množství izolované DNA.

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, PCR)

Polymerázová řetězová reakce je enzymatická metoda využívající principu replikace nukleových kyselin, která umožňuje rychlé a snadné namnožení specifického úseku DNA *in vitro* za přítomnosti alespoň jedné kopie daného úseku DNA. Úsek izolované DNA, obsahující sekvenci genu pro leptin a pro 1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferázu, byl amplifikován metodou PCR. Reakční směs pro PCR je složena z komponent vypsanych v tabulkách 3.5 a 3.7.

Primery byly tvořeny těmito sekvencemi:

Primer *AGPAT6* F: 5' - CAA GGC GGC GTA GAC AAA-3'

Primer *AGPAT62* R: 5' - AGC CCC GTC AGA GGT TCA T-3'

Primer *LEP* F: 5' - GGG AAG GGC AGA AAG ATA G-3'

Primer *LEP* R: 5' - TGG CAG ACT GTT GAG GAT C-3'

Reakční směs pro PCR byla namíchána a pipetována po 25 µl (bez DNA a Taq polymerázy) do očíslovaných Eppendorf zkumavek. K směsi ve zkumavce byla přidána příslušná DNA (podle čísla vzorku). Do předem nastaveného termocykleru byly vloženy zkumavky. Byla spuštěna úvodní denaturace probíhající 5 min. při 95 °C. Ke vzorku byla přidána Taq polymeráza. Amplifikace molekul DNA je tvořena třemi cyklicky se opakujícími reakcemi. Denaturace trvá 60 s při 95 °C. Annealing neboli nasedání (navázání) primerů probíhá 60 s za snížené teploty při 72 °C. Elongace trvá 60 s při 72 °C. Probíhá za přítomnosti enzymu *Taq*-polymerázy a dalších nezbytných složek reakční směsi (volných nukleotidů dNTP, dvojmocných iontů atd.), po nasednutí primerů na jednořetězcové molekuly DNA. Pro molekulárně biologickou analýzu bylo zapotřebí provést 35 cyklů. Časový program jednotlivých kroků je sepsán v tabulkách 3.6 a 3.8. Výsledná DNA (produkt PCR amplifikace) byla detekována elektroforézou na 2,5% agarózovém gelu.

Tabulka 3.5: Složení reakční směsi pro polymorfismus alel v genu *AGPAT6* (Čítek et al., 2018, Certifikovaná metodika č. 1975)

Složení směsi	Objem (μl)
mastermix PPP	5,0
primer F	0,25
primer R	0,25
templátová DNA	1,5
H ₂ O	3,5
Celkové množství	10,5

Tabulka 3.6: Časový program pro PCR pro polymorfismus alel v genu *AGPAT6* (Čítek et al., 2018, Certifikovaná metodika č. 1975)

Složení směsi	Program T (°C)	Čas	
mastermix PPP	95	5 min.	
primer F	95	40 s	} 35 x
primer R	58	60 s	
templátová DNA	72	90 s	
H ₂ O	72	10 min.	
	4	pauza	

Tabulka 3.7: Složení reakční směsi pro polymorfismus C-T na exonu 3 v genu *LEP* (Čítek et al., 2018, Certifikovaná metodika č. 1975)

Složení směsi	Objem (μl)
PCR pufr	3,0
MgCl ₂ (25 mM)	2,0
dNTP's	3,0
primer F	1,5
primer R	1,5
<i>Taq</i> polymeráza (1U)	3,0
templátová DNA	2,0
H ₂ O	14,0
Celkové množství	30,0

Tabulka 3.8: Časový program pro PCR pro polymorfismus C-T na exonu 3 v genu *LEP* (Čítek et al., 2018, Certifikovaná metodika č. 1975)

Složení směsi	Program T (°C)	Čas	
PCR pufr	95	5 min.	
MgCl ₂ (25 mM)	95	45 s	} 35 x
dNTP's	53	60 s	
primer F	72	60 s	
primer R	72	5 min.	
<i>Taq</i> polymeráza (1U)	15	pauza	

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů

(Restriction fragment length polymorphisms, RFLP)

Metodou RFLP byly genotypizovány amplifikované vzorky DNA. K 15 µl amplifikátu (PCR produktu) bylo přidáno 1,7 µl pufru a 1,0 µl (10U) restriktazy *Hph*I. Tento enzym má za úkol rozštěpit řetězec DNA v cílové sekvenci (gen pro *LEP*). Vzorky byly přes noc vloženy do inkubátoru při teplotě 37 °C. Po inkubaci byla výsledná DNA detekována elektroforézou na 3% agarózovém gelu. Při restrikci vznikly fragmenty *M* – 331 bp a *W* – 311 + 20 bp dlouhé (gen pro *LEP*).

Fragmentační analýza ABI 3500 DX

Byl smíchán velikostní standard 500-LIZ 0,5 µl s 11 µl deionizovaného formamidu. Tato směs byla zvortexována. Na osmikapilárovém sekvenátoru ABI® 3500 DX Genetic Analyser Applied Biosystems byl testován polymorfismus genu *AGPAT6* za pomoci Dye setu G5 a polymeru POP7 s délkou kapiláry 50 cm. Do sekvenačních destiček byly napipetovány vzorky po 11 µl. K těmto vzorkům byl přidán 1 µl naředěné DNA (5 ng/µl). Směs s DNA byla zvortexována. Denaturace probíhala 5 minut při 95 °C. Nakonec byla směs 5 minut chlazená na ledu. Pomocí softwaru GeneMapper (Applied Biosystems) byly zpracovány výsledky fragmentační analýzy a byly určeny genotypy genu pro *AGPAT6*. Výstupem fragmentační analýzy byly rozlišené alely lišící se délkou, tj. index polymorfismu na BTA27 g.36198118GGC.

3.2.2 Složení mléka

Pro analýzu základního složení mléka byla zvolena metoda infračervené spektroskopie ve středové oblasti s využitím Fourierových informací. Pro tento účel bylo využito zařízení CombiFoss FT+ (Foss Analytical A/S, Denmark) sestávající z kombinace přístrojů MilkoScan FT+ 76150 a Fossomatic FC 79910. Kapacita tohoto zařízení umožňuje zpracovat 500 vzorků za hodinu.

3.2.3 Stanovení MK mléčného tuku

Analýza plynovou chromatografií (Gas chromatography, GC)

Plynová chromatografie je separační metoda, kdy se od sebe oddělují složky ve vzorku. Analýzy MK referenční metodou byly provedeny na Katedře aplikované chemie ZF JU. Vzorky mléka pro analýzy byly nejdříve lyofilizovány a po extrakci tuku petroletherem převedeny na methylestery MK.

Lyofilizace materiálů

Vzorek mléka (30 ml) byl umístěn do 150 ml kádinky a zmražen při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následovala lyofilizace po dobu 48 hodin při teplotě $-46\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku 0,07 mbar. Pro lyofilizaci byl použit přístroj Alpha 1–4 LD (Christ, Německo). Lyofilizovaný materiál byl převeden do plastových vzorkovnic a uchováván při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ do vlastní analýzy.

Extrakce tuku

Ke vzorku 0,15 g lyofilizovaného mléka ve zkumavce objemu 8 ml bylo přidáno 3 ml petroletheru. Vialky byly umístěny při laboratorní teplotě do třepačky na tři hodiny. Po sedimentaci byl petroletherový extrakt přímo použit k derivatizaci.

5 g lyofilizovaného krmiva bylo extrahováno 10 ml petroletheru 24 hodiny při laboratorní teplotě za stálého třepání ve vialce objemu 40 ml. Extrahovaná směs byla po usazení filtrována přes papírový filtr za sníženého tlaku, zbytek byl propláchnut 5 ml petroletheru a opět filtrován, filtráty byly dále zpracovávány společně. Z filtrátu byl při teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ odpařen petrolether v ochranné dusíkové atmosféře, ze zbylého tuku bylo odváženo cca 5 mg, rozpuštěno v 1 ml petroletheru a tento roztok byl použit k derivatizaci.

Derivatizace MK

MK byly převedeny na methylestery reesterifikací petroletherového extraktu tuku methanolovým roztokem hydroxidu draselného. K 1 ml petroletherového extraktu mléka bylo přidáno 200 µl roztoku KOH v methanolu (2 mol/l) a směs byla zahřívána 2 min. ve vodní lázni o teplotě 60 °C. Do vychlazené směsi bylo přidáno 400 µl HCl v methanolu (1 mol/l) k neutralizaci KOH a 1 ml petroletheru. K analýze plynovou chromatografií byl odebírán 1 µl petroletherového roztoku.

Stanovení MK

Stanovení MK bylo provedeno na přístroji Varian 3800 dle předepsaných parametrů (viz tabulka 3.9). Kvantifikace zastoupení MK v mléčném tuku byla určena z poměru ploch píků jednotlivých methylesterů MK k celkové ploše jejich píků. Korekce na odezvu detektoru a diskriminaci při nástřiku byla provedena pomocí kvantitativních standardů. Identifikace jednotlivých methylesterů MK byla provedena pomocí kvalitativních standardů firmy Supelco (USA) a hmotnostního detektoru 4000 MS firmy Varian v režimu chemické i elektronové ionizace.

Tabulka 3.9: Parametry chromatografické analýzy

Parametr	Hodnota
Kolona	SelectFAME (Varian), 60 m/0,25 mm
Detektor	FID (plamenově ionizační)
Teplota:	55 °C – 5 min., 40 °C /min. –170 °C,
- kolona	2 °C /min. –196 °C, 10 °C /min. –210 °C – 8 min
- injektor	250 °C
- detektor	250 °C
Nosný plyn	helium
Průtok helia	1,8 ml/min.
Nástřík	1 µl, split 10

3.3 Statistické vyhodnocení dat

Pro statistické vyhodnocení byl použit program Statistica (StatSoft CR s.r.o.) a dále Microsoft Office Excel.

Genotypové a alelové frekvence byly vypočítány pro celkovou populaci dojníc a poté jednotlivě podle plemene. Za pomoci chí-kvadrát testu (χ^2) bylo stanoveno, zda se celková populace a populace sledovaných plemen nachází v Hardy-Weinbergově rovnováze (HWE, *Hardy-Weinberg equilibrium*).

Sledovanými závislými proměnnými byly:

- 1) Ukazatelé mléčné užitkovosti dojníc na první, resp. druhé laktaci – délka laktace ve dnech, produkce mléka (kg), produkce tuku (kg), produkce bílkovin (kg), průměrný obsah tuku (%) a průměrný obsah bílkovin (%)
- 2) Vybrané ukazatelé kvality mléka v mléčném tuku (%) v den odběru mléka: pořadí aktuální laktace, laktační den, celodenní dojivost (kg), tuk (%), bílkoviny (%), laktóza (%)
- 3) Zastoupení vybraných MK a jejich skupin v mléčném tuku (%) v den odběru mléka: nasycené MK; monoenové nenasycené MK v *cis* konfiguraci; *trans* izomery nenasycených MK; polyenové nenasycené MK; MK s krátkým řetězcem; MK se středním řetězcem; MK s dlouhým řetězcem; SFA = C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C12:0, C14:0, C16:0, C18:0; MUFA = C16:1*n*-7 (*cis*-9), C17:1*n*-7 (*cis*-10), C18:1*n*-7 (*trans*-11), C18:1*n*-9 (*cis*-9), C18:1*n*-7 (*cis*-11); PUFA = C18:2*n*-6 (*cis*-9, *cis*-12), C18:3*n*-3 (all *cis*-9,12,15), C18:2 (*cis*-9, *trans*-11); TFA = C18:1*n*-7 (*trans*-11), C18:2 (*cis*-9, *trans*-11)

U souboru byly vyhodnoceny předpoklady pro užití parametrických metod (normalita dat, homogenita rozptylů). Pro analýzu nezávislé proměnné (polymorfismus příslušného genu) byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA), k následnému porovnání (*post-hoc* testy) ve skupinách byl použit Fisherův *LSD* test. Statistická významnost byla vyhodnocena při obvyklých hladinách významnosti ($p < 0,05$; 0,01; 0,001).

4 Výsledky a diskuse

Výsledky jsou rozděleny do tří podkapitol. V první kapitole jsou shrnuty četnosti polymorfismů genů *AGPAT6* a *LEP*. Druhá kapitola pojedná o mléčné užitkovosti dojnic českého strakatého plemene a jejich kříženek na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismech genů *AGPAT6* a *LEP*. Ve třetí kapitole jsou shrnuty výsledky naměřených vybraných ukazatelů kvality mléka a zastoupení MK u dojnic českého strakatého plemene a kříženek v den odběru v závislosti na polymorfismech genů *AGPAT6* a *LEP*.

4.1 Četnosti polymorfismu ve vybraném souboru dojnic českého strakatého plemene a jejich kříženek

Celkem bylo genotypizováno 400 dojnic. Z celkového počtu bylo 259 dojnic českého strakatého plemene a 141 dojnic bylo kříženkami českého strakatého skotu s jiným plemenem. Z výběrového souboru byl zmapován genotyp každé dojnice a byla určena celková frekvence v rámci sledovaných populací. Dále byla dopočítána alelová frekvence.

4.1.1 Četnosti polymorfismu *AGPAT6*

Při pozorování genotypových četností mezi dojnicemi českého strakatého skotu, kříženek a celé populace nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly. Polymorfismus genu *AGPAT6* byl zjištěn celkem u 390 dojnic českého strakatého skotu a jejich kříženek. Dojnic s genotypem *CC* bylo 88, s genotypem *CT* 289 a s genotypem *TT* 13. Pro celkovou populaci byla stanovena genotypová frekvence 0,226 pro genotyp *CC*, 0,741 pro *CT* a 0,033 pro *TT* (tabulka 4.1). Alelová frekvence činila 0,596 pro alelu *C* a 0,404 pro alelu *T*.

Populace českého strakatého skotu byla zastoupena v počtu 251 dojnic. Z tohoto počtu byla zjištěna genotypová frekvence 0,231 pro genotyp *CC*, 0,737 pro *CT* a 0,032 pro *TT*. Ve studii Deniz et al. (2020) byla také pozorována genotypová frekvence českého strakatého skotu. V této studii došli autoři k odlišnému závěru. Nejčetnější genotypová frekvence (0,58) byla pro genotyp *CC*, mnohem nižší (0,34) pak pro *CT* a 0,08 pro *TT* a alelová frekvence představovala poměr 0,75 *C* a 0,25 *T*. K odlišnému výsledku autoři patrně dospěli proto, že pozorovali velmi malou skupinu dojnic ($n = 50$).

V případě kříženek byl zjištěn polymorfismus u 139 z nich. Genotypová frekvence představovala 0,216 pro genotyp *CC*, 0,748 pro *CT* a 0,036 pro *TT* (graf 4.1). Dále byla určena alelová frekvence pro alelu *C* 0,590 a pro alelu *T* 0,410 (graf 4.2).

