

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra speciální zootechniky



**Asociační analýza SNP mutací v prasečím genu MC4R
s užitkovými vlastnostmi prasat**

Bakalářská práce

Autor práce: Jan Calta

Obor studia: Živočišná produkce

Vedoucí práce: doc. Ing. Jaroslav Čítek, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Asociační analýza SNP mutací v prasečím genu MC4R s užitkovými vlastnostmi prasat" jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 20. 4. 2018

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu bakalářské práce doc. Ing. Jaroslavu Čítkovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval, a Ing. Kateřině Zadinové, Ph.D. za neocenitelnou teoretickou i praktickou přípravu.

Asociační analýza SNP mutací v prasečím genu *MC4R* s užitkovými vlastnostmi prasat

Souhrn

Cílem práce bylo ověřit vliv jednonukleotidových polymorfizmů v prasečím genu *MC4R* na produkční vlastnosti prasat. Práce je proto rozdělena na dvě hlavní části: literární rešerši a samotnou asociační analýzu, v níž byla využita data od zvířat vykrmených na testovní stanici.

Rešerše shrnuje důležité poznatky o užitkovosti prasat, kvalitě vepřového masa a aplikaci molekulární genetiky v živočišné produkci. Poslední jmenovaná kapitola je zaměřená na využití genetických markerů a vyzdvihuje jejich roli ve šlechtění prasat. Proto práce obsahuje i základní metody, jež se při práci s markery používají. Zvláštní pozornost má gen *MC4R*, který se zapojuje do regulace příjmu potravy, a proto ho mnohé studie zahrnují mezi kandidátní geny výkrmnosti a jatečné hodnoty.

V praktické části práce bylo sledováno 49 kanců hybridní linie Bílé otcovské x (Landrace x Bílé ušlechtilé). Zvířata byla vykrmena na testovní stanici Katedry speciální zootechniky a porážena v průměrné živé hmotnosti 110 kg a věku 148 dnů. Následně byl proveden jatečný rozbor a byly odebrány vzorky krve, z nichž byla izolována DNA, a vzorky tuku pro stanovení hladiny složek kančího pachu (tzn. androstenonu, skatolu a indolu). Za použití metody PCR-RFLP a elektroforézy pak byly stanoveny genotypy dvou vybraných polymorfizmů v genu *MC4R*. To umožnilo provést asociační analýzu mezi genotypy a vybranými kvantitativními i kvalitativními znaky jatečné hodnoty.

Vliv polymorfizmu Arg236His dále zkoumán nebyl, neboť se ve sledované populaci vyskytla jen jedna alela (G). Zato v případě polymorfizmu Asp298Asn se objevilo příznivé rozdělení alel i genotypů.

Genotyp AA podle předpokladů vykázal na konci výkrmu průkazně největší tělesnou hmotnost, s čímž korelovala také hmotnost jatečně upraveného těla a hlavních masitých částí. Možný vliv polymorfizmu na zmasilost (podíl libové svaloviny) se však neprojevil a statistická analýza nepodpořila ani vztah k látkám způsobujícím kančí pach. Lze tedy souhlasit, že SNP v genu *MC4R* mohou mít vliv na produkční vlastnosti prasat, ovšem toto tvrzení je nutné podpořit dalšími studiemi.

Klíčová slova: Polymorfismus, SNP, *MC4R*, prase, užitkové vlastnosti

Association analysis of SNPs in the porcine *MC4R* gene with production traits

Summary

The goal of this thesis was to verify the influence of SNPs in porcine *MC4R* gene on pig production traits. The thesis is therefore divided into two main parts: a research and an association analysis, in which data from animals that were fattened up at a test station were used.

The research summarizes important knowledge of pig production traits, pork quality and application on molecular genetics in livestock production. The latter chapter focuses on the use of genetic markers and highlights their role in pig breeding. Thus, it also contains characterization of basic methods used when working with markers. Attention is paid to *MC4R* gene, which is involved in the regulation of feed intake and therefore is included amongst candidate genes for growth and carcass value.

In the practical part of the thesis 49 boars of a hybrid line Czech Large White × (Czech Large White × Czech Landrace) were studied. The animals were fed at a test station of the Department of Animal Husbandry and were slaughtered at an average live weight of 110 kg and 148 days of age. Subsequently, carcass analysis was performed and blood samples for DNA isolation and fat samples for boar taint related compounds were collected. Using PCR-RFLP and electrophoresis, genotypes by two SNPs in *MC4R* were determined. This enabled to carry out the association analysis between the genotypes and selected quantitative and qualitative traits of carcass value.

The effect of the p.Arg236His was not studied further, since only one allele (*G*) was present in the studied population. However, in the case of the p.Asp298Asn a favourable distribution of both alleles and genotypes appeared.

According to the assumptions, the *AA* genotype showed the highest body weight at the end of the fattening, which correlated with carcass weight and weight of primal carcass cuts. However, the reported possible influence of the p.Asp298Asn on leanness was not supported, nor was the relationship to boar taint compounds. This thesis therefore agrees that the p.Asp298Asn in the *MC4R* gene may affect pig production traits, but assertion needs to be supported by further studies.

Keywords: Polymorphism, SNP, *MC4R*, pig, production traits

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Cíl práce	2
3	Přehled literatury	3
3.1	Užitkové vlastnosti prasat.....	3
3.1.1	Reprodukční užitkovost.....	3
3.1.2	Produkční užitkovost.....	3
3.1.2.1	Výkrmnost	3
3.1.2.2	Jatečná hodnota.....	4
3.2	Kvalita vepřového masa	5
3.2.1	Vepřové maso	5
3.2.2	Technologické a senzorické vlastnosti.....	5
3.2.2.1	Barva	5
3.2.2.2	Vaznost.....	6
3.2.2.3	pH.....	6
3.2.2.4	Křehkost a mramorování	6
3.2.2.5	Chuť a vůně	7
3.3	Molekulární genetik.....	8
3.3.1	Genetické markery	8
3.3.2	QTL.....	9
3.3.3	Kandidátní geny využívané ve šlechtění prasat	10
3.3.3.1	RYR1.....	10
3.3.3.2	PRKAG3 (RN).....	10
3.3.3.3	CAST.....	11
3.3.3.4	IGF2	11
3.3.3.5	LEP.....	12
3.3.3.6	CYP2E1	12
3.3.4	Molekulárně-genetické metody	12
3.3.4.1	Izolace DNA	12
3.3.4.2	PCR	13
3.3.4.3	RFLP	13
3.3.4.4	Elektroforéza.....	14
3.4	MC4R	15
3.4.1	Prasečí MC4R	15

3.4.2	Polymorfismus Asp298Asn.....	16
3.4.2.1	Růst, příjem krmiva, tučnost.....	16
3.4.2.2	Kančí pach	17
3.4.2.3	Další faktory	17
3.4.3	Polymorfismus Arg236His.....	18
4	Materiál a metody.....	19
4.1	Zvířata.....	19
4.2	Jatečný rozbor	19
4.3	Laboratorní rozbor	19
4.3.1	Stanovení hladiny androstenonu, skatolu a indolu	19
4.3.2	Izolace DNA	20
4.3.3	PCR-RFLP.....	20
4.3.4	Elektroforéza.....	21
4.4	Asociační analýza.....	21
5	Výsledky	22
6	Diskuse.....	24
7	Závěr	25
8	Seznam literatury	26
8.1	Tištěné publikace	26
8.2	Internetové zdroje.....	35
9	Seznam použitých zkratk.....	36

1 Úvod

Prase patří k nejdříve domestikovaným druhům hospodářských zvířat. Jeho hlavním využitím je produkce masa, které poskytuje člověku vysoce hodnotné bílkoviny. Poptávka po vepřovém mase stále roste, a proto zootechnická opatření i v současnosti představují základní předpoklad pro intenzifikaci chovu prasat. Součástí těchto opatření jsou znalosti genetiky, jež pomáhají využít dosud nevyužitý potenciál v užitkovosti zvířat. Při tom se čím dál více uplatňují poznatky z molekulární genetiky. Požadovaných výsledků lze dosáhnout mimo jiné pomocí markerů.

