



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA

Katedra genetiky a zemědělských biotechnologií

Bakalářská práce

Monogenně podmíněné dědičné poruchy zdraví skotu

Autorka práce: Dagmar Wagnerová

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

České Budějovice
2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Dagmar WAGNEROVÁ**
Osobní číslo: **Z16043**
Studijní program: **B4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Zootechnika**
Název tématu: **Monogenně podmíněné dědičné poruchy zdraví skotu**
Zadávací katedra: **Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

Aplikace genetiky a genomiky ve šlechtění hospodářských zvířat znamená vstup do nové epochy. To platí rovněž pro oblasti genetiky zdraví zvířat. Molekulárně genetické analýzy jsou velmi spolehlivé a ekonomicky výhodné. Nové metodické postupy odhalování a popisu příčin dědičně podmíněných poruch zdraví umožňují populace postupně ozdravovat.

Úkolem bakalářské práce je zpracovat literární rešerši, která vyhodnotí současný stav vědeckého poznání v oblasti monogenních dědičných poruch zdraví skotu včetně praktických aplikací ve šlechtění.

Zpracujete literární rešerši, v níž shrnete současné poznatky o vybraných monogenních dědičných chorobách skotu se zaměřením na ekonomicky nejvýznamnější. Popíšete lokalizaci příslušných genů na chromozomech, příčinné mutace, způsoby genotypizace. Zvláště popište možnosti využití čipů pro odhalování nositelů nežádoucích alel a pro skrining populace. Analyzujte výskyt choroby v populaci skotu v ČR, v Evropě a ve světě. V závěru práce formulujte návrhy praktických šlechtitelských opatření směřujících k eradikaci choroby z populace skotu v ČR.


Rozsah grafických prací: 5 stran
Rozsah pracovní zprávy: 25-30 stran
Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam odborné literatury:


Fleming A., Abdalla E. A., Maltecca C., Baes C. (2018): Invited review: Reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for genetic progress in dairy cattle. *Archives Animal Breeding*, 61, 43-57
Fritz S., Capitan A., Djari A., Rodriguez S. C., Barbat A., Baur A., Grohs C., Weiss B., Boussaha M., Esquerre D., Klopp C., Rocha D., Boichard D. (2013): Detection of Haplotypes Associated with Prenatal Death in Dairy Cattle and Identification of Deleterious Mutations in GART, SHBG and SLC37A2. *Plos One*, 8, e65550
Avanus K., Altinel A. (2017): Comparison of allele-specific PCR, created restriction-site PCR, and PCR with primer-introduced restriction analysis methods used for screening complex vertebral malformation carriers in Holstein cattle. *Journal of Veterinary Science*, 18, 465-470.

Vedoucí bakalářské práce: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
Katedra genetiky a speciální produkce rostlinné

Datum zadání bakalářské práce: 26. února 2018
Termín odevzdání bakalářské práce: 15. dubna 2019


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc., dr. h. c.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentůvská 1588, 370 05 České Budějovice


prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 13. února 2018

Prohlášení

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

24. dubna 2021 v Českých Budějovicích

.....
Dagmar Wagnerová

Abstrakt

Chov skotu je významná součást zemědělské výroby a jelikož je tento chov celosvětově velmi rozšířen a u každého plemene se snaží o ještě větší zušlechtění jeho primární užitkovosti, dlouhověkosti, ranosti a dobrého zdraví, pojí se s tím i úskalí v podobě geneticky podmíněných chorob, většinou s plemennou predispozicí. V dřívějších dobách se hojně využívaly inseminační dávky elitních býků bez předchozího testování na dědičné choroby, a tak se tyto mutace snadno rozšířili do celého světa. Například u holštýnského skotu, který je velmi prošlechtěný a je celosvětově nejvíce rozšířený pro mléčnou užitkovost, se poměrně často vyskytují, respektive vyskytovaly, některé monogenně podmíněné dědičné choroby. Jedná se například o komplex vertebrálních malformací (CVM), syndrom deficience adhezní schopnosti leukocytů (BLAD), bovinní citrulinémie (CIT), nedostatek uridin monofosfát syntázy (DUMPS), deficit koagulačního faktoru XI nebo Glycogen Storage Disease (GSD II) a syndaktilie. U těchto nemocí je frekvence výskytu v České republice na poměrně nízké úrovni. Dá se říci, že až téměř nevyskytující se. Jediné CVM se zde v České republice vyskytuje, nicméně se daří tuto chorobu monitorovat a tím i pomalu, ale jistě eliminovat. Ke zjištění a eliminaci těchto onemocnění se nejčastěji používá metoda PCR, PCR-RFLP, která slouží k odhalování heterozygotních přenašečů a jejich vyřazování z reprodukce. Kvalita kontroly dědičnosti je taktéž velmi důležitou součástí eliminace daných chorob. Díky těmto metodám eliminace a detekce se v České republice téměř žádná z výše uvedených chorob nevyskytuje. Nejvýznamnější z nich, Komplex vertebrálních malformací, v České republice doznívá, ale je pod kontrolou.

Klíčová slova: skot, choroby

Abstract

Cattle breed is a significant part of agricultural production. As cattle breed is widespread all around the world, with every breed effort to refine its primary utility, longevity and good health is made. In connection with those efforts, many difficulties in the form of genetically determined diseases, mostly with a breeding predisposition, arise. In the past, insemination doses of elite bulls without prior testing for hereditary diseases were widely used. As a result, mutations of this type were easily spread all around the world. For example, holstein cattle, which is very refined and is globally used for milk yield, is predisposed to some monogenic hereditary diseases. These include Vertebral Malformation Complex (CVM), Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrome (BLAD), Bovine Citrullinemia (CIT), Uridine Monophosphate Synthase Deficiency (DUMPS), Coagulation Factor XI Deficiency or Glycogen storage disease (GSD II) and Syndactyly. The frequency of these diseases in the Czech Republic is relatively low. It can be said that they are almost non-occurring. The only CVM occurs here, but it fades and is under control. To detect and eliminate these diseases the PCR method, PCR-RFLP is mostly used. The quality of heredity control is also a significant part of eliminating these diseases. Thanks to these methods of elimination and detection, almost none of these diseases occur in the Czech Republic. The most important of them, the Complex of Vertebral Malformations, is fading in the Czech Republic, but it is under control.

Keywords: Cattle, Diseases

Poděkování

Děkuji prof. Ing. Jindřichu Čítkovi, CSc. za vedení, cenné rady, ochotu, trpělivost a veškerou pomoc při zpracování mé bakalářské práce.

Obsah

Úvod.....	10
1. Chov skotu v České republice	11
.....	11
Kontrola mléčné užitkovosti	12
Kontrola užitkovosti masných plemen skotu	12
2. Bovinní genom.....	13
3. Monogenně podmíněná dědičnost	15
4. Diagnostická metoda PCR.....	16
Fáze:	17
5. Metoda RFLP.....	18
6. Komplex vertebrálních malformací (CVM)	19
Klinické příznaky	19
Dědičnost	19
Diagnostika	20
Opatření proti šíření CVM	20
7. Syndrom deficience adhezní schopnosti leukocytů (BLAD)	22
Klinické příznaky	22
Dědičnost	22
Diagnostika	22
8. Bovinní citrulinémie (CIT)	23
Klinické příznaky	23
Dědičnost	24
9. Nedostatek uridin monofosfát syntázy (DUMPS).....	24
Klinické příznaky	25
Dědičnost	25
Diagnostika	25

10.	Glycogen storage disease (GSD II).....	26
	Klinické příznaky	26
	Dědičnost	26
	Diagnostika	26
11.	Deficit koagulačního faktoru XI	27
	Klinické příznaky	27
	Dědičnost	27
	Diagnostika	27
12.	Syndaktylie.....	28
	Klinické příznaky	28
	Dědičnost	28
	Diagnostika	28
13.	Screening DNA pomocí mikročipů.....	29
	Illumina čipy	29
14.	Výskyt monogenních chorob	30
	Závěr	31
	Seznam použité literatury.....	32
	Seznam obrázků	36
	Seznam tabulek	37

Úvod

Chov skotu je významnou součástí zemědělské výroby. Chov skotu je finančně náročnější než chovy jiných zemědělských zvířat, a proto je kladen velký důraz na celkový zdravotní stav stáda a jedinců v něm. Skot je v České republice chován především pro mléko a hovězí maso, jakožto základní živočišné složky pro lidskou výživu.

Nejenže ze skotu máme základní živočišné složky, ale zároveň se podílí na udržování trvalých travních porostů, zejména v horských a podhorských oblastech a tím udržení její ekologické stability a kulturního vzhledu krajiny. Skot je také nenahraditelným zdrojem přirozených statkových hnojiv.

Problémy se zdravotním stavem mohou způsobovat i geneticky podmíněné choroby, jelikož se v minulosti hojně využívaly inseminační dávky elitních býků zlepšovatelů po celém světě a nebyly k dispozici ani v podvědomí genetické testy na dané choroby, Vertebral Malformation Complex (CVM), Leukocyte Adhesion Deficiency Syndrome (BLAD), Bovine Citrullinemia (CIT), Uridine Monophosphate Synthase Deficiency (DUMPS), Coagulation Factor XI Deficiency, Glycogen storage disease (GSD II) a Syndactylie, rozšířily se tak tyto mutace po celém světě.

Dědičnost většiny těchto onemocnění je autozomálně recesivní, což znamená, že gen je lokalizován na autozomu a choroba se fenotypově projeví u homozygota recesivního. Při páření heterozygotních rodičů je pravděpodobnost vyštěpení homozygota recesivního s genetickou poruchou 25 %. Pokud se tedy nebudou jedinci testovat na dané mutace, může to znamenat, že jestliže se budou množit heterozygotní přenašeči recesivních alel pro tato onemocnění, za několik let by se v jednotlivých chovech tyto choroby mohly masivně rozrůst a tím způsobit škody nejen ekonomické ale i chovatelské a šlechtitelské. Jako například zánik elitních linií jednotlivých plemen.

1. Chov skotu v České republice

Jak bylo zmíněno již výše, v České republice se skot chová hlavně na produkci mléka a masa. Česká republika se v roce 2019 pohybovala se soběstačností v produkci hovězího masa na 121 %. V roce 2020 byl počet kusů chovaného skotu 1 404 000 kusů. V porovnání s předchozím rokem se tedy stav mírně snížil, jelikož v roce 2019 se chovalo 1 417 000 kusů. Průměrný stav dojených krav v roce 2019 meziročně mírně vzrostl na 363 000 kusů. Průměrná dojivost se taktéž zvýšila na 8 741 l na kus s průměrnou tučností 3,98 %. Počty kusů skotu chovaného v České republice a průměrnou dojivost s jednotlivými složkami mléka za posledních několik let, shrnují tabulky uvedené níže.

Tabulka 1: Ukazatele průměrné výroby mléka (Ročenka chovu skotu 2019)

Ukazatel	Jed.	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Dojnice (Ø stav) ¹⁾	tis.	371	368	370	365	361	363
Ø denní dojivost	l/krávu	21,11	21,92	22,03	22,53	23,36	23,21
Ø roční dojivost	l/krávu	7 705	8 001	8 061	8 223	8 526	8 471
Produkce mléka	mil. l	2 856	2 946	2 984	2 998	3 078	3 073
Tržní produkce mléka	mil. l	2 753	2 844	2 885	2 898	2 978	2 975
Tržnost	%	96,4	96,5	96,7	96,7	96,8	96,8
Tučnost mléka	%	3,87	3,84	3,91	3,89	3,86	3,92
Nákupní cena mléka	Kč/l	9,37	7,66	6,70	8,55	8,57	8,86

Tabulka 2: Ukazatele jakosti syrového mléka v ČR (Ročenka chovu skotu 2019)

Ukazatel	2015	2016	2017	2018	2019
CPM (tis./ml)	47,7	36,9	34,4	28,2	29,1
PSB (tis./ml)	240,0	223,0	230,9	226,0	221,0
RIL (% +)	0,10	0,14	0,06	0,05	0,06
Bod mrznutí $-(m^{\circ}C)$	526,3	526,0	526,8	527,3	525,8
Bilkoviny (%)	3,39	3,44	3,47	3,47	3,50
Kasein (%)	2,64	2,68	2,75	2,77	2,78
Tuk (%)	3,99	4,05	4,03	3,97	3,98
TPS (%)	8,96	8,96	9,00	9,00	9,04
Močovina (mg/100ml)	25,00	25,71	22,90	23,20	23,72
VMK ²⁾ (mmol/100 g tuku)	0,84	0,82	0,89	0,97	0,75
Koliformní bakterie (v ml)	203	182	198	171	169
Termorezist. mikroorg. (tis./ml)	0,20	0,14	0,11	0,15	0,22
Psychotropní mikroorg. (tis./ml)	7,91	8,04	9,93	7,23	7,28
Sporotvorné m. o. (% +)	35,40	55,00	x	54,8	22,9

Počet kusů masného skotu oproti dojnému vzrostl.

Tabulka 3: Základní ukazatele výroby hovězího masa (Ročenka chovu skotu 2019)

Ukazatel	Jednotka	2015	2016	2017	2018	2019 ⁴⁾
Početní stav skotu celkem ¹⁾	tis. ks	1 408	1 416	1 421	1 416	1 417
Z toho – dojně krávy ¹⁾	tis. ks	376	373	370	365	364
– krávy bez TPM ¹⁾	tis. ks	204	211	216	222	226
– krávy celkem ¹⁾	tis. ks	580	584	586	587	590
Produkce jatečného celkem	tis. t ž. hm.	175	173	166	174	168
skotu ²⁾ na krávu	kg ž. hm.	307	304	288	300	291
Spotřeba hovězího celkem	tis. t ž. hm.	124,3	132,0	138,0	142,0	138,9
a telecího masa ³⁾ na osobu	kg/rok	8,2	8,6	8,5	8,8	9,0
Dovoz skotu a hov. masa	tis. t ž. hm.	53,7	67,7	77,0	78,0	84,8
Vývoz skotu a hov. masa	tis. t ž. hm.	105,4	110,4	105,9	109,8	114,3
Soběstačnost v produkci masa	%	141	131	120	123	121

Kontrola mléčné užitkovosti

V chovu dojného skotu je kontrola mléčné užitkovosti jedním z nejdůležitějších parametrů jak pro chovatele, tak i šlechtitele. Díky této kontrole mají data, která ukazují jednak nedostatky z hlediska výživy, hygieny a prevence, tak i informace důležitá pro výpočet plemenné hodnoty. ICAR je mezinárodní výbor pro kontrolu užitkovosti, jímž je Česká republika členským státem, a proto pokyny pro vykonání kontrol užitkovosti vycházejí z platných norem tohoto výboru.

U této kontroly se zjišťuje množství vyprodukovaného mléka jednotlivými dojnicemi a taky jednotlivé složky mléka. Kontrolu provádí oprávněná osoba mající souhlas od ministerstva zemědělství. Zjišťuje se dojivost, obsah tuku, bílkovin, laktózy, močoviny, somatických buněk a další ukazatele kvality mléka

Kontrola užitkovosti masných plemen skotu

Metodika je také dána normou od ICAR.

U masných a kombinovaných plemen se zjišťuje hmotnost telat ve věku 120, 210, 365 dnech. Dále se u jalovic hodnotí exteriér, věk při prvním otelení, průměrné mezidobí, délku březosti a průběh porodu. U býků se taktéž boduje exteriér. Dále se u nich hodnotí procento zabřeznutých krav a jalovic a průběhy porodů. Hodnotí se také užitkovost potomstva.

U hodnocení exteriéru se boduje osvalení, které se posuzuje na plecích, hřbetu a zádi. Dále se hodnotí užitkový typ, kdy se posuzuje celková harmonie těla, ušlechtilost zvířete a pohlavní výraz. Další posuzovanou částí je tělesný rámec, který určuje výška a délka těla, hmotnost. Kapacita těla zahrnuje hodnocení hloubky hrudníku a zádě a přední šířku hrudníku (cmsch.cz, 2018).

2. Bovinní genom

Genom je kompletní genetická informace organismu, uložená v sekvencích nukleových kyselin. Zahrnuje tedy sekvence kódující i nekódující (Urban, 2008).

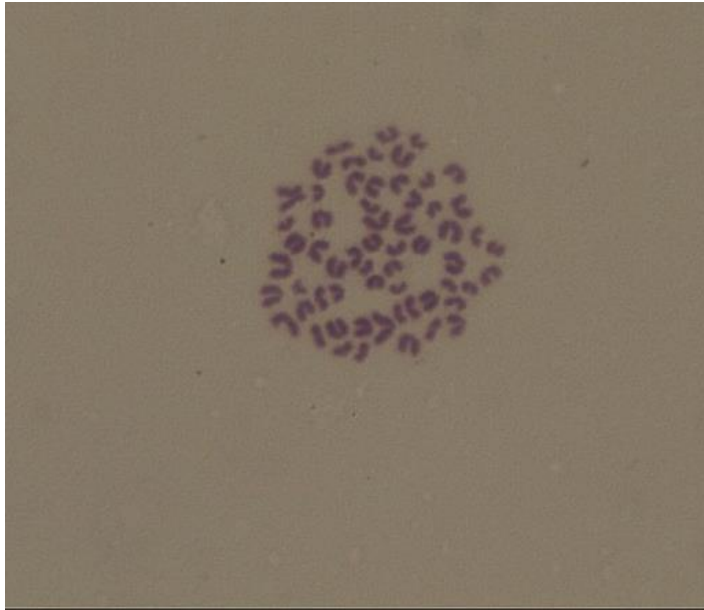
Genetická informace je v genomu zapsána dvěma typy nukleových kyselin, a to ribonukleovou kyselinou (RNA) nebo deoxyribonukleovou kyselinou (DNA). DNA i RNA jsou dlouhé molekuly složené z menších podjednotek-nukleotidů. Každý nukleotid je tvořen 3 složkami-pentózou, dusíkatou bází a fosfátovou skupinou. Jak názvy nukleových kyselin napovídají, pentózou v DNA je vždy deoxyribóza a v RNA je to ribóza. Dusíkaté báze jsou dvojího typu. První skupina je odvozena od pyrimidinu. Je to thymin, cytosin a uracil. Tyto báze jsou šestičlenné. Druhý typ bází je devítičlenný a je odvozen od purinu. Zástupci jsou adenin a guanin. DNA i RNA obsahují adenin, guanin a cytosin a pouze u RNA nalezneme uracil a u DNA zase thymin. Pentóza a dusíkatá báze vytvoří nukleosid a ten se pak spojí s fosfátovou skupinou a vytvoří výsledný nukleotid. Odhaduje se, že boviní genom obsahuje přibližně 22000 genů a 2,8 miliardy nukleotidů (Anson, 2009).

Genom skotu se podařilo přečíst roku 2009. Byl sestaven pomocí podobných metod, které byly použity k sestavení genomu mořského ježka nebo krys (Elsik *et al.*, 2009).

První výzkum genomu proběhl na krávi herefordského plemene a podařilo se u ní přečíst kompletně celé sekvence genomu. Následně byl porovnán s dalšími 6 plemeny. Genetická diverzita skotu je dokonce vyšší než u člověka nebo psa domácího (Anson, 2009).

Samotný genom skotu obsahuje minimálně 22 tisíc genů. Evolučně specifické pro skot je, že chromozomy mají vyšší hustotu segmentovaných duplikací, obohacených o opakující se prvky a mají druhově specifické variace v genech spojených s laktací a imunitou. Geny podílející se na metabolismu zůstaly stejné, avšak 5 metabolických genů chybí nebo jsou úplně jiné než původně lidské.

Velikost boviního genomu je 2 857 605 192 bp, z nichž 2 612 820 649 bp je umístěno ve 30 chromozómech. Zbývajících 245 Mbp je obsaženo v neumístěných souvislých sekvencích (Elsik *et al.*, 2009).



Obrázek 1: Karyotyp skotu (Bártová, 2014)

3. Monogenně podmíněná dědičnost

Tato dědičnost znamená, že mutace je vázána na jeden major gen. Vnější prostředí má buď minimální, nebo vůbec žádný vliv.

Většina těchto poruch se projeví ihned po porodu nebo ovlivňuje časnou mortalitu. Příčinné alely leží buď na některém z autozomů, nebo na chromozomu X. Dle toho se pak jedná o choroby autozomální anebo X-vázané (Zabek a Rys, 1998).

U dědičnosti těchto chorob se jedná buď o dominantní, která se projeví tehdy, pokud jeden chromozom z páru nese mutantní dominantní alelu, anebo se jedná o recesivní dědičnost, ta se projeví pouze pokud oba chromozomy z páru nesou mutantní recesivní alelu.

Monogenní dědičnosti se můžou dělit na autosomálně dominantní (AD), autosomálně recesivní (AR), s neúplnou dominancí, X dominantní (XD) a X recesivní (XR) (Pritchard a Korf, 2003).

Autosomálně dominantní dědičnost: Zde je dominantní alela na autosomu. Nemocní jsou heterozygoti. Jedinec s touto mutací má postiženého jednoho z rodičů. Jedná se o vertikální typ dědičnosti a riziko opakování pro sourozence nebo potomky postiženého je 50 %.

Je zde možná takzvaná neúplná penetrance, což znamená, že znak mutace se nemusí projevit u všech jedinců, nebo se projeví minimálně a je tak těžce zpozorovatelný.

Ke vzniku autozomálně dominantní alely může také dojít mutací u jedince, který má oba zdravé rodiče.

Autosomálně recesivní dědičnost: Zde je na autosomu přítomna recesivní alela nesoucí mutaci. Postižení se objeví u homozygotů. Jedná se o vertikální typ dědičnosti.

X- Dominantní dědičnost: Dominantní alela je vázána na X chromozomu. Tato dědičnost má vzácný výskyt a nikdy se nepřenesou z otce na syna.

X- recesivní dědičnost: Recesivní alela leží na chromozomu X. Pokud je samec nositelem této alely, jeho synové jsou zdraví a dcery přenašečky. Pokud je přenašečkou samice, tak její synové mají 50% možnost výskytu onemocnění a dcery mohou být na 50 % také přenašečky (Zabek a Rys, 1998).

4. Diagnostická metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce byla objevena a popsána roku 1983 Kary Mullisem, který za ní v roce 1993 získal Nobelovu cenu (Clark a Pazdernik, 2012).

Jedná se o nejvíce využívanou molekulárně biologickou diagnostickou metodu. V odebraných vzorcích se cílová DNA vyskytuje v tak nízké koncentraci, že po izolaci určitého úseku jej není možné přímo genotypizovat. Proto je třeba jej mnohonásobně replikovat (Bednář et al., 199).

Tato metoda umožňuje replikovat cílovou nukleovou kyselinu díky komplementaritě bází. Pro úspěšnost této reakce je velmi důležité zvolit vhodný primer, který zajistí úspěšnou replikaci.

Primery jsou krátké oligonukleotidové sekvence DNA obsahující kolem 18-30 bází. Pro tuto reakci musí být použity dva primery. První primer začíná na 5'-konci řetězce genu. V průběhu reakce se elonguje ve směru transkripce. Označuje se jako kódující nebo forward primer. Druhý primer transkripci ukončuje a označuje se jako antikódující nebo reverse primer. Vhodný primer by měl být specifický ideálně zcela komplementární k bázi na kterou chceme, aby dosedal, avšak k dalšímu primeru by komplementární být neměl, aby se nezačaly tvořit jejich dimery. Zároveň by primer neměl být vnitřně komplementární, abychom se vyhnuli tvorbě smyček (Šmarda 2005).

Principem této metody je amplifikace daného úseku DNA in vitro ve 3 krocích. Jedná se o cyklicky se opakující enzymovou syntézu určitého úseku DNA ve směru $5' \rightarrow 3'$ prostřednictvím DNA-polymerázy (Bednář 1997).

DNA polymeráza, dnes nejčastěji používaná, je původně izolována z termofilních bakterií žijících v pramenech majících až 100 °C. Bakterie se nazývá *Thermus aquaticus* z které se pak vytváří polymeráza *Taq*. V dnešní době se tato polymeráza neizoluje z bakterií, ale díky genetickému inženýrství je vytvářena uměle. Tato polymeráza zajišťuje dostatečnou aktivitu enzymu při celém procesu amplifikace. Avšak tento enzym nedokáže opravit chyby při replikaci jelikož má pouze $5' \rightarrow 3'$ polymerázovou aktivitu a postrádá $3' \rightarrow 5'$ exonukleázovou aktivitu (Knoll a Vykoukalová, 2002).

Fáze:

1. Denaturace

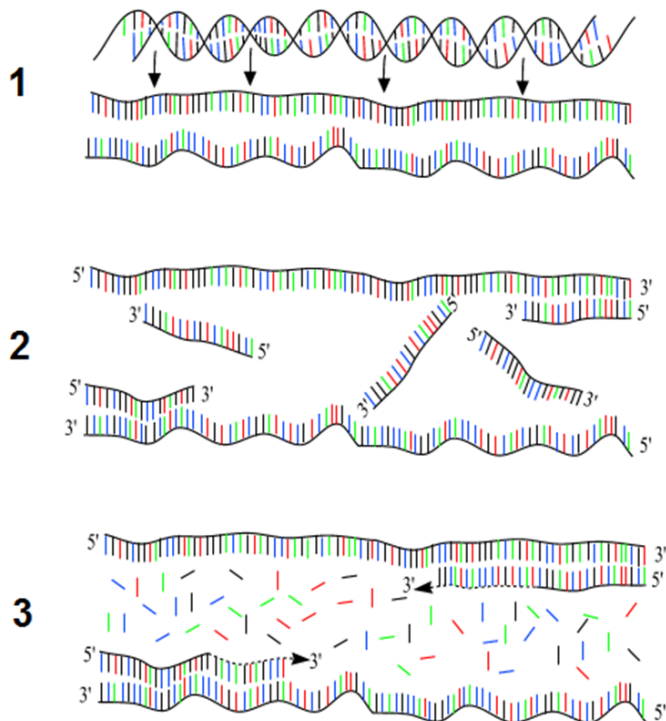
V této fázi dochází k zahřátí roztoku s DNA na teplotu kolem 95 °C po dobu 20-30 sekund. Tato teplota způsobí denaturaci dvojitého řetězce DNA, kdy se rozruší vodíkové můstky a vzniknou tak dvě jednořetězcová vlákna umožňující další fázi, nasedání primerů.

2. Annealing

K annealingu neboli nasedání primerů dochází při teplotě 50–65 °C. Daný úsek je vymezen dvěma vhodně zvolenými primery, určující začátek a konec úseku, který chceme replikovat. Jejich 3'-konce jsou proti sobě, a tak DNA polymeráza ví odkud začít a kterým směrem syntetizovat vlákno.

3. Elongace

Teplota roztoku se opět zvyšuje v závislosti na použité DNA polymeráze. Nejhojněji využívaná tzv *Taq* polymeráza má optimální teplotu kolem 72-80 °C. Oligonukleotidy, které nasedly ve fázi annealingu nyní slouží jako primery pro DNA polymerázu. Od 3'-konce se zde tvoří komplementární nový řetězec.



Obrázek 2: Fáze metody PCR (Bártová, 2011)

Po prvním cyklu se počet řetězců zdvojnásobuje. V následném cyklu již slouží jako templát pro DNA polymerázu i nově vytvořené řetězce z prvního cyklu, a tak dochází k syntéze dvojnásobného množství (Primrose *et al*, 2006).

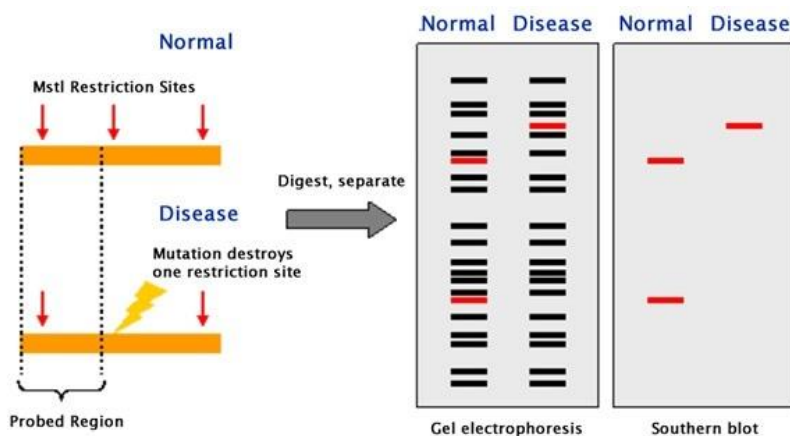
5. Metoda RFLP

Polymorfismus délky restričních fragmentů je spolehlivá diagnostická metoda, k odhalení monogenně podmíněných dědičných chorob u skotu nejvíce používaná. Je založená na principu rozdílu v restričních mapách téhož druhu. Pomocí určité restriční endonukleázy se určitý úsek DNA vyštěpí na restriční fragmenty, který mají určitý počet a délku. Díky tomuto principu rozpoznáme například jednotlivé mutace, které zapříčiňují ztrátu či nově vytvořené rozpoznávací místo pro restriční endonukleázu. Kromě mutací tato metoda také rozpozná přestavby ve specifických oblastech chromozomů, inserci, delecii nebo repetitivní sekvence (Šmarda, 2005).

Restriční endonukleázy chrání genetický materiál před invazí cizích DNA například virů. Každé štěpné místo musí být chráněno vlastní restriční endonukleázou jinak by mohlo dojít k degradaci vlastní DNA.

Restričními fragmenty se nazývají úseky DNA, která vznikají enzymatickým štěpením (Pritchard a Korf, 2007).

Restriční endonukleázy štěpí cizí DNA na určité restriční fragmenty, díky kterým se pomocí gelové elektroforézy zjistí počet a délka fragmentů. (Šmarda, 2005).



Obrázek 3: Schéma RFLP metody (Cherivedath, 2019)

6. Komplex vertebrálních malformací (CVM)

Komplex vertebrálních malformací neboli CVM je významná dědičně přenosná letální porucha u skotu, nejhojněji u skotu holštýnského.

Jedná se o chorobu jednonukleotidového polymorfismu. Je způsobena mutací G>T559 tzv. missense v genu *SLC35A3*, který se skládá z 6 exonů. (Thomsen *et al.*, 2006).

Choroba je lokalizovaná na chromozomu *BTA3* (*Bos Taurus Autosom*) kolem 40-60 Mb (VanRaden *et al.* 2011).

Poprvé byla popsána roku 2000 u holštýnského skotu. K prvnímu prokázání této mutace došlo u amerického plemeníka Penstate Ivanhoe Star, který byl přenašečem mutované alely. Tuto mutaci nejspíše zdědil po otci, jelikož jeho matka byla testovaná na přítomnost mutované alely a výsledek byl negativní. (Čítek *et al.*, 2006). K nejhojnějšímu rozšíření této mutace pak přispěl jeho potomek, syn Carlin-M Ivanhoe Bell, který byl elitním býkem Holštýnského skotu a díky zvýšené užitkovosti jeho dcer bylo jeho semeno využíváno po celém světě (Whitlock *et al.*, 2008).

Klinické příznaky

Jak již z názvu vyplývá, u postižených jedinců jsou pozorovány změny na páteři, konkrétně deformace obratlů jak hrudních, tak i krčních. Často zde dochází k distorzi prvních tří krčních obratlů a fúzi posledních dvou obratlů, což se jeví jako mírná skolióza. Tímto pozorujeme na jedincích zkrácený krk a hrudní končetiny. Bilaterální mírné stažení zápěstních kloubů, zkrácení a mírná laterální rotace nártových spojů. Všechny končetiny mají protáhlý nárt. Pánevní končetiny vykazují bilaterální symetrické kontrakce nártových kloubů s mediální rotací pánevních končetin. Srdeční vady byly popsány přibližně u 50 % postižených telat. Postižená telata se často rodí předčasně, s nižší hmotností a mrtvá.

Chovatelské statistiky prokázaly sníženou plodnost plemenic zapouštěných přenašeči tohoto onemocnění. (Agerholm *et al.*, 2001).

Dědičnost

Dědičnost této nemoci je autozomálně recesivní. Produkt genu *SLC35A3* dává informaci Golgiho komplexu, který udává vývoj axiálního skeletu a vzniku glykoproteinů. Tato nemoc nosí mutaci právě genu *SLC35A3*, který je složen ze 6 exonů a tato mutace se nachází na 4. exonu. Na pozici 559 v podobě transverse guaninu na thymin, kde je ve finálním proteinu BTA3 tohoto genu valin nahrazen fenylalaninem (Whitlock *et al.*, 2008).

Diagnostika

Zjištění mutace se provádí detekcí genetického markeru. Vyšetření se provádí v deoxyribonukleové kyselině (DNA) molekulárně genetickou metodou. Pro zjištění recesivní alely se používá periferní krev nebo sperma z inseminační dávky. Nejčastěji se užívá metoda PCR, která namnoží určitý lokus, který chceme a poté se použije PCR-RFLP k analýze polymorfismu (Čítek, *et al.*, 2005).

K detekci se mohou využít i jiné metody jako například PCR-PIRA (Polymerase Chain Reaction-Primer Introduced Restriction Analysis). Tato metoda je spolehlivá a užívá se k detekci mutace jediného nukleotidu v každém genu bez restrikčního místa v okolí. Primery v této metodě zavedou EcoT22I restrikční místa do CVM recesivních alel a PstI do normálních (Kanae *et al.*, 2005).

Další je možná metoda AS-PCR (Allele-Specific Polymerase Chain Reaction) Dominantní homozygoti se značí TV a heterozygoti neboli přenašeči, CV (Whitlock *et al.*, 2008).

Opatření proti šíření CVM

Jelikož se od roku 2000 zjistilo velké množství jedinců nosících recesivní alelu zapříčiňující tuto chorobu, zavedlo plno států, včetně České republiky, postup na vymýcení CVM z chovu skotu.

Jediná spolehlivá metoda ke zjištění nositelů daného recesivního faktoru je laboratorní molekulárně genetická metoda, která je chráněna patentem. Majitelé býků, podezřelých z nosičství příslušné recesivní alely, museli testovaný vzorek nechat vyšetřit v zahraničních laboratořích mající koupěnou licenci, která je opravňuje vzorky na CVM testovat (Motyčka, 2002).

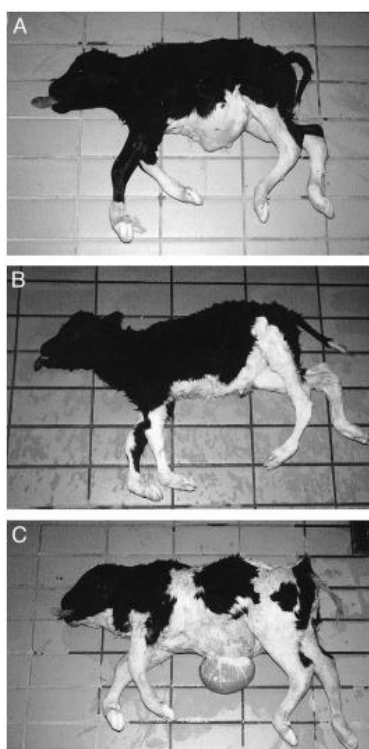
Roku 2005 se podařilo laboratoři imunogenetiky Českomoravské společnosti chovatelů a.s. získat licenci od *Federation AI-Societies and the Danish Institute of Agricultural Sciences* opravňující provádění DNA testů CVM (cmsch.cz).

Plemenní býci holštýnského skotu mající v předcích plemenného býka Penstate Ivanhoe Star nebo jeho syna Carlin-M Ivanhoe Bella jsou podezřelí z nesení recesivní alely způsobující CVM. Pro jejich použití v inseminaci musí být od roku 2002 znám výsledek vyšetření CVM. Po vyšetření na tuto chorobu je za jejich jméno zadáván tzv. status CVM. Označení TV se dává plemenným býkům, kteří nejsou nositeli, a tudíž ani přenašeči dané recesivní alely. Status CV se zadává býkům, kteří jsou přenašeči CVM.

Výsledky vyšetření na CVM sdělili majitelé plemenných býků a dovozci spermatu ihned po obdržení výsledků Svazu chovatelů holštýnského skotu, který je předával útvaru genetiky Státního veterinárního ústavu v Brně zároveň je zadal do evidence plemenné knihy, a zveřejnil seznam vyšetřených býků i s výsledky na jejich webových stránkách. Pokud býk nebyl zaznamenán v plemenné knize, vyšetření na CVM bylo podmínkou pro jeho zápis do plemenné knihy. Zároveň musí majitelé plemenných býků a dovozci spermatu informovat o statusu CVM jednotlivých býků veterinární techniky a chovatele, kteří zakoupili inseminační dávky.

Pokud je status CVM plemenného býka CV, čili je přenašeč, může být použit v inseminaci pouze v případě, že jsou prověřeni kontrolou dědičnosti, již jsou zapsáni v plemenné knize a chovatel si je sám vyžádá a souhlasí s použitím spermatu v jeho stádě. Chovatel musí dbát na to, aby sperma býka se statusem CV nebylo použito na plemenici podezřelou z přenašečství recesivního faktoru CVM nebo již mající shodný status CV.

V přirozené plemenitbě bylo možné využívat býky se statusem CV pouze dočasně. Dále bylo možné použít býky bez známého statusu CVM, i když byli podezřelí, že mají recesivní alelu CVM, avšak chovatelé museli dbát, aby neoplovnili plemenici, která má předky nesoucí recesivní alelu CVM či již má status CV (Motyčka, 2002).



Obrázek 4: Telata s CVM (Jorgen et al., 2001)

7. Syndrom deficiencie adhezní schopnosti leukocytů (BLAD)

Syndrom deficiencie adhezní schopnosti leukocytů je celosvětový problém, hlavně v chovu holštýnského skotu, končící letálně a stejně jako u Komplexu vertebrální malformací se jedná o jednonukleotidový polymorfismus.

Integriny, adhezní molekuly, zprostředkovávají průchod neutrofilů přes membránu a ničí patogeny. Kvůli této mutaci se sníží exprese $\beta 2$ heterodimerického integrinu (Nasreen *et al.*, 2009).

Choroba je lokalizovaná na chromozomu *BTA1* na 55- 73Mb (VanRaden *et al.*, 2011)

První příčina této nemoci byla popsána roku 1992 v chovu holštýnského skotu. Původ nemoci lze dohledat až do roku 1962, kdy žil plemeník Osbordale Ivanhoe, který měl největší genetický dopad s touto mutací na celý holštýnský chov, kvůli využívání jeho semene v umělém oplodnění (Nagahata, 2004).

Klinické příznaky

Mezi nejrozšířenější klinické příznaky patří paradontóza, záněty dásní, vředy v dutině ústní. Dále také chronický průjem a dermatitidy. Zhoršené hojení ran a záněty plic, nechutenství, zakrslý růst. Na tuto chorobu umírají zvířata mladého věku kvůli komplikacím způsobenými infekcemi (Schutz *et al.*, 2008).

Špatná přilnavost leukocytů vede k porušení imunity sliznic a následnému vzniku klinických příznaků uvedených výše.

Leukocyty mají postiženou funkci migrace přes kapilární endotel subendoteliální membrány k vzniklým infekcím a lezím během imunitní odpovědi (Nagahata, 2004).

Dědičnost

Tato nemoc, stejně jako CVM je autozomálně recesivní.

Porucha je způsobena bodovou mutací v genu *ITGB2*, kterou způsobuje aminokyselina na pozici 383 ($\beta 2$ integrinu) nacházející se na finálním proteinu BTA1 mezi pozicemi 131892340 a 131863180. Zaměnění se aminokyselina adenin za guanin na pozici (c383A> G.) (Shuster *et al.*, 1992).

Diagnostika

Genotypy jsou zjišťovány pomocí metody PCR-RFLP. Pro přesnost analýzy se používají enzymy TaqI a HaeIII (Schutz *et al.*, 2008).

Získané fragmenty se analyzují na agarózovém gelu ethidiumbromidem (Čítek *et al.*, 2006).

Dále se taky tato mutace může detekovat metodou BLAD-FRET. Zdraví jedinci se označují TL, přenašeči BL (Schutz *et al.*, 2008).



Obrázek 5: Tele s BLAD (Müller *et al.*, 1994)

8. Bovinní citrulinémie (CIT)

Citrulinémie je vrozená autozomálně dědičná porucha metabolismu moči zapříčiněná nedostatečnou aktivitou enzymu argininosukcinátsyntézy (Dennis *et al.*, 1989).

Lokalizuje se na chromozómu *BTA11* (Grupe *et al.*, 1996).

Argininosukcinátsyntéza je enzym, který se nachází v játrech a díky němu se přeměňuje citrulin, asparát a ATP na argininosukcinát, který je prekurzorem argininu, což je biogenní aminokyselina.

První zmínka o bovinní citrulinémii byla u holštýnského plemene v Austrálii. Popsali ji roku 1986. Když se podíváme zpět, největší podíl na rozšíření této mutace do celého světa se přisuzuje plemeníku z USA holštýnského plemene Linmacku Krissu Kingovi (Healy *et al.* 1991).

Klinické příznaky

Charakteristické pro postižené jedince je vysoká úroveň citrulinu a amoniaku v krvi, plazmě a tkáních. (Dennis *et al.*, 1989)

Telata mající tuto nemoc vypadají po porodu zcela normálně, avšak postupem času zjistíme, že špatně přijímají potravu, jsou skleslá a tím, že nejsou schopna

vylučovat amoniak, dochází k otravě a postupně se zhoršující neurologické symptomy vedou k úmrtí telete, ke kterému dochází cca do 7 dnů od narození. (Grupe *et al.*, 1996).

K neurologickým symptomům řadíme nejistou chůzi, slepotu, křeče, zvracení, malátnost, v boxu stojí s hlavou opřenu o zeď či plot, kolaps a nakonec smrt (Robinson *et al.*, 1993).

U heterozygotních jedinců je aktivita enzymu ASS pouze nižší nikoliv kritická než u normálních zdravých jedinců, a tak nevede tato mutace ke smrti. Avšak u homozygotně recesivních telat není aktivita žádná, což vede k úhynu v průměru do 1 týdne věku telete. (Dennis *et al.*, 1989).

Dědičnost

Dědičnost této mutace je autosomálně recesivní.

Jedná se o bodovou mutaci genu, který kóduje ASS, na chromozomu *BTA11*. V exonu 5 dochází k záměně cytosinu s thyminem, čímž dojde k tomu, že triplet CGA se změní na kodón TGA, což vede k ukončení translace. Ukončení translace v tomto exonu má za následek zkrácený bílkovinný produkt, který má místo původních 412 aminokyselin pouze aminokyselin 85. Tímto enzym přichází o funkci a již nemůže být nadále využíván (Dennis *et al.*, 1989).

9. Nedostatek uridin monofosfát syntázy (DUMPS)

Uridin 5 monofosfát syntáza hraje hlavní roli v syntéze pyrimidinových nukleotidů jež jsou součástí DNA a RNA a je normální složkou v mléku krav a ostatních přežvýkavců. (Meydan *et al.*, 2010)

Lokalizuje se na *BTA1* na 55- 73Mb (VanRaden *et al.*, 2011).

Zastavení této syntézy má za následek deficit pyrimidinů pro syntézu DNA, který zapříčiní megaloblastovou anemii a poruchy dělení buněk. Taktéž se v organismu hromadí orotát a tím dochází ke krystalurii.

V pozdějších letech roku 1987 bylo v Americe popsána tato mutace u holštýnského skotu a poté byl zahájen screening této mutace pomocí biochemického rozboru hladiny uridin monofosfatázy v krvi. Zjistilo se, že nejvíce přenašečů heterozygotů v Evropě a Severní Americe jsou potomci holštýnského býka Happy Herd Beautician (Harlizus *et al.*, 1996).

Klinické příznaky

Pokud organismus nese mutovanou alelu, dochází v něm ke krystalurii, poruše dělení buněk a dochází ke megaloblastové anemii.

Jestliže je plod telete heterozygot neboli přenašeč, má pouze sníženou aktivitu enzymu.

Pokud je však organismus recesivní homozygot, dojde k potratu ještě v raném stádiu březosti. Ve většině případů kráva nesoucí postižený plod touto nemocí vstřebá zárodek ještě před zjištěním březosti. Bylo také zpozorováno, že některé krávy na univerzitě v Illinois měly v mléku až desetkrát vyšší koncentraci kyseliny orotové než je v normálním složení. Tato koncentrace byla přítomna poté již v každé další laktaci (Kaya *et al.*, 2016).

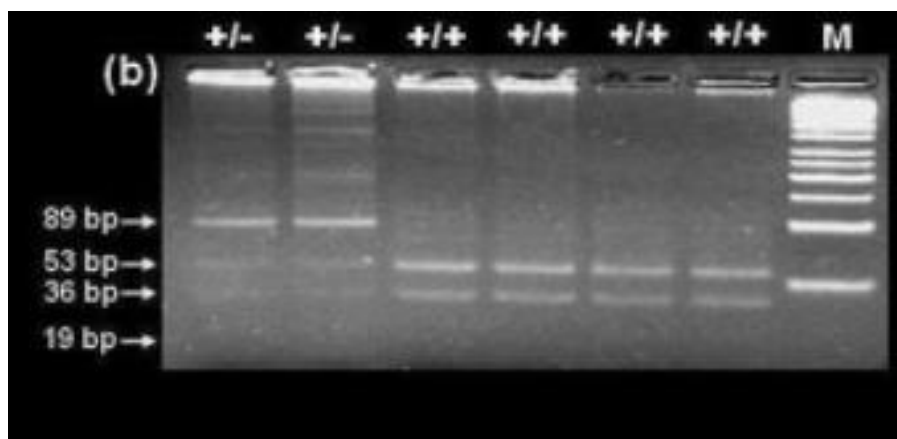
Dědičnost

Jedná se o autosomálně recesivní dědičnost. Jedná se o bodovou mutaci na kodonu 405 v rámci exonu 5 (Viana *et al.*, 1998).

Diagnostika

DUMPS se zjišťuje pomocí metody PCR-RFLP. Přesnou metodu, která funguje ke zjištění alel s mutací máme díky Schwenger *et al.* (1993) a Grzybowski *et al.* (1998).

Produkt PCR je štěpen restriktázou *Ava*I. Fragmenty jsou analyzovány na agarózovém gelu pomocí elektroforézy. Normální homozygoti ukazují bandy 53, 36 a 19 bp, heterozygoti 89, 53, 36 a 19 bp. Písmeny DP se v rodokmenu označuje jedinec přenašeč, geneticky zdraví jedinci se označují pomocí písmen TD (Shanks a Robinson, 1990).



Obrázek 6: Genotyp *Dumps* na agarózovém gelu (Meydan *et al.*, 2010)

10. Glycogen storage disease (GSD II)

Jedná se o poruchu ukládání glykogenu II. typu, jehož příčinou je vážný nedostatek aktivity kyselé glukosidázy GAA. Gen se nachází u skotu v 19. chromozómu a zde je mutantní alela genu kyselé α -glukosidázy GAA.

GAA je enzym, který katabolizuje glykogen na glukózu. U postižených jedinců touto nemocí je aktivita GAA enzymu na 1 % ve fibroblastech, 9 % ve svalech a 3 % v leukocytech. (Reichmann *et al.*, 1993). Onemocnění je typické pro australský skot brahmanský a pro masné shorthornské plemeno. (Jolly *et al.*, 1977) V genu pro GAA se vyskytuje několik mutací.

Klinické příznaky

Tato nemoc se začne projevovat kolem 6. měsíce věku telete. Tele má svalovou slabost, která se postupem času zhoršuje, špatně roste a může mít i nervové symptomy jako například nekoordinovaná chůze. (Richards *et al.*, 1977).

Dědičnost

Tato mutace má autosomálně recesivní dědičnost.

Letální charakter má mutace "E13" (c1783C> T), kde je tranzice v exonu 13. Jedná se o náhradu argininu na pozici 595 stop kodonem.

Mutace „E7“ má taktéž letální charakter. Jedná se o delecii dinukleotidu v exonu 7. (c.1057_1058delTA).

70-80% snížení aktivity enzymu GAA má za následek jednobázová substituce tranzicí v exonu 9 označena jako „E9“ (c1351C> T). Tato mutace nemá letální charakter, a dokonce nevyvolává ani klinické onemocnění.

Další možná mutace je delecce dinukleotidu v exonu 18, dojde ke vzniku stop kodonu v exonu 19 v nukleotidové pozici 2637–2639 a tím k ukončení translace (Dennis a Healy, 2001).

Diagnostika

Diagnostika může být provedena zjištěním snížené aktivity GAA v lymfocytech periferní krve a kosterní svalovině. Dále také koncentrací glykogenu ve svalech, která je výrazně vyšší než u zdravých zvířat. Dále je také biochemicky zjištěna zvýšená aktivita aspartátaminotransferázy a kreatinkinázy a v moči je vyšší hladina oligosacharidů.

Detekce se provádí na 4 % agarózovém gelu s ethidium bromidem. Provádí se metoda PCR-RFLP (Reichmann *et al.*, 1993).

11. Deficit koagulačního faktoru XI

Koagulační faktor XI je jedním z mnoha proteinů podílejících se na srážení krve. Je to glykoprotein vznikající v játrech.

Tento faktor je plazmová serinová proteináza zapojená v aktivaci krevní koagulační kaskády. Během aktivace krevní srážlivosti je tento faktor přeměněn z neaktivní formy na proteolytický enzym XIa. Tento enzym pak iniciuje v koagulační části tvorbu fibrinu z fibrinogenu.

Tento deficit byl poprvé popsán u holštýnského skotu roku 1969 (Kociba *et al.*, 1969).

Klinické příznaky

U této mutace je široká škála příznaků. Může být i bezpříznaková forma.

Obecně se jedná o dlouhodobé krvácení po odrohování, injekci nebo jiných veterinárních zákrocích. Může se objevit krev v mléce a kolostru, které pak bývá narůžovělé. Zvíře je náchylnější k infekčním chorobám jako je například pneumonie, mastitida nebo metritida. Krávy mají nižší reprodukci a může dojít až k anémii či dokonce k vnitřnímu krvácení (Kunieda *et al.*, 2005).

Dědičnost

Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění. Tento deficit může mít dvě možné mutace.

U první možné mutace se jedná o inzerci stop kodonu v exonu 12 na chromozómu 27. Tím se protein změní ve své struktuře, veškerá serinová oblast kódovaná exony 13–15 chybí. Výsledkem je absence činnosti.

Druhým způsobem mutace je Inzerce 15 bp v exonu 9, která způsobuje aminokyselinovou substituci 6 aminokyselinových zbytků (Kunieda *et al.*, 2005).

Diagnostika

Diagnostikuje se pomocí PCR metody

Zdravá zvířata, homozygoti, s normálními FXI alelami mají jeden 244 bp fragment, kdežto postižení homozygoti mají fragment o délce 320 bp. Heterozygoti pak mají oba fragmenty (244 bp a 320 bp) (Marron *et al.*, 2004).

12. Syndaktylie

Syndaktylie neboli mule foot disease je dědičné autozomálně recesivní onemocnění s neúplnou penetrací. Projevuje se srůstem prstů na jedné nebo více končetinách, avšak nejčastěji je na pravé přední noze. U této mutace může také dojít k postižení proximální části končetiny, což vede k redukci počtu sezamských kostí. (Whitlock *et al.*, 2008).

Syndaktylii lze u embrya diagnostikovat již 37.- 40 den březosti. Dochází zde nejčastěji k předčasnému spojení metakarpální a metatarsální III. a IV. Kostí. Mutace se nachází na 15. boviním chromozómu (*BTAL1*). Není letální, avšak velmi omezuje život zvířete. U Syndaktilie je možná příčina několika mutací (Leipold *et al.*, 1973).

Klinické příznaky

Mezi klinické příznaky patří právě srůst prstů, který je viditelný.

Mezi příznaky se také může zařadit náchylnost k hypertermii. Symptomy v pozdějším věku skotu pak připomínají polydaktilický syndrom. (Hart *et al.*, 1987).

Dědičnost

Jedná se o autosomálně recesivní dědičnost alel a jak je již výše zmíněno, syndaktylii může zapříčinit několik mutací.

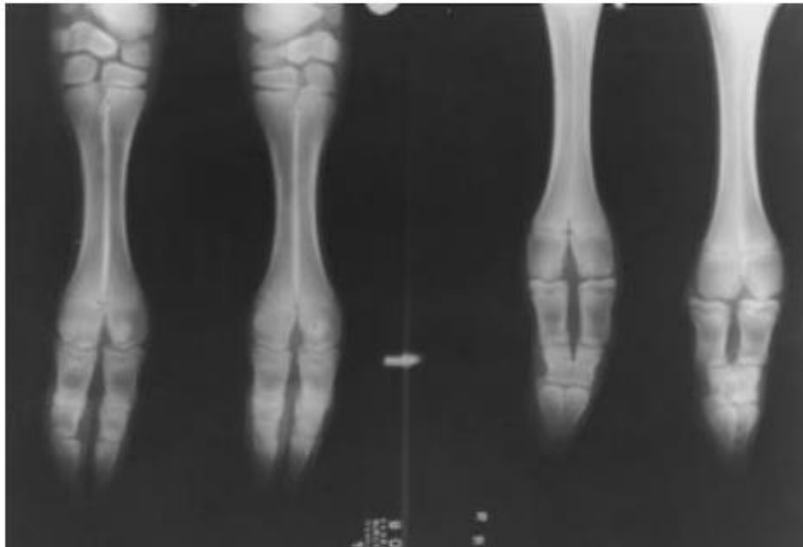
Například některé mutace u boviního genu *LRP4* se u holštýnského skotu a simentálu považují za příčinu syndaktylie.

Příkladem je mutace exonu 33 na pozici 103 (c4940C> T), kdy dojde ke změně aminokyseliny (p.pro1647lys) nebo změna (c5385G> A) na prvním nukleotidu na donorovém místě intronu 37 úplně vyřadí toto stykové místo.

Další je mutace substitucí v exonu 33 (c4863C> A; c.4864G> T) v boviním *LRP4* genu (Duchesne *et al.*, 2006).

Diagnostika

Klinické příznaky, PCR metoda



Obrázek 7: RTG snímek syndaktylie u telete (Leipold et al., 1998)

13. Screening DNA pomocí mikročipů

Dna čipy neboli DNA microarray je technologie sloužící k analýze DNA, která je založena na principu párování komplementárních bází nukleotidů.

Odhluje změny sekvence v DNA i když nedochází ani k inzerci a delecí nebo nestačí počet či délka fragmentů. Zároveň je velkou výhodou to, že lze vyšetřit velké množství sekvenčních variant.

Illumina čipy

Společnost illumina používá čipy ve tvaru mikrokuliček z oxidu křemičitého. Díky nim lze najednou testovat až miliony genotypů u jednoho jedince. Mikrokuličky jsou potaženy několika kopiemi oligonukleotidové sondy zaměřené na konkrétní lokus.

Jak fragmenty DNA procházejí čipem, každá ze sond se váže na komplementární sekvence DNA a zastaví před požadovaným místem. Specifita alel je dána prodloužením jedné báze, která zahrnuje jeden ze čtyř značených nukleotidů. Při excitaci laserem vysílá nukleotidová značka signál. Dle intenzity signálu, který přenáší informace, se pozná alelický poměr v daném místě

Například BovineHD DNA Analysis Kit, je čip s komplexním polem genotypizace skotu. Má více než 777 000 SNP, které pokrývají celý genom skotu. Umožňuje tak výběr v celém genomu, identifikaci lokusů kvantitativních znaků, mapování kříženců, srovnávací genetické studie atd (Illumina, 2021).

14. Výskyt monogenních chorob

V současné době je výskyt výše uvedených chorob minimální téměř po celém světě. Je tomu tak díky zavedeným metodám screeningu a neumožnění páření jedinců postižených nebo přenašečů daných chorob.

V dřívějších dobách, kdy dané choroby nebyly úplně v povědomí a plemenní jedinci na ně nebyli testováni, byl výskyt jedinců s příčinnými alelami poměrně vysoký.

Počátkem 90. let se do České republiky začal hodně dovážet skot z důvodu dovezení plemenného materiálu a tím se zvedlo i procento heterozygotních nositelů a nositelek.

Například u Syndromu deficience adhezní schopnosti leukocytů se v té době u červeně zbarveného holštýnského skotu našlo ze 64 importovaných býků 34 BL pozitivních po jednom otci. V Dánsku v této době bylo až 26,7 % heterozygotů nosičů této mutace. V posledních letech se v České republice neobjevil žádný nový případ. Na BLAD se vyšetřuje minimálně, jelikož většina dovezených býků nebo krav je již testována v zahraničí (Hradil, 1994).

Bovinní citrulinémie se v australské populaci holštýnských býků narozených v letech 1955–2001 vyskytovala s 2,27 % nositeli genu onemocnění. Nyní je nízká, téměř žádná, frekvence výskytu ve všech zemích (Windsor a Agerholm, 2009).

Za nejvýznamnější, s největším šlechtitelským a ekonomickým dopadem pro skot holštýnský, se považuje Komplex vertebrálních malformací. Většina zemí včetně České republiky má vyvinut šlechtitelský program s monitoringem této nemoci, který je detailněji popsán v kapitole zabývající se opatřením proti šíření a vymýcení CVM z chovu skotu.

Například v roce 2006 Čítek *et al.*, (2006) provedl genotypizaci 136 vybraných černostrakatých plemenic českého Holštýna a 28 z nich vyšlo jako heterozygotních přenašeček CVM. Na BLAD, boviní citrulinémii ani na DUMPS nebyla nalezena ani jedna přenašečka.

V roce 2008 bylo analyzováno 279 jedinců holštýnského plemene a 30 simentálského plemene na Deficit koagulačního faktoru XI a ze všech analyzovaných byl nalezen pouze jeden přenašeč recesivní alely na exonu 12 a to holštýnského plemene (Čítek *et al.*, 2008).

V roce 2008 byli taktéž genotypizováni jedinci různých plemen, například Charolais, Český Simentál, Belgické modrobílé atd. na GSD II. Zde nebyl nalezen ani jeden přenašeč alely zapříčiňující tuto chorobu (Čítek *et al.*, 2008).

V roce 2009 bylo nalezeno 64 plemenných otců, po kterých jsou potomci přenašeči nemoci BLAD a 4 otcové, kteří předávají recesivní alelu CVM svým potomkům (Čítek *et al.*, 2009).

Tabulka 4: Frekvence heterozygotů (Čítek *et al.*, 2013)

Choroba	Rok	1993–98	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
	Počet testovaných býků a jalovic								
BLAD	býci	568	14	69*	83*	89	153	161	101
	– z toho heterozygotní	79	0	1	2	2	0	3	1
	jalovice	121	2	*	*	9	9	10	8
	– z toho heterozygotní	13	0	3	0	2	2	2	0
CVM	býci	–	–	–	10*	35	108	72	85
	– z toho heterozygotní	–	–	–	2	7	12	6	7
	jalovice	–	–	–	*	3	13	13	20
	– z toho heterozygotní	–	–	–	0	0	5	5	4

Závěr

Cílem mé práce bylo zpracovat literární rešerši o nejvýznamnějších monogenně podmíněných poruchách zdraví skotu, aby i nadále zůstala v podvědomí, a to hlavně chovatelů a šlechtitelů, kteří sestavují jednotlivé přípařovací plány. Ačkoli se tyto nemoci téměř nevyskytují u nás v České republice a ani jinde na světě, je stále důležité dbát na monitoring daných chorob, aby nedošlo k opětovnému masivnímu rozšíření v chovu, které by mohlo zapříčinit nejen škody ekonomické, z důvodu letálnosti některých chorob, ale i obrovské škody v odvětví chovatelském a hlavně šlechtitelském, kdy by v nejhorším možném případě mohlo dojít k eliminaci jednotlivých elitních linií plemen skotu. Díky monitoringu v České republice nastaveném pro jedince používajících se v plemenitbě se v posledních letech nenacházejí žádní jedinci nesoucí recesivní alelu zapříčiňující nemoci jako DUMPS, bovinní citrulinémii, deficienci koagulačního faktoru XI, syndaktylii a ani BLAD. CVM se podařilo téměř vymýtit, avšak malé procento heterozygotních přenašečů se u nás stále vyskytuje, a tak je velmi důležité, aby se jedinci nesoucí danou recesivní alelu, označení statusem CV nadále nemnožili a podařilo se tak tuto chorobu vymýtit z chovu.

Seznam použité literatury

Agerholm, J., (2001). Complex Vertebral Malformation in Holstein Calves. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians*. **13**(4), 283-289. Dostupné z: doi:10.1177/104063870101300401

Anson, A. Secrets of the Genome: a New Bovine Story. *The cattle site.com* [online]. 2009 [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://www.thecattlesite.com/articles/1963/secrets-of-the-genome-a-new-bovine-story/>

Bednář, M. et al. (1996) *Lékařská mikrobiologie. Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha: Triton. ISBN 8594031505280.

Clark, D. a Pazdernik, N. (2013). *Molecular Biology*. 2nd edition. Academic cell. ISBN 9780124105171.

Cmsch.cz [online]. [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://www.cmsch.cz/>

Čítek, J. a Bláhová, B. (2004). Recessive disorders-a serious health hazard? *Journal of Applied Biomedicine*. (2), 187-194. ISSN 1214-0287. Dostupné z: doi:10.32725/jab.2004.022

Čítek, J. et al., (2006). Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. *Veterinarni Medicina*. **51**(6), 333-339. Dostupné z: doi:10.17221/5553-VETMED

Čítek, J. et al., (2007). Genotyping Glycogen Storage Disease Type II and Type V in Cattle Reared in the Czech Republic. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. **54**, 257-259. Dostupné z: doi:10.1111/j.1439-0442.2007.00931.x.

Čítek, J. et al., (2008). Frequency of BLAD and CVM alleles in sires and elite heifers of Czech Holstein cattle. *Deutsche tierärztliche Wochenschrift*. **115**(12), 475-477.

Čítek, J. et al., (2008). Sporadic incidence of factor XI deficiency in Holstein cattle. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **88**, 2069-2072. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.3315

Čítek, J. et al., (2013). Dědičné poruchy zdraví u býků v České republice. *Veterinářství*. **2013**(1), 41-45.

Dennis, J. a Healy, P.J., (2001). Genotyping Shorthorn cattle for generalised glycogenosis. *Australian Veterinary Journal*. **79**, 773-775.

Dennis, J. et al., (1989). Molecular definition of bovine argininosuccinate synthetase deficiency. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **86**(20), 7947-7951.

- Duchesne, A. et al., (2006). Identification of a doublet missense substitution in the bovine LRP4 gene as a candidate causal mutation for syndactyly in Holstein cattle. *Genomics*. **88**(5), 610-621. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2006.05.007
- Elsik, G. et al. (2009). The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution. *Science*. **2009**(Vol. 324), 522-528. Dostupné z: doi:10.1126/science.1169588
- Grupe, S. et al., (1996). Population survey of citrullinemia on German Holstein. *Livestock Production Science*. **45**, 35–38.
- Grzybowski, G. et al., (1998). Badania przesiewowe na obecność genu wczesnej obumieralności zarodków DUMPS u bydla w Polsce. *Medycyna Weterynaryjna*. **54**, 189–193.
- Haely, PJ. et al., (1991). Bovine citrullinemia traced to the sire of Linmack Kriss King. *Australian Veterinary Journal*. **68**(4), 155. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-0813.1991.tb03165.x
- Harlizius, B. et al., (1996). Isolation of the bovine uridine monophosphate synthase gene to identify the molecular basis of DUMPS in cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. **113**, 303-309.
- Hart, L. et al., (1987). Hereditary bovine syndactyly: diagnosis in bovine fetuses. *Veterinary Pathology*. **24**(2), 140-147. Dostupné z: doi:10.1177/030098588702400207
- Hradil, R., (1994). Application of molecular genetic methods to the BLAD and PSS testing in bovine and pigs in Czech Republic (in Czech). *XXIV International Conference on Animal Genetics*. , 83–84.
- Illumina.com* [online], 2021. [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/bovinehd.html>
- Jolly, R. et al., (1977). Generalized glycogenesis in beef shorthorn cattle--heterozygote detection. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*. **55**(2), 141-150. PMID: 20072.
- Kanae, Y., (2005). A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. **17**, 258-262. Dostupné z: doi:10.1177/104063870501700309
- Kaya, M. et al., (2016). Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, bovine citrullinaemia and factor XI deficiency in Holstein cattle. *Indian Journal of Animal Sciences*. **86**(8), 900-903.
- Knoll, A. a Vykoukalová, Z. (2002). *Molekulární genetika zvířat: Metody detekce polymorfizmů DNA genů*. Brno: MZLU. ISBN 80-7157-616-6.
- Kociba, G. et al., (1969). Bovine plasma thromboplastin antecedent (Factor XI) deficiency. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. **74**(1), 37-41.

- Kunieda, M. et al., (2005). An insertion mutation of the bovine F11 gene is responsible for factor XI deficiency in Japanese black cattle. *Mammalian genome*. **16**, 383–389. Dostupné z: doi:10.1007/s00335-004-2462-5
- Leipold, H. et al., (1973). Syndactyly in cattle. *Veterinary Bulletin*. **43**, 399-403.
- Marron, B. et al., (2004). Identification of a mutation associated with factor XI deficiency in Holstein cattle. *Animal genetics: Immunogenetics, Molecular Genetics and Functional Genetics*. **35**(6), 454-456.
- Meydan, H. et al., (2010). 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 veterinaria Scandinavica*. 52-56. Dostupné z: doi:10.1186/1751-0147-52-56
- Motyčka, J. (2002). Opatření k postupnému omezování a likvidaci dědičné vady Complex Vertebral Malformation (CVM) v populaci holštýnského skotu. *Svaz chovatelů holštýnského skotu ČR* [online]. 2002 [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://holstein.cz/cz/slechtenci#ke-stazeni>
- Nagahata, H., (2004). Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review. *The Journal of Veterinary Medical Science*. **66**(12), 1475-1482. Dostupné z: doi:10.1292/jvms.66.1475
- Nasreen, F et al., (2009). Detection and screening of bovine leukocyte adhesion deficiency in Pakistan using molecular methods. *Hereditas*. **146**, 74-78. Dostupné z: doi:10.1111/j.1601-5223.2009.02093.x
- OMIA 001340-9913 : Complex vertebral malformation in Bos taurus. *Omia.org* [online]. [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://omia.org/OMIA001340/9913/>
- Plemenářská práce: Kontrola užítkovosti. *Cmsch.cz* [online]. [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <https://www.cmsch.cz/plemenarska-prace/ku-kontrola-uzitkovosti/>
- Primrose, S. et al., (2006). *Principles of Gene Manipulation and Genomics*. 7th Edition. Velká Británie: John Wiley and Sons. ISBN 9781405135443.
- Pritchard, D. a Korf, B. (2003). *Základy lékařské genetiky*. 1. vydání. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-449-2.
- Reichmann, K. et al., (1993). Clinical, diagnostic and biochemical features of generalised glycogenosis type II in Brahman cattle. *Australian Veterinary Journal*. **70**(11), 405-408. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-0813.1993.tb06073.x.
- Richards, R. et al., (1977). Bovine generalized glycogenosis. *Neuropathology and Applied Neurobiology*. **3**(1), 45–56.
- Robinson, J. et al.,(1993). Low incidence of citrullinemia carriers among dairy cattle of the United States. *Journal of Dairy Science*. **76**(3), 853-858.

- Shanks, R. a Robinson, J., (1990). Deficiency of uridine monophosphate synthase among Holstein cattle. *Cornell Veterinarian*. **80**, 119–122.
- Shuster, D., (1992). Identification and prevalence of a genetic defect that cause leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *The Proceeding of the National Academy of Sciences*. **89**(19), 9225–9229. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.89.19.9225
- Schütz, E. et al., (2008). Implication of Complex Vertebral Malformation and Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency DNA-Based Testing on Disease Frequency in the Holstein Population. *Journal of Dairy Science*. **91**(2), 4854–4859.
- Schwenger, B. et al., (1993). DUMPS cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. *Genomics*. **16**(1), 241–244.
- Šmarda, J. et al. (2005). *Metody molekulární biologie*. 1. vydání Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-3841-1.
- Thomsen, B. et al., (2006). A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome research*. **16**(1), 97-105. Dostupné z: doi:10.1101/gr.3690506
- Urban, J. *Virtuální svět genetiky 3: genetiky populací a kvantitativních znaků* [online]. [cit. 2021-4-5]. Dostupné z: <http://user.mendelu.cz/urban/vsg3/qtl/qtl5.html>
- VanRaden, P. (2011). Harmful recessive effects on fertility detected by absence of homozygous haplotypes. *Journal of Dairy Science*. **94**(12), 6153-6161. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.3168/jds.2011-4624
- Viana, J. et al., (1998). Diagnóstico y kontrol de las principales enfermedades genéticas (citrulinemia, DUMPS y BLAD) descritas en ganado Holstein-Frisón. *Medicine Veterinary*. **15**, 538–544.
- Whitlock, B., (2008). Heritable bovine fetal abnormalities. *Theriogenology*. **70**(3), 535-549.
- Zabek, T. a Rys, A. (1998). Gene defect in farm animals. *Biul. Inform. Inst. Zootech.* **36**: 5-13.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Karyotyp skotu (Bártová, 2014)	14
Obrázek 2: Fáze metody PCR (Bártová, 2011)	17
Obrázek 3: Schéma RFLP metody (Cherivedath, 2019)	18
Obrázek 4: Telata s CVM (Jorgen et al., 2001)	21
Obrázek 5: Tele s BLAD (Müller et al., 1994).....	23
Obrázek 6: Genotyp Dumps na agarózovém gelu (Meydan et al., 2010).....	25
Obrázek 7: RTG snímek syndaktylie u telete (Leipold et al., 1998).....	29

Seznam tabulek

Tabulka 1: Ukazatele průměrné výroby mléka (Ročenka chovu skotu 2019) ...	11
Tabulka 2: Ukazatele jakosti syrového mléka v ČR (Ročenka chovu skotu 2019)	11
Tabulka 3: Základní ukazatele výroby hovězího masa (Ročenka chovu skotu 2019)	12
Tabulka 4: Frekvence heterozygotů (Čítek et al., 2013).....	31