



CERTIFIKOVANÁ METODIKA

Využití haplotypů genů mléčných bílkovin pro zlepšení technologické kvality mléka u českého strakatého skotu

Autoři

Ing. Jitka Matějčková, Ph.D.
Ing. Miloslava Štípková
Ing. Mgr. Jana Bolečková
Ing. Jaroslava Šefrová, DiS.
Michaela Krejčová

Oponenti

prof. Ing. Jan Frelich, CSc.

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta

Ing. Juraj Saksún

Ministerstvo zemědělství České republiky
Odbor živočišných komodit

Metodika vznikla jako součást výzkumného záměru MZe ČR
(MZE0002701404).

ISBN 978-80-7403-056-7

Ministerstvo zemědělství České republiky
Těšnov 17
117 05 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

č. 17210/2010 - 8

o uznání uplatněné certifikované metodiky
v souladu s podmínkami „Metodiky hodnocení výsledků výzkumu a vývoje“

Využití haplotypů genů mléčných bílkovin pro zlepšení technologické kvality mléka u českého strakatého skotu

*Ing. Jitka Matějčková, PH.D., Ing. Miloslava Štípková, Ing. Mgr. Jana Bolečková,
Ing. Jaroslava Šefrová, DiS., Michaela Krejčová*

*Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetěves
ISBN 978-80-7403-056-7*

Vypracované v rámci řešení výzkumného záměru
MZE0002701404

V Praze dne 1. listopadu 2010



Ing. Jiří Machek
ředitel odboru
živočišných komodit 17 210

.....

OBSAH

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE	3
II. VLASTNÍ POPIS METODIKY	4
1. Úvod	4
2. Literární přehled	4
2.1 Geny mléčných bílkovin	4
2.2 Variabilita obsahu kaseinů mezi hlavními dojenými plemeny	7
3. Experimentální část metodiky	8
3.1 Materiál a metodika	8
3.2 Výsledky a diskuze	12
3.3 Závěr a doporučení pro praxi	17
III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	18
IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	18
V. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	19
VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	21

Poděkování:

Autorky děkují za spolupráci pracovnímu týmu oddělení Molekulární genetiky VÚŽV, v.v.i. a kolektivu Výzkumného ústavu pro chov skotu s.r.o. v Rapotíně, dále Českomoravské společnosti chovatelů, a.s. a spolupracujícím chovům českého strakatého skotu.

I. CÍL METODIKY A DEDIKACE

Hypotéza metodiky

Technologická kvalita mléka určuje jak kvalitu, tak ekonomiku výroby sýrů a je významnou měrou ovlivňována geny mléčných bílkovin. Tyto geny jsou ve vzájemné interakci, proto je výhodné posuzovat jejich společný efekt, tj. efekt haplotypů. Výsledky poskytují informace o možnostech zlepšení parametrů technologické kvality mléka a tím i ekonomiky a kvality výroby sýrů.

Cíle metodiky

1. Zjistit vztah haplotypů sledovaných kombinací genů pro alfa_{S1} kasein, beta kasein, kappa kasein a beta laktoglobulin k parametrům mléčné užitkovosti (produkce mléka, bílkovin a tuku, obsah bílkovin a tuku), technologické kvality a syřitelnosti mléka (obsah celkové sušiny, tukuprosté sušiny, hrubých bílkovin, čistých bílkovin, nebílkovinných dusíkatých látek, kaseinu, syrovátkových bílkovin, dále čas enzymatické koagulace mléka = doba sýření, kvalita sýřeniny, pevnost sýřeniny a objem vyloučené syrovátky) ve sledované populaci českých strakatých krav.
2. Uvést poznatky této práce do praxe.

Dedikace metodiky

Metodika vznikla jako součást řešení výzkumného záměru MZe ČR (MZE0002701404).

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Úvod

Český strakatý skot, plemeno s kombinovanou užitkovostí, se v České republice stále podstatnou měrou podílí na zabezpečení požadavků trhu na mléko a hovězí maso. Dochází sice ke zvyšování počtu krav specializovaných dojných a masných plemen na úkor kombinovaného skotu, přesto si však české strakaté plemeno zachovává v objemu mléčné a masné produkce významné postavení.

Pro udržení konkurenceschopnosti musí chovatelé skotu produkovat mléko a hovězí maso s co nejnižšími náklady a zároveň nabídnout i odpovídající kvalitu produktů. Kvalita mléka se pak odráží i v kvalitě mléčných výrobků. Zejména výroba tvrdých sýrů je odvislá od množství, poměru a kvality mléčných bílkovin, které jsou významně ovlivňovány geny mléčných bílkovin (zejména kapa kasein a beta laktoglobulin, ale také beta kasein a alfa_{S1} kasein).

Současný důraz na zvyšování kvality potravin a tím i na zvyšování kvality živočišných produktů vybízí chovatele dojeného skotu k zařazení doplňkových selekčních prvků týkajících se kvality mléka. Z hlediska vztahu ke kvalitě a množství mléčné produkce jsou za vhodné považovány geny mléčných bílkovin.

2. Literární přehled

Kvantitativní užitkové vlastnosti skotu jsou ovlivňovány množstvím genů malého účinku (tzv. minor genů). Některé z genů však mohou mít větší vliv, pak se jedná o tzv. kandidátní geny s přímým vlivem na dané vlastnosti (Bouška et al, 2006). Snahou je takové geny identifikovat a využít je pro zlepšení významných parametrů výkonnosti skotu.

2.1 Geny mléčných bílkovin

Nejvýznamnější geny se vztahem k parametrům mléčné užitkovosti a kvality mléka jsou tzv. geny mléčných bílkovin, mezi které patří geny pro kaseiny: alfa_{S1} kasein (*CSN1S1*, α_{S1} -CN), beta kasein (*CSN2*, β -CN), alfa_{S2} kasein (*CSN1S2*, α_{S2} -CN) a kapa kasein (*CSN3*, κ -CN) a geny pro syrovátkové bílkoviny: alfa laktalbumin (*LALBA*, α -LA) a beta laktoglobulin (*LGB*, β -LG). Základní přehled o genech mléčných bílkovin včetně jejich hlavních alel je uveden v tabulce.

Přehled mléčných bílkovin a hlavních alel jejich genů u skotu

Bílkovina (gen)	Obsah bílkoviny v odstředěném mléce (g/l)	Hlavní alely	Specifikace alel
α_{S1} -CN	12 - 15	B C	na pozici 192 Glu na pozici 192 Gly
β -CN	9 - 11	A ¹ A ² B	na pozici 67 His na pozici 67 Pro na pozici 67 His, na pozici 122 Arg místo Ser
α_{S2} -CN	3 - 4	A	na pozicích 33, 47 a 130 Glu, Ala a Thr
κ -CN	2 - 4	A B E	na pozicích 136 a 148 Thr a Asp na pozicích 136 a 148 Ile a Ala na pozici 155 Gly místo Ser
α -LA	0,6 - 1,7	B	na pozici 10 Arg
β -LG	2 - 4	A B	na pozicích 64 a 118 Asp a Val na pozicích 64 a 118 Gly a Ala

(Zdroje: Eigel et al., 1984; Erhardt, 1989; Lien et al., 1992; Farrell et al., 2004)

Kaseinové geny se nachází na bovinním chromozomu 6 za sebou v pořadí α_{S1} -kasein, β -kasein, α_{S2} -kasein, a κ -kasein. Gen pro α -laktalbumin je situován na chromozomu 5 a gen pro β -laktoglobulin na chromozomu 11 (Farrell et al., 2004). Kaseiny tvoří 78 – 82 % z bílkovin mléka krav, zbývající část (18 – 22 %) připadá na syrovátkové bílkoviny (Kräusslich, 1994).

V této práci byly pro vyhodnocení vztahů ke sledovaným parametrům použity pouze geny pro alfa_{S1} kasein, beta kasein, kapa kasein a beta laktoglobulin, protože variabilita alel zbývajících genů je v populaci příliš nízká.

Alfa_{S1} kasein (CSN1S1, α_{S1} -CN)

Alfa_{S1} kasein tvoří až 40 % kaseinů v mléce krav a dosud bylo objeveno 8 alel jeho genu - A, B, C, D, E, F, G, H (Farrell et al., 2004). Nejvíce se u evropských plemen skotu vyskytují alely B a C, z nichž převažuje alela B (Jann et al., 2002; Boettcher et al., 2004). Z genotypů jsou pak nejvíce zastoupeny genotypy BB a BC, méně genotyp CC.