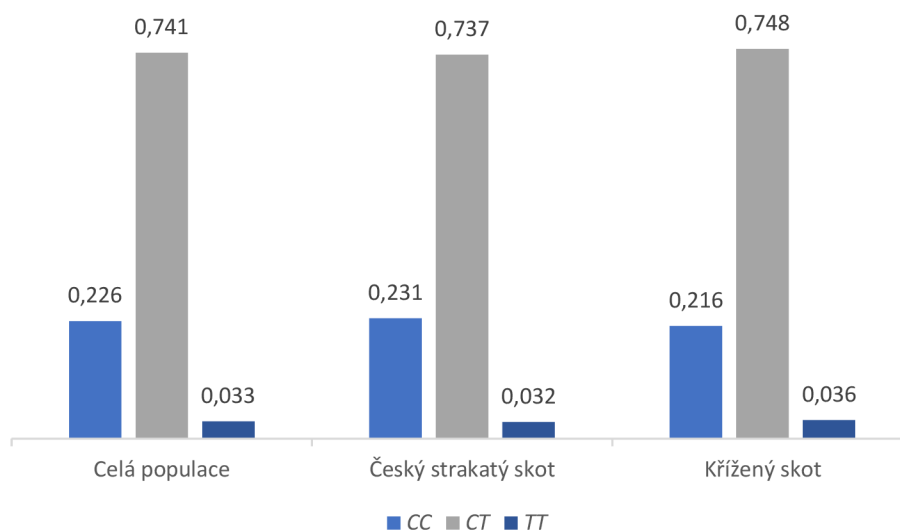
Pomocí chí-kvadrát testu (χ^2) bylo stanoveno, zdali se pozorovaná populace dojníc nachází v HWE. HWE byla vypočítána pro celý soubor, pro populaci českého strakatého skotu a pro populaci kříženek. Hodnota chí-kvadrát testu byla vyšší než kritická hodnota, což ukazuje, že populace nebyla v genu pro *AGPAT6* v genetické rovnováze, a to jak celá populace, tak dojnice českého strakatého skotu a kříženky.

Při porovnání genotypových četností mezi plemeny byla zjištěna významnost na hladině $p > 0,05$.

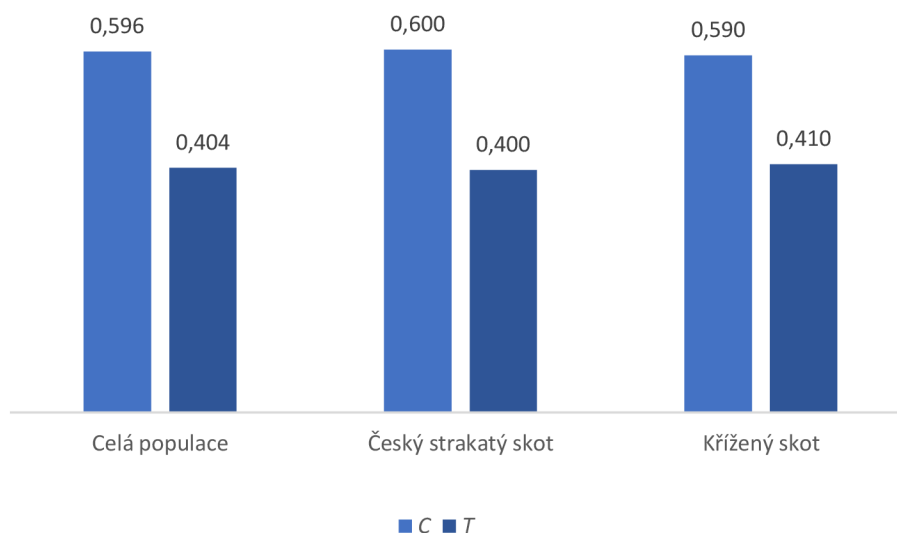
Ve studii He et al. (2011) genotypizovali plemena Xinong Sannen a Guanzhong a došli k závěru, že dominantní genotypovou frekvencí byl genotyp *CC*. I u alelových frekvencí byla zjištěna převaha alely *C* (0,793) nad *T* (0,207). Také Upadhyay et al. (2019) určili genotypovou a alelovou frekvenci u plemene Karan Fries (KF) s převahou pro genotyp *TT*. Z výsledku chí-kvadrát testu určili, že populace KF byla v HWE. U obou studií šlo o odlišná plemena, a to je nejspíše důvodem, proč pozorovali jiný dominantní genotyp.

Tabulka 4.1: Genotypové a alelové frekvence *AGPAT6* v rámci jednotlivých populací dojníc českého strakatého skotu

	Genotypová frekvence			Alelová frekvence		χ^2
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	
Celá populace (n = 390)	0,226	0,741	0,033	0,596	0,404	29,05***
Český strakatý skot (n = 251)	0,231	0,737	0,032	0,600	0,400	28,62***
Kříženky s českým strakatým skotem (n = 139)	0,216	0,748	0,036	0,590	0,410	29,86***
<i>p</i>	0,9267					



Graf 4.1: Genotypová frekvence *AGPAT6* v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu



Graf 4.2: Alelová frekvence *AGPAT6* v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu

Dále byl sledován polymorfismus *AGPAT6* u jednotlivých chovů. Souhrn všech genotypových a alelových frekvencí *AGPAT6* v rámci chovů je vypsán v tabulce 4.2 a graficky znázorněn v grafech 4.3 a 4.4.

V chovu A byla zastoupena genotypová frekvence 0,313 pro genotyp *CC*, 0,688 pro genotyp *CT* a genotyp *TT* se v tomto chovu vůbec nevyskytoval. Alelová frekvence pak byla dopočítána v poměru 0,656 pro alelu *C* a 0,344 pro alelu *T*. Chov B se

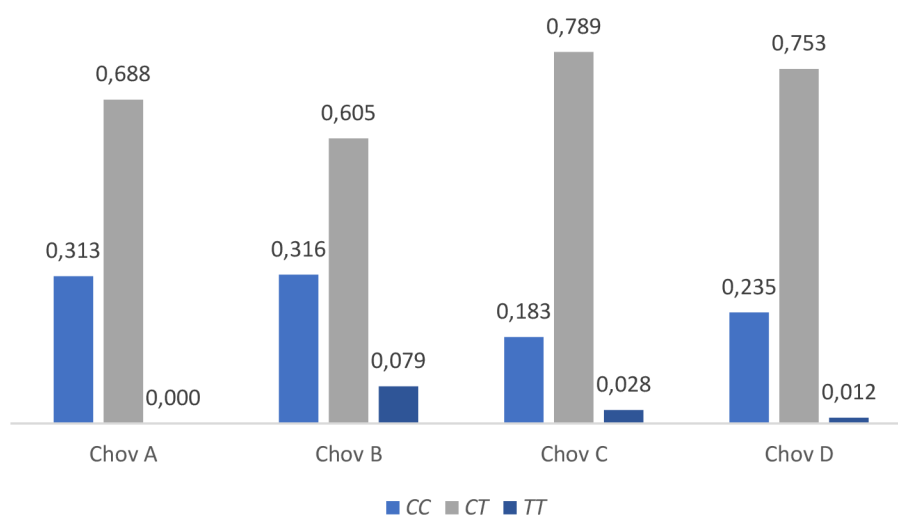
vyznačoval alelovou frekvencí 0,618 pro alelu *C* a 0,382 pro alelu *T*. Pro chov C byly alelové frekvence 0,577 pro alelu *C* a 0,423 alelu *T*. U populace dojníc v chovu D byla určena alelová frekvence 0,612 pro alelu *C* a 0,388 pro alelu *T*.

Pro všechny chovy byly stanoveny hodnoty chí-kvadrát testu. V chovech A, C a D nebyla populace v HWE. Rozdíly v genotypoch mezi jednotlivými chovy byly na hladině významnosti $p < 0,01$. Pouze u chovu B (Pražák) byl rozdíl v pozorovaných a očekávaných genotypoch významný na hladině významnosti $p < 0,05$.

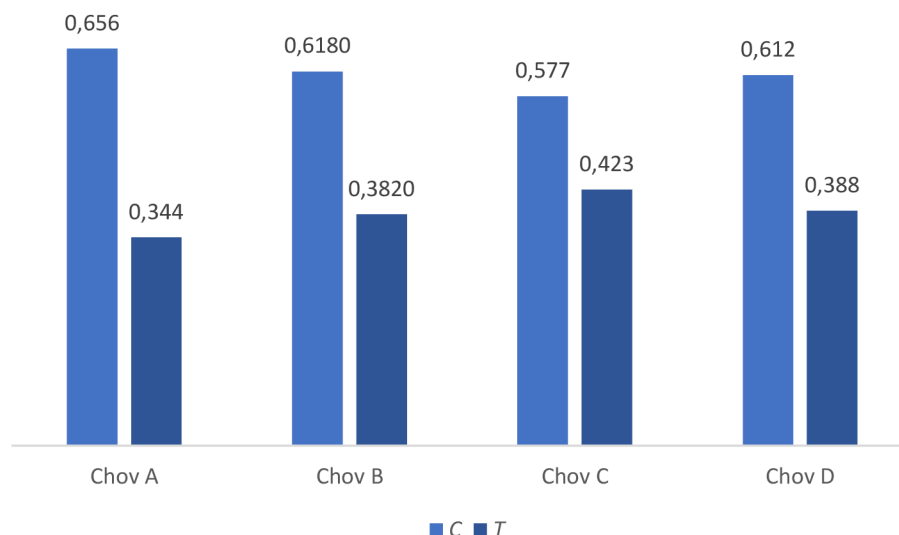
Při porovnání genotypových četností mezi chovy byla zjištěna významnost na hladině $p < 0,05$.

Tabulka 4.2: Genotypové a alelové frekvence *AGPAT6* v rámci sledovaných chovů

	Genotypová frekvence			Alelová frekvence		χ^2
	<i>CC</i>	<i>CT</i>	<i>TT</i>	<i>C</i>	<i>T</i>	
Chov A (n = 16)	0,313	0,688	0,000	0,656	0,344	27,44***
Chov B (n = 76)	0,316	0,605	0,079	0,618	0,382	7,98*
Chov C (n = 213)	0,183	0,789	0,028	0,577	0,423	37,98***
Chov D (n = 85)	0,235	0,753	0,012	0,612	0,388	34,23***
<i>p</i>	0,0267*					



Graf 4.3: Genotypová frekvence *AGPAT6* v rámci sledovaných chovů



Graf 4.4: Alelová frekvence *AGPAT6* v rámci sledovaných chovů

4.1.2 Četnosti polymorfismu *LEP*

Polymorfismus *LEP* byl zmapován pouze u 336 dojnic. Genotyp *MM* mělo 251 dojnic, genotyp *MW* 72 dojnic a genotyp *WW* 13 dojnic. Z celkové sledované populace dojnic byla genotypová frekvence 0,747 pro genotyp *MM*, 0,214 pro genotyp *MW* a 0,039 pro genotyp *WW* (tabulka 4.3). Ve všech sledovaných skupinách dominoval genotyp *MM*. Tyto údaje jsou graficky znázorněny v grafu 4.5. Alelová frekvence pro alelu *M* činila 0,854 a pro alelu *W* 0,146 (graf 4.6).

Pro populaci českého strakatého skotu byla zjištěna genotypová frekvence 0,714 *MM*, 0,240 *MW* a 0,046 *WW*. Alelová frekvence pak byla 0,834 pro alelu *M* a 0,166 pro alelu *W*. Cenná je pro porovnání studie Ječmínková et al. (2016), ve které autoři genotypizovali polymorfismus českého strakatého skotu a zjistili velmi podobné genotypové frekvence, a to 0,626 pro *MM*, 0,305 pro *MW* a 0,069 pro *WW*. Alelová frekvence ve studii byla opět velmi podobná: 0,778 pro alelu *M* a 0,222 pro alelu *W*.

V populaci kříženého skotu představovala genotypová frekvence pro genotyp *MM* 0,807, pro *MW* 0,168 a pro *WW* 0,025. Alelová frekvence vykazovala podobný trend jako v populaci českého strakatého skotu a byly zjištěny hodnoty 0,891 pro alelu *M* a 0,109 pro alelu *W*.

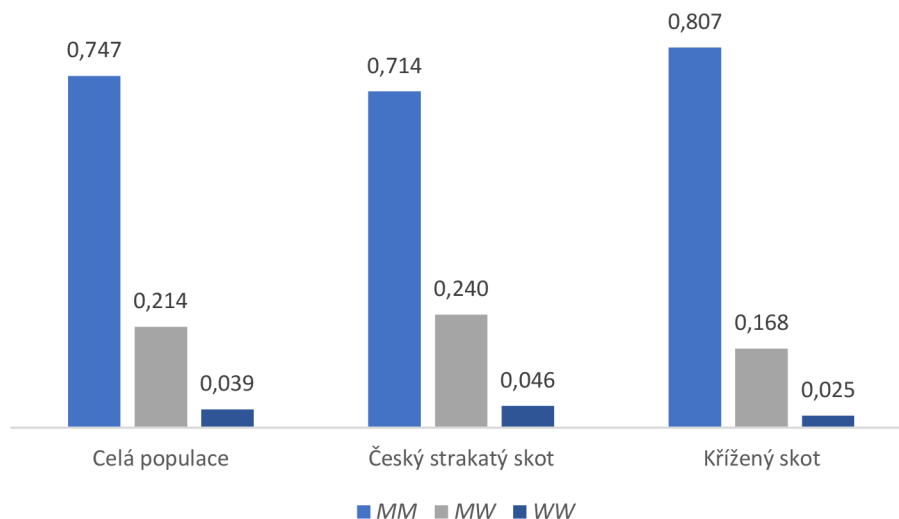
Hodnota chí-kvadrát testu pro celkový soubor 336 dojnic byla 1,96, pro populaci českého strakatého skotu 1,80 a pro populaci kříženek 1,86. Rozdíly v pozorovaných a očekávaných genotypových četnostech nejsou významné, populace jsou v HWE.

Porovnáním genotypových četností mezi plemeny byla zjištěna hladina významnosti $p > 0,05$, tj. rozdíly nebyly statisticky významné.

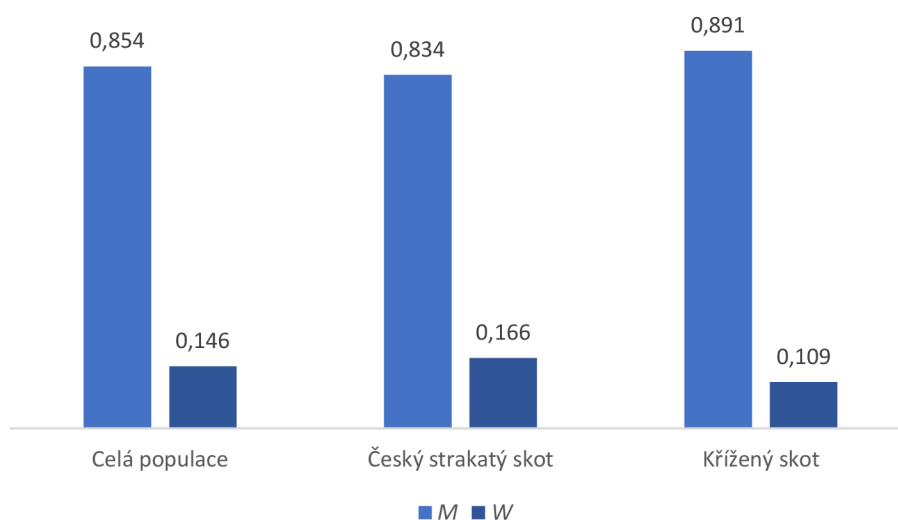
Kala et al. (2017) také genotypizovali dojnice českého strakatého plemene a dospěli ke stejnému poměrnému zastoupení MM 0,714 %, MW 0,241 % a WW 0,045 %. Alelová frekvence M (0,835 %) a W (0,165 %) byla rovněž stejná. Podobné výsledky uvádějí i další autoři. Například Silva et al. (2014) u plemene Nellore, kde genotypová frekvence byla 0,70; 0,30 a 0,00. Alelová frekvence M a W byla v této studii zjištěna 0,85 a 0,15. Tento poměr se prakticky rovná zde zjištěnému alelovému poměru celé populace. Dalším příkladem jsou Almeida et al. (2003), kteří pozorovali 100 dojnic s polymorfismem genu *LEP HphI* a zjistili alelové četnosti 0,85 resp. 0,15 u kříženců Aberdeen Angus a Nelore. Také ve studii Trakovické et al. (2013) zjistili autoři genotypové a alelové frekvence u slovenského strakatého a pinzgavského skotu v podobných poměrech. Javanmard et al. (2010) také pozorovali genotypovou a alelovou frekvenci u čtyř íránských plemen skotu. Kulig et al. (2009) pozorovali dojnice plemene Jersey a zjistili genotypovou frekvenci MM 0,52, MW 0,40 a WW 0,08. Frekvence alel byla M 0,72 a W 0,28. Jiný druh plemene zde hrál roli a výsledky byly od výsledků zjištěných v této diplomové práci odlišné.

