



GENETICKÝ POLYMORFIZMUS A DALŠÍ VLIVY PŮSOBÍCÍ NA PRODUKCI, SLOŽENÍ A TECHNOLOGICKOU JAKOST MLÉKA DOJNIC ČESKÉHO STRAKATÉHO A HOLŠTÝNSKÉHO SKOTU

Jindřich Čítek¹, Michaela Brzáková¹, Lenka Hanusová¹,
Oto Hanuš², Miloslava Kavková², Libor Večerek¹,
Eva Samková¹, Karolína Straková¹, Lucie Hasoňová¹

¹ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 1668, 370 05 České Budějovice

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

Polymorphisms and other factors influencing production, composition and technological properties of Czech Simmental and Holstein cows

Abstrakt

Práce měla za cíl kvantifikovat efekt polymorfizmů v genech *DGATI*, *LEP*, *FASN*, *SCD1*, *CSN2*, *CSN3* a *LGB* na výši mléčné produkce, složení mléka a ukazatele technologické jakosti u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu. Genotyp *DGATI AA* byl spojen se statisticky významně vyšší produkcí mléka, tuku a bílkovin v kg, genotyp *LEP MM* s nižším obsahem a alela *W* s vyšším obsahem bílkovin. Dojnice s genotypem *FASN GG* měly vyšší obsah bílkovin (%), avšak alela *A* byla spojena s vyšší produkcí mléka, bílkovin i tuku v kg než alela *G*. Genotyp *SCD1 TT* byl spojen s nejnižší produkcí mléka, bílkovin a tuku v kg a s nejvyšším obsahem bílkovin. Alela *T* měla vyšší hodnoty ve srovnání s alelou *C* pro všechny ukazatele kromě obsahu tuku. Genotyp *CSN3 AA* byl asociován se zvýšenou dojivostí, *BB* s vyšším obsahem bílkovin. Alely neměly významný vliv na technologické vlastnosti mléka. Mléko dojnic s geno-

typem *CSN2 BB* mělo nejlepší alkoholový test a nejhorší syřitelnost. Genotyp *CSN2 A'A'* ovlivnil pozitivně jogurtový test. Gen *CSN3* ovlivňoval technologickou jakost významně. Při analýze dalších vlivů byl zjištěn klíčový efekt farmy na ukazatele produkce i technologickou jakost kravského mléka.

Klíčová slova: mléčná užitkovost, jogurtový test, syřitelnost, alkoholový test

Abstract

The aim was to evaluate the influence of polymorphic loci and other factors on milk performance and the technological properties of milk of Czech Simmental and Holstein cows. Polymorphisms in the *DGATI*, *LEP*, *FASN*, *SCD1*, *CSN2*, *CSN3* and *LGB* genes were genotyped, and association analysis was performed. For the *DGATI* gene, the *AA* genotype was associated with higher milk, protein and fat yields. In the *LEP* gene, the *MM* genotype was found to have a lower protein percentage and the *W* allele a higher protein percentage. In cows with the *FASN GG* genotype, the protein percentage was higher, the *A* allele was associated with higher milk, protein and fat yields. In *SCD1* gene, the *TT* genotype had the lowest milk, protein and fat yields and the highest milk protein percentage, but *T* allele had higher values than the *C* allele except for fat percentage. In casein kappa (*CSN3*), the *AA* genotype was associated with a high milk yield, and *BB* genotype with a high protein content. The alleles did not affect significantly the technological quality. The *CSN2 BB* genotype had the best alcohol test, and the worst renneting. The *CSN2 A'A'* genotype had the best milk fermentation ability. *CSN3* genotypes affected the technological quality significantly. Evaluating the other effects, the essential importance of farms on milk yield, composition and technological quality was found.

Keywords: milk performance, milk fermentation ability, renneting, ethanol test

Úvod

Pro ekonomiku zemědělského podniku je důležitý objem produkce mléka a jeho složení. Zpracovatele nej-

více zajímá složení a technologická jakost, které určují možnosti zpracování mléka a jeho lepšího zpeněžení. Jsou analyzovány různé vlivy, působící na technologickou jakost. Cecchinato et al. (2015) uvádí pro koagulaci mléka a pevnost syřeniny heritabilitu až 0,278, přitom část dědivosti byla způsobena polymorfizmy v genech velkého účinku (major geny). Autoři rovněž potvrdili vliv *CSN2* (kasein beta) na technologickou kvalitu. Zajímavá a rozsáhlá studie genů *CSN2*, *CSN3* (kasein kappa) a *LGB* (laktoglobulin beta) byla uskutečněna u českého strakatého plemene (Kyselová et al., 2019), která potvrdila, že mléko dojníc na první laktaci vykazuje změny a nerovnováhy ve fyzikálně-chemických ukazatelích. Vliv složených genotypů většinou odrážel vliv jednotlivých genů při samostatném hodnocení. Genetické polymorfizmy ovlivňovaly jogurtový test (titrační kyselost), alkoholovou stabilitu, obsah fosforu a vápníku, pH jogurtu a počet laktobacilů. Zjištění podporují dříve nalezené nepřímé efekty polymorfizmů mléčných proteinů na technologickou jakost mléka. Autoři navrhuje provedení detailní analýzy polymorfizmů a interakce genů v rozsáhlejší souboru jednak k ověření jejich výsledků, jednak k nalezení případných rozdílů mezi plemeny.

V posledních letech je důkladně studován polymorfismus *DGATI* (diacylglycerol O-acyltransferáza), jehož lysinová varianta pozitivně ovlivňuje plemenné hodnoty pro obsah tuku v mléce (Winter et al., 2002). Další autoři zjistili rovněž vliv na produkci tuku, proteinu a mléka, např. Spelman et al. (2002). Kromě toho byly analyzovány také efekty polymorfizmů *SCDI* (stearoyl-CoA desaturáza 1), *LEP* (leptin), *FASN* (syntáza mastných kyselin) a dalších genů (Safina et al., 2018; Sanchez et al., 2019; Mauric et al., 2019).

Cílem této práce byla asociační analýza polymorfismu vybraných lokusů k ukazatelům mléčné užitkovosti a technologické jakosti mléka dojníc českého strakatého a holštýnského plemene. Byly vybrány geny mléčných proteinů *CSN2*, *CSN3* a *LGB*. Dále byly analyzovány polymorfizmy v genech *DGATI*, *LEP*, *FASN* a *SCDI*. Posledně jmenované geny byly dosud studovány ve vztahu k mléčné užitkovosti, avšak jejich efekt na technologické vlastnosti rozsáhleji analyzován nebyl. Rovněž byly vyhodnoceny další možné vlivy na produkci, složení a technologickou jakost mléka.

Materiál a metody

Studie byla provedena v pěti chovech s volným ustájením. Krmná dávka se celoročně skládala z konzervovaných krmiv, kukuřičné siláže, travní siláže, sena a jadrných krmiv. Konkrétní krmná dávka se mezi podniky lišila v poměru složek a v kvalitě. V pokusu bylo zařazeno 390 dojníc českého strakatého plemene a kříženek, 358 dojníc holštýnského plemene a kříženek. Dojnic na první laktaci bylo 748, z nichž 660 ukončilo rovněž druhou laktaci, telení probíhalo v letech 2015-17. Průměrná dojivost byla 8358 kg mléka, tučnost 4,12 %,

obsah bílkovin 3,47 %, produkce tuku 343,0 kg, produkce bílkovin 287,2 kg za laktaci. Technologická jakost mléka, tj. titrační kyselost (jogurtový test), syřitelnost měřená subjektivně a nefelometricky a alkoholový test, byla zjišťována u 242 dojníc, z toho u 81 jedenkrát, u 86 dvakrát, u 53 třikrát, u 16 čtyřikrát a u 6 dojníc pětkrát. Vzorky byly odebrány v průběhu celého roku během první a druhé laktace.

DNA byla izolována roboticky z mléka. Genotypizace byla provedena technikou PCR/RFLP. V genu *DGATI* byly genotypizovány alely *A* (alanine) a *K* (lysine) postupem dle Kuhn et al. (2004), v genu *LEP* alely *M* a *W* podle Buchanan et al. (2002), v genu *FASN* alely *A* a *G* podle Roy et al. (2006), v genu *CSN2* alely *A* a *B* podle Medrano, Sharrow (1991) a alely *A¹* a *A²* podle Miluchová et al. (2013), v genu *CSN3* alely *A*, *B*, *C* a *E* podle Barroso et al. (1998), v genu *LGB* alely *A* a *B* podle Strzalkowska et al. (2002), v genu *SCDI* alely *C* a *T* podle Inostroza et al. (2013).

Údaje o mléčné užitkovosti byly převzaty z chovatelských databází. Obsah tuku a bílkovin byl zjišťován v laboratořích kontroly užitkovosti (Českomoravská společnost chovatelů a.s.) metodou infračervené spektroskopie. Laboratoře jsou akreditovány podle standardu ISO (ČSN EN ISO/IEC 17025) a pracují v systému ICAR (International Committee for Animal Recording). Alkoholový test (etanolový test, teplotní stabilita) byl proveden titrací 5 ml mléka 96% etanolem do vytvoření prvních vloček a je uveden jako spotřeba alkoholu v ml. Jogurtový test (titrační kyselost, fermentační schopnost) byl proveden podle standardů českého mléčného průmyslu (ON 57 0534). 50 ml syrového mléka bylo zahřáto na 85°C po dobu 5 min. a ochlazeno na 43±2 °C, vzorek byl poté inokulován 2 ml mléčné kultury YC-180-40-FLEX (Chr. Hansen, Denmark; *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrückeii* subsp. *lactis*, and *L. d.* subsp. *bulgaricus*). Následovala inkubace při 43 °C po dobu 3,5 hod. Výsledek je udáván jako titrační kyselost jogurtu v ml 0.25 mol×l⁻¹ NaOH×100 ml⁻¹, tj. stupně Soxhlet-Henkel. Syřitelnost byla stanovena klasickým postupem přidáním syřidla (1% obj.) do mléka zahřátého na 35 °C, udávána jako čas ve vteřinách do tvorby prvních vloček laktoproteinu. Dále byla zjišťována syřitelnost nefelometricky, udávaná jako čas koagulace mléka na přístroji ML-2 analyzer. Hodnotí se intenzita rozptýleného Tyndalova světla na laktoproteinových vločkách.

Statistické analýzy byly provedeny s použitím SAS (SAS 9.3, SAS Institute, Cary, NC, USA). Pro údaje o mléčné užitkovosti byla každá laktace samostatným vstupem, pokud dojnice ukončila dvě laktace, byla vložena dvakrát. Podobně pro technologickou jakost, pokud byl vzorek od dojnice odebrán opakovaně, bylo každé měření vloženo samostatně. Ke statistickému vyhodnocení vlivu polymorfizmů a srovnání genotypů byly použity smíšené lineární modely s opakovanými měřeními a metoda LSM (metoda nejmenších čtverců). Byly vyvinuty následující modely.

Pro ukazatele mléčné užitkovosti průměrný obsah tuku a bílkovin (%) za laktaci, produkce mléka, tuku a bílkovin (kg) za laktaci:

$$Y_{ijk} = \mu + \text{gen}_i + \text{lak}_j + \text{jedinec}_k + e_{ijk}$$

kde Y_{ijk} = ukazatel mléčné užitkovosti; μ = populační průměr; gen_i = pevný efekt příslušného genotypu ($i=1, 2, 3$); lak_j = pevný efekt pořadí laktace ($j=1, 2$); jedinec_k = náhodný efekt jedince; e_{ijk} = náhodný reziduální efekt.

Pro jogurtový test:

$$\text{Jogurt}_{ijklmn} = \mu + \text{gen}_i + \text{farma}_j + \text{bílkoviny}_k + \text{kasein}_l + \text{stadlak}_m + \text{jedinec}_n + e_{ijklmn}$$

kde jogurt_{ijklmn} = hodnota jogurtového testu; μ = populační průměr; gen_i = pevný efekt příslušného genotypu ($i=1, 2, 3$); farma_j = pevný efekt farmy ($j=1, 2, 3, 4, 5$); bílkoviny_k = pevný efekt obsahu bílkovin (%); kasein_l = pevný efekt obsahu kaseinu (%); stadlak_m = pevný efekt dne laktace; jedinec_n = náhodný efekt jedince; e_{ijklmn} = náhodný reziduální efekt.

Pro syřitelnost:

$$\text{Syřitelnost}_{ijklmn} = \mu + \text{gen}_i + \text{farma}_j + \text{bílkoviny}_k + \text{TPS}_l + \text{sezóna}_m + \text{jedinec}_n + e_{ijklmn}$$

kde $\text{syřitelnost}_{ijklmn}$ = syřitelnost měřená subjektivně nebo nefelometricky; μ = populační průměr; gen_i = pevný efekt příslušného genotypu ($i=1, 2, 3$); farma_j = pevný efekt farmy ($j=1, 2, 3, 4, 5$); bílkoviny_k = pevný efekt obsahu bílkovin (%); TPS_l = pevný efekt obsahu tukoprosté sušiny (%); sezóna_m = pevný efekt sezóny ($m=1$ (prosinec, leden, únor), 2 (březen, duben, květen), 3 (červen, červenec, srpen), 4 (září, říjen, listopad)); jedinec_n = náhodný efekt jedince; e_{ijklmn} = náhodný reziduální efekt.

Pro alkoholový test:

$$\text{Alkohol}_{ijk} = \mu + \text{gen}_i + \text{farma}_j + \text{jedinec}_k + e_{ijk}$$

kde alkohol_{ijk} = alkoholová stabilita; μ = populační průměr; gen_i = pevný efekt příslušného genotypu ($i=1, 2, 3$); farma_j = pevný efekt farmy ($j=1, 2, 3, 4, 5$); jedinec_k = náhodný efekt jedince; e_{ijk} = náhodný reziduální efekt.

Efekt alel na mléčnou užitkovost a technologickou jakost mléka byl hodnocen modelem:

$$Y_{ij} = \mu + \text{alela}_i + \text{jedinec}_j + e_{ij}$$

kde Y_{ij} = hodnocený znak; μ = populační průměr; alela_i = pevný efekt příslušné alely ($i=1,2$); jedinec_j = náhodný efekt jedince; e_{ij} = náhodný reziduální efekt.

Pro porovnání jednotlivých skupin byl použit Tukey-Kramer test.

Výsledky a diskuze

Ukazatele mléčné užitkovosti dojníc

Dojnice s genotypem AA v genu *DGAT1* měly statisticky významně vyšší produkci mléka, tuku a bílkovin v kg než dojnice s genotypem KA a rovněž alela A, avšak bez statistické významnosti (Tab. 1, 2). To je v souladu s našimi předchozími výsledky (Čítek et al., 2007; 2018) i výsledky jiných autorů, např. Kuhn et al. (2004). Selektční tlak vede k postupnému zvyšování frekvence alely A v populaci dojeného skotu, takže v naší skupině dojníc nebyl nalezen ani jeden homozygot KK.

V genu *LEP* byl u dojníc s homozygotním genotypem MM zjištěn nižší obsah bílkovin, alela W tedy ovlivnila obsah pozitivně. Polymorfismus genu *FASN* ovlivnil mléčnou užitkovost tak, že dojnice GG měly v mléce významně vyšší obsah bílkovin, i když rozdíl nebyl velký. Alela A pozitivně ovlivnila dojivost, což se odrazilo ve vyšší produkci bílkovin a tuku v kg. Je zajímavé, že frekvence alely G byla podstatně vyšší, než alely A (0,860 vs. 0,140), což nekoresponduje s rozdíly v užitkovosti. V genu *SCD1* měl genotyp TT významnou asociaci s nízkou dojivostí, produkcí bílkovin a tuku v kg a s vysokým obsahem bílkovin. Alela T naopak vykazovala významný pozitivní vztah ke všem ukazatelům s výjimkou obsahu tuku. Rozdíly mezi genotypy naznačují intermediární dědičnost.

Rozdíly v užitkovosti mezi genotypy *CSN2* nebyly statisticky významné, alela B měla významně vyšší dojivost a v důsledku toho také produkci bílkovin. Rovněž efekt genotypů $A^1 - A^2$ nebyl významný. Alela A^2 měla statisticky významně vyšší produkci mléka, tuku a bílkovin.

U genu *CSN3* byl genotyp AA významně asociován s vysokou dojivostí, genotyp BB s obsahem bílkovin. Rovněž dojnice s genotypem EE, 21 dojníc s celkem 40 laktacemi, měly vyšší obsah bílkovin než dojnice s genotypem AA, u kterých byl obsah statisticky významně nejnižší. I když při vyhodnocení vlivu alel bylo zjištěno pořadí E B A, neměl genotyp BB vyšší produkci bílkovin v kg v důsledku rozdílu v dojivosti. Alela B a genotyp BB měly vyšší obsah tuku než A, resp. AA, ale rozdíly v produkci tuku opět nebyly významné. Tyto výsledky se shodují se zjištěním jiných autorů, v České republice např. Bartoňová et al. (2012), Kučerová et al. (2006). Preference alely B, resp. genotypu BB ve šlechtění dojených plemen skotu je tedy zcela na místě.

Genotyp AB v laktoglobulinovém genu byl asociován s vyšší produkcí mléka, bílkovin a tuku, pořadí genotypů naznačuje možný vliv heterozního efektu.

Byly testovány další možné vlivy na mléčnou užitkovost, a to farma, plemeno a pořadí laktace. Produkce mléka a tuku v kg a obsah bílkovin byly ovlivněny všemi uvedenými faktory, obsah tuku efektem farmy (výživa) a obsah bílkovin farmou a pořadím laktace.

Ukazatele technologické jakosti mléka

Nejdůležitějším cílem analýzy byla kvantifikace efektů ovlivňujících technologickou jakost mléka. Ta je

Tab. 1 Dojvost a složení mléka za laktaci u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu a jejich kříženců v závislosti na genotypu

Gen	Genotyp	n	Mléko (kg)		Bílkoviny (%)		Bílkoviny (kg)		Tuk (%)		Tuk (kg)	
			LSM±SE	p	LSM±SE	p	LSM±SE	p	LSM±SE	p	LSM±SE	p
DGAT1	AA	1344	8376±84 ^a	0,045*	3,46±0,01	0,548	287,9 ^a ±2,6	0,027*	4,12±0,01	0,141	344,0 ^a ±3,4	0,019*
	KA	60	7555±401 ^b		3,49±0,04		260,1 ^b ±12,3		4,04±0,06		304,8 ^b ±16,3	
LEP	MM	925	8412±101	0,156	3,45 ^a ±0,01	0,038*	287,7±3,1	0,281	4,11±0,01	0,909	344,7±4,1	0,235
	MW	229	8138±203		3,50 ^b ±0,02		282,7±6,3		4,13±0,03		335,1±8,3	
	WW	45	7667±450		3,51±0,04		266,4±13,9		4,11±0,06		317,5±18,4	
FASN	AG	378	8527±158	0,180	3,43 ^a ±0,02	0,017*	290,5±4,9	0,371	4,13±0,02	0,562	349,8±6,4	0,177
	GG	1018	8277±97		3,48 ^b ±0,01		285,4±3,0		4,11±0,01		339,6±3,9	
SCD1	CC	398	8549 ^A ±154	0,001**	3,43 ^{Aa} ±0,01	<0,001**	290,5 ^A ±4,7	0,005**	4,10±0,02	0,606	348,4 ^A ±6,2	0,001**
	TC	811	8426 ^A ±107		3,47 ^{Ab} ±0,01		290,0 ^A ±3,3		4,12±0,02		346,9 ^A ±4,3	
	TT	187	7608 ^B ±222		3,53 ^B ±0,02		266,4 ^B ±6,8		4,12±0,03		312,1 ^B ±9,0	
CSN2	AA	32	8143±535	0,541	3,41±0,05	0,133	276,6±16,4	0,254	4,23±0,08	0,201	344,0±21,8	0,442
	AB	220	8562±210		3,50±0,02		296,6±6,4		4,14±0,03		353,2±8,5	
	BB	1105	8326±93		3,46±0,01		286,0±2,8		4,11±0,01		341,2±3,8	
CSN2	A1A1	143	7883±254	0,163	3,48±0,02	0,539	273,0±7,8	0,190	4,15±0,04	0,491	327,7±10,3	0,253
	A1A2	501	8416±137		3,46±0,01		288,7±4,2		4,11±0,02		345,0±5,6	
	A2A2	675	8217±120		3,48±0,01		283,0±3,7		4,10±0,02		335,7±4,9	
CSN3	AA	646	8497 ^a ±96	0,112	3,43 ^{A,3} ±0,01	<0,001**	288,1±3,7	0,364	4,09 ^a ±0,02	0,133	345,4±4,9	0,377
	AB	586	8267±101		3,50 ^{B,4} ±0,01		287,0±3,9		4,13±0,02		341,1±5,2	
	BB	70	8355±291		3,54 ^B ±0,03		292,3±11,5		4,20 ^b ±0,05		349,8±15,2	
	BC	4	8140±1217		3,51±0,11		285,5±48,5		4,33±0,22		352,3±64,2	
	EE	3	5627 ^b ±1406		3,79 ^{B,4} ±0,13		199,2±50,8		4,24±0,23		221,8±67,1	
	AE	32	7594 ^b ±430		3,47 ^d ±0,04		258,0±16,2		4,20±0,06		311,8±21,4	
	BE	40	8139±385		3,51 ^{3,4} ±0,04		282,4±15,1		4,06±0,07		328,8±20,0	
LGB	AA	30	6991 ^A ±546	<0,001**	3,52±0,05	0,611	245,9 ^A ±16,8	<0,001**	3,97±0,08	0,161	281,2 ^A ±22,2	<0,001**
	AB	1222	8471 ^B ±88		3,47±0,01		291,1 ^B ±2,7		4,12±0,01		347,9 ^B ±3,6	
	BB	103	7515 ^A ±299		3,47±0,03		258,9 ^A ±9,2		4,11±0,04		309,1 ^A ±12,2	

n počet laktací dojnic s příslušným genotypem; LSM nejmenší průměrný čtverec; SE standardní chyba; *významné na hladině $p < 0,05$; **významné na hladině $p < 0,01$; ^{a,b} různá písmena mezi genotypy v témže sloupci značí rozdíly významné na hladině $p < 0,05$; ^{A,B} různá písmena mezi genotypy v témže sloupci značí rozdíly významné na hladině $p < 0,01$; ³ rozdíly mezi genotypy CSN3 AA a BE v obsahu bílkovin jsou významné na hladině $p < 0,05$; ⁴ rozdíly mezi genotypy CSN3 EE vs. AB, AE, BE v obsahu bílkovin jsou významné na hladině $p < 0,05$.

Tab. 2 Významnost rozdílů v mléčné užitkovosti a technologické jakosti mléka mezi alelami

Gen	Mléko (kg)	Bílkoviny (%)	Bílkoviny (kg)	Tuk (%)	Tuk (kg)	Jogurtový test (ml NaOH)	Syřitelnost subjektivně, (vteřiny)	Syřitelnost nefelometricky (vteřiny)	Alkoholový test (ml alkoholu)
DGAT1	0,861	0,255	0,753	0,308	0,628	0,064	0,528	0,354	0,659
LEP	0,999	0,023*W>M	0,701	0,835	0,904	0,446	0,823	0,642	0,077
FASN	0,008**A>G	0,896	0,009**A>G	0,610	0,007**A>G	0,142	0,906	0,555	0,536
SCD1	0,024*T>C	0,014*T>C	0,014*T>C	0,774	0,028*T>C	0,266	0,078	0,173	0,461
CSN2 (A, B)	0,031*B>A	0,390	0,042*B>A	0,319	0,055	0,002**B>A	0,083	0,086	0,242
CSN2 (A ¹ , A ²)	0,002**A ² >A ¹	0,367	0,002**A ² >A ¹	0,324	0,006**A ² >A ¹	0,663	0,909	0,411	0,344
CSN3	A:B	0,187	<0,001**B>A	0,899	0,039*B>A	0,740	0,512	0,217	0,901
	A:E	0,046*A>E	0,314	0,055	0,111	0,099	0,240	0,914	0,526
	B:C	0,943	0,846	0,929	0,630	0,961	0,948	0,733	0,476
	B:E	0,068	0,010* E>B	0,074	0,815	0,062	0,091	0,980	0,322
LGB	<0,001**B>A	0,063	<0,001**B>A	0,736	<0,001**B>A	0,562	0,067	0,148	0,220

*významné na hladině $p < 0,05$; **významné na hladině $p < 0,01$.

Tab. 3 Technologická jakost mléka u dojnic českého strakatého a holštýnského skotu a jejich kříženců v závislosti na genotypu polymorfních lokusů

gen	geno- typ	Jogurtový test (ml NaOH)			Syřitelnost subjektivně (vteřiny)			Syřitelnost nefelometricky (vteřiny)			Alkoholový test (ml alkoholu)		
		n	LSM±SE	p	n	LSM±SE	p	n	LSM±SE	p	n	LSM±SE	p
DGAT1	AA	435	14,93 ^A ±0,25	<0,001**	470	523,16±16,70	0,781	438	318,13±9,48	0,538	445	0,913±0,053	0,518
	KA	25	18,24 ^B ±0,87		31	507,79±53,79		23	338,64±32,64		25	1,052±0,204	
LEP	MM	288	15,09±0,33	0,709	315	510,28±18,78	0,609	289	314,68±10,54	0,654	293	0,864 ^A ±0,057	0,070
	MW	81	15,58±0,64		92	544,2±32,57		84	330,11±17,64		83	0,938 ^A ±0,105	
	WW	14	14,80±1,21		15	502,47±77,41		13	300,65±41,89		14	1,445 ^B ±0,248	
FASN	AG	118	15,07±0,44	0,998	130	545,46±26,47	0,262	117	336,70±14,53	0,123	115	1,026±0,094	0,202
	GG	338	15,07±0,28		367	512,17±18,52		340	311,87±10,37		351	0,888±0,058	
SCD1	CC	135	15,01±0,41	0,553	148	502,28 ^A ±25,10	0,029*	131	320,98±14,15	0,059	136	0,944±0,087	0,955
	TC	284	15,25±0,30		305	513,78 ^A ±19,74		287	309,75 ^A ±11,00		288	0,918±0,064	
	TT	41	14,54±0,67		48	625,41 ^B ±41,88		43	369,90 ^B ±24,21		46	0,898±0,151	
CSN2	AA	22	14,08±1,34	0,538	22	522,96±59,26	0,540	21	271,44 ^A ±30,86	0,121	22	0,448 ^A ±0,215	0,001**
	AB	171	15,39±0,45		187	498,54±26,77		172	304,21±14,68		176	0,724 ^A ±0,082	
	BB	267	14,98±0,32		292	532,28±19,03		268	329,06 ^B ±10,73		272	1,058 ^B ±0,062	
CSN2	A ¹ A ¹	42	16,43 ^{Aa} ±0,60	0,022*	45	527,46±48,38	0,968	38	314,22±26,72	0,462	43	0,829±0,153	0,769
	A ¹ A ²	148	14,60 ^B ±0,37		161	535,74±25,11		150	336,75±13,70		150	0,919±0,084	
	A ² A ²	224	15,17 ^B ±0,33		249	528,31±22,05		227	317,65±12,1		230	0,950±0,069	
CSN3	AA	215	15,22±0,34	0,075	228	552,38 ^A ±21,62	0,116	212	337,29 ^A ±12,02	0,037*	220	0,929 ^A ±0,070	0,109
	AB	191	15,04±0,37		216	504,38±22,32		196	299,82 ^B ±12,31		197	0,871 ^A ±0,073	
	BB	24	15,36±0,77		25	486,02±56,55		24	312,04±29,83		23	1,543 ^{Ba} ±0,206	
	BC	4	14,77±1,35		4	299,68 ^B ±122,34		4	229,114±63,58		4	0,966±0,490	
	AE	13	14,97±1,00		15	454,31±68,79		13	331,77±39,04		13	0,701 ^B ±0,271	
	BE	12	12,89±1,93		12	616,24 ^A ±93,27		11	414,90 ^{3,4} ±49,35		12	0,990±0,285	
	BB	58	14,76±0,64		70	576,97±37,91		60	337,37±21,73		64	1,216 ^B ±0,123	
LGB	AA	12	-	0,556	15	517,50±68,35	0,281	8	335,45±45,82	0,608	12	0,942±0,310	0,036*
	AB	390	15,15±0,27		416	510,01±18,42		393	314,56±10,45		394	0,857 ^A ±0,058	
	BB	58	14,76±0,64		70	576,97±37,91		60	337,37±21,73		64	1,216 ^B ±0,123	

n počet laktací dojnic s příslušným genotypem; LSM nejmenší průměrný čtverec; SE standardní chyba; *významné na hladině $p < 0,05$; **významné na hladině $p < 0,01$; ^{a,b} různá písmena mezi genotypy v témže sloupci značí rozdíly významné na hladině $p < 0,05$; ^{A,B} různá písmena mezi genotypy ve témže sloupci značí rozdíly významné na hladině $p < 0,01$; ³ rozdíly mezi genotypy CSN3 AB vs. AA a BE v syřitelnosti zjištěné přístrojově jsou významné na hladině $p < 0,05$; ⁴ rozdíly mezi genotypy CSN3 BE a BC v syřitelnosti zjištěné přístrojově jsou významné na hladině $p < 0,05$.

důležitým faktorem pro zhodnocení syrového mléka a nabídku kvalitních mlékařských výrobků.

Efekt alel na ukazatele technologické jakosti byl s jedinou výjimkou statisticky nevýznamný (Tab. 2). Dojnice s genotypem KA v genu DGAT1 měly výzamně lepší jogurtový test (Tab. 3). Rozdíly mezi genotypy LEP v alkoholové stabilitě byly významné ($p < 0,05$) mezi MM a MW vs. WW se stoupajícími hodnotami testu, což může mít význam pro produkci UHT mléka. Polymorfizmy v genu FASN neměly významný efekt, v SCD1 genu mělo mléko dojnic s genotypem TT nejhorší syřitelnost.

V genu CSN2 měl homozygotní genotyp BB statisticky významně nejlepší alkoholový test, avšak také nejhorší syřitelnost. Genotyp A¹A¹ se syřitelností a alkoholovým testem asociován nebyl, měl však nejlepší jogurtový test. Na základě výsledků ve sledované skupině není možné

určit celkově nejlepší genotyp kaseinu beta s ohledem na technologickou jakost mléka.

Genotyp BC měl z genotypů kaseinu kappa nejlepší syřitelnost stanovenou přístrojově, avšak zjištěnou z pouhých čtyř měření, výsledek je proto nutné interpretovat opatrně. Genotyp BB měl významně lepší syřitelnost ve srovnání s AA, avšak nikoli s AB. Nejhorší syřitelnost měly prokazatelně genotypy s alelou A a E (AE, AA, BE). Negativní vliv alely E potvrzují Matějčíček et al. (2008). Možné vysvětlení lze spatřovat i v důsledku změn v sekvenci aminokyselin mezi jednotlivými variantami. B se od A liší ve dvou aminokyselinových pozicích, na 136. je nahrazen threonin isoleucinem, na 148. asparagin alaninem. Tyto substituce mohou interagovat pozitivně s účinkem syřidla, které začíná štěpit kaseinovou molekulu mezi 105. a 106. aminokyselinou, tj. poblíž změněných aminokyselin. BB genotyp měl rovněž

nejlepší výsledek v alkoholovém testu. Významný vliv polymorfizmu *CSN3* byl zjištěn řadou autorů, v poslední době např. Amalfitano et al. (2019). Michalčová, Krupová (2007) potvrzují pozitivní vliv alely *B* na zkrácení doby syřitelnosti, avšak zjistily mírné zhoršení alkoholové stability.

V genu *LGB*, který kóduje nejdůležitější syrovátkový protein, byl významný efekt zjištěn pouze u alkoholového testu, nejlepší byl genotyp *BB*.

Při kvantifikaci dalších vlivů bylo zjištěno, že efekt farmy byl významný u všech ukazatelů technologické jakosti mléka, přitom farma s nejlepším jogurtovým testem a syřitelností měla nejhorší alkoholový test. Obsah bílkovin ovlivnil jogurtový test a syřitelnost, obsah tuku alkoholový test, obsah TPS a počet somatických buněk syřitelnost. Obsah kaseinu, měsíc a sezóna otelení ovlivnily jogurtový test. Významný vliv pořadí laktace, stadia laktace a plemene nebyl zjištěn.

Závěr

Byla potvrzena pozitivní asociace genotypu *AA* a alely *A* genu *DGAT1* s vyšší produkcí mléka, bílkovin a tuku v kg. Stejná asociace byla zjištěna u alely *A* genu *FASN*, alely *B* a *A2* genu *CSN2*, genotypu *AB* a alely *B* genu *LGB*. V genu *CSN3* byly alely *B* a *E* asociovány s vyšším obsahem bílkovin, alela *B* rovněž s obsahem tuku, genotyp *AA* s produkcí mléka. Genotyp *BB* genu *CSN3* byl potvrzen jako nejlepší s ohledem na technologickou jakost mléka, u ostatních genů nebyla jednoznačná interpretace možná. V našem poměrně rozsáhlém pokusu byl potvrzen klíčový vliv farmy jak na produkci a složení mléka, tak na jeho technologické vlastnosti. Polymorfizmy v genech *DGAT1* a *CSN3* je možné využít v praktickém šlechtění dojených plemen skotu, u ostatních genů doporučujeme další asociační analýzy.

Poděkování

Výzkum byl podpořen Ministerstvem zemědělství, projekty MZe NAZV KUS QJ1510339 a MZe-RO0718. Dále byl podpořen Grantovou agenturou Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, projekt GAJU 028/2019/Z.

Seznam literatury

AMALFITANO N., CIPOLAT-GOTET C., CECCHINATO A., MALACARNE M., SUMMER A., BITTANTE G. (2019): Milk protein fractions strongly affect the patterns of coagulation, curd firming, and syneresis. *Journal of Dairy Science*, 102, s. 2903-2917.

BARROSO A., DUNNER S., CAÑÓN J. (1998): Technical note: detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). *Journal of Animal Science*, 76, s. 1535-1538.

BARTONOVA P., VRTKOVA I., KAPLANOVA K., URBAN T. (2012): Association between *CSN3* and *BCO2* gene polymorphisms and milk performance traits in the Czech Fleckvieh cattle breed. *Genetics and Molecular Research*, 11, s. 1058-1063.

BUCHANAN F. C., FITZSIMMONS C. J., VAN KESSEL A. G., THUE T. D., WINKELMAN-SIM D. C., SCHMUTZ S. M. (2002): Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetics Selection Evolution*, 34, s. 105-116.

CECCHINATO A., CHESSA S., RIBECA C., CIPOLAT-GOTET C., BOBBO T., CASELLAS J., BITTANTE G. (2015): Genetic variation and effects of candidate-gene polymorphisms on coagulation properties, curd firmness modeling and acidity in milk from Brown Swiss cows. *Animal*, 9, s. 1104-1112.

CITEK J., REHOUT V., HRADECKA E., VECEREK L., PANICKE L. (2007): The breeding values of German Holstein sires and the *DGAT1* polymorphism. *Archives of Animal Breeding*, 50, s. 136-146.

ČÍTEK J., HANUSOVÁ L., BRZÁKOVÁ M., VEČEREK L., PANICKE L., LÍSKOVCOVÁ L. (2018): Associations between gene polymorphisms, breeding values, and glucose tolerance test parameters in German Holstein sires. *Czech Journal of Animal Science*, 63, s. 167-173.

INOSTROZA K. B., SCHEUERMANN E. S., SEPULVEDA N. A. (2013): Stearoyl CoA desaturase and fatty acid synthase gene polymorphisms and milk fatty acid composition in Chilean Black Friesian cows. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 26, s. 263-269.

KUČEROVÁ J., MATĚJÍČEK A., OM J., SØRENSEN P., NĚMCOVÁ E., ŠTÍPKOVÁ M., KOTT T., BOUŠKA J., FRELICH J. (2006): Milk protein genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *LGB* and their relation to genetic values of milk production parameters in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science*, 51, s. 241-247.

KUHN C., THALLER G., WINTER A., BININDA-EMONDS O. R. P., KAUPÉ B., ERHARDT G., BENNEWITZ J., SCHWERIN M., FRIES R. (2004): Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics*, 167, s. 1873-1881.

KYSELOVÁ J., JEČMÍNKOVÁ K., MATĚJÍČKOVÁ J., HANUŠ O., KOTT T., ŠTÍPKOVÁ M., KREJČOVÁ M. (2019): Physicochemical characteristics and fermentation ability of milk from Czech Fleckvieh cows are related to genetic polymorphisms of β -casein, κ -casein, and β -lactoglobulin. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, 32, s. 14-22.

MATĚJÍČEK A., MATĚJÍČKOVÁ J., ŠTÍPKOVÁ M., HANUŠ O., GENČUROVÁ V., KYSELOVÁ J., NĚMCOVÁ E., KOTT T., ŠEFROVÁ J., KREJČOVÁ M., MELČOVÁ S., HÖLZELOVÁ I., BOUŠKA J., FRELICH J. (2008): Joint effects of *CSN3* and *LGB* genes on milk quality and coagulation properties in Czech Fleckvieh. *Czech Journal of Animal Science*, 53, s. 246-252.

MAURIC M., MASEK T., LJOLJIC D. B., GRBAVAC J., STARCEVIC K. (2019): Effects of different variants of the *FASN* gene on production performance and milk fatty acid composition in Holstein x Simmental dairy cows. *Veterinarní Medicína*, 64, s. 101-108.

MEDRANO J. F., SHARROW L. (1991): Genotyping of bovine beta-casein loci by restriction site modification of polymerase chain reaction (PCR) amplified DNA. *Journal of Dairy Science*, 74, s. 282.

MICHALCOVÁ A., KRUPOVÁ Z. (2007): Influence of composite κ -casein and β -lactoglobulin genotypes on composition, rennetability and heat stability of milk of cows of Slovak Pied breed. *Czech Journal of Animal Science*, 52, s. 292-298.

MILUCHOVÁ M., GÁBOR M., TRAKOVICKÁ A. (2013): Analysis of Slovak Spotted breed for bovine beta casein A1 variant as risk factor for human health. *Acta Biochimica Polonica*, 60, s. 799-801.

ROY R., ORDOVAS L., ZARAGOSA P., ROMERO A., MORENO C., ALTARRIBA J., RODELLAR C. (1991): Association of polymorphisms in the bovine *FASN* gene with the milk fat content. *Animal Genetics*, 37, s. 215-218.

SAFINA N. Y., SHAKIROV S. K., ZINNATOVA F. F., FATTAKHOVA Z. F., GAYNUTDINOVA E. R., SHAYAKHMETOVA L. N. (2018): Dynamics of dairy production of heifers of different genotypes of stearoyl-CoA desaturase (*SCD1*). *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 9, s. 2028-2031.

SANCHEZ M. P., RAMAYO CALDAS Y., WOLF V., LAITHIER C., EL JABRI M., MICHENET A., BOUSSAHA M., TAUSSAT S., FRITZ S., DELACROIX-BUCHET A., BROCHARD M., BOICHARD D. (2019): Sequence-based GWAS, network and pathway analyses reveal genes co-associated with milk cheese-making properties and milk composition in Montbéliarde cows. *Genetics Selection Evolution*, 51, s. 34.

SPELMAN R. J., FORD C. A., MCELHINNEY P., GREGORY G. C., SNELL R. G. (2002): Characterization of the *DGAT1* gene in New Zealand dairy population. *Journal of Dairy Science*, 85, s. 3514-3517.

STRZALKOWSKA N., KRZYZEWSKI J., ZWIERZCHOWSKI L., RYNIOWICZ Z. (2002): Effects of κ -casein and β -lactoglobulin loci polymorphism, cows' age, stage of lactation and somatic cell count on daily milk yield and milk composition in Polish Black-and-White cattle. *Animal Science Papers and Reports*, 20, s. 21–35.

WINTER A., KRAMER W., WERNER F. A. O., KOLLERS S., KATA S., DURSTEWITZ G., BUITKAMP J., WOMACK J. E., THALLER G., FRIES R. (2002): Association of lysine 232 alanine polymorphism in bovine gene encoding acylCoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *PNAS*, 99, s. 9300 – 9305.

Korespondující autor: Prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.,
Zemědělská fakulta, Jihočeská univerzita v Českých
Budějovicích, Studentská 1668, 370 05 České
Budějovice, Česká republika, e-mail: citek@zf.jcu.cz

Přijato do tisku: 20. 2. 2020

Lektorováno: 5. 5. 2020

MASTNÉ KYSELINY MLÉČNÉHO TUKU JAKO POTENCIÁLNÍ BIOMARKERY NEGATIVNÍ ENERGETICKÉ BILANCE DOJNIC V ČASNÉ LAKTACI

Magdaléna Štolcová, Luděk Bartoň, Dalibor Řehák
Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i.

Milk fatty acids as potential biomarkers of negative energy balance in early-lactation dairy cows

Abstrakt

Hodnocení vztahů mezi mastnými kyselinami mléčného tuku a sérovými neesterifikovanými mastnými kyselinami (NEFA) bylo provedeno u 66 dojníc holštýnského a českého strakatého plemene v období od porodu do 8 týdnů laktace. Dojnice byly rozděleny do tří skupin (NEB0, NEB1, NEB2) podle výskytu a hloubky negativní energetické bilance určené na základě koncentrací NEFA v prvních 14 dnech po porodu. Celkem bylo použito 490 vzorků krve a mléka. Středně těsné vztahy mastných kyselin mléčného tuku se sérovými NEFA u všech dojníc bez ohledu na rozdělení do skupin byly pozorovány u sumy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (LCFA; $r = 0,56$), sumy mononenasyčených mastných kyselin ($r = 0,47$), C16:0 ($r = -0,58$), C18:0 ($r = 0,44$) a C18:1 ($r = 0,50$). Dále byly zjišťovány vztahy mezi NEFA a nejsilněji korelovanými mastnými kyselinami mléčného tuku u jednotlivých skupin dojníc. Parametry ve skupinách NEB0 a NEB1 korelovaly slabě až středně silně, zatímco ve skupině NEB2 byly již vztahy těsnější a u C16:0 a LCFA byly hodnoty $r = -0,65$ a $0,63$,

což značí těsný vztah. U všech stanovovaných parametrů v mléce byly vypočteny rozdíly mezi skupinami krav podle NEB. Ty byly statisticky signifikantní mezi skupinou NEB0 a NEB2 a to u stejných parametrů, které korelovaly s NEFA. Na základě těchto zjištění se lze domnívat, že určité mastné kyseliny mléčného tuku by mohly být využity při predikci rizik spojených s NEB.

Klíčová slova: dojnice, negativní energetická bilance, mastné kyseliny mléčného tuku, neesterifikované mastné kyseliny, infračervená spektroskopie

Abstract

The relationship between milk fatty acids and serum non-esterified fatty acids (NEFA) was evaluated in 66 Holstein and Czech Fleckvieh dairy cows in the period from parturition to 8 weeks of lactation. Dairy cows were assigned into three groups (NEB0, NEB1, NEB2) according to the occurrence and severity of the negative energy balance (NEB) determined on the basis of the NEFA concentrations in the first 14 days after parturition. A total of 490 blood and milk samples were used. Moderate correlations between milk fatty acids and serum NEFAs in all dairy cows, regardless of grouping, were observed for the sum of long chain fatty acids (LCFA; $r = 0.56$), the sum of monounsaturated fatty acids ($r = 0.47$), C16:0 ($r = -0.58$), C18:0 ($r = 0.44$) and C18:1 ($r = 0.50$). Furthermore, the relationship between these milk fatty acids and NEFAs in individual groups of dairy cows were determined. The correlations determined in the NEB0 and NEB1 groups were weak to moderate, while in the NEB2 group the correlations were higher ($r = -0.65$ and 0.63 for C16:0 and LCFA, respectively). In addition, differences between groups of cows according to NEB were calculated for all the parameters determined in milk. Significant differences between NEB0 and NEB2 were observed for the same fatty acids that correlated with NEFA. Based on these findings, it can be assumed that certain milk fatty acids could be used to predict the risks associated with the NEB.

Key words: dairy cows, negative energy balance, milk fatty acids, non-esterified fatty acids, infrared spectroscopy

Úvod

Mléko je vhodným a snadno získatelným materiálem pro biochemickou analýzu jeho složek. Samotné zastoupení běžných složek analyzovaných při kontrole užitkovosti ovšem z hlediska odhadu energetické bilance neposkytne úplně kompletní výpověď. Vztah k energetické bilanci z běžně stanovovaných složek mají tuk, citrát a ketolátky, nicméně obsah tuku se obtížně interpretuje a jeho obsah, stejně jako obsah citrátu, je v mléce velmi variabilní. Ketolátky lze využít spíše pro diagnostiku ketóz, včetně subklinických forem (Denis-Robichaud a kol., 2014). Pro predikci energetické bilance by mohly