2 Cíl práce

Cílem práce je ověřit vliv SNP mutací v prasečím genu *MC4R* na produkční a kvalitativní vlastnosti prasat.

Hypotéza: sledované SNP v genu *MC4R* u hybridních populací prasat ovlivňují růstovou schopnost a podíl libové svaloviny.

3 Přehled literatury

3.1 Užitékové vlastnosti prasat

V současné době je vepřové maso po drůbežím těsně druhým nejčastěji zastoupeným druhem masa ve výživě lidí. Jeho celosvětová produkce v roce 2017 činila asi 118 milionů tun s průměrnou spotřebou 12,3 kg na obyvatele. Ve státech Evropské unie pak vepřové maso stále vévodilo statistikám produkce (23,6 milionu tun) i spotřeby (32,5 kg na obyvatele), takže zaujímá téměř polovinu veškerého masa, které zkonsumuje průměrný Evropan. V dalších letech by celosvětová produkce stále měla mírně růst, ovšem v zemích EU-28 se předpokládá stagnace až mírný pokles (OECD-FAO, 2016; OECD-FAO, 2017).

Stupka a kol. (2013) konstatovali, že chov prasat má v zabezpečování proteinové bilance lidí nezastupitelnou úlohu. Cílem chovatelů prasat proto je dosažení odpovídající užítkovosti, přičemž se zohledňuje ekonomika výroby, preference konzumentů či kvalita a bezpečnost výrobků. Užitékové vlastnosti prasat se pak dělí do dvou hlavních skupin, a sice na reprodukční a produkční.

3.1.1 Reprodukční užítkovost

Reprodukce má klíčový dopad na efektivitu chovných systémů prasat. Její užítkovost se obvykle vyjadřuje jako počet selat vyprodukovaných jednou prasnicí za rok, proto složky reprodukční užítkovosti tvoří počet selat ve vrhu a počet vrhů ročně. Za předpokladu, že náklady na reprodukční stádo jsou zhruba stejně velké nehledě na to, kolik selat se ročně narodí jedné prasnici, je právě počet narozených selat zásadní položkou v příjmech chovu. Chovatelé přitom stále více hledí také na kvalitu selat (Whittemore a Kyriazakis, 2006).

Pulkrábek a kol. (2005) uvádějí, že v Evropě začíná být produkce selat rentabilní od 20 odstavených selat na prasnici ročně. Podle Stupky a kol. (2009) by cílem v našich chovech mělo být alespoň 25 a více selat. Podle dat ČSÚ (2018) se tento údaj v České republice za uplynulý rok vyšplhal už na 27,9 selete, což znamená nárůst o 1 sele oproti roku 2016.

3.1.2 Produkční užítkovost

3.1.2.1 Výkrmnost

Další neopomenutelný aspekt užítkovosti prasat představuje výkrmnost, která vyjadřuje schopnost vytvářet z přijatých živin jatečné produkty. I tato schopnost má své dílčí ukazatele:

průměrný denní přírůstek, jenž reprezentuje růst, a spotřebu krmiva na 1 kg přírůstku živé hmotnosti (konverzi), která reprezentuje efektivnost výkrmu (Pulkrábek a kol., 2005).

Velmi důležitou charakteristikou prasat je schopnost produkovat během relativně krátké doby velké množství tělesné hmoty, z níž rozhodující je produkce masa. Ta je funkcí plodnosti a růstu (Hovorka, 1983). Růst obvykle chápeme jako přibývání na velikosti v důsledku množení a zvětšování buněk (Whittemore a Kyriazakis, 2006).

Stupka a kol. (2009) výkrmnost charakterizují jako jev, který zahrnuje kvalitativní a kvantitativní proces – tedy vývin, respektive růst. Kvalitativním procesem (vývinem) se rozumí diferenciaci buněk, jejímž důsledkem je změna tkání, potažmo tělesné stavby; kvantitativní proces (růst) pak vede ke změnám hmotnosti a tělesných rozměrů.

Vzhledem k těmto definicím tedy výkrmnost závisí na řadě vnitřních a vnějších faktorů. Vnitřní stojí na genetickém základu, který ovlivňuje hranici růstu a vývinu a zahrnuje pohlaví a hormonální činnost organismu. Z toho důvodu na něj přímo navazuje plemenářská práce. Zato vnější faktory výkrmnosti spadají pod ošetřovatelskou činnost, neboť mezi ně patří výživa, mikroklima, způsob chovu, délka výkrmu atp. (Pulkrábek a kol., 2005; Stupka a kol., 2013).

Těmito činiteli jsou podmíněny rovněž hodnoty zmiňovaných ukazatelů výkrmnosti. Průměrný denní přírůstek či konverzi krmiva je tedy nutno vztahovat mj. k plemeni, pohlaví a věku (či období, kdy jsou tyto údaje měřeny). Například podle Svazu chovatelů prasat v Čechách a na Moravě je chovným cílem mateřských plemen v ČR přírůstek 1300 g v unifikovaném testu vlastní užitkovosti (SCHP, 2010). Saintilan a kol. (2011) ve svém výzkumu u plemene Large White zase ilustrovali, že průměrná spotřeba krmiva na 1 kg přírůstku bývá nejvyšší u vepříků. Kanečci díky svým biologickým předpokladům dosahovali konverze 2,43 kg, prasničky 2,66 kg a vepřici 2,81 kg.

3.1.2.2 Jatečná hodnota

Jatečná hodnota vyjadřuje kvantitativní a kvalitativní hodnotu jatečného zvířete. Zpeněžování u nás (v provozech s průměrně 100 poraženými kusy týdně) v souladu s nařízením Rady EU č. 3220/1984 podléhá systému SEUROP, jehož snahou je co nejobjektivnější klasifikace. V menších podnicích se ke klasifikaci používá dvoubodová metoda, ve větších se měří aparativně, tzn. vpichovými sondami či ultrazvukem (Stupka a kol., 2009).

Ke kvantitativním ukazatelům jatečné hodnoty Pulkrábek a kol. (2005) zařadili:

- jatečnou výtěžnost, která je podílem jatečně upraveného těla za tepla z porážkové hmotnosti (u prasat 72–84 %);
- podíl libového masa, který se hodnotí v souladu se systémem SEUROP;

- výšku hřbetního tuku a poměr masitých, tučných a méněcenných částí.

Mezi kvalitativní ukazatele pak spadá barva masa, šťavnatost, křehkost, mramorování, tloušťka svalových vláken, vaznost, chuť a vůně masa.