Hanuš et al. (2000b) uvádějí u dojnic českého strakatého plemene na první laktaci vztah genotypu BC k vyššímu obsahu bílkovin a tuku oproti genotypu BB. Genotyp CC ve sledované populaci nezjistili vůbec. Havlíček (1996) zaznamenal rovněž u plemenic českého strakatého skotu vztah genotypu BC k vyšší produkci mléka, bílkovin a tuku a zároveň k vyššímu obsahu bílkovin oproti genotypu BB. Žitný et al. (1997) toto zjištění potvrdili u krav slovenského strakatého plemene. Graml a Pirchner (2003) zjistili u plemene Fleckvieh vztah lokusu CSN1S1 k obsahu kaseinu v mléce.

Beta kasein (CSN2, β -CN)

Beta kasein zaujímá až 45% podíl kaseinů v kravském mléce a zatím bylo detekováno 15 alel jeho genu - A^1 , A^2 , A^3 , A^4 , A^5 , B^1 , B^2 , C , D , E , F , G , H^1 , H^2 a I (Farrell et al., 2004; Zwierzchowski 2005). Nejčastěji se u evropských plemen skotu vyskytují alely A^1 , A^2 , A^3 a B .

Ng-Kwai-Hang (1998) zjistil vyšší mléčnou užitkovost, avšak nižší obsah bílkovin u plemenic s genotypem A^1A^3 oproti plemenicím s genotypem A^1B . U plemenic s genotypem A^1B však uvádí vyšší obsah kaseinu v mléce.

Comin et al. (2006) uvádějí jako hlavní efekt lokusu *CSN2* jeho vliv na výši mléčné produkce. Vztah lokusu *CSN2* k technologickým vlastnostem mléka zjistili Hanuš et al. (2000a) u sledované populace českého strakatého skotu. V jiné práci zaznamenali Hanuš et al. (2000b) obdobně jako předcházející autoři vztah lokusu *CSN2* k výši mléčné produkce. Graml a Pirchner (2003) zjistili u plemene Fleckvieh vliv lokusu *CSN2* na syntézu kaseinu v mléce.

Kapa kasein (CSN3, κ -CN)

Kapa kasein tvoří asi 13 % z celkového podílu kaseinů v mléce krav a představuje výjimečnou složku mezi kaseiny. Je totiž jedinou frakcí kaseinu, která obsahuje sirmé aminokyseliny - cystein a methionin. Dosud bylo objeveno 11 alel genu pro kapa kasein - A , B , C , E , F^1 , F^2 , G^1 , G^2 , H , I a J (Farrell et al., 2004).

U evropských plemen skotu se nejvíce vyskytují alely A , B a E . Nejvyšší četnost výskytu má alela A , zejména u jednostranně mléčných plemen, jako je holštýnský skot. Tento jev je spojen se šlechtěním na vysokou mléčnou užitkovost, protože alela A je spojena s vyšší produkcí mléka (Neubauerová, 2001). Nižší četnost vykazuje alela B , která zvyšuje obsah mléčných složek, zejména bílkovin, a zlepšuje technologické parametry mléka (Boettcher et al., 2004; Caroli et al., 2004; Comin et al., 2006). Četnost této alely je vyšší u kombinovaného českého strakatého skotu (i přes příliv krve plemen red holštýn a ayrshire) oproti mléčnému plemeni holštýnskému (Neubauerová, 2001). Alela E se vyskytuje nejméně a negativně ovlivňuje technologické vlastnosti mléka (Ikonen et al., 1997). Zastoupení alely E je zpravidla nižší u českého strakatého skotu v porovnání se skotem holštýnským.

Boettcher et al. (2004) a Caroli et al. (2004) uvádějí, že genotyp BB zvyšuje obsah a kvalitu bílkovin v mléce, ale snižuje mléčnou produkci. Opačný trend uvádí Neubauerová (2001) u genotypu AA . Také Hanuš et al. (2000b) uvádějí vztah genotypu BB k vyššímu obsahu bílkovin v mléce a navíc k vyšší produkci tuku.

Amigo et al. (2001) zjistili u plemene Fleckvieh rovněž vztah lokusu *CSN3* k vyššímu obsahu bílkovin v mléce a zároveň zaznamenali kratší dobu sýření a vyšší pevnost sýřeniny u krav s genotypem BB oproti genotypům ostatním. Hanuš et al. (2000a) potvrdili u českého strakatého

skotu pozitivní vliv genotypu *BB* na technologické vlastnosti mléka, zejména na vyšší obsah kaseinů, kratší dobu sýření, vyšší pevnost sýřeniny, vyšší objem vyloučené syrovátky a naopak negativní vliv genotypu *AA* na tyto vlastnosti. Graml a Pirchner (2003) uvádějí u plemene Fleckvieh pozitivní vliv *CSN3* na obsah kaseinu v mléce.

Beta laktoglobulin (LGB, β -LG)

Beta laktoglobulin je hlavní bílkovinou syrovátky a zatím bylo identifikováno 11 alel jeho genu - *A, B, C, D, E, F, G, H, I, J* a *W* (Farrell et al., 2004). Oproti výše zmiňovaným genům, které se nachází na chromozomu 6, je gen pro beta-laktoglobulin situován na bovinním chromozomu 11. Nejčastěji se vyskytují alely *A* a *B*, přičemž alela *B* je zastoupena s vyšší četností (Panicke et al., 1996). Řídce se u evropských plemen vyskytují alely *C* a *D*.

U sledovaného souboru českých strakatých krav zjistili Hanuš et al. (2000b) vztah genotypu *BB* k vyššímu obsahu bílkovin a tuku v mléce oproti genotypům *AA* a *AB*. Naopak Neubauerová (2001) uvádí, že vztah *LGB* ke sledovaným parametrům nebyl statisticky významný.

Graml a Pirchner (2003) zjistili vliv lokusu *LGB* na obsah syrovátkových bílkovin v mléce a naopak velmi malý vliv na obsah kaseinu u plemene Fleckvieh. Choi a Ng-Kwai-Hang (2002) zaznamenali vztah alely *B* k vyššímu obsahu bílkovin a tuku v sýru a vyšší produkci sýřeniny. Hanuš et al. (1995) ve své práci rovněž zjistili, že genotyp *BB* pozitivně ovlivňuje sýrařské vlastnosti mléka u sledovaných plemenic českého strakatého skotu. U tohoto genotypu zaznamenali nejkratší dobu sýření, nejvyšší pevnost a kvalitu sýřeniny a nejvyšší objem vyloučené syrovátky oproti genotypům *AA* a *AB*. Buchberger a Dovc (2000) také považují pro výrobu sýrů za výhodnější alelu *B* oproti alele *A*.

2.2 Variabilita obsahu kaseinů mezi hlavními dojenými plemeny

Mášová a Šustová (2006) porovnávali variabilitu průměrného obsahu kaseinů v mléce u českého strakatého a holštýnského skotu a zjistili vyšší obsah kaseinů v mléce českého strakatého skotu (2,64 - 3,19 %) oproti skotu holštýnskému (2,56 - 3,09 %). Zároveň uvádějí, že pokles obsahu kaseinů o 0,1 % představuje zvýšení spotřeby mléka na výrobu 1 kg sýra o 0,3 až 0,5 litru. Proto hraje obsah kaseinů důležitou roli ve výtěžnosti při výrobě sýrů (výtěžnost = množství sýra získaného ze 100 l, nebo 100 kg mléka). Obdobně Čejna et al. (2006) porovnávali dojnice českého strakatého a holštýnského skotu z hlediska průměrného obsahu kaseinů v mléce a zjistili podstatně vyšší obsah kaseinů u dojnic českého strakatého skotu oproti dojnicím holštýnského skotu. Zjištěné hodnoty jsou uvedeny v tabulce .

Rozdíly v obsahu kaseinů mezi skupinami dojníc českého strakatého (C) a holštýnského skotu (H) na první a čtvrté a vyšší laktaci (Čejna et al., 2006)

Laktace	Plemeno	n	Kaseiny (%)		
			\bar{x}	min.	max.
1.	C	64	2,81	2,29	3,67
	H	79	2,59	2,04	2,90
4. a vyšší	C	64	2,83	2,22	3,69
	H	75	2,67	2,05	3,31

3. Experimentální část metodiky

3.1 Materiál a metodika

3.1.1 Český strakatý skot

Celkem bylo sledováno 429 českých strakatých krav, u nichž byly detekovány alely a genotypy sledovaných genů a zjišťovány parametry produkce a technologické kvality mléka. Plemence pocházely ze čtyř vysokoprodukčních stád s vysokou úrovní managementu a výživy.

3.1.2 Sledované parametry

U plemenic byly stanoveny genotypy genů pro alfa_{S1} kasein (*CSN1S1*), beta kasein (*CSN2*), kapa kasein (*CSN3*) a beta laktoglobulin (*LGB*), věk při prvním otelení, genetický podíl českého strakatého plemene, plemenná hodnota otce, rok a období otelení, stádo (podnik). Sledovány byly parametry mléčné užitkovosti (produkce mléka, bílkovin a tuku, obsah bílkovin a tuku - údaje byly převzaty z centrální databanky kontroly užitkovosti skotu Českomoravské společnosti chovatelů, a.s.), dále byly stanoveny parametry technologické kvality mléka a syřitelnosti (obsah celkové sušiny, obsah tukuprosté sušiny, obsah hrubých bílkovin, obsah čistých bílkovin, obsah nebílkovinných dusíkatých látek, obsah kaseinu, obsah syrovátkových bílkovin, čas enzymatické koagulace mléka = doba sýření, kvalita sýřeniny, pevnost sýřeniny a objem vyloučené syrovátky). Rozbory mléka byly provedeny ve spolupráci s laboratořemi Výzkumného ústavu pro chov skotu, s.r.o. v Rapotíně.

3.1.3 Detekce polymorfismů sledovaných genů

DNA pro detekci genotypů genů mléčných bílkovin byla získána z krve plemenic a inseminačních dávek plemeníků. Krev byla u plemenic odebírána v období před prvním otelením, a to z ocasní žíly (*vena caudalis*) pomocí odběrky Hemos. Ihned po odběru byla krev přelita do plastové sběrné zkumavky s roztokem EDTA, který zabránil jejímu sražení. Poté byla uložena do

chladicího boxu, následně dopravena do mrazicího kontejneru laboratoře a uchována. Izolace DNA byla prováděna podle Kawasaki (1990).

Genotypy *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3* a *LGB* byly stanoveny metodou PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism; polymerázová řetězová reakce a polymorfismus délky restričních fragmentů) a následnou elektroforézou na agarózovém gelu na oddělení Molekulární genetiky VÚŽV, v.v.i.

Detekce alel pro kaseinové geny *CSN1S1* (alely *B* a *C*) a *CSN3* (alely *A*, *B* a *E*) byla provedena podle metodiky Lien a Rogne (1993). Alely pro *CSN2* (*A*¹, *A*², *A*³ a *B*) byly stanoveny podle metodiky Lien et al. (1992). Varianty *LGB* (alely *A* a *B*) byly detekovány podle metodiky publikované autory Agrawala et al. (1992). Podmínky PCR se v některých hodnotách lišily oproti výše uvedeným citacím:

- *CSN1S1* – 3 min. při 94 °C, dále 40 cyklů: 30 s při 94 °C, 45 s při 63 °C a 60 s při 72 °C;
- *CSN2* – 1 min. při 95 °C, dále 35 cyklů: 30 s při 95 °C, 25 s při 66 °C a 30 s při 72 °C;
- *CSN3* - 1 min. při 95 °C, dále 35 cyklů: 30 s při 95 °C, 25 s při 62 °C a 30 s při 72 °C;
- *LGB* - 3 min. při 95 °C, dále 40 cyklů: 60 s při 95 °C, 30 s při 60 °C a 30 s při 72 °C.

Pomocí PCR byl namnožen požadovaný úsek DNA označený primery. Syntéza úseku byla zajištěna termostabilní DNA polymerázou (tzv. *Taq DNA polymeráza*). Dále následovalo rozštěpení jedné ze dvou přítomných variant PCR produktu specifickou restriční endonukleázou (metoda RFLP), která štěpí řetězec DNA uvnitř specifické sekvence nukleotidů. Výsledek štěpení byl zjištěn pomocí elektroforézy na agarózovém gelu.

3.1.4 Stanovení parametrů kvality mléka

Odběry vzorků mléka od sledovaných prvotetek českého strakatého skotu pro rozboru technologické kvality byly prováděny mezi 50. a 140. dnem po otelení. Odběry probíhaly v dojárnách do plastových vzorkovnic o objemu 500 ml pomocí poměrného vzorkovače používaného k odběru vzorků mléka při kontrole užitkovosti. Úhel posazení vzorkovače byl pozměněn tak, aby se zvýšila průtoková rychlost a tudíž byl za jedno dojení odebrán vzorek o minimálním objemu 300 ml.

Odebrané vzorky byly převezeny do laboratoře Výzkumného ústavu pro chov skotu, s.r.o. v Rapotíně a analyzovány na parametry technologické kvality mléka. Souhrnný přehled stanovovaných ukazatelů, jejich udávaná jednotka a stručná metodika jejich stanovení byly následující:

Parametr (zkratka)	Jednotka	Stanovení
MLÉKO		
• Celkový obsah sušiny (S)	(%)	Parametry S a TPS měřeny přístrojem MilkoScan 133B (Foss Electric, Denmark), dle standardu ČSN 57 0536, kalibrace podle Kjeldahla pro HB a polymerické a gravimetrické metody pro TPS podle standardu ČSN 57 0530. HB = celkový N × 6,38.
• Obsah tukuprosté suš. (TPS)	(%)	
• Obsah hrubých bílkovin (HB)	(%)	
• Obsah čistých bílkovin (CB)	(%)	Stanovení metodou Kjeldahl na přístrojích Tecator a Kjeltec Auto Distillation unit 2 200 (Foss-Tecator AB, Sweden) podle ČSN 57 0530. Výsledky získány: bílkovinný N × 6,38 a kaseinový N × 6,38.
• Obsah kaseinu (KAS)	(%)	
• Obsah nebílkovinných dusíkatých látek (NNL)	(%)	Obsah HB – obsah CB
• Obsah syrovátkových bílkovin (SB)	(%)	Obsah CB – obsah KAS
SÝRY		
• Doba enzymatické koagulace mléka	(s)	Zjištění doby enzymatické koagulace mléka (od přidání enzymu do sražení mléka).
• Kvalita sýřeniny (KvS)	stupeň	Subjektivní odhad, aspekci a palpací, 1 = výborná až 4 = špatná.
• Pevnost sýřeniny (PevS)	(mm)	Po enzymatickém sýření - mm propadu tělíska koláčem sýřeniny za konstantních podmínek, čím méně mm, tím pevnější sýřenina.
• Objem vyloučené syrovátky (Syr)	(ml)	Objem syrovátky vypuzené koláčem sýřeniny získané z 50 ml mléka.

3.1.5 Statistické vyhodnocení

Analýza vztahů haplotypů genů mléčných bílkovin k parametrům mléčné užitkovosti byla provedena v programu SAS analýzou rozptylu pomocí následujícího lineárního modelu s pevnými efekty:

$$y_{ijklmn} = \mu + SRO_i + G_j + P_k + B_l + bV_m + e_{ijklmn} \quad (1)$$

kde y je sledovaný parametr mléčné užitkovosti; μ je průměr sledovaného parametru; SRO je sdružený efekt stáda (podniku), roku a období otelení; G je vliv sledovaného haplotypu; P je vliv genetického podílu českého strakatého plemene; B je efekt plemenné hodnoty otce, bV je regrese na věk při prvním otelení plemenice; e je soubor reziduálních efektů.

Analýza vztahů haplotypů genů mléčných bílkovin k parametrům kvality a syřitelnosti mléka byla provedena v programu SAS analýzou rozptylu pomocí následujícího lineárního modelu s pevnými efekty:

$$y_{ijkl} = \mu + SRO_i + G_j + b_1 V_k + e_{ijkl} \quad (2)$$

kde y je sledovaný parametr kvality mléka; μ je průměr sledovaného parametru; G je vliv sledovaného haplotypu; bV je regrese na věk při prvním otelení plemence; e je soubor reziduálních efektů.

V modelu (2) byl nejprve zahrnut i efekt dne laktace od otelení, kdy byl odebrán vzorek mléka na rozbor kvality (tzn. efekt fáze laktace). Ten se však neprojevil jako významný, proto byl z modelu vypuštěn. Výsledky analýz byly i po jeho vyřazení shodné.

Sdružený efekt stáda, roku a období zahrnoval čtyři skupiny podle podniku (chov 1 až 4) a čtyři skupiny podle období otelení (jaro – skupina 1 až zima – skupina 4).

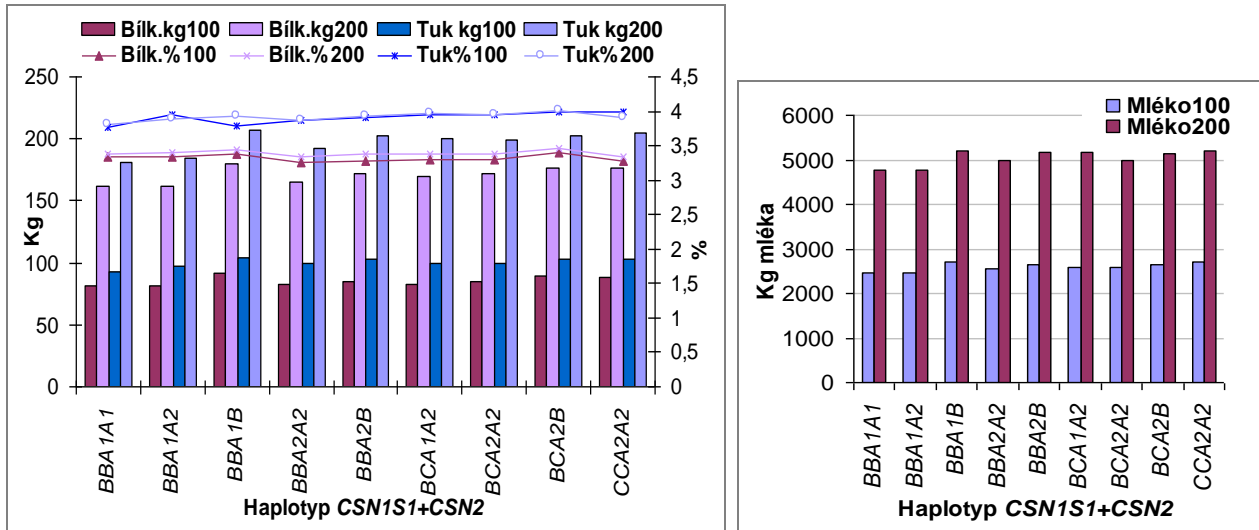
Dle genetického podílu českého strakatého plemene byly sledované prvotelky rozděleny do třech skupin:

- 100 % skupina 1;
- 76 – 99 % skupina 2;
- 50 – 75 % skupina 3.

3.2 Výsledky a diskuze

3.2.1 Efekt haplotypů genů mléčných bílkovin na parametry mléčné užitkovosti

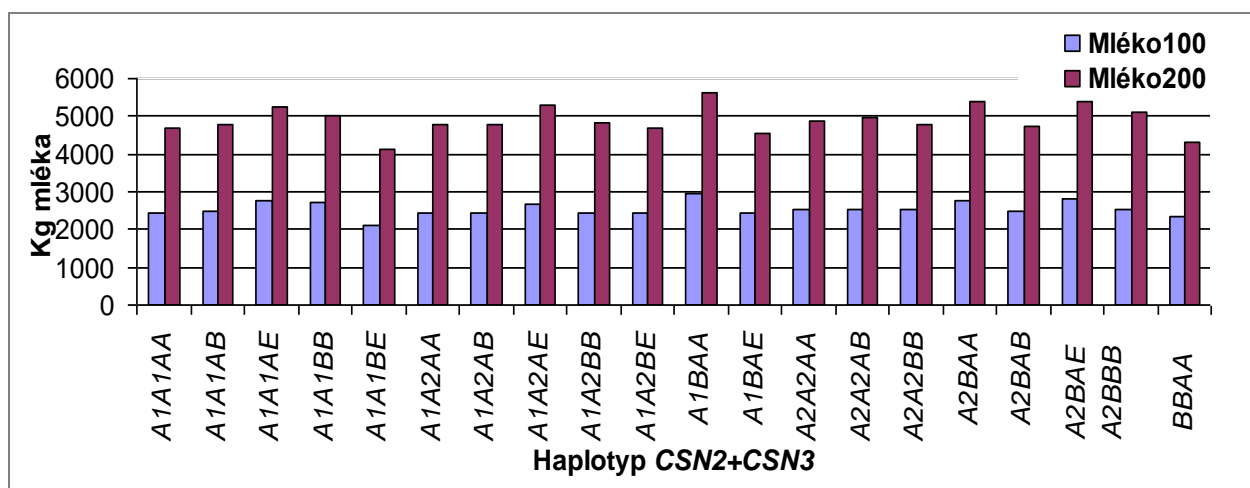
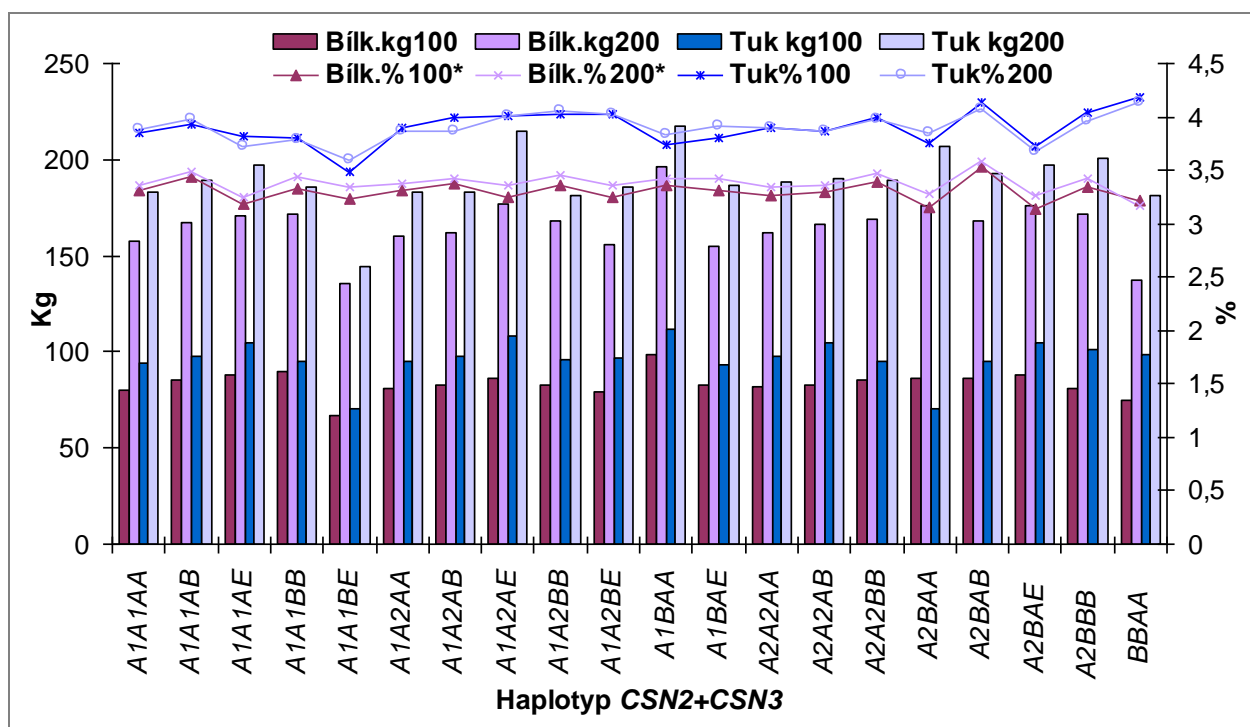
Grafy 1, 2: Efekt haplotypů *CSN1S1* a *CSN2* na parametry mléčné užitkovosti u sledovaných prvotetek za prvních 100 a 200 dnů laktace (n=429)



Haplotypy genů *CSN1S1* a *CSN2* nevykázaly statisticky významný vztah ke sledovaným parametrům mléčné užitkovosti za 100 a 200 denní úsek laktace (grafy 1 a 2). Celkem bylo detekováno 9 haplotypů. Výsledky spojené s haplotypy BBA^1A^1 a CCA^2A^2 poukazují na vliv alely *B* genu *CSN1S1* a alely A^1 genu *CSN2* na nižší produkci mléka a bílkovin, ale na vyšší obsah bílkovin, zatímco u alely *C* genu *CSN1S1* a alely A^2 genu *CSN2* je tomu naopak (tzn. vliv na vyšší produkci, ale nižší obsah složek). Průměrné hodnoty obsahu a produkce bílkovin a tuku byly v souladu s uvedeným zjištěním zaznamenány u haplotypu BCA^1A^2 , produkce mléka byla u krav nesoucích tento haplotyp vysoká.

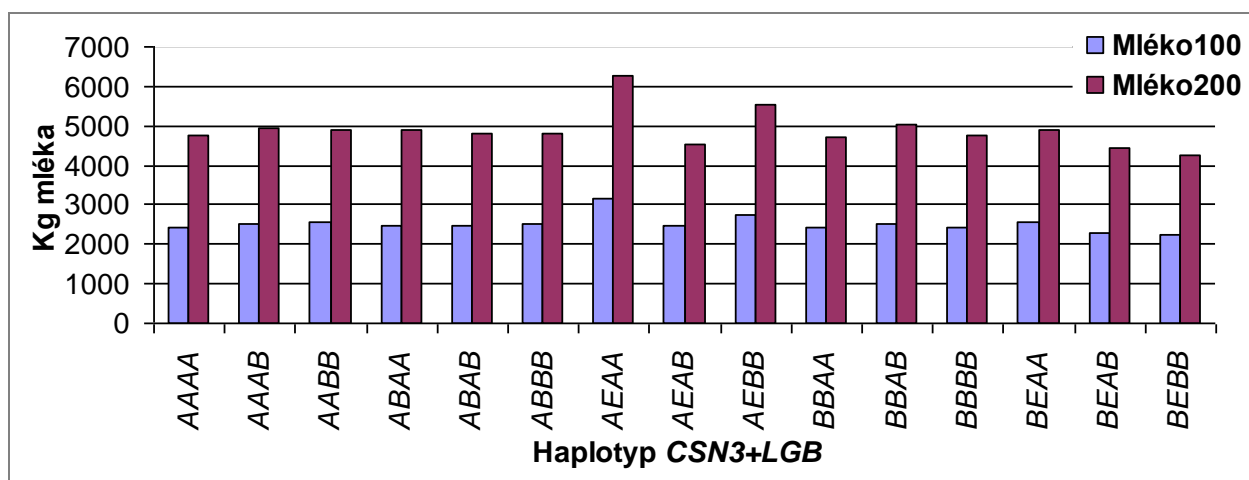
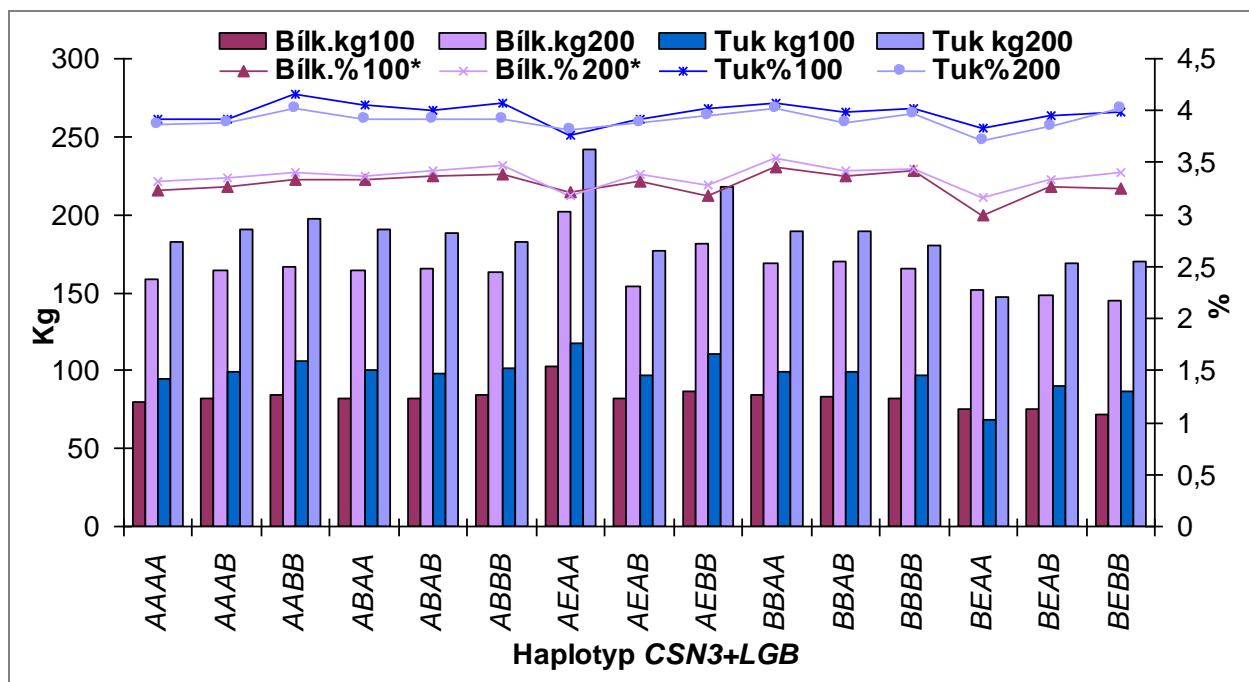
Statisticky významný vztah haplotypů genů *CSN2* a *CSN3* byl zjištěn k obsahu bílkovin v mléce (graf 3). Z dvaceti detekovaných kombinací byly s nejvyšším obsahem bílkovin spojeny haplotypy obsahující alelu *B* a genotyp *BB* genu *CSN3*. Haplotypy obsahující alelu *A* nebo *E* genu *CSN3* byly spojeny s vyššími produkčními parametry. Vliv genu *CSN3* se v haplotypových kombinacích zřetelně projevil a efekty jeho alel převážily nad efekty alel genu *CSN2*. Rovněž Comin et al. (2006) zaznamenali nejnižší produkci mléka a bílkovin u krav s haplotypy (A^1A^2BB a A^1BAB) obsahujícími alelu *B* a genotyp *BB* genu *CSN3*.

Grafy 3,4: Efekt haplotypů CSN2 a CSN3 na parametry mléčné užitkovosti u sledovaných prvotetek za prvních 100 a 200 dnů laktace (n=429; * značí statistickou významnost $P < 0,05$)



Rovněž v kombinaci genů CSN3 a LGB (grafy 4 a 5) se projevil statisticky významný vztah genu CSN3 k obsahu bílkovin v mléce, který byl zjištěn rovněž v kombinaci s genem CSN2. Z patnácti detekovaných haplotypů byl nejvyšší obsah bílkovin a tuku spojen s kombinacemi BBAA, ABBB a BBBB naopak nejvyšší produkci mléka, bílkovin a tuku vykázaly genotyp AEAA a AEBB. Tento výsledek poukazuje na výrazný vliv alely B genu CSN3 na vyšší obsah bílkovin v mléce a zároveň vliv alel A a E genu CSN3 na vyšší mléčnou užitkovost. Obdobný trend je patrný i u alel A a B genu LGB. Obdobný trend zaznamenali Matějčiček et al. (2007), kteří zjistili nejvyšší produkci mléka a bílkovin v případě haplotypu ABAA a nejvyšší obsah bílkovin a tuku u haplotypu BBAB.

Grafy 5,6: Efekt haplotypů *CSN3* a *LGB* na parametry mléčné užitkovosti u sledovaných prvotetek za prvních 100 a 200 dnů laktace ($n=429$; * značí statistickou významnost $P<0,05$)

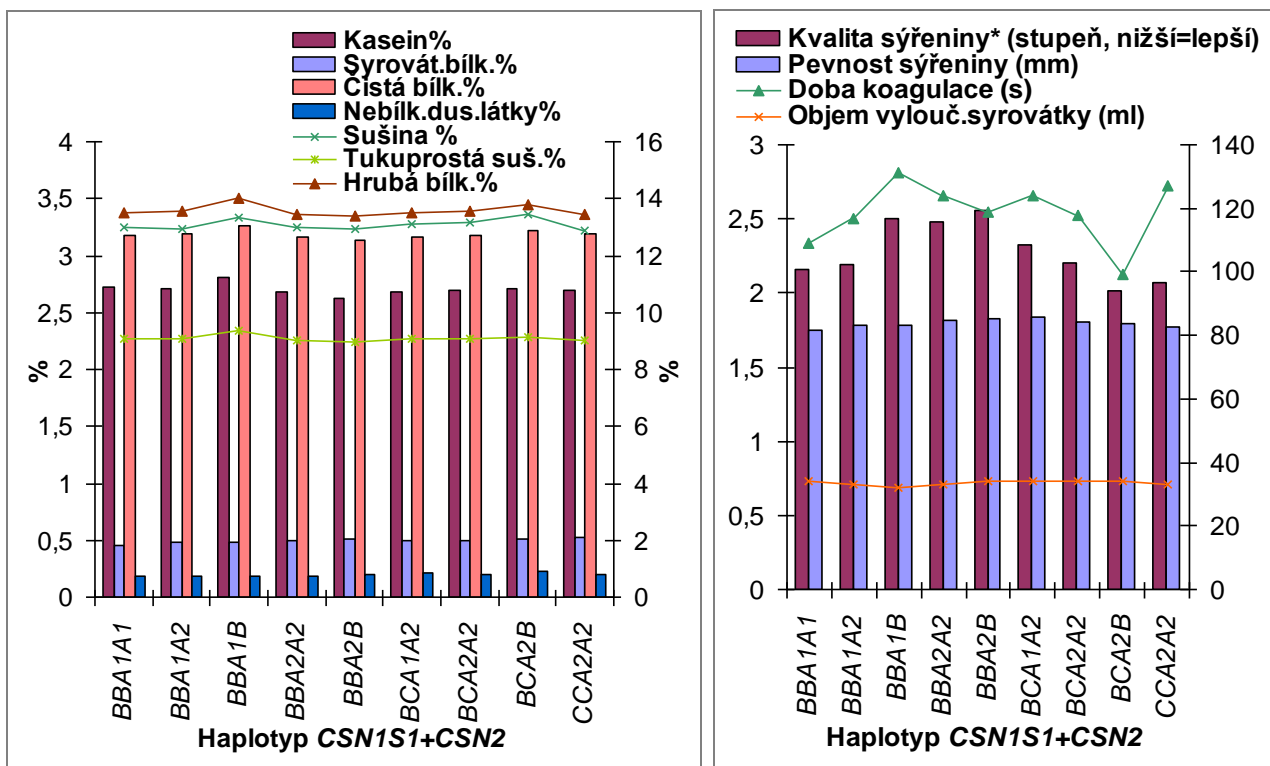


Při testování haplotypů genů *CSN1S1*+*CSN2*+*CSN3* a *CSN2*+*CSN3*+*LGB* se opět projevilo nejvýraznější efektem genu *CSN3*. Haplotypové kombinace obsahující alelu *B* a genotyp *BB* genu *CSN3* vykazovaly vyšší obsah bílkovin a naopak haplotypy obsahující alelu *A* či *E* vykazovaly vyšší produkci mléka. Obdobně efektem genu *LGB* byl v případě alely *A* zaznamenán spíše na produkci, zatímco v případě alely *B* na obsah složek mléka. Efekty alel genů *CSN1S1* a *CSN2* nebyly výrazné.

3.2.2 Efekt haplotypů genů mléčných bílkovin na parametry technologické kvality a syřitelnosti mléka

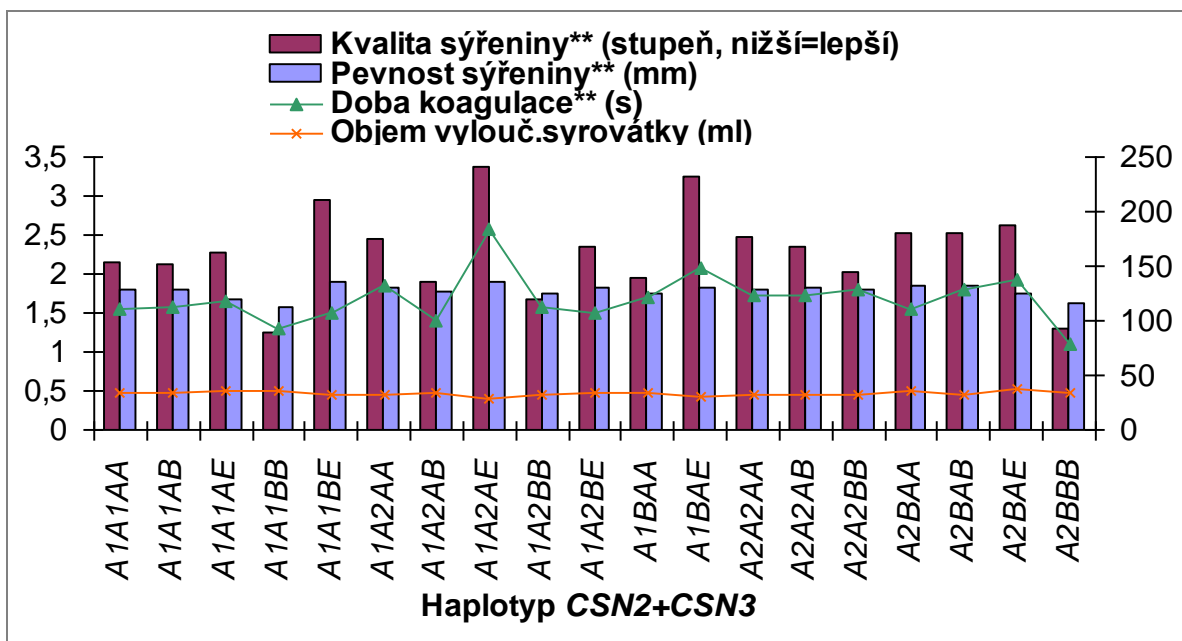
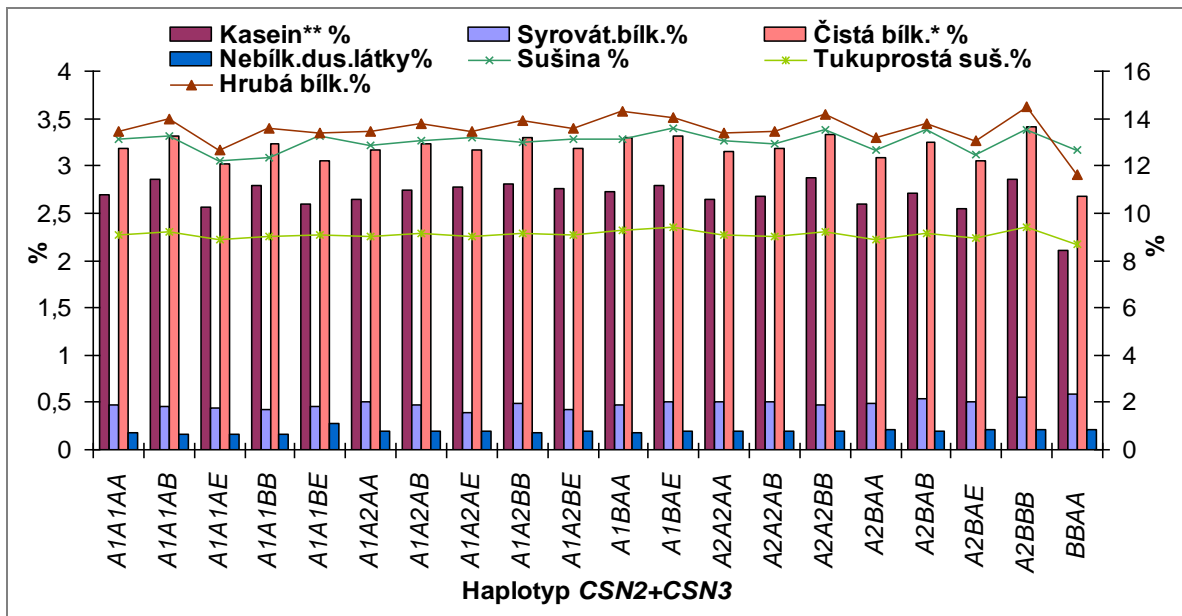
Vztah haplotypů *CSN1S1* a *CSN2* k parametrům kvality mléka a syřitelnosti byl zjištěn statisticky významný pouze ke kvalitě sýřeniny (grafy 7 a 8). V souladu se zjištěním efektu alel na parametry mléčné užitkovosti byl zaznamenán vztah haplotypů obsahujících alelu *B* genu *CSN1S1* a alelu *A¹* genu *CSN2* k vyššímu obsahu kaseinu, hrubých i čistých bílkovin, sušiny a k dobré kvalitě sýřeniny (*BBA¹A¹* a *BBA¹A²*). Naopak haplotypy obsahující alelu *C* genu *CSN1S1* a alelu *A²* genu *CSN2* vykázaly horší obsahové parametry, ale ve dvou případech lepší kvalitu sýřeniny (*CCA²B* a *CCA²A²*). Ostatní sledované parametry byly mezi haplotypy vyrovnané s výjimkou doby koagulace.

Grafy 7, 8: Efekt haplotypů *CSN1S1* a *CSN2* na parametry technologické kvality a syřitelnosti mléka u sledovaných prvotetek ($n=429$; * značí statistickou významnost $P<0,05$)



Společný efekt genů *CSN2* a *CSN3* byl prokázán na obsah kaseinu a obsah čistých bílkovin, z parametrů syřitelnosti na kvalitu a pevnost sýřeniny a dobu koagulace (grafy 9 a 10). Pozitivní vliv na sledované parametry měly haplotypy obsahující alelu *A¹* genu *CSN2* a alelu *B* či genotyp *BB* genu *CSN3* (*A¹A¹BB*, *A¹A¹AB*, *A¹A²BB*, *A²A²BB* a *A²BBB*). Nepříznivý efekt byl zaznamenán u většiny haplotypů obsahujících alelu *E* genu *CSN3*. Rovněž Comin et al. (2006) uvádějí v souladu s našimi výsledky haplotypové kombinace *A¹A¹AB*, *A¹A²BB*, *A¹A²AB*, *A²BBB* a *A²BAB* jako pozitivní ve vztahu ke sledovaným parametrům kvality a syřitelnosti mléka. Autoři dále uvádějí, že efekt *CSN2* je patrný spíše na parametry mléčné užitkovosti, naopak klíčový efekt genu *CSN3* je zaměřen na parametry technologické kvality mléka.

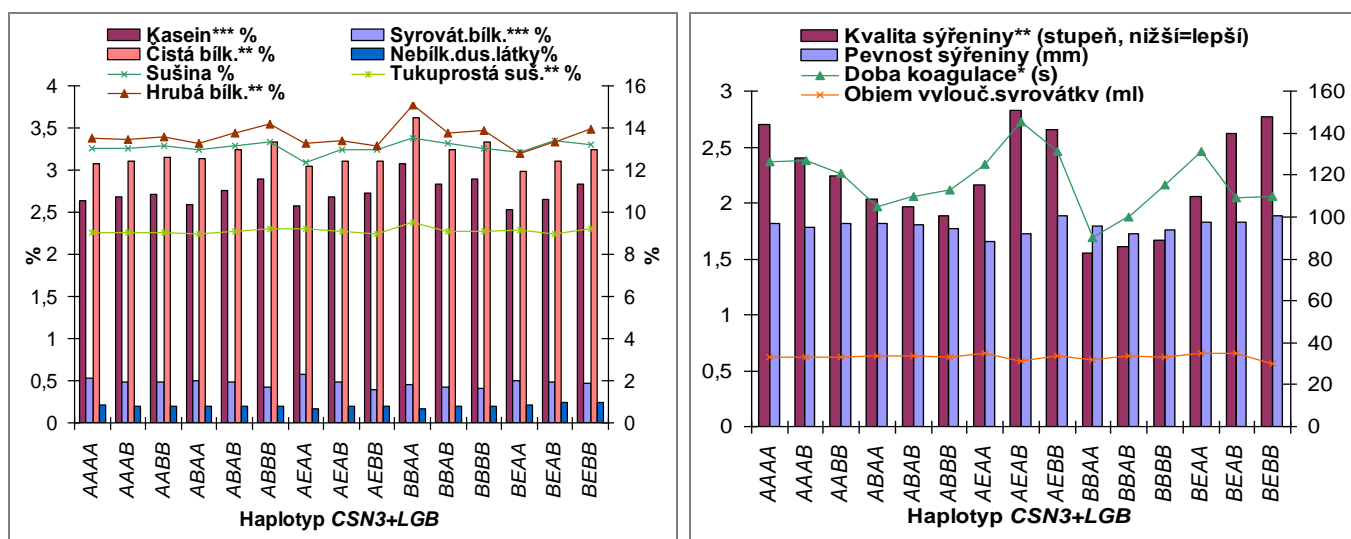
Grafy 9, 10: Efekt haplotypů CSN2 a CSN3 na parametry technologické kvality a syřitelnosti mléka u sledovaných prvotetek (n=429; * a ** značí statistickou významnost $P < 0,05$ a $P < 0,01$)



Jako nejvýznamnější z hlediska parametrů kvality a syřitelnosti mléka byl zjištěn společný efekt genů *CSN3* a *LGB* (grafy 11 a 12). Významnost vztahů haplotypů *CSN3* a *LGB* k obsahu kaseinu a syrovátkových bílkovin byla zjištěna $P < 0,001$, k obsahu hrubých a čistých bílkovin, tukuprosté sušiny a kvalitě sýřeniny $P < 0,01$ a k době koagulace $P < 0,05$. Nejpriznivější výsledky byly zaznamenány u haplotypových kombinací *BBAA*, *BBBB*, *BBAB*, *ABBB* a *ABAB*. Nejméně příznivé hodnoty parametrů byly spojeny s haplotypy obsahujícími alelu *E* genu *CSN3*. Podobně i Choi a Ng-Kwai Hang (2002) uvádějí jako nejpriznivější kombinace haplotypů *CSN3* a *LGB* pro výrobu sýrů *BBBB*, *BBAB*, *BBAA*, *ABBB* a *AABB*, naopak za nejméně příznivé považují genotypy *AAAA* a *AAAB*. Autoři však ve sledované populaci krav nezjistili přítomnost alely *E* genu *CSN3*.

Při společném testování haplotypů genů *CSN1S1*+*CSN2*+*CSN3* a *CSN2*+*CSN3*+*LGB* se stejně jako v případě parametrů mléčné užitkovosti projevily nejvýraznější efekty genu *CSN3*. Haplotypové kombinace obsahující alelu *B* a genotyp *BB* genu *CSN3* vykázaly vyšší obsah bílkovin, kaseinu, tukuprosté sušiny a lepší kvalitu syřeniny, oproti haplotypům ostatním. Naopak kombinace obsahující alelu *A* či *E* genu *CSN3* vykázaly méně příznivé ukazatele kvality, zejména obsahu kaseinu a kvality syřeniny. Podobně alela *B* genu *LGB* vykázala v haplotypových kombinacích příznivější efekt na ukazatele kvality a syřitelnosti oproti alele *A*. Vliv genů *CSN1S1* a *CSN2* nebyl výrazný.

Grafy 11, 12: Efekt haplotypů *CSN3* a *LGB* na parametry technologické kvality a syřitelnosti mléka u sledovaných prvotek (n=429; *, **, *** značí statistickou významnost $P < 0,05$, $P < 0,01$ a $P < 0,001$)



3.3 Závěr a doporučení pro praxi

Ve vztahu haplotypových kombinací sledovaných genů k parametrům mléčné užitkovosti, technologické kvality a syřitelnosti mléka byl prokázán nejvýznamnější vliv genu *CSN3*, zejména na parametry kvality mléka a syřitelnosti. Haplotypové kombinace obsahující alelu *B* a genotyp *BB* genu *CSN3* vykázaly vyšší obsah bílkovin, kaseinu, tukuprosté sušiny a lepší kvalitu syřeniny oproti haplotypům ostatním. Naopak kombinace obsahující alelu *A* nebo *E* genu *CSN3* byly většinou spojeny s vyšší produkcí, ale horší kvalitou a syřitelností mléka. Podobný pozitivní efekt na kvalitu a syřitelnost mléka byl zaznamenán u alely *B* genu *LGB* oproti alele *A*. Významnost efektů genů *CSN1S1* a *CSN2* se v haplotypových kombinacích výrazně neprojevila. Z výsledků je však patrný vztah alely *C* genu *CSN1S1* a alely A^2 genu *CSN2* k parametrům produkce a zároveň ke kvalitě syřeniny oproti alele *B* genu *CSN1S1* a alele A^1 genu *CSN2*.

Na základě výsledků a výše uvedených závěrů je možné doporučit jako doplňkové kritérium pro šlechtění českého strakatého skotu ve vztahu k obsahu bílkovin, technologické kvalitě a syřitelnosti mléka preferenci alely *B* a genotypu *BB* genu *CSN3* a genu *LGB* a naopak snížení výskytu alely *E* genu *CSN3*. V případě méně výrazných efektů genů *CSN2* a *CSN1S1* se jako výhodnější jeví alely *A¹* i *A²* genu *CSN2* a pro vyšší užitkovost a kvalitu sýřeniny alela *C* oproti alele *B* genu *CSN1S1*.

Zkratky: *CSN1S1* - alfa_{S1} kasein (α_{S1} -CN);

CSN2 - beta kasein (β -CN);

CSN3 - kapa kasein (κ -CN);

LGB - beta laktoglobulin (β -LG).

III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Geny s přímým vztahem k parametrům mléčné užitkovosti, kvality a syřitelnosti mléka je možné využít ve šlechtění, zejména jako doplňkové kritérium pro rychlejší a účinnější změny těchto parametrů. Předkládaná metodika se zabývá výzkumem vztahů haplotypů genů mléčných bílkovin k parametrům mléčné užitkovosti a technologické kvality a syřitelnosti mléka u krav českého strakatého skotu. V tomto směru je ojedinělou prací na daném plemeni. Výsledky přinášejí informace o možnosti využití haplotypů sledovaných genů ve šlechtění českého strakatého skotu, zejména v oblasti selekce zvířat.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY

Metodika je určena organizacím zabývajícím se šlechtěním českého strakatého skotu a dále chovatelům českého strakatého plemene. Záměrem metodiky je snaha o umožnění chovatelům a šlechtitelům rychleji a efektivněji zvyšovat kvalitu mléka a zvýšit tak konkurenceschopnost plemene na trhu s mlékem.

V. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Agrawala P.L., Wagner V.A., Geldermann H. (1992): Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. *Theriogenology*, 38:969-978.
- Amigo L., Martin-Alvarez P.J., Garcia-Muro E., Zarazaga I. (2001): Effect of milk protein haplotypes on the composition and technological properties of Fleckvieh bovine milk. *Milchwissenschaft*, 56:488-491.
- Boettcher P.J., Caroli A., Stella A., Chessa S., Budelli E., Canavesi F., Ghiroldi S., Pagnacco G. (2004): Effects of Kasein Haplotypes on Milk Production Traits in Italián Holstein and Brown Swiss Cattle. *J. Dairy Sci.*, 87:4311-4317.
- Bouška J., Doležal O., Jílek F., Kudrna V., Kvapilík J., Příbyl J., Rajmon R., Sedmíková M., Skřivanová V., Šlosárková S., Tyrolová Y., Vacek M., Žižlavský J. (2006): Chov dojeného skotu. Profí Press, s.r.o., Praha, 1. vyd., 186 s.
- Buchberger J., Dovc P. (2000): Lactoprotein genetic variants in cattle and cheese making ability. *Food Technology and Biotechnology*, 38:91-98.
- Caroli A., Chessa S., Bolla P., Budelli E., Gandini G. C. (2004): Genetic structure of milk protein polymorphism and effects on milk production traits in a local dairy cattle. *J. Anim. Breed. Genet.*, 121:119-127.
- Comin A., Cassandro M., Ojala M., Bittante G. (2006): Effect of β - and κ -casein genotypes on milk coagulation properties, milk production and content, and milk quality traits in Italian Holstein cows. 57th Annual Meeting of the EAAP, 17. - 20.9.2006, Antalya, Turkey.
- Čejna V., Mlček J., Chládek G. (2006): Vliv plemene a pořadí laktace na obsah kaseinu v kravském mléce. In: Sborník z konference s mezinárodní účastí „Den mléka“, 22.5.2006, ČZU Praha, 98-99.
- Eigel W.N., Butler J.E., Ernstrom C.A., Farrell H.M., Harwalkar V.R., Jenness R., Whitney R.McL. (1984): Nomenclature of proteins of cow's milk. *J. Dairy Sci.*, 67:1599-1631.
- Erhardt G. (1989): κ -caseins in bovine milk. Evidence of a further allele (κ -Cn E) in different breeds. *J. Anim. Breed. Genet.*, 106:225-231.
- Farrell H. M., Jimenez-Flores R., Bleck G. T., Brown E. M., Butler J. E., Creamer L. K., Hicks C. L., Hollar C. M., Ng-Kwai-Hang K. F., Swaisgood H. E. (2004): Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk - Sixth Revision. *J. Dairy Sci.*, 87:1641-1674.
- Graml R., Pirchner F. (2003): Effects of milk protein loci on content of their proteins. *Archiv für Tierzucht*, 46:331-340.
- Hanuš O., Gajdůšek S., Gabriel B., Kopecký J., Jedelská R. (1995): Sýrařsky významné vlastnosti syrového a pasterovaného mléka ve vztahu k polymorfismu mléčných bílkovin. (Cheesemaking properties of raw and pasteurized milk with respect to milk protein polymorphism). *Czech J. Anim. Sci.*, 40:523-528.
- Hanuš O., Beber K., Kopecký J. (2000a): Varianty mléčných bílkovin a vlastnosti mléka a krav. In: Sborník příspěvků z mezinárodní konference „Šlechtitelské, výživářské a technologické aspekty produkce a kvality mléka“ („Breeding, nutritional and technological aspects of milk production and duality“). Rapotín, 47-49.

- Hanuš O., Beber K., Čermák V., Kopecký J., Jedelská R. (2000b): Typy mléčných bílkovin ovlivňují užítkovost, dlouhověkost i zdraví krav. In.: Sborník příspěvků z mezinárodní konference „Šlechtitelské, výživářské a technologické aspekty produkce a kvality mléka“ („Breeding, nutritional and technological aspects of milk production and duality“). Rapotín, 53-57.
- Choi J. W., Hg-Kwai-Hang K. F. (2002): Effects of genetic variants of κ -casein and β -lactoglobulin and Heat Treatment of Milk on Cheese and Whey Compositions. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 5:732-739.
- Ikonen T., Ojala M., Syvaioja E.L. (1997): Effects of composite casein and beta-lactoglobulin genotypes on renneting properties and composition of bovine milk by assuming an animal model. *Agricultural and Food Science in Finland*, 6:283-294.
- Jann O., Prinzenberg E. M., Brandt H., Williams J. L., Ajmone-Marsan P., Zaragoza P., Ozbeyaz C., Erhardt G. (2002): Intragenic haplotypes at the bovine *CSN1S1* locus. *Arch. Anim. Breed.*, 41: 13-21.
- Kawasaki E.S. (1990): Sample preparation from blood, cells and another fluids. In: PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic Press, New York, 146-152.
- Kräusslich H. (1994): Tierzuchtungslehre., 4. vyd., Stuttgart, Ulmer Verlag: 464 s.
- Lien S., Alestrom P., Klungland H., Rogne S. (1992): Detection of multiple β -casein (*CASB*) alleles by amplification created restriction sites (ACRS). *Anim. Genet.*, 23:333-338.
- Lien S., Rogne S. (1993): Bovine casein haplotypes: number, frequencies and applicability as genetic markers. *Anim. Genet.*, 24:373-376.
- Mášová H., Šustová K. (2006): Obsah kaseinu u plemen české strakaté a holštýnské. In: Sborník z konfer. s mezinárodní účastí „Den mléka“, 22.5.2006, ČZU Praha, 95-97.
- Neubauerová V. (2001): Detekce genetických markerů a možnosti jejich využití u skotu a dalších kopytníků. Disertační práce. JU v Českých Budějovicích, 211.
- Ng-Kwai-Hang K.F. (1998): Genetic polymorphuism of milk proteins: Relationships with production traits, milk composition and technological properties. *Can. J. Anim. Sci.*, 78:131–147.
- Panicke L., Freyer G., Erhardt G. (1996): Effekte der Milchproteinpolymorphismen auf die Leistung. In: Kolloquium Milchprotein und Proteinansatz, Graal-Müritz, FBN Dummerstorf, Universität Rostock, 20.
- Zwierzchowski L. (2005): Cattle genomics – functional polymorphism in milk protein genes and other genes related to milk and meat production. Workshop on genomics and bioinformatics in animal biotechnology, Jastrzebiec 31.1. – 4.2. 2005, Poland.

VI. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Vědecké impaktované publikace:

Matějčec A., Matějčková J., Štípková M., Hanuš O., Genčurová V., Kysel'ová J., Němcová E., Kott T., Šefrová J., Krejčová M., Melčová S., Hölzelová I., Bouška J., Frelich J. (2008): Joint effects of *CSN3* and *LGB* genes on milk quality and coagulation properties in Czech Fleckvieh. Czech J. Anim. Sci., 53:246-252.

Vědecké recenzované publikace:

Matějčková J., Matějčec A., Štípková M., Kyselová J., Hanuš O., Genčurová V., Kott T., Šefrová J., Krejčová M., Melčová S. (2009): Vztah haplotypů genů *CSN2* a *CSN3* k technologické kvalitě a syřitelnosti mléka u českého strakatého skotu. Acta fytotechnica et zootechnica, 12:54-56.

Matějčec A., Matějčková J., Štípková M., Kysel'ová J., Hanuš O., Genčurová V., Němcová E., Kott T., Šefrová J., Krejčová M., Melčová S., Hölzelová I., Bouška J. (2008): Effect of *CSN2* and *CSN3* haplotypes on milk quality and coagulation properties in Czech Fleckvieh. Výzkum v chovu skotu / Cattle Research, 4:20-27.

Sborníky z konferencí:

Matějčková J., Matějčec A., Štípková M., Hanuš O., Genčurová V., Kysel'ová J., Kubešová M., Němcová E., Kott T., Šefrová J., Krejčová Bouška J. (2008): Joint effects of *CSN3* and *LGB* genes on coagulation properties in Czech Fleckvieh. Book of Abstracts of the 59th Annual Meeting of the EAAP, 24.-24.8.2008, Vilnius, Lithuania, 277.

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

Název: **Využití haplotypů genů mléčných bílkovin pro zlepšení technologické kvality mléka u českého strakatého skotu**

Autoři: Ing. Jitka Matějčková, Ph.D.
Ing. Miloslava Štípková
Ing. Mgr. Jana Bolečková
Ing. Jaroslava Šefrová, DiS.
Michaela Krejčová

ISBN: 978-80-7403-056-7

Dedikace: Metodika vznikla v rámci řešení výzkumného záměru MZE0002701404.