

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
ČESKÉ BUDĚJOVICE**

Studijní program: N 4101 Zemědělské inženýrství

Studijní obor: Živočišné biotechnologie

Katedra: Katedra genetiky, šlechtění a výživy

Vedoucí katedry: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Diplomová práce

KONGENITÁLNÍ CHOROBY SKOTU

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.

Autor:

Bc. Hana Kosobudová

2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Jméno a příjmení: Hana Kosobudová

Studijní program:

Studijní obor: **Živočišné biotechnologie**

Název tématu: Kongenitální choroby skotu
Congenital disorders by cattle

Zásady pro vypracování:
(v zásadách pro vypracování uveďte cíl práce a metodický postup)

Cílem diplomové práce je provést ve vybraném panelu plemen analýzy, které budou provedeny molekulárně-genetickými metodami. V závěru by měl být zhodnocen výskyt vybraných chorob ve zkoumaném souboru zvířat, popř. navrhnout vhodný metodický postup pro zabránění dalšího šíření těchto chorob do následujících populací.

Práce bude členěna do kapitol:

- 1) úvod
 - 2) literární přehled výskytu kongenitálních chorob skotu a principy molekulárně-genetických metod, využívaných při odhalování těchto chorob – převážně z vědeckých článků v anglickém jazyce
 - 3) materiál a metodika – popis vybraného panelu zvířat, popis použitých molekulárně-genetických metod
 - 4) výsledky a diskuze – analýza zjištěných výsledků genotypizace u jednotlivých lokusů a porovnání získaných výsledků s výsledky jiných autorů
 - 5) závěr – shrnutí zjištěných výsledků, formulace praktických doporučení
- Při zpracování diplomové práce budou dodržena obvyklá formální pravidla.

Rozsah grafických prací: 5 - 7 tabulek, 5 – 10 obrázků

Rozsah průvodní zprávy: 50 stran textu

Seznam odborné literatury:

Buitkamp J., Semmer J., Gotz K.U. (2011): Arachnomelia syndrome in Simmental cattle is caused by a homozygous 2-bp deletion in the molybdenum cofactor synthesis step 1 gene (MOCS1). *BMC Genetics*, 11,12.

Buck B.C., Ulrich R., Wohlke A., Kuiper H., Baumgartner W., Distl O. (2010): Vertebral nad multiple organ malformation in a black and white German Holstein calf. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift*, 123 (5-6), 251-255.

Meydan H., Yildiz M.A., Angerholm J.S. (2010): Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor IX deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52, 56.

Čítek, J.; Řehout, V.; Hájková, J.; Pávková, J. (2006): Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech republic. *Veterinární medicína*, 51 (6), 333 –339.

Čítek, J.; Řehout, V.; Večerek, L.; Hájková, J. (2007): Genotyping Glycogen Storage Disease Type II and Type V in Cattle Reared in the Czech Republic. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 54: 257 – 259.

Fries, R.; Ruvinski, A. (1999): *The Genetics of the Cattle*. CABI Publishing, 720 pp., ISBN: 9780851992587.

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

Konzultant:

Datum zadání bakalářské práce: 15.3.2011

Termín odevzdání bakalářské práce: 30.4.2012

L.S.

prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.

prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15.3.2011

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Lence Hanusové, Ph.D., za ochotu, trpělivost a veškerou pomoc při zpracování diplomové práce. Děkuji také celému kolektivu katedry genetiky, šlechtění a výživy ZF JU za poskytnutí cenných rad. Nakonec bych ráda poděkovala rodině a přátelům, kteří mě podporovali během studia.

Tato práce byla financována z finančních prostředků z VZ MSM 6007665806.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně na základě vlastních zjištění a s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě (v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Zemědělskou fakultou JU) elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách.

V Českých Budějovicích dne

.....

Bc. Hana Kosobudová

ANOTACE

V rámci této diplomové práce byla provedena genotypizace 46 jedinců plemene česká červinka ze Školního zemědělského podniku JU v ČB, která sledovala výskyt autozomálně recesivně dědičných poruch, konkrétně bovinní citrulinémie (BC) v exonu 5 a deficiencie krevního koagulačního faktoru XI (FXI) v exonu 9 a 12.

Analýza BC proběhla pomocí PCR/RFLP a pro poruchu FXI v obou exonech byly stanoveny genotypy na základě rozdílné délky fragmentů pomocí PCR metody a agarózové horizontální elektroforézy.

Přítomnost mutované alely se prokázala pouze v lokusu pro BC a to u 7 heterozygotních přenašečů, kteří produkovali 3 fragmenty o délce 185 bp, 103 bp a 82 bp. Frekvence mutované alely a frekvence heterozygotů odpovídá 7,6 % a 15,2 %.

Výsledky studie ukazují, že výskyt nežádoucí alely pro BC je v námi testovaném panelu zvířat dosti vysoký. Do budoucna bude zapotřebí přijmout opatření, která povedou k eliminaci této alely, neboť další její šíření by mělo negativní dopad na zdravotní stav populace a působilo by komplikace při regeneraci české červinky, která patří mezi naše genetické zdroje.

V literárním přehledu je nastíněna problematika kongenitálních poruch a pojednáno o významu dědičnosti zdraví a přečtení genomické informace skotu.

Klíčová slova: česká červinka, bovinní citrulinémie, deficiencie krevního koagulačního faktoru, PCR/RFLP, elektroforéza, genetický zdroj, kongenitální porucha, dědičnost zdraví, genomická informace

ANNOTATION

In the framework of this thesis was performed genotyping of 46 specimens of the breed Czech red cattle from the University farm in Czech Budejovice, which monitored the incidence of autosomal recessive genetic disorders, specifically bovine citrullinemia (BC) in exon 5 and deficiency of blood coagulation factor XI (FXI) in exon 9 and 12.

Genotyping for BC was done using PCR/RFLP methods and for the disorder FXI in both exons genotypes were determined on the basis of different length of fragments using PCR technology and horizontal agarose electrophoresis.

The presence of mutant allele was detected only in the locus for BC and that is in 7 heterozygous carriers, who produced three bands with a length of 185 bp fragments, 103 bp and 82 bp. The frequency of mutant allele and the frequency of heterozygous carriers to 7.6% and 15.2%.

Results of the study show that the presence of mutant allele for BC in our tested panel of animals is relatively high. In the future it will be necessary to adopt measures that will lead to the elimination of this allele. Otherwise, its further dissemination would have a negative impact on the health of the population and there might occur complications in the regeneration of Czech red cattle, which is one of our farm animal genetic resources.

The literature review deals with the problems of congenital disorders and discusses the importance of health heredity and understanding of the genomic information of cattle.

Keywords: Czech red cattle, bovine citrullinemia, deficiency of blood coagulation factor XI, PCR/RFLP, electrophoresis, genetic resource, congenital disorder, health heredity, genomic information

OBSAH

1. ÚVOD	10
2. CÍL PRÁCE	11
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
3.1 Kongenitální poruchy	12
3.2 Příčiny, dělení a výskyt kongenitálních poruch skotu.....	12
3.2.1 Genetické příčiny vzniku kongenitálních poruch	13
3.2.2 Negenetické (exogenní) příčiny vzniku kongenitálních poruch.....	15
3.3 Dědičnost zdraví.....	16
3.4 Genom skotu.....	17
3.5 Markery asistovaná selekce (MAS).....	18
3.5.1 Genomická selekce.....	23
3.6 Vybrané kongenitální poruchy skotu.....	25
3.6.1 Bovinní citrulinémie (BC).....	25
3.6.2 Deficience krevního koagulačního faktoru XI (<i>F11</i>)	27
3.7 Česká červinka	30
3.7.1 Plemenné znaky a chovný cíl	31
3.7.2 Definice plemene a kódové označení.....	33
3.8 Základní metody molekulární genetiky využívané k detekování kongenitálních poruch ...	34
3.8.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	34
3.8.2 RFLP – délkový polymorfismus restrikčních fragmentů	37
3.8.3 Gelová elektroforéza	37
4. MATERIÁL A METODIKA	40
4.1 Materiál	40
4.2 Metodika.....	40
4.2.1 Izolace DNA.....	40
4.2.2 Genotypizace pro lokus bovinní citrulinémie.....	41
4.2.2.1 PCR pro lokus bovinní citrulinémie	41

4.2.2.2 RFLP pro lokus bovinní citrulinémie	42
4.2.3 Genotypizace pro FXI v exonu 9 a 12	43
4.2.3.1 PCR pro FXI.....	43
4.2.3.2 Detekce fragmentů horizontální elektroforézou	44
4.3 Statistické vyhodnocení.....	44
5. VÝSLEDKY	47
5.1 Izolace DNA.....	47
5.2 Detekce výskytu mutací pro BC a FXI.....	47
5.3 Statistické vyhodnocení výsledků	49
6. DISKUZE.....	51
7. ZÁVĚR.....	55
8. SEZNAM ZKRATEK.....	57
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59

1. ÚVOD

Předpokladem úspěšného chovu skotu je zdravé stádo. Na zdravotním hledisku se podílí především podmínky prostředí, ve kterém se zvířata nachází. Kvalitní výživa, technologie ustájení a péče ošetřovatelů jsou nezbytné. Nezanedbatelnou roli však hraje i vlastní potenciál jedince daný jeho genofondem. Právě nyní se začíná ve šlechtění věnovat větší pozornost tzv. druhotným funkčním vlastnostem, kterými jsou zdraví a dlouhověkost.

S rozvojem molekulárně-genetických metod jsme nyní již schopni číst vlastní genomickou informaci skotu. Tato oblast vědy a výzkumu je de facto stále ještě v plenkách, ale už dnes napomáhá při selekci zvířat. S využitím genetických markerů lze zpřesnit, zrychlit a zefektivnit výběr zvířat do další plemenitby. V současnosti již dokážeme odhalit výskyt některých nežádoucích kongenitálních chorob, jako jsou například CVM, BLAD, DUMPS aj., a tím napomoci v ozdravování chovů. Další velké pozitivum tkví v urychlení kontroly dědičnosti. Genomické testy napomáhají zpřesňovat plemennou hodnotu mladých zvířat, která mohou být zařazena do šlechtění mnohem dříve, než tomu bylo doposud. Význam to má především pro snížení nákladů na odchov a následnou testaci u plemenných býků, kdy je chováno méně býků čekatelů.

Z pohledu genetické variability je populace skotu poměrně homogenní skupinou zvířat. Jednoduše řečeno, skoro všechna zvířata jsou ve více či méně příbuzenském stavu.

Dědičné poruchy zdraví skotu mají v naprosté většině případů recesivní způsob dědičnosti. Jejich přenos mezi generacemi může být proto skrytý. Význam jejich testování a odhalování nových příčinných mutací je proto nesporný. Pro chovatele je i ztráta jediného zvířete nežádoucí a působí na zvyšování provozních nákladů a snižování ziskovosti chovu.

2. CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce je provedení analýzy výskytu vybraných kongenitálních chorob u zkoumaného souboru zvířat pomocí molekulárně-genetických metod. V závěru budou shrnuty dosažené výsledky a případně doporučeny příslušná chovatelská opatření.

Analyzovaným souborem zvířat budou jedinci plemene česká červinka. Genotypizace se provede pro výskyt bovinní citrulinémie a deficiencie krevního koagulačního faktoru XI (*F11*) v exonu 9 a 12.

3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 KONGENITÁLNÍ PORUCHY

Slovo kongenitální pochází z latinského *congenitalis*, znamenající vrozený. Kongenitální poruchy jsou takové změny struktury nebo funkce tkání a orgánů, které si jedinec nese od narození (Blowey & Weaver, 2003). Změny už překračují variabilitu běžnou v populaci a pro jedince jsou do určité míry patologické (www.vrozene-vady1.cz).

3.2 PŘÍČINY, DĚLENÍ A VÝSKYT KONGENITÁLNÍCH PORUCH SKOTU

Příčiny vzniku kongenitálních poruch jsou mnohdy neznámé. Zásadní roli většinou hraje genetický základ jedince, ovšem svůj podíl na jejich vzniku může mít i vnější prostředí působící během březosti. Bývá velmi obtížné rozhodnout, co je příčinou vzniku, protože oba vlivy mnohdy mívají podobné projevy dopadu na jedince. K identifikaci příčin vzniku mohou napomoci veterinární a chovatelské záznamy. Hlášení výskytu poruch by proto mělo být v zájmu každého chovatele, aby evidence byla co možná nejpřesnější (Čítek, 2009, *in verb*).

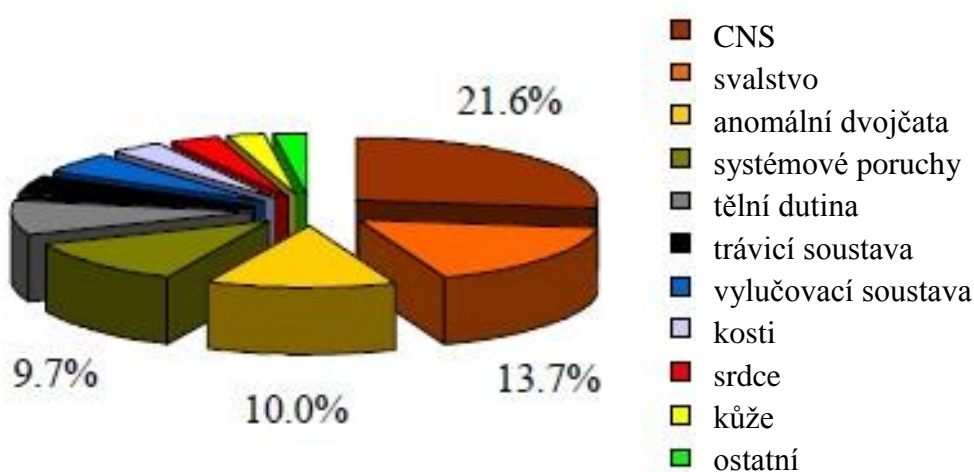
Citlivost k činitelům, kteří mohou ovlivnit vývoj plodu, se mění v průběhu březosti. Obecně platí, že se zvyšujícím se gestačním věkem náchylnost klesá. Prvních 14 dnů březosti je embryo citlivé na genetické mutace a změny chromozomálního počtu a struktury. Mezi 14. - 42. dnem, kdy dochází k formování orgánových soustav, je zvýšená citlivost vůči teratogenům. Po 42. dni se plod stává k teratogenům rezistentní. Výjimku tvoří mozeček a urogenitální systém, neboť se vyvíjí v pozdějším stádiu březosti (Bademkiran *et al.*, 2009)

Podle mechanismu vzniku dělíme vrozené vady do 4 skupin.

1. **Malformace:** zapříčiněny abnormálním vývojem tkáně či orgánu, ke kterému dochází od úplného počátku.
2. **Deformace:** způsobeny zásahem cizího faktoru (například fyzikálního charakteru), jenž vede k poškození doposud zdravé tkáně nebo orgánu.
3. **Disrupce:** zapříčiněny patologickým procesem, který naruší vývoj orgánu či tkáně, jenž byl původně normální.

4. Dysplazie: způsobena abnormálním uspořádáním buněk, které tvoří danou tkáň či orgán (www.vrozene-vady1.cz).

Frekvence výskytu kongenitálních poruch je velmi variabilní. Liší se v závislosti na testovaném plemeni a prostředí, ze kterého zvíře pochází (Čítek *et al.*, 2009). U skotu bylo zjištěno více než 200 různých genetických vad. Některé z nich se vyskytují jen ve spojení s určitým plemenem. Obecně je frekvence výskytu kongenitálních vad nízká, ale ne zanedbatelná (Parish, 2010). V rámci prosperity chovu a šlechtitelské práce proto existuje snaha je eliminovat.



Graf 1- odhadovaná frekvence kongenitálních poruch skotu (1:100 - 1:500); (O'Toole, 2010)

Kongenitální vady nejčastěji souvisí s poruchami nervového systému a pohybového aparátu. Na grafu 1 výše je patrné, jaké procento podílu zaujímají poruchy jednotlivých soustav. Do výšece „ostatní“ lze zahrnout například metabolické poruchy, poruchy imunitního systému aj. (O'Toole, 2010).

3.2.1 GENETICKÉ PŘÍČINY VZNIKU KONGENITÁLNÍCH PORUCH

Změna genetické informace, nebo-li mutace, patří k hlavním příčinám vzniku kongenitálních poruch. Základním hlediskem, podle kterého můžeme mutace rozdělit, je zda působí na úrovni genomu, chromozomů nebo genů.

Genomovými mutacemi nazýváme změny působící na úrovni počtu chromozomálních sad. Jde o tzv. polyploidie, vedoucí ke znásobení počtu chromozomů v somatických buňkách či gametách a haploidie, které mají za důsledek

snížení počtu chromozomů na polovinu. Počet chromozomů je taxonomickým znakem pro každý druh. Změny na úrovni genomu jsou neslučitelné se životem (www.lfhk.cuni.cz/kohler/).

Mutace působící na chromozomální úrovni označujeme jako chromozomální aberace. Vznikají v důsledku strukturní nebo numerické odchylky v karyotypu (www.vrozene-vady2.cz; www.vrozene-vady3.cz). Do této kategorie patří například robertsonovské translokace 1/21, vyskytující se u holštýnsko-fríského plemene (Miyake *et al.*, 1991), nebo 14/20 a 13/2, rozšířené v chovech simentálského skotu (Weber *et al.*, 1992).

Mutace působící na genové úrovni podmiňují monogenně či polygenně založené poruchy. Vznik monogenních vad je podmíněn interakcí jednoho páru alel, nacházejících se na stejném místě chromozomu, tzv. lokusu. Defektní alela zodpovídající za vznik poruchy může mít recesivní nebo dominantní charakter (Kuklík, 2006). Z monogenně podmíněných poruch se nejčastěji vyskytují poruchy s autozomálně recesivní dědičností. Řadí se sem například *epitheliogenesis imperfecta* (Blowey & Weaver, 2003), různé enzymopatie (Kováč, 2001), BLAD, CVM aj. Dalšími typy jsou pak autozomálně dominantní dědičnost nebo na X- chromozom vázaná recesivní či dominantní dědičnost. U polygenních vad je výsledný fenotyp ovlivněn více geny, mezi nimiž působí různě složité interakce (www.vrozene-vady3.cz). Do této skupiny patří například *atresia ani* a *atresia ilei* (Kováč, 2001).