3.2 Kvalita vepřového masa

3.2.1 Vepřové maso

Maso lze definovat jako příčně pruhovanou svalovinu z těl teplokrevných jatečných zvířat včetně vazivové součásti svalů, povrchového a intramuskulárního tuku, cév, mízních uzlin, nervů, kostí a v některých případech i opárené kůže (Steinhauser a kol., 2000). Vepřové maso se získává z jatečně upraveného těla (JUT), které představuje dvě k sobě náležící půlky s hlavou a kůží, bez štětín, bez výkrojů očních a ušních, bez mozku, míchy, jazyka, bránice, bráničního pilíře, ledvin, plsti, pohlavních orgánů, špárků, orgánů dutiny hrudní, břišní a pánevní vyňatých s přirostlým tukem (Pulkrábek a kol., 2005).

Heinz a Hautzinger (2010) uvádějí, že JUT prasete má průměrně následující složení: 41,1 % vody, 11,2 % bílkovin, 47,0 % tuku a 0,6 % popelovin. Libové vepřové maso pak obsahuje: 75,1 % vody, 22,8 % bílkovin, 1,2 % tuku a 1,0 % popelovin. Tyto hodnoty jsou téměř stejně jako u drůbežího nebo libového hovězího masa.

Kvalita masa je souhrnem nutričních, senzorických, technologických a hygienicko-toxikologických vlastností (Stupka a kol., 2013). Ty jsou odvislé od vnitřních a vnějších činitelů. Mezi vnitřní patří vlivy genetiky, plemene, pohlaví, stáří a jatečné hmotnosti. Vnější činitelé zahrnují výživu, teplotu, světlo, ustájení a pohyb. Zvláštní kategorii představuje technika a technologie porážky (Hovorka a kol., 1983).

Všechny jmenované ukazatele jsou samostatně obsáhlými tématy, ale jelikož na ně pravděpodobně působí gen *MC4R*, objevují se i v této práci.

3.2.2 Technologické a senzorické vlastnosti

3.2.2.1 Barva

Barva bývá pro spotřebitele jedním z prvních znaků kvality masa. Podmiňuje ji především obsah a stav hemových barviv, tedy hemoglobinu a myoglobinu, ale také pH či hydratační stav masa. Obvykle je barva vyjadřována v systému CIE, jenž posuzuje světlost (L^*) a barevný odstín (koeficienty a^* a b^*) (Pipek a Pour, 1998).

3.2.2.2 Vaznost

Vaznost je definována jako schopnost masa udržet vodu vlastní a přidanou při působení určité síly. Vyjadřuje se jako podíl vody vázané (tj. hydratační + imobilizované) ku celkovému obsahu vody v mase. K nejvýraznějším faktorům, které vaznost ovlivňují, patří pH, koncentrace solí, obsah některých iontů, intravitální vlivy, průběh posmrtných změn a rozmělnění masa (Pipek a Pour, 1998). Krátce post-mortem vaznost masa klesá, avšak v průběhu zrání se znovu zvyšuje, což je připisováno degradaci cytoskeletárních bílkovin (Li a kol., 2017). Nepříjemná vaznost každoročně působí procentům masa ztráty v milionech dolarů (Huff-Lonergan a Lonergan, 2005).

3.2.2.3 pH

Kvalita masa a pH – definovaného jako záporný dekadický logaritmus aktivity vodíkových kationtů – jsou provázány v několika klíčových ohledech. Jak už bylo zmíněno, pH souvisí s barvou a vazností, a jeho vývoj je nezbytný při procesu zrání. V mase a masných výrobcích nabývá pH hodnot od 4,2 do 7,0. Zvláštní hranicí jsou hodnoty okolo 5,0, neboť při nich se maso dostává do izoelektrického bodu (pI) – počet kladných a záporných nábojů na molekule bílkoviny je shodný. Čím více se pH blíží pI, tím méně jsou bílkoviny rozpustné. V pI je z toho důvodu vaznost nejnižší (Pipek a Pour, 1998).

Abnormální vývoj pH během zrání předurčuje ke vzniku myopatií, z nichž nejdůležitější v případě vepřového masa je vada PSE (zkratka angl. pale, soft, exudative = bledé, měkké, vodnaté). Ta vzniká, pokud po porážce dochází k příliš rychlému štěpení velkého množství glykogenu na kyselinu mléčnou. Prudký pokles pH na hodnotu 5,8–5,6 (nebo nižší) při stále poměrně vysoké teplotě masa tím zapříčiní částečnou denaturaci bílkovin. Vaznost proto zůstává poměrně nízká, což rezultuje v produkt, který spotřebitel vnímá negativně kvůli vzhledu a ztrátě vody během vaření (Pipek a Pour, 1998; Whittimore a Kyriazakis, 2006). Samotný vzhled masa je pro více jak 60 % spotřebitelů vůbec nejdůležitějším kritériem při výběru výrobku v obchodě (Lee a Choi, 1999).

3.2.2.4 Křehkost a mramorování

Křehkost lze objektivně hodnotit např. měřením síly stříhu nebo spotřeby energie při namletí vzorku. Rozhodující vliv má množství vaziva ve svalu a tloušťka svalových vláken. (Hovorka a kol., 1983). Důležité je rovněž mramorování (marbling), které kromě křehkosti

dodává masu také šťavnatost a chutnost. Rozsah mramorování se připisuje obsahu intramuskulárního tuku (intra muscular fat – IMF) (Steinhauser a kol., 2000; Liu a kol., 2012).

3.2.2.5 Chut' a vůně

Tyto vlastnosti vedle struktury svaloviny a obsahu tuku determinuje obsah extraktivních látek. Mezi extraktivní látky se mj. řadí látky aromatické (Hovorka a kol., 1983; Steinhauser a kol., 2000).

Aktuálním tématem je kančí pach, který je možno čichově i chuťově detekovat v mase pocházejícím z některých kanců. Tento nežádoucí zápach, který způsobuje ekonomické ztráty, je v současnosti připisován zvýšené koncentraci tří látek, a to především v tukové tkáni: androstenonu, skatolu a indolu. Androstenon se syntetizuje stejnou biochemickou cestou jako testosteron ve varlatech, zatímco skatol a indol vznikají bakteriálním rozkladem aminokyseliny tryptofanu ve střevě. Jelikož se tyto látky v nadměrné (tj. senzoricky detekovatelné) míře ukládají v tukové tkáni kanců, pro produkci masa se využívají kastráti (Schroyen a kol., 2015). Pro androstenon je hraniční koncentrace 1,0 ppm, pro skatol 0,25 ppm. Avšak ne každý člověk kančí pach vnímá. Předpokládaný podíl kanečků, jejichž maso je znehodnoceno kančím pachem, se ve vědeckých studiích velmi různí – některé uvádějí 5 %, jiné až 30 % (Whittemore a Kyriazakis, 2006).

Rutinní chirurgická kastrace je však už řadu let konfrontována s otázkami welfare. Evropská komise v roce 2010 vydala deklaraci, prostřednictvím které vyzývala producenty, aby chirurgickou kastraci prováděli pouze s anestézií či s analgetiky a aby do 1. ledna 2018 od chirurgické kastrace upustili úplně (Evropská komise, 2010). Alternativ je několik: imunovakcinace, výkrm kanečků do nižších porážkových hmotností, použití přístrojů na detekci „závadných“ JUT, sexace spermií a v neposlední řadě selekce pomocí genetických markerů (Tuyttens a kol., 2011). Nicméně celoplošné používání anestézie a analgezie, natož dalších zmíněných metod, se v mnoha zemích zejména vzhledem ke zvýšeným nákladům stále neprovádí. Na druhou stranu Dánsko, Švýcarsko, Nizozemsko, Švédsko, Norsko či Německo už kastraci bez anestézie nebo analgezie zakázaly (De Briyne a kol., 2016).

