

Zuzana Sztankóová
a kolektiv

VYUŽITÍ POLYMORFISMU GENŮ LIPOGENNÍCH ENZYMŮ PRO ZLEPŠENÍ KVALITATIVNÍCH A TECHNOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ MLÉKA KOZ



ISBN 978-80-7403-216-5

METODIKA

VYUŽITÍ POLYMORFISMU GENŮ LIPOGENNÍCH ENZYMŮ PRO ZLEPŠENÍ KVALITATIVNÍCH VLASTNOSTÍ MLÉKA KOZ

Autoři

Ing. Zuzana Sztankóová, Ph.D.

Ing. Jana Rychtářová, Ph.D.

Ing. Alena Svitáková, Ph.D.

Ing. Markéta Borková, Ph.D.

Oponenti

Ing. Antonín Vejčík, CSc.,

Zemědělská fakulta

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Ing. Zdenka Majzlíková

Česká plemenářská inspekce, Praha

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu QJ 1310107, podporovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV), řešeného v letech 2013-2017

Obsah

I. Cíl metodiky	6
II. Popis metodiky	7
2.1. Úvod	7
2.2. Literární přehled	8
2.3. Lipogenní geny	8
2.4. Variabilita sledovaných genů lipogenních enzymů	10
2.5. Využití informace ve šlechtění	13
2.6. Experimentální část metodiky	14
2.6.1 Materiál a metodika	14
2.6.2. Sledované parametry	14
2.6.3. Detekce genetického polymorfismu	14
2.7. Stanovení mastných kyselin v mléce metodou GC/FID	15
2.8. Statistické vyhodnocování	16
2.9. Výsledky	18
2.9.1. Profil mastných kyselin ve vzorcích kozího mléka	18
2.9.2. Efekt genotypů lipogenních enzymů na parametry mléčné užitkovosti	20
III. Srovnání „novosti postupů“	31
IV. Popis uplatnění metodik	31
V. Ekonomické aspekty	31
VI. Seznam použité literatury	32
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice	34

Poděkování:

Autoři děkují za spolupráci pracovnímu týmu oddělení Genetiky a šlechtění HZ VÚŽV, Výzkumnému ústavu mlékárenskému (VÚM, s.r.o.), Svazu chovatelů ovcí a koz (SCHOK) a spolupracujícím chovatelům kozy bílé a hnědé krátkosrsté.

I. Cíl metodiky

K základním produktům chovu koz patří: mléko, maso, produkce kůží a srsti. V České republice je chov koz zaměřen zejména na produkci mléka a následně pak na výrobu sýrů a mléčných výrobků (kefir, jogurt aj.). V posledních pěti letech v České republice vzniklo na pět desítek malých mlékáren. Přímou na farmách zpracovávají mléko jak drobní zemědělci, kteří mají nízké stavy dojených zvířat, tak i ti větší chovatelé. S rozvojem faremní produkce mléčných produktů se současně otvírají nové oblasti, které vyžadují svojí pozornost. Jednou z nich je dosahování kvalitní, bezpečné a zároveň efektivní produkce mléčných produktů z chovu koz. To je mimo jiné podmíněno základními složkami mléka (bílkoviny, tuk, laktóza) a jeho technologickou kvalitou, které určují ekonomiku výroby. Tyto parametry jsou zásadně ovlivněny jednak geny mléčných bílkovin a jednak geny lipogenních enzymů a jejich vzájemnými interakcemi. Současné výsledky výzkumu nabízí nové možnosti využití této skutečnosti ve šlechtitelských postupech, které mohou zvýšit a zlepšit efektivitu a konkurenceschopnost tohoto alternativního odvětví živočišné výroby.

Cílem metodiky je

- seznámit chovatele s metodou využití genetického polymorfismu vybraných genů lipogenních enzymů u koz pro zlepšení složek bílkovin a tuku a technologických vlastností kozího mléka,
- poskytnout uživatelům konkrétní návod jak při využití této metody postupovat a podpořit tak její uvedení do praxe.

II. Popis metodiky

2. 1. Úvod

Chov koz má v České republice dlouholetou tradici a historii, která sahá až do roku 1900. Od roku 1928 jsou známy celkové výsledky kontroly užitkovosti koz a od roku 1941 byla na základě zákona “ O plemenitbě hospodářských zvířat” zavedena kontrola užitkovosti v Čechách.

Koza bílá a hnědá krátkosrstá jsou domácí plemena s mléčnou užitkovostí, která se podstatnou mírou podílejí na produkci kozího mléka v České republice a zachovávají si své významné postavení přestože dochází k zvyšování stavů specializovaných dojných plemen (koza sánská, anglonubijská ...).

Kozí mléko a výrobky z kozího mléka hrají významnou úlohu ve výživě lidí při příjmu bílkovin živočišného původu a poskytují prospěšnou alternativu kravskému mléku, neboť kozí mléko se vyznačuje svojí specifickou chutí, strukturou a svým naturálním a blahodárným účinkem. Průměrné složení kozího mléka a jeho srovnání s kravským a ovčím mlékem ukazuje tabulka č. 1. Podíl hlavních složek kozího mléka je podmíněn dvěma faktory tj. ne-genetickými tedy enviromentálními a genetickými.

Tab. 1. Průměrné složení mléka vybraných druhů hospodářských zvířat

Druh	Protein (%)	Tuk (%)	Laktóza (%)	Minerální látky (%)	Celková sušina (%)
Koza	3,52	4,25	4,27	0,86	13,00
Ovce	5,81	7,98	4,81	0,90	20,29
Skot	3,50	3,70	4,90	0,70	12,80

(Biadala et al., 2018; Rynal – Ljutovac et al., 2007; Tziboula-Clarke et al., 2003)

Mléčný tuk se vyskytuje ve formě tukových kuliček a je nejvíce proměnlivou složkou mléka. Je syntetizován v sekrečních buňkách mléčné žlázy z glycerolu a mastných kyselin. Mléčný tuk je významným zdrojem esenciálních mastných kyselin jako je kyselina linolová a kyselina α -linolová, pozitivně působící polyenové mastné kyseliny (PUFA) a lipofilních vitaminů. Mléčný tuk se podílí na senzorických a reologických vlastnostech mléka a mléčných výrobků. Typická chuť a vůně kozího mléka je způsobená vyšším podílem kyseliny kaprilové, kaprinové a kapronové (Tab. 2) a přítomnosti enzymu lipoproteinové lipázy.

Tab. 2. Obsah mastných kyselin (%) v rozdílných typech mléka v závislosti na živočišném druhu

Mastná kyselina	Kozy (%)	Ovce (%)	Skot (%)
C _{4:0}	3,6	4,0	3,3
C _{6:0}	2,9	2,6	1,6
C _{8:0}	2,7	2,5	1,3
C _{10:0}	8,4	7,5	3,0
C _{12:0}	3,3	3,7	3,1

(Biadala et al., 2018)

2. 2. Literární přehled

Kvantitativní užitkové vlastnosti koz jsou ovlivňovány faktory prostředí a genetickými faktory, tj. množstvím genů malého účinku tzv. minorgeny. Některé z genů však mohou mít větší vliv, pak se jedná o tzv. kandidátní geny s přímým účinkem na dané znaky (Matejíčková et al., 2010; Moiola et al., 2007). Úsilím vědců je takové geny identifikovat a využít je pro zlepšení mléčných parametrů v chovu koz. Jedním z důležitých mléčných parametrů je obsah a kompozice mléčného tuku. Kompozice mléčného tuku je důležitá vlastnost pro mléčný průmysl, protože má významný vliv na výtěžnost sýra a organoleptické vlastnosti mléčných produktů. Kozí mléko je bohaté na nasycené mastné kyseliny (SFA; 55% z celkových triacylglyceridov) zatímco mononenasyčené mastné kyseliny (MUFA; 29%) a polonenasyčené mastné kyseliny (PUFA; 16%) mají slabé zastoupení. Z těchto důvodů je cílem v mléce koz zvýšit obsah nenasycených mastných kyselin proti SFA, které jsou mimo jiné často spojovány s rozvojem koronárních a aterosklerotických onemocnění u lidí. Obsah tuku a jeho kompozice může být extenzivně modifikovaná genetickými a fyziologickými faktory, ale také faktory výživy (Bernard a kol., 2005; Chilliard a kol., 2003).

2. 3. Lipogenní geny

Acetyl-CoA karboxylasa (ACACA)

Acetyl-CoA karboxyláza - je klíčovým enzymem v regulaci syntézy mastných kyselin v živočišných tkáních, a po dobu laktace je regulován acetyl-CoA karboxyláza- α (ACACA) genem (Barber a Travers 1995, 1998). U koz je situován na chromozomu 19 a doposud bylo popsáno 7 bodových mutací (SNP) (Badaoui et al., 2007, Joezy-Shekalgorabi, S et al., 2015). Výsledky výzkumu dokazují, že gen ACACA u koz významně ovlivňuje obsah tuku a bílkoviny v mléce, stejně tak i celkový nádoj (Signorelli et al., 2008; Crepaldi et al. 2013).

Butyrophilin (BTN1A1)

Butyrophilin BTN1A1 je membránovým proteinem obsaženým v globulích mléčného tuku, kde tvoří více než 40% celkového proteinu membránového komplexu. Významně se

podílí na vzniku, transportu a sekreci jemně dispergovaných kapiček tuku v mléce a pravděpodobně ovlivňuje obsah a složení mléčného tuku. Gen *BTN1A1* je u koz mapován na chromozomu 23 (GenBank XM_001494179). Jeho bílkovinný produkt se skládá z 526 kódujících aminokyselin (GenBank ABN50060.1). V literatuře byla popsána nonsynonymní mutace v exonu 5: CTT (Leu) > TTT (Phe) – aminokyselinová pozice 377 (Qu et al., 2011). Zároveň byl popsán efekt tohoto polymorfismu na základní mléčné ukazatele. Výsledky ukazují, že daná mutace měla průkazný vliv na obsah mléčného tuku, celkovou sušinu a tukuprostou sušinu. Qu et al., 2011, uvádí, že genotyp NN v porovnání s genotypem MM průkazně zvyšuje hodnoty mléčné produkce: tuk (kg), celková sušina (%) a tukuprostá sušina (%).

Lipoproteinová lipáza (LPL)

Lipoproteinová lipáza (LPL) je multifunkční glykoproteinový enzym, situovaný na chromozomu 8, je dlouhý 1437bp a kóduje protein o délce 478aa. LPL je glykoprotein, který hraje významnou roli v metabolismu triglyceridů (TG) (Badaoui et al., 2007). LPL hydrolyzuje triglyceridy obsažené v lipoproteinech, především v chylomikrony (CM) a lipoproteiny o velmi nízké hustotě (VLDL), a tím uvolňuje mastné kyseliny (MK) pro potřeby periferních tkání. To je nezbytný první krok v metabolismu lipoproteinů, které transportují triglyceridy (Olivecrona and Olivecrona, 1995).. V mléce se LPL enzym vyskytuje v několika formách, váže se také na kaseinové micely, které významně ovlivňují kvalitativní a kvantitativní vlastnosti mléka včetně jeho technologických charakteristik (Martin a kol., 1999 a 2002; Crepaldi et al., 2013). Aktivita mléčné LPL je ovlivněna stádiem laktace, frekvencí dojení, plemenem, doplňkem lipidového krmiva v krmné dávce (Chilliard et al., 2003). U koz, byla charakterizovaná nukleotidová sekvence LPL až v roce 2007 (Badaoui et al.). Dosud je popsáno 6 polymorfních mutací v exonu 1, 6 a 7 (Ling et al., 2015), a dále pak v signálním peptidu (G50C). Tato mutace způsobuje AA substituci Ser (serin) > Thr (treonin). Dalšími popsány SNP jsou nukleotidová substituce C > T v oblasti 3' UTR tohoto genu (C2094T) a nukleotidová substituce C > T v oblasti intronu 7 (Badaoui et al., 2007; Crepaldi et al., 2013).

Stearoyl-CoA desaturáza (SCD)

Stearoyl-CoA desaturáza (SCD) je enzym endoplazmatického retikula, který se podílí na biosyntéze mononenasycených mastných kyselin (MUFA) z nasycených mastných kyselin (SFA), které jsou jednak syntetizované de novo nebo pochází z potravy. U koz je gen *SCD* lokalizován na chromozomu 26 (Crepaldi et al., 2012) a je složen z pěti intronů a z šesti exonů, jejichž délka se pohybuje v rozmezí od 131 do 4047 bp (Zhang et al., 2010). Současný výzkum popisuje 6 nukleových polymorfismů a 5 haplotypů (A, B, C, D, E) z toho haplotyp A a B byl nejvíc zastoupen (Chen Z. et al. 2011; Supakorn et al., 2016; Zhang et al., 2010; Chen et al., 2011). Účinek tohoto genu na ukazatele mléčné produkce nebyl u koz dosud popsán, testován byl pouze efekt na parametry růstové (Chen et al., 2011; Supakorn et al., 2016).

2. 4. Variabilita sledovaných genů

DNA pro detekci genotypů vybraných lipogenních a glykoproteinových genů byla získána z krve od cca 600 ks zvířat plemene koza bílá a hnědá krátkosrstá a kozy burské. U testované populace byla zjištěna variabilita sledovaných genů: ACACA, BTN1A1, LPL a SCD. Rozdíly ve frekvencích výskytu jednotlivých alel a genotypů resp. genotypových kombinací u sledovaných plemen koz jsou ovlivněny různými faktory: vývojem plemene, selekcí, managementem chovu, šlechtěním a genetikou.

Tab. 3. Alelové a genotypové frekvence genu ACACA v populaci koza bílá krátkosrstá (KBK), koza hnědá krátkosrstá (KHK) kříženci (O) a koza burská (BU)

Plemeno	Genotypová frekvence (%)						Alelová frekvence (%)				
	SNP1			SNP2		SNP3	SNP1		SNP2	SNP3	
	CC	CT	TT	AA	CT	TT	C	T	A	C	T
KBK	75,96	20,93	3,10	100	5,43	94,57	86,43	13,56	100	2,71	97,29
KHK	15,94	55,07	28,99	100	8,69	91,30	43,48	56,52	100	4,35	95,65
O	59,26	33,33	7,41	100	100		75,93	24,07	100		100
BU		50	50	100	50	50	25	75	100	25	75

SNP1 = 1206 C/T; SNP2 = 1255 A/G; SNP3 = 1320 T/C

Tab. 4. Genotypová kombinace genu ACACA v sledovaném souboru zvířat

Genotypová kombinace	Frekvence za celou populaci (%)	Genotypová frekvence (%) dle plemena			
		KBK	KHK	O	BU
CC/AA/CT	3,65	4,26	2,89		
CC/AA/TT	58,99	71,70	13,04	59,26	
CT/AA/CT	2,25	1,16	5,79		100
CT/AA/TT	26,40	19,77	49,28	33,33	
TT/AA/TT	8,71	3,10	28,99	7,41	100

SNP1 = 1206 C/T, SNP2 = 1255 A/G, SNP3 = 1320 T/C

Tab. 5. Alelové a genotypové frekvence genu BTN1A1 v populaci koza bílá krátkosrstá (KBK), koza hnědá krátkosrstá (KHK) kříženci (O) a koza burská (BU)

Plemeno	Frekvence genotypů (%)			Alelová frekvence (%)	
	AA	AG	GG	A	G
KBK	2,17	20,59	77,24	13,59	86,41
KHK	1,94	23,30	74,76	13,59	86,41
O	0,87	16,52	82,61	9,13	90,87
BU	0,87	16,52	82,1		1

Tab. 6. Alelové frekvence genu LPL v oblasti signálního peptidu: 105 G/A a SNPs v oblasti intronu 1: 186G/T, 258C/T, a 301G/A v populaci koza bílá krátkosrstá (KBK), koza hnědá krátkosrstá (KHK) a kříženci (O)

	105 bp		186 bp		258 bp		302 bp	
	A	G	G	T	C	T	A	G
KBK	5,56	94,44	94,74	5,26	68,71	31,29	12,87	87,13
KHK	0,5	99,5	75,74	24,26	81,19	18,81	4,95	95,05
O	2,32	97,78	89,01	10,99	73,07	26,93	11,27	88,73

Tab. 7. Genotypové kombinace genu LPL v oblasti signálního peptidu (105 G/A) a intronu 1 (186G/T, 258C/T, a 301G/A) v populaci koza bílá krátkosrstá (KBK), koza hnědá krátkosrstá (KHK) a kříženci (O)

Početnost	Genotypová kombinace	Genotypová frekvence (%)		
		KBK	KHK	O
N (335)	LPLsnap			
1	AAGGCCGG	0,58	0	0
1	AAGGTAA	0,58	0	0
1	GAGGCCGA	0	0	2,78
10	GAGGCCGG	4,68	0,99	2,78
1	GAGGCTGA	0	0	0
6	GAGGCTGG	3,51	0	0
1	GAGGTTGG	0,58	0	0
1	GAGTCTGG	0	0	2,78
2	GGGGCCAA	0,58	0	2,78
43	GGGGCCGA	15,79	6,93	13,65
71	GGGGCCGG	19,3	20,79	29,47
1	GGGGCTAA	0	0	2,78
15	GGGGCTGA	7,02	0,99	2,78
82	GGGGCTGG	28,07	21,78	18,65
20	GGGGTTGG	8,77	0,99	8,28
3	GGGTCCGA	0,58	1,98	0
48	GGGTCCGG	5,85	31,68	8,52
27	GGGTCTGG	4,09	12,87	12,54
1	GGTTCCGG	0	0,99	0

Tab. 8. Alelové a genotypové frekvence SNP v 3exonu genu *SCD* v populaci koza bílá krátkosrstá (KBK), koza hnědá krátkosrstá (KHK) kříženci (O) a koza burská (BU)

Plemeno	Frekvence genotypů (%)						Alelová frekvence (%)		
	AA	AB	AC	BB	BC	CC	A	B	C
KBK	1,8	21,41	1,36	62,06	11,92	2,17	12,47	78,7	8,81
KHK	4,67	17,76	15,89	31,78	25,23	4,67	21,49	53,27	25,23
O	0,83	16,67	0,05	40,83	28,33	8,33	11,67	63,33	0,25
BU			1				0,5		0,5

Tab. 9. Frekvence genotypových kombinací v oblasti exonu 3 a intronu 3 genu *SCD* v populaci koza bílá krátkosrstá (KBK), koza hnědá krátkosrstá (KHK) kříženci (O) a koza burská (BU).

Pořad čsl.	Genotypová kombinace	Frekvence genotypů (%)	KBK (%)	KHK (%)	O (%)	BU (%)
1	AA/AA/CC/GG/AA	0,37	0,58			
2	AA/AA/CC/GG/AG	1,50	2,2		1,4	
3	AA/AA/CC/GG/GG	50,66	57,64	31,82	43,75	
4	AA/AA/CT/GG/GG	2,6	3,17			
5	AA/AC/CG/GG/AG	0,19	0,29			
6	AA/AG/CC/GG/GG	0,19	0,29			
7	AG/AA/CC/AG/AG	3,19	0,58	12,5	4,17	
8	AG/AA/CC/GG/AG	0,19	0,29			
8	AG/AA/CT/AG/AG	0,38	17,29	5,68	2,8	
10	AG/AA/CT/GG/AG	14,82	0,29		14,58	
11	AG/AA/CT/GG/GG	0,19	2,89			
12	AG/AA/TT/GG/AG	2,6	10,95	1,14		
13	AG/AG/CC/AG/AG	14,63	0,29	21,59	21,87	
14	AG/AG/CT/AG/AG	0,75		1,14	2,8	
15	GG/AA/CC/AA/AA	0,19		1,14		
16	GG/AA/CT/AA/AA	0,56		3,44		
17	GG/AA/TT/AA/AA	0,75	0,86	1,14		
18	GG/AG/CC/AA/AA	2,25	0,29	11,36	1,4	
19	GG/AG/CT/AA/AA	2,6	0,58	5,69	3,12	
20	GG/AG/CT/AG/AG	0,19			1,4	0,5
21	GG/AG/TT/AA/AA	0,38	0,29			0,5
22	GG/GG/CC/AA/AA	2,44	1,44	3,41		

2. 5. Využití informací ve šlechtění

V současnosti se využívají dva základní postupy ve šlechtění: kvantitativní genetika a molekulárně genetické nástroje, např. tzv. genetické markery (MAS – Marker Assisted Selection / GAS – Gene Assisted Selection) ve vzájemné vazbě. Kvantitativní genetika hodnotí fenotypové vlastnosti na základě kontroly užítkovosti, sledování jejich dědičnosti a vypočítává plemenné hodnoty.

Kvantitativní užítkové vlastnosti jsou ovlivňovány množstvím genů malého účinku, některé geny však mohou mít větší vliv. Geny, které ovlivňují ekonomicky významné produkční vlastnosti, označujeme jako kandidátní geny. Geny umístěné v těsné blízkosti vedle sebe na jednom nepohlavním chromozomu vytvářejí shluk genů, které označujeme jako haplotyp, a který se dědí zpravidla společně. Metody detekce těchto genů (genetických variant) mají potenciál pro ovlivňování fyziologických procesů. Detekce polymorfního znaku (genetického markeru) jehož varianty vykazují mendelistickou dědičnost a mohou být v asociaci s variabilitou znaku je pro chovatele zvířat důležitá. Marker sám o sobě nemusí užítkové vlastnosti ovlivňovat, ale může rozdělit do několika typů, které mají různý stupeň polymorfismu (různorodosti tvarů) (Mátlová a Sztankóová, 2008).

Vyhodnocení rozdílů alel kandidátních genů mezi zvířaty a různým fenotypovým projevem, to znamená s různými ukazateli užítkovosti, nabízí možnost identifikace markeru (polymorfního znaku) spojeného s fenotypovou (užitkovou) hodnotou. Pokud se vztah mezi užítkovostí a markerem prokáže, lze provést časnou selekci mezi zvířaty ještě dříve, než je známa jejich vlastní užítkovost. (Mátlová a Sztankóová, 2008).

Další výhodou použití metody kandidátních genů je zvýšení přesnosti selekce pomocí doplňkových informací přímo vztahených ke genotypu jedince a možnosti snížení generačního intervalu – možnost získat informace prakticky po narození, nezávisle na pohlaví a věku (Mátlová a Sztankóová, 2008).

V praktickém šlechtění umožňuje použít metodu genetických markerů ve dvojstupňové selekci: v první fázi je informace o markerech využita k ranné selekci (předvýběru) zvířat s žádoucími alelami, ve druhé fázi jsou předvybraná zvířata testovaná na vlastní užítkovost a bez ohledu na informaci o markerech dále selektována (Mátlová a Sztankóová, 2008).

2. 6. Experimentální část metodiky

2. 6. 1. Materiál a metodika

Celkem bylo do sledování zařazeno 589 individuálních jedinců plemene koza bílá a hnědá krátkosrstá (včetně jejich kříženců) a burská koza, u nichž byly detekovány alely, genotypy a genotypové kombinace. U sledované populace zvířat byly zjišťovány parametry mléčné užitkovosti a kompozice mastných kyselin v mléce. Zvířata pocházela z jednoho stáda, byla ustájena ve skupinách v kotcích na hluboké podestýlce, krmená lučním porostem a senem ad libitum a jadrné směsí, která byla dávkovaná při dojení v dojárně v celkovém množství 300g/ks/den.

2. 6. 2. Sledované parametry

U koz se stanovovali genotypy a genotypové kombinace pro acetyl-CoA karboxylasu (ACACA), butyrophilin (BTN1A1), lipoproteinovou lipázu (LPL) a stearyl-CoA desaturázu (SCD). U jednotlivých zvířat byly sledovány údaje o pořadí laktace, sdružený efekt roku a období laktace, měsíc laktace, plemeno, lineární a kvadratická regrese na dny v laktaci a věk zvířete. Sledovány byly parametry mléčné užitkovosti (produkce mléka, obsah bílkovin, tuku a laktózy – údaje byly převzaty z databáze kontroly užitkovosti koz Svazu chovatelů ovcí a koz) dále byla stanovena kompozice mastných kyselin - s využitím metody GC/FID. Zastoupení mastných kyselin bylo stanoveno ve spolupráci s laboratoří Výzkumného ústavu mlékárenského (VUM) s. r. o. v Praze.

2. 6. 3. Detekce genetického polymorfismu sledovaných genů

Pro provedení molekulárně genetických analýz byly v průběhu roku 2013 od testovaného panelu zvířat zajištěny vzorky krve. Odběry biologického materiálu byly v návaznosti na veterinární službu vyžádanou chovatelem - pravidelný odběr krve pro sérologické vyšetření. Krev testovaných zvířat byla po odebrání ošetřena antikoagulantem EDTA a před vlastní izolací DNA byla uskladněna při -20°C.

Metody detekce genetického polymorfismu ve vybraných genech byly během řešení optimalizované v laboratoři molekulární genetiky VÚŽV v. v. i. v Praze-Uhřetěvesi, pro některé byly vyvinuty nové postupy detekce - chráněné postupy (patent resp. užitný vzor) (Tabulka10).

Tab.10. Použité metody detekce sledovaných polymorfismů

Lokus	Metoda	Alely	Reference	Poznámka
ACACA	PEA ¹	1206bp C/T, 1255 A/G, 1322 C/T	Signorelli et al., 2011	neopublikovaná metodika
BTN1A1	PCR – RFLP ²	A, G	Qu et al., 2011 Adjustovaná metodika	nová varianta
LPL	PEA	103bp G/A, 185 G/T 257bp C/T, 301bp G/A	Rychtářová et al., 2015, 2017	nově popsané SNP
SCD	PEA	430bp A/G, 483bp A/G 529bp T/C, 601bp A/G 651bp A/G	Chen et al., 2011 Sztankóová et al., 2016	nově popsané SNP

¹ PEA – primer extenssion analysis; PCR – RFLP² – PCR – restriction fragment lenght polymorphism

2. 7. Stanovení mastných kyselin v mléce metodou GC/FID

Vzorky kozího mléka od jednotlivých zvířat byly odebírány na Kozí farmě Pěččín v měsíčních intervalech v období od května do září po dobu trvání projektu (4roky). Zastoupení mastných kyselin bylo stanoveno ve spolupráci s laboratoří Výzkumného ústavu mlékárenského (VUM) s. r. o. v Praze – Vokovice podle ČSN EN ISO 1211 (2011).

Příprava vzorku k analýze GC:

Mastné kyseliny byly převedeny na methylestery, které byly dále analyzovány, následujícím postupem. Vzorek mléčného tuku byl pozvolně rozmražen ve vodní lázni při teplotě 30°C. Přibližně 40 mg mléčného tuku bylo naváženo do centrifugační zkumavky s víčkem. Bylo přidáno 0,5 ml methanolu a 0,5 ml methanolátu sodného (0,5 N). Roztok byl za občasného míchání tři minuty zahříván na 80 °C. Dále bylo po zchlazení vzorku přidáno 1,5 ml hexanu a 10 ml nasyceného roztoku chloridu sodného a roztok byl opět promíchán a odstředěn. Odstředěná hexanová vrstva byla analyzována přístrojem GC-FID (Agilent 7890A) Identifikace jednotlivých methylesterů mastných kyselin byla provedena porovnáním retenčních časů se směsným standardem 37 methylesterů mastných kyselin (CRM 47885-U, Supelco). Zastoupení jednotlivých mastných kyselin bylo vypočteno metodou vnitřní normalizace.

Podmínky GC stanovení:

kolona: SP-2560, Supelco (100 m x 0,25 mm x 0,2 μm)

nosný plyn: helium

teplota nástřiku: 280 °C

teplota detektoru: 280 °C

teplotní program: iniciační teplota 140 °C

po 5 minutách zvyšována na 240 °C rychlostí 4 °C./min-1

nástřík: 1 μl

split poměr: 1:100

doba analýzy: 52 min

detekce: plamenově ionizační detektor (FID)

2. 8. Statistické vyhodnocení

Pro vyhodnocení vlivu jednotlivých alel na ukazatele mléčné užitkovosti byl použit lineární model s opakovatelností (PROC MIXED, SAS 2004), kdy opakováním byl jedinec. Jako další významné efekty byly použity: pořadí laktace, sdružený efekt roku a období laktace, měsíc laktace, plemeno, lineární a kvadratická regrese na dny v laktaci a věk zvířete a genotyp.

$$y_{ijklmno} = \mu + RO_i + G_j + dL_k + PL_l + MES_m + PLEM_n + VEK_o + e_{ijklmno}$$

kde, y je sledovaný parametr mléčné užitkovosti; μ je průměr sledovaného parametru; RO je sdružený efekt roku a období, G je vliv sledovaného genotypu resp. genotypové kombinace; dL je lineární a kvadratická regrese na den v laktaci; PL je pořadí laktace; MES je měsíc odběru; PLEM je plemeno zvířete; VEK je věk zvířete; e je soubor reziduálních efektů.

Efekt pořadí laktace byl použit jako efekt ve třídách, kdy záznamy byly sloučeny od 7. laktace do jedné třídy (tato třída obsahovala 3 % záznamů). Nejvíce zvířat bylo na první laktaci – necelých 30 %, dále pak na druhé laktaci bylo 24,5 %, na třetí 17 %. Vzhledem k tomu, že všechna zvířata byla z jednoho stáda, byl použit sdružený efekt roku a období, kdy nejnižší počet záznamů ve třídě byl 10.

Vstupní soubor pro výpočet vlivu jednotlivých genotypů na vybrané ukazatele užítkovosti koz:

Databáze kontroly užítkovosti obsahovala 9957 záznamů o nádoji mléka (v kg), obsahu tuku, bílkovin a laktózy, které byly sledovány v letech 2010 - 2017. Tyto údaje byly očištěny o nesmyslné záznamy. Pro nádoj mléka byly vyloučeny hodnoty mimo interval 0,6 – 7 kg mléka. Pro obsah tuku byly hranice intervalu 2 - 4 %, pro obsah bílkovin pak 1,5 – 5 %. Toto očištění vyplývalo z fyziologických možností zvířat, stejně jako i ze statistického hlediska, kde byl brán v úvahu průměr souboru a 3 směrodatné odchylky. Po úpravách bylo k dispozici 8097 záznamů. Nejvíce byly v souboru zastoupeny údaje od plemene koza bílá (68%), dále pak koza hnědá 21,5% a ostatní plemena pak téměř 8% jedinců. Kříženci bílých a hnědých koz tvořili 2 resp.: 1 % jedinců. Průměrný nádoj byl 3 kg (Tabulka č. 8) s 3 % obsahem tuku a bílkovin.

Tab. 11. Souhrnná statistika kontrola užítkovosti koz vybraného stáda

	Jednotky	Průměr	Směr. Odch.	Minimum	Maximum
Nádoj	kg	3,03	1,00	0,6	7
Tuk	%	2,93	0,50	2	4
Bílkovina	%	3,03	0,33	1,64	4,84
Laktóza	%	4,50	0,29	2,25	5,79
Sušina	%	5,99	3,69	0	11,2
Den laktace		35,92	11,25	1	131
Pořadí Laktace		2,72	1,64	1	7
Vek	dny	1513,57	877,90	228	4924

2. 9. Výsledky

2. 9. 1. Profil mastných kyselin ve vzorcích kozího mléka

V tabulce číslo 12 je uveden přehled zastoupení mastných kyselin v mléce koz (bazénové vzorky) v průběhu laktace (duben - červenec.).

Tab. 12. Profil mastných kyselin ve směsných vzorcích kozího mléka

Mastné kyseliny		1.	2.	3.	4.
		%	%	%	%
Máselná	C4:0	2,31	2,29	2,36	2,22
pentanová	C5:0	0,01	0,01	0,02	0,02
kapronová	C6:0	2,49	2,53	2,55	2,46
heptanová	C7:0	0,03	0,03	0,04	0,04
kaprylová	C8:0	2,75	2,75	2,73	2,68
nonanová	C9:0	0,05	0,05	0,07	0,07
kaprinová	C10:0	9,52	9,31	9,16	9,21
undekanová	C11:0	0,26	0,24	0,27	0,33
Laurová	C12:0	4,14	3,90	3,90	4,06
tridekanová	C13:0	0,13	0,12	0,14	0,17
	C14:0; R	0,08	0,08	0,09	0,10
myristová	C14:0	10,45	10,49	10,38	10,91
	C15:0, R	0,18	0,17	0,19	0,22
myristolejová	C14:1	0,11	0,10	0,11	0,14
pentadekanová	C15:0	1,03	1,02	1,09	1,15
	C16:0, R	0,31	0,30	0,27	0,32
cis-10-pentadecenová	C15:1	0,00	0,00	0,00	0,01
palmitová	C16:0	27,81	27,25	26,82	28,40
	C16:1, T	0,40	0,39	0,37	0,41
palmitolejová	C16:1	0,59	0,55	0,52	0,64
heptadekanová	C17:0	0,69	0,67	0,66	0,60
heptadecenová	C17:1	0,32	0,31	0,27	0,32

Stearová	C18:0	9,44	9,84	10,53	8,41
SUMA (vakcenová, elaidová)	C18:0; T	1,55	2,26	2,13	1,40
Olejevá	C18:1n9c	18,40	17,67	18,70	19,63
SUMA	C18:1; C	1,06	1,36	1,12	0,94
SUMA (linoelaidová, C18:2n6t)	C18:2; T	0,66	1,02	0,98	0,72
Linolová	C18:2n6c	2,72	2,63	2,12	2,26
Arachová	C20:0	0,25	0,20	0,23	0,26
g-linolenová	C18:3n6	0,02	0,02	0,02	0,02
eikosenová, gadolejová	C20:1	0,07	0,08	0,06	0,07
α -linolenová	C18:3n3	1,27	1,39	1,01	0,86
CLA		0,39	0,43	0,57	0,45
cis-11,14-eikosadienová	C20:2	0,04	0,04	0,05	0,03
behenová	C22:0	0,08	0,08	0,08	0,08
cis-8,11,14-eikosatrienová	C20:3n6	0,02	0,02	0,01	0,02
Eruková	C22:1n9	0,01	0,01	0,01	0,01
cis-11,14,17-eikosatrienová	C20:3n3	0,04	0,04	0,03	0,02
arachidonová	C20:4n6	0,14	0,14	0,13	0,14
cis-13,16-dokosadienová	C22:2	0,01	0,01	0,01	0,00
lignocerová	C24:0	0,04	0,03	0,04	0,04
EPA	C20:5n3	0,08	0,08	0,08	0,08
nervonová	C24:1	0,01	0,01	0,01	0,01
DHA	C22:6n3	0,06	0,07	0,07	0,07

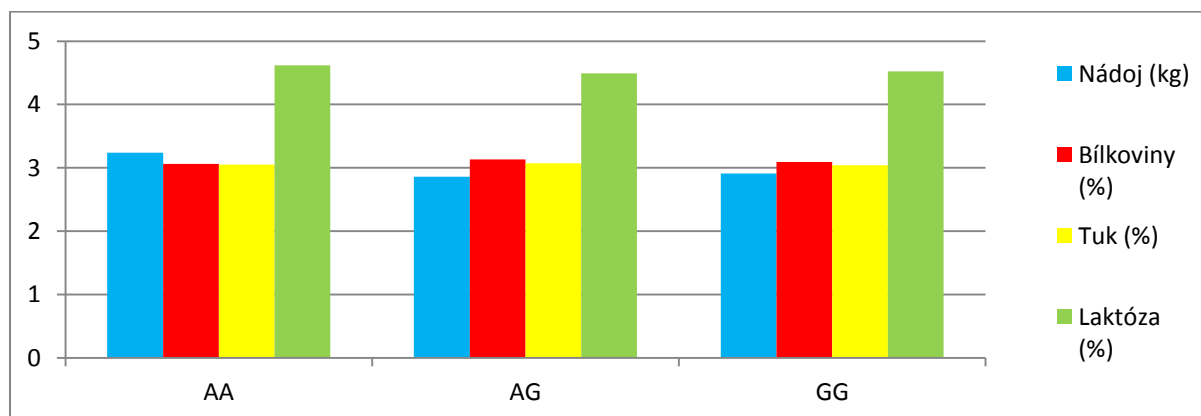
Celkové zastoupení nasycených (SFA), monoenových (MUFA), polyenových (PUFA), $\omega - 3$ a $\omega - 6$ mastných kyselin ze všech stanovovaných mastných kyselin bazénových vzorků kozího mléka je uvedeno v tabulce číslo 13. Množství SFA se v průběhu laktace téměř nelišilo. Množství MUFA se naopak v průběhu laktace neustále zvyšovalo (+0,2%; +0,8%; +1,1% v porovnání s 1. odběrem). Nárůst PUFA byl zaznamenán pouze u druhého odběru. Toto jednorázové navýšení bylo způsobeno drobným nárůstem obsahu $\omega - 3$ mastných kyselin v mléce. Množství $\omega - 6$ mastných kyselin v průběhu laktace mírně klesalo.

Tab. 13. Zastoupení SFA, MUFA, PUFA, ω -6 a ω -3 mastných kyselin ve směsných vzorcích koziho mléka

MK	1.	2.	3.	4.
	%	%	%	%
SFA	72,1	71,4	71,6	71,7
MUFA	22,5	22,7	23,3	23,6
PUFA	5,4	5,9	5,1	4,7
ω - 6	2,94	2,85	2,34	2,48
ω - 3	1,45	1,57	1,18	1,03

2. 9. 2. Efekt genotypů lipogenních enzymů na parametry mléčné užitkovosti

Graf 1 Efekt BTN1A1 genu na parametry mléčné užitkovosti u sledované populace koz (n = 449)



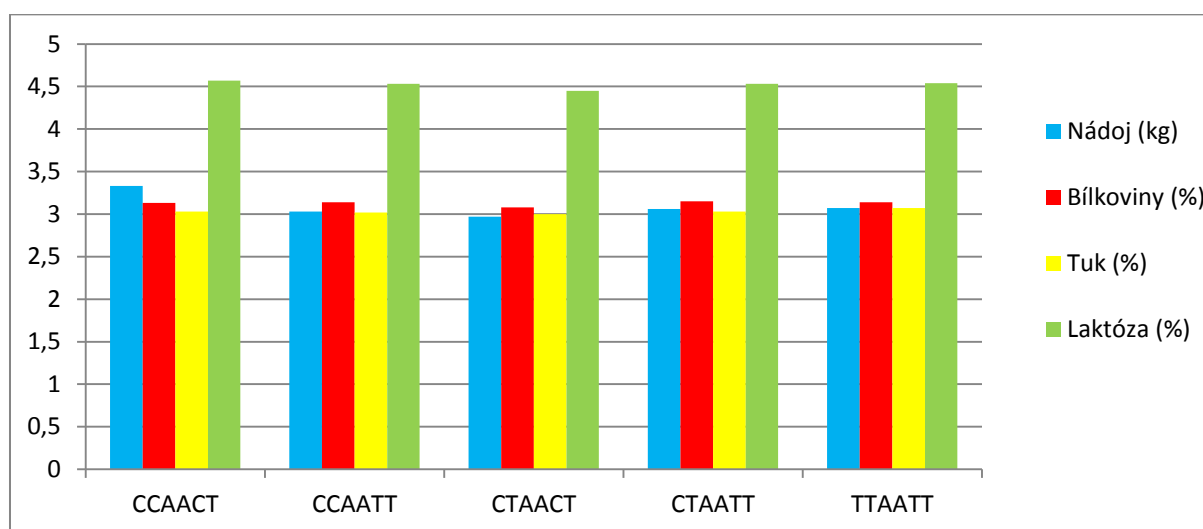
Nejvyšší průměrná hodnota pro parametr nádoj byl vykazován u zvířat, které byly nositeli genotypu AA. Potvrdilo se, že tento genotyp měl také pozitivní vliv na obsah laktózy v mléce. Nejvyšší obsah bílkovin a tuku je spojeno s heterozygotním genotypem AG. Obdobný trend zaznamenali Qu et al. (2011), kteří zjistili vliv daného genu na obsah tuku (%) vliv na celkovou sušinu (%) a tukuprostou sušinu (%). Dle získaných výsledků, funkce a charakteristiku genu a genetický polymorfismus, tento gen pozitivně ovlivňuje vlastnosti mléka u koz.

Tab. 14. Vliv genetického polymorfismu *BTN1A1* genu na parametry mléčné užitkovosti u koz

BTN1A1	Nádoj (kg)		Bílkoviny (%)		Tuk (%)		Laktóza (%)	
	Průměr	SE	Průměr	SE	Průměr	SE	Průměr	SE
AA	3,24a	0,081	3,06 a,b	0,025	3,05	0,044	4,62a	0,023
AG	2,86b	0,048	3,13a	0,015	3,07	0,026	4,49b	0,013
GG	2,91b	0,046	3,09b	0,014	3,04	0,025	4,52c	0,0133

Vysvětlivky: hodnoty v řádcích v rámci jednotlivých genetických systémů označené rozdílnými písmeny se od sebe liší na úrovni významnosti $P \leq 0,05$. SE = střední chyba průměru

Graf 2 Efekt genotypové kombinace *ACACA* genu (SNPs v promotoru III) na parametry mléčné užitkovosti u sledované populace koz (n = 292)



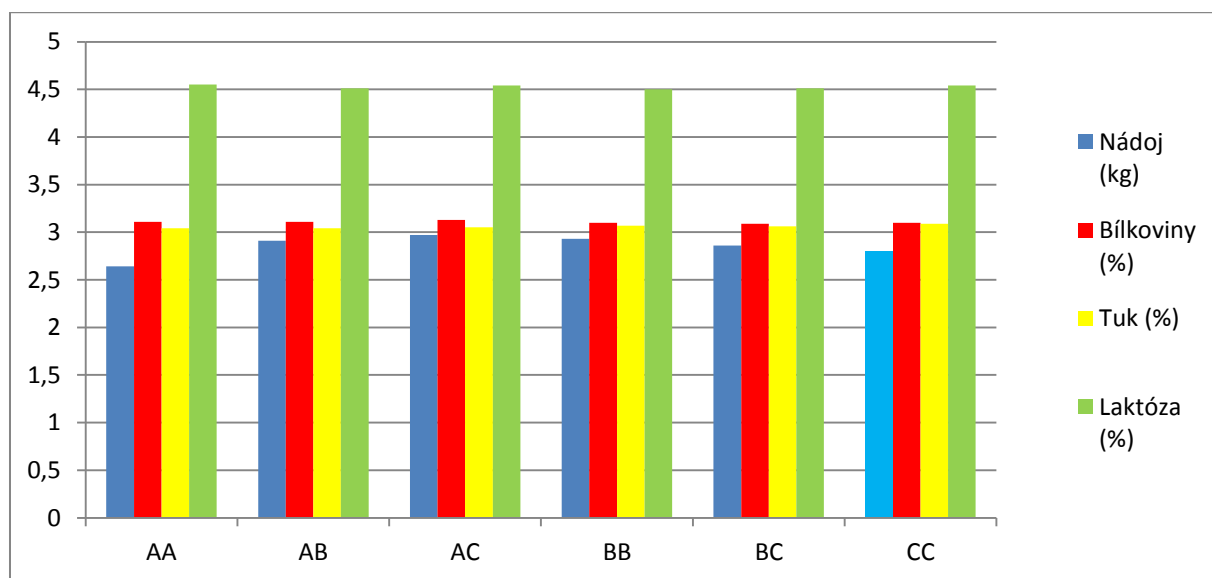
Celkem bylo detekováno 5 genotypových kombinací. Statisticky významný vliv genu *ACACA* byl zaznamenán k ukazateli celkový nádoj, obsah bílkovin a dále pak k obsahu laktózy (%). Genotypová kombinace CCAACT se vyznačuje nejvyšším průměrným nádojem (Tabulka č. 10). Genotypová kombinace CTAACT má průkazně ($p < 0,05$) nejnižší obsah bílkovin, tuku i laktózy. Nejvyšší průměrná hodnota obsahu tuku byla zaznamenána u genotypové kombinace TTAATT a naopak nejnižší byla pozorována u jedinců s genotypem CTAACT. Signorelli et al. (2009) zaznamenali, že nepůvodní (mutantní) alela T v pozici 1206bp má vliv obsah tuku a proteinu (%), a alela C v pozici 1322bp má pozitivní vliv na obsah tuku (%) a množství proteinu v mléce (kg). Nicméně, výsledky potvrzují, že tento gen ovlivňuje parametry mléka u koz.

Tab.15. Efekt genotypových kombinací ACACA genu (promotor III) na parametry mléčné užitkovosti u sledované populaci koz

	ACACA	Nádoj (kg)		Bílkoviny (%)			Tuk (%)		Laktóza (%)		
		Genotyp	Průměr	SE	Průměr	SE	P<0,05	Průměr	SE	Průměr	SE
1	CCAACT	3,33a	0,082	3,13	0,026		3,03	0,044	4,57	0,023	2,3,4
2	CCAATT	3,03b	0,062	3,14	0,019		3,02	0,034	4,53	0,017	
3	CTAACT	2,97b	0,100	3,08	0,031	2,4,5	3,00	0,054	4,45	0,028	2,4,5
4	CTAATT	3,06b	0,064	3,15	0,020		3,03	0,034	4,53	0,018	
5	TTAATT	3,07b	0,076	3,14	0,024		3,07	0,041	4,54	0,021	

Vysvětlivky: hodnoty v řádcích v rámci jednotlivých genetických systémů označené rozdílnými písmeny se od sebe liší na úrovni významnosti $P \leq 0,05$. Statistická významnost je také vyznačena pomocí číslic, které určují číslo lišící se skupiny (významnost je psaná nerecipročně). SE = střední chyba průměru

Graf 3 Efekt genotypu SCD genu na parametry mléčné užitkovosti u sledované populace koz (n = 453)



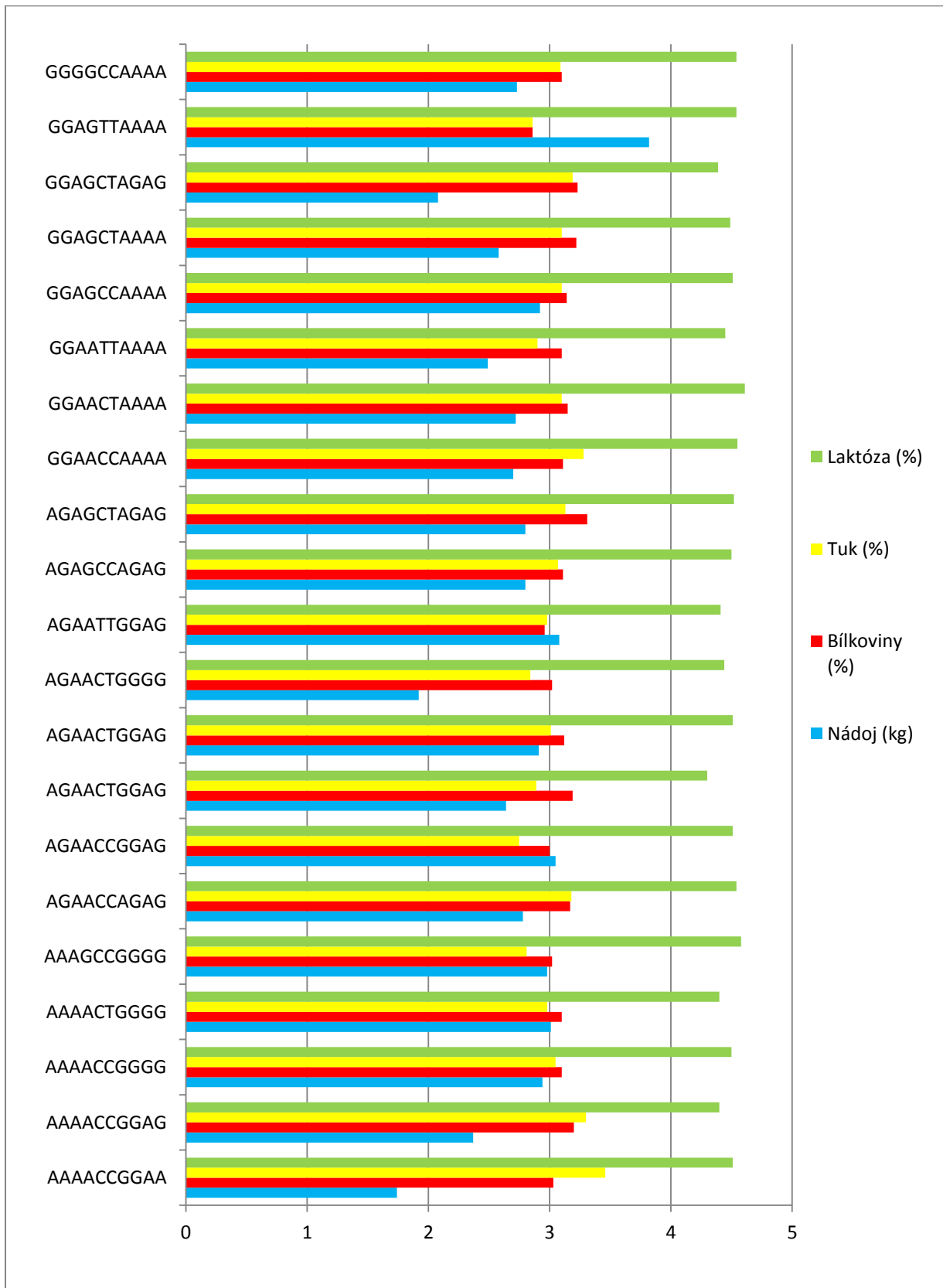
Ve sledovaném souboru zvířat se rovněž projevil vztah mezi polymorfismem v SCD genu a ukazateli mléčné užitkovosti. Celkem bylo detekováno 6 genotypů SCD lokusu. Projevil se pozitivní vliv alely B na všechny sledované ukazatele mléka. Alela A zaznamenala negativní vliv na dojivost. Nejnižší nádoj vykazovala zvířata s genotypem AA (Tabulka č. 13). Genotyp vyznačující se nejvyšším nádojem (AC) se průkazně liší pouze od dvou nejnižších úrovní (genotyp AA, CC). Průměrné hodnoty obsahu bílkovin jsou u všech genotypů na velmi podobné úrovni, stejně jako je tomu u obsahu tuku a laktózy.

Tab. 16. Efekt SCD genu na parametry mléčné užitkovosti u sledované populace koz

SCD	Nádoj (kg)			Bilkoviny (%)			Tuk (%)		Laktóza (%)		
	Průměr	SE	P<0,05	Průměr	SE	P<0,05	Průměr	SE	Průměr	SE	P<0,05
AA	2,64	0,08	2,5	3,11	0,025		3,04	0,043	4,55	0,023	
AB	2,91	0,049		3,11	0,015		3,04	0,026	4,51	0,014	
AC	2,97	0,065	6	3,13	0,02		3,05	0,035	4,54	0,018	5
BB	2,93	0,046	5	3,1	0,014	2,3	3,07	0,024	4,5	0,013	2,3,6
BC	2,86	0,054		3,09	0,017	2,3	3,06	0,029	4,51	0,015	
CC	2,8	0,08		3,1	0,025		3,09	0,043	4,54	0,022	

Vysvětlivky: Statistická významnost je vyznačená pomocí číslic, které určují číslo lišící se skupiny (významnost je psaná nerecipročně). SE = střední chyba průměru

Graf 4 Vliv genotypových kombinací SCD genu (3exon) na parametry mléčné užitkovosti u koz (n = 409)



Efekty genotypových kombinací genu SCD (SNP v oblasti 3exon a 3intron) na užitkovost jsou popsány v tabulkách 14a a 14b. Genotypová kombinace: GGAGTTAAAA (kombinace č. 20) vykazuje statisticky průkazně nejvyšší nádoj (3,82 kg). Nositelé této kombinace však vykazovali nízký obsah bílkovin i tuku v mléce ($p < 0,05$). Nejnižší nádoj je spojen s genotypovou kombinací AAAACCGGAA (kombinace č. 1), která má ovšem nejvyšší obsah tuku. Nejvyšší průměrný obsah bílkovin 3,31% vykazují zvířata s kombinací AGAGCTAGAG (kombinace č. 13). Zatímco nejhorší genotypová kombinace GGAGTTAAAA (kombinace č. 20) má průměrný obsah bílkovin pouze 2,86 %, stejně jako obsahu tuku. Mezi procentuálním obsahem laktózy není u jednotlivých kombinací výrazný rozdíl.

Tab. 17a Efekt SCD genu na parametry mléčné užitkovosti u sledované populace koz

	HAPLOTYP SCD	Nádoj (kg)			Bílkoviny (%)			Tuk (%)			Laktóza (%)		
		Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05
1	AAAACCGGAA	1,74	0,214	2-9,11-18,20,21	3,03	0,068	2,6,8,13,18	3,46	0,116	3-13,15-18,20,21	4,51	0,061	8
2	AAAACCGGAG	2,37	0,094	3-7,9,11-13, 15,17,20,21	3,20	0,030	3-5,7,9- 13,16,20,2 1	3,30	0,051	3-13,15-18,20,21	4,40	0,027	3,6,8,9,12- 15,17,18,20 ,21
3	AAAACCGGGG	2,94	0,048	6,8,10,12,15,16, 18-21	3,10	0,015	6,11,13,18, 20	3,05	0,026	6-9,14,16	4,50	0,013	4,6,8,11,15
4	AAAACTGGGG	3,01	0,084	6,8,10,12,15,16, 18-21	3,10	0,026	6,11,13,18, 20	2,98	0,045	6,12,14,17,18,21	4,40	0,024	5,6,8,12- 15,18,18, 20, 21
5	AAAGCCGGGG	2,98	0,276	10,19,20	3,02	0,087	13,18	2,81	0,149	6,14	4,58	0,079	8,11
6	AGAACCAGAG	2,78	0,068	9-11,16,18,20	3,17	0,021	9,11-13, 20,21	3,18	0,037	7-12,16,20	4,54	0,019	8,11,15,16
7	AGAACCGGAG	3,05	0,276	10,19,20	3,00	0,087	13,18	2,75	0,149	12-15,17,18,21	4,51	0,079	8
8	AGAACTGGAG	2,64	0,155	10,11,20	3,19	0,049	11,20	2,89	0,084	12-15,17,18,21	4,30	0,044	9,11-18, 20,21
9	AGAACTGGAG	2,91	0,053	10-12,16,18-21	3,12	0,016	11,12,18,2 0	3,01	0,028	12,14,17	4,51	0,015	11,15
10	AGAACTGGGG	1,92	0,275	11-18,20,21	3,02	0,087	13,18	2,84	0,149	14	4,44	0,078	15
11	AGAATTGGAG	3,08	0,090	12,15,18-21	2,96	0,028	12-19,21	2,98	0,048	12,14,17,18,21	4,41	0,025	12-15,17, 18,20,21

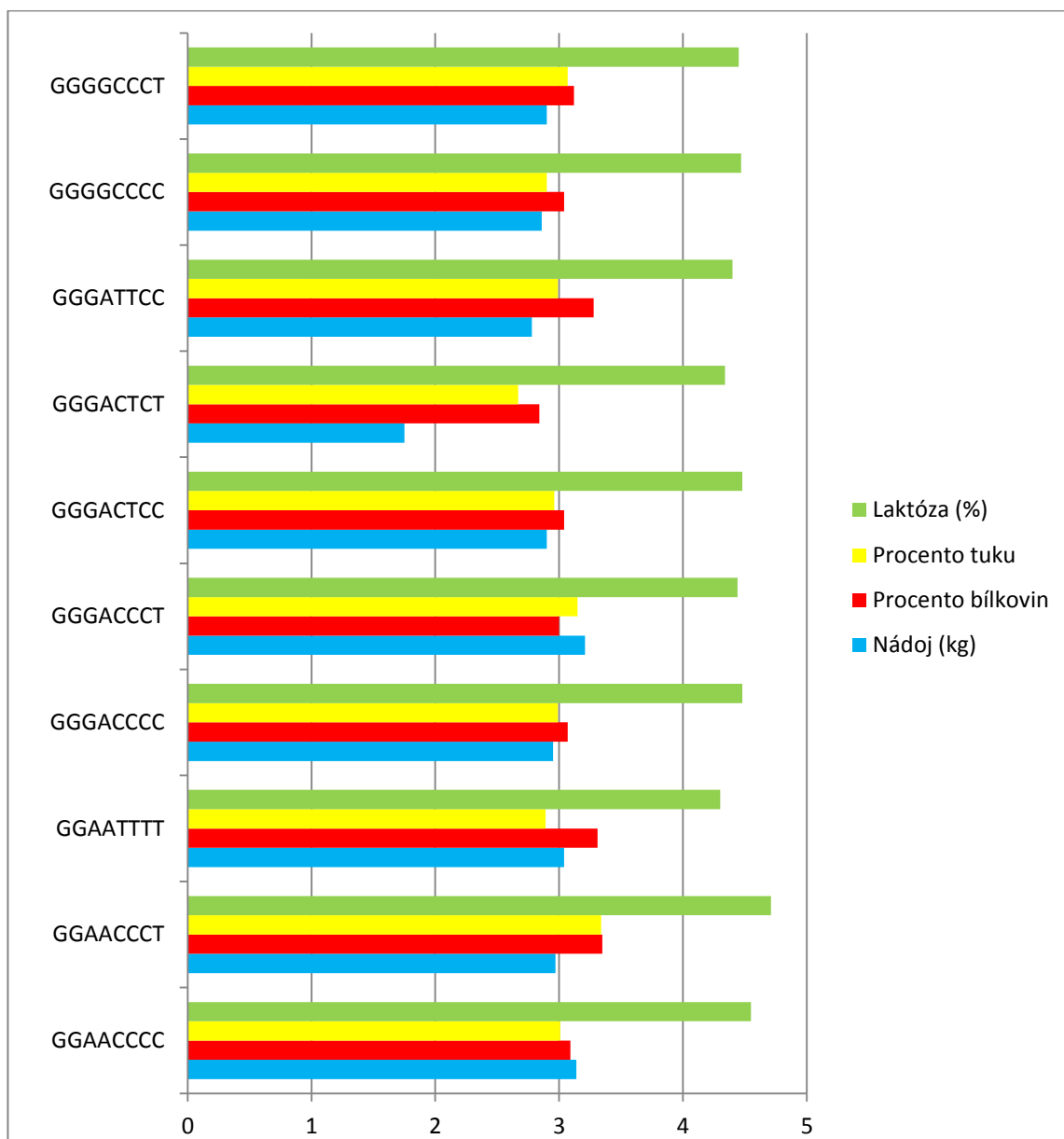
Vysvětlivky: Statistická významnost je vyznačená pomocí číslic, které určují číslo lišící se skupiny (významnost je psaná nerecipročně). SE = střední chyba průměru

Tab. 17b Efekt SCD genu na parametry mléčné užitkovosti u sledované populace koz

	HAPLOTYP SCD	Nádoj (kg)			Bílkoviny (%)			Tuk (%)			Laktóza (%)		
		Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05
12	AGAGCCAGAG	2,80	0,057	16,18,19,20	3,11	0,018	13,18,20	3,07	0,031	14,16,20	4,50	0,016	15
13	AGAGCTAGAG	2,80	0,161	20	3,31	0,051	14-17, 20,21	3,13	0,087	16,20	4,52	0,046	
14	GGAACCAAAA	2,70	0,188	20	3,11	0,059	20	3,28	0,102	16	4,55	0,053	
15	GGAACTAAAA	2,72	0,110	20	3,15	0,034	20	3,10	0,059	16,20	4,61	0,031	16-19
16	GGAATTAAAA	2,49	0,119	17,20	3,10	0,037	18,20	2,90	0,064	17,18,21	4,45	0,034	21
17	GGAGCCAAAA	2,92	0,078	18-20	3,14	0,024	18,20	3,10	0,042	20	4,51	0,022	
18	GGAGCTAAAA	2,58	0,099	20	3,22	0,031	20,21	3,10	0,054	20	4,49	0,028	
19	GGAGCTAGAG	2,08	0,359	20	3,23	0,113	20	3,19	0,194		4,39	0,102	
20	GGAGTTAAAA	3,82	0,197	21	2,86	0,062	21	2,86	0,106	21	4,54	0,056	
21	GGGGCCAAAA	2,73	0,093		3,10	0,029		3,09	0,050		4,54	0,026	

Vysvětlivky: Statistická významnost je vyznačena pomocí číslic, které určují číslo lišící se skupiny (významnost je psaná nerecipročně). SE = střední chyba průměru

Graf 4 Vliv genotypových kombinací LPL genu (SNPs v oblasti signálního peptidu a intronu 1) na sledované ukazatele mléčné užitkovosti u koz



Graf 4 a tabulky 18a a 18b demonstrují vliv genotypových kombinací LPL genu (SNPs v oblasti signálního peptidu a intronu 1) na užitkové vlastnosti koz. Nejvyšší průměrný nádoj vykazuje kombinace č. 16 (GTGACCCT), ovšem s velkou střední chybou tohoto průměru, proto není tato kombinace statisticky průkazně lepší než všechny ostatní, které dosahují nižších hodnot. Stejně to je i u kombinace s nejnižším nádojem (č. 7). Velké střední chyby jsou i u obsahu bílkovin, tuku a laktózy. Což znamená, že se zvířata uvnitř jednotlivých kombinací se výrazně liší.

Tab. 18a. Vliv genotypových kombinací LPL genu na parametry mléčné užitkovosti u koz.

	HAPLOTYP LPL	Nádoj (kg)			Bílkoviny (%)			Tuk (%)			Laktóza (%)		
		Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05
1	GGAACCCC	3,14	0,098	4,6,7,9,10,12, 15-18	3,09	0,030	2,3,5,9,14,16,19	3,01	0,054	2,5,9,11,16,19	4,55	0,029	2-6,9-12, 14,16,18
2	GGAACCCT	2,97	0,234	16	3,35	0,072	4-7,9- 12,14,15,17,18	3,34	0,130	3,4,6,9- 12,14,15,17	4,71	0,069	3-6,8-5,17
3	GGAATTTT	3,04	0,172	7,16	3,31	0,053	4-7,9-12,14,15, 17-19	2,89	0,095	5,13,16,18,19	4,30	0,051	4-6,9,10,12, 15-19
4	GGGACCCC	2,95	0,074	5,7,9,16	3,07	0,023	5,8,9,14,16,19	2,99	0,041	5,9,11,13,16	4,48	0,022	15-18
5	GGGACCCT	3,21	0,115	6,7,9,10,12	3,00	0,035	8,10,12-19	3,15	0,064	6,9,11,12,14- 17,19	4,44	0,034	15-19
6	GGGACTCC	2,90	0,093	7,16	3,04	0,028	8,10,12,14,16,1 7	2,96	0,052	11,13,16,18,19	4,48	0,027	15,16,18
7	GGGACTCT	1,75	0,597	11,12,16	2,84	0,184	8,16,19	2,67	0,331	16,19	4,34	0,177	16,18
8	GGGATTCC	2,78	0,349	16	3,28	0,108	9,11,14	2,99	0,193	16,19	4,40	0,103	16,18
9	GGGGCCCC	2,86	0,075	12,16	3,04	0,023	10,12,14-17,19	2,90	0,041	10,13,15-19	4,47	0,022	15-18
10	GGGGCCCT	2,90	0,104	16	3,12	0,032	11,14,16,19	3,07	0,057	11,12,14,16, 17, 19	4,45	0,030	15-19

Vysvětlivky: Statistická významnost je vyznačená pomocí číslic, které určují číslo lišící se skupiny (významnost je psaná nerecipročně). SE = střední chyba průměru i jednotlivých genetických systémů označené rozdílnými písmeny se od sebe liší na úrovni významnosti $P \leq 0,05$.

Tab. 18b. Vliv genotypových kombinací LPL genu na parametry mléčné užitkovosti u koz.

	HAPLOTYP LPL	Nádoj (kg)			Bílkoviny (%)			Tuk (%)			Laktóza (%)		
		Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05	Průměr	SE	P < 0,05
11	GGGGCCTT	3,08	0,187	16	3,00	0,057	13,16,19	2,71	00,104	12,13,15-19	4,41	0,055	15-19
12	GGGGCTCC	2,98	0,078	15,16	3,09	0,024	14,16,19	2,95	0,043	13,16,18,19	4,48	0,023	14-18
13	GGGGCTCT	2,89	0,291	16	3,21	0,089	14,19	3,30	0,161	14,17	4,43	0,086	16,18
14	GGGGTTCC	2,87	0,231	16	2,86	0,071	15-19	2,81	0,128	16,18,19	4,35	0,068	15-19
15	GTGACCCC	2,84	0,077	16	3,09	0,023	16	2,99	0,042	16,19	4,56	0,022	16-18
16	GTGACCCT	4,08	0,208		3,26	0,064	17,19	3,51	0,115	17,18	4,75	0,061	17
17	GTGGCCCC	2,89	0,077		3,09	0,023	19	2,97	0,042	19	4,52	0,022	18
18	GTGGCTCC	2,71	0,161		3,12	0,049	19	3,13	0,089		4,66	0,047	
19	TTGGCCCC	2,32	0,353		3,55	0,109		3,55	0,195		44,67	00,104	

Vysvětlivky: Statistická významnost je vyznačená pomocí číslic, které určují číslo lišící se skupiny (významnost je psaná nerecipročně). SE = střední chyba průměru

III. Srovnání „novosti postupů“

Geny s prokázaným vztahem k parametrům mléčné užitkovosti a technologické kvalitě mléka lze využít ve šlechtění koz, zejména jako doplňkové kritérium pro rychlejší a účinnější změny vybraných parametrů. Účinnost tohoto metodického postupu závisí na diverzitě plemena v dané oblasti (tj. genetického polymorfismu) a na optimalizaci postupu šlechtění využitím znalosti existujících rozsahů tohoto genetického polymorfismu ve šlechtěné populaci. Předkládaná metodika se zabývá výzkumem vztahu genotypu a genotypových kombinací lipogenních genů k parametrům mléčné užitkovosti, obsahu tuku a kompozici tuku v mléce dojného typu koz. Tento postup je nový a ještě nebyl v rutinním provozu uplatněn.

Výsledky přinášejí informace a možnosti využití genotypů a genotypové kombinace sledovaných lipogenních genů ve šlechtění dojných plemen koz zejména v oblasti selekce zvířat.

IV. Popis uplatnění metodiky

Metodika je určena:

- organizacím zajišťující šlechtitelské programy koz,
- šlechtitelům plemenářských služeb,
- chovatelům plemen koz.

Její uplatnění efektivně a rychle umožní zvýšit kvalitativní parametry kozího mléka, zlepšit konkurenceschopnost a podpořit rozvoj tohoto alternativního odvětví živočišné produkce.

IV. Ekonomické aspekty

Zjištěná genetická variabilita sledovaných genů u koz pomůže chovateli zefektivnit selekci zvířat pro zvýšení mléčné produkce. Nalezením vhodného genotypu resp. genotypové kombinace a/nebo skupiny, selekce zvířat a efektivní šlechtění může ve stádě zvýšit mléčnou užitkovost, resp. mohou přinést zkvalitnění obsahu mléčných složek mléka a zlepšit kompozici a obsah tuku v mléce. Složky mléka a jeho technologická kvalita určují ekonomiku výroby sýra a dalších mléčných výrobků, které jsou hlavním produktem chovu dojných koz.

Materiálové náklady pro multiplexní stanovení genetických variant vede k efektivnímu stanovení genetických variant.

Genotypováním se zvýší pro chovatele cena plemenného zvířete z dnešních 2 500 – 3 000Kč na přibližně 4 000 – 4 500Kč. Pokud bude mít zvíře charakteristický unikátní genotyp, může být zařazen do genových zdrojů daného plemene v rámci ČR včetně nárokové státní podpory.

Produkce kozího mléka se v ČR pohybuje okolo 2200tis.l/rok. Za předpokladu, že pro výrobu kozích jogurtů a nápojů je využito 3% jeho produkce a při průměrné ceně jogurtu 15Kč/100g, lze vycházet celkově z obratu mil. Kč/rok. Při zvýšení kvality produktů zvýšením jejich výživových benefitů lze zvýšeným zájmem spotřebitelů o 10% a současným zvýšením ceny jogurtu na 17Kč/100g navýšit obrat během následujících 5-ti let nejméně o 12 000tis.Kč. Ekonomický přínos tržeb bude záviset na konkrétních podmínkách a způsobu chovu a technologii zpracování mléka a výrobě konečného mlékárenského produktu. V roce 2017 podle MZE a SCHOK bylo vyprodukováno 290t kozího sýra s průměrnou cenou 300,- Kč/kg. Pokud předpokládáme, tento vyvíjecí trend a zvýší se produkce alepší se kvalita sýra, můžeme předpokládat, že dosáhneme celkové tržby 87 000 000mil.- Kč/ročně.

VI. Seznam použité literatury

An X. P., Song S. G., Hou, J. X., Zhu, C. M., Peng, J. X., Liu, X. Q., Liu, H. Y., Xiao, W. P., Zhao, H. P., Bai, L., Wang, J. G., Song, Y. X., Cao, B. Y. Polymorphism identification in goat DGAT2 gene and association analysis with milk yield and fat percentage. *Small Ruminant Research* 2011, 100, 2-3, 107-110.

Badaoui, B., Serradilla, J. M., Tomas, A., Urrutia, B., Ares, J. L., Carrizosa, J., Sanchez, A., Jordana, J., Amills, M. Short communication: Identification of two polymorphisms in the goat lipoprotein lipase gene and their association with milk production traits. *Journal of Dairy Science* 2007, 90, 3012-3017.

Bernard L., Rouel J., Leroux C., Ferlay A., Faulconnier Y., Legrand P., Chilliard Y. Mammary lipid metabolism and milk fatty acid secretion in Alpine goats fed vegetable lipids, 2005, *J. Dairy Sci* 88, 1478-1489. Ceballos L. S., Morales E. R., de la Torre Adarve G., Castro J. D., Martínez L. P., Sampelayo M. R. S. Composition of goat and cow milk produced under similar conditions and analyzed by identical methodology. *J. of Food composition and analysis*, 22, 322-329.

Chen Z. Sun J., Li Z., Lan X., Zhan, Ch., Qu Y., Liu Y., Fang X., Lei Ch., Chen H. Novel SNPs in the caprine stearoyl-CoA desaturase (SCD) and decorin (DCN) genes that are associated with growth traits in Chinese goat breeds. *Mol. Biol. Rep.* 2011, 38, 3121-3127.

Chilliard Y., Farlay A., Rouel J., Lamberet G. A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. 2003a, *J Dairy Sci.* 86, 1751-1770.

Crepaldi P., Nicoloso L., Coizet B., Milanese E., Pagnacco G., Fresi P., Dimauro C., Macciotta N. P. P. Associations of acetyl-coenzyme A carboxylase α , stearoyl-coenzyme A desaturase, and lipoprotein lipase genes with dairy traits in Alpine goats. *J. Dairy Sci.* 2013, 96, 1856-1864.

ČSN EN ISO 1211 (2011): Mléko – Stanovení obsahu tuku – Vážková metoda (Referenční metoda), Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.

Fang XT., Zhang JM., Xu HX., Zhang CL., Du Y., Shi XY., Chen DX., Sun JJ., Jin QJ., Lan XY., Chen H. Polymorphisms of diacylglycerol acyltransferase 2 gene and their relationship with growth traits in goats. *Mol. Biol. Rep.* 2012, 39, 1801-1807.

Joezy-Shekalgorabi S., Shahr-e-Babak HM., Ghorbani A. Association of the acetyl-coenzyme-a carboxylase α exon 1 genetic patterns with milk traits in mahabadi goat. *Journal of Animal and Plant Sciences* 2015, 25(3):640-644.

Ling Y., Wang K., Yin J., Zhu L., Zhang X., Han Ch., Ding J. Molecular analyses for genetic polymorphism of the LPL gene and their associations with intramuscular fat content in goats. *J. of Animal and plant Science*, 2015, 25, 5, 1238-1244.

Qu Y., liu Y., Ma L., Sweeney S., Lan X., Chen Z., Li Z., Lei Ch. Chen H. Novel SNPs of butoryphilin (BTN1A1) and milk fat globule epidermal growth factor (EGF) 8 (MFG-E8) are associated with mik traits in dairy goat. *Mol. Biol. Rep.* 2011, 38, 371-377.

Signorelli F., Napolitano F., De Matteis G., Scatà C., Maria, Catillo G., Tripaldi C., Moioli B. Identification of novel single nucleotide polymorphisms in promotor III of the acetyl-CoA carboxylase- α gene in goats affecting milk production traits. *J. Hered.* 2009, 100, 3, 386-389.

Supakorn C. Genetic polymorphisms of caprine stearoyl-coa desaturase (SCD) gene and their relationship with blood cholesterol and triglyceride of goats for meat in southern Thailand. *Journal of Animal Science*, Volume 94, Issue suppl_4, September 2016, 80-81.

Supakorn C., Pralomkarn W., Tumwasorn, S. Genetic polymorphism of caprine stearoyl-coA desaturase (SCD) gene and their relationship with blood cholesterol, triglyceride and pre-weaning growth traits of mixed breeds of goats in southern Thailand. *Indian journal of animal sciences.* 2016, 86, 4, 441-444.

Zhang Ch. – L., Gao X. – Y., Shao R. – Y, Wang Y. – H., fang X. – T., Chen H. Steroyl - CoA deasturase (SCD) gene polymorphism in goat breeds. *Biochem. Genet.* 2010, 48, 822-828.

VII. Seznam publikací, které předcházely metodice

SZTANKÓOVÁ, Z., RYCHTÁŘOVÁ, J., SVITÁKOVÁ, A. a MILERSKI, M. Polymorphism AT BTN1A1, SCD and LPL and its Association on Milk Parameters in Czech White Shorthaired Goat Breed. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 2017, 21, 50-55. ISSN 1857- 8489.

SZTANKÓOVÁ, Z., KYSELOVÁ, J., RYCHTÁŘOVÁ, J., MICHNOVÁ, K., FANTOVÁ, M. a NOHEJLOVÁ, L., 2016 Genetic Variability of Lipogenic Enzymes (DGAT2, SCD) and Glycoprotein (BTN1A1) in the Dairy Goat Population of the Czech Republic. In *Sustainable goat breeding and goat farming in the Central and Eastern European Countries*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, s. 133-138. ISSN 978-92-5-109123-4.

SZTANKÓOVÁ, Zuzana, RYCHTÁŘOVÁ, Jana, SCHMIDOVÁ, Jitka, KYSELOVÁ, Jitka a MILERSKI, Michal. Genetický polymorfismus lipogenních enzymů a kandidátních genů ovlivňující zastoupení mastných kyselin v kozím mléce. *Zpravodaj - Svaz chovatelů ovcí a koz*, 2015, roč. 2015(3-4), s. 24-26. ISSN.

Kombinace primerů pro detekci bodových mutací (SNPs) v exonu 3 a intronu 3 genu stearyl-CoA desaturázy (SCD) u koz. Autoři: SZTANKÓOVÁ, Z. a RYCHTÁŘOVÁ, J. Česká republika. Užitný vzor U1. 29791. 2016.

Sada pro detekci jednonukleotidového polymorfismu v signálním peptidu a intronu I genu lipoproteinové lipázy u koz. Autoři: RYCHTÁŘOVÁ, J., SZTANKÓOVÁ, Z. a KYSELOVÁ, J. Patentový spis CZ 306986 B6. 2017.

Sada pro detekci jednonukleotidového polymorfismu v signálním peptidu a intronu I genu lipoproteinové lipázy u koz. Autoři: RYCHTÁŘOVÁ, J., SZTANKÓOVÁ, Z. a KYSELOVÁ, J. Česká republika. Užitný vzor CZ 28456 U1. 2015.

Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves

Název: VYUŽITÍ POLYMORFISMU GENŮ LIPOGENNÍCH ENZYMŮ PRO ZLEPŠENÍ
KVALITATIVNÍCH A TECHNOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ MLÉKA KOZ

Autoři: Ing. Zuzana Sztankóová, Ph.D. (50%)
Ing. Jana Rychtářová, Ph.D. (25%)
Ing. Alena Svitáková, Ph.D. (15%)
Ing. Markéta Borková, Ph.D. (10%)

ISBN: 978-80-7403-216-5

Vydáno bez jazykové úpravy.

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu QJ 1310107, podporovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV), řešeného v letech 2013-2017

© Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., Praha Uhřetěves

Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

Přátelství 815

104 00 Praha Uhřetěves

www.vuzv.cz