Existují také tzv. **multifaktoriální poruchy**. Na jejich vzniku se podílí kombinace genetických i negenetických (exogenních) příčin (www.vrozene-vady3.cz). Jejich charakteristickým znakem je značná fenotypová variabilita. Do této kategorie můžeme zařadit například cystickou degeneraci ovarií, agromegalické plody nebo pacecky (Kováč, 2001).

3.2.2 NEGENETICKÉ (EXOGENNÍ) PŘÍČINY VZNIKU KONGENITÁLNÍCH PORUCH

Vlivy vnějšího prostředí, které mají za následek vznik a vývoj anomálií u plodů, obecně nazýváme teratogeny (Hanusová, 2010, *in verb*). Nejčastěji se dělí do 3 skupin.

- 1. Teratogeny fyzikální povahy:** mezi tyto teratogeny řadíme změny tlaku, otřesy, teplo a chlad, RTG záření. Mechanické vlivy mohou být příčinou vzniku rozštěpů tkání, orgánů, popřípadě celého zárodku (Kudláč *et al.*, 1977; www.vrozene-vady2.cz).
- 2. Teratogeny chemické povahy:** takovými rozumíme látky používané v průmyslu a zemědělství jako polychlorované bifenyly, těžké kovy, organická rozpouštědla aj.; farmaka jako cytostatika, antibiotika, látky steroidní povahy apod.; intoxikace z krmiva nebo vody jako u lupiny, bolehlavu skvrnitého, vikve, tabáku, popřípadě mykotoxiny, aflatoxiny, dusičnany a dusitany a další. Jejich vlivem dochází často k abortům, vývinu deformit končetin (*arthrogryposis*), defektů páteře (skoliózy, kyfózy) a rozštěpům patra (Keeler, 1974; Shupe *et al.*, 1967; Hovingh, 2009; Knight & Walter, 2004; www.vrozene-vady2.cz).
- 3. Teratogeny biologické povahy:** takto označujeme infekční nákazy, které mohou být způsobeny různými bakteriemi, viry, plísněmi aj., například brucelóza, leptospiróza, listérie, BVD virus, IBR (infekční bovinní rinotracheitida), bluetongue virus, campylobacter, salmonela a další. Nákazy vedou nejčastěji ke vzniku abortů, poruch centrální nervové soustavy a snížené životaschopnosti telat (Hovingh, 2009; Kudláč *et al.*, 1977; Kováč, 2001).

Předčasné ukončení gravidity většinou končí mumifikací plodu, abortem (zmetání, potrat) nebo časnou embryonální smrtí. Z ekonomického pohledu tento problém představuje významné hospodářské škody. Následkem může být jak narušení reprodukce a plemenářské práce, díky ztrátě mláďat, zhoršení kondice a případné neplodnosti zmetalek, tak i snížení laktace a zvýšení nákladů spojených s veterinárním ošetřením (Kudláč *et al.*, 1977).

3.3 DĚDIČNOST ZDRAVÍ

Dnes již víme, že u skotu se vyskytuje značná rozmanitost v projevu reakce na nemoci. Citlivost k nemocem se mění hlavně v závislosti na plemeni. V současnosti se čím dál více šlechtí na odolnost zvířat k nemocem, jako jsou mastitidy, ketózy, respirační onemocnění, brucelóza, tuberkulóza, bovinní spongiformní encefalopatie aj. (Morris, 2007).

Důležitou roli hraje prostředí, ve kterém se zvíře nachází. Plemena, která jsou pro daný region původní, mají přirozeně vyšší odolnost vůči místním chorobám a nákazám. Během evoluce se totiž přizpůsobila místním podmínkám. Vyvinula se u nich určitá tolerance až rezistence k běžným patogenům vyskytujícím se v daném prostředí (Savič *et al.*, 1995).

Rezistence vůči chorobám lze stanovit na základě klinického vyšetření nebo pomocí genetických markerů (MAS – markery asistovaná selekce). Ve výzkumu pro genetickou rezistenci k nemocem se využívá databáze FAO DAD-IS (Food Agriculture Organization Domestic Animal Diversity Information System), která obsahuje záznamy o fenotypových a genotypových popisech a jiných zdravotních kritériích (Jovanovič *et al.*, 2009).

Určitou naději dává i využití transgenních technologií. S jejich pomocí se podařilo získat geneticky modifikovaný skot se zvýšenou odolností vůči BSE nebo mastitidám (Petr, 2006).

Ovšem svoji nezastupitelnou roli má i nadále kontrola dědičnosti zdraví (KDZ) prováděná na základě hodnocení zdravotního stavu potomků testovaného plemeníka. V České republice se používá KDZ založená na tzv. slovenském modelu, který je členěn do třech etap (Kováč, 2001):

- 1. etapa:** zahrnuje tři období - gravidita, porod, životaschopnost do 1. měsíce u 120 telat F1 generace.
- 2. etapa:** posuzuje vývojové vady pohlavních orgánů - hodnoceno minimálně u 15 synů a 50 dcer ve věku mezi 10. a 16. měsícem stáří.
- 3. etapa:** posuzuje zdravotní stav u 30 dcer plemeníka po prvním porodu a zároveň hodnotí i zdravotní stav jejich potomků (F2 generace).

U plemenných býků je také kontrolováno vlastní zdraví (KVZ). Sleduje se sedm kritérií:

1. sexuální výraz
2. nervový typ
3. sexuální aktivita
4. pohlavní reflexy
5. onemocnění a vývojové anomálie pohlavního ústrojí
6. vady exteriéru ve vztahu k poruchám zdraví
7. utváření končetin a mechanika pohybu

www.cmsch-kdz-prehled.cz.

Každoročně na základě výsledků z KDZ a KVZ jsou plemenní býci stojící na inseminačních stanicích zařazováni do zdravotních tříd A, B a C. Přiděluje se vždy horší zdravotní třída bez ohledu na to, zda se jedná o třídu za vlastní zdraví nebo kontrolu dědičnosti zdraví. Zdravotní třídy dělíme na:

A třída: využití v plemenitbě bez omezení

B třída: využití v plemenitbě s omezením

C třída: býk je z plemenitby vyřazen

www.cmsch-kdz-prehled.cz.

3.4 GENOM SKOTU

Pojem genom vystihuje označení pro kompletní genetickou informaci v konkrétní buňce nebo organismu. Dělí se na jaderný a mimojaderný (mitochondriální) (Urban, 2008c).

Genom skotu byl přečten před třemi lety v roce 2009. Výzkum proběhl na jedné krávě herefordského plemene, u které došlo k přečtení kompletní sekvence genomu a následnému srovnání se sekvencemi dalších šesti plemen. Odhaduje se, že genom obsahuje přibližně 22000 genů a 2,8 miliardy nukleotidů (Anson, 2009). Určitý přínos poskytla i analýza genetické informace bizona s využitím Bovine SNP50 čipu určeného pro skot. Vědci z Australian Centre for Ancient DNA, kteří na tomto projektu spolupracovali, byli sami překvapeni ze zjištění, že lze pomocí tohoto

čipu provést kvalitní profilaci genotypů i pro ty druhy, pro něž původně nebyl ani navržen (Marcinková & Beran, 2009).

Přečtení genomu pomůže pochopit vývoj skotu a jeho adaptabilitu v rámci času a prostředí. V neposlední řadě poskytne srovnání s lidským genomem. Zjistilo se, že člověk má se skotem shodných přibližně 80 % DNA. Fakt, že dobytek je nám geneticky blíže než myši, mající běžně využití jako laboratorní zvíře, může pomoci k pochopení vývoje a zlepšení léčby mnoha nemocí člověka, zejména týkající se reprodukční biologie a některých infekčních chorob (Anson, 2009; Beran, 2009). Neustále panují obavy z poklesu variability genofondu u skotu a s tím souvisejícím nárůstem zdravotních problémů, ale ve skutečnosti se prokázalo, že genetická diverzita skotu je větší než u člověka nebo psa (Bovine HAPMAP Consortium, 2009; Anson, 2009).

Stejně jako u lidí, tak i u skotu sehrály duplicitní segmenty genomu zřejmý dopad na přestavbu chromozomů. Jejich význam ve vývoji dobytka spočívá zejména v tom, že ovlivňují geny pro imunitu, laktaci, zažívání atd. Nepochybně největší revoluci způsobí tento objev ve zkoumání genů, majících vliv na vlastnosti podstatné pro produkci masa a mléka (Anson, 2009; Tellam *et al.*, 2009). S tímto bude souviset i snaha o znovunalezení genové variability hospodářských druhů zvířat, což může přinést nový impuls v moderním zemědělství (Marcinková & Beran, 2009).

3.5 MARKERY ASISTOVANÁ SELEKCE (MAS)

Markery asistovaná selekce je biotechnologická metoda, založená na kombinaci poznatků z tradiční genetiky a molekulární biologie. MAS nám pomáhá při selekci genů, které mají dopad na užitkové vlastnosti jako barva srsti, kvalita masa a mléka nebo odolnost k nemocem (www.biotech.iastate.edu/). Většina takto studovaných genů jsou geny velkého účinku, a nebo geny kvantitativních vlastností (QTG). Pokud neznáme přesné umístění genu velkého účinku, tak jej nazýváme jako lokus kvantitativních vlastností (QTL) (Urban, 2008a).

Geny ovlivňující ekonomicky nejdůležitější znaky jsou rozmístěny po celém genomu. Nachází se zde relativně málo genů, které mají velký dopad na požadované znaky, ale také hodně genů, které již mají menší vliv (Thallman, 2009). Podstata MAS spočívá v hledání genetických (zejména DNA) markerů, které jsou buď

součástí genů, majících vliv na požadované vlastnosti, nebo jsou s nimi alespoň v co možná nejužší vazbě. Podle práce autorů Hulák *et al.* (2006) je existence DNA markerů dána předpokladem existence polymorfismu na úrovni DNA. Mezi charakteristické vlastnosti těchto markerů se řadí následující:

1. Jsou tvořeny sekvencemi bází na specifickém fyzickém místě genomu (lokusu), tyto sekvence jsou variabilní mezi jedinci.
2. Jsou exaktně testovatelné a vykazují kodominantní dědičnost, tj. lze zjistit i heterozygotní genotyp, který se ve fenotypu neprojeví.
3. Mohou, ale nemusí být částí genu.
4. Lze je hodnotit na úrovni zárodečného vývoje nebo i zárodečných buněk a není třeba čekat na fenotypový projev v dospělosti organismu.
5. Jsou vysoce informativní, lze je získat i z malého množství materiálu a také v libovolné fázi ontogeneze jedince včetně embryí a tělesných pozůstatků.

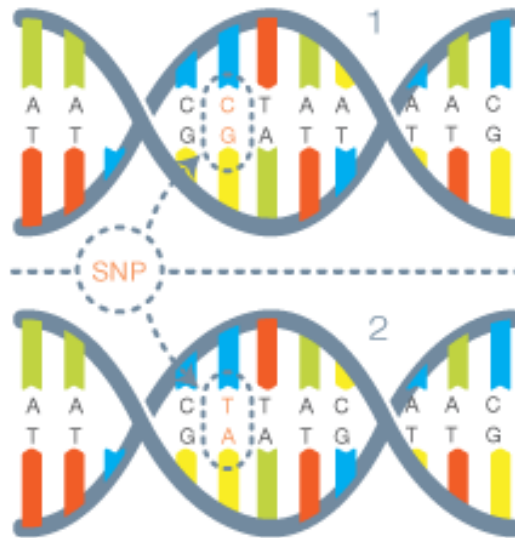
K získání markerů musíme nejprve znát mapu genů a QTL. Na jejich základě lze poté identifikovat kandidátní geny mající vztah k užitkové vlastnosti a provést asociační studie na experimentálních a komerčních populacích. Hlavním problémem asociačních studií je vazbová nerovnováha a neznámé genetické pozadí v populacích (Hulák *et al.*, 2006). V různých populacích se může vyskytovat jiná vazbová fáze. Proto má zásadní význam správný výběr markerů pro danou populaci (Urban, 2008b).

Z pohledu QTL dělíme genetické DNA markery na 2 typy (Urban, 2008b; Hulák *et al.*, 2006):

- I. typ: **přímé markery** – kódující exprimované geny – vyznačují se nízkou hladinou polymorfismu. Využívají se v komparativním mapování. Pro studium diverzity rodin a populací či určování identity jsou méně vhodné.
- II. typ: **nepřímé markery** – jde o polymorfismy, které nemají vliv na projev znaku, ale jsou ve vazbě s QTL. Dělí se na dvě skupiny:
 - a) **vysoce variabilní sekvence DNA**: patří sem krátké tandemové repetice tzv. mikrosatelity (STR – Short Tandem Repeats) a minisatelity (VNTR – Variable Number Tandem Repeats). Vyznačují se vysokým polymorfismem.

Hlavní využití mají při populačních studiích, určování rodičovství, identity, a tvoří základ pro vazbové mapování genů – například QTL.

b) **jednonukleotidové polymorfismy** - SNP (single nucleotide polymorphism) - markery v kódujících nebo častěji nekódujících sekvencích, ve kterých byl odhalen polymorfismus podmíněný záměnou jedné báze v DNA, viz. názorná ukázka na obrázku 1. V genomu se vyskytují přibližně každých 500 – 100 bp.

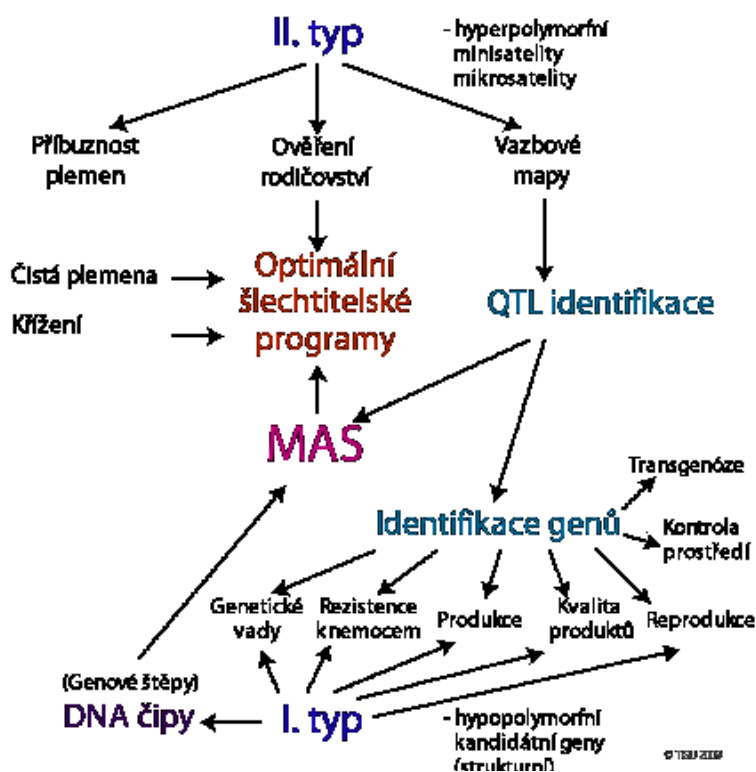


Obrázek 1 - SNP polymorfismus; www.siriusgenomics.com

Podle metod analýzy dělíme DNA markery do dvou skupin (Teturová, 2011):

1. markery založené na hybridizaci (RFLP),
2. markery založené na polymerázové řetězové reakci (PCR), kterou amplifikujeme náhodnou nebo specifickou sekvenci DNA (AFLP, RAPD, SCAR, SSR, CAPS nebo-li PCR – RFLP, STS, SNP aj.).

Varianty využití DNA markerů jsou schématicky znázorněny na obrázku 2.



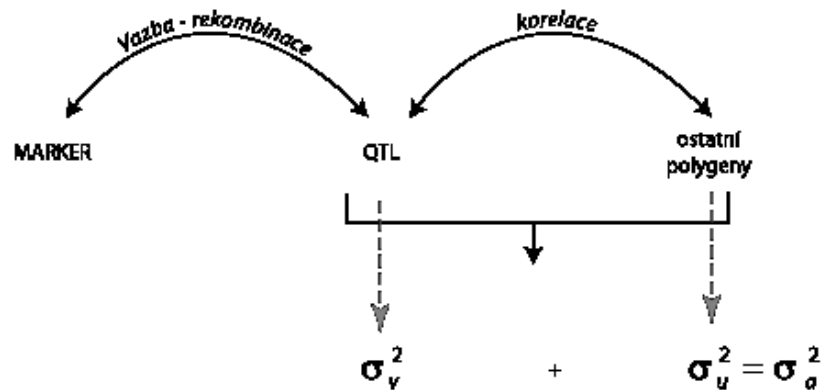
Obrázek 2 - využití DNA markerů ve šlechtění hospodářských zvířat; (Urban, 2008b)

Ze schématu výše je patrné, že využití DNA markerů je téměř v jakékoliv oblasti šlechtění a zahrnuje širokou oblast výzkumu. Jejich aplikace v praxi bezesporu přináší nové poznatky, které umožní rychlejší, systematictější a efektivnější rozvoj mnoha odvětví moderního zemědělství.

Efekt při využití MAS se u jednotlivých kategorií užitkových vlastností liší. Eenennaam (2006) řadí vlastnosti sestupně od těch s nejvyšším efektem po ty s nejnižším efektem:

- genetické vady s jednoduchou dědičností,
- jatečná hodnota a senzorické vlastnosti,
- plodnost a reprodukční výkonnost,
- výnos z jatečně upraveného těla,
- produkce mléka a mateřské vlastnosti,
- růst, hmotnost při narození, snadnost telení.