3.3 Molekulární genetik

Kořeny systematického popisu a mapování genomu *Sus scrofa*, jehož karyotyp sestává z 19 párů chromozomů, sahají do přelomu 80. a 90. let minulého století, kdy navázaly na výzkum Human Genome Organisation (HUGO). Jejím cílem bylo kompletně zmapovat genom člověka. V případě prasat se první mezinárodně koordinovanou snahou stal Pig Gene Mapping Project (PiGMap), financovaný Evropskou unií. Původní ambicí tohoto projektu bylo identifikování a popsání tzv. genetických markerů (Rothschild a Ruvinsky, 2011).

3.3.1 Genetické markery

Genetické markery – známé sekvence DNA, které lze detekovat molekulárními analýzami – se zasadily o výrazný pokrok molekulární genetiky, která také umožnila nový přístup ke šlechtění zvířat. Dříve k odhadu plemenné hodnoty, tedy k odhadu genotypu, mohly sloužit pouze údaje o fenotypu (užitkovost jednice, rodičů či potomků); zato nyní lze pro selekci využít plemennou hodnotu zpřesněnou o některé informace z genomu nebo přímo takové informace. Právě genetické markery nám umožňují tyto informace získávat. Kromě přesnosti nabízejí markery další klíčové výhody: jsou zjistitelné ve spermatu, prenatálně i postnatálně v každém věku zvířete; vyskytují se u obou pohlaví nehledě na to, že daný znak či vlastnost se fenotypově u daného pohlaví kvůli pohlavnímu dimorfismu projevit nemůže; odhalují i heterozygotní genotypy, které se fenotypově neprojevují (Steinhauser a kol., 2000). Selekcce pomocí markerů se ukrývá pod zkratkou MAS (z angl. marker assisted selection; Al-Samarai a Al-Kazaz, 2015).

Pro marker je nezbytné, aby reprezentoval genetický rozdíl mezi organismy (ať už v rámci jednoho druhu, nebo více druhů), čili aby vykazoval polymorfismus (na základě dominantní či kodominantní alelické interkace). Markery často ani nejsou součástí sledovaného genu, tudíž se v takových případech samy o sobě fenotypově neprojevují, avšak kvůli své pozici jsou s tímto genem (vazebně) spojeny. Genetické markery se dělí na tři hlavní typy:

- Morfologické (viditelné) markery se samy fenotypově projevují jako znaky nebo vlastnosti.
- Biochemické markery spočívají v alelické variaci enzymů (izoenzymů), které rozlišujeme pomocí elektroforézy.
- DNA (molekulární) markery konečně odhalují varianty genetické informace, a proto jsou nejpoužívanějším typem. Vycházejí z různých typů mutací

a obvykle se vyskytují v nekódujících oblastech. Využívají se například pro sestavování vazbových map (Collard a kol., 2005).

Knoll a Vykoukalová (2002) dále třídí DNA markery podle využití v mapování genomu, a to do těchto podtypů:

- markery kódující exprimované geny (sem patří kandidátní geny pro QTL), které mají nízkou hladinu polymorfizmu, ale významně se uplatňují při komparativním mapování;
- markery s vysoce variabilní sekvencí DNA, zejména mikrosatelity a minisatelity (repetitivní sekvence genomu), které tvoří data pro populační studie a při určování rodičovství;
- jednonukleotidové polymorfizmy (single-nucleotide polymorphism – SNP).

SNP znamená variantu (mutaci) jediného nukleotidu. Postihnout může jak kódující, tak nekódující sekvenci – formou inserce, delece či substituce (tranzice či transverze). Valná většina SNP je bialelická, takže v populaci se objevují tři genotypy. O SNP se zpravidla mluví pouze v případě, že se všechny varianty vyskytují alespoň s 1% frekvencí. SNP coby markery přinášejí velké výhody: jsou bohatě zastoupeny napříč celým genomem; vykazují vysokou stabilitu, opakovatelnost a přesnost; genotypování s jejich pomocí probíhá poměrně rychle; v případě kodominance efektivně odlišují heterozygoty od homozygotů. Také díky těmto přínosům se SNP po RFLP a SSR staly třetí generací mezi markerovými technologiemi (Yang a kol., 2013).

3.3.2 QTL

Zmíněné mapování genomu (pomocí vazbových map), v němž hrají markery nezastupitelnou roli, je předpokladem pro identifikaci lokusů kvantitativních vlastností (quantitative trait loci – QTL). Tyto lokusy, přesněji jejich polymorfizmy, ovlivňují kvantitativní vlastnosti. Jelikož se mnohé kvantitativní vlastnosti přímo promítají do ekonomiky produkce, takové vlastnosti se označují rovněž jako lokusy ekonomicky významných vlastností (economic trait loci – ETL). Znalost QTL pak umožňuje zkoumání genů, které mohou být zodpovědné za určitou vlastnost – tzv. kandidátních genů. V živočišné produkci se k hledání kandidátních genů uplatňuje zejména komparativní mapování, které využívá poznatků z genomů jiných živočišných druhů (Steinhauser a kol., 2000; Collard a kol., 2005).

U prasat bylo k prosinci minulého roku nalezeno a zveřejněno 26 076 QTL, a to v souvislosti s 647 různými vlastnostmi. Více jak polovina těchto QTL přitom spadá mezi QTL ovlivňující produkční užitkovost (Animal Genome, 2017).

3.3.3 Kandidátní geny využívané ve šlechtění prasat

3.3.3.1 RYR1

Už více jak 25 let se ve šlechtění prasat k hledání kandidátních genů, které by mohly mít vliv na důležité (produkční) vlastnosti, využívá konzervované syntenie s ostatními druhy savců, tedy především s lidmi. Prvním příkladem úspěšné aplikace této metody je identifikace genu ryanodinového receptoru 1 (*RYR1*), jenž už nyní nese označení příčinný gen (Rothschild a Ruvinsky, 2011).

Tento gen, nazývaný také jako halotanový gen (*HAL*) či gen vápníkového kanálu (*CRC*), tvoří v membráně sarkoplazmatického retikula kosterního svalu receptory pro kalcitové kanály, takže se podílí na svalové kontrakci (Ma a kol., 1988). Mutace v pozici 615, kvůli níž příslušný triplet namísto argininu kóduje cystein, je zodpovědná za prasečí stresový syndrom (PSS), nebo jinými slovy za syndrom maligní hypertermie, který působí producentům vepřového masa výrazné ekonomické ztráty (Fujii a kol., 1991).

Polymorfismus Cys615 je pro *RYR1* označován jako recesivní alela, tedy malé *n*. Homozygotně recesivní jedinci (*nn*) však oproti heterozygotům (*Nn*) nebo dominantním homozygotům (*NN*) vykazují větší zmasilost, což v minulosti vzhledem k důrazu na podíl libové svaloviny vedlo k výraznému zvýšení frekvence recesivní alely – především u supermasných plemen jako Pietrain nebo Belgická landrase. Bylo tak potřeba vyšlechtit stres-rezistentní linie (Stupka a kol., 2009).

3.3.3.2 PRKAG3 (RN)

Gen nekatalytické $\gamma 3$ podjednotky adenosinmonofosfátem aktivované proteinkinázy (*PRKAG3*) může mít na kvalitu masa podobný účinek jako *RYR1*. Protein kódovaný tímto genem reguluje proteinkinázu, která v odpovědi na stres usměrňuje metabolické dráhy v buňce (NCBI, 2018). Pro *PRKAG3* často bývá jako synonymum používán název *Rendement Napole* (*RN*), ovšem ten v podstatě zahrnuje jen dvě z alel *PRKAG3*. Dominantní alela (vznikající v důsledku p.Arg200Gln v *PRKAG3*) nese zkratku RN^- a recesivní (p.Ile199Val) rn^+ (Andersson, 2003; Enfält a kol., 2006; Rothschild a Ruvinsky, 2011).

Nositelé dominantní alely RN^- produkují maso světlejší barvy a nižší vaznosti než jedinci s recesivní alelou rn^+ , což je pravděpodobně důsledkem vyššího ukládání glykogenu do svalů

(Hamilton a kol., 2000). Obsah glykogenu kvůli přítomnosti alely RN^- roste až o 70 % (Rothschild a Ruvinsky, 2011).

Studie RN probíhaly hlavně u plemene Hampshire, protože i když maso z těchto zvířat mělo *post mortem* obvyklý pokles pH, vykazovalo sníženou kvalitu. To vědce vedlo k závěru, že někteří jedinci plemene Hampshire mají extrémní glykolitický potenciál, a proto se také v literatuře mluví o tzv. Hampshire efektu (McKeith a kol., 1998).

3.3.3.3 CAST

Calpastatin (*CAST*) působí jako inhibitor proteáz μ - a m -calpainu a jeho aktivita patrně souvisí s křehkostí a šťavnatostí masa, protože calpainy během posmrtných změn katalyzují degradaci bílkovin (Rothschild a Ruvinsky, 2011). Demonstrovali to například Ciobanu a kol. (2004), kteří srovnali mj. tři haplotypy v populaci třígeneračních kříženců Berkshire x Yorkshire, a to podle polymorfizmů Arg249Lys a Ser638Arg. Vzorky nejčastěji zastoupeného haplotypu 249Lys-638Arg vykázaly nejlepší výsledky díky asociaci s vyšším pH, křehkostí a šťavnatostí a nižší silou stříhu a ztrátou při vaření.

Nonneman a kol. (2011) v sekvenci *CAST* našli 194 SNP, z nichž čtveřice (EU137105; 67853_270 – pozice 48309, 67855_230 – pozice 48699, 67855_289 – pozice 48759 a 77013_98 – pozice 49228) byla rovněž ve významné asociaci s křehkostí masa. Při měření síly stříhu tyto SNP svým vlivem dokonce předčily výše jmenované polymorfizmy.

3.3.3.4 IGF2

Inzulinu podobný růstový faktor 2 (*IGF2*) stejně jako *IGF1* interaguje s růstovým hormonem (*STH*), takže zasahuje do mnohých aspektů savčího vývoje. Vzhledem k vlivu na myogenezi byl *IGF2* intenzivně zkoumán i u prasat. Tento gen se exprimuje v závislosti na tkáni: zatímco v játrech nebo v mozku jsou funkční obě alely, v ledvinách a ve svalech se exprimuje pouze paternální alela. V tomto smyslu je kladen důraz na SNP ve třetím intronu (g.3072G>A), kdy alela *A* v řadě populací měla výrazně pozitivní efekt na vlastnosti *JUT*. Avšak v případě zastoupení *IMF* na vykázal mnohem lepší výsledky genotyp *GG* (Oczkowicz a kol., 2012).

Prvotní studie z konce minulého tisíciletí uvádějí, že tento lokus vysvětluje 15–30 % fenotypového rozptylu v množství čisté svaloviny a 10–20 % v rozptylu tloušťky hřbetního tuku (Jeon a kol., 1999; Nezer a kol., 1999).

3.3.3.5 LEP

Leptin (LEP) je secernován adipocyty v odpovědi na hmotnostní nebo energetické změny v organismu, pročež se zapojuje do regulace příjmu živin či energetického výdeje prostřednictvím řady účinků na neuroendokrinní systém (Barb a kol., 2001). Mediátorem tohoto proteinu jsou specifické receptory (LEPR). Jak *LEP*, tak *LEPR* je proto asociován s reprodukčními i produkčními ukazateli v chovech prasat (Chen a kol., 2004).

De Oliveira a kol. (2006) provedli asociační analýzu u pěti SNP v *LEP* (sekvence GenBank U66254; C798T, T2411C, T3266G a T3469C) a doporučili jejich další zkoumání pro potenciální markerové využití. Silnou asociaci našli například mezi p.C798T a počtem struků nebo mezi p.T3469C a růstovými vlastnostmi.

3.3.3.6 CYP2E1

Jaterní cytochrom P450 2E1 (zkr. CYP2E1) je zapojen především do látkové přeměny etanolu a řady nízkomolekulárních xenobiotik. Mezi QTL prasat se objevuje proto, že patrně může sloužit jako marker pro kančí pach. Skatol totiž indukuje expresi tohoto genu a jeho enzym má za úkol právě hladinu skatolu redukovat. Avšak pokud CYP2E1 nefunguje správně, neodbouraný skatol se ukládá v tukové tkáni. Zvířata s vysokým obsahem skatolu v tuku navíc mívají i vyšší hladiny androstenonu. Androstenon možná hraje v expresi CYP2E1 takovou úlohu, že působí jako antagonist indukce CYP2E1 skatolem, pročež se skatolu zase otevírá cesta k akumulaci do tukové tkáně. Tudíž je u některých zvířat vysoká akumulace skatolu důsledkem vysoké produkce androstenonu (Doran a kol., 2002).

Zadinová a kol. (2017) hledali vztah mezi SNP (g.2412C>T, c.1422C>T, c.1423G>A a c.*14G>T) a hladinou skatolu, androstenonu i indolu. Významnou asociaci odhalili pouze v případě indolu, vliv na skatol byl méně průkazný a asociaci s androstenonem nepotvrdili.

3.3.4 Molekulárně-genetické metody

K tomu, aby šlechtitelé mohli využít genetické markery nebo rovnou genetické mapy, bylo zapotřebí vyvinout snadno proveditelné molekulárně-genetické metody. Tyto metody slouží mj. DNA diagnostice, která pracuje s bodovými i repetitivními polymorfizmy (Knoll a Vykoukalová, 2002).

3.3.4.1 Izolace DNA

Nukleové kyseliny lze teoreticky izolovat z jakékoliv tkáně, jejíž buňky obsahují jádro. Při procesu extrakce se vyskytují tři univerzální kroky: lýza buněk, odstranění proteinů a jiných

buněčných zbytků a zpřístupnění DNA v roztoku. K lýze se obvykle používá pufrů s proteinkinázami či dodecylsíránem sodným, což jsou látky, které narušují a zpracovávají buněčné a jaderné membrány. K odstranění nežádoucích buněčných komponent může sloužit srážení, absorpce DNA do různých nosičů nebo přidání roztoku s organickou a vodní fází, takže proteiny a lipidy se rozpustí v organické fázi a DNA jsou navázány ve vodní. Ve třetím a posledním kroku jsou DNA převedeny do odpovídajícího pufru (např. tris-EDTA) nebo do ionizované vody. Toho lze docílit přidáním etanolu nebo isopropanolu, který spouští vysrážení DNA, a následnou centrifugací (Lefferts a Lefferts, 2016).

3.3.4.2 PCR

Pro většinu metod v molekulárních analýzách je zapotřebí získat jednotlivá vlákna nukleových kyselin, k čemuž slouží tzv. denaturace a hybridizace, a často navíc také velké množství těchto vláken (nebo lépe řečeno jejich úseků). Proto se vyvinutí polymerázové řetězové reakce (polymerase chain reaction – PCR) stalo klíčem k objevení a aplikaci dalších technik (Lefferts a Lefferts, 2016).

Amplifikace specifické části genomu pomocí PCR probíhá díky opakujícím se procesům v cyklu. Tento přístroj dokáže rychle měnit teploty a po 20–40 cyklech tak lze získat i miliardu kopií vybraného úseku. Základními procesy PCR jsou:

1. Denaturace DNA, kdy obvykle při 92–96 °C dochází k rozpletení dvoušroubovice.
2. Hybridizace (annealing) primerů, což jsou krátké řetězce DNA (20–25 nukleotidů), které díky unikátní komplementaritě vymezují potřebný úsek. Tento krok probíhá při teplotě 45–65 °C.
3. Elongace (syntéza) řetězců působením termorezistentní DNA-polymerázy (72 °C). Ta nasedá na 3'-OH konce navázaných primerů a ve směru 5'→3' prodlužuje řetězec připojováním nových nukleotidů. Po každém cyklu se tak počet fragmentů DNA zdvojnásobí (Kočárek, 2008).

3.3.4.3 RFLP

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism – RFLP) slouží k identifikaci alel, a to na základě přítomnosti nebo absence specifického restrikčního místa v řetězci. Toto místo rozpoznávají restrikční endonukleázy, které pak štěpí DNA uvnitř nebo blízko rozpoznávací sekvence. Ta mívá délku několik nukleotidů a je oboustranně symetrická (v témže směru je sekvence stejná u obou komplementárních vláken).

Tato metoda je ovšem sama o sobě poměrně pracná, proto se využívá její modifikace PCR-RFLP. Vznikají tak fragmenty DNA, které se liší svou velikostí. Díky této skutečnosti je pak lze separovat a vizualizovat pomocí elektroforézy (Knoll a Vykoukalová, 2002).

3.3.4.4 Elektroforéza

Elektroforéza je fyzikálně-chemická metoda pro dělení látek v elektrickém poli. V elektroforézové vaně se nachází pufr a gel s jamkami pro DNA a díky zdroji stejnosměrného napětí pak DNA migruje směrem k anodě. Molekuly větší velikosti procházejí gelem pomaleji, takže se po uplynutí určitého času (např. 15 minut) vytvářejí patrné odstupující mezi akumulovanými molekulami se stejnou velikostí. Gel se obvykle připravuje z agarózy nebo polyakrylamidu, který má lepší homogenitu a vyšší rozlišovací schopnost.

Aby byly vzniklé shluky molekul viditelné, je před samotnou separací potřeba použít ještě další látky. K barvení vzorků nejčastěji slouží fluorescenční ethidiumbromid, který má schopnost se vmezeřovat do vlákna DNA, a výsledky pak odhaluje UV-lampa. Existují ovšem i další fluorescenční barviva (GelRed, GelGreen) a dále je možné značit molekuly stříbrem nebo radiokativními izotopy (Knoll a Vykoukalová, 2002).

3.4 MC4R

Gen pro melanokortin 4 receptor (*MC4R*) kóduje tvorbu stejnojmenného proteinu, který patří mezi membránové receptory (NCBI, 2018). Konkrétněji se řadí k tzv. receptorům spojeným s G-proteiny, pro něž je charakteristický polypeptidový řetězec procházející sedmkrát lipidovou dvojvrstvou buňky. V případě MC4R platí, že hormon, jakožto první signální molekula, v receptoru stimuluje konformační změnu, která předává signál dál aktivací adenylátcyklázy. Adenylátcykláza zodpovídá za syntézu cyklického AMP (cAMP), druhého buněčného posla, jenž vyvolává mj. aktivaci A-kinázy. Ta pak fosforyluje genové regulační proteiny, které konečně spouštějí transkripci příslušného genu (Alberts a kol., 1998).

Receptory MC4 se nacházejí v mozku a zřejmě působí na energetickou homeostázi organismu, neboť ovlivňují příjem potravy. Na základě studií zejména na hlodavcích byly u MC4R popsány interakce s agonistou alfa-melanocyty stimulujícím hormonem (alfa-MSH) a antagonistou agouti-related peptidem (AGRP). Zatímco alfa-MSH, derivát POMC, vyvolával anorektický efekt, sekrece AGRP v hypotalamu tento účinek blokovala, a tudíž byl AGRP spojen hyperfagií (Ollmann a kol., 1997; Barb a kol., 2004). NCBI (2018) navíc uvádí interakci s adrenokortikotropním hormonem (ACTH).

Zvýšená pozornost se na gen *MC4R* zaměřila v 90. letech, a to v rámci molekulárně-genetických výzkumů týkajících se obezity u lidí (Hinney a kol., 2013; Tao, 2010). Farooqi a kol. (2003) uvádějí, že nedostatečnost *MC4R* je nejběžnější monogenní formou obezity. Poukázali na to ve svém výzkumu, kdy ve vzorku 500 lidí, kteří se v dětství potýkali s obezitou, našli 29 jedinců (5,8 %) s mutací ve vybraných 100 alelách genu. Tito jedinci trpěli těžkou obezitou, hyperfagií či hyperinzulinémií. Hinney a kol. (2013) taktéž došli k závěru, že snížená aktivita *MC4R* vede k obezitě. V té době bylo popsáno už 166 mutací. Siljee a kol. (2018) shrnuli, že mutace v *MC4R* jsou příčinou 3–5 % případů vážné obezity.

3.4.1 Prasečí MC4R

Vzhledem k výše popsanému vlivu tučnosti na užitek a kvalitu masa prasat se gen *MC4R* začal podrobně zkoumat také u tohoto živočišného druhu. V prasečím genomu se *MC4R* nachází na chromozomu 1 q22–q27 (Kim a kol., 2000b). Asociační analýzy se zpravidla zaměřují na polymorfismus Asp298Asn, marginálně na p.Arg236His. Identifikovány ovšem byly i další jednobodové mutace: c.175C>T (Leu59Leu), c.-780C>G, c.-135C>T, c.175C>T, c.*430A>T (Kim a kol., 2004; Fan a kol., 2009; Fontanesi a kol., 2013).

3.4.2 Polymorfismus Asp298Asn

3.4.2.1 Růst, příjem krmiva, tučnost

Missense mutace, kterou způsobuje záměna adeninu za guanin v pozici c.892 (příslušný kodon tak místo kyseliny asparagové kóduje asparagin, proto p.Asp298Asp, nebo také D298N), je asociována především s růstovými vlastnostmi a příjmem krmiva. Zatímco varianta Asp298 (alela *G*) vede k normální signalizaci MC4R na adenylátcyklázu a tedy může stimulovat akumulaci cAMP, varianta Asn298 (alela *A*) je u prasat funkčně inaktivní – pokud nedojde ke změně vazby s agonistou či změně v expresi buněčného povrchu. Jelikož se selekce u moderních plemen prasat zaměřovala na co nejvyšší růst v podmínkách krmení *ad libitum*, tato plemena (např. Duroc a Hampshire) vykazují vysokou frekvenci alely *A*, tedy varianty Asn298. Naopak v případě pomalu rostoucích plemen, u nichž taková selekce prováděna nebyla (např. Meishan a prase divoké), je kompletně zafixována alela *G* (Kim a kol., 2004).

To potvrdili i Ciobanu a kol. (2001), když se zaměřili na genetické srovnání rumunských plemen Mangalica a Bazna. Mangalica je primitivní sádelné pomalu rostoucí plemeno, kdežto plemeno Bazna, které vzniklo křížením Mangalice s Berkshire, vykazuje rychlejší růstovou schopnost s větší žravostí. U 40 testovaných zvířat Mangalica se alela *A* vyskytovala jen s frekvencí 0,09, kdežto u 62 zvířat plemene Bazna měla tato alela frekvenci 0,45.

Piorkowska a kol. (2010) zase srovnali frekvence u zvířat plemen Pietrain a Duroc, neboť tato plemena se značně liší podílem tuku v JUT. U plemena Pietrain, které se šlechtí na vysoký podíl libového masa, měla alela *A* frekvenci 0,08. Oproti tomu prasata tučnějšího plemene Duroc vykazovala frekvenci 0,69. Tato studie dále potvrdila asociaci alely *A* se zvýšeným příjmem krmiva, vyšším přírůstkem i větší tloušťkou hřbetního tuku.

Pro možné využití *MC4R* jako markeru tučnosti, příjmu krmiva či přírůstku kvůli p.Asp298Asn hovoří rovněž tyto studie: Houston a kol. (2004); Bruun a kol. (2006); Burgos a kol. (2006); Jokubka a kol. (2006); Meidtner a kol. (2006); Óvilo a kol. (2006); Van den Maagdenberg a kol. (2007); Dvořáková a kol. (2011); Fontanesi a kol. (2013); Kwon a kol. (2015); Szyndler-Nedza (2016).

Fan a kol. (2009) však upozorňují, že asociace s p.Asp298Asn některé studie nepotvrdily, což by mohlo být důsledkem efektů dalších a dosud neprozkoumaných SNP v *MC4R*. Například Stachowiak a kol. (2005) při testu s 679 prasničkami prokazatelnou korelaci mezi p.Asp298Asn a výší příjmu krmiva či tloušťkou hřbetního a břišního tuku nezaznamenali.

3.4.2.2 Kančí pach

Dále by tento SNP mohl najít uplatnění při selekci na kančí pach. Zřejmě s první podobnou studií přišli Schroyen a kol. (2015), když z 1647 poražených kanců vybrali 105, u jejichž tukové tkáně provedli senzorické zkoušky a chromatograficky určili obsah androstenonu, skatolu a indolu. Výsledky ukázaly silnou asociaci mezi polymorfizmem a chuťovými vlastnostmi, avšak průkazná asociace s obsahem jmenovaných látek nalezena nebyla. Závěrem tedy bylo konstatování, že p.Asp298Asn by v případě selekce na kančí pach mohl pomoci nepřímo: ovlivněním akumulace tuku.

Van den Broeke a kol. (2015b) však tuto asociaci našli: kanci genotypu AA měli v tuku výrazně vyšší koncentrace androstenonu, skatolu i indolu než kanci GG, nicméně při senzorické analýze se rozdíly neprojevíly.

Van den Broeke a kol. (2015a) následně k podobným závěrům došli také při sledování koncentrace látek v plazmě. Kanci GG vykázali výrazně nižší koncentrace skatolu a indolu, v případě androstenonu a testosteronu se vliv polymorfizmu neprojevil. Z toho důvodu tato studie představila hypotézu, že nižší příjem krmiva u kanců GG vede k nižší produkci tryptofanu ve střevě, a tudíž k nižší produkci skatolu a indolu. Zároveň se ukázalo, že selekce za pomoci p.Asp298Asn by mohla mít přesah do etologie zvířat, neboť u kanců i prasniček genotypu GG bylo pozorováno hravější chování. To vedlo k častějším výskytům kožních lézí.

3.4.2.3 Další faktory

Vzhledem k asociaci s ukládáním tuku některé studie sledují i podíl IMF u jednotlivých genotypů. Han a kol. (2007), Schwab a kol. (2009), Van den Maagdenberg a kol. (2007) či Choi a kol. (2016) naměřili nejvyšší procento IMF u jedinců AA, naopak Piorkowska a kol. (2010) navzdory svým předpokladům našli nejvíce IMF u genotypu GG, ačkoliv stejně jako předchozí studie použili sval *longissimus*.

Hong a kol. (2015) p.Asp298Asn pak uvedli mezi SNP, jež mohou mít vliv na složení mastných kyselin v mase. Alela G byla v korelaci s vyšším zastoupením mononenasycených mastných kyselin (MUFA), které v tukové tkáni snižují bod tání, což přispívá k chutnosti a křehkosti masa. Ke stejnému výsledku dospěli také Choi a kol. (2016). Jejich data navíc ukazují, že vzorky ze zvířat GG měly téměř o 2 % vyšší množství nenasycených mastných kyselin (UFA) než AA.

V případě pH či barvy (světlosti) masa se v různých populacích vyskytovaly velmi nekonzistentní závěry (Van den Maagdenberg a kol., 2007; Piorkowska a kol., 2010; Rohrer a kol., 2012; Choi a kol., 2016).

3.4.3 Polymorfismus Arg236His

Tento polymorfismus (záměna adeninu za guanin v pozici c.-707) byl dosud zkoumán jen okrajově. Fan a kol. (2009) ho asociovali s průměrným denním přírůstkem a tučností, kdy zvířata genotypu *GG* vykazovala nejrychlejší růst. Tato studie nadto doporučila další zkoumání p.Arg236His pro možnou interakci (vazbovou nerovnováhu) s p.Asp298Asn. Roh a kol. (2012) pak na vzorku 484 prasat našli významnou asociaci s tučností či barvou masa.

Polymorfismus Arg236His našli rovněž Dvořáková a kol. (2011) v populaci českých hybridů, avšak protože se alela *A* objevila pouze s frekvencí 0,03, asociační analýza provedena nebyla. Ze stejného důvodu Fontanesi a kol. (2013) uvedli, že pro potvrzení či vyvrácení vlivu p.Arg236His budou potřeba další, průkaznější studie.

4 Materiál a metody

4.1 Zvířata

Do sledování bylo zahrnuto 49 kanců hybridní linie Bílé otcovské x (Landrace x Bílé ušlechtilé). Zvířata byla ustájena v testovací stanici KSZ v Ploskově u Lán. Výživa zvířat byla upravena podle norem potřeby živin (Šimeček a kol., 2000) jednotnou kompletní krmnou směsí (KKS), jejíž výživová hodnota byla kontinuálně přizpůsobována v závislosti na věku a hmotnosti zvířat. Všechna zvířata byla krmena adlibitně.

4.2 Jatečný rozbor

Kanci byli poraženi ve 148 dnech věku při dosažení průměrné živé hmotnosti 110 kg, načež byl proveden kompletní jatečný rozbor (Walstra a Merkus, 1995). Sledovány byly následující ukazatele:

- Hmotnost pravé jatečné půlky JUT (kg)
- Hmotnost hlavních masitých částí (HMČ), tj. kýty, kotlety, plece a krkovice (kg)
- Podíl svaloviny (%) – metodou ZP
- Výška hřbetního tuku (mm) – průměr měření nad prvním hrudním, posledním hrudním a prvním bederním obratlem
- pH 45 minut *post mortem* – vpichovým pH metrem 330i (WTW) za posledním žebrem v *musculus longissimus lumborum et thoracis* (MLLT)
- Elektrická vodivost (EV) 50 minut *post mortem* – konduktometrem

4.3 Laboratorní rozbor

4.3.1 Stanovení hladiny androstenonu, skatolu a indolu

Pro stanovení hladin složek kančího pachu byla použita metodika podle Hansena-Møllera (1994). 24 hodin *post mortem* byl mezi prvním a třetím krčním obratlem odebrán vzorek s tukovou a svalovou tkání, který byl následně zavakuován a zmrazen na -80 °C. Androstenon, skatol a indol byly derivatizovány pomocí dansylhydrazinu v autosampleru Jasco AS 2059 Plus (Tokio, Japonsko) a přeneseny do kolony Kinetex (Torrance, USA) 5 μ C18 100 a (50 x 4,60 mm). Záznamy byly vyhodnoceny v programu ChromNAV (Tokio, Japonsko) a kvantifikovány na základě retenčních časů známých ze standardů androstenonu a skatolu.

4.3.2 Izolace DNA

Vzorky DNA byly získány z krve odebrané při porážce. Izolace byla provedena pomocí izolačního kitu Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell). Po každé izolaci byla přítomnost DNA kontrolována pomocí elektroforézy na 1% agarozovém gelu. Získaná DNA byla uchovávána při -20 °C.

4.3.3 PCR-RFLP

V PCR byly aplikovány primery pro testování p.Asp298Asn a p.Arg236His, které ve svých pracích využili Kim a kol. (2000b) a Meidtner a kol. (2006) (Tabulka 1). Celkový objem reakční směsi pro PCR byl 25 µl s využitím: 15,8 µl H₂O, 2 µl MgCl₂, 2,5 µl standartního reakčního pufru, 0,5 µl dNTP, 0,5 µl DMSO, 1 µl každého z dvojice primerů (A+B pro p.Asp298Asn a C+D pro p.Arg236His) a 1 µl LA polymerázy (Top-Bio). PCR reakce probíhala dle následujících podmínek:

95 °C	2 min	}	30 cyklů
95° C	30 s		
55° C	30 s		
68° C	30 s		
68° C	5 min		

Pro štěpení, které trvalo zhruba 4 h, byly použity polymerázy *TaqI* (65 °C) a *MwoI* (37 °C).

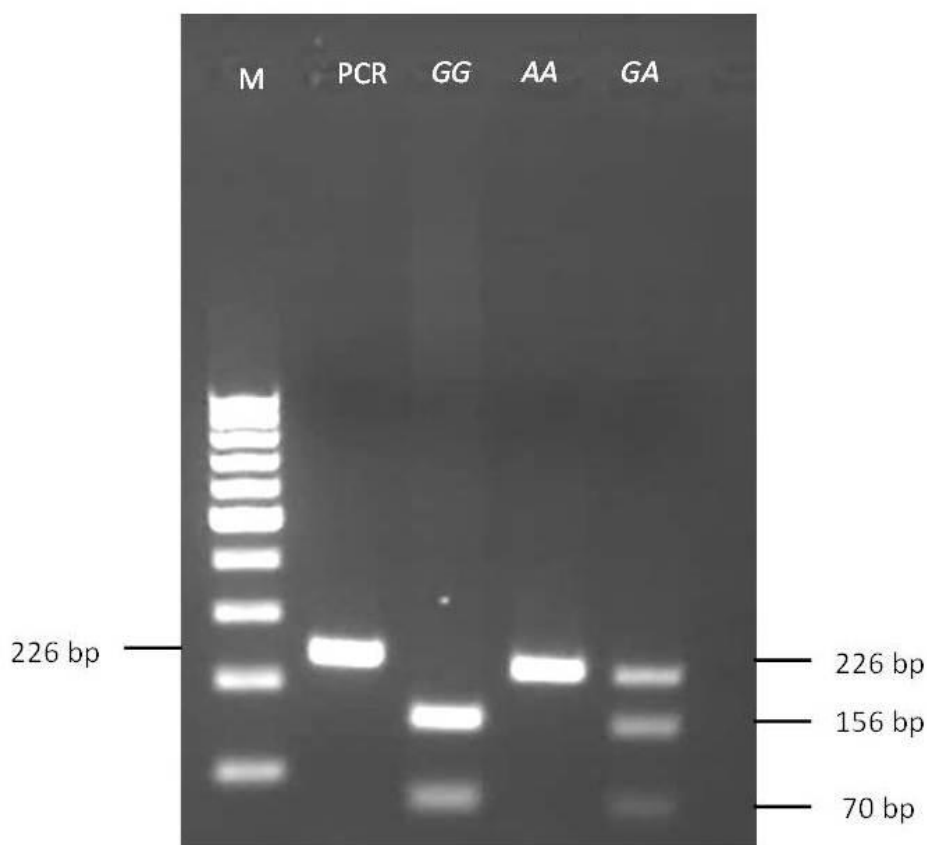
Tabulka 1: Primery a reakční podmínky pro amplifikaci fragmentů MC4R a následné štěpení restričními enzymy

Primer	Sekvence (5'–3')	Umístění	Délka fragmentu (bp)	MgCl ₂ (mM)	Ta (°C)	Prodloužení (s)	Metoda
MC4R-A	TAC CCT GAC CAT CTT CAT TG	Exon 1	226	2	55	30	RFLP (<i>TaqI</i>) A 226 / G 70+156
MC4R-B	ATA GCA ACA GAT GAT CTC TTT G						
MC4R-C	GGC CAG ACT CCA CAT TAA GAG	Exon 1	117	2	55	30	RFLP (<i>MwoI</i>) A 117 / G 51 +66
MC4R-D	CAG ACC ACA AAG ACG CCA AT						

4.3.4 Elektroforéza

Vzorky po štěpení restrikními enzymy byly přeneseny na 1,5% agarózový gel a pro jejich průchod gelem bylo do aparatury puštěno napětí 230 V po dobu 20 minut. Snímky (Obrázek 1) byly pořízeny za pomoci UV lampy (MiniBis Pro).

Obrázek 1: Snímek z UV lampy – 1,5% agarózový gel se vzorky p.Asp298Asn v genu *MC4R* po elektroforéze



M = DNA žebřík; PCR = kontrolní vzorek po PCR; GG/AA/GA = vzorek po štěpení

4.4 Asociační analýza

Asociační analýza byla provedena pomocí zobecněného lineárního modelu (GLM) v programu SAS (Statistical Analysis System, Inst. Verze 9.4, 2012, SAS Institute, Cary, NC, USA). Tento model zahrnoval genotyp podle *MC4R* jako pevný efekt. V Tabulce 2 je uveden průměr (\bar{x}), směrodatná odchylka (σ) a významnost (p-hodnota). Zