



VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v.v.i.

Věra Mátlová a Zuzana Sztankóová

**Využití polymorfismu genů mléčných bílkovin
pro zlepšení kvalitativních a technologických
vlastností mléka koz**





VÝZKUMNÝ ÚSTAV ŽIVOČIŠNÉ VÝROBY, v. v. i.
Praha Uhřetěves

CERTIFIKOVANÁ METODIKA

**Využití polymorfismu genů mléčných bílkovin pro zlepšení kvalitativních
a technologických vlastností mléka koz**

Autoři

Ing. Věra Mátlová
Ing. Zuzana Sztankóová, PhD.

Oponenti

doc. Ing. Milena Fantová, CSc.
Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Ing. Jaroslav Oplt, CSc.
Ministerstvo zemědělství české republiky
Odbor živočišných komodit

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu 1G57051, podporovaného
Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV), řešeného v letech 2005-2008

Ministerstvo zemědělství České republiky
Těšnov 17
117 05 Praha 1

v y d á v á

OSVĚDČENÍ

17210/2010 - 19

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

*Využití polymorfismu genů mléčných bílkovin pro zlepšení kvalitativních a
technologických vlastností mléka koz*

Ing. Věra Mátlová

Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves
ISBN 978-80-7403-076-5

Vypracované v rámci výzkumného projektu/záměru NAZV č. 1G57051

Využití genetických zdrojů národních plemen ovcí a koz pro produkci geneticky
definovaných mléčných výrobků s různými nutričními a organoleptickými vlastnostmi
(NAZV, 2005-2008)

V Praze dne 20. prosince 2010



Ing. Jiří Machek
ředitel odboru
živočišných komodit 17 210

.....

ISBN 978-80-7403-076-5

OBSAH

I. Cíl metodiky	4
II. Vlastní popis metodiky	5
1. Podstata metody - polymorfismus mléčných proteinů a možnosti jeho využití	5
1.1. Složení a technologické vlastnosti kozího mléka	5
1.2. Geny se vztahem k mléčné užitkovosti jejich polymorfismus	6
1.3. Využití informace na úrovni genů ve šlechtění	7
1.4. Variabilita národních plemen koz na úrovni genů mléčných bílkovin	8
1.5. Vztah kvalitativních a technologických parametrů mléka a genotypu kaseinů u našich plemen	11
1.6. Hodnoty obsahu mléčných složek zjišťované v kontrole užitkovosti	13
2. Potenciální přínos genotypizace	18
2.1. Vliv jedinců – nositelů „silných alel“	18
2.2. Využití v praxi	22
III. Srovnání novosti postupu	28
IV. Popis uplatnění certifikované metodiky	28
V. Ekonomické aspekty	29
VI. Seznam použité související literatury	31
VII. Seznam publikací, které předcházely metodice	32

I. CÍL METODIKY

Složky mléka a jeho technologická kvalita určují ekonomiku výroby sýrů a dalších mléčných výrobků, které jsou hlavním produktem chovu koz. Tyto parametry jsou zásadně ovlivněny geny mléčných bílkovin a jejich interakcí. Současné výsledky výzkumu nabízí nové možnosti využití této skutečnosti ve šlechtitelských postupech, které mohou zvýšit efektivitu a konkurenceschopnost tohoto alternativního odvětví živočišné výroby.

Cílem metodiky je

- poskytnout odborným pracovníkům uznaného chovatelského sdružení (SCHOK) podklady ke zavedení pokročilých metod do kontroly užitečnosti a selekčního programu,
- poskytnout nové informace o národních plemenech koz za účelem zkvalitnění výběru jedinců do podporovaného genetického zdroje a do konzervačních projektů v rámci Národního programu genetických zdrojů zvířat,
- seznámit chovatele s metodou využití polymorfismu mléčných proteinů u koz pro zlepšení složení a technologických vlastností kozího mléka
- a poskytnout všem uživatelům konkrétní návod jak při využití této metody postupovat a podpořit tak její uvedení do praxe.

II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

1. Podstata metody - polymorfismus mléčných proteinů a možnosti jeho využití

1.1. Složení a technologické vlastnosti kozího mléka

Složení kozího mléka je ovlivněno plemenem, výživou, faktory životního prostředí, stádiem laktace, genetickými vlivy a ročním obdobím. Průměrné složení kozího mléka a rozsahy hlavních mléčných složek z dostupných údajů různých plemen ukazuje tabulka č.1 (hodnoty bílkovin reprezentuje hrubá bílkovina tj. celkový dusík vynásobený 6,38).

Tab. 1. Celkové složení kozího mléka

Složky mléka	průměr	min.	max.
celková sušina (%)	13.02	9.95	21.5
tuk (%)	4.2	2.46	7.76
hrubá bílkovina (%)	3.52	2.49	5.06
kasein (%)	2.9	2.33	4.63
laktóza (%)	4.52	3.62	6.3
minerální látky (%)	0.8	0.69	0.89

Tziboula-Clarke: Goat Milk, Encyklopedia Dairy Science, Academic press, 2003

Sušinu kozího mléka tvoří tuk, bílkoviny, laktóza a minerální látky.

Tuk je tvořen menšími tukovými kuličkami, které mají relativně více nasycených mastných kyselin s délkou řetězce 4-12 atomů uhlíku. Typická chuť a vůně kozího mléka je způsobena vyšším podílem kyselin kaprylové, kaprinové a kapronové. V mléce našich koz tvoří 10-18% podíl z celkového obsahu mastných kyselin. Mezi jejich obsahem a genotypem mléčných bílkovin nebyla nalezena žádná souvislost.

Hlavní složkou **bílkovin** jsou stejně jako u kravského mléka **kaseiny** (alfa S1 a S2, beta a kapa) a **syrovátkové bílkoviny** (beta laktoglobulín, alfa laktalbumín, seroalbumín, imunoglobulín a laktoferín). Kasein se v mléce shlukuje do tzv. micel, jejichž pevnost závisí na obsahu dalších látek, hlavně vápníku a fosforu. Pro tvorbu sýřeniny je ideální obsah nad 120 mg vápníku /100g sušiny. Hodnoty zjišťované v mléce našich plemen se pohybovaly od 89,1 do 160,5 mg / 100 g s průměrem 117,3 mg / 100 g.

Obsah a typ kaseinů v mléce ovlivňuje technologické vlastnosti mléka, zejména **sýřitelnost** (čas potřebný ke koagulaci mléka). Kaseiny kozího mléka, α S1-kasein, α S2-kasein, β -kasein a κ -kasein, se od kravského liší množstvím a svým poměrným zastoupením, proto se kozí mléko sráží rychleji než mléko kravské a tvoří méně pevnou sýřeninu. Ekonomicky významným ukazatelem kvality mléka je **výtěžnost**, udávaná v sýrových jednotkách, které přecházejí do sýra ze zpracovaného 1 kg mléka:

$$SJ = \left[\left(\text{hmotnost sýřeniny (g)} \times \text{sušina sýřeniny \%} \right) - \left(\text{hmotnost sýřeniny (g)} \times \text{tučnost sýřeniny \%} \right) \right] : \text{navážka mléka (g)}$$

Hodnoty sýřitelnosti zjišťované u mléka našich plemen se pohybovaly od 0,2 do 9,4 minut (průměrně 2,9 minut), přitom u mléka s nízkým obsahem α_{S1} -kaseinu (genetická varianta α_{S1} -kaseinu F0) byl delší (3,1 min). Pro porovnání, u kravského mléka je průměrná doba 5-7 minut.

Hodnoty výtěžnosti u jednotlivých vzorků mléka se pohybovaly od 2,30 SJ (genetická varianta α_{S1} -kaseinu F0) do 4,69 SJ (genetická varianta α_{S1} -kaseinu AA)

1.2. Geny se vztahem k mléčné užitkovosti jejich polymorfismus

Polymorfizmem se v genetice rozumí existence více variant (alel) určitého genu.

Zkoumání genetického polymorfizmu kaseinových genů (α_{S1} -, β -, α_{S2} - a κ -kasein) má zvyšující se tendenci právě u koz, protože polymorfismus mléčných kaseinů je ve spojitosti nejen s kvantitativní, ale i kvalitativní variabilitou (obsahová složka, koagulační vlastnosti mléka, výtěžnost sýra a jeho stabilita, velikost a mineralizace micel).

Alfa S1 kasein (CSN1S1)

Alfa S1 kasein je zodpovědný za velkou individuální variabilitu obsahu kaseinu v mléce. Významně ovlivňuje koagulační vlastnosti mléka, výtěžnost sýra, sensorické a technologické vlastnosti (formování micel, které určují kvalitu sraženiny). V současnosti je pro tento gen popsáno 17 variant - alel, které se od sebe liší rozdílným stupněm syntézy proteinu. Dle obsahu CSN1S1 kaseinu v mléce jsou genetické varianty CSN1S1 klasifikovány do čtyřech skupin:

silné alely: A, B1, B2, B3, B4, C, H, L, M, (syntéza 3,5 – 4,2 g proteinu/ l mléka)
 střední alely: E, I (1,4 – 1,7 g proteinu)
 slabé alely: D, F, G (0,4 – 0,6 g proteinu)
 nulové alely: O1, O2, N (absence CSN1S1 kaseinu).

Typ mléka A (silné alely) má vyšší obsah kaseinů (g/kg), tuků, celkové sušiny a proteinu, ale má menší velikost micel, a obsah vápníku je nižší v porovnání s mlékem typu F (slabé alely). U mléka typu F se setkáváme s většími micelami než u varianty A, B a E. Má lepší tepelnou stabilitu, ale vyšší náchylnost k lipolýze (štěpení tuků) než mléko typu A, takže rychleji žlukne, a to má negativní vliv při dlouhodobé manipulaci (uskladnění) mléka.

Zvláštností kaseinové frakce je, že při snižování množství CSN1S1 kaseinu v mléce, se zvyšuje relativní množství beta, kapa a alfaS2 kaseinů, zároveň i průměr micel je větší.

Alfa S2 (CSN1S2)

V současnosti je pro tento lokus definováno 8 genetických variant: A, B, C, D, E, F, G, 0, které jsou spojeny s rozdílným obsahem Alfa S2 kaseinu v mléce – varianty A, B, C, E, F a G se vyznačují normálním obsahem kaseinu v mléce, varianta D se vyznačuje sníženým obsahem a varianta nula (0) se vyznačuje absencí α S2-kaseinu. Efekt jednotlivých variant tohoto lokusu a jeho funkce doposud nebyl jednoznačně popsán, je předpoklad, že spolu s ostatními kaseinovými frakcemi se podílí na senzoryckých a technologických vlastnostech mléka.

Beta kasein (CSN2)

U koz CSN2 má v kozím mléce nejvyšší zastoupení, přibližně 50% z celkového kaseinového obsahu, což představuje okolo 10 g/l. V současnosti je tento lokus definovaný 8 genetickými variantami, které jsou rozděleny do dvou úrovní podle kaseinového obsahu. Varianty: A, A1, B, C, D, E se vyznačují normálním obsahem, nulové varianty: 0, 0' se vyznačují úplnou absencí beta kaseinu v mléce. Nízký obsah je spojen se zmenšováním velikosti micel, prodloužením času srážení a nestabilní pevnost sraženiny.

Kapa kasein (CSN3)

určuje nutriční vlastnosti mléka (stravitelnost mléčné bílkoviny) a formování a stabilizaci micel, čímž ovlivňuje jeho technologické (výrobní) vlastnosti, výtěžnost a organoleptickou kvalitu. Současný výzkum popisuje 21 variant, z nich 16 (alely D, E, K a M s podobným izoelektrickým bodem IP = 5,66 a alely A, B, C, X, Y, C', F, G, H, I, J, L, B' a B'' s IP = 5,29) je popsáno u evropských plemen, a nové varianty N, O, P, Q a R nalezené v r. 2009 u indického plemene Jakhkana.

1.3. Využití informace na úrovni genů ve šlechtění

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

Metoda kandidátních genů

U dlouhodobě šlechtěných plemen se alely (varianty) některých genů dostaly do příznivých ustálených četností a vazeb. Výzkum struktury a působení určitých genů umožnil prokázat souvislosti variability jednotlivých alel genů s rozdílnou produkční nebo jinou ekonomicky významnou užítkovou vlastností.

Kvantitativní užítkové vlastnosti zvířat jsou ovlivňovány množstvím genů malého účinku, některé geny však mohou mít větší vliv. Geny, které mají efekt na ekonomicky významné

produkční vlastnosti označujeme kandidátní geny. Geny umístěné v těsné blízkosti vedle sebe na jednom nepohlavním chromozomu vytvářejí shluk genů, který označujeme jako haplotyp, a který se zpravidla dědí společně. Metody detekce těchto genů (jejich genetické varianty) mají potenciál pro ovlivňování fyziologických procesů (např. syntézu mléčných proteinů). Na jejich základě je možné určit alelu, která má za následek žádoucí fenotypový projev (výsledek), například lepší sýřitelnost. 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 užitkové vlastnosti ovlivňovat, ale může být ve vazbě s genem, jenž některý znak ovlivňuje. Markery můžeme rozdělit do několika typů, které mají různý stupeň polymorfismu (různorodosti tvarů).

Hlubší poznání struktury DNA, která je tvořena opakující se kombinací 4 druhů nukleotidů – Adenin, Thymin, Guanin a Cytosin a současný technologický vývoj přinesl možnost mnohonásobné analýzy genetické informace a bioinformatické metody se statistickými postupy, které umožňují komplexní zhodnocení velkého objemu dat. Jedním ze slibných směrů se jeví mapování pomocí nového typu markeru, tzv. **SNP** (single nucleotide polymorphisms), tedy jednonukleotidových variací sekvence DNA.

Vyhodnocení rozdílů alel kandidátních genů mezi zvířaty a různým fenotypovým projevem, to znamená s různými ukazateli užitkovosti, nabízí možnost identifikace markeru (polymorfního znaku) spojeného s fenotypovou (užitkovou) hodnotou. Pokud se vztah mezi užitkovostí markerem a prokáže, lze provést časnou selekci mezi zvířaty ještě dříve než je známá jejich vlastní užitkovost. Zjišťování dat užitkovosti je časově i ekonomicky náročné, může být zatíženo řadou chyb – při odběru a analýze vzorků, v zadávání dat do automatického počítačového programu a pod.

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

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 testována na vlastní užitkovost a bez ohledu na informaci o markerech dále selektována.

1.4. Variabilita národních plemen koz na úrovni genů mléčných bílkovin

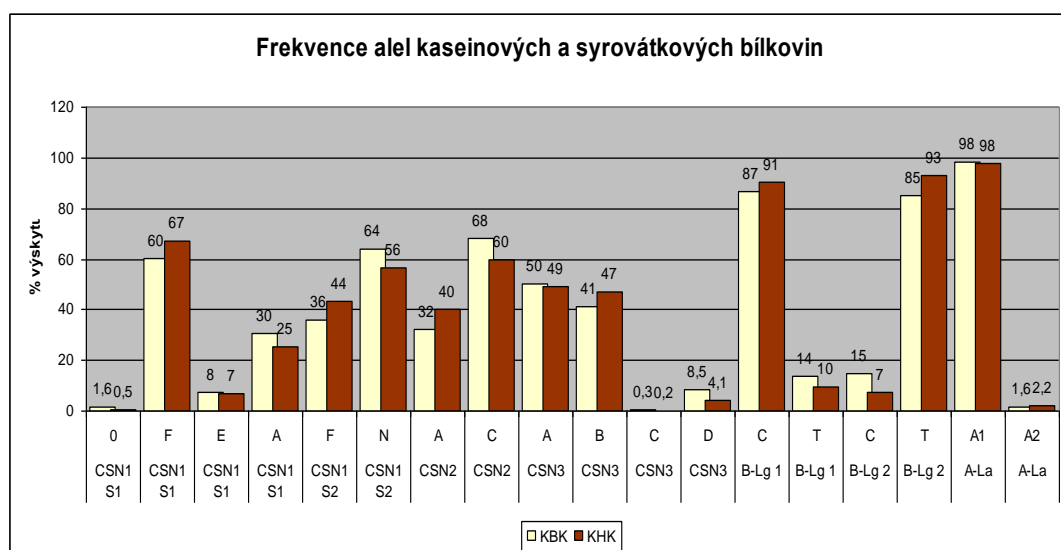
Na základě analýzy cca 800 vzorků DNA bílé a hnědé krátkosrsté kozy byla zjištěna variabilita na sledovaných kaseinových lokusech (odpovídajících místech genů na chromosomu). Podobně byla analyzována variabilita v albuminových lokusech: beta laktoglobulinu 1 a 2 (B-Lg 1, B-Lg 2, a alfa laktalbumínu (A La).

Rozdíly ve frekvencích významných alel resp. jejich konkrétních sestav - genotypů mezi oběma plemeny jsou způsobeny různým vývojem obou plemen v posledních dvou dekádách. Hnědé plemeno bylo od r. 1994 revitalizováno z velmi úzké skupiny cca 200 jedinců, navíc regionálně ohraničené - pozůstatek někdejší rajonizace plemen.

Tab. 2. Frekvence genotypů kaseinových alel u bílého a hnědého plemene (M = kozli, F= kozy)

Frekvence genotypů CSN1S1 (%)				
plemeno	bílé (M)	bílé (F)	hnědé (M)	hnědé (F)
počet analýz	362	465	184	277
A0	0	0,2	1,1	0
E0	1,1	0,6	1,6	0,4
F0	2,5	1,9	0,5	0,7
AA	1,4	0,0	4,3	0,7
FA	50,8	45,2	51,1	49,5
FE	8,8	5,2	13,6	13,4
FF	35,4	46,9	27,7	35,4
Frekvence genotypů CSN1S2 (%)				
počet analýz	65	304	43	201
FF	35,4	29,3	7,0	8,5
FN*	56,9	50,3	58,1	70,1
N*N*	7,7	20,4	34,9	21,4
Frekvence genotypů CSN2 (%)				
počet analýz	13	339	39	202
AA	15,4	7,1	5,1	14,9
AC	69,2	40,1	53,8	50,5
CC	15,4	52,8	41,0	34,7
Frekvence genotypů CSN3 (%)				
počet analýz	330	577	176	234
AA	2,7	4,3	27,8	23,1
AB	31,5	28,6	37,5	47,0
AC	0,6	0,9	0	0,4
BB	61,2	61,2	17,6	21,4
BC	3,9	4,5	0,6	0,0
BD	0	0,5	9,1	3,8
AD	0	0	6,8	4,3
DD	0	0	0,6	0

Graf 1 - souhrnný přehled alel lokusů kaseinových a syrovátkových bílkovin u koz (%)



KBK, KHK – koza bílá krátkosrstá, koza hnědá krátkosrstá

Kombinace alel kaseinových lokusů

Celkem bylo zjištěno 73 různých kombinací alel CSN1S1/CSN1S2/CSN2/CSN3, z toho 48 u bílé kozy a 49 u hnědé kozy. Společných pro obě plemena je 21 kombinací, které představují 70% celkové variability u bílých a 69% variability u hnědých koz. Frekvence těchto kombinací se ale u obou plemen liší.

U bílého plemene bylo nalezeno 23 rozdílných genotypů (v pořadí CSN1S1-CSN2-CSN1S2-CSN3), nejčastější byly genotypy FFCCFFAC (21.5%), FA*ACFN*AB (12%), FA*ACFN*BB (11.1%).

U hnědého plemene bylo nalezeno 29 rozdílných genotypů, z nichž čtyři nejčastější byly FFACFN*AB (10%), FA*ACN*N*BD (8.6%), FA*ACFN*AB a FFACFN*AA (7.1%).

Následně byl vypočítán i odhad frekvence haplotypů kaseinových lokusů a stanoveno 22 možných haplotypů, z nich u KBK byl nejčastější haplotyp F-C-F-B (v pořadí: CSN1S1-CSN2-CSN1S2-CSN3) s frekvencí 0.2605. U KHK byl nejčastější haplotyp F-C-F-A (0.2177)

1.5. Vztah kvalitativních a technologických parametrů mléka a genotypu kaseinů u našich plemen

Vztah zjištěné genetické variability v lokusech mléčných proteinů, chemického složení mléka a jeho technologických vlastností byl v průběhu řešení projektu ověřován několika způsoby.

V první fázi byly jednorázově zanalyzovány vzorky z několika farem pro ověření rozsahu zjišťovaných hodnot (tab. 3,4,5), v další fázi byl pro vyloučení vlivu chovatelského prostředí k podrobné technologické analýze zvolen jeden faremní velkochov (cca 500 koz).

Údaje o produkci, sýřitelnosti a technologických vlastnostech mléka byly zpracovány analýzou variance s použitím statistického programu SAS v.9.1, procedury GLM. Pro odhad vlivu jednotlivých genů na sledované ukazatele produkce a dalších vlastností mléka byly použity modely s pevnými efekty, v nichž byly alternativně zařazovány genotypy genů *CSN1S1*, *CSNS1S2*, *CSN2* a *CSN3*.

Obsah bílkovin, kaseinu a výtěžnost je ovlivněna **genotypem *CSN1S1***, kromě genotypu AA, jehož výskyt v populaci je velmi vzácný (ale relativně četný například u dovezených anglonubijských koz, používaných pro křížení v komerčních mlékařicích chovech), podle očekávání nejlepší výsledky vykazuje mléko typu FA a FE.

Vliv alel F/N genotypu ***CSN1S2*** nebyl prokázán, stejně jako u genotypu ***CSN2***, přestože betakasein tvoří téměř stejnou část celkového proteinu jako kasein AS1 (téměř 30%).

U genotypu kapakaseinu ***CSN3*** byly zjištěné rozdíly v obsahu bílkovin a kaseinu u genotypů obsahujících alelu D zdánlivě vysoké (0,24 – 0,4%), ale neprůkazné, jejich četnost v souboru i výskytu v populaci je však velmi nízká, což mohlo průkaznost ovlivnit. Průkazný byl vliv na sýřitelnost a výtěžnost.

Vliv kaseinového genotypu na celkovou produkci bílkovin za laktaci

K analýze byly použity výsledky individuálních odběrů kontrolních vzorků kontroly užítkovosti (5-7 za laktaci, podle metodiky AT - ICAR). Do výpočtu byly zahrnuty pouze vzorky odebrané mezi 40 – 280 dnem laktace, vzhledem výrazným změnám v obsahu složek v počátcích a na konci laktace. Z těchto dat byla vypočítána průměrná denní produkce mléka, průměrný obsah proteinu a celková produkce bílkoviny za období 40-280 dní. Data užítkovosti byla testována podle modelu který zohlednil efekty roku kozlení (2003 až 2008), plemene (plemeno B a H), pořadí laktace (laktace 1., 2. a 3.) a efekty genu (alternativně genotypy genů *CSN1S1*, *CSNS1S2*, *CSN2* a *CSN3*). Vysoce průkazné rozdíly byly zjištěny u různých genotypů alfa kaseinu (*S1* i *S2*) a kapa kaseinu, středně průkazné byly i rozdíly v genotypu beta kaseinu (tabulky 3 až 5).

Tab. 3. Střední hodnoty parametrů mléka u zvířat podle genotypu kaseinů - jednorázový odběr vzorků ze 4 farem (n=393)

ukazatel	Genotyp CSN1S1					Genotyp CSN1S2			Genotyp CSN2			Genotyp CSN3				
	FF	FA	FE	F0	E0	FF	FN	NN	AA	AC	CC	AA	AB	AC	BB	BC
	n=137	n=180	n=26	n=6	n=1	n=70	n=177	n=89	n=27	n=141	n=171	n=18	n=102	n=7	n=246	n=20
sušina celkem %	11,37	11,33	11,85	10,67	10,34	11,4	11,37	11,36	11,71	11,33	11,38	11,43	11,36	11,16	11,37	11,58
obsah bílkovin %	2,88	2,99	3,09	2,58	3,13	2,92	2,97	2,99	3	3,03	2,91	2,92	2,93	3,12	2,92	3,13
obsah kaseinu %	2,22	2,29	2,4	1,85	2,41	2,24	2,27	2,31	2,32	2,31	2,23	2,27	2,24	2,5	2,23	2,44
tuk g/100ml	3,4	3,29	3,77	3,15	2,22	3,41	3,37	3,31	3,73	3,25	3,39	3,29	3,36	3	3,41	3,28

Tab. 4. Střední hodnoty parametrů mléka - technologický rozbor vzorků z jedné farmy (n=105)

ukazatel	genotyp CSN1S1					genotyp CSN1S2			genotyp CSN2			genotyp CSN3				
	FF	FA	FE	F0	AA	FF	FN	NN	AA	AC	CC	AA	AB	AD	BB	BD
	n=33	n=58	n=6	n=6	n=2	n=22	n=56	n=27	n=5	n=46	n=54	n=3	n=36	n=4	n=60	n=1
sušina celkem %	10,92	11,32	11,21	10,78	11,38	11,38	11,2	11,01	11,44	11,13	11,18	11,01	11	11,06	11,24	12,9
obsah bílkovin %	2,94	3,25	3,08	2,89	3,43	3,15	3,15	3,11	3,09	3,17	3,1	3,18	3,03	3,42	3,18	3,27
obsah kaseinu %	2,24	2,45	2,29	2,08	2,69	2,37	2,37	2,35	2,38	2,38	2,34	2,5	2,28	2,7	2,39	2,3
tuk g/100ml	2,94	3,15	3,23	2,93	3,62	3,32	3,13	2,94	3,51	3,04	3,12	2,79	3	2,63	3,15	4,59
sýřitelnost min.	2,8	2,78	2,76	1,99	3,52	2,78	2,62	3,05	3,12	2,64	2,91	3,8	2,91	2,26	2,48	5,8
výtěžnost SJ	2,85	3,1	3,18	2,24	3,34	2,96	2,98	3,09	3,21	3,02	2,97	3,45	2,86	3,37	3,04	3,22

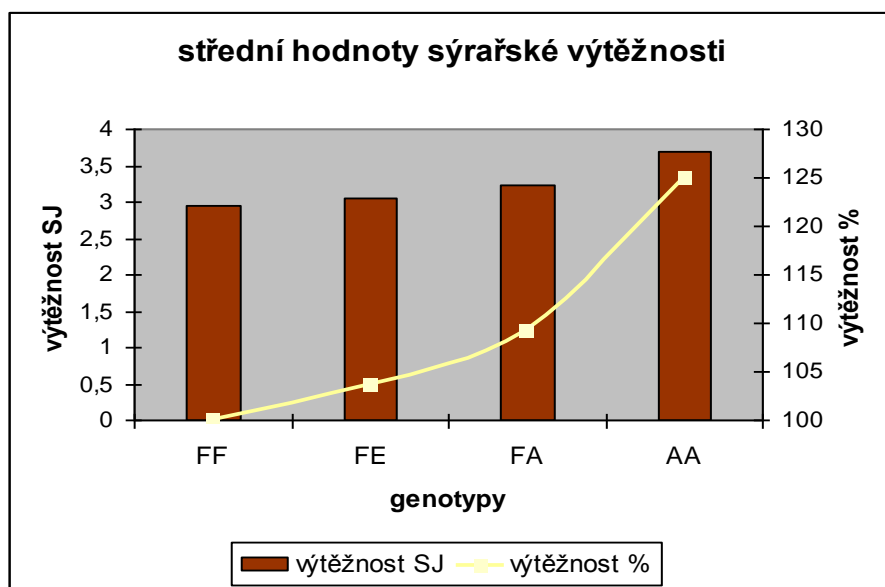
Tab. 5. Střední hodnoty produkce bílkovin za 240 dní laktace (n = 360 laktací)

ukazatel	genotyp CSN1S1					genotyp CSN1S2			genotyp CSN2			genotyp CSN3					
	FF	FA	FE	F0	AA	FF	FN	NN	AA	AC	CC	AA	AB	AD	BB	BC	BD
	n=140	n=204	n=24	n=15	n=6	n=49	n=246	n=65	n=34	n=189	n=166	n=26	n=106	n=9	n=241	n=1	n=6
denní nádoj (kg)	2,46	2,47	2,58	2,52	2,2	2,16	2,58	2,68	2,54	2,45	2,45	2,32	2,52	2,53	2,45	2,27	2,78
obsah bílkovin(%)	2,88	2,89	2,91	2,59	2,93	2,9	2,88	2,8	2,94	2,89	2,85	2,81	2,86	3,09	2,89	3,67	3,04
produkce bílkovin kg/240 dní	16,36	16,32	17,47	14,74	14,63	14,55	17,14	17,19	17,54	16,33	15,94	15,00	16,38	18,07	16,33	17,59	20,36

Vliv kaseinového genotypu na sýrařskou výtěžnost mléka

V průběhu řešení projektu byly u odebíraných vzorků mléka v průběhu roku opakovaně analyzovány i technologické vlastnosti, z nichž zejména sýrařská výtěžnost má přímý ekonomický efekt. Průměrné hodnoty mléka podle jednotlivých genotypů AS1kaseinu ukazuje graf č. 2.

Graf 2. sýrařská výtěžnost mléka jednotlivých genotypů AS1 kaseinu



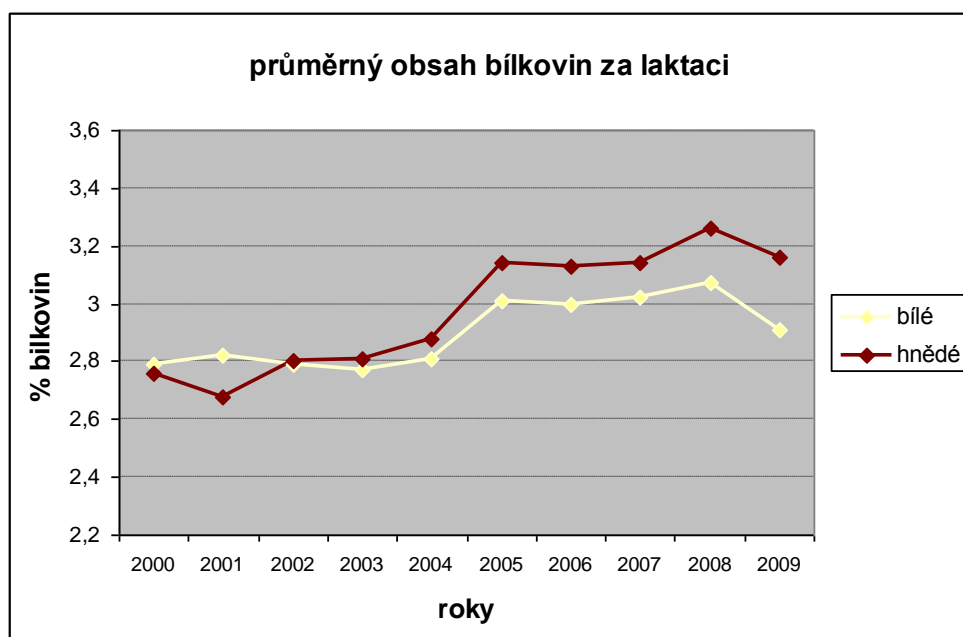
1.6. Hodnoty obsahu mléčných složek zjišťované v kontrole užítkovosti

Vývoj obsahu mléčných složek u našich plemen koz můžeme hodnotit až od roku 1992, kdy se poprvé začal sledovat obsah bílkovin. Celkovou produkci mléka ani tuku a bílkovin za laktaci nelze porovnat, protože výpočet i délka kontrolního období se několikrát změnil. Od roku 1999 se odděleně vyhodnocují i kozy chované individuálně (do 5 ks) a ve stádech. Průměrné hodnoty obsahu bílkovin se vlivem cílené selekce zvyšují, během 10 let v průměru o 4% za rok u bílých a o 7% u hnědých koz.

Tab. 6. Výsledky kontroly mléčné užitkovosti koz 1992-2009

rok	počet laktací	mléko			počet laktací	mléko		
		kg	tuk %	bílkoviny %		kg	tuk %	bílkoviny %
bílá kozy					hnědá kozy			
1992	1343	947	3,86	2,44				
1993	1931	837	3,73	2,70				
1994	2570	723	3,63	2,74				
1995	2019	760	3,74	2,81				
1996	1421	789	3,71	2,82				
1997	969	793	3,80	2,81				
1998	869	804	3,66	2,77				
1999	918	840	3,74	2,78	106	933	4,20	2,82
2000	859	830	3,66	2,79	112	894	3,94	2,76
2001	900	865	3,45	2,82	223	841	3,70	2,68
2002	973	807	3,66	2,79	246	88	3,57	2,80
2003	1095	719	3,29	2,77	341	909	3,53	2,81
2004	1098	757	3,14	2,81	727	806	3,42	2,88
2005	1276	715	3,23	3,01	541	778	3,62	3,14
2006	1244	680	3,30	3,00	537	776	3,40	3,13
2007	1124	693	3,16	3,02	533	794	3,49	3,14
2008	1235	620	3,27	3,07	462	754	3,66	3,26
2009	1390	651	3,06	2,91	512	811	3,49	3,16
chovy	stáda				individuální			
1999	390	722	3,77	2,75	642	912	3,73	2,80
2000	617	749	3,52	2,74	369	981	3,93	2,86
2001	778	783	3,34	2,73	366	1026	3,78	2,88
2002	649	800	3,30	2,81	598	852	3,55	2,97
2003	662	730	3,25	2,75	842	778	3,43	2,82
2004	1171	726	3,06	2,79	376	905	3,62	2,93
2005	1445	698	3,06	2,79	411	850	3,62	2,93
2006	1458	665	3,33	3,05	381	867	3,55	3,05
2007	1388	688	3,26	3,05	358	878	3,38	3,14
2008	1539	622	3,35	3,13	261	846	3,70	3,22
2009	1724	658	3,12	2,96	318	877	3,66	3,18

Graf 3. Vývoj vykazovaných průměrných hodnot obsahu bílkovin v mléce 2000 – 2009



U jednotlivých koz však zaznamenáváme velmi výrazné rozdíly, způsobené hlavně výživou, vlivem způsobu chovu, v některých případech vlivem způsobu odběru vzorků a strojového vyhodnocení dat. Na rozdíl od obsahu tuku, který lze i krátkodobě (v období kontrolního odběru) výživou výrazně ovlivnit, obsah bílkovin je mnohem stabilnější, ve velké míře ale závisí na způsobu odběru vzorku. Objektívni způsob pomocí milkmetrů je aplikován zatím výhradně ve stádech, protože v individuálních chovech se dojí ručně.

Mezi roky 2000-2009 se v jednotlivých letech v databázi měsíčních výsledků rozborů vzorků mléka vyskytuje 0,2 až 1% extrémně vysokých hodnot obsahu bílkovin (6 až 9,99%), vesměs z odběrů v říjnu až prosinci a 0,1 až 1,7% extrémně nízkých hodnot (0,6-1,99%). Průměrné vypočítané hodnoty za normální laktaci jsou pak vykazovány v rozmezí 1,6 – 5,62%.

Hodnotit za toto období je možné pouze obsah bílkovin, protože v metodice výpočtu docházelo k úpravám – z původních 305 se postupně přecházelo na „normovaných“ 280 dní.

Pro výpočet „průměrné hodnoty“ je neméně důležité období odběru vzorků – zejména vzorky z konce laktace mají výrazně jiný obsah složek – a také kontrola event. očištění dat zadávaných do výpočtu průměrných hodnot.

Příklady:

Pro druhou laktaci kozy č.196361 je vypočítána průměrná hodnota 3,68% bílkovin, rozbořem výsledků analýz měsíčních kontrolních vzorků zjistíme, že minimálně dva ze 6 vzorků mají výrazně odlišný obsah složek (tuk, bílkovina i laktóza), nejspíš vlivem momentální fyziologické nebo metabolické nerovnováhy. Při zahrnutí těchto výsledků do výpočtu pak dostáváme zkreslené „průměrné“ hodnoty. Pro třetí laktaci je průměrná hodnota zkreslená ještě výrazněji (5,62%).

Tab.7.

laktace	číslo zvířete	mléko kg	tuk %	tuk kg	bílk. %	bílkoviny kg
1.	00196361CZ	484,6	3,77	18,3	2,93	14,2
	00196361CZ	499,4	4,04	20,2	3,68	18,4
	datum	mléko kg	tuk %	bílk. %	lakt. %	den laktace
	26.4.2001	1,8	2,83	4,20	2,80	95
2.	27.5.2001	1,9	8,35	3,51	4,06	126
	28.6.2001	1,8	3,44	2,53	4,15	158
	30.7.2001	1,9	4,02	3,37	3,53	190
	27.8.2001	1,8	6,02	2,79	4,40	218
	24.9.2001	1,8	3,17	5,40	2,87	246
		číslo zvířete	mléko kg	tuk %	tuk kg	bílk. %
	00196361CZ	550	4,61	25,40	5,62	31,00
	datum	mléko kg	tuk %	bílk. %	lakt. %	den laktace
3.	25.4.2002	1,8	4,25	3,25	4,48	55
	27.6.2002	2,4	2,02	3,21	4,43	84
	27.9.2002	1,7	8,08	9,15	2,54	144
	29.5.2002	2,2	1,73	3,36	4,55	178
	29.7.2002	2,4	1,92	3,81	3,71	210
	29.10.2002	1,2	7,28	9,39	0,96	257

K podobně zkreslenému průměrnému výsledku (1,62%) dojde při zahrnutí hodnot 0,00 (složky zřejmě v jednom ze vzorků nebyly stanoveny, v dalším jsou nestandardní)

Tab.8

laktace	číslo zvířete	mléko kg	tuk %	tuk kg	bílk. %	bílkoviny kg
1.	00343661CZ	1100,7	4,55	50,1	2,71	29,8
2.	00343661CZ	1486,0	3,89	57,8	2,49	37,0
3.	00343661CZ	1297,5	3,66	47,5	2,66	34,5
4.	00343661CZ	1112,5	4,67	52,0	2,59	28,8
	číslo zvířete	mléko kg	tuk %	tuk kg	bílk. %	bílkoviny kg
	00343661CZ	1300	5,49	71,40	1,62	21,10
	datum	mléko kg	tuk %	bílk. %	lakt. %	den laktace
5.	3.5.2000	5,6	6,02	2,22	4,34	58
	11.6.2000	5,4	3,60	0,00	0,00	97
	16.7.2000	5,2	5,05	1,14	2,40	132
	15.8.2000	5,0	6,50	2,28	4,79	162
	19.9.2000	4,5	6,45	2,49	4,60	197

Objektivizace výsledků KU

Od roku 2001 došlo k významné změně hodnocení užitkovosti u koz. Namísto produkce tuku za laktaci, která byla hlavním kritériem od roku 1929, se kozy hodnotí podle množství vyprodukované bílkoviny. Je to způsobeno jednak změnou názoru na význam tuku ve výživě, jednak se většina podnikatelských chovů koz zaměřuje na výrobu sýrů, kde vzhledem k povinnému tepelnému ošetření mléka část tuku odchází do syrovátky a nepříspěvá ke zvýšení výtěžnosti výrobků. Zůstává ale významným faktorem, který ovlivňuje senzorycké vlastnosti a kromě toho je nositelem některých důležitých vitaminů (A,D,E,K).

Používaná metoda kontroly mléčné užitkovosti ICAR-AT, tj. měření jednoho nádoje za měsíc, střídavě z ranního a večerního dojení, zejména **v malochovech** poskytuje prostor pro celou řadu chyb a nepřesností, která se projeví na výsledné hodnotě produkce mléka resp. mléčné bílkoviny za laktaci:

- nádoj je měřen ručně
- možný posun doby dojení proti běžné rutině až v řádu hodin, což má na velikost nádoje u kozy významný vliv,
- složení vzorku odebraného z nádoje jinak než milkmetrem závisí na promíchání a způsobu odběru
- protože se naměřené hodnoty velikosti nádoje do výpočtu násobí dvěma, násobí se i možná chyba při odběru
- výsledky analýz z kontrolních rozborových protokolů jsou zadávány do strojního zpracování bez potřebné kontroly, analýzy a eventuálního očištění dat

2. Potenciální přínos genotypizace

2.1. Vliv jedinců – nositelů „silných alel“

Přidělování kozlů by nadále mělo respektovat zásadu střídání linií, a to i v případě chovů které nejsou orientovány na produkci plemenných zvířat, a až druhým kriteriem pro volbu by měla být přítomnost „silných alel“ v genotypu kaseinového lokusu. I když není znám genotyp matek, které mohou být nositelkami jak silných (S) tak ostatních (O) alel, při použití kozla s genotypem SO minimálně u 25% dcer lze očekávat vyšší výskyt těchto silných alel a u 50% dcer kombinaci obou (SO). Jestliže otec je nositelem kombinace SS, bude podíl silných alel u dcer ještě příznivější:

genotyp matky (kombinace alel)			genotyp otce	genotyp dcer		
SS	SO	SO	SS	50% SS	50% SO	
SS	SO	OO	SO	25% SS	25% OO	50% SO

V rámci projektu jsme ověřovali vliv záměrného připarování kozlů vybraných podle genotypizace na zlepšení obsahu složek, zejména bílkovin v mléce. Plemenní kozlí genotypovaní na tzv. „silné“ alely AS1 a kapa kaseinu byli v letech 2004 - 2005 přiděleni do kontrolovaných velkých chovů a z dat výsledků kontroly užitkovosti jejich dcer s neznámým genotypem následně hodnoceny rozdílly jejich užitkovosti proti užitkovosti jejich matek (rovněž s neznámým genotypem). Průměr užitkovosti (za 2 – 3 laktace) matek a dcer je porovnáván v tabulce 9.

Byli vybráni kozlové nesoucí silné alely AS1 + neutrální alely kapa kaseinu (skupina 1), dále nositelé kombinace silné a neutrální alely AS + silných alel kapa kaseinu (skupina 2), nositelé slabých alel AS1 + silných alel kapa kaseinu (skupina 3) a konečně nositelé slabých alel AS1 + kombinace silné a neutrální alely kapa kaseinu (skupina 4).

U všech skupin došlo ke zvýšení střední hodnoty obsahu bílkovin u dcer (i když u jednotlivých zvířat tomu přirozeně ve 100% případů tak nebylo), a to v největší míře u 1. skupiny a nejnižší u 4. skupiny.

Srovnání množství vyprodukované bílkoviny není zcela objektivní, protože několik matek mělo laktace kontrolované v individuálních chovech a výsledky jejich dcer pochází z velkochovů, u hodnot obsahu bílkovin je míra objektivity přirozeně mnohem vyšší. To se týká hlavně koz skupiny FA/BC a FA/BD. Výsledky koz (n = 20) ze skupin, které v režimu dvoufázové reprodukce stáda zahájily laktaci mimo běžnou sezónu (červen-červenec) nebyly do srovnání zahrnuty. Jejich vzorky odebírané mezi srpnem a prosincem mají vysoký a poměrně stabilní obsah bílkovin (2,7 – 4,4%), průměr za laktaci je pak 3,52% ale při kratší laktaci a podstatně nižším nádoji (pouze 300 – 450 l mléka), takže celková produkce bílkovin se pohybuje mezi 10 – 15 kg.

Tab.9. Porovnání výsledků kontroly užítkovosti matek a dcer

skupina	genotyp AS1/CSN a počet otců	počet	užitkovost matek (průměr ze 2-3 laktací)			počet	užitkovost dcer (průměr ze 2-3 laktací)				
			mléko kg	bílkoviny %	bílkoviny kg		mléko kg	bílkoviny %	bílkoviny kg		
			střed.hodnota	917	2,71	25,1		střed.hodnota	873	3,01	26,6
	AA/BB (5)	27 (hnědé)	max.	1192	3,34	38,2	39	max.	1177	3,47	39,4
			min.	621	2,28	16,8		min.	678	2,49	19
			střed.hodnota	1109	2,95	32,8		střed.hodnota	969	3,27	31,6
1	AA/AB (1)	5 (hnědé)	max.	1192	3,29	37,63	6	max.	1191	3,42	36,9
			min.	894	2,69	25,25		min.	757	3,07	24,6
			střed.hodnota	1006	2,52	25,2		střed.hodnota	1025	2,64	27,1
	AA/AB (2)	2 (bílý)	max.	1031	2,82	28,2	1	max.	1082	2,70	28,8
			min.	944	2,35	22,2		min.	979	2,55	25,0
			střed.hodnota	682	2,84	19,52		střed.hodnota	526	2,96	15,56
	FA/BC (2)	12 (bílý)	max.	1084	3,12	24,6	8*	max.	793	3,16	24,2
			min.	453	2,66	13,2		min.	361	2,68	10,12
2			střed.hodnota	1023	2,80	28,2		střed.hodnota	946	2,98	28,2
	FA/BD (6)	16 (hnědé)	max.	1262	3,00	36,2	31	max.	1129	3,31	36,4
			min.	856	2,42	24,7		min.	696	2,46	21,2
			střed.hodnota	796	2,74	22,0		střed.hodnota	925	3,10	28,4
3	FF/BD (1)	3 (hnědé)	max.	871	2,84	24,7	6	max.	1346	3,25	42,5
			min.	645	2,56	16,55		min.	681	2,88	22,1
			střed.hodnota	746	2,86	21,3		střed.hodnota	715	2,89	20,9
4	FF/AC (2)	82 (bílý)	max.	1095	3,37	29,8	110	max.	989	3,36	30,2
			min.	380	2,33	10,6		min.	388	2,51	11,2

8* mladé kozy, výsledky jsou jen za první laktace

Selekce na užítkovost a genetická rozmanitost populace

Cílená selekce na jakýkoliv znak má za následek zužování genetické rozmanitosti (diverzity) v populaci. Národní program uchování a využití genetických zdrojů má za úkol udržet co možná nejširší rozmanitost resp. uchovat pokud možno všechny existující geny v populaci se vyskytující. K tomu využívá jak tradiční metody – řízenou plemenitbu s rotací plemenků, s cílem udržet všechny existující genealogické linie kozlů a zároveň zabránit jejich opakování v otcovské pozici dříve než za 3 generace, ale také výsledky molekulárně genetických analýz, kdy je možné cíleným pářením určitého počtu genotypovaných jedinců docílit narození jedinců s požadovaným genotypem.

V komerčních stádech, která nejsou zaměřena na produkci plemenných zvířat, se tedy budou výsledky genotypování využívat jinak než v nukleových stádech genového zdroje. Vzhledem k délce generačního intervalu u koz (tj. doby od narození jedince do doby narození jeho potomstva) pak bude z hlediska zachování potřebné míry diverzity a udržení přijatelně nízké hodnoty indexu příbuzenské plemenitby (zejména ve velkých stádech) žádoucí zajistit každých 5 let plošný screening v rozsahu cca 25-30% celé populace, eventuálně průběžný screening (každoročně 5-10% populace) s výběrem jedinců podle plemenářské evidence.

Využití genotypovaných kozlů v komerčních stádech

Pro chovy zaměřené na produkci mléčných výrobků má význam zvyšování podílu „silných alel“ AS1 a kapa kaseinu. Prognóza vývoje chovu předpokládá i nadále snižování kapacit zájmových chovů s 1-3 plemennými kozami, které až dosud jsou téměř výhradním zdrojem plemenných kozlů. Tuto jejich roli budou postupně přebírat některé faremní chovy, zařazené do kontroly užitkovosti. Jestliže je stádo zařazeno do kontroly mléčné užitkovosti, je možné vytipovat nejlepší matky určené pro produkci plemenných zvířat:

Jako **matky kozlů** jsou zařazovány kozy s nejlepšími výsledky kontroly mléčné užitkovosti v minimálně dvou laktacích, s odpovídajícím exteriérem. Jejich produkční období obvykle trvá 3- 6 (výjimečně i více) let a proto se rozhodně vyplatí jejich genotypizace na AS1 a kapa kaseinu:

genotyp AS1 – vyloučení nulové alely, rozlišení A/E/F,

genotyp kapa kaseinu – kompletní SNP pro zjištění nositelek silných alel C,D.

Mladé *kozičky určené na odchov pro obnovu stáda*

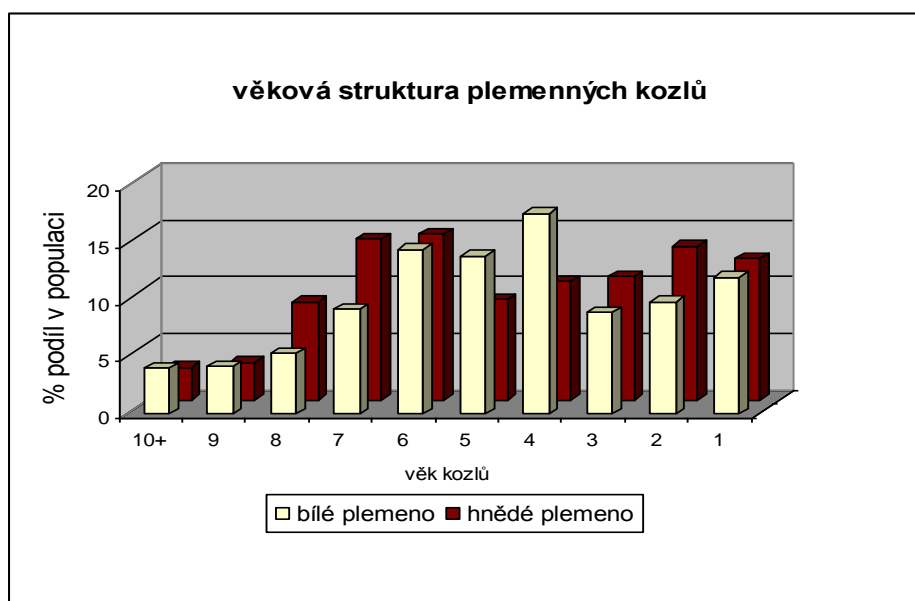
Vzhledem k ceně analýz a velmi malé frekvenci výskytu nulových alel je v současné populaci genotypování AS1, 2 a beta kaseinu možno považovat za nadstandardní, pro chovy se sýrařským zaměřením je výhodné zjistit genotyp kapa kaseinu – kompletní SNP pro zjištění nositelek silných alel C,D. Tato informace by mohla vést i ke zjednodušení kontroly užitkovosti – například stanovení obsahu složek by se provádělo jen 3x za laktaci, ideálně mezi 90 – 150. dnem, eventuálně pouze v jedné kontrolované laktaci.

Využití ve šlechtitelském programu SCHOK

Plemenní kozli

Ideální stav je kompletní genotypizace, kde bychom měli postupně dospět k jejímu rutinnímu zařazení v procesu výběru do plemenitby. Průměrný aktivní věk plemenných kozlů je v současné době 4,7 resp. 2,9 roku u bílých resp. hnědých koz, podíl jednotlivých věkových skupin ukazuje graf č.3, to znamená že při genotypování všech nově zařazovaných kozlů a jejich roční obměně v rozsahu cca 12 -15 % by za 7-8 let mohli být takto zmapováni všichni aktivní plemeni. Cena kompletní analýzy sice zvýší náklady na produkci plemenného kozla (viz kapitola 8, ekonomika), ale zvýší tím jeho užitnou hodnotu, která se promítne přímo do vyšší prodejní ceny.

Graf 3. zastoupení věkových kategorií kozlů v populaci



Matky kozlů chované v současnosti hlavně u individuálních zájmových chovatelů by měly stejně jako plemenní kozli být postupně kompletně genotypovány, informace o genotypu zvýší možnosti řízeného připařování s definovaným cílem (zvýšení obsahu mléčných složek, zejména bílkoviny u potomstva tj. nových plemenných kozlů)

Využití v konzervačním programu (Národní program genetických zdrojů zvířat)

Pro účely šlechtění resp. výběru jedinců do nukleu genetického zdroje a řízené připařování s cílem udržení (rozšíření) genetické diverzity je účelné provést následující analýzy:

- lokus AS1- přítomnost E, F a O1 alely
- lokus AS2- doplňkově na (ne)přítomnost O alely, detekce alely D (pro genobanku)
- lokus beta-kaseinu - doplňkově (ne)přítomnost O alely, detekce A a C alely (pro genobanku)
- lokus kapa-kaseinu: genetické varianty A-G (PEA analýza, sekvenátor ABI PRISM 3100)

V současné době je pro zajištění Národního programu dostačující systém řízené čistokrevné plemnitby jedinců vybraných jako genetický zdroj a umístěných v běžném chovu. S očekávanou změnou ve struktuře chovu (snižování počtu individuálních chovů s čistokrevnou plemnitbou, převaha faremních chovů s vysokým počtem polosester a/nebo se zvýšeným využíváním užitkového křížení) bude zřejmě nutné zahájit speciální konzervační programy. Diverzita zde bude uchovávána především prostřednictvím konzervace definovaných semenných dávek.

a) Nukleové chovy

Tyto chovy budou tvořit vybrané genotypované matky, řízeně připařované (inseminované) genotypovanými kozly. Mateřská část nukleové populace bude vybírána a udržována v co

nejširší genetické rozmanitosti, tedy včetně „negativních“ genotypů kaseinových lokusů. Z potomstva budou vybírání kozli potřebných genotypů (tedy i negativních – jde o uchování diverzity!) k odchovu do nástupu pohlavní aktivity a odběru semenných dávek pro genobanku, k vlastní reprodukci nukleového chovu a eventuálně k distribuci do jiných chovů. Tímto způsobem bude možné zajistit zároveň i uchování všech genealogických otcovských linií.

b) Kryokozevace „ekonomicky nevýhodných“ genotypů

V návaznosti na předpokládanou rutinní selekci nově zařazovaných plemenků s ohledem na genotyp kaseinových lokusů nebude část kozlů s „ekonomicky nevýhodným“ genotypem zařazena do plemenitby. Tito kozli budou buď smluvně odchováni do doby jejich plné reprodukční aktivity a následně využiti pro odběr a kryokozevací semenných dávek, nebo v případě následné kastrace či porážky budou jejich semenné dávky získány metodou extrakce nadvarlat (epididymální sperma). Tato metoda je použitelná i u varlat odebraných na jatkách, pokud jsou během 48 hodin udržovaná v chladu a dopravená do laboratoře ke zpracování.

2.2. Využití v praxi

Analýzy DNA

Metodiky pro detekci genetického polymorfismu kalcium-senzitivních bílkovin u koz byly během řešení projektu optimalizované v laboratoři molekulární genetiky VÚŽV v.v.i., pro některé byly vyvinuty patentově chráněné postupy:

Lokus	Metoda	Alely	Reference
CSN1S1	AS-PCR ¹	E, non E	Jansá-Pérez et al.,1994; Rando et al.,1998
		01, non 01	Sztankoova et al., 2006
	PCR-RFLP	A*a, F	Ramunno et al., 2000
CSN2	AS-PCR	0´	Ramunno et al., 1995
	Light Cycler Analysis	A, C	Sztankoova et al., 2008
CSN1S2	PCR-RFLP	D, F, N*b, 0	Ramunno et al., 2001a, b
CSN3	PEA ²	A, B, C, D, E, F, G	Yahyaoui et al., 2003

¹ AS-PCR= allele specific –PCR; ²PEA=Primer extention analysis

aA*=A, B, C, D

bN*=A, B, C, E

Organizace genotypování - odběry vzorků

Potřeba informací pro **využití ve šlechtění** je u koz sezónní (bonitace mladých plemenných zvířat, prodej a distribuce kozlů – tj. srpen, září), to znamená že je možné

odběry vzorků DNA předvybraných kozlíků u individuálních chovatelů a hlavně pak následné zpracování a analýzy vzorků organizovat hromadně. To může významně snížit zejména cenu analýz, protože lze využít různých poloautomatických systémů, efektivně využít drahé chemikálie i personální kapacity laboratoře.

Potřeba informací pro chovatele hlavně **ve faremních chovech** je závislá na tom, jaký je v daném chovu systém rané selekce koziček pro obnovu stáda. Vzhledem k poměru mezi cenou zvířete a cenou analýzy, který je neporovnatelný se skotem, není plošné využití postupu používaného u skotu (tj. první stupeň selekce podle genotypu) racionální. Prvotní selekce, která je rovněž sezónní a probíhá většinou koncem března (tak, aby nevhodní jedinci mohli být prodáni jako jatečná velikonoční kůzlata), se tedy opírá o informace o užitkovosti matek. Jestliže jsou matky genotypovány, výběr je usnadněn.

Další stupeň selekce koziček, kdy se například rozhoduje o tom zdali budou vybrány do čistokrevné plemnitby nebo do užitkového křížení s anglonúbijským či búrským plemenem, se časově shoduje s bonitací kozlů. Potom je možné molekulárně-genetické analýzy organizovat společně se vzorky kozlíků.

Získávání DNA

DNA k analýze je možné získat z jakéhokoliv biologického materiálu - z krve, stěru sliznic z tlamy nebo nosu, z chlupových cibulek, z peří nebo z jiné tkáně (svaly, vnitřní orgány, kůže, placenta atd.). Spolehlivým zdrojem dostatečného množství kvalitní DNA je krev, odběr krve však podle naší legislativy může provádět pouze veterinář nebo veterinární technik na rozdíl od stěrů sliznic, který může jednoduše provést každý chovatel sám.

V rámci projektu jsme porovnávali výtěžnost a čistotu DNA získanou z různých biologických materiálů (krev, chlupy a sliny). Získávání DNA z chlupů ani ze slin nebylo optimální, z důvodů nízké výtěžnosti a čistoty (pro optimální průběh PCR reakce je nutné dvoj- až trojnásobné množství izolátu), skladovatelnosti a případné opakovatelnosti analýz. Je možné pro rutinní (jednorázové) genotypování zvířat, protože je lehce zvládnutelné přímo ve faremních podmínkách, bez nutné asistence veterináře/ veterinárního technika a při minimálním stresu pro zvířata. Extrakce DNA z krve je optimální z následujících důvodů:

- vyextrahovaná DNA z krve má vyšší čistotu a tedy i vyšší výtěžnost
- vyextrahovaná DNA z krve je stabilnější
- krev je vhodná pro dlouhodobé skladování
- vyšší objem DNA získaný extrakcí z krveumožňuje realizovat větší počet analýz, a to i opakovaně po dlouhé době po uložení (v řádu roků)
- je nižší potřeba (množství) výchozího materiálu pro jednotlivé analýzy.

Negativem je nutnost přítomnosti veterinárního pracovníka při úkonu získávání krve.

Na základě výsledků jednotlivých analýz lze doporučit následující:

Pro uložení v genobance a extrakci DNA odebírat výhradně krev. Pro jednorázové stanovení (například časná selekce plemenných kozlíků pro odchov) by připadala v úvahu extrakce DNA ze slin, v krajním případě z chlupů.

Odběr krve

Odběry krve provádí veterinární lékař. Soupravu na **odběr krevního vzorku** zasílá po objednání přímo laboratoř a obsahuje zpravidla sterilní zkumavku s látkou zamezující krevnímu srážení (EDTA), obálku se zpáteční adresou a formulář k vyplnění (identifikaci zvířete a chovatele).

Pro jednorázovou analýzu postačí 1 ml krve, eventuálně odebrané i na speciální odběrové karty s terčem ze ssavého materiálu, ošetřeného speciálním preparátem (FTA card), ale pro uložení do genobanky je potřeba počítat s cca 10 – 15ml, protože vzorky se ukládají a zpracovávají jiným způsobem, navíc se všechny ukládají z bezpečnostních důvodů v dubletech (zdvojeně).

Zkumavku je nutné protřepat, aby se krev promísila s antikoagulantem a dobře zašroubovat. Krev lze uchovat v lednici po dobu nezbytně nutnou, nejlépe je ji ihned odeslat do laboratoře. Spolehlivá doba udržení kvality vzorku mezi odběrem a zpracováním v laboratoři jsou tři dny.

Odběr vzorků ze sliznice tlamy

Tento způsob odběru kombinuje odběr ze sliznice a ze slin, a má dobrou výtěžnost čisté DNA. Zejména u přežvýkavců jej ale může komplikovat skutečnost, že zvířata i delší dobu po nakrmení mohou mít v tlamě zbytky přežvykované potravy, ze stejného důvodu je velmi nespolehlivý u sajících mláďat resp. kůzlat napájených mléčnou náhražkou, kde může dojít ke kontaminaci vzorku DNA z mléka.

V současné době se proto hlavně u skotu doporučuje stejným způsobem provádět odběr z **nosní sliznice**, k němuž jsou dostupné různé druhy kitů, dodávané i přes internetové e-shopy. U následujícího zahraničního kitu se uvádí komfortní odběr i ve velkých stádech, výkon je až 150 kusů zvířat za hodinu, je ale nutné kalkulovat i s vysokou cenou odběrových souprav v relaci s hodnotou zvířete (která je u koz x-násobně nižší než u skotu). Výhodou je, že zvířata nejsou v době odběru omezována v příjmu potravy (mléka). Stejného efektu lze dosáhnout odběrem do soupravy připravené laboratoří VÚŽV pro odběry slin.

Soupravu k odběru zasílá po objednání přímo laboratoř a obsahuje zpravidla stěrový tampon nebo kartáček v uzavíratelném obalu, zkumavku na uložení tamponu po odběru, formulář k vyplnění (identifikaci zvířete a chovatele) a obálku se zpáteční adresou. Při stěru je nutné dodržet následující postup a zásady:

- Zvíře nesmí alespoň 20 minut před stěrem mít přístup ke krmivu a pokud možno by nemělo ani pít. Nejlepší je stěr uskutečnit před pravidelným kmením.
- Odběr se provádí v rukavicích (aby nedošlo ku kontaminaci vzorku stopami DNA, které zanechá odebírající v místě uchopení tyčinky odběrového tamponu)
- Po vyjmutí z obalu se tampon nesmí dotýkat jiného předmětu, než ústní dutiny odebíraného jedince.
- Tamponem důkladně po dobu 5 sekund otáčivým pohybem stírejte vnitřní stranu dásně nad horními řezáky zvířete
- Po odběru bezprostředně vložte tampon do zkumavky s konzervačním roztokem (EDTA) a pevně zašroubujte

- Na štítku zkumavky vyplňte čitelně údaje (identifikace chovatele, odebíraného zvířete), se zkumavkou vložte do přiložené obálky a odešlete co nejdříve do laboratoře. Spolehlivá délka udržení potřebné kvality vzorku mezi odběrem a zpracováním je 3-4 dny.

Obr.1 Postup při odběru stěrů z nosní sliznice



Odběr chlupů

Rizikem při odběru chlupů je kontaminace vzorku jinými chlupy, které mohou ulpívat na těle zvířat při vzájemném otírání nebo otíráním o předměty s uchycenými chlupy jiných zvířat. Odebírat je proto nutné pouze chlupy získané vyškubnutím, nikoliv vyčesáváním. Chlupy musí mít vlasovou cibulku, není tedy možné je získat ostříháním!

Soupravu na **odběr chlupů** zasílá po objednání přímo laboratoř a obsahuje zpravidla dvě samolepky s natištěným rámečkem k vyplnění identifikačního čísla zvířete, uzavíratelný (zip) polyetylenový sáček se vloženým krycím papírem, obálku se zpáteční adresou a formulář k vyplnění (identifikaci zvířete a chovatele).

Postup:

Ideální místo k oděru je u kořene ocasu, k analýze je potřeba minimálně **20** chlupů s vlasovými cibulkami. Veškerá manipulace s předměty, kterých se budou po odběru vzorky dotýkat, by měla být prováděna v rukavicích.

- Na samolepce a na sáčku vyplňte číslo (identifikaci) zvířete
- Místo vybrané k odběru chlupů nasucho otřete, event. vyčešte, abyste jej zbavili případných mechanických nečistot a volných chlupů. Odebírané chlupy musí být suché – případné zapaření v obalu by znehodnotilo DNA.
- Popsanou samolepku sejměte z krycí fólie a vyškubnuté chlupy přitiskněte na samolepku tak, aby vlasové cibulky vyčnívaly a 0,5-1 cm mimo lepicí plochu, přeložte v naznačené linii a stiskněte, tím chlupy zafixujete.
- Jestliže se vám nepodaří získat dostatečný počet chlupů, postup opakujte s druhou samolepkou.
- Vložte do připraveného krycího papíru v sáčku a uzavřete zip.

Obr.2. Postup při odběru vzorku chlupů



III. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPU

Geny s přímým vztahem k parametrům mléčné užitkovosti a technologické kvalitě mléka je možné využít ve šlechtění dojených plemen koz, podobně jako je tomu u skotu. Efektivita tohoto postupu závisí na diverzitě plemen v dané oblasti (tj. polymorfismus genů mléčných bílkovin), a na optimalizaci postupu šlechtění využitím znalosti existujícího rozsahu tohoto polymorfismu ve šlechtěné populaci. Předkládaná metodika je výsledkem výzkumu, který se u českých plemen koz uskutečnil vůbec poprvé. Zařazení informace o genotypu kaseinových lokusů jako selekčního kritéria nebylo ve šlechtitelských programech koz v ČR dosud aplikováno.

Výběr nových plemenů v současné době probíhá hlavně na základě hodnocení mléčné užitkovosti jejich matek, vlastní užitkovost plemena je známa až po vyhodnocení užitkovosti jejich dcer (to znamená 1,5 – 3 roky prodleva) a nelze ji zcela objektivně posoudit, pokud jsou jeho dcery rozptýleny v několika malých individuálních chovech s neporovnatelnou úrovní chovatelských podmínek.

Informace o genotypu zároveň představuje kvalitativně vyšší kritérium pro zařazování jedinců do genetického zdroje resp. do konzervačních projektů obou národních plemen koz v Národním programu genetických zdrojů, a vytváří lepší podmínky pro zachycení a uchování ještě většího spektra jejich genetické diverzity.

IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Metodika je určena:

- Svazu chovatelů ovcí a koz – oprávněné organizaci zajišťující šlechtitelské programy koz,
- odborným pracovníkům – šlechtitelům plemenářských služeb,
- krajským informačním střediskům a zemědělským poradcům,
- chovatelům dojených plemen koz.

Dále je možné ji použít jako studijního resp. výukového materiálu pro studenty a pedagogy středních odborných a vysokých škol příslušného zaměření (zootecnika).

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

V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Náklady na genotypizaci pro chovatele jsou závislé jednak na požadovaném rozsahu analýz, jednak na velikosti souboru vzorků, který je analyzován.

Cena se skládá z několika částí:

- získání a příprava vzorku, tj. cena odběrové soupravy, zpracování vzorku po doručení a extrakce DNA – tato část je stejná u každého vzorku;
- fixní cena rozborů (spotřeba chemikálií, energie, odpis přístrojů aj.) která částečně závisí na počtu analýz;
- pracovní náklady obsluhy – závisí na velikosti analyzovaného souboru, optimální je možnost používat poloautomatické techniky nastavené na hromadnou analýzu 96 vzorků.

Tab. 10 Náklady na genotypování (na 1 vzorek, 2010)

lokus	rozsah analýzy	a	b	c		celkem
		příprava vzorku	analýza	pracovní náklady 1	pracovní náklady 2	
AS1	pouze vyloučení 0 alely		50	70-130	20-30	200-310
	detekce A/F (=ostatní/slabá alela)	130	60	70-130	20-30	210-340
beta	pouze vyloučení 0 alely		50	70-130	20-30	200-310
kapa	kompletní analýza SNaPShot		130	70-130	20-30	280-390

pracovní náklady 1 = individuální rozbor na vyžádání, do 5-10 vzorků

pracovní náklady 2 = hromadný rozbor (pro aukční zvířata, pro screening stád)

Při doporučeném postupu pro plemenné kozy a matky kozlů **při hromadně organizované analýze** by se tedy cena kompletní **genotypizace jednoho zvířete** mohla pohybovat (při cenových relacích roku 2010) okolo 900 Kč, u genotypizace v produkčních chovech pouze na kapakasein (pro účely selekce s cílem zvýšit obsah mléčného proteinu ve stádě) kolem 280 Kč. Náklady na analýzu malého počtu individuálních vzorků budou asi o 50% vyšší, tj. ca 1350 Kč u kompletní analýzy a 400 Kč u genotypizace pouze alel kapakaseinu.

Přímý ekonomický přínos (posuzovaný zvýšením celkové produkce bílkoviny a sýrařské výtěžnosti mléka) bude kromě zvýšení obsahu bílkovin v mléce ovlivněn také úrovní chovného prostředí, zejména výživou a kondicí zvířat.

Zvýšení obsahu bílkovin v mléce využitím cíleného připarování kozlů se „silnými alelami“ bude záviset na „startovací úrovni“ tj. výchozí hodnotě tohoto parametru ve stádě. U

potomků matek se silnými alelami bude zvýšení menší než u potomků matek s ostatními alelami, a zvyšování bude samozřejmě možné pouze do dosažení biologického limitu.

V ověřovací aplikaci metody cíleného připárování kozlů se „silnými“ alelami kaseinu ve faremních chovech došlo ke zvýšení obsahu bílkoviny u skupin dcer po kozlech – zlepšovatelných genotypu (viz tabulka 9, skupiny 1 až 3) v průměru o 0,12 - 0,3% a zlepšení sýrařské výtěžnosti o 4 – 25% (u některých jednotlivých dcer bylo zvýšení ještě větší, v závislosti na genotypu matek, který nebyl zjišťován).

Tab. 11. Potenciální zvýšení množství vyprodukovaných bílkovin v kg za laktaci

zvýšení % bílkovin	průměrná užitkovost za laktaci (kg mléka)			
	600	700	800	900
+ 0,1	0,6	0,7	0,8	0,9
+ 0,2	1,2	1,4	1,6	1,8
+ 0,3	1,8	2,1	2,4	2,7

Na základě těchto hodnot, při uvažovaném průměrně 10% zvýšení výtěžnosti mléka a ceně 300 Kč/kg sýra lze odhadnout přímý ekonomický přínos u jedné kozy mezi 200 – 900 Kč za laktaci, v závislosti na jejím nádoji. Při průměrně uvažované produkční životnosti čtyř laktací to znamená 800 – 3600 Kč. U dcer matek s velmi „nevýhodným“ genotypem kaseinu může být uvažováno i se zvýšením výtěžnosti o 20%, a to by znamenalo zdvojnásobení tohoto ekonomického efektu.

Kromě toho by bylo možné dosáhnout snížení nákladů zmenšením počtu analýz pro kontrolu užitkovosti. V současné době se kontroluje minimálně 5 vzorků v každé ze tří měřených laktací, při aplikaci pouze tři analýz ve dvou laktacích a ceně 12 Kč za analýzu (tj. cenová úroveň 2010) by se přímé náklady chovatele na kontrolu užitkovosti snížily o ca 110 Kč.

V každém případě využívání tohoto postupu bude nejlepším možným způsobem dosažení trvale vysoké kvality kozího mléka coby výchozí suroviny pro další mlékárenské (sýrařské) zpracování.

VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- P. Bucek a kol., *Ročenka chovu ovcí a koz v České republice za rok 2008*. Českomoravská společnost chovatelů, a.s. U Topíren 2/860, Praha (2009).
- A. Caroli, F. Chiatti, S. Chessa, D. Rignanese, P. Bolla and G. Pagnacco, Focusing on the goat casein complex, *J. Dairy Sci.* 89 (2006), pp. 3178–3187.
- V. Czerneková, G. Dudková, T. Kott, Z. Sztankóová, J. Soldát, M. Marková, Selected genetic markers: their effect on milk production traits. *Animal Science Papers and Reports*, 2004, roč. 22, s. 15-18.
- T. G. Devold, R. Nordbø, T. Langsrud, C. Svenning, M. Jansen Brovold, E. S. Sørensen, B. Christensen, T. Ådnøy and G. E. Vegarud, Extreme frequencies of the $\alpha s1$ -casein "null" variant in milk from Norwegian dairy goats – Implications for milk composition, micellar size and renneting properties, *Dairy Sci. Technol. INRA, EDP Sciences*, 2010
- S. C. Gupta; D. Kumar; A. Pandey; G. Malik; N. Gupta, New kapa-Casein Alleles in Jakhrana Goat Affecting Milk Processing Properties, *Food Biotechnology* 1532-4249, Volume 23, Issue 1 (2009), pp. 83 – 96
- B. Hayes, N. Hagesæther, T. Ådnøy, G. Pellerud, P.R. Berg, and S. Lien, Effects on Production Traits of Haplotypes Among Casein Genes in Norwegian Goats and Evidence for a Site of Preferential Recombination, *Genetics*. 174(1) 2006, pp. 455–464.
- K. Liu and V. Muse, PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data, *Bioinformatics* 21 (2005), pp. 2128–2129
- D. Marletta, S. Bordonaro, A.M. Guastella, A. Criscione and G. D'Urso, Genetic polymorphism of the calcium sensitive caseins in Sicilian Girgentana and Argentata dell'Etna goat breeds, *Small Rumin. Res.* 57 (2005), pp. 133–139.
- T.H.E. Meuwissen and M.E. Goddard, The use of marker haplotypes in animal breeding schemes, *Genet. Sel. Evol.* 28 (1996), pp. 161–176.
- L. Ramunno, G. Cosenza, M. Pappalardo, N. Pastore, D. Gallo, P. Di Gregorio and P. Masina, Identification of the goat *CSN1S1* F allele by means of PCR-RFLP, *Anim. Genet.* 31 (2000), pp. 333–346.
- L. Ramunno, G. Cosenza, M. Pappalardo, E. Longobardi, D. Gallo, N. Pastore, P. Di Gregorio and A. Rando, Characterization of two new alleles at the goat *CSN1S2* locus, *Anim. Genet.* 32 (2001), pp. 264–268.
- L. Ramunno, E. Longobardi, M. Pappalardo, P. Di Gregorio, G. Cosenza, P. Mariani, N. Pastore and P. Masina, An allele associated with a no detectable amount of αs_2 casein in goat milk, *Anim. Genet.* 32 (2001), pp. 19–26.
- A. Rando, L. Ramunno and P. Masina, Mutations in casein genes, *Zoot. Nutriz. Anim.* 26 (2000), pp. 105–114.

A. Sánchez, H. Ilahi, E. Manfredi, J. M. Serradilla, Potential benefit from using the *as1*-casein genotype information in a selection scheme for dairy goats, *J. Anim. Breeding and Genetics* 122 (2005), Issue 1, pp.21-29

Z. Sztankóová, C. Senese, V. Czerneková, G. Dudková, T.Kott, J.Soldát, Detection of Mls1 polymorphism at the goat beta-casein gene. In *XXI Genetic Days*. Wrocław: Agricultural University of Wrocław, 2004.

Z. Sztankóová, T.Kott, V. Czerneková, G. Dudková, V. Mátlová, V., J.Soldát, C. Senese, Analýza nulovej alely CSN1S1 lokusu u kozy bielej krátkosrstej a kozy hnedej krátkosrstej.. In *Ovce - kozy Seč 2004. Sborník přednášek z mezinárodní konference a setkání chovatelů*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2004, s. 129-130.

A. Tziboula-Clarke, *Goat milk*. In: Roginski H, Fuquay J, Fox P, editors. *Encyclopedia of dairy sciences (2003)*, Academic Press. p. 1270-9.

M.H. Yahyaoui, A. Angiolillo, F. Pilla, A. Sanchez and J.M. Folch, Characterization and genotyping of the Caprine κ -casein variants, *J. Dairy Sci.* 86 (2003), pp. 2715–2720.

VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ ŘPECHÁZELY METODICE

SZTANKÓOVÁ, Z. Jedinečnost kozieho mlieka v humánnej výžive. *Náš chov*, 2005, roč. 65, č. 2, s. 46-47.

SZTANKÓOVÁ, Z., SENESE, C., CZERNEKOVÁ, V., DUDKOVÁ, G., KOTT, T., MÁTLOVÁ, V. & SOLDÁT, J. Genomic analysis of the CSN2 and CSN3 loci in two Czech goat breeds. *Animal Science Papers and Reports*, 2005, roč. 23, s. 67-70.

SZTANKÓOVÁ, Z. Specifická variabilita kozího mléka. *Náš chov*, 2006, roč. 66, č. 4, s. 78-79.

SZTANKÓOVÁ, Z. Kozie mlieko verus genetický polymorfizmus. *Mliekarstvo*, 2006, roč. 37, č. 1, s. 31-32. VÚŽV, v.v.i., Praha.

SZTANKÓOVÁ, Z., KOTT, T., CZERNEKOVÁ, V., DUDKOVÁ, G., MÁTLOVÁ, V. & SOLDÁT, J. A new allele specific polymerase chain reaction method (AS-PCR) for detection of the goat CSN1S1 01 allele. *Small Ruminant Research*, 2006, roč. 66, s. 282-285.

MARKOVÁ, M., SNÁŠELOVÁ, J., BUCHVALDKOVÁ, T., MÁTLOVÁ, V. & SZTANKÓOVÁ, Z. Látkové složení a technologické vlastnosti kozího mléka. In *XXXVII. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin*. Praha: VÚPP, 2006, s. 351-353.

SZTANKÓOVÁ, Z., MÁTLOVÁ, V. & MALÁ, G. Genetic polymorphism at the CSN1S1 gene in two Czech goat breeds. *Czech Journal of Animal Science*, 2007, roč. 52, s. 199-202. VÚŽV, v.v.i., Praha.

SZTANKÓOVÁ, Z., KYSELOVÁ, J., KOTT, T. & KOTTOVÁ, E. Technical note: Detection of the C allele of beta-casein (CSN2) in Czech dairy goat breeds using LightCycler analysis. *Journal of Dairy Science*, 2008, roč. 91, s. 4053-4057.

HORÁK, F., KONRÁD, M., MALÁ, G., MAREŠ, V., MÁTLOVÁ, V., MILERSKI, M., SEDLÁK, J. & SZTANKÓOVÁ, Z. *80 let KONTROLY UŽITKOVOSTI KOZ v České republice 1928-2008* Brno: Svaz chovatelů ovčí a koz, 2008, 148 s. ISBN 978-80-904140-3-7

MARKOVÁ, M., PECHAČOVÁ, M., MÁTLOVÁ, V., SZTANKÓOVÁ, Z. & SNÁŠELOVÁ, J. Fermentovaný nápoj na bázi kefíru z kozího mléka dvou variant alfa s1 - kaseinu. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 2008, roč. , č. 109, s. 9-11.

SZTANKÓOVÁ, Z., MÁTLOVÁ, V., KYSELOVÁ, J., JANDUROVÁ, O.M., ŘÍHA, J. & SENESE, C. Short communication: polymorphism of casein cluster genes in Czech local goat breeds. *Journal of Dairy Science*, 2009, roč. 92, s. 6197-6201.

- Vydal: Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i.
Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves
- Název: Využití polymorfismu genů mléčných bílkovin pro zlepšení kvalitativních a technologických vlastností mléka kozí
- Autoři: Ing. Věra Mátlová
Ing. Zuzana Sztankóová, PhD.
- Oponenti: doc.Ing. Milena Fantová, CSc.
Česká zemědělská univerzita v Praze
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů
Ing. Jaroslav Oplt, CSc.
Ministerstvo zemědělství české republiky
Odbor živočišných komodit
- Dedikace: Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu 1G57051, podporovaného Národní agenturou pro zemědělský výzkum (NAZV), řešeného v letech 2005-2008

ISBN 978-80-7403-076-5

Vydáno bez jazykové úpravy.