Využitelnost markeru jako selekčního kritéria závisí na síle vazby a četnosti možných rekombinací. Čím je vazba silnější, tím se zvyšuje spolehlivost selekce podle markeru. Celková genetická proměnlivost (σ_a^2) je ovlivněna jak působením QTL (σ_v^2), tak i ostatními polygeny (σ_u^2). Obrázek 3 znázorňuje schéma popisující jejich vzájemný vztah. Význam jednotlivých alel QTL je buď velký, nebo malý. Na základě toho pak marker vysvětluje různě velkou míru proměnlivosti (σ_v^2), což předurčuje i vlastní účinnost MAS (Řehout, 2012, *in verb*).



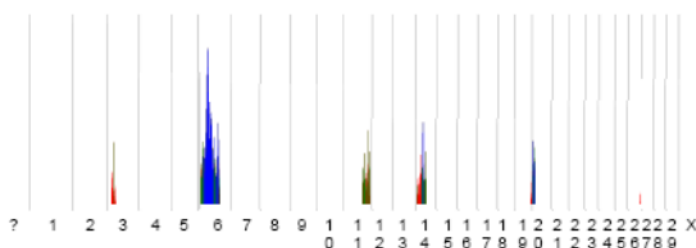
Obrázek 3 - schéma popisující vlivy na celkovou genetickou proměnlivost a vztah mezi markerem, QTL a polygeny; (Urban, 2008d)

Jednotlivé kroky MAS můžeme shrnout do čtyř základních bodů (Řehout, 2012, *in verb*):

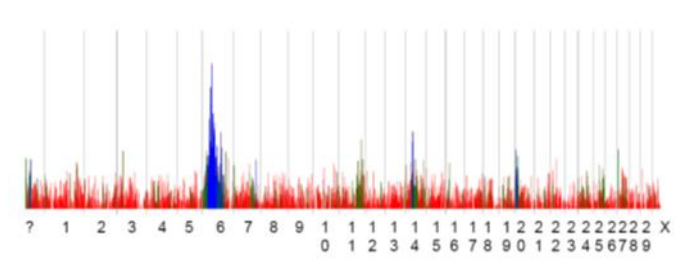
- vyhledání markerů
- stanovení mapy, z níž vyplývá síla vazby mezi markerem a QTL
- stanovení podílu proměnlivosti QTL (σ_v^2)
- identifikace nositelů požadované alely a jejich využití v plemenitbě.

3.5.1 GENOMICKÁ SELEKCE

Genomická selekce (WGS - whole genome selection) je určitou formou MAS. Vychází z možností určit polymorfismus DNA na úrovni jednotlivých nukleotidů (SNP) a určit jednotlivé markery, které mají spojitost s požadovanými užitkovými vlastnostmi na základě referenční populace (Kučera, 2011). Od původní MAS se liší v počtu využívaných markerů, kterých je mnohonásobně více, viz obr. 4 a 5. Stejně jako MAS klade největší důraz na regiony s prokazatelným vlivem na požadované znaky, ale zároveň počítá i s těmi, u kterých jejich vliv už není tak jednoznačný. To umožňuje WGS počítat s větší částí genetické variability (Thallman, 2009). Genomická selekce se už nezaměřuje pouze na jedince uvnitř rodin, ale analyzuje zvířata napříč populací. Svou zásluhu na jejím rozvoji nese i pokrok v technologiích, kde se zvýšila přesnost a rychlost analýzy a zároveň se snížila její cena (Gassaway, 2011; Ježková, 2011).



Obrázek 4 - mapování při využití tradiční marker asistované selekce (MAS) – zaměřena jen na regiony s prokazatelným vlivem na požadované znaky; (Thallman, 2009)



Obrázek 5 - mapování při využití genomické selekce (WGS) – červeně vyznačeny regiony s méně jasným vlivem na požadované znaky; (Thallman, 2009)

K hlavním přínosům genomické selekce patří zpřesnění odhadu PH, zkrácení generačního intervalu, zkvalitnění souboru testantů a zvýšená kontrola nad

genetickými defekty (Marková, 2009; Gassaway, 2011). Díky hledání vynikajících zvířat v outcrossových liniích může pomoci i v boji s inbridíngem.

Jak už bylo výše zmíněno, genomická selekce spočívá ve vyhledávání polymorfismu DNA na úrovni SNP. V současnosti již existuje několik typů tzv. SNP čipů, které slouží k jejich detekci. Ukázky některých z nich uvádí obrázky 6, 7 a 8. Podstatu využívání SNP čipů lze shrnout v několika krocích (Marková, 2009):

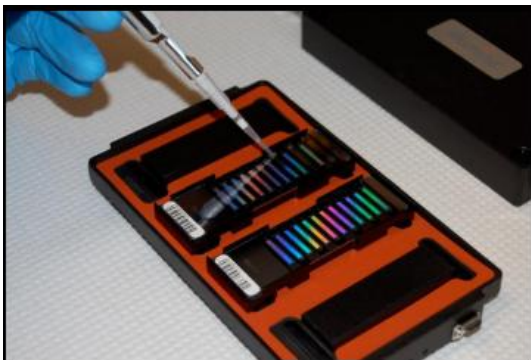
- v rámci populace se vyberou nejlepší a nejhorší průměrní jedinci
- stanoví se jejich SNP-DNA profily
- vytipují se žádoucí SNP statisticky významně korelované s užitkovostí
- syntetizují se oligonukleotidové čipy pro vybrané SNP
- specifickou vizualizací vazby SNP čipu se potvrdí přítomnost nebo absence požadovaného SNP v DNA konkrétního testovaného jedince
- přítomnost nebo absence požadovaného SNP a jejich haplotypů se použije jako kritérium pro odhad PH na základě genomové selekce.

K neznámějším vývojářům těchto silikonových čipů patří společnost Illumina. Nejprve byl vyvinut čip BovineSNP50 o kapacitě 50K, který dokáže přečíst 54 001 SNP markerů a vyhodnotit až 12 vzorků najednou. Dnes už existuje i jeho druhá verze, která čte až 24 vzorků. Byly vyvinuty i tzv. HD-high density čipy, které



mají velkou hustotu a využitelnou kapacitu až 600K. Ovšem v běžné praxi chovu skotu zatím nemají uplatnění. Novinkou roku 2011 se stal čip BovineSNP3K, který je jednodušší a cenově dostupnější. Přečte 2900 markerů a vyhodnotí až 32 vzorků najednou. Jeho budoucnost se vidí především v mapování samičí populace. Všechny typy čipů mohou mezi sebou komunikovat. Pro dekodování informací slouží specializovaný software, který umožní převedení dat na obrázkové soubory a ty pak na genotypy (Gassaway, 2011; Ježková, 2011).

Obrázek 6 - BovineHD BeadChip; (Gassaway, 2011)



Obrázek 7 - BovineSNP50; (Gassaway, 2011)



Obrázek 8 - čtečka využívající ultrafialového paprsku; (Gassaway, 2011)

Využití genomické selekce v praxi bylo už s úspěchem odstartováno u mléčného skotu. Pravděpodobně tomu napomohlo častější využívání umělé inseminace a také skutečnost, že se týká nižšího počtu plemen na rozdíl od masného skotu (Thallman, 2009).

3.6 VYBRANÉ KONGENITÁLNÍ PORUCHY SKOTU

Mezi kongenitální poruchy patří obrovské množství abnormalit, kterých dnes je v rámci skotu přibližně na 400. Jakýsi ucelený výpis lze najít na webových stránkách Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA) (http://omia.angis.org.au/results?search_type=advanced&gb_species_id=9913).

Jejich počet stále narůstá, což má souvislost i s pokročilými diagnostickými metodami zejména na molekulární úrovni. V této práci se budu blíže zabývat bovinní citrulinémií a deficiencí krevního koagulačního faktoru XI v populaci plemene česká červinka. Ani jedna z těchto poruch nebyla doposud u tohoto původního středoevropského plemene studována.

3.6.1 BOVINNÍ CITRULINÉMIE (BC)

Citrulinémie je vrozená, autozomálně recesivní porucha metabolismu moči zapříčiněná nedostatečnou aktivitou enzymu močovinnového cyklu, tzv. argininosukcinátsyntézy (ASS) (Dennis *et al.*, 1989; Padeeri *et al.*, 1999). Tento enzym se nachází v játrech a způsobuje přeměnu citrulinu, aspartátu a ATP k získání

argininosukcinátu, který je prekurzorem argininu (Husson *et al.*, 2003; Ilie *et al.*, 2011).

Citrulinémií zapříčiňuje bodová mutace v genu kódujícím ASS na chromozomu *BTA11* (Grupe *et al.*, 1996). Záměna cytosinu thyminem v exonu 5 způsobí, že arginin-86 (CGA) se změní na nesmyslný kodón (TGA), čímž dojde k ukončení translace. Výsledkem je zkrácený bílkovinový produkt, který má místo 412 aminokyselin pouhých 85 aminokyselin (Dennis *et al.*, 1989; Li *et al.*, 2011; Ilie *et al.*, 2011). Takto zkrácený produkt vede ke ztrátě funkce enzymu ASS. Bodovou mutaci lze diagnostikovat pomocí metody PCR/RFLP (Grupe *et al.*, 1996).

Porucha močovinového cyklu je charakteristická vysokou úrovní citrulinu a amoniaku v krvi, plazmě a tkáních postižených zvířat (Dennis *et al.*, 1989; Padeeri *et al.*, 1999). Po prvním nakrmení se u jedinců začnou projevovat neurologické symptomy (nejistá chůze, slepota, křeče aj.), které se časem zhoršují. K úhynu obvykle dochází do jednoho týdne po porodu (Dennis *et al.*, 1989; Harper *et al.*, 1989; Grupe *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2001). Na rozdíl od normálních zdravých zvířat je průměrná aktivita enzymu ASS u heterozygotních jedinců nižší (Dennis *et al.*, 1989; Healy, 1996). Pokles však není tak kritický, aby vedl k úhynu jako u homozygotně recesivních telat.

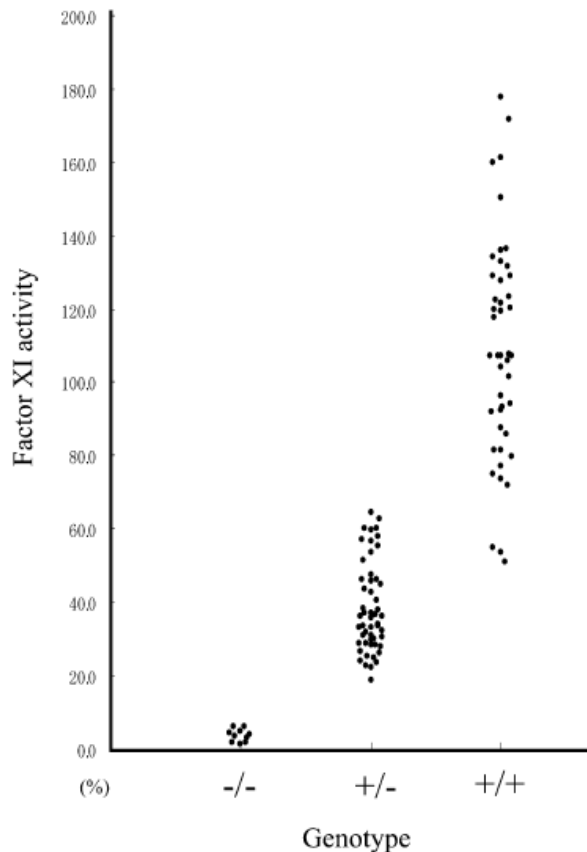
Nejprve byla porucha identifikována u člověka a psů. Následně se odhalila i u holštýnsko-fríských telat (Harper *et al.*, 1986; Uffo & Acosta, 2009). Citrulinémie se vyskytuje především u holštýnského plemene (Li *et al.*, 2011). Svou zásluhu na tom měl americký holštýnský býk – Linmack Kriss King, později identifikovaný jako heterozygotní přenašeč této poruchy. Patřil k nejvyužívanějším plemeníkům ve šlechtitelském programu holštýnského skotu (Healy, 1996; Healy *et al.*, 1991; Uffo & Acosta, 2009; Ilie *et al.*, 2011). Třináct procent z plemeníků v jedné inseminační stanici (AI) v Austrálii bylo identifikováno jako heterozygoti pro tuto poruchu. Od roku 1990 došlo na australských AI k zahájení screeningu potomstva po Linmack Kriss King, což napomohlo vyloučit heterozygotní přenašeče a eliminovat další šíření citrulinémie (Healy, 1996). V roce 1994 Schwerin *et al.*, uveřejnil výsledky své studie zaměřené na detekci výskytu mutace u plemene Schwarzbuntes Milchrind (SMR) v Německu. Zjistil přítomnost poruchy u 17 % testovaných embryí, určených jako heterozygotní přenašeči. O dva roky později Grupe *et al.* (1996) již nepotvrdil výskyt mutace na území Německa. Frekvence mutované alely byla v USA

zaznamenána na velmi nízké úrovni (Robinson *et al.*, 1993). V dalších zemích, například Turecko, Indie a Irán, není vůbec popsána (Patel *et al.*, 2006; Meydan *et al.*, 2010; Oner *et al.*, 2010; Nassiry *et al.*, 2005 a Eydivandi *et al.*, 2012). V Číně došlo k potvrzení přítomnosti mutace jen u jednoho zvířete, což z testované populace 615 ks zvířat holštýnského plemene činí pouhých 0,16 %. Lze konstatovat, že frekvence výskytu citrulinémie je všeobecně na velmi nízké úrovni (Li *et al.*, 2011).

3.6.2 DEFICIENCE KREVNÍHO KOAGULAČNÍHO FAKTORU XI (*F11*)

Deficience faktoru XI je dědičná porucha způsobená nežádoucí mutací v genu *F11* kódujícím krevní koagulační faktor XI. Tento faktor patří do skupiny více jak deseti proteinů, které se podílí na srážlivosti krve (Gentry *et al.*, 1998). V počáteční fázi tvorby krevní sraženiny je faktor XI převeden z neaktivní formy na aktivní, tzv. proteolytický enzym, faktor XIa. Takto modifikovaný aktivovaný protein zahajuje další kroky v procesu srážlivosti vedoucí ke tvorbě fibrinu (Brush *et al.*, 1987).

Deficience faktoru XI má autozomálně recesivní dědičnost. Heterozygotní jedinci přenášející defektní gen vypadají navenek zcela normálně, zatímco u homozygotů se projevuje mírná hemofilie. Postižená zvířata mají méně než 10 % z normální biologické aktivity FXI v plazmě, přičemž většina má méně než 1 %. Přenašeči mají od 20 - 60 % normální úrovně aktivity (Gentry *et al.*, 1998; Ghanem *et al.*, 2005; Kunieda *et al.*, 2005). Na grafu 2 je názorně vystižen rozdíl v distribuci aktivity FXI u jednotlivých genotypů. Označení *-/-* náleží recesivnímu homozygotovi, *+/-* patří heterozygotovi, *+/+* zobrazuje dominantního homozygota.



Graf 2 - distribuce aktivity faktoru XI u různých genotypů; (Kunieda *et al.*, 2005)

Postižení jedinci mohou přežít i několik let bez zjevných klinických projevů, může se jen projevit vyšší mortalita a morbidita ve stádě. Z patrných projevů lze zmínit například nadměrné krvácení z pupeční šňůry, dlouhodobé krvácení po odrohování a kastraci, snížení reprodukční schopnosti, zvýšení výskytu zápalu plic a mastitid. Postižené krávy mají často růžově zbarvené kolostrum (Liptrap *et al.*, 1995; Gentry *et al.*, 1998; Ghanem *et al.*, 2005; Kunieda *et al.*, 2005).

Genotypizace jedinců nám pomáhá odlišit zdravá zvířata od postižených zvířat. Detekce deficiencie faktoru se zpočátku prováděla na základě analýzy srážlivosti FXI v krevním vzorku. Metoda byla však lehce ovlivnitelná například nekvalitním odběrem krve (Gentry *et al.*, 1998). Navíc při stanovení genotypů bylo obtížné odlišit přenašeče (heterozygoty) od zdravých jedinců, neboť dochází k překryvu rozpětí aktivity faktoru XI, patrné i z grafu 2 (Kunieda *et al.*, 2005). Poskytované výsledky měly proto nízkou spolehlivost a navíc byly časově náročné. Dnes mají využití především DNA testy, které přináší přesnější a spolehlivější informace (Gentry *et al.*, 1998; Kunieda *et al.*, 2005).

Bovinní *F11* gen je zmapován na chromozomu 27. V současnosti známe dvě varianty deficiencie FXI. U holštýnského plemene jde o inzerci 76 bp segmentu *[AT(A)(28)TAAAG(A)(26)GGAAATAATAATTCA]* v exonu 12. To vede ke vzniku stop kodonu. Následkem této mutace schází FXI proteinu funkční proteázy kódované exony 13, 14 a 15 (Marron *et al.*, 2004). Druhou variantou je inzerce 15 bp v exonu 9 stejného genu objevená u japonského černého skotu. V jejím důsledku pak dochází k náhradě fenylalaninu (*Phe*) v kodonu 290 za šest jiných aminokyselin, kterými jsou *Leu, Tyr, Val, Gln, Asn, Ile*. V místě inzerce 15 bp dochází navíc k jednonukleotidové substituci C → A. Obě varianty mutací mohou mít odlišný dopad na funkci faktoru XI. Další srovnání fenotypů těchto deficiencí faktoru XI poskytne užitečné informace, týkající se vztahu mezi genotypem a fenotypy na genu *F11* (Kunieda *et al.*, 2005).

Záznamy o výskytu této poruchy jsou popsány nejen u skotu, ale i psa (Dodds & Kull, 1971) a člověka (Rosenthal *et al.*, 1953). K odhalení bovinní formy došlo v roce 1969 v Ohiu u holštýnského plemene (Kociba *et al.*, 1969). Další výskyt následoval u holštýnsko-fríského skotu v Kanadě, Austrálii, Anglii (Gentry *et al.*, 1998) a u japonského černého skotu (Kunieda *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2006; Ohba *et al.*, 2008). Přítomnost nežádoucí alely zaznamenali Číteck *et al.* (2008) a Gurgul *et al.* (2009) i v oblasti střední Evropy. V posledních třech letech probíhá rozsáhlý screening holštýnské populace na území Turecka (Meydan *et al.*, 2009; Meydan *et al.*, 2010; Oner *et al.*, 2010). Nejnovější výsledky z tohoto regionu přináší Karsli *et al.* (2011), který detekoval 2 heterozygotní krávy, tomu odpovídá hodnota prevalence přenašečů 0,4 %. Frekvence výskytu mutované alely u amerických holštýnských býků je 1,2 % (Marron *et al.*, 2004) a u indických Holštýnů odpovídá 0,6 % (Patel *et al.*, 2007). Na základě těchto studií můžeme říci, že přítomnost deficiencie krevního koagulačního faktoru XI je relativně na nízké úrovni.

3.7 ČESKÁ ČERVINKA

Česká červinka je původním krajovým plemenem v českých zemích. Patří do skupiny červeného skotu střeoevropského. Fylogeneticky pochází z tura krátkorohého evropského (*Bos taurus brachyceros europaeus*) (www.cestr.cz/cc). Podle oblastí jejich chovů vznikly určité rázy tohoto plemene jako například české, slezské, chebské, líšňanské červinky apod. Lišily se zbarvením a doživostí (www.genetickezdroje.cz).



Obrázek 9 - jalovičky plemene česká červinka; (www.genetickezdroje.cz)

Historie chovu českých červinek na našem území sahá hluboko do minulosti. Dříve velmi rozšířené plemeno začalo upadat v důsledku dovozu plemen s vyšší užitkovostí, především z oblasti Alp, Holandska, Bavorska, Švýcarska aj. Do poloviny 19. století probíhal chov převážně v čistokrevné míře, postupně však došlo k překřížení původního plemene s výkonnějšími plemeny. Do popředí zájmu se dostal holštýnský skot a český strakatý skot. Česká červinka se ocitla na pokraji vyhynutí (Hanusová, 2012, *in verb*).

První snahy o záchranu tohoto plemene sahají do doby již před 1. světovou válkou, kdy došlo k umístění několika zvířat na školní statek v Uhříněvsi. Po 2. světové válce se podobné snahy setkaly s nepochopením. V 70. letech existovala již pouze tři stáda s počtem cca 350 krav (St. statek Hajnice, Benešov a Netvořice). Po roce 1987 se ujala regenerace červinky Vysoká škola zemědělská v Praze a později i Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. V roce 1992 byla česká červinka zařazena mezi genové rezervy. K rozšíření početního stavu

napomohli býci příbuzných červených plemen evropského horského typu (Polsko, SRN). Populaci však negativně ovlivnila situace s výskytem IBR a v důsledku ozdravovacího programu došlo znovu k poklesu stavů (www.genetickezdroje.cz).

V roce 2007 byl ve VÚŽV Uhřetěves zahájen projekt regenerace s využitím embryí uchovávaných od roku 1997. Z narozených telat se odchovali plemenní býci, kteří se umístili do chovů účastníků Národního programu. Došlo k zavedení samostatné plemenné knihy a v programu kryokonzervace se opět daří naplňovat zásoby inseminačních dávek od nových býků i embryí. V současnosti (leden 2012) čítá živá populace okolo 230 kusů ve dvaceti chovech. Projekt ochrany české červinky v rámci Národního programu zajišťuje Česká zemědělská univerzita v Praze a Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta (www.genetickezdroje.cz).

kategorie	Rok							
	1999	2001	2003	2006	2008	2009	2010	2011
Plemenní býci	2	3	2	3	2	14	9	9
Krávy	62	54	70	63	80	78	89	85
Jalovice (nad 6 měs.)	12	39	34	40	51	51	70	56
Jalovice (do 6més.)	15	20	11	10	24	20	21	22
celkem	91	116	117	113	157	163	189	172

Tabulka 1 - struktura populace; (www.genetickezdroje.cz)

Podrobný výpis struktury populace v letech 1999 – 2011 zobrazuje tabulka 1. Nejedná se ovšem o totální počty všech zvířat, ale jen těch, dále zařazených do plemenitby. Po roce 2008 je zřejmý skokový nárůst plemeníků, kteří pochází z výše zmíněné regenerace s využitím embryí.

3.7.1 PLEMENNÉ ZNAKY A CHOVNÝ CÍL

Červinka patří mezi pozdní plemena. Jde o plemeno kombinovaného mléčno-masného užitkového typu. Vyznačuje se středním tělesným rámcem, plášt'ovým žlutočerveným zbarvením, kde i končetiny včetně paznehtů a mulce jsou zbarveny, jemnou kostrou, klínovitou hlavou, kratšími světlými rohy s tmavým zakončením

špiček. Výška v kohoutku dosahuje u býků maximálně 142 cm a u krav až 135 cm. Hmotnost se pohybuje v rozmezí 700 - 850 kg u býků a 470 - 530 kg u krav. Charakteristické je svou konstituční pevností, dlouhověkostí, živým temperamentem (Suchánek, 2006) a barvou mléka, která by měla být nažloutlá (www.genetickezdroje.cz). Typické představitele tohoto plemene zachycují obrázky 9 a 10.

Chovný cíl se zaměřuje na zachování a regeneraci české červinky s jejími specifickými vlastnostmi a to především dlouhověkostí, plodností, snadnými porody a pastevní schopností (www.cestr.cz/slprogram/cc). Základní parametry chovného cíle pro mléčnou a masnou užitkovost, věk a tělesné rozměry popisuje tabulka 2.

Mléčná užitkovost	krávy na I. laktaci	3500 kg
	krávy na II. a další laktaci	3500 – 4500 kg
	obsah bílkovin	3,4 %
	obsah tuku	4,0 %
	produkční využití krávy	6 a více laktací
Masná užitkovost	denní přírůstek	800 – 1000 g
	jatečná výtěžnost	56 % a více
Věk při prvním zapuštění	18 – 20 měsíců	
Věk při prvním otelení	27 – 32 měsíců	
Tělesné rozměry	hmotnost jalovic ve věku 12 měsíců	260 – 310 kg
	hmotnost jalovic při 1. zapouštění	380 – 400kg
	hmotnost krav v dospělosti	500 – 550 kg
	hmotnost býků v dospělosti	800 - 1000 kg
	výška v kříži dospělých krav	130 – 135 cm
	výška v kříži dospělých býků	140 – 150 cm

Tabulka 2 - základní parametry chovného cíle; (www.cestr.cz/slprogram/cc)

Z tabulky 2 lze vyčíst, že nejen mléčná ale i masná užitkovost je na relativně nízké úrovni. Mléčná užitkovost v extenzivním pastevním chovu dosahuje 1835 kg (2004), v intenzivním stájovém chovu 3000 kg, při vyšší tučnosti až 4,6 % (www.genetickezdroje.cz). Nevýhodou plemene je i pozdní dospívání. Už z těchto důvodů nelze očekávat, že by někdy v budoucnu mohlo dojít k jeho opětovnému masivnímu rozšíření jako před 200 lety. V dnešní době jde především o snahu uchovat červinky jako kulturně historickou památku a genetický zdroj.

3.7.2 DEFINICE PLEMENE A KÓDOVÉ OZNAČENÍ

Za jedince plemene česká červinka se považují zvířata původního červeného skotu a jeho kříženci s fylogeneticky příbuznými plemeny červeného skotu nebo skotu českého strakatého. Pro účely zápisu býků a krav do PK, popřípadě registrace v plemenném registru, se zvířata začleňují do kategorií označovaných podle genetického podílu plemene česká červinka, kódem:

- L 1 - podíl 75 % a více krve české červinky
- L 2 - podíl 51-74 % krve české červinky
- L 3 - podíl 37 - 50 % krve české červinky

(www.cestr.cz/rpk/cc).



Obrázek 10 - plemenný býk; (www.cestr.cz/clanky-byk-ceske-cervinky)

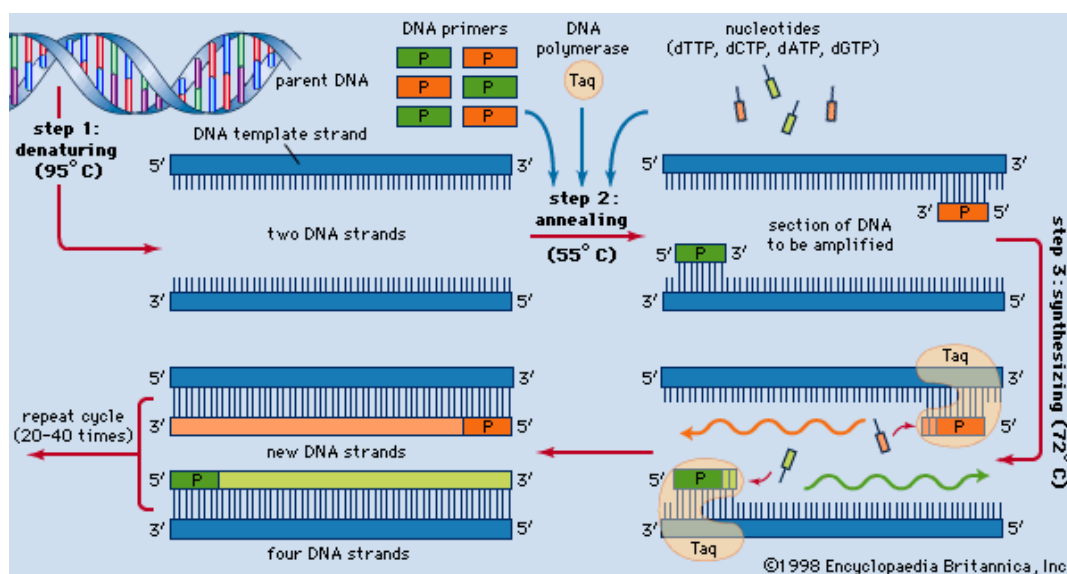
3.8 ZÁKLADNÍ METODY MOLEKULÁRNÍ GENETIKY VYUŽÍVANÉ K DETEKOVÁNÍ KONGENITÁLNÍCH PORUCH

3.8.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je relativně jednoduchá metoda amplifikace (zmnožení) určité části DNA *in vitro* bez použití živých organismů. PCR vyvinul Kary Mullisem v roce 1983 a v roce 1993 za tento objev obdržel Nobelovu cenu za chemii (<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>; Knoll, 2009).

V praxi je PCR používána na amplifikaci specifické oblasti DNA, např. jednotlivých genů nebo jejich částí či nekódujících oblastí. Délka amplifikovaných fragmentů obvykle nepřesahuje 10 kb (Vlášková & Trešlová, 2008a).

Metoda PCR je založena na cyklickém střídání teplot reakční směsi v přístroji zvaném termocykler. Průběh reakce dělíme do tří kroků (<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>; Knoll, 2009). Celý princip PCR schématicky znázorňuje obrázek 11.



Obrázek 11 - schéma průběhu PCR; (Anderson, 2010)

Prvním krokem reakce je **denaturace** dvouvláknové DNA, kdy dojde k rozpletení šroubovice DNA, zahřátím na 92 - 95°C po dobu cca 30 sekund.

Následující krok představuje tzv. **annealing**, při němž dojde k nasednutí primerů na komplementární oblasti templátové DNA. Annealing probíhá za teploty cca 50 – 60 °C po dobu asi 30 sekund. Optimální teplota této fáze závisí na délce a složení bází primerů. Zpravidla by měla být o 5 °C nižší než teplota tání

(denaturace), tzv. melting temperature (T_m) primerů. Pro primery do 25 bp se T_m vypočítá podle rovnice: $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$. T_m by měla být pro oba primery přibližně stejná.

Třetím krokem je tzv. **elongace** (syntéza DNA), která probíhá většinou při teplotě 70 – 72 °C po dobu cca 1,5 minuty. K vytvoření 1000 bází je potřeba přibližně 1 minuta. Syntéza nových vláken DNA probíhá za pomoci DNA-polymerázy od 5' konce ke 3' konci.

V následujícím cyklu se produkty z prvního cyklu denaturují a za pomoci DNA-polymerázy replikují. Počet cyklů se pohybuje od 25 do 40 opakování. Na tomto principu dojde k exponenciálnímu pomnožení požadovaného úseku DNA. Finálním krokem je zchlazení PCR reakce na teplotu 4 – 15 °C pro uchování amplikonu.

Reakční směs PCR obsahuje několik složek, jejichž poměr a množství se různě liší podle metodiky.

Základní PCR mix obsahuje:

- **templátovou DNA** – studovaná část DNA, kterou chceme amplifikovat,
- **DNA polymerázu** – enzym, který replikuje nový řetězec DNA podle vzoru templátu; nejvyužívanější je *Taq*-polymeráza,
- **PCR pufr** – udržuje stabilní pH a obsahuje chemikálie pro optimální aktivitu a stabilitu DNA polymerázy,
- **MgCl₂** – Mg²⁺ ionty slouží jako kofaktor DNA polymerázy,
- **nukleotidy (dNTP)** – směs deoxynukleosidtrifosfátů (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), základních stavebních jednotek DNA,
- **primery** – oligonukleotidy (krátké úseky jednořetězcové DNA), zpravidla o délce 10 – 25 bází, které se párují se začáteční a koncovou komplementární oblastí amplifikovaného úseku v templátové DNA. Mají funkci počátečního místa replikace DNA, bez kterého by DNA polymeráza nemohla začít syntézu nového řetězce. Primery by neměly být příliš krátké a neměly by obsahovat sekvenci, která se často vyskytuje v templátové DNA. Při jejich navrhování je žádoucí se vyvarovat sekvencí, které tvoří smyčky nebo jsou navzájem komplementární. Zastoupení GC bází v sekvenci, by mělo být 40 - 60 %.

- **demineralizovanou nebo deionizovanou vodu**

(<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>; Vlášková & Trešlová, 2008a)

V rámci optimalizace PCR reakce lze do PCR mixu přidat **aditiva** (DMSO, formamid, betaine, glycerol, BSA, (NH₄)₂SO₄), které napomáhají zvyšovat stabilitu polymerázy a specifčnost vazby primerů. Dalšími nejčastěji využívanými možnostmi k optimalizaci průběhu PCR reakce je úprava teploty annealingu, změna koncentrace DNA a MgCl₂ nebo modifikace cyklu (prodloužení či zkrácení doby elongace, zvýšení počtu cyklů, apod.) (<http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>).

Předností metody je její vysoká citlivost. Využití nalézá v lékařských a biologických oborech, zejména při diagnostice dědičných a infekčních onemocněních, určování otcovství, klonování genů, indentifikaci osob v kriminalistice aj. Určitá nevýhoda PCR metody spočívá ve využívání *Taq*-polymerázy. Ta totiž nemá korektorskou aktivitu ve směru 3' → 5'. Během syntézy nového vlákna dochází k chybám, které se pak řetězově hromadí. Dále neumí efektivně syntetizovat fragmenty delší než cca 3 - 15 tisíc bp. Její nevýhody lze odstranit použitím termostabilních polymeráz s korektorskou aktivitou. Ty jsou ovšem méně výkonné, proto se využívají směsi *Taq*-polymerázy a termostabilní polymerázy s korektorskou aktivitou, které se vzájemně doplňují (Vlášková & Trešlová, 2008a). Výpis některých DNA polymeráz uvádí tabulka 3.

DNA polymeráza	5' → 3' exonukleasa	3' → 5' exonukleasa
<i>Taq</i> (<i>Thermus aquaticus</i>)	ano	ne
<i>Tfl</i> (<i>Thermus flavus</i>)	ano	ne
<i>Tbr</i> (<i>Thermus brockianus</i>)	ano	ne
<i>Tth</i> (<i>Thermus thermophilus</i>)	ano	ne
<i>Tli</i> (<i>Thermococcus litoralis</i>)	ne	ano
<i>Pfu</i> (<i>Pyrococcus furiosus</i>)	ne	ano
<i>Pwo</i> (<i>Pyrococcus woesei</i>)	ne	ano

Tabulka 3 - přehled významných termostabilních DNA polymeráz; (Průša et al., 1998)

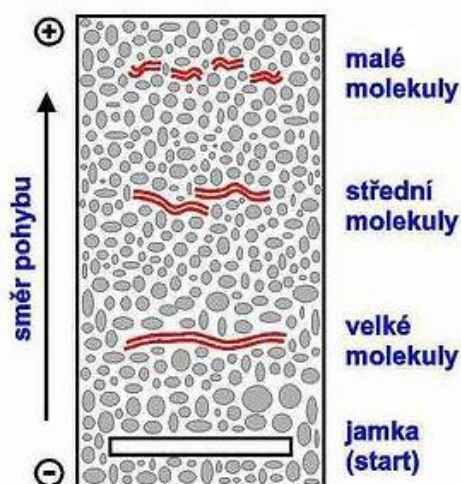
Výsledek PCR lze detekovat na gelu pomocí elektroforézy. Pokud se na gelu zobrazuje jeden pruh, proběhla PCR úspěšně. Je-li výsledkem více pruhů, tak došlo k nasednutí primerů na více místech se shodným protisměrným orientováním, což vede k namnožení více produktů o různé délce. Nutností je pak optimalizovat podmínky reakce. Není-li zobrazen žádný pruh, PCR neproběhla (Vlášková & Trešlová, 2008a).