Tabulka 4.3: Genotypové a alelové frekvence *LEP* v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu

	Genotypová frekvence			Alelová frekvence		χ^2
	<i>MM</i>	<i>MW</i>	<i>WW</i>	<i>M</i>	<i>W</i>	
Celá populace (n = 336)	0,747	0,214	0,039	0,854	0,146	1,96
Český strakatý skot (n = 217)	0,714	0,240	0,046	0,834	0,166	1,80
Kříženky (n = 119)	0,807	0,168	0,025	0,891	0,109	1,86
<i>p</i>	0,1669					



Graf 4.5: Genotypová frekvence *LEP* v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu



Graf 4.6: Alelová frekvence *LEP* v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu

Polymorfismus *LEP* byl také sledován v rámci jednotlivých chovů, údaje o genotypové a alelové frekvenci jsou shrnuty v tabulce 4.4 a grafech 4.7 a 4.8.

Genotypové frekvence genotypu *WW* byly ve všech chovech zastoupeny ve velmi nízkém poměru. Alelová frekvence pro chov A představovala 0,971 pro alelu *M* a 0,029 pro alelu *W*. Pro chov B byla alelová frekvence 0,864 pro alelu *M* a 0,136 pro alelu *W*. Alelová frekvence pro chov C byla v poměru 0,840 pro alelu *M* a 0,160 pro

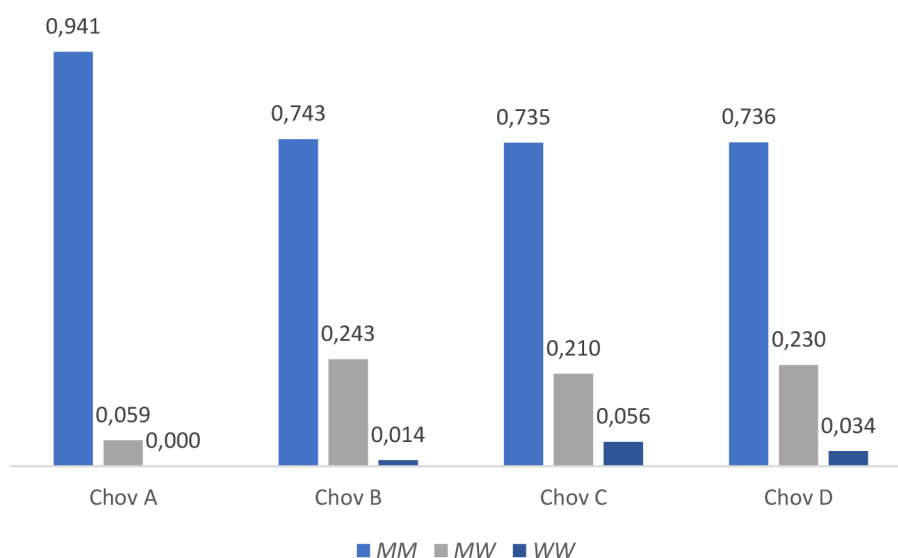
alelu *W*. Chov D se vyznačoval alelovými frekvencemi 0,851 pro alelu *M* a 0,149 pro alelu *W*.

Pro všechny chovy byly stanoveny hodnoty chí-kvadrát testu. Populace v chovech A, B a D pro daný lokus byla v HWE. Mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi genotypů v jednotlivých chovech nebyly významné rozdíly. Pouze u chovu C (Sedlec) byl pozorován rozdíl v genotypoch na hladině významnosti $p < 0,05$. Vychýlení z genetické rovnováhy se obvykle interpretuje jako důsledek probíhající selekce ve prospěch určitého genotypu, roli však mohou hrát i další vlivy.

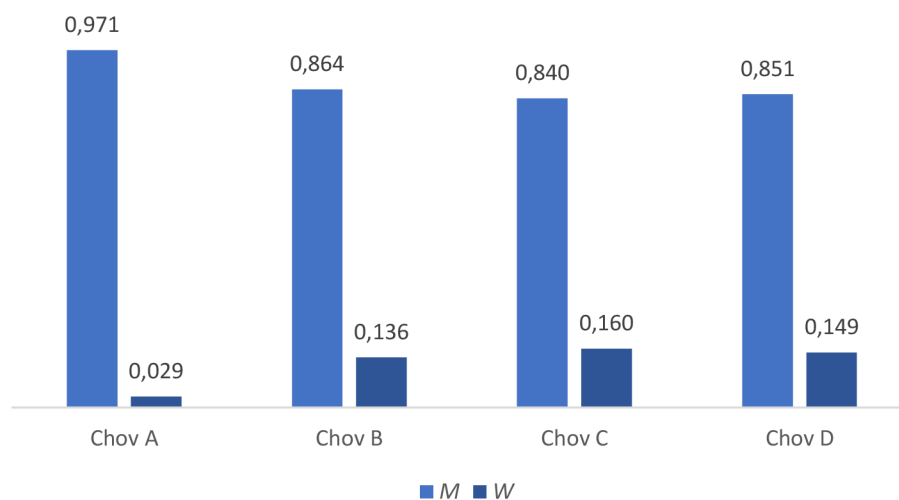
Při porovnání genotypových četností mezi chovy nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$).

Tabulka 4.4: Genotypové a alelové frekvence *LEP* v rámci sledovaných chovů

	Genotypová frekvence			Alelová frekvence		χ^2
	<i>MM</i>	<i>MW</i>	<i>WW</i>	<i>M</i>	<i>W</i>	
Chov A (n = 17)	0,941	0,059	0,000	0,971	0,029	0,09
Chov B (n = 70)	0,743	0,243	0,014	0,864	0,136	0,12
Chov C (n = 162)	0,735	0,210	0,056	0,840	0,160	4,89*
Chov D (n = 87)	0,736	0,230	0,034	0,851	0,149	0,91
<i>P</i>	0,4042					



Graf 4.7: Genotypová frekvence *LEP* v rámci sledovaných chovů



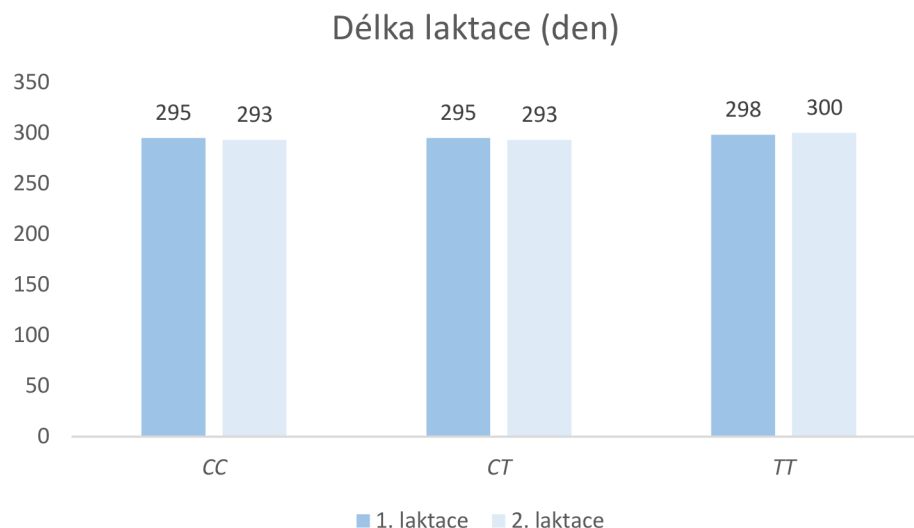
Graf 4.8: Alelová frekvence *LEP* v rámci sledovaných chovů

4.2 Asociační analýza mléčné užitkovosti dojnic českého strakatého plemene a jejich kříženek na 1. a 2. laktaci

4.2.1 Analýza mléčné užitkovosti v závislosti na polymorfismu genu *AGPAT6*

Gen pro *AGPAT6* lze považovat za kandidátní gen pro regulaci produkce tuku a celkového složení mléka (He et al., 2011). Zvýšením genové exprese genu *AGPAT6* dojde k odpovídajícímu zvýšení množství enzymu AGPAT6, což má za následek zvýšení TAG v mléce (Littlejohn et al., 2014). Vzhledem k vlastnostem genu pro *AGPAT6* byl pozorován vliv polymorfismu *AGPAT6* na mléčnou užitkovost ve sledovaném stádě dojnic.

V celé populaci, jak u čistokrevných dojnic českého strakatého skotu, tak kříženek, byla srovnávána mléčná užitkovost dosažená na 1. a 2. laktaci. Do této analýzy bylo zapojeno na 1. laktaci 366 dojnic a v průběhu 2. laktace 335 dojnic (viz tabulka 4.5). Průměrná délka 1. a 2. laktace je graficky znázorněna v grafu 4.9.

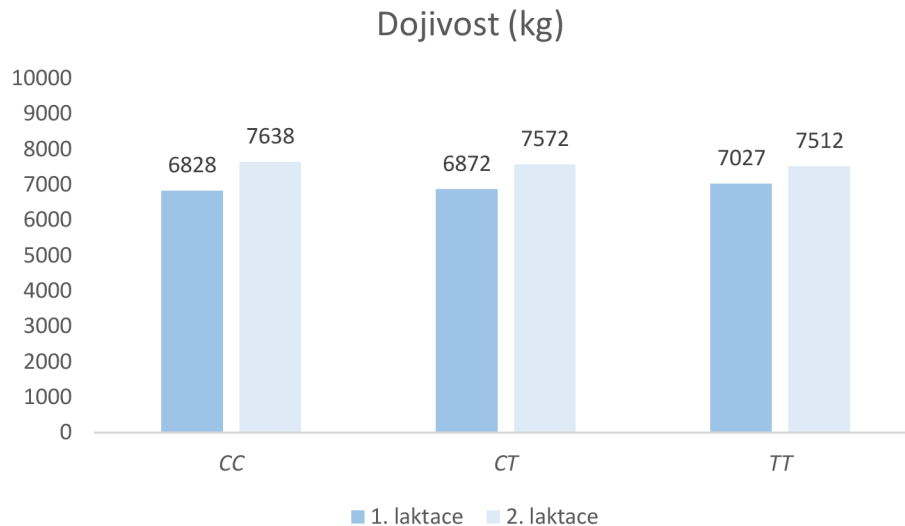


Graf 4.9: Délka 1. a 2. laktace (den) v závislosti na polymorfismu pro gen *AGPAT6*

Během 1. laktace byla prokázána u dojnic genotypu *TT* nejvyšší dojivost, a to 7027 kg. Dojivost genotypu *CC* a *CT* je velmi obdobná, tj. 6828 kg, resp. 6872 kg.

Dojivost během 2. laktace byla v porovnání s 1. laktací (graf 4.10) o 773 kg vyšší. Během 2. laktace však došlo k opačnému trendu mléčné užitkovosti oproti 1. laktaci, kdy nejvyšší nádoj byl pozorován u genotypu *CC* s hodnotou 7638 kg. Rozdíl mezi genotypem *CT* a *TT* byl pouze 60 kg. Celkově by se dalo z grafu usuzovat, že během 1. laktace má vyšší mléčnou užitkovost genotyp *TT* a během 2. laktace genotyp *CC*.

Mezi jednotlivými genotypy nebyly zjištěny ani během 1. a ani během 2. laktace statisticky významné rozdíly. Ke stejnému závěru, tj. ke genotypové nezávislosti, dospěli i Upadhyay et al. (2019). Ti sice pozorovali dojnice plemene Karan Fries, avšak ani u tohoto plemene nebyl prokázán vliv genotypu na plemennou hodnotu produkce mléka v kg (dojivost).

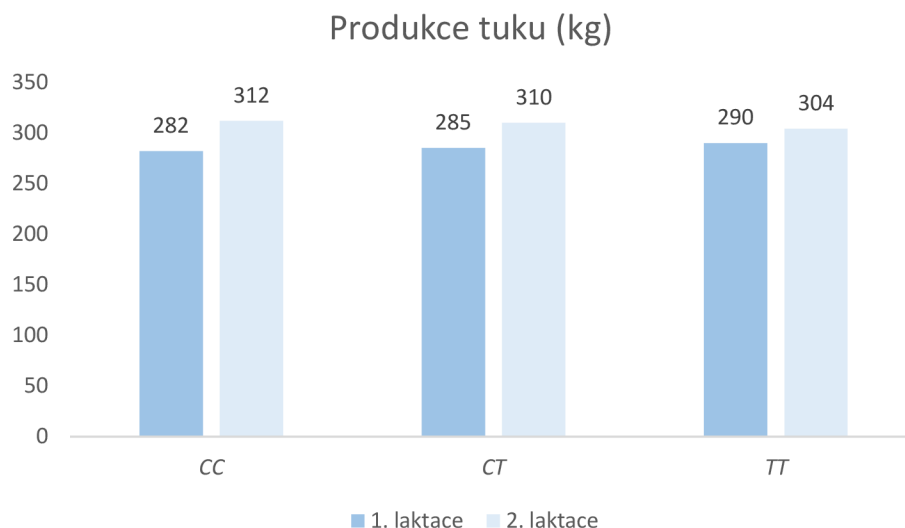


Graf 4.10: Dojivost (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *AGPAT6*

Za celou 1. laktaci byla prokázána nejvyšší produkce mléčného tuku u genotypu *TT* s množstvím 290 kg. Jak u heterozygotního genotypu *CT* s množstvím 285 kg, tak u homozygotního genotypu s množstvím 282 kg mléčného tuku, nebyl pozorován markantní rozdíl v porovnání s genotypem *TT*. Mezi genotypy nebyly statisticky významné rozdíly ($p > 0,05$).

Ve 2. laktaci byla, stejně jako v dojivosti, patrná vyšší produkce tuku u homozygotního genotypu *CC*. O nepatrné množství (2 kg) byla zjištěna nižší produkce tuku u heterozygotního genotypu *CT*. Nejnižší produkce tuku ve 2. laktaci byla u homozygotních jedinců *TT* (304 kg). Stejně jako u předešlého ukazatele (dojivosti) lze pozorovat nepřímou úměru v produkci tuku v průběhu pozorovaných laktací (viz graf 4.11). Hladina významnosti byla $p > 0,05$, a proto je vliv genotypu na produkci tuku statisticky nevýznamný.

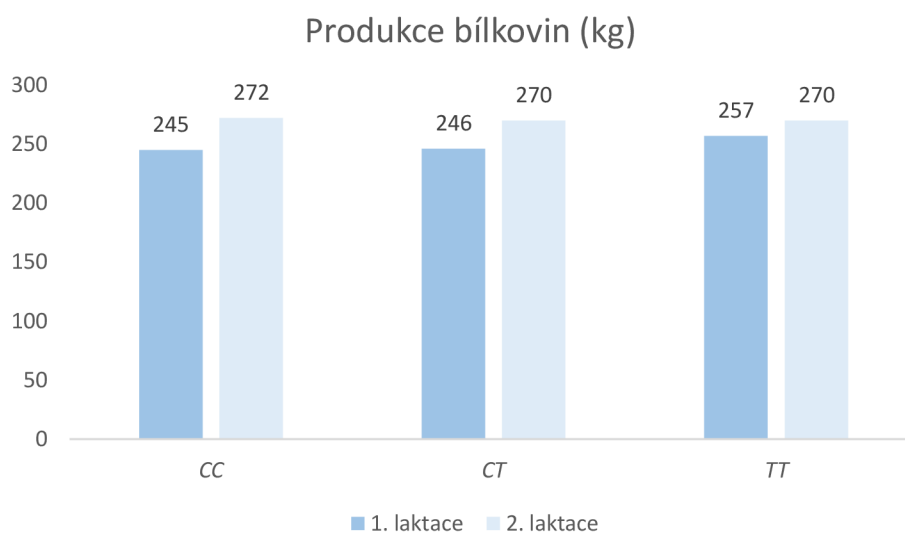
Autoři Upadhyay et al. (2019) pozorovali polymorfismus genu pro *AGPAT6*, avšak u plemene Karan Fries. V jejich pozorované skupině dojníc se plemenná hodnota produkce tuku také významně nelišila s ohledem na různé genotypy.



Graf 4.11: Produkce tuku (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *AGPAT6*

V období 1. laktace je z grafu 4.12 vidět jednoznačně nejvyšší produkce bílkovin pro genotyp *TT* (257 kg). Genotypy *CC* a *CT* vykazovaly nižší produkci bílkovin, oproti genotypu *TT*, avšak vzájemně byly hodnoty téměř rovnocenné, s rozdílem 1 kg. Mezi genotypy nebyl statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$).

Produkce bílkovin v období 2. laktace byla velmi obdobná pro všechny genotypy. Pro genotypy *CT* a *TT* bylo naměřeno množství 270 kg bílkovin. O 2 kg více byla zjištěna produkce bílkovin pro genotyp *CC*. Lze tedy konstatovat, že genotyp na produkci bílkovin ve druhé laktaci neměl vliv.

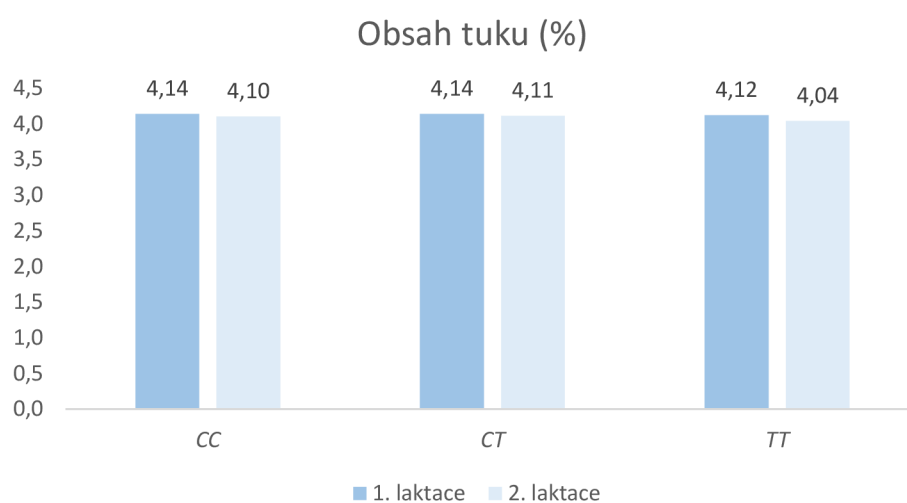


Graf 4.12: Produkce bílkovin (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *AGPAT6*

Minimální rozdíly v uvedené celkové produkci tuku a bílkovin dokládají i nepříliš vysoké rozdíly v procentuálních obsazích tuku a bílkovin. Například v obsahu tuku vykazovaly genotypy *CC* a *CT* stejné hodnoty (4,14 %) a u genotypu *TT* byl obsah tuku 4,12 %.

Na 2. laktaci byly zjištěny nižší obsahy u všech genotypů (graf 4.13). Lze konstatovat, že genotypy vykazovaly v období 1. i 2. laktace stejný trend.

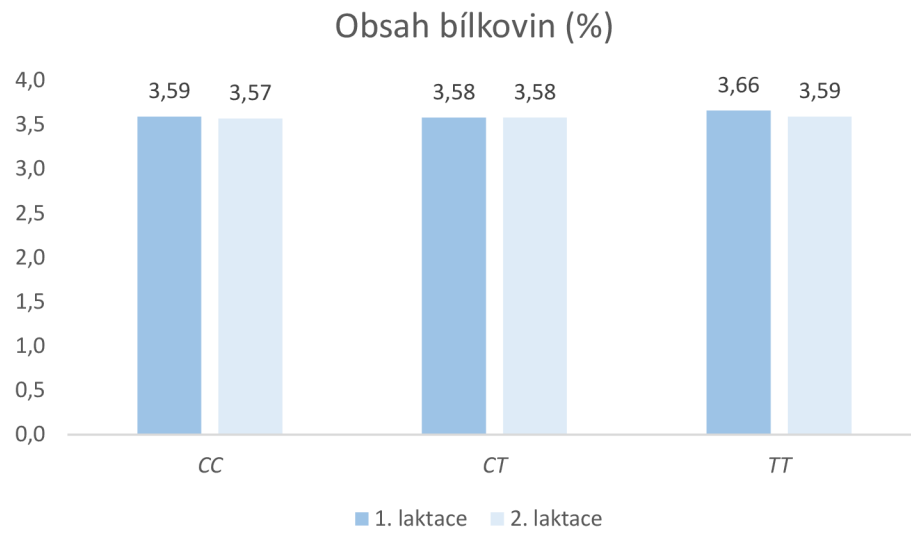
Upadhyay et al. (2019) také naměřili u dojnic plemene Karan Fries srovnatelný obsah tuku u genotypů *CT* a *CC* a stejně tak nižší procento tuku u dojnic s genotypem *TT*.



Graf 4.13: Obsah tuku (%) na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *AGPAT6*

Jednoznačně nejvyšší obsah bílkovin v období 1. laktace vykazoval genotyp *TT* (3,66 %). U genotypu *CT* byl naměřen stejný obsah bílkovin v obou laktacích (3,58 %). Také genotyp *CC* vykazoval podobný trend. Avšak v období 1. laktace byl naměřen u genotypu *CC* vyšší obsah bílkovin (3,59 %). Genotyp ve 2. laktaci neměl až tak významný vliv na obsah bílkovin (graf 4.14).

Sledované parametry mléčné užitkovosti zjištěné pro 1. a 2. laktaci nebyly polymorfismem pro gen *AGPAT6* ovlivněny, neboť rozdíly mezi genotypy jsou statisticky nevýznamné.



Graf 4.14: Obsah bílkovin (%) na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *AGPAT6*

Tabulka 4.5: Vliv polymorfismu genu *AGPAT6* na parametry mléčné užitkovosti během 1. a 2. laktace

Genotyp <i>AGPAT6</i>	n	Délka laktace		Dojivost (kg)		Tuk (%)		Tuk (kg)		Bílkoviny (%)		Bílkoviny (kg)	
		\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x
1. laktace													
<i>CC</i>	267	295	15	6828	1104	4,14	0,31	282	44	3,59	0,17	245	39
<i>CT</i>	87	295	14	6872	1066	4,14	0,33	285	50	3,58	0,18	246	38
<i>TT</i>	12	298	13	7027	1333	4,12	0,38	290	62	3,66	0,22	257	48
Celkem	366	295	15	6845	1100	4,14	0,32	283	46	3,59	0,17	245	39
<i>p</i>		0,7128		0,8008		0,9643		0,7400		0,3390		0,5827	
2. laktace													
<i>CC</i>	243	293	16	7638	1254	4,10	0,34	312	51	3,57	0,18	272	43
<i>CT</i>	81	293	16	7572	1179	4,11	0,33	310	49	3,58	0,19	270	39
<i>TT</i>	11	300	7	7512	938	4,04	0,36	304	52	3,59	0,18	270	38
Celkem	335	294	16	7618	1225	4,10	0,34	312	50	3,58	0,18	272	42
<i>p</i>		0,4141		0,8775		0,8117		0,8462		0,9338		0,9256	

n = počet dojnic; \bar{x} = průměr; s_x = směrodatná odchylka; *p* = hladina významnosti

4.2.2 Analýza mléčné užitkovosti v závislosti na polymorfismu genu *LEP*

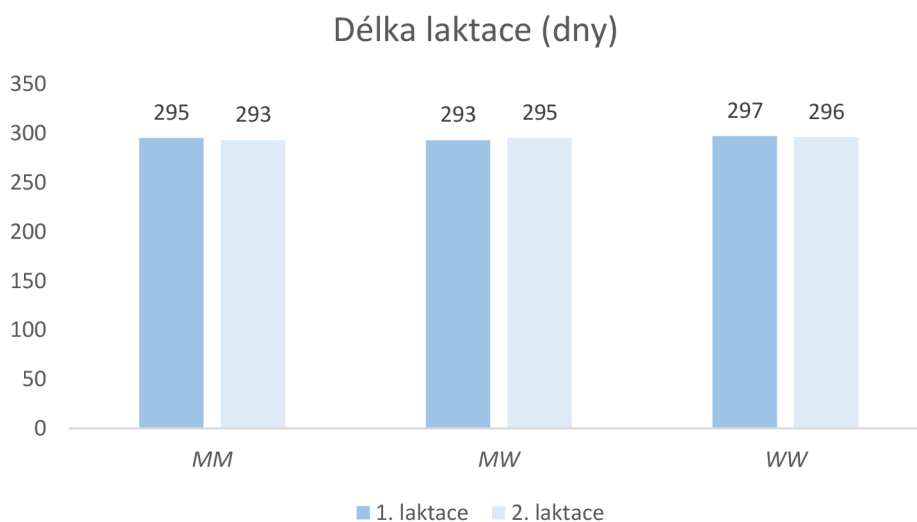
Leptin má v těle skotu za úkol regulovat obsah tuku. Gen kódující *LEP* je potenciální kandidátní gen pro regulaci poměru tukové tkáně a libové svaloviny u skotu. Genotyp *LEP* může mít také vliv na zastoupení monoenoových nenasycených MK, kyseliny stearové, olejové a myristoolejové (Orrù et al., 2011).

Byl pozorován polymorfismus genu pro leptin a jeho závislost na mléčnou užitkovost. V 1. laktaci bylo z celého stáda zapojeno do tohoto pozorování 320 dojnic a v průběhu 2. laktace 292 dojnic (viz tabulka 4.6).

U dojnic s genotypem *MW* trvala 1. laktace 293 dní a u dojnic s genotypem *MM* 295 dní. Nejdelší (297 dnů) 1. laktaci měly dojnice s genotypem *WW*.

Dojnice s genotypem *WW* měly také nejdelší 2. laktaci ze všech genotypů (296 dnů). Jediný genotyp *WW* se nacházel v obou laktacích nad celkovým průměrem 295 dní (viz graf 4.15).

Autoři Kala et al. (2017) dospěli k odlišným výsledkům. Studovali dojnice českého strakatého a holštýnského plemene a kříženky, ale délka laktace (295 dnů) byla nejdelší u dojnic s genotypem *MM*. Naopak dojnice s genotypem *WW* měly laktaci nejkratší (284 dnů). Možná právě odlišnost plemen v délce laktace zde hrála roli.



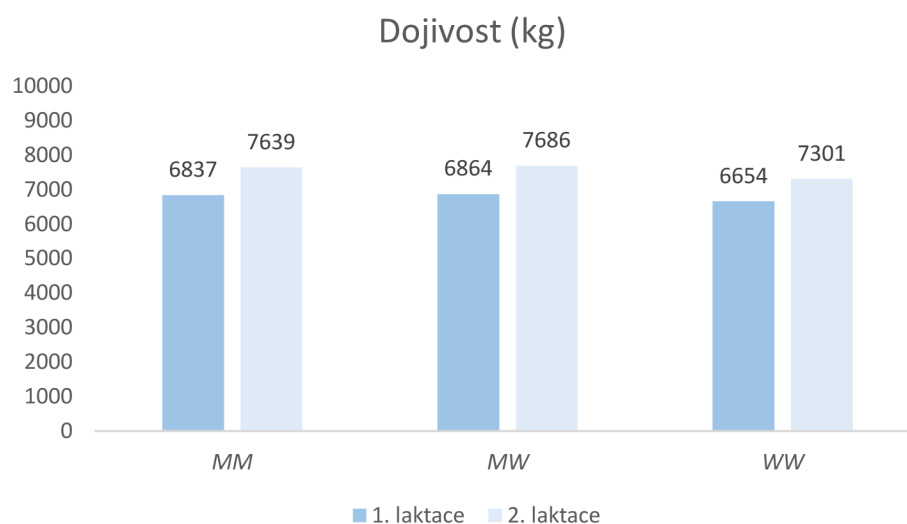
Graf 4.15: Délka 1. a 2. laktace (den) v závislosti na polymorfismu pro gen *LEP*

Dalším pozorovaným parametrem byla dojivost, která byla vyšší během 2. laktace pro všechny genotypy. V období 1. laktace byla průměrná dojivost pro genotyp *MM*

6837 kg a *MW* 6864 kg, tedy velmi obdobná. Rozdíl byl pouze 27 kg (relativní procento snížení 0,39 %). Genotyp *WW* vykazoval nejnižší dojivost a v porovnání s genotypem *MW* činil rozdíl 210 kg (3,06 %).

V období 2. laktace (opět s nepatrným rozdílem) byla dojivost pro genotyp *MW* nejvyšší. Genotyp *MM* oproti genotypu *MW* vykazoval nižší dojivost o 47 kg. Propad je opět vidět u genotypu *WW* s nádojem 7301 kg a rozdílem 385 kg oproti genotypu *MW*. Celkově lze tedy říci, že v obou pozorovaných laktacích byla prokázána nejvyšší dojivost u genotypu *MW* (viz graf 4.16).

Kala et al. (2017) také pozorovali dojivost u dojnic českého strakatého a holštýnského plemene a kříženek, ale jako příznivý zjistili genotyp *MM* s nejvyšším nádojem 7989 kg. Opět nejnižší dojivost byla pozorována u genotypu *WW*. Naopak Kulig et al. (2009) zjistili u dojnic plemene Jersey také nejvyšší dojivost za laktaci u genotypu *MW* 4589 kg, stejně tak jako v této diplomové práci.

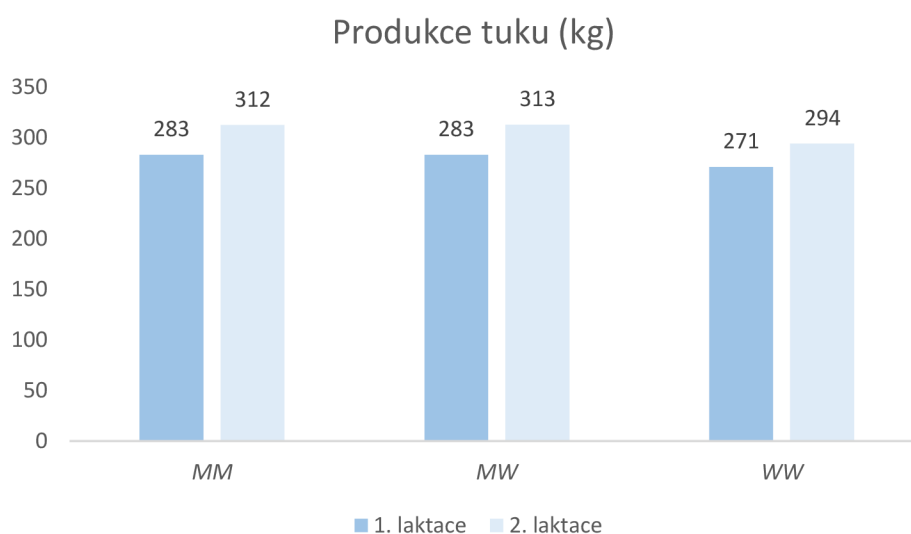


Graf 4.16: Dojivost (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *LEP*

Za období 1. laktace byla produkce tuku pro genotyp *MM* a *MW* stejná (283 kg). Jak lze z grafu 4.17 vyčíst, u genotypu *WW* byla naměřena o 12 kg (tj. o -4,24 %) nižší produkce tuku.

V období 2. laktace vykazovala produkce tuku stejný trend jako při 1. laktaci. Téměř stejné množství mléčného tuku bylo zjištěno jak pro genotyp *MW*, tak pro genotyp *MM*, kde byl rozdíl pouze 1 kg. Pro genotyp *WW* byla zjištěna produkce mléčného tuku o 19 kg (tj. o 6,07 %) nižší oproti genotypu *MW*. Jak genotyp *MM*, tak *MW* vykazovaly rovnocennou produkci mléčného tuku.

Kulig et al. (2009) naměřili u genotypů *MM*, *MW* a *WW* ve stejném pořadí, tedy 257 kg, 262 kg a 247 kg tuku. I když pozorovali dojnice plemene Jersey, statisticky významný rozdíl byl pozorován pouze u genotypu *WW*, stejně jako v této diplomové práci. Mnohem vyšší produkci tuku během celé laktace zjistili Kala et al. (2017) u genotypu *MM* (327,9 kg), což bylo pravděpodobně způsobeno sledovanou skupinou dojnic, kde kromě českého strakatého skotu byly i dojnice holštýnského plemene s vyšší užitkovostí za laktaci. Opět nejnižší produkci tuku (311,2 kg) zjistili autoři u dojnic s genotypem *WW*.



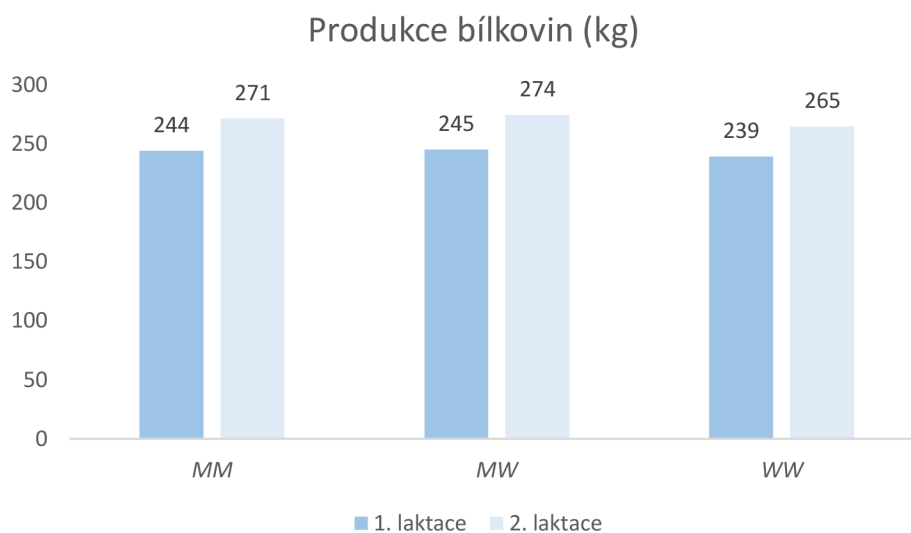
Graf 4.17: Produkce tuku (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *LEP*

V produkci bílkovin byly všechny genotypy v období 1. laktace víceméně rovnocenné. Genotyp *MM* vykazoval nižší hodnoty (pouze o 1 kg) oproti genotypu *MW* a genotyp *WW* o 6 kg oproti genotypu *MW*.

Velmi podobných výsledků, avšak v průměru s vyššími hodnotami, bylo dosaženo v produkci bílkovin v období 2. laktace. Produkce bílkovin byla u homozygotních genotypů *MM* a *WW* ve stejném pořadí 271 kg a 265 kg, tj. o 3 kg resp. o 9 kg méně oproti heterozygotnímu genotypu *MW*. Opět, stejně jako u pozorovaných parametrů dojivosti a produkce mléčného tuku, byla prokázána vyšší produkce bílkovin u genotypů *MM* a *MW* během obou laktací, s nepatrnou převahou heterozygotního genotypu *MW* (viz graf 4.18).

Kulig et al. (2009) naměřili produkci bílkovin 181 kg u genotypů *MM* i *MW* a u genotypu *WW* 173 kg. Pozorovali dojnice plemene Jersey, proto zjistili nižší

hodnoty tohoto ukazatele. Hlavní informací je, že u genotypu *WW* také naměřili nejnižší produkci bílkovin, stejně jako v této diplomové práci. Vliv polymorfismu *LEP* na obsah bílkovin pozorovali též Kala et al. (2017). V této studii byla nejvyšší produkce bílkovin (272,7 kg) u genotypu *MM*. Autoři ve své práci prokázali vliv tohoto polymorfismu na produkci bílkovin, protože rozdíly v obsazích bílkovin mezi genotypy byly statisticky významné ($p < 0,05$). Důvody lze spatřovat, jak už bylo uvedeno výše, v odlišné skladbě plemen.

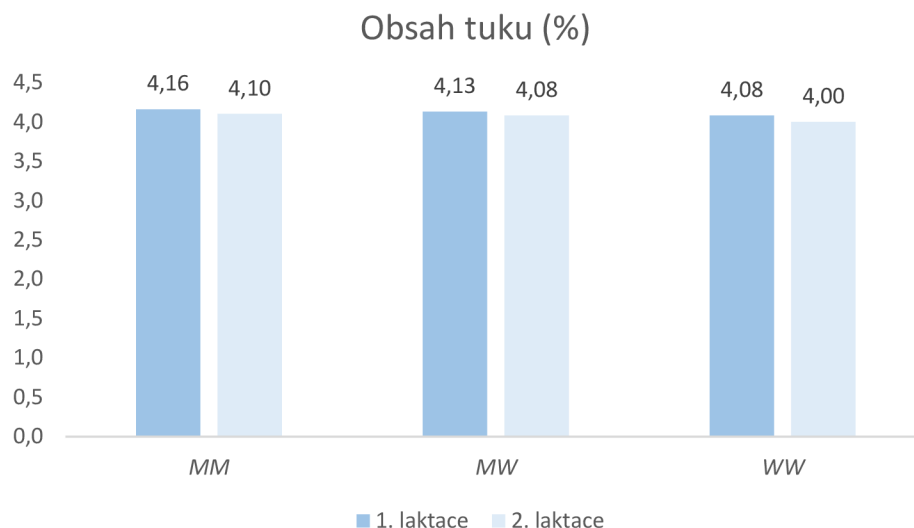


Graf 4.18: Produkce bílkovin (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *LEP*

Mléčný tuk, jakožto další parametr mléčné užitkovosti, byl nejvyšší u genotypu *MM* (4,16 %). Genotyp *MW* pak vykazoval obsah tuku 4,13 % a genotyp *WW* 4,08 %. Zajímavostí je celkově vyšší obsah mléčného tuku ve všech genotypech v období 1. laktace, ale tato skutečnost koresponduje s nižší produkcí mléka (dojivostí) za laktaci.

Stejný trend byl pozorován i během 2. laktace. Obsah tuku u dojnic s genotypem *WW* byl nejnižší, tj. 4 %. Naopak nejvyšší obsah tuku (4,1 %) vykazoval genotyp *MM*. Velmi nepatrný rozdíl 0,02 % byl zjištěn u heterozygotního genotypu *MW*. Genotyp *MM* vykazoval nejvyšší obsah mléčného tuku v obou laktacích (graf 4.19).

Kulig et al. (2009) pozorovali dojnice plemene Jersey. Nejvyšší procento tuku bylo naměřeno u genotypu *MW* (5,74 %). Homozygotní genotypy *MM* a *WW* vykazovaly 5,64 % a 5,62 % tuku. Celkově vyšší naměřená hodnota je připisována odlišnosti plemene, ale i tito autoři (stejně jako v této diplomové práci) neprokázali v obsahu tuku v mléce statistický významný rozdíl mezi genotypy.

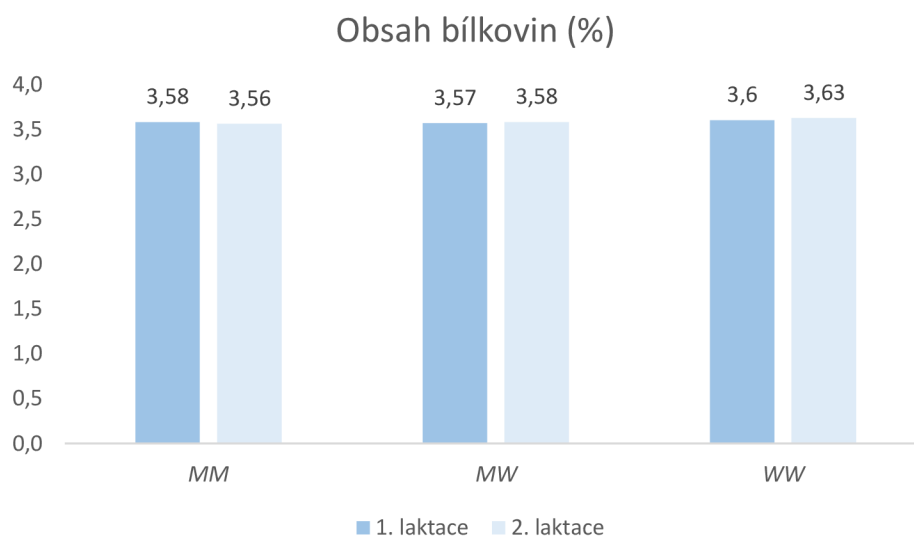


Graf 4.19: Obsah tuku (%) na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *LEP*

Obsah bílkovin byl v průběhu 1. laktace nejvyšší (3,6 %) u dojnic s genotypem *WW* a stejně tomu bylo i u 2. laktace (3,63 %). U dojnic genotypu *MW*, resp. *MM* byl zjištěn obsah bílkovin 3,58 %, resp. 3,56 %, tj. o 0,05 %, resp. o 0,07 % méně oproti homozygotnímu genotypu *WW*.

Zajímavý je opačný trend u genotypu *MM*, kde během 2. laktace byl naměřen nižší obsah bílkovin oproti 1. laktaci. Obsah bílkovin byl celkově nejpříznivější u genotypu *WW*, a to jak v období 1., tak 2. laktace (viz graf 4.20).

Hodnoty statistické významnosti ($p > 0,05$) u všech parametrů mléčné užitkovosti dokládají, že ani u tohoto genu nebyly potvrzeny mezi genotypy statisticky významné rozdíly.



Graf 4.20: Obsah bílkovin (%) na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen *LEP*

Tabulka 4.6: Vliv genotypu *LEP* na parametry mléčné užitkovosti během 1. a 2. laktace

Genotyp <i>LEP</i>	n	Délka laktace		Dojivost (kg)		Tuk (%)		Tuk (kg)		Bílkoviny (%)		Bílkoviny (kg)	
		\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x	\bar{x}	s_x
1. laktace													
<i>MM</i>	240	295	14,81	6837	1138,57	4,16	0,31	283	47,1	3,58	0,18	244	40,23
<i>MW</i>	68	293	14,86	6864	955,21	4,13	0,35	283	42,93	3,57	0,18	245	33,45
<i>WW</i>	12	297	15,9	6654	841,14	4,08	0,15	271	32,6	3,6	0,19	239	27,39
Celkem	320	295	14,86	6836	1090,27	4,15	0,31	283	45,73	3,58	0,18	244	38,4
<i>p</i>		0,3651		0,8270		0,6419		0,6685		0,8921		0,8785	
2. laktace													
<i>MM</i>	224	293	16,38	7639	1260,16	4,1	0,34	312	51	3,56	0,18	271	42,78
<i>MW</i>	60	295	15,19	7686	1147,91	4,08	0,34	313	50,98	3,58	0,19	274	40,34
<i>WW</i>	8	296	15,38	7301	1444,07	4	0,34	294	69,19	3,63	0,18	265	52,89
Celkem	292	294	16,09	7639	1240,1	4,1	0,34	312	51,43	3,57	0,18	272	42,46
<i>p</i>		0,6271		0,7129		0,6191		0,6063		0,5312		0,7879	

n = počet dojnic; \bar{x} = průměr; s_x = směrodatná odchylka; *p* = hladina významnosti

4.3 Asociační analýza zastoupení vybraných MK a jejich skupin u dojnic českého strakatého plemene a jejich kříženek v den odběru

Údaje o celodenní mléčné užitkovosti v den odběru jsou zaznamenány v tabulkách 3.4 a 4.7, kde jsou uvedeny některé ukazatele dle genotypů. S ohledem na cíl diplomové práce bude nadále komentováno pouze zastoupení MK.

V žádném z chovů nebyly dojnice pasené ani přikrmované čerstvou pící. Tomuto faktu odpovídají i hodnoty UFA, které jsou nižší, než hodnoty uváděné autory Frelich et al. (2009), Littlejohn et al. (2014) a Avondo et al. (2019) pro pasoucí se dojnice. V souladu s literárními zdroji Pešek et al. (2011) a Hanuš et al. (2018) vykazovaly SFA nižší variabilitu než UFA.

4.3.1 Analýza zastoupení vybraných MK a jejich skupin v den odběru mléka v závislosti na polymorfismu genu *AGPAT6*

Údaje o zastoupení vybraných MK a jejich skupin v závislosti na genotypech jsou uvedeny v tabulce 4.7. Většina studií, která byla na toto téma publikována, se zaměřovala na známější polymorfismy genů, než je právě polymorfismus pro *AGPAT6* (viz kapitola 1.3). Z tohoto důvodu je většina MK diskutována pouze s prací Littlejohn et al. (2014).

Kyselina máselná (C4:0) je zastoupena v genotypech *CC*, *CT* a *TT* v následujících hodnotách: 2,16 %, 1,89 % a 2,54 %. Množství kyseliny máselné se u jednotlivých genotypů statisticky významně liší na hladině významnosti $p < 0,001$. Dále byl potvrzen vliv genotypu na zastoupení kyseliny kapronové (C6:0). Zastoupení kyseliny kapronové se ve všech třech genotypech *CC* (1,88 %), *CT* (1,75 %) a *TT* (2,13 %) významně lišilo na hladině významnosti $p < 0,01$. Zastoupení kyseliny kaprylové (C8:0) se statisticky významně lišilo pouze u genotypu *TT* na hladině významnosti $p < 0,01$. Rovněž zastoupení konjugované kyseliny linolové (rumenové) (C18:2 *cis*-9, *trans*-11) se v genotypech *CC* (0,43 %), *CT* (0,46 %) a *TT* (0,37 %) významně lišilo a vliv polymorfismu genu *AGPAT6* byl statisticky významný ($p < 0,05$).

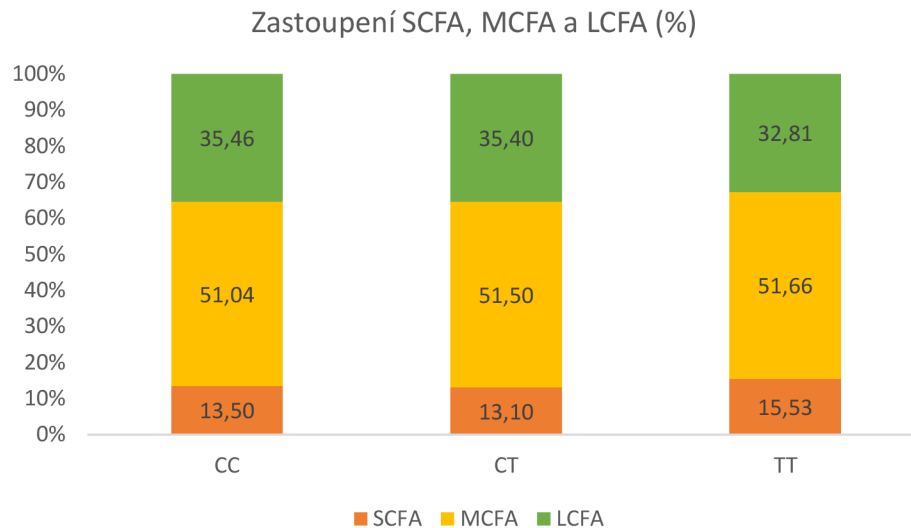
Kyselina palmitová (C16:0) by měla být z hlediska nutričního ve stravě snižována (Haug et al., 2007). V mléčném tuku však je zastoupena s nejvyšším podílem, což se potvrdilo i v této práci. Vykazovala ve všech genotypech *CC* (31,92 %): *CT* (32,00 %): *TT* (31,89 %) velmi podobná zastoupení. Vliv polymorfismu na zastoupení kyseliny palmitové byl statisticky nevýznamný. Shodně s výsledky v této diplomové práci byla

naměřena nejnižší hodnota kyseliny palmitové u dojnic s genotypem *TT* i autory Littlejohn et al. (2014). Ti naopak u křížence plemen Holštýnsko-fríský a Jersey zjistili statisticky významný ($p < 0,001$) vliv polymorfismu na zastoupení kyseliny palmitové, přičemž nejvyšší hodnota (29,63 %) byla zjištěna u genotypu *CC*.

Skupina SFA byla nejvíce zastoupena v mléčném tuku dojnic s genotypem *TT* a hodnotou 69,67 %. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo u dojnic s genotypem *CT* a *CC*. U genotypu *CT* bylo zastoupení SFA 68,50 % a u genotypu *CC* o 0,09 % nižší, tj. 68,41 %. Vliv genotypu na zastoupení SFA nebyl významný ($p > 0,05$). Littlejohn et al. (2014) zjistili statisticky významné ($p < 0,001$) rozdíly v obsazích SFA (69,86 % u *TT*, 70,30 % u *TC* a 70,74 % u *CC*).

Pro SCFA vykazoval genotyp *TT* zastoupení 15,53 %, genotyp *CC* pak 13,50 % a genotyp *CT* pak o 0,40 % méně. U této skupiny MK byly v závislosti na genotypu prokázány statisticky významné rozdíly v zastoupení. Zastoupení SCFA se však statisticky významně lišilo pouze u genotypu *TT* na hladině významnosti $p < 0,01$. Statistická významnost zjištěná pro tuto skupinu byla ovlivněna statisticky významnými rozdíly MK s krátkým uhlíkovým řetězcem (C4–C8).

Pro MCFA byla nejvyšší hodnota (51,66 %) naměřena u genotypu *TT*. U dojnic s genotypem *CT* byla zjištěna hodnota 51,50 % a pro genotyp *CC* 51,04 %. Opačný trend byl prokázán v zastoupení LCFA. Genotyp *CC* vykazoval průměrné zastoupení 35,46 %, genotyp *CT* pak 35,40 % a genotyp *TT* 32,81 %. Polymorfismus genu *AGPAT6* nebyl v případě MCFA ani LCFA prokázán. Zastoupení SCFA, MCFA a LCFA je rovněž znázorněno v grafu 4.21.



Graf 4.21: Zastoupení SCFA, MCFA a LCFA (%) v den odběru v závislosti na polymorfismu genu *AGPAT6*

Homozygotní genotyp *CC* vykazoval zastoupení MUFA 23,75 %. O 0,25 % nižší bylo zastoupení MUFA u genotypu *CT*, tj. 23,50 %. U genotypu *TT* bylo naměřeno 22,31 %.

Pro genotyp *CT* byla hodnota TFA 2,34 %, pro genotyp *TT* 2,31 % a pro genotyp *CC* 2,23 %. Vliv genotypu na zastoupení TFA byl statisticky nevýznamný.

Zastoupení PUFA bylo u genotypů *CC*, *CT*, *TT* následující: 3,13 %, 3,11 %, 3,09 %. Littlejohn et al. (2014) naměřili zastoupení PUFA 4,13 % u genotypu *CC*, 4,20 % u genotypu *CT* a 4,27 % u genotypu *TT*. Rozdíly v obsazích byly statisticky významné ($p < 0,01$). Ve studii byl tedy potvrzen vliv genotypu, na rozdíl od výsledků v diplomové práci, kde nebyl vliv genotypu na zastoupení PUFA prokázán.

U dojnic s genotypem *TT* byla v den odběru zjištěna hodnota UFA 28,21 %. O 1,01 % více byla pak hodnota pro genotyp *CT* (29,22 %) a nejvyšší hodnota (29,38 %) byla naměřena u dojnic s genotypem *CC*. Nebyl prokázán vliv polymorfismu genu pro *AGPAT6* na zastoupení UFA. Opačný trend pozorovali Littlejohn et al. (2014), kteří naměřili 30,14 % pro genotyp *TT*, 29,70 % pro genotyp *TC* a 29,26 % pro genotyp *CC*. Autoři došli k závěru, že genotypy mají statisticky významný vliv na zastoupení UFA ($p < 0,001$).

Tabulka 4.7: Vliv polymorfismu genu *AGPAT6* na ukazatele kvality mléka a zastoupení vybraných mastných kyselin a jejich skupin

Proměnná	CC		CT		TT		p
	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	\bar{x}	S _x	
Charakteristika dojnic (n = 253)							
Pořadí aktuální laktace	1,2	0,4	1,2	0,6	1,4	0,5	0,6004
Laktační den	157	92	191	107	189	102	0,1122
Celodenní dojvost (kg)	22,6	5,6	20,8	5,9	21,5	5,3	0,1217
Ukazatele kvality mléka (n = 237)							
Tuk (%)	4,38	0,77	4,36	0,80	4,86	0,53	0,2568
Bílkoviny (%)	3,59 ^a	0,37	3,71 ^b	0,27	3,77 ^{ab}	0,25	0,0230*
Laktóza (%)	5,18	0,17	5,14	0,19	5,15	0,15	0,3055
Zastoupení MK (n = 250)							
C4:0	2,16 ^b	0,58	1,89 ^a	0,49	2,54 ^c	0,56	0,00003***
C6:0	1,88 ^b	0,35	1,75 ^a	0,30	2,13 ^c	0,39	0,0003***
C8:0	1,36 ^a	0,25	1,30 ^a	0,21	1,56 ^b	0,26	0,0026**
C10:0	3,36	0,66	3,36	0,56	3,79	0,58	0,1186
C12:0	3,99	0,82	4,06	0,69	4,56	0,73	0,1173
C16:0	31,92	3,10	32,00	2,57	31,89	3,00	0,9766
C16:1 _{n-7}	1,42	0,26	1,38	0,29	1,54	0,28	0,2310
C18:0	9,16	1,61	9,18	1,52	8,05	1,61	0,1277
C18:1 _{cis-9}	19,10	3,50	18,85	2,83	17,50	2,79	0,3672
C18:1 _{n-7}	0,71	0,19	0,71	0,18	0,69	0,23	0,9456
C18:2 _{n-6}	1,87	0,25	1,82	0,27	1,95	0,14	0,2522
C18:3 _{n-3}	0,37	0,09	0,37	0,08	0,36	0,08	0,8921
C18:2 <i>cis-9, trans-11</i>	0,43 ^{ab}	0,14	0,46 ^b	0,11	0,37 ^a	0,14	0,0380*
Skupiny MK (n = 250)							
SFA	68,41	4,23	68,50	3,48	69,67	4,17	0,6581
MUFA	23,75	3,72	23,50	3,09	22,31	3,04	0,4969
TFA	2,23	0,57	2,34	0,44	2,31	1,01	0,3279
PUFA	3,09	0,39	3,11	0,38	3,13	0,35	0,9352
SCFA	13,50 ^a	2,45	13,10 ^a	2,01	15,53 ^b	2,44	0,0047**
MCFA	51,04	4,02	51,50	3,29	51,66	3,31	0,6766
LCFA	35,46	5,50	35,40	4,27	32,81	5,42	0,2881
UFA	29,38	4,17	29,22	3,43	28,21	3,98	0,6979

^{a, b, c} průměry s odlišnými indexy v řádce se statisticky významně liší; * významné na hladině $p < 0,05$; ** významné na hladině $p < 0,01$; *** významné na hladině $p < 0,001$;

n = počet dojnic; \bar{x} = průměr; s_x = směrodatná odchylka; p = hladina významnosti;

SFA = nasycené MK; MUFA = monoenoové nenasycené MK v *cis* konfiguraci; TFA = *trans* izomery nenasycených MK; PUFA = polyenoové nenasycené MK; SCFA = MK s krátkým uhlíkovým řetězcem; MCFA = MK se středním uhlíkovým řetězcem; LCFA = MK s dlouhým uhlíkovým řetězcem

4.3.2 Analýza zastoupení vybraných MK a jejich skupin v závislosti na polymorfismu genu *LEP*

Většina studií se zaměřuje na známější polymorfismy genů (viz kapitola 1.3). Pro diskuzi tedy existuje jen velmi málo studií zaměřených na vliv polymorfismu genu *LEP* na zastoupení MK, a proto byly hodnoty MK zjištěné v této diplomové práci porovnávány nejen s hodnotami v závislosti na polymorfismu, ale i s hodnotami MK zastoupenými v mléčném tuku dojnic bez ohledu na polymorfismus.

Do analýzy zastoupení jednotlivých MK bylo zapojeno 201 dojnic v den odběru. Mezi genotypy nebyl prokázán statisticky významný vliv na zastoupení jednotlivých MK. Hladina významnosti je u všech MK $p > 0,05$.

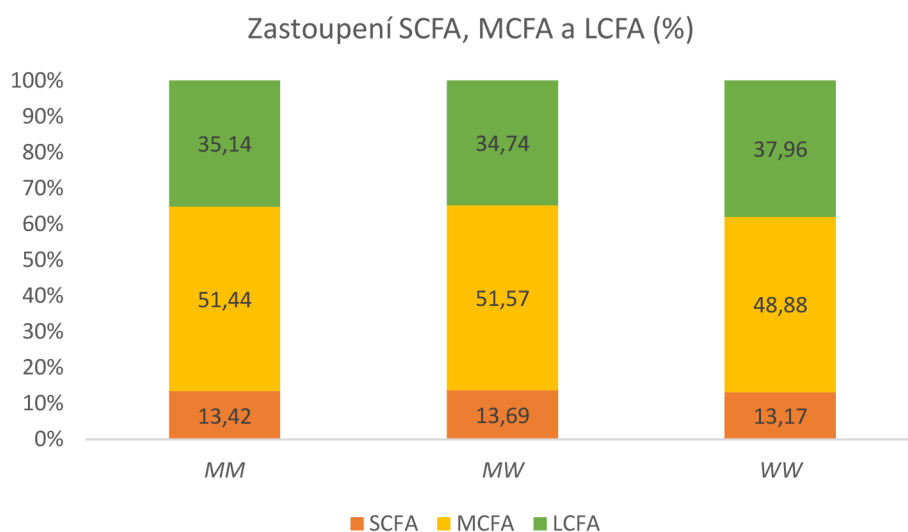
V této diplomové práci byl zjištěn průměr kyseliny α -linolenové (C18:3n-3) 0,36 %. Rozdíly v genotypech zjištěny nebyly (0,37 %: 0,36 %: 0,35 %) (viz tabulka 4.8). Kyselina α -linolenová by měla být zastoupena v mléčném tuku skotu v rozmezí 0,7–1,6 % (Collomb et al., 2004). Hodnoty zjištěné v této diplomové práci byly výrazně pod tímto průměrem. V práci Collomb et al. (2004) však byly pozorovány dojnice krmené řepkovými, lněnými a slunečnicovými semeny.

Kyselina stearová by obecně měla být v mléčném tuku skotu zastoupena v 9–14 % (Samková et al., 2008b), což odpovídá naměřeným průměrům v této diplomové práci. Zastoupení kyseliny stearové (C18:0) bylo nejnižší (9,06 %) pro genotyp *MW*, nejvyšší pro genotyp *WW* (10,30 %).

Zastoupení SFA by mělo být s ohledem na lidské zdraví ve stravě snižováno (Haug et al., 2007). Ve sledované práci měly dojnice s genotypem *WW* v den odběru SFA 67,16 %, o něco více pak genotyp *MM* (68,75 %) a nejvyšší hodnota SFA (69,05 %) byla naměřena u dojnic s genotypem *MW*. Stejně jako v této diplomové práci, tak i Pegolo et al. (2016) neprokázali statisticky významný vliv genotypu na SFA.

SCFA byly zastoupeny u genotypů *MW*: *MM*: *WW* v poměru 13,69 %: 13,42 %: 13,17 %. MCFA byly taktéž analyzovány s nejvyšší hodnotou 51,57 % u genotypu *MW*. O 0,13 % nižší zastoupení MCFA bylo naměřeno u genotypu *MM*. Genotyp *WW* byl charakterizován hodnotou MCFA 48,88 %. Pro genotyp *WW* byla tedy ve všech těchto skupinách MK naměřena nejnižší hodnota. Naopak nejvyšší zastoupení LCFA (37,96 %) bylo zjištěno u genotypu *WW*. U dojnic s genotypem *MM* a *MW* byly zjištěny hodnoty 35,14 % a 34,74 %. Rozdíly v zastoupení LCFA mezi genotypy byly nevýznamné, stejně tak jako u SCFA i MCFA. Pegolo et al. (2016) také pozorovali

hodnoty MK v závislosti na polymorfismu pro *LEP*. Stejně jako v této diplomové práci neprokázali statisticky významné rozdíly mezi genotypy v zastoupení SCFA a LCFA. Poměrné zastoupení SCFA, MCFA a LCFA je znázorněno v grafu 4.22.



Graf 4.22: Zastoupení SCFA, MCFA a LCFA (%) v den odběru v závislosti na polymorfismu genu *LEP*

Zastoupení MUFA bylo obdobné u všech genotypů. Nejvyšší zastoupení MUFA bylo zjištěno u genotypu *WW*, a to 24,50 %. Genotyp *MM* vykazoval hodnotu 23,29 % a genotyp *MW* o 0,26 % nižší. MUFA tvoří v mléčném tuku 26–42 % (Samková et al., 2008b). Hodnoty MUFA naměřené v této diplomové práci jsou pod tímto průměrem.

Jak již bylo zmíněno výše, TFA zvyšují hladinu cholesterolu v krvi a tato vysoká hladina cholesterolu je rizikovým faktorem kardiovaskulárních onemocnění (CVD) (Haug et al., 2007). Nejvyšší hladina TFA byla naměřena u genotypu *WW* s hodnotou 2,47 %. Pro genotyp *MM* byla průměrná hodnota 2,31 % a pro genotyp *MW* činila tato hodnota 2,25 %. Vliv genotypu na zastoupení TFA nebyl statisticky významný.

Stejný trend jako u TFA vykazovalo i zastoupení PUFA, kdy opět nejvyšší hodnoty připadaly genotypu *WW*, a to 3,25 %. Nižší zastoupení bylo zjištěno pro genotyp *MM* s hodnotou 3,13 % a nejnižší hodnota (3,08 %) připadala na genotyp *MW*. Vliv genotypu na zastoupení PUFA nebyl statisticky významný. Ke stejnému závěru došli i Pegolo et al. (2016), a to u zastoupení MUFA i PUFA. V jejich práci však není uvedené zastoupení MK u jednotlivých genotypů.

Poslední sledovanou skupinou MK v závislosti polymorfismu genu pro *LEP* byla skupina UFA. Opět byla u genotypu *WW* naměřena nejvyšší hodnota (30,50 %). Genotypy *MM* a *MW* pak vykazovaly zastoupení 29,02 % a 28,69 %.

Tabulka 4.8: Vliv polymorfismu genu *LEP* na ukazatele kvality mléka a zastoupení vybraných mastných kyselin a jejich skupin

Proměnná	MM		MW		WW		p
	\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x	\bar{x}	s _x	
Charakteristika dojnic (n = 205)							
Pořadí aktuální laktace	1,2	0,6	1,3	0,6	1,6	1,2	0,0852
Laktační den	172	92	171	86	119	114	0,2810
Celodenní dojivost (kg)	22,4	5,2	22,0	5,3	22,1	4,0	0,8971
Ukazatele kvality mléka (n = 196)							
Tuk (%)	4,38	0,68	4,39	0,83	4,01	0,65	0,3561
Bílkoviny (%)	3,65	0,28	3,72	0,30	3,63	0,34	0,3372
Laktóza (%)	5,16	0,19	5,13	0,19	5,16	0,18	0,7637
Zastoupení MK (n = 201)							
C4:0	2,00	0,55	2,06	0,50	1,95	0,37	0,7858
C6:0	1,83	0,32	1,85	0,33	1,79	0,28	0,8375
C8:0	1,34	0,22	1,37	0,25	1,33	0,25	0,7289
C10:0	3,40	0,58	3,47	0,66	3,36	0,79	0,8106
C12:0	4,08	0,73	4,16	0,84	4,00	0,97	0,7893
C16:0	32,06	2,68	32,28	2,81	30,38	1,17	0,2205
C16:1n-7	1,37	0,28	1,35	0,27	1,26	0,28	0,5218
C18:0	9,13	1,64	9,06	1,62	10,30	1,79	0,1691
C18:1cis-9	18,65	2,95	18,51	2,77	20,05	3,39	0,4314
C18:1n-7	0,71	0,18	0,66	0,18	0,67	0,33	0,3990
C18:2n-6	1,87	0,27	1,84	0,24	1,94	0,23	0,6550
C18:3n-3	0,37	0,09	0,35	0,06	0,36	0,10	0,2993
C18:2 cis-9, trans-11	0,45	0,13	0,44	0,13	0,48	0,12	0,8158
Skupiny MK (n = 201)							
SFA	68,75	3,69	69,05	3,42	67,16	3,64	0,4441
MUFA	23,29	3,17	23,06	2,92	24,50	3,63	0,5293
TFA	2,31	0,54	2,25	0,51	2,47	0,40	0,5621
PUFA	3,13	0,40	3,08	0,35	3,25	0,30	0,4938
SCFA	13,42	2,14	13,69	2,43	13,17	2,62	0,7342
MCFA	51,44	3,49	51,57	3,34	48,88	2,48	0,1450
LCFA	35,14	4,76	34,74	4,56	37,96	4,62	0,2485
UFA	29,02	3,63	28,69	3,35	30,50	3,67	0,4612

n = počet dojnic; \bar{x} = průměr; s_x = směrodatná odchylka; p = hladina významnosti;

SFA = nasycené MK; MUFA = monoenové nenasyčené MK v *cis* konfiguraci; TFA = *trans* izomery nenasyčených MK; PUFA = polyenové nenasyčené MK; SCFA = MK s krátkým uhlíkovým řetězcem; MCFA = MK se středním uhlíkovým řetězcem; LCFA = MK s dlouhým uhlíkovým řetězcem

Závěr

Cílem diplomové práce bylo stanovit genotypy polymorfních variant kandidátních lokusů vybraných enzymů u dojnic a vyhodnotit vliv těchto polymorfních variant. Byly vybrány gen pro leptin (*LEP*) a gen pro 1-acylglycerol-3-fosfát O-acyltransferázu 6 (*AGPAT6*). Nejprve byly zjištěny genotypové a alelové četnosti a poté byla provedena asociační analýza ve vztahu k mléčné užitkovosti. Na závěr bylo analyzováno zastoupení mastných kyselin v mléčném tuku dojnic.

U polymorfismu *AGPAT6* bylo zjištěna převaha genotypu *CT*. Nebyl prokázán vliv polymorfismu *AGPAT6* na parametry mléčné užitkovosti během 1. a 2. laktace, byl však prokázán statisticky významný vliv polymorfismu *AGPAT6* na zastoupení kyseliny máselné, kapronové, kaprylové a konjugované kyseliny linolové. Dále byl potvrzen vyšší procentuální obsah mléčného tuku a bílkovin, stejně tak i vyšší zastoupení skupiny SCFA u genotypu *TT*. Tato studie potvrzuje statisticky významný vliv sledovaného lokusu genu *AGPAT6* na složení mléka a na ukazatele kvality mléčného tuku.

V závislosti na genu *LEP* nebyly mezi genotypy zjištěny statisticky významné rozdíly. Nebyl tedy prokázán vliv polymorfismu *LEP* na parametry mléčné užitkovosti během 1. a 2. laktace a ani na zastoupení mastných kyselin nebo jejich skupin. Genotyp *MW* se však ukázal příznivější v procentuálním obsahu tuku a bílkovin a také v zastoupení skupin SCFA a MCFA.

Získané výsledky sledovaných genů *AGPAT6* a *LEP* přispívají ke zlepšení znalostí o možnostech ovlivnění výše mléčné užitkovosti, složení mléka a kvality mléčného tuku.

Seznam použité literatury

1. Akyüz, B. et al. (2015). Effects of DGAT1 and GH1 polymorphism on milk yield in holstein cows reared in Turkey. *Original Scientific Article*, 52(4), 185-191.
 2. Alim, M. A. et al. (2014). Effect of FASN gene on milk yield and milk composition in the Chinese Holstein dairy population. *Animal Genetics*, 45(1), 111-113. <https://doi.org/10.1111/age.12089>
 3. Almeida, S. E. M. et al. (2003). Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 120(2), 106-113. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0388.2003.00377.x>
 4. Avondo, M. et al. (2019). Leptin Gene Polymorphism in Goats Fed with Diet at Different Energy Level: Effects on Feed Intake, Milk Traits, Milk Fatty Acids Composition, and Metabolic State. *Animals*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/ani9070424>
 5. Barłowska, J. et al. (2011). Nutritional Value and Technological Suitability of Milk from Various Animal Species Used for Dairy Production. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10(6), 291-302. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2011.00163.x>
 6. Beigneux, A. P. et al. (2006). Agpat6—a novel lipid biosynthetic gene required for triacylglycerol production in mammary epithelium. *Journal of Lipid Research*, 47(4), 734-744. <https://doi.org/10.1194/jlr.M500556-JLR200>
 7. Bionaz, M. a Loor, J. J. (2008). ACSL1, AGPAT6, FABP3, LPIN1, and SLC27A6 Are the Most Abundant Isoforms in Bovine Mammary Tissue and Their Expression Is Affected by Stage of Lactation. *The Journal of Nutrition*, 138(6), 1019-1024. <https://doi.org/10.1093/jn/138.6.1019>
 8. Bovenhuis, H. et al. (2016). Effects of the diacylglycerol o-acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism on fatty acid, protein, and mineral composition of dairy cattle milk. *Journal of Dairy Science*, 99(4), 3113-3123. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10462>
 9. Bovenhuis, H. et al. (2015). Effects of the DGAT1 polymorphism on test-day milk production traits throughout lactation. *Journal of Dairy Science*, 98(9), 6572-6582. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9564>
 10. Cao, J. et al. (2006). Molecular identification of microsomal acyl-CoA: glycerol-3-phosphate acyltransferase, a key enzyme in de novo triacylglycerol
-

-
- synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(52), 19695-19700. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609140103>
11. Cecchinato, A. et al. (2019). Genetic and genomic analyses of latent variables related to the milk fatty acid profile, milk composition, and udder health in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 102(6), 5254-5265. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15867>
 12. Collomb, M. et al. (2004). Impact of a basal diet of hay and fodder beet supplemented with rapeseed, linseed and sunflowerseed on the fatty acid composition of milk fat. *International Dairy Journal*, 14(6), 549-559. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.11.004>
 13. Conte, G. et al. (2010). Diacylglycerol acyltransferase 1, stearoyl-CoA desaturase 1, and sterol regulatory element binding protein 1 gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Italian Brown cattle. *Journal of Dairy Science*, 93(2), 753-763. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2581>
 14. Demeter, R. M. et al. (2009). Effects of milk fat composition, DGAT1, and SCD1 on fertility traits in Dutch Holstein cattle. *Journal of Dairy Science*, 92(11), 5720-5729. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2069>
 15. Deniz, D. et al. (2020). Determination the effect of CSN1S1, CSN3 and AGPAT6 genes and lactation rank on physicochemical properties of goat milk. *Large Animal Review*, 2020(26), 167-171.
 16. DePeters, E. J. et al. (2001). Fatty Acid and Triglyceride Composition of Milk Fat from Lactating Holstein Cows in Response to Supplemental Canola Oil. *Journal of Dairy Science*, 84(4), 929-936. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74550-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74550-X)
 17. Dewettinck, K. et al. (2008). Nutritional and technological aspects of milk fat globule membrane material. *International Dairy Journal*, 18(5), 436-457. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.10.014>
 18. Dhiman, T. R. et al. (2005). Factors Affecting Conjugated Linoleic Acid Content in Milk and Meat. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(6), 463-482. <https://doi.org/10.1080/10408390591034463>
 19. Di Stasio, L. et al. (2005). Polymorphism of the GHR gene in cattle and relationships with meat production and quality. *Animal Genetics*, 36(2), 138-140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2005.01244.x>
-

-
20. Doležal, O. (2000). *Mléko, dojení, dojírny*. Agrospoj.
 21. Dostálová, J. a Kadlec, P. (2014). *Potravinářské zboží: technologie potravin*. Key Publishing.
 22. Drbohlav, J. a Vodičková, M. (2002). *Tabulky látkového složení mléka a mléčných výrobků* (2., nezměněné vyd). ÚZPI. ISBN 80-7271-005-2.
 23. Duchemin, S. et al. (2013). Genetic correlation between composition of bovine milk fat in winter and summer, and DGAT1 and SCD1 by season interactions. *Journal of Dairy Science*, 96(1), 592-604. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5454>
 24. El-Loly, M. (2011). Composition, properties and nutritional aspects of milk fat globule membrane – a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 61(1), 7-32. <https://doi.org/10.2478/v10222-011-0001-0>
 25. Frelich, J. et al. (2009). Fatty acid composition of cow milk fat produced on low-input mountain farms. *Czech Journal of Animal Science*, 54(12), 532-539. <https://doi.org/10.17221/226/2009-CJAS>
 26. German, J. B. et al. (2009). A reappraisal of the impact of dairy foods and milk fat on cardiovascular disease risk. *European Journal of Nutrition*, 48(4), 191-203. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0002-5>
 27. Gresti, J., et al. (1993). Composition of Molecular Species of Triacylglycerols in Bovine Milk Fat. *Journal of Dairy Science*, 76(7), 1850-1869. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77518-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77518-9)
 28. Grisart, B. et al. (2004). Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(8), 2398-2403. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308518100>
 29. Hanuš, O. et al. (2018). Role of fatty acids in milk fat and the influence of selected factors on their variability – a review. *Molecules*, 23(7). <https://doi.org/10.3390/molecules23071636>
 30. Haug, A. et al. (2007). Bovine milk in human nutrition – a review. *Lipids in Health and Disease*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
 31. He, C. et al. (2011). AGPAT6 polymorphism and its association with milk traits of dairy goats. In *Genetics and Molecular Research* (Vol. 10, pp. 2747-2756). <https://doi.org/10.4238/2011.November.4.8>
-

-
32. Inostroza, K. B. et al. (2013). Stearoyl CoA desaturase and fatty acid synthase gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Chilean Black Friesian cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26, 263-269.
 33. Javanmard, et al. (2010). DNA Polymorphism of Bovine Pituitary-Specific Transcription Factor and Leptin Gene Between Iranian *Bos indicus* and *Bos taurus* Cattle. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(3), 282-285. <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2010.282.285>
 34. Ječmínková, K. et al. (2016). Leptin Promoter Region Genotype Frequencies and Its Variability in the Czech Fleckvieh Cattle. *Scientia Agriculturae Bohemica*, 47(2), 54-59. <https://doi.org/10.1515/sab-2016-0009>
 35. Juhlin, J. et al. (2012). Association of DGAT1 genotype, fatty acid composition, and concentration of copper in milk with spontaneous oxidized flavor. *Journal of Dairy Science*, 95(8), 4610-4617. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4915>
 36. Kala, R. et al. (2017). Association of selected genes with milk fat in two breeds of cattle. *MendelNet*, November(8-9), 696- 701. <https://mendelnet.cz/pdfs/mnt/2017/01/51.pdf>
 37. Kesek, M. et al. (2014). Genetic, physiological and nutritive factors affecting the fatty acid profile in cows' milk - a review. *Animal Science Papers and Reports*, 32(2), 95-105.
 38. Kgwatalala, P. M. et al. (2009). Stearoyl-CoA desaturase 1 genotype and stage of lactation influences milk fatty acid composition of Canadian Holstein cows. *Animal Genetics*, 40(5), 609-615. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01887.x>
 39. Kobayashi, Y. et al. (1999). Reduced Growth Hormone Receptor (GHR) Messenger Ribonucleic Acid in Liver of Periparturient Cattle Is Caused by a Specific Down-Regulation of GHR 1A That Is Associated with Decreased Insulin-Like Growth Factor I*. *Endocrinology*, 140(9), 3947-3954. <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.7000>
 40. Kulig, H. et al. (2009). Effect of Leptin Gene Polymorphisms on Milk Production Traits of Jersey Cows. *TÜBİTAK*, 33(2), 143-146. doi:10.3906/vet-0710-10
 41. Li, C. et al. (2016a). Genetic effects of FASN, PPARGC1A, ABCG2 and IGF1 revealing the association with milk fatty acids in a Chinese Holstein cattle
-

-
- population based on a post genome-wide association study. *BMC Genetics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0418-x>
42. Li, C. et al. (2016b). A post-GWAS confirming the SCD gene associated with milk medium- and long-chain unsaturated fatty acids in Chinese Holstein population. *Animal Genetics*, 47(4), 483-490. <https://doi.org/10.1111/age.12432>
43. Li, X. et al. (2015). Joint genome-wide association study for milk fatty acid traits in Chinese and Danish Holstein populations. *Journal of Dairy Science*, 98(11), 8152-8163. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9383>
44. Liefers, S. C. et al. (2002). Associations between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. *Journal of Dairy Science*, 85(6), 1633-1638. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(02\)74235-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(02)74235-5)
45. Lindmark Månsson, H. (2008). Fatty acids in bovine milk fat, 52(1). <https://doi.org/10.3402/fnr.v52i0.1821>
46. Littlejohn, M. D. et al. (2014). Expression Variants of the Lipogenic AGPAT6 Gene Affect Diverse Milk Composition Phenotypes in *Bos taurus*. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085757>
47. Lu, J. et al. (2015). Effect of the DGAT1 K232A genotype of dairy cows on the milk metabolome and proteome. *Journal of Dairy Science*, 98(5), 3460-3469. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8872>
48. Mao, Y. J. et al. (2012). Effects of SCD1- and DGAT1-genes on production traits of Chinese Holstein cows located in the Delta Region of Yangtze River. *Livestock Science*, 145(1-3), 280-286. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2011.12.019>
49. Mohammed, S. A. et al. (2015). DGAT1 Gene in Dairy Cattle. *Global Journal of Animal Scientific Research*, 3(1), 191-198.
50. Moioli, B. et al. (2007). Short Communication: Effect of Stearoyl-Coenzyme A Desaturase Polymorphism on Fatty Acid Composition of Milk. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3553-3558. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-855>
51. Moody, D. E. et al. (1995). Assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. *Animal Genetics*, 26(5), 341-343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1995.tb02671.x>
-

-
52. Navrátilová, P. et al. (2012). *Hygiena produkce mléka* (1st ed.). Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.
53. Orrù, L. et al. (2011). Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the LEP and SCD1 genes on the fatty acid profile of muscle fat in Simmental bulls. *Meat Science*, 87(4), 344-348. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.009>
54. Pacheco-Pappenheim, S. et al. (2019). The DGAT1 K232A polymorphism and feeding modify milk fat triacylglycerol composition. *Journal of Dairy Science*, 102(8), 6842-6852. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-16554>
55. Peč, P. a Pečová, D. (2001). *Učebnice středoškolské chemie a biochemie*. Nakladatelství Olomouc.
56. Pegolo, S. et al. (2016). Effects of candidate gene polymorphisms on the detailed fatty acids profile determined by gas chromatography in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 99(6), 4558-4573. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10420>
57. Pešek, M. et al. (2011). Fatty acids and composition of their important groups in milk fat of Czech Pied cattle. *Czech Journal of Animal Science*, 51(5), 181-188. <https://doi.org/10.17221/3927-CJAS>
58. Rahmatalla, S. A. et al. (2011). The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle. *Journal of Applied Genetics*, 52(4), 459-465. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0051-3>
59. Roy, R. et al. (2006). Association of polymorphisms in the bovine FASN gene with milk-fat content. *Animal Genetics*, 37(3), 215-218. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01434.x>
60. Roy, R. et al. (2005). Genomic structure and alternative transcript of bovine fatty acid synthase gene (FASN): comparative analysis of the FASN gene between monogastric and ruminant species. *Cytogenetic and Genome Research*, 111(1), 65-73. <https://doi.org/10.1159/000085672>
61. Ruiz-Sala, P., et al. (1996). Triglyceride composition of ewe, cow, and goat milk fat. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(3), 283-293. <https://doi.org/10.1007/BF02523421>
-

-
62. Samková, E. (2012). *Mléko: produkce a kvalita: Milk: production and quality: vědecká monografie*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
63. Samková, E. et al. (2008a). *Mastné kyseliny mléčného tuku skotu a faktory ovlivňující jejich zastoupení: vědecká monografie = Fatty acids of cow milk fat and factors affecting their composition : a review*. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta.
64. Samková, E., et al. (2008b). Vliv mléčného tuku na zdravotní stav konzumentů a možnosti ovlivnění jeho složení v prvovýrobě. In *Výrobní zemědělská praxe a potravinářské biotechnologické úpravy pro zvýraznění pozitivních zdravotních vlivů mléka a mléčných výrobků* (p. 14). KartoTISK, s.r.o., Šumperk.
65. Shi, B. et al. (2019). Variation in the Fatty Acid Synthase Gene (FASN) and Its Association with Milk Traits in Gannan Yaks. *Animals*, 9(9). <https://doi.org/10.3390/ani9090613>
66. Schennink, A. et al. (2009). Effect of polymorphisms in the FASN , OLR1 , PPARGC1A , PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Animal Genetics*, 40(6), 909-916. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01940.x>
67. Schennink, A. et al. (2008). Milk Fatty Acid Unsaturation: Genetic Parameters and Effects of Stearoyl-CoA Desaturase (SCD1) and Acyl CoA. *Journal of Dairy Science*, 91(5), 2135-2143. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0825>
68. Signorelli, F. et al. (2009). Exploring polymorphisms and effects on milk traits of the DGAT1, SCD1 and GHR genes in four cattle breeds. *Livestock Science*, 125(1), 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2009.02.014>
69. Silva, D. B. S. et al. (2014). Genetic variations in the leptin gene associated with growth and carcass traits in Nellore cattle. *Genetics and Molecular Research*, 13(2), 3002-3012. <https://doi.org/10.4238/2014.April.16.9>
70. Suburu, J. et al. (2014). Fatty acid synthase is required for mammary gland development and milk production during lactation. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 306(10), E1132-E1143. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00514.2013>
-

-
71. Taniguchi, M. et al. (2004). Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*, 15(2), 142-148. <https://doi.org/10.1007/s00335-003-2286-8>
72. Taniguchi, Y. et al. (2002). Genomic Structure and Promoter Analysis of the Bovine Leptin Gene. *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, 53(2), 131-135. <https://doi.org/10.1080/15216540211465>
73. Trakovická, A. et al. (2013). Genetic polymorphisms of leptin and leptin receptor genes in relation with production and reproduction traits in cattle. *Acta Biochimica Polonica*, 60(4). https://doi.org/10.18388/abp.2013_2058
74. Tzompa-Sosa, D. A. et al. (2016). Milk fat triacylglycerols and their relations with milk fatty acid composition, DGAT1 K232A polymorphism, and milk production traits. *Journal of Dairy Science*, 99(5), 3624-3631. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-10592>
75. Upadhyay, A. et al. (2019). Detection of Single-Nucleotide Polymorphism in AGPAT6 Gene, Associated with Milk Fat Content, using Tetra-Primer ARMS PCR-Based Assay, in Karan Fries Breeding Bulls. *Iranian Journal of Biotechnology*, 17(4), 78-82. <https://doi.org/doi:10.30498/ijb.2019.102188>
76. Velíšek, J. a Hajšlová, J. (2009). *Chemie potravin (Rozš. a přeprac. 3. vyd)*. OSSIS.
77. Vyas, D. et al. (2013). Milk fat responses to butterfat infusion during conjugated linoleic acid-induced milk fat depression in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 2387-2399. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5861>
78. Winter, A. 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*, 99(14), 9300-9305. <https://doi.org/10.1073/pnas.142293799>
79. Xu, T. L. et al. (2018). Epigenetic mechanisms contribute to decrease stearoyl-CoA desaturase 1 expression in the liver of dairy cows after prolonged feeding of high-concentrate diet. *Journal of Dairy Science*, 101(3), 2506-2518. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12878>
-

Seznam grafů

Graf 4.1: Genotypová frekvence <i>AGPAT6</i> v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu.....	38
Graf 4.2: Alelová frekvence <i>AGPAT6</i> v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu.....	38
Graf 4.3: Genotypová frekvence <i>AGPAT6</i> v rámci sledovaných chovů.....	39
Graf 4.4: Alelová frekvence <i>AGPAT6</i> v rámci sledovaných chovů.....	40
Graf 4.5: Genotypová frekvence <i>LEP</i> v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu.....	42
Graf 4.6: Alelová frekvence <i>LEP</i> v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu.....	42
Graf 4.7: Genotypová frekvence <i>LEP</i> v rámci sledovaných chovů.....	43
Graf 4.8: Alelová frekvence <i>LEP</i> v rámci sledovaných chovů.....	44
Graf 4.9: Délka 1. a 2. laktace (den) v závislosti na polymorfismu pro gen <i>AGPAT6</i>	45
Graf 4.10: Dojivost (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>AGPAT6</i>	46
Graf 4.11: Produkce tuku (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>AGPAT6</i>	47
Graf 4.12: Produkce bílkovin (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>AGPAT6</i>	47
Graf 4.13: Obsah tuku (%) na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>AGPAT6</i>	48
Graf 4.14: Obsah bílkovin (%) na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>AGPAT6</i>	49
Graf 4.15: Délka 1. a 2. laktace (den) v závislosti na polymorfismu pro gen <i>LEP</i> ...	51
Graf 4.16: Dojivost (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>LEP</i>	52
Graf 4.17: Produkce tuku (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>LEP</i>	53
Graf 4.18: Produkce bílkovin (kg) za 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>LEP</i>	54

Graf 4.19: Obsah tuku (%) na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>LEP</i>	55
Graf 4.20: Obsah bílkovin (%) na 1. a 2. laktaci v závislosti na polymorfismu pro gen <i>LEP</i>	55
Graf 4.21: Zastoupení SCFA, MCFA a LCFA (%) v den odběru v závislosti na polymorfismu genu <i>AGPAT6</i>	59
Graf 4.22: Zastoupení SCFA, MCFA a LCFA (%) v den odběru v závislosti na polymorfismu genu <i>LEP</i>	62

Seznam tabulek

Tabulka 1.1: Významné mastné kyseliny mléčného tuku (Samková et al., 2012)	11
Tabulka 1.2: Vybrané polymorfismy s vlivem na znaky mléčné užitkovosti.....	24
Tabulka 3.1: Základní charakteristika chovů a počet sledovaných dojnic.....	26
Tabulka 3.2: Rozložení četností genotypů sledovaných dojnic českého strakatého plemene	26
Tabulka 3.3: Údaje o celé 1. a 2. laktaci získané z databáze plemenic.....	28
Tabulka 3.4: Údaje o celodenní mléčné užitkovosti v den odběru	29
Tabulka 3.5: Složení reakční směsi pro polymorfismus alel v genu <i>AGPAT6</i> (Čítek et al., 2018, Certifikovaná metodika č. 1975).....	31
Tabulka 3.6: Časový program pro PCR pro polymorfismus alel v genu <i>AGPAT6</i> (Čítek et al., 2018, Certifikovaná metodika č. 1975	31
Tabulka 3.7: Složení reakční směsi pro polymorfismus C-T na exonu 3 v genu <i>LEP</i> (Čítek et al., 2018, Certifikovaná metodika č. 1975).....	31
Tabulka 3.8: Časový program pro PCR pro polymorfismus C-T na exonu 3 v genu <i>LEP</i> (Čítek et al., 2018, Certifikovaná metodika č. 1975).....	32
Tabulka 3.9: Parametry chromatografické analýzy	34
Tabulka 4.1: Genotypové a alelové frekvence <i>AGPAT6</i> v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu.....	37
Tabulka 4.2: Genotypové a alelové frekvence <i>AGPAT6</i> v rámci sledovaných chovů	39
Tabulka 4.3: Genotypové a alelové frekvence <i>LEP</i> v rámci jednotlivých populací dojnic českého strakatého skotu.....	41
Tabulka 4.4: Genotypové a alelové frekvence <i>LEP</i> v rámci sledovaných chovů.....	43
Tabulka 4.5: Vliv polymorfismu genu <i>AGPAT6</i> na parametry mléčné užitkovosti během 1. a 2. laktace	50
Tabulka 4.6: Vliv genotypu <i>LEP</i> na parametry mléčné užitkovosti během 1. a 2. laktace	56
Tabulka 4.7: Vliv polymorfismu genu <i>AGPAT6</i> na ukazatele kvality mléka a zastoupení vybraných mastných kyselin a jejich skupin	60
Tabulka 4.8: Vliv polymorfismu genu <i>LEP</i> na ukazatele kvality mléka a zastoupení vybraných mastných kyselin a jejich skupin.....	63

Seznam použitých zkratek

BTA – *Bos taurus* autosome

CPM – celkový počet mikroorganismů

DGAT1 – acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferáza 1

FASN – fatty acid synthase, syntáza MK

GHR – growth hormone receptor, receptor růstového hormonu

HUFA – highly unsaturated fatty acids, nenasycené MK s dlouhým řetězcem

HWE – Hardy-Weinbergova rovnováha

LCFA – long-chain fatty acids, MK s dlouhým řetězcem

LEP – leptin

LDL – low density lipoprotein, lipoprotein s nízkou hustotou

MCFA – medium-chain fatty acids, MK se středně dlouhým řetězcem

MK – mastná kyselina

MUFA – monounsaturated fatty acids, monoenové nenasycené MK

NADPH – nikotin amid adenin dinukleotidfosfát

PSB – počet somatických buněk

PUFA – polyunsaturated fatty acids, polyenové nenasycené MK

QTL – quantitative trait locus, lokalita kvantitativního znaku

RIL – rezidua inhibičních látek

SCFA – short-chain fatty acids, MK s krátkým řetězcem

SFA – saturated fatty acids, nasycené MK

SNP – single nucleotide polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus

SCD1 – stearyl-CoA desaturase 1, stearyl-CoA desaturáza

TAG – triacylglycerol

TFA – *trans* fatty acids, *trans* izomery nenasycené MK

UFA – unsaturated fatty acids, nenasycené MK

UTR – untranslated region, nepřekládaná oblast