3.8.2 RFLP – DÉLKOVÝ POLYMORFISMUS RESTRIKČNÍCH FRAGMENTŮ

Metoda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, polymorfismus délky restričních fragmentů) je založená na enzymatickém štěpení molekul DNA ve specifickém restričním místě pomocí tzv. restričních endonukleáz (RE) (Bártová, 2011a). V současnosti známe asi 1500 restričních endonukleáz (RE) (Průša, 1997). RE produkují různé druhy bakterií. Slouží jako ochrana proti cizorodé DNA (Šmarda *et al.*, 2005). Každý typ restriční endonukleázy rozpoznává různé krátké sekvence nukleotidů – 4,6,8 a štěpí cílovou DNA v různých místech, v závislosti na sekvenci DNA. Obecně ty, které rozpoznávají kratší sekvenci, štěpí DNA častěji na menší úseky a ty, které rozpoznávají delší sekvenci, štěpí méně často a vznikají delší fragmenty. Délka fragmentů i jejich počet je pro daného jedince specifická (Průša, 1997). Inkubace reakční směsi obvykle probíhá při 37 °C po dobu 1 hodiny. Separované fragmenty pomocí gelové elektroforézy srovnáváme na základě jejich velikosti a počtu. Ze získaných údajů následně stanovíme tzv. polymorfismy. Polymorfismy délky restričních fragmentů zapříčiňují přestavby, například delece, inserce a substituce bází. Změny v pořadí bází nukleotidů pak vedou ke změně počtu restričních míst (Bártová, 2011a).

3.8.3 GELOVÁ ELEKTROFORÉZA

Gelová elektroforéza patří k nepoužívanějším separačním technikám využívaným k analýze nukleových kyselin a bílkovin. Princip metody spočívá v pohybu záporně nabitých molekul v elektrickém poli směrem k anodě (viz. obrázek 12). Hlavním nositelem náboje jsou záporně nabitě fosfátové skupiny.



Separace molekul probíhá na základě jejich rozdílných rychlostí pohybu v gelu. Rychlost pohybu je nepřímo úměrná velikosti molekul (Bártová, 2011b).

Obrázek 12 - separace molekul nukleových kyselin v gelu; (Raclavský, 2003)

Rozlišujeme dva typy elektroforézy:

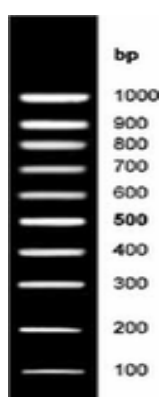
- Horizontální (nosné médium je agarózový gel, nebo dříve škrob)
- Vertikální (nosné médium je polyakrylamidový gel, tzv. PAGE)

Agarózová elektroforéza je používána k detekování produktů po PCR nebo PCR/RFLP a jejich případnou preparaci pro následné analýzy, například sekvenování. Produkty se dělí podle své relativní molekulové hmotnosti a velikosti náboje. V agarózovém gelu lze separovat fragmenty o velikostech 50 bp – 20 000 bp. Menší fragmenty se třídí v polyakrylamidovém gelu. Koncentrace agarózy se volí podle velikosti separovaných fragmentů (viz. tabulka 4) (Vlášková & Trešlová, 2008b).

Velikost fragmentů	Hustota agarózového gelu
1 - 20 kbp	0,4 - 0,8%
500 - 1000 bp	2%
100 - 500 bp	3%
50 - 100 bp	5%

Tabulka 4 - hustota agarózového gelu v závislosti na velikosti separovaných fragmentech; (Vlášková & Trešlová, 2008b)

Pro přípravu gelu a jako elektrolyt v elektroforetické vaně používáme pufrý (například TBE, TAE, SB), které zabezpečí stálé pH. Jejich funkcí je neutralizace iontů H^+ a OH^- vznikající hydrolyzou vody na elektrodách (Vlášková & Trešlová, 2008b).



Obrázek 13 - velikostní marker; (Bártová, 2011b)

Před nanášením vzorků na gel se smísí jednotlivé vzorky nukleových kyselin s tzv. nanášecím puffrem (např. bromfenolová modř, xylencyanol) (Vlášková & Trešlová, 2008b), který má tmavé zbarvení a působí jako zatížení, aby nedošlo k difúzi vzorku do elektrolytu. Díky zbarvení zároveň umožňuje kontrolu při nanášení vzorků a jeho migraci v gelu. Pro odhad velikosti pozorovaných fragmentů se do jedné jamky gelu nanáší tzv. velikostní marker (hmotnostní standard, DNA ladder = žebřík) o definované velikosti

jednotlivých fragmentů (Bártová, 2011b). Příklad velikostního markeru lze spatřit na obrázku 13.

Po proběhnutí elektroforézy následuje vizualizace separovaných fragmentů pomocí UV záření v přístroji zvaném UV transluminátor. Fragmenty po osvětlení UV vyzařují jako proužky. Jako značící barvivo slouží nejčastěji ethidium bromid nebo SYBR Green. K detekci fragmentů lze využít i radioaktivního značení, nebo hybridizaci se značenou sondou (krátkým oligonukleotidem, který se komplementárně váže k hledané sekvenci) (Bártová, 2011b).

Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) je jednou z metod pro separaci a charakterizaci zejména proteinu, ale i DNA. Polyakrylamidový gel vzniká polymerací směsi akrylamidu a bisakrylamidu za pokojové teploty v pufru TAE. Zdroj volných radikálů obvykle poskytuje peroxosíran amonný (APS) způsobující homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení reakce se používá volná zásada tetrametylendiamin (TEMED), která katalyzuje tvorbu volných radikálů APS. Další využívaným iniciátorem polymerace je riboflavin mající účinnost i při velmi nízkých koncentracích 5 - 10 ng/l. Nízké pH a možnost přístupu O₂ vede k inhibici polymerace. Koncentrace TEMED a APS v polymerizačním roztoku by měly být 0,05 %. Koncentrace akrylamidu se mění podle velikosti separovaných fragmentů DNA. Gely s koncentrací akrylamidu od 3,5 % vyhovují pro fragmenty 1 - 2 kbp a 20% gely pro malé fragmenty 10 - 100 bp (Průša, 1997; Trešlová & Vyleťal, 2008).

PAGE může probíhat jako denaturační nebo nativní. Při denaturační PAGE je obvykle využíváno přítomnosti močoviny či detergentu dodecylsíranu sodného (SDS) a separace molekul probíhá pouze na jejich molekulové hmotnosti. Při nativní PAGE probíhá separace molekul podle jejich tvaru, nadmolekulární struktury (proteiny), molekulové hmotnosti a náboje (Průša, 1997; Trešlová & Vyleťal, 2008).

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1 MATERIÁL

Testovaný panel zvířat zahrnoval 46 jedinců plemene česká červinka pocházejících ze Školního zemědělského podniku JU v ČB včetně telat, dále nezařazených do chovu. Analyzovány byly vzorky krve těchto jedinců odebrané v průběhu let 2008 – 2010. Odběry krve proběhly do roztoku EDTA (pH = 8) a před izolací DNA byly uskladněny v -20°C.

4.2 METODIKA

4.2.1 IZOLACE DNA

Genomová DNA byla izolována z krve metodou s využitím lyzátů. V tomto případě lze použít pouze krev neodebranou do heparinu.

Vlastní proces izolace DNA probíhal následovně:

- K 50 µl krve rozpuštěné v roztoku EDTA se přidá 500 µl Tris-EDTA pufu.
- Směs pečlivě promícháme a odstředíme na centrifuze při 14 000 rpm po dobu 3 minut.
- Supernatant odstraníme a proces opakujeme 2-3 krát, dokud není peleta leukocytů čistá.
- V eppendorfci o objemu 1,5 ml převrstvíme peletu leukocytů 100 µl lyzačního pufu (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,3, 2,5 mM MgCl₂, 0,5% Tween 20) s proteinázou K (20 mg·l⁻¹).
- Vzorky inkubujeme při 54 °C po dobu 12 hodin.
- Zkontrolujeme provedení izolace pomocí elektroforézy na 1% agarózovém gelu.

V průběhu studie byla genomová DNA uskladněna při 4 °C.

4.2.2 GENOTYPIZACE PRO LOKUS BOVINNÍ CITRULINÉMIE

Analýza vzorků pro lokus bovinní citrulinémie proběhla pomocí metody PCR/RFLP. Genotypizace byla provedena metodou dle Grupe *et al.* (1996), s mírnými úpravami pro laboratorní podmínky daného pracoviště. Sekvence primerů byla následující:

Primer Citr F 5'...GGCCAGGGACCGTGTTTCATTGAGGACATC...3'

Primer Citr R 5'...TTCCTGGGACCCCGTGAGACACATACTG...3'

4.2.2.1 PCR PRO LOKUS BOVINNÍ CITRULINÉMIE

Pomocí PCR proběhlo namnožení požadovaného úseku DNA *in vitro*. Prvním krokem byla příprava reakční směsi, jejíž složení je uvedeno v tabulce 5.

Reakční směs	1 vzorek (μl)
pufr	2
MgCl₂	1,2
dNTP's	2
Primer Citr F	1
Primer Citr R	1
DNA	1,3
Taq-polymeráza*	2
H₂O	9,5
Σ	20

Tabulka 5 - složení reakční směsi pro PCR lokusu bovinní citrulinémie

*Taq-polymeráza byla ředěna na hodnotu 1 U/ μl

Nejprve jsme si připravili mastermix smíchaný v pořadí H₂O, pufr, MgCl₂, dNTP's, primery. V dalším kroku došlo k jeho rozpipetování do nachystaných a popsaných eppendorfek a k následnému přidání příslušné DNA daného vzorku. Poté byly vzorky vloženy do termocykleru a spuštěn program. Po přibližně dvou minutách trvající denaturaci při 95 °C se přidala naředěná Taq-polymeráza a pokračovalo se v programu. Taq-polymeráza není přidávána do vzorku ihned z důvodu dosud aktivní proteinázy K, kterou je potřeba zahřátím inaktivovat. Celý program trval přibližně 2,5 hodiny.

Amplifikace byla zahájena počáteční denaturace při 95 °C po dobu 5 minut. Poté navazovalo 35 cyklů, kde se opakovaly kroky v pořadí:

- denaturace 95 °C /50 s,
- annealing 56 °C /50 s,
- extenze 72 °C /50 s.

Závěrečná extenze proběhla při 72 °C po dobu 5 min. Po doběhnutí amplifikace byl termocykler nastaven na 15 °C na dobu neurčitou. Pro PCR bylo využíváno přístroje T3 Thermocycler firmy Biometra®.

Po skončení PCR následovala kontrola výsledného produktu pomocí agarózové elektroforézy na 2,5% gelu barveném ethidium bromidem. Vzorky před nanesením na hřebínky byly obarveny bromfenolovou modří v množství 5 µl na 1 vzorek. Jako elektrolyt do elektroforetické vany posloužil u všech analýz 1x TBE pufr. Kontrola PCR produktu pro bovinní citrulinémii trvala po dobu 45 minut při 120 V. Při úspěšném provedení PCR byl při vizualizaci fragmentů patrný proužek o délce 199 bp.

4.2.2.2 RFLP PRO LOKUS BOVINNÍ CITRULINÉMIE

Po amplifikaci DNA navazovala metoda RFLP. Ke každému vzorku PCR produktu o množství 15 µl se přidalo 1,7 µl červeného pufru R a 1 µl restrikčního enzymu *Ava II* (*Eco 47I*). Po smíchání složek byly vzorky vloženy do termostatu a inkubovány při 37 °C přes noc.

Druhý den poté proběhla separace fragmentů pomocí horizontální elektroforézy. Vzorky se obarvily bromfenolovou modří a nanesly do hřebínků na 3,5% agarózový gel značený ethidium bromidem. Průběh elektroforézy byl nastaven na 100 V po dobu 60 minut. Vizualizace fragmentů v podobě proužků se provedla pomocí UV záření. Na základě výsledků vizualizace byla provedena genotypizace. Délky jednotlivých fragmentů, podle kterých se určí genotyp jedince, uvádím níže.

- 185 bp recesivní homozygot (*aa*)
- 103 bp, 82 bp dominantní homozygot (*AA*)
- 185 bp, 103 bp, 82 bp heterozygot (*Aa*)

4.2.3 GENOTYPIZACE PRO FXI V EXONU 9 A 12

Stanovení genotypů pro obě mutace bylo uskutečněno na základě rozdílné délky fragmentů pomocí PCR metody a agarózové horizontální elektroforézy. Genotypizace vzorků v exonu 9 byla provedena metodou dle Kunieda *et al.* (2005) a pro exon 12 se využilo metody dle Marron *et al.* (2004). U obou metodik došlo k mírným úpravám pro laboratorní podmínky daného pracoviště. Sekvence primerů byly následující:

Pro exon 9 - Primer FXI F 5'...TCACATCTCAATATGTGCTTCTGC...3'

Primer FXI R 5'...TCTACGATGTCGAGTTCTTCTCC...3'

Pro exon 12 - Primer FXI F 5'...CCCCTGGCTAGGAATCGTT...3'

Primer FXI R 5'...CAAGGCAATGTCATATCCAC...3'

4.2.3.1 PCR PRO FXI

Celý průběh metodiky genotypizace FXI se v podstatě shodoval pro oba exony 9 a 12, jediný rozdíl spočíval v přidání odlišných primerů. Složení reakční směsi PCR pro FXI popisuje tabulka 6.

Reakční směs	1 vzorek (μl)
pufr	2,5
MgCl₂	2,8
dNTP's	0,8
Primer FXI F	2
Primer FXI R	2
DNA	1
Taq-polymeráza*	3
H₂O	6,9
Σ	21

Tabulka 6 - složení reakční směsi PCR programu pro FXI

*Taq-polymeráza byla ředěna na hodnotu 1 U/ μl

PCR program probíhal přibližně 3 hodiny. Amplifikaci zahájila počáteční denaturace, která trvala 2 minuty při 94 °C. Po této době byla ke vzorkům přidána naředěná Taq-polymeráza. Následovalo 35 cyklů, kde se opakovaly tyto kroky:

- denaturace 94 °C /1 min.
- annealing 60 °C /1 min.
- extenze 72 °C /1,5 min.

Nakonec proběhla závěrečná extenze při 72 °C po dobu 4 minut. Po dokončení amplifikace byl termocykler nastaven na 15 °C na dobu neurčitou.

4.2.3.2 DETEKCE FRAGMENTŮ HORIZONTÁLNÍ ELEKTROFORÉZOU

Po amplifikaci požadovaného úseku DNA následovalo roztřídění fragmentů pomocí horizontální elektroforézy na 3,5% agarózovém gelu barveném ethidium bromidem. Nejprve se vzorky obarvily bromfenolovou modří v množství 5 μ l /1 vzorek, a poté se nanasly do hřebínků na gelu. Samozřejmě byl také nanesen jeden hřebínek s velikostním markerem. V naší studii se využívalo *pUC 19 DNA / MspI (Hpa II) Marker*. Elektroforéza se nastavila na 130 V po dobu 50 min. Výsledná genotypizace byla provedena na základě rozdílné délky fragmentů zviditelněných pomocí UV záření. Délky jednotlivých fragmentů pro obě mutace, podle kterých se určí genotyp jedince, uvádím níže.

Exon 9:

110 bp recesivní homozygot (*aa*)
 95 bp dominantní homozygot (*AA*)
 110 bp, 95 bp heterozygot (*Aa*)

Exon 12:

320 bp recesivní homozygot (*aa*)
 244 bp dominantní homozygot (*AA*)
 320 bp, 244 bp heterozygot (*Aa*)

4.3 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ

Na základě zjištěných výsledků genotypizace testovaného souboru se vypočetla frekvence výskytu mutované alely a heterozygotních přenašečů pro daný lokus. Nakonec byla pomocí χ^2 testu stanovena odchylka populace od rovnovážného stavu podle Hardy–Weinbergova zákona. K výpočtům bylo využito několik základních vztahů, které tvoří podstatu populační genetiky, viz. níže podle (Urban, 2008e).

Hardy-Weinbergův zákon vyjadřuje matematickým vztah mezi frekvencemi genů (alel) a frekvencemi genotypů.

$$AA \sim p^2$$

$$Aa \sim 2pq$$

$$Aa \sim q^2$$

p a q jsou frekvence alel A a a .

Platí vztah: $p + q = 1$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Uvažujeme-li jeden lokus se dvěma alelami, A a a , pak platí:

$$p = f(A)$$

$$q = f(a)$$

relativní zastoupení jednotlivých genotypů:

$$(d + h + r = 1)$$

relativní genové (alelové) frekvence:

$$p = d + \frac{1}{2} h$$

$$q = r + \frac{1}{2} h$$

Rovnovážený genetický stav v populaci nastává, pokud platí, že genovým frekvencím odpovídají příslušné genotypové frekvence. Tato definice vychází ze základní rovnice genetické rovnováhy:

$$p^2 q^2 = \left(\frac{2pq}{2}\right)^2 \approx dr = \left(\frac{h}{2}\right)^2$$

Populace se nachází v genetické rovnováze, pokud P jako frekvence genotypů pozorovaných (skutečných) se statisticky neliší od O jako frekvencí genotypů (očekávaných) za genetické rovnováhy. K vyhodnocení se využívá χ^2 test:

$$\chi_{n-p-1}^2 = \sum \frac{(P - O)^2}{O}$$

n (počet porovnávaných tříd dat)

p (počet odhadovaných parametrů).

Vypočítaná hodnota χ^2 testu se porovnává s tabulkovou hodnotou pro příslušnou hladinu významnosti a stupeň volnosti (df).

$$df = n - p - 1$$

Hladina významnosti	Stupně volnosti df				
	1	2	3	4	5
0,05	3,84	5,99	7,81	9,48	11,07
0,01	6,35	9,21	11,34	13,27	15,08

Tabulka 7 - tabulkové hodnoty χ^2 testu; (Urban, 2008e)

V případě lokusu se dvěma genotypy a třemi genotypy bude hodnota $df = 3 - 1 - 1 = 1$.

Populace je pro daný lokus v genetické rovnováze, pokud platí $\chi^2_{\text{tab.}} > \chi^2_{\text{vyp.}}$.

Zjistíme-li však průkazný rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi, $\chi^2_{\text{tab.}} < \chi^2_{\text{vyp.}}$, pak populace pro daný lokus není v genetické rovnováze.

5. VÝSLEDKY

5.1 IZOLACE DNA

U všech 46 testovaných vzorků nebyly zjištěny žádné výrazné problémy s izolací genomové DNA z krve od odebraných zvířat. To potvrdila i kontrola provedená elektroforetickou metodou na 1% agarózovém gelu. Po úspěšném ověření vyizolování DNA byly vzorky uskladněny do chladu při teplotě 4 °C.

5.2 DETEKCE VÝSKYTU MUTACÍ PRO BC A FXI

Monitoring výskytu bovinní citrulinémie a deficiencie krevního koagulačního faktoru v exonu 9 a 12 proběhl u plemene česká červinka poprvé. Jednalo se tedy o pilotní projekt, zacílený na prověření možnosti potenciální přítomnosti těchto nežádoucích alel. Výskyt mutací by mohl být teoreticky předpokládán nejen z pohledu, že se jedná o původní plemeno, ale v současnosti především i z důvodu hrozby inbrední deprese v souvislosti s nízkým stavem populace.

Mutace genu *ASS*, který se nachází na chromozomu 11, lokace *11q28*, má za následek poruchu označovanou bovinní citrulinémie (BC). Metodou PCR/RFLP proběhla analýza vzorků a došlo k určení genotypů a detekci mutované alely, viz. tabulka 8.

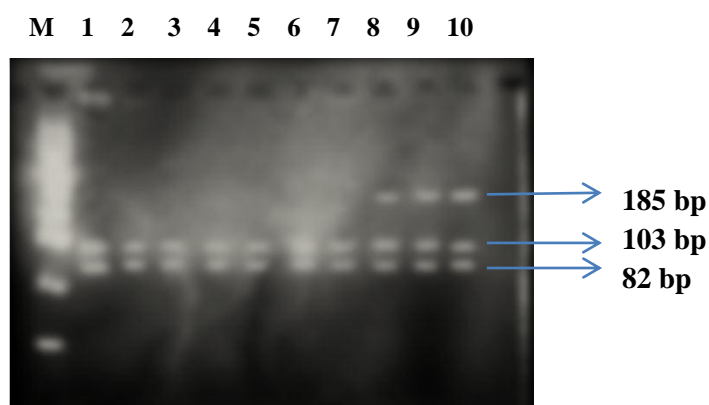
Mutace genu *F11*, který se nachází na chromozomu 27, lokace *27q14*, má za následek poruchu označovanou deficiencie krevního koagulačního faktoru XI. Doposud se povedlo identifikovat dvě příčinné mutace. První objevenou byla mutace v exonu 12, kde je spojitost vzniku vady s inzercí 76 bp (Marron *et al.*, 2004). Poté následovala mutace v exonu 9, která souvisí s inzercí 15 bp (Kunieda *et al.*, 2005). Jak už bylo výše zmíněno, genotypizace poruchy FXI proběhla na základě rozdílné délky fragmentů pomocí PCR metody a agarózové horizontální elektroforézy. Díky velkému rozsahu vložené sekvence bází lze jednoznačně identifikovat, je-li zvíře nositelem mutované nebo normální alely. K odhadu délky fragmentů posloužil velikostní marker tzv. DNA ladder *pUC 19 DNA / MspI (Hpa II) Marker*, nanášený do jamky v gelu stejně jako jednotlivé vzorky.

Náš testovaný soubor čítal 46 jedinců. U každého z nich byla provedena detekce výskytu mutace pro tři výše zmiňované lokusy. Výsledky analýzy znázorňuje tabulka 8.

Detekované lokusy	Počet analyzovaných jedinců	Počet nositelů mutované alely
Lokus pro BC	46	7
Lokus pro FXI v exonu 9	46	0
Lokus pro FXI v exonu 12	46	0

Tabulka 8 - detekované výsledky v testované populaci české červinky

Z tabulky 8 vyplývá, že v našem analyzovaném panelu zvířat byli všichni jedinci v exonech 9 i 12 pro lokus FXI nositeli normální alely, tudíž se jedná o zdravé dominantní homozygoty. Na gelu po vizualizaci fragmentů UV zářením byl u všech vzorků v exonu 9 patrný 1 proužek o délce 95 bp a v exonu 12 byl zaznamenán 1 proužek o délce 244 bp. Bohužel výsledky u BC nejsou tak příznivé poněvadž, analýza prokázala 7 heterozygotů čili přenašečů nežádoucí mutace, viz. obrázek 14. Ty se při vizualizaci fragmentů projeví třemi proužky o délce 185 bp, 103 bp a 82 bp. U zbylých 39 jedinců byl stanoven genotyp pro BC jako dominantní homozygot, neboť u nich se vyskytovaly 2 proužky o délce 103 bp a 82 bp.



Obrázek 14 – ukázka vizualizace genotypů bovinní citrulinémie (BC);

M – marker, 1 - 7 dominantní homozygoti, 8 - 10 heterozygoti

5.3 STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ

V testovaném souboru 46 jedinců plemene česká červinka byla zjištěna přítomnost mutované alely pro lokus BC u 7 heterozygotních přenašečů. Na základě těchto výsledků bylo stanoveno:

1) odhad frekvence heterozygotů h_i (tzv. odhad míry heterozygotnosti populace)

46 jedinců = n (celkový počet jedinců v populaci)

7 jedinců = n_{hi} (počet heterozygotů Aa)

$h_i = ?$

$$h_i = \frac{n_{hi}}{n}$$

$h_i = 7/46$

$h_i = 0,152173913 = 15,2 \%$

Počet přenašečů mutované alely v populaci je 15,2 %.

2) odhad frekvence mutované alely q

Vycházíme ze vztahu $q = r + \frac{1}{2} h$

r (relativní frekvence recesivních homozygotů v populaci)

h (relativní frekvence heterozygotů v populaci) = h_i

$q = 0 + \frac{1}{2} 0,152173913$

$q = 0,076086956 = 7,6 \%$

Frekvence mutované alely v populaci je 7,6 %.

3) testování odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy

K výpočtu využijeme χ^2 test:

$$\chi_{n-p-1}^2 = \sum \frac{(P - O)^2}{O}$$

$df = (n - p - 1) = 3 - 1 - 1$

$$df = 1$$

zvolená hladina významnosti $p < 0,01$



$$\chi^2_{\text{tab.}} = 6,35$$

Pozorované počty genotypů (P)

AA 39 jedinců

Aa 7 jedinců

aa 0 jedinců

Odhad frekvence alel

$$p + q = 1$$

$$q = 0,076086956$$

$$p = 1 - q$$

$$p = 1 - 0,076086956$$

$$p = 0,923913044$$

Odhad očekávaných počtů genotypů (O)

$$AA \quad n \cdot p^2 = 46 \cdot 0,923913044^2 = 39,26630439$$

$$Aa \quad n \cdot 2pq = 46 \cdot 2 \cdot 0,923913044 \cdot 0,076086956 = 6,467391264$$

$$aa \quad n \cdot q^2 = 46 \cdot 0,076086956^2 = 0,266304344$$

Po dosazení do vzorce:

$$\chi^2_{n-p-1} = \sum \frac{(P - O)^2}{O}$$

$$\chi^2_{3-1-1} = \frac{(39 - 39,26630439)^2}{39,26630439} + \frac{(7 - 6,467391264)^2}{6,467391264} + \frac{(0 - 0,266304344)^2}{0,266304344}$$

$$\chi^2 = 0,311972319$$

$$\chi^2_{\text{vyp.}} = 0,31$$

$$\chi^2_{\text{tab.}} \mathbf{6,35} > \chi^2_{\text{vyp.}} \mathbf{0,31}$$

Mezi pozorovanými a očekávanými frekvencemi genotypů při stupni volnosti 1 a hladině významnosti 0,01 je shoda, a tudíž testovaná populace české červinky se v daném lokusu nachází v Hardy-Weinbergově rovnováze.

6. DISKUZE

Ve světě probíhá screening BC i FXI převážně u jedinců holštýnského plemene a jeho kříženců, u kterých došlo i k jejich prvotnímu odhalení výskytu. Detekce mutovaných alel obou poruch byla zaznamenána v mnoha zemích v několika projektech.

- Bovinní citrulinémie

První záznam o bovinní citrulinémii popsal Harper *et al.* (1986) u australské holštýnské populace. Frekvence mutované alely zde dosahovala velmi vysoké úrovně. Healy *et al.* (1991) uvedl, že 50 % australských holštýnsko – fríských stád a 30 % býků využívaných v AI bylo potomstvem amerického holštýnského plemníka - Linmack Kriss Kinga, který měl největší podíl na rozšíření nežádoucí alely.

Robinson *et al.* (1993) prokázal přítomnost jednoho heterozygotního holštýnského plemníka v USA. Frekvence výskytu mutace odpovídá 0,3 % z celkového souboru 367 kusů testovaných holštýnů. Naštěstí nepatřil k moc využívaným plemníkům, a z AI byl vyřazen dříve, než se zjistil jeho status citrulinémie. Dále mezi 102 guernsey býky a 53 jersey býky nebyl zaznamenán žádný přenašeč BC.

V roce 1994 Schwerin *et al.* provedl první studii detekce citrulinémie v Německu. Testovaný soubor zahrnoval 116 vypláchnutých embryí plemene Schwarzbuntes Milchrind (SMR) z roku 1989, které pocházely od 9 plemníků a 24 krav. Určil, že 17 % analyzovaných embryí jsou přenašeči poruchy. Následně Grupe *et al.* (1996) uskutečnil screening 866 holštýnských býků, 91 kusů SMR býků a 34 německých fríských plemníků. Nezjistil žádného přenašeče mutované alely. Na tomto převratném výsledku mají zřejmě svůj podíl změny prodělané v rámci sjednocení Německa v roce 1990, kdy došlo k porážení téměř jednoho milionu krav, a na inseminačních stanicích přestali být využíváni SMR plemníci (Schwerin *et al.*, 1994).

V roce 2006 uveřejnil Čítek *et al.* výsledky z projektu zaměřeném na monitoring genetického zdraví skotu v České republice. Testovaný soubor zahrnoval různá plemena jako například holštýn, český simentál, charoleis, limousine, masný simentál, hereford a další. Ani u jednoho zvířete nebyla potvrzena přítomnost

výskytu bovinní citrulinémie. Shodné výsledky uveřejnili ve svých studiích, zaměřených na výskyt této poruchy u holštýnského plemene a jeho kříženců, i další autoři jako Patel *et al.* (2006) v Indii, Meydan *et al.* (2010) a Oner *et al.* (2010) v Turecku nebo Nassiry *et al.* (2005) a Eydivandi *et al.* (2012) na území Iránu.

V současnosti nejnovější potvrzený případ výskytu BC je zaznamenán v Číně. Li *et al.* (2011) detekoval mutaci u jednoho přenašeče v testované populaci holštýnského skotu, která zahrnovala 436 krav a 179 býků. Frekvence přenašečů činí 0,16 %.

Na základě těchto informací a výsledků z předchozích projektů by mohlo být konstatováno, že přítomnost bovinní citrulinémie je ve světovém měřítku na nízké úrovni. Doposud k nejmarkantnějšímu odhalení výskytu mutace patří detekce provedená na území Austrálie. Screening populace skotu v ostatních zemích ukazuje většinou nulovou přítomnost poruchy. Naopak výsledky naší studie, kde četnost heterozygotních přenašečů dosahuje 15,2 % a frekvence mutované alely odpovídá 7,6 % přináší nepříjemné zjištění, týkající se plemene česká červinka na našem území. Možná opatření, která by mohla vést ke snížení frekvence mutované alely a zabránění v jejím dalším šíření napříč populací, uvádím v závěru práce.

- Deficience krevního koagulačního faktoru XI

Bovinní forma poruchy FXI byla poprvé popsána u holštýnského skotu v Ohio koncem šedesátých let minulého století (Kociba *et al.*, 1969). Marron *et al.* (2004) detekoval příčinou mutaci vzniku poruchy v exonu 12. Na základě toho byl vyvinut diagnostický DNA test. Ve své studii potvrdil přítomnost přenašečů mutované alely u plemeníků amerického holštýna s frekvencí 1,2 %. Následující rok Kunieda *et al.* (2005) odhalil mutaci faktoru XI, v exonu 9 u japonského černého skotu. V roce 2008 provedl Ohba *et al.* genotypování 123 zvířat tohoto plemene. Soubor zahrnoval 42 býků a 81 krav z oblasti Gifu a Hyogo na území Japonska. Frekvence mutace byla 26,4 %. Po přepočtení hodnoty pouze na býky činil výsledek až 33,3 %. V návaznosti na tak alarmující výsledky došlo k vypracování rodokmene plemeníků a na jeho základě se zjistilo, že výskyt nežádoucí alely je nejméně po šest a více generací otců.

Klinické příznaky poruchy u japonského černého skotu v porovnání s holštýnským plemenem mají mírnější projev srovnatelný s FXI deficiencí u člověka. Zřídka dochází ke spontánní krvácivosti, kterou představuje například vznik hematomů nebo vnitřní krvácení v kloubech (Kunieda *et al.*, 2005).

V posledních letech probíhá rozsáhlý screening holštýnského plemene na území Turecka. Například Meydan *et al.* (2009) odhalil 4 přenašeče (heterozygoty) z celkového testovaného souboru 225 krav. Frekvence mutované alely odpovídala 0,9 %. Po přepočtení hodnota prevalence přenašečů činila 1,8 %. V roce 2010 Oner *et al.* uskutečnil analýzu 170 krav z regionu Bursa. Zaznamenal 2 přenašeče. Frekvence mutované alely byla 0,06 a prevalence přenašečů 1,17 %. Ve stejném roce Meydan *et al.* (2010) odhalil při screeningu vybraných recesivně dědičných poruch (BLAD, DUMPS, CVM, BC, FXI) čtyři přenašeče FXI v souboru 350 holštýnek. Frekvence mutované alely činila 0,006 a prevalence přenašečů byla 1,2 %. Nejnovější výsledky z regionu Antalya přináší Karsli *et al.* (2011). Zjistil přítomnost mutace u dvou přenašeček z celkového panelu 504 kusů holštýnských krav, tj. prevalence přenašečů 0,4 %. Tyto studie prokazují velmi nízký výskyt FXI v rámci celého Turecka.

Deficience krevního koagulačního faktoru byla již zaznamenána i ve střední Evropě. O tom svědčí výsledky studie pod vedením Čítka *et al.* (2008), který analyzoval soubor 309 jedinců holštýnského skotu a jeho kříženců s českým simentálem chovaných v ČR a SRN. Výzkum potvrdil výskyt mutace v exonu 12 u 1 německé holštýnské krávy, detekované jako heterozygotní přenašečka poruchy. V následujícím roce v sousedním Polsku uveřejnil Gurgul *et al.* (2009) pozitivní záchyt třech heterozygotních příbuzných krav holštýnsko - fríského plemene.

Nejúčinnější prevencí před šířením poruchy je testování plemeníků na inseminačních stanicích. Jako zářný příklad lze uvést projekt vedený Patelem *et al.* (2007), do kterého bylo zahrnuto 1001 býků indických mléčných plemen jako *Bos taurus* (holštýnsko - fríský skot, jersey), *Bos indicus*, kříženci *Bos taurus* a *Bos indicus*, či *Bubalus bubalis* (vodní bývol). V souboru detekoval 2 holštýnské býky jako heterozygotní přenašeče. Frekvence nežádoucí alely u indického holštýnského skotu tedy odpovídá 0,6 %.

Jedna z nejnovějších analýz potvrzuje přítomnost poruchy i v Číně. Zhang *et al.* (2010) detekoval mezi 576 kravami plemene holštýn z provincie Henan 2 přenašeče a 1 postiženého jedince. Frekvence mutované alely činí 0,3 %, frekvence přenašečů 0,3 % a prevalence přenašečů 0,2 %.

Příznivé výsledky přinesla studie Eydivandi *et al.* (2011) který testoval 100 jedinců íránského holštýnského plemene a 230 kusů domorodého skotu v provincii Khuzestan v Iránu. Všechna zvířata byla prostá nežádoucí mutace.

Výše zmíněné projekty ukazují, že deficiencie krevního koagulačního faktoru FXI je porucha rozšířená téměř po celém světě. V některých zemích se vyskytuje více, v jiných zas méně, což má příčinu především ve využívání plemenků (heterozygotů pro FXI) v umělé inseminaci (AI). Jedná se o autozomálně recesivně dědičnou poruchu, a tudíž šíření mutované alely může probíhat skrytě.

Nežádoucí mutace má negativní dopad na zdravotní stav populace a s tím souvisí i ztráty zisku a prosperity chovů. Projevy poruchy mohou být asymptomatické a v populaci se projeví jen zvýšenou mortalitou a morbiditou (Meydan *et al.*, 2009) nebo naopak zřetelnější a upozorní na sebe několika symptomy, jako například nadměrnou krvácivostí, anémií, nižší přežitelností plodů a telat (Liptrap *et al.*, 1995), či snížení rezistence k pneumonii, mastitidám, metritidám aj. infekčním nemocem (Gentry *et al.*, 1996). Z pohledu fyziologie reprodukční činnosti se přítomnost mutace FXI nepříznivě odráží na velikosti folikulů, které mají menší průměr, a dále na nižší úrovni koncentrace estradiolu v plasmě v době ovulace (Ghanem *et al.*, 2005). Estrální cyklus postižených krav se vyznačuje sníženým vývojem folikulů a pomalým procesem luteolýzy (Liptrap *et al.*, 1995). Tyto studie predikují potenciální vliv na plodnost.

Eliminace nežádoucí recesivní alely a preventivní screening populace jsou kroky, které mohou vést ke snížení rizika ztrát a problémů spojených s přítomností poruchy FXI. Naše testovaná populace české červinky byla zjištěna jako prostá výskytu poruchy FXI, a proto není zapotřebí přijímat žádná zvláštní chovatelská opatření.

7. ZÁVĚR

Kongenitální poruchy se vyskytují u všech druhů a plemen hospodářských zvířat. Jejich přítomnost v populaci sebou přináší neblahý dopad na zdravotní stav a ekonomiku produkce stáda. Poruchy vzniklé díky působení nevhodných exogenních vlivů je relativně snazší eliminovat například úpravou managementu stáda a dodržováním základních zootechnických opatření, oproti poruchám jejichž příčina vzniku má spojitost se změnou genetické informace čili mutací. Vzhledem k tomu, že mutace se vyskytují v každé generaci, je tedy nemožné úplně vymýtit veškeré genetické vady. Nicméně pomocí moderních molekulárně – genetických metod a technologií, které nám poskytují potřebný nástroj pro eradikaci specifických genetických vad, lze podstatně urychlit proces jejich identifikace a následné eliminace.

Cílem této diplomové práce bylo provedení genotypizace pro lokusy bovinní citrulinémie a deficiencie krevního koagulačního faktoru v exonu 9 a 12 u populace plemene česká červinka ze Školního zemědělského podniku JU v ČB. Analýza prokázala přítomnost mutované alely pouze v lokusu pro bovinní citrulinémii. Porucha FXI nebyla vůbec zaznamenána a v porovnání s výsledky z předchozích studií jiných autorů lze souhlasit se stanoviskem jejího všeobecně nízkého výskytu.

Došlo k odhalení celkem 7 heterozygotních přenašečů bovinní citrulinémie, čemuž odpovídá frekvence výskytu mutované alely 7,6 %. V porovnání s výsledky jiných autorů je četnost této nežádoucí alely v našem testovaném souboru zvířat dosti značná. Jako nejsnazší doporučení k její eliminaci bych navrhovala vyloučení všech detekovaných jedinců z plemenitby. To by nebylo tak obtížné provést u plemene jako holštýn aj., které disponují dostatečně velkou populací zvířat, ovšem pro českou červinku, kde je stav populace v celé České republice na úrovni do 250 jedinců, by tento krok měl značně zdrcující dopad.

Česká červinka patří mezi naše genové rezervy a v současnosti se u ní provádí postupná revitalizace. Avšak tento proces probíhá značně pomalu. Skot má sám o sobě dosti dlouhou dobu březosti a navíc česká červinka z pohledu chovatelské dospělosti patří k pozdějším plemenům. Největší problém ovšem přináší vysoká hrozba inbrední deprese. Velmi nízký stav populace a zejména nízký počet plemeníků vede k nedostatečné možnosti výběru variabilních rodičovských párů.

Je třeba proto hledat a činit šetrné kroky, které povedou k eliminaci nežádoucích alel, ale zároveň nezpůsobí neúnosné snižování stavu populace.

Jako východisko bych viděla využití embryotransferu, který se dnes provádí bez velkých problémů, kde nevýhodou je snad jen vyšší finanční nákladnost a pracovní náročnost. Vlastnímu přenosu embryí do příjemkyň by předcházela jejich genotypizace. Využita by byla jen embrya detekovaná jako dominantní homozygoti tedy prostá výskytu poruchy bovinní citrulinémie. Tímto způsobem by mohla být zachována reprodukce i heterozygotních rodičovských párů. Ty jsou totiž schopni i přes přítomnost nežádoucí mutované alely produkovat 25 % potomků s normálním genotypem. Pokud by byl jen jeden z rodičů přenašečem a druhý zcela zdravý, tak až 50 % jejich potomstva může mít normální genotyp. Ve snaze co možná nejvíce rozšířit chovnou základnu a uchovat co možná nejširší variabilitu genofondu, by tento způsob mohl přinést požadovaný efekt.

Do budoucna by bylo vhodné provést další monitoring populace české červinky i na výskyt jiných recesivně dědičných poruch, které se mohou šířit bez zjevných klinických projevů. Preventivní genotypizace by měla být uskutečněna zejména u plemeníků, kteří oproti samičí populaci mají častější využití v plemenitbě, a nesou tak hlavní podíl na rozšiřování těchto poruch.

8. SEZNAM ZKRATEK

- AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism, délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů
- AI - artificial insemination, umělá inseminace
- APS - peroxosíran amonný
- ASS - Argininosuccinate synthase, argininosukcinátsyntéza
- ATP - Adenosine TriPhosphate, adenosin trifosfát
- BC - bovine citrulinemia, bovinní citrulinémie
- BLAD - Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency, deficiencie adheze leukocytů u skotu
- BSA - albumin bovinního séra
- BSE - Bovine Spongiform Encephalopathy, Bovinní spongiformní encefalopatie
- BTA11 - Bovine Chromosome 11, bovinní 11. chromozom
- BVD virus - Bovine viral diarrhoea virus, Bovinní virová diareja
- CAPS - Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, délkový polymorfismus restriktivně štěpené amplifikované DNA
- CNS - centrální nervová soustava
- CVM - Complex Vertebral Malformation, complex vertebrálních malformací
- DMSO - dimethyl sulfoxide
- DNA - Deoxyribonucleic Acid, deoxyribonukleotidová kyselina
- dNTP - Deoxyribonucleotide triphosphate, deoxyribonukleotid trifosfát
- DUMPS - Deficiency of uridine monophosphate synthase, deficiencie uridin-5'-monofosfátsyntázy
- EDTA - Ethylenediaminetetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraoctová
- FAO DAD - IS - Food Agriculture Organization Domestic Animal Diversity Information System
- FXI; F11 - factor XI, krevní koagulační factor, zkratka i pro jeho dědičnou poruchu
- IBR - Infectious Bovine Rhinotracheitis, infekční bovinní rinotracheitída
- KDZ - kontrola dědičnosti zdraví
- KVZ - kontrola vlastního zdraví
- MAS - Marker-Assisted Selection, marker asistovaná selekce
- OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals
- PAGE - Polyacrylamide Gel Electrophoresis, polyakrylamidová elektroforéza

PCR - Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce

PH - plemenná hodnota

PK - plemenná kniha

QTG - Quantitative Trait Gene, gen kvantitativních vlastností

QTL - Quantitative Trait Loci, lokus kvantitativních vlastností

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA, polymorfismus náhodně amplifikované DNA

RE - Restriction Enzyme, restriční enzym

RFLP - Restriction Fragment Length Polymorphism, polymorfismus délky restričních fragmentů

RTG - rentgenové záření

SB - sodium borate buffer, sodnoborátový pufr

SCAR - Sequence Characterized Amplified Region, sekvence vyznačující amplifikovanou oblast

SDS - dodecylsírán sodný

SMR - Schwarzbuntes Milchrind (25 % German Friesians, 25 % Jersey, 50 % Holsteins)

SNP - Single Nucleotide Polymorphism, jednonukleotidový polymorfismus

SRN - Spolková republika Německo

SSR - Simple Sequence Repeats, tandemová opakování krátkých motivů

STR - Short Tandem Repeats, tandemová opakování krátkých motivů

STS - Sequence-Tagged Site, sekvence cílového místa

TAE - buffer (Tris/acetate/EDTA), Tris-acetátový pufr

TBE - buffer (Tris/Borate/EDTA), Tris-borátový pufr

TEMED - Tetramethylethylenediamine, tetrametylendiamin

VNTR - Variable Number Tandem Repeats, variabilita v počtu tandemových opakování

VÚŽV - Výzkumný ústav živočišné výroby

WGS - Whole Genome Selection, genomická selekce

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ANDERSON, Phill. The Polymerase Chain Reaction (PCR): Cloning DNA in the Test Tube. ST. ROSEMARY EDUCATIONAL INSTITUTION. [Http://schoolworkhelper.net/](http://schoolworkhelper.net/) [online]. July 31, 2010 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://schoolworkhelper.net/2010/07/the-polymerase-chain-reaction-pcr-cloning-dna-in-the-test-tube/>
2. ANSON, Adam. The Cattle site.com [online]. May 2009 [cit. 2011-10-15]. Secrets of the Genome: a New Bovine Story. Dostupné z WWW: <<http://www.thecattlesite.com/articles/1963/secrets-of-the-genome-a-new-bovine-story>>.
3. BADEMKIRAN, S; ICEN, H; KURT, D. Congenital Recto Vaginal Fistula with Atresia Ani in a Heifer: A Case Report. Y.Y.U. Veteriner Fakultesi Dergisi. 2009, 20, 1, s. 61-64. ISSN 1017-8422.
4. BÁRTOVÁ, Eva. Gelová elektroforéza. Molekulární biologie: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat [online]. Brno, c2011b [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-gelova_elektroforeza&lang=cz
5. BÁRTOVÁ, Eva. RFLP – restrikční reakce. Molekulární biologie: VFU Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat [online]. Brno, c2011a [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: http://opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-rflp&lang=cz
6. BERAN, Ota. Co přináší poznání genomu skotu. ZPRAVODAJ ČESKÉHO SVAZU CHOVATELŮ. 2009, 16, 3, s. 46-49.
7. BLOWEY, RW; WEAVER, AD. Color Atlas of Diseases and Disorders of Cattle. 2nd ed. London : Mosby, 2003. Congenital Disorders, s. 1-10. ISBN 0-7234-3205-8.
8. Bovine HAPMAP Consortium: The genetic history of cattle. Science 2009, 324:529-532.
9. BRUSH, PJ; ANDERSON, PH; GUNNING, RF. Identification of factor XI deficiency in Holstein-Friesian cattle in Britain. Vet Rec. 1987, 121, s. 14-17.
10. ČÍTEK, J., V. ŘEHOUT, J. HAJKOVA a J. PAVKOVA. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. Vet Med. 2006, roč. 51, s. 333-339.
11. ČÍTEK, J., V. ŘEHOUT, L. HANUSOVÁ a P. VRABCOVÁ. Sporadic incidence of factor XI deficiency in Holstein cattle. J. Sci. Food. Agric. 2008, roč. 88, s. 2069-2072.
12. ČÍTEK, J; ŘEHOUT, V; HÁJKOVÁ, J. Congenital disorders in the cattle population of the Czech Republic. Czech J. Anim. Sci. 2009, 54, 2, s. 55-64.

13. DENNIS, J.A., P.J. HEALY, A.B. BEAUDET a W.E. O'BRIENT. Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1989, roč. 86, s. 7947-7951.
14. DODDS, W.J. a J.E. KULL. Canine Factor XI (plasma thromboplastin antecedent) deficiency. J. Lab. Clin. Med. 1971, roč. 78, s. 746.
15. EENENNAAM, Alison Van. DNA-Based Technologies. National Beef Cattle Evaluation Consortium Beef Sire Selection Manual [online]. 2006, s. 66-73, [cit. 2011-10-20]. Dostupný z WWW: <http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/My_Laboratory/Publications/NBC-EC-SireSelectionManualChapter.pdf>.
16. EYDIVANDI, Cyrus, Cyrus AMIRINIA, Naser EMAMJOMEH-KASHAN, Mohammad CHAMANI a Jamal FAYAZI. Study of factor XI deficiency in Khuzestan cattle population of Iran. African Journal of Biotechnology. 2011, roč. 10, č. 4, s. 718-721. ISSN 1684-5315. Dostupné z: <http://www.academicjournals.org/AJB>
17. EYDIVANDI, Cyrus, Cyrus AMIRINIA, Naser EMAMJOMEH-KASHAN, Mohammad CHAMANI, Jamal FAYAZI a Hamid Reza SEYEDABADI. Study of citrullinaemia disorder in Khuzestan Holstein cattle population of Iran. African Journal of Biotechnology. 2012, roč. 11, č. 10, s. 2587-2590. ISSN 1684-5315. DOI: 10.5897/AJB10.2420. Dostupné z: <http://www.academicjournals.org/AJB>
18. GASSAWAY, Levi V.M. Genomika v praxi USA [online]. [s.l.] : MTS spol. s r.o., c2011 [cit. 2011-10-25]. Dostupné z WWW: <<http://www.mtssro.cz/nezaheslovano/genomikavpraxi.pdf>>.
19. GENTRY, P.A., K.M. OVERTON a J.L. ROBINSON. Illinois Dairy Report. 1996, s. 32-35.
20. GENTRY, Patricia A., Katrina M. OVERTON a James L. ROBINSON. Illini DairyNet Papers: Bovine Factor XI Deficiency. UNIVERSITY OF ILLINOIS EXTENSION. Illini DairyNet: The Online Resource of the Dairy Industry [online]. 08/05/1998, c2012 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://www.livestocktrail.illinois.edu/dairyNet/paperDisplay.cfm?ContentID=226>
21. GHANEM, ME; NISHIBORI, M; NAKAO, T; NAKATANI, K; AKITA, M. Factor XI mutation in a Holstein cow with repeat breeding in Japan. J Vet Med Sci. 2005, 67, s. 713-715.
22. GRUPE, S; DIETL, G; SCHWERIN, M. Population survey of citrullinemia on German Holsteins. Livest. Prod. Sci. 1996, 45, s. 35 - 38.
23. GURGUL, A., D. RUBIŚ a E. SŁOTA. Identification of carriers of the mutation causing coagulation factor XI deficiency in Polish Holstein-Friesian cattle. Journal of Applied Genetics. 2009, roč. 50, č. 2, s. 149-152. DOI: 10.1007/BF03195666.
24. HARPER, P.A., P.J. HEALY a J.A. DENNIS. Animal model of human disease. Citrullinemia (argininosuccinate synthetase deficiency). Am. J. Pathol. 1989, roč. 135, 1213-1215.

25. HARPER, PA, PJ HEALY, JA DENNIS, JJ O'BRIEN a DH RAYWARD. Citrullinaemia as a cause of death in neonatal Friesian calves. *Aust. Vet. J.* 1986, roč. 63, s. 244.
26. HEALY, P.J. Testing for undesirable traits in cattle: an Australian perspective. *J. Anim. Sci.* 1996, roč. 74, s. 917-922.
27. HEALY, P.J., J.A. DENNIS, L.M. CAMILERI, J.L. ROBINSON, A.L. STELL a R.D. SHANKS. Bovine citrullinaemia traced to the sire of Linmack Kriss King. *Aust. Vet. J.* 1991, roč. 68, č. 4, s. 155.
28. HOVINGH, Ernest. Common Causes of Abortions. In *Abortions in Dairy Cattle - I. Virginia Cooperative Extension. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine : Virginia Tech, 2009* [cit. 2011-11-11]. Dostupné z WWW: <<http://pubs.ext.vt.edu/404/404-288/404-288.pdf>>.
29. <http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>: Metody: Polymerázová řetězová reakce PCR (Polymerase Chain Reaction). Laboratoř molekulární biologie rostlin PřF JU [online]. [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://botanika.bf.jcu.cz/laboratory/pcr.html>
30. HULÁK, Martin, et al. VYUŽITÍ MOLEKULÁRNÍCH METOD A DNA MARKERŮ V GENETICE RYB - PŘEHLED. *Bulletin VÚRH Vodňany.* 2006, 42, 2, s. 69-73.
31. HUSSON, A., C. BRASSE-LAGNE, A. FAIRAND, S. RENOUF a A. LAVOINNE. Argininosuccinate synthetase from the urea cycle to the citrulline-NO cycle. *Eur. J. Biochem.* 2003, roč. 270, č. 9, s. 1887-99.
32. ILIE, Daniela Elena, et al. Control Strategies for Prevention of Undesirable Traits in Cattle - Review. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies.* 2011, 44, 1, s. 415-419. Dostupný také z WWW: <<http://www.usab-tm.ro/utilizatori/ZOOTEHNIE/file/REVISTA%202011/vol%2044/1/biotehnologii/Ilie.pdf>>.index.php?co=priciny_vad_teratogeny>.
33. JEŽKOVÁ, Alena. Genomika mléčného skotu v praxi. *NÁŠ CHOV : odborný časopis pro chovatele hospodářských zvířat a veterinární lékaře.* 2011, 71, 5, s. 15-16. ISSN 0027-8068.
34. JOVANOVIĆ, S., M. SAVIĆ a D. ŽIVKOVIĆ. GENETIC VARIATION IN DISEASE RESISTANCE AMONG FARM ANIMALS. *Biotechnology in Animal Husbandry.* 2009, roč. 25, 5-6, s. 339-347. ISSN 1450-9156. Dostupné z: <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/1450-9156/2009/1450-91560906339J.pdf>
35. KARSLI, Taki, ŞAHİN, Bahar ARGUN KARSLI, Sezai ALKAN a Murat Soner BALCIOĞLU. Identification of Alleles for Factor XI (FXID) and Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) Deficiencies in Holstein Cows Reared in Antalya. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.* 2011, roč. 17, č. 3, s. 503-505.
36. KEELER, RF. Coniine, a teratogenic principle from *Conium maculatum* producing congenital malformations in calves. *Clin Toxicol.* 1974, 7, s. 195 - 206.

37. KNIGHT, AP; WALTER, RG (eds.). Plants Associated with Congenital Defects and Reproductive Failure. In A Guide to Plant Poisoning of Animals in North America. Teton NewMedia, Jackson WY. Ithaca, New York, USA: International Veterinary Information Service, 3. 3. 2004 [cit. 2011-10-12]. Dostupné z WWW: <http://www.ivis.org/special_books/Knight/chap8/IVIS.pdf>.
38. KNOLL, Aleš. Metody molekulární genetiky: Amplifikace sekvencí DNA polymerázovou řetězovou reakcí (PCR). SNUSTAD, D. Peter a Michael J. SIMMONS. Z ANG. ORIGINÁLU PRINCIPLES OF GENETICS, Fifth edition, 2009, John Wiley & Sons, Inc. Genetika. 1.vyd. Alena Mizerová. Jiřina Relichová. Brno: Masarykova univerzita, 2009, s. 434. ISBN 978-80-210-4852-2.
39. KOCIBA, G.J., O.D. RATNOFF, W.F. LOEB, R.L. WALL a L.E. HEIDER. Bovine plasma thromboplastin antecedent (Factor XI) deficiency. J Lab Clin Med. 1969, roč. 74, 37–41.
40. KOVÁČ, G. Choroby hovädzieho dobytku. Vyd. 1. Prešov : M & M, 2001. 874 s. ISBN 80-88950-14-7.
41. KUČERA, Josef. Aktuální vývoj ve šlechtění českého strakatého skotu. NÁŠ CHOV : odborný časopis pro chovatele hospodářských zvířat a veterinární lékaře. 2011, 71, 10, s. 56-57.
42. KUDLÁČ, E; ELEČKO, J., et al. Veterinární porodnictví a gynekologie. Vyd. 1. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1977. 776 s.
43. KUKLÍK, M. LÉKAŘSKÁ A KLINICKÁ GENETIKA, 1. ČÁST : OBECNÁ GENETIKA NEBO TAKÉ FORMÁLNÍ GENETIKA. In MAŘÍK, I. (eds.). Pohybové ústrojí : Pokrok ve výzkumu, diagnostice a terapii. Praha : Excerpta Medica, 10.10.2006. s. 17-34. [cit. 2011-12-11]. Dostupné z WWW: <http://www.pojivo.cz/pu/PU_12_2006.pdf>. ISSN 1212-4575.
44. KUNIEDA, M; TSUJI, T; ABBASI, AR; KAHALAJ, M; IKEDA, M; MIYADERA, K; et al. An insertion mutation of the bovine F11 gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle. Mamm Genome. 2005, 16, s. 383-386.
45. LI, Jianbin, Hongmei WANG, Yi ZHANG, Minghai HOU, Jifeng ZHONG a Yuan ZHANG. Identification of BLAD and citrullinemia carriers in Chinese Holstein cattle. Animal Science Papers and Reports. 2011, roč. 29, č. 1, s. 37-42.
46. LIN, DY; HUANG, YC; CHEN, JC; YANG, TW; SHIAO, TF; CHANG, HL. Investigation of citrullinemia of dairy cattle in Taiwan. J. Taiwan Livest. Res. 2001, 34, s. 279 - 284.
47. LIPTRAP, R.M., P.A. GENTRY, M.L. ROSS a E. CUMMINGS. Preliminary findings of altered follicular activity in Holstein cows with coagulation factor XI deficiency. Vet. Res. Commun. 1995, roč. 19, s. 463-471.
48. MARCINKOVÁ, Anna; BERAN, Ota . Zkoumání genomu skotu odhaluje minulost a dává naději do budoucna. ZPRAVODAJ ČESKÉHO SVAZU CHOVATELŮ MASNÉHO SKOTU. 2009, 16, 4, s. 42-45.

49. MARKOVÁ, Marie. Co si vlastně představit pod pojmem genomová selekce? : Selekcce na úrovni DNA. Chov skotu. 2009, 6, 1, s. 6-8. Dostupný také z WWW: <<http://www.crv.cz/LinkClick.aspx?fileticket=zKrGrddEUAM%3d&tabid=1386>>. ISSN 1801-5409.
50. MARRON, BM; ROBINSON, JL; GENTRY, PA; BEEVER, JE. Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. Anim Genet. 2004, 35, 6, s. 454-456.
51. MEYDAN, H., M.A. YILDIZ a J.S. AGERHOLM. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. Acta Vet Scan. 2010, roč. 52, č. 56, s. 1-8. DOI: 10.1186/1751-0147-52-56.
52. MEYDAN, Hasan, Mehmet A YILDIZ, Fulya ÖZDİL, Yasemin GEDIK a Ceyhan ÖZBEYAZ. Identification of factor XI deficiency in Holstein cattle in Turkey. Acta Vet. Scand. 2009, roč. 51, č. 5, s. 1-4. DOI: 10.1186/1751-0147-51-5. Dostupné z: <http://www.actavetscand.com/content/51/1/5>
53. MIYAKE, YI; MURAKAMI, RK; KANEDA, Y. Inheritance of the Robertsonian Translocation (1/21) in the Holstein-Frisian Cattle. I. Chromosome analysis. J Vet Med Sci. 1991, 53, s. 113-116.
54. MORRIS, CA. A review of genetic resistance to disease in Bos taurus cattle. The Veterinary Journal. 2007, 174, s. 481-491.
55. NASSIRY, Mohammad Reza, Amir NOROUZY, Fereidoun Eftekhari SHAHROUDI, Ali JAVADMANESH a Mohammad Ali SHAD. Investigation of two recessive disorders in breeder bulls of Abbas Abad animal breeding center. IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY. April 2005, roč. 3, č. 2, s. 125-128.
56. O'TOOLE, D. UNIVERSITY OF WYOMING. Genetic and congenital diseases. 13.10. 2010. Dostupné z: http://www.uwyo.edu/vetsci/courses/patb_4110/2110_lectures/genetic_congen_dis.pdf
57. OHBA, Y., M. TAKASU, N. NISHII, E. TAKEDA, S. MAEDA, T. KUNIEDA a H. KITAGAWA. Pedigree analysis of factor XI deficiency in Japanese black cattle. Journal of Veterinary Medical Science. Mar 2008, roč. 70, č. 3, s. 297-299. ISSN 0916-7250. Dostupné z: <http://agris.fao.org/agris-search/search/display.do?f=2009%2FJP%2FJP0901.xml%3BJP2008005842>
58. OMIA - Online Mendelian Inheritance in Animals [online]. Sydney: The University of Sydney, © 2012, 10th August 2011 [cit. 2012-02-27]. Dostupné z: http://omia.angis.org.au/results?search_type=advanced&gb_species_id=9913
59. ONER, Y., A. KESKIN a A. ELMACI. Identification of BLAD, DUMPS, Citrullinemia, Factor XI deficiency in Holstein Cattle in Turkey. Asian Journal of Animal and Veterinary Advance. 2010, roč. 5, č. 1, s. 60-65.

60. PADEERI, M; VIJAYKUMAR, K; GRUPE, S; NARAYAN, MP; SCHWERIN, M; KUMAR, MH. Bovine leucocyte adhesion deficiency syndrome in Indian dairy cattle (*Bos taurus*, *Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus Bubalis*) Population. Arch. Tierz. 1999, 42, s. 347 - 352.
61. PARISH, Jane. Managing Genetic Defects in Beef Cattle Herds. Cattle Business in Mississippi : "Beef Production Strategies" articles [online]. 2010, March, [cit. 2011-11-02]. Dostupný z WWW: <http://msucares.com/livestock/beef/mca_mar2010.pdf>.
62. PATEL, R. K., K. M. SINGH, K. J. SONI, J. B. CHAUHAN a K. R. SAMBASIVA RAO. Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. Journal of Applied Genetics. 2006, roč. 47, č. 3, s. 239-242.
63. PATEL, Rajesh K., Kalpesh J. SONI, Jenabhai B. CHAUHAN, Krishna M. SINGH a Krothapalli R.S. Sambasiva RAO. Factor XI deficiency in Indian *Bos taurus*, *Bos indicus*, *Bos taurus* × *Bos indicus* crossbreds and *Bubalus bubalis*. Genet. Mol. Biol. 2007, roč. 30, č. 3, s. 580-583.
64. PETR, Jaroslav. GMO v živočišné produkci : Geneticky modifikovaní živočichové. In GENETICKY MODIFIKOVANÉ ORGANISMY : Sborník přednášek ze semináře pořádaného Ministerstvem zemědělství ČR a Českou zemědělskou univerzitou v Praze [online]. Praha : [s.n.], 2006 [cit. 2011-10-29]. Dostupné z WWW: <http://eagri.cz/public/web/file/17405/Sbornik_GMO_2006.pdf>.
65. PRŮŠA, Richard. Základy analytických metod v klinické molekulární biologii. 1.vyd. Praha: 2. lékařská fakulta UK a LAMBDA BIO-MED spol. s r. o., 1997. ISBN 80-238-0940-7. Dostupné z: <http://www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-DNA/pdf/skripta.pdf>
66. PRŮŠA, Richard., et al., Amplifikační metody. Multimediální učebnice DNA diagnostiky [online]. 1. vydání. Praha, 1998 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://www.lf2.cuni.cz/Projekty/prusa-dna/newlook/defa6.htm>
67. RACLAVSKÝ, Vladislav. Třídění molekul nukleových kyselin v gelu. Metody molekulární genetiky [online]. Olomouc, 20.11.2003 [cit. 2012-02-23]. Dostupné z: <http://biologie.upol.cz/metody/Slovník/Trideni%20v%20gelu.htm>
68. ROBINSON, J.L., J.L. BURNS, C.E. MAGURA a R.D. SHANKS. Low incidence of citrullinemia carriers among dairy Cattle of the United States. Journal of Dairy Science. 1993, roč. 76, s. 853-858.
69. ROSENTHAL, R.L., O.H. DRESKIN a N. ROSENTHAL. New hemophilia-like disease caused by deficiency of a third plasma thromboplastin factor. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1953, roč. 82, s. 171.
70. SAVIĆ, M; JOVANOVIĆ, S; TRAILOVIĆ, R. Some genetic markers in blood of Balkan goat. Acta Veterinaria. 1995, 45, s. 5-6.
71. SHUPE, JL; JAMES, LF; BINNS, W. Observations on crooked calf disease. J Am Vet Med Assoc. 1967, 151, s. 191-197.

72. SCHWERIN, M., V. PARKANYI, K. ROSCHLAU, W. KANITZ a G. BROCKMANN. Simultaneous genetic typing at different loci in bovine embryos by multiplex polymerase chain reaction. *Biotechnology*. 1994, roč. 1, č. 5, s. 46-63.
73. SUCHÁNEK, Bohumil. Česká červinka. SAMBRAUS, Hans Hinrich. Atlas plemen hospodářských zvířat. 1.vyd. v češtině. Praha: Brázda, s.r.o., 2006, s. 33. ISBN 80-209-0344-5.
74. ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK a Vladislava RŮŽIČKOVÁ. *Metody molekulární biologie*. 1.vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, *Manipulace s nukleovými kyselinami*, s. 17-28. ISBN 80-210-3841-1.
75. TELLAM , Ross L, et al. Unlocking the bovine genome. *BMC Genomics* [online]. 2009, 10:193, [cit. 2011-10-15]. Dostupný z WWW: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/193>>.
76. TETUROVÁ, Kateřina. Identifikace genů rezistence k padlí (*Blumeria graminis* f. sp. hordei) u *Hordeum vulgare* prostřednictvím DNA markerů [online]. Brno : Masarykova univerzita, 2011. 76 s. Dizertační práce. Masarykova univerzita. Dostupné z WWW: <http://is.muni.cz/th/151559/prif_d/Disertacni_prace_K_Teturova.pdf>.
77. THALLMAN, Mark. Whole Genome Selection. University of California at Davis [online]. 2009, June, [cit. 2011-10-28]. Dostupný z WWW: <http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech/Outreach/Whole_Genome_Selection.pdf>.
78. TREŠLOVÁ a Petr VYLEŤAL. Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (vertikální). In: *Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice: Projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048*. Praha: Ústav dědičných metabolických poruch Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, 2008, s. 23. [cit. 2012-02-19]. Dostupné z: http://www.udmp.cz/elearning/sborniky_files/cytogen.pdf
79. UFFO, Odalys a Atzel ACOSTA. Molecular diagnosis and control strategies for the relevant genetic diseases of cattle. *Biotechnologia Aplicada*. 2009, roč. 26, č. 3, s. 204-208.
80. URBAN, Tomáš. QTL & MAS - včlenění informace o markeru do lineárních modelů: Markery a výpočty BLUP. *Virtuální svět genetiky 3: principy genetiky populací a kvantitativních znaků* [online]. Brno: AF MZLU, c2008d, 09.12.2008 [cit. 2012-03-20]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/qtl/qtl4.html>
81. URBAN, Tomáš. *Virtuální svět genetiky 3 : principy genetiky populací a kvantitativních znaků* [online]. Brno : AF MZLU , c2008a, 09.12.2008 [cit. 2011-10-21]. QTL & MAS - úvod. Dostupné z WWW: <<http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/qtl/uvodqtl.html>>.
82. URBAN, Tomáš. *Virtuální svět genetiky 3 : principy genetiky populací a kvantitativních znaků* [online]. Brno : AF MZLU , c2008b, 16.01.2009 [cit. 2011-10-21]. QTL & MAS - genetické markery. Dostupné z WWW: <<http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/qtl/qtl2.html>>.

83. URBAN, Tomáš. Virtuální svět genetiky 3 : principy genetiky populací a kvantitativních znaků [online]. Brno : AF MZLU , c2008c, 09.12.2008 [cit. 2011-10-21]. QTL & MAS - mapování QTL. Dostupné z WWW: < <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/qtl/qtl5.html> >.
84. URBAN, Tomáš. Genetika populací - organizace genetické variability - Hardy - Weinbergův princip. Virtuální svět genetiky 3 - principy genetiky populací a kvantitativních znaků [online]. Brno: AF MENDELU, 5.09.2008e, 17.09.2008 [cit. 2012-04-08]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/index.html>
85. VLÁŠKOVA, Hana a Helena TREŠLOVÁ. Elektroforéza v agarózovém gelu (horizontální). In: Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice: Projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048. Praha: Ústav dědičných metabolických poruch Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, 2008b, s. 21-22. [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: http://www.udmp.cz/elearning/sborniky_files/cytogen.pdf
86. VLÁŠKOVÁ, Hana a Helena TREŠLOVÁ. PCR. In: Vybrané vyšetřovací metody v molekulární genetice a cytogenetice: Projekt Metabolické vzdělávací centrum CZ.04.3.07/3.2.01.2/2048. Praha: Ústav dědičných metabolických poruch Všeobecná fakultní nemocnice v Praze, 2008a, s. 21-22. [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: http://www.udmp.cz/elearning/sborniky_files/cytogen.pdf
87. WATANABE, D; HIRANO, T; SUGIMOTO, Y; OGATA, Y; ABE, S; ANDO, T; et al. Carrier rate of factor XI deficiency in stunted Japanese black cattle. J Vet Med Sci. 2006, 68, s. 1251-1255.
88. WEBER, AF; BUOEN, LC; ZHANG, TQ. Prevalence of 14/20 centric fusion chromosomal aberration in US Simmental cattle. Am Vet Med Assoc. 1992, 200, s. 1216-1219.
89. www.biotech.iastate.edu: From Mendel to Markers : Impact of molecular technologies on animal, plant, and human genetics [online]. Iowa : Office of Biotechnology Iowa State University, 2005, 02/18/08 [cit. 2011-10-29]. Marker Assisted Selection (MAS), s. Dostupné z WWW: <<http://www.biotech.iastate.edu/publications/mendel/>>.
90. www.cestr.cz/cc: Informace pro chovatele plemene Česká červinka: Historie chovu české červinky (L). Svaz chovatelů českého strakatého skotu [online]. c2008 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://www.cestr.cz/cc.html>
91. www.cestr.cz/clanky-byk-ceske-cervinky : Býk české červinky. Svaz chovatelů českého strakatého skotu [online]. 10. 5. 2010 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://www.cestr.cz/clanky-byk-ceske-cervinky.html>
92. www.cestr.cz/rpk/cc: Informace pro chovatele plemene Česká červinka: Řád plemenné knihy plemene Česká červinka. SVAZ CHOVATELŮ ČESKÉHO STRAKATÉHO SKOTU [online]. 10. 12. 2009 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: http://www.cestr.cz/download-846-rpk_cc_2007-doc.html

93. www.cestr.cz/slprogram/cc: Chovný cíl a šlechtitelský program plemene česká červinka. Svaz chovatelů českého strakatého skotu [online]. 10. 12. 2009 [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: http://www.cestr.cz/download-848-sl_prog_cc_2007_12_11-doc.html
94. www.cmsch-kdz-prehled.cz: Českomoravská společnost chovatelů, a.s. [online]. c2004-2011 [cit. 2011-10-21]. Přehledy kontroly dědičnosti zdraví hospodářských zvířat. Dostupné z WWW: <<http://www.cmsch.cz/cs/prehledy-kontroly-dedicnosti-zdravi-hospodarskych-zvirat/>>.
95. www.genetickezdroje.cz: ČESKÁ ČERVINKA. Národní referenční středisko uchování a využití genetických zdrojů hospodářských zvířat [online]. [cit. 2012-02-14]. Dostupné z: <http://www.genetickezdroje.cz/index.php?p=skot>
96. www.lfhk.cuni.cz/kohler/: KÖHLEROVÁ, Renata. Mutace. In: Lékařská fakulta UK v Hradci Králové [online]. Hradec Králové: Ústavu lékařské biochemie LF UK HK, 3. 2. 2012 [cit. 2012-03-22]. Dostupné z: <http://www.lfhk.cuni.cz/kohler/vyuka/dzl/Mutace.htm>
97. www.siriusgenomics.com: Technology: What is a Single Nucleotide Polymorphism?. Sirius Genomics Inc.: See better outcomes [online]. Canada, © 2007-2010, August 22, 2011 [cit. 2012-03-16]. Dostupné z: <http://www.siriusgenomics.com/technology/>
98. www.vrozene-vady1.cz :ŠÍPEK, Antonín, et al. Vrozené vývojové vady [online]. c2008 – 2011 [cit. 2011-10-05]. Definice a rozdělení vrozených vad. Dostupné z WWW: <http://www.vrozene-vady.cz/vrozene-vady/index.php?co=definice_vady>.
99. www.vrozene-vady2.cz :ŠÍPEK, Antonín, et al. Vrozené vývojové vady [online]. c2008 – 2011 [cit. 2011-10-05]. Příčiny vrozených vad a teratogeny. Dostupné z WWW: <<http://www.vrozene-vady.cz/vrozenevady/>>
100. www.vrozene-vady3.cz :ŠÍPEK, Antonín, et al. Vrozené vývojové vady [online]. c2008 – 2011 [cit. 2011-10-05]. Základní typy dědičnosti. Dostupné z WWW: <<http://www.vrozene-vady.cz/genetika/index.php?co=dedicnost>>.
101. ZHANG, Ke, Zhan- bin WANG a Qing- yi WANG. Detecting Factor XI Deficiency in Holstein Cattle Using PCR Analysis. Agricultural Science & Technology. 2010, roč. 11, č. 5, s. 109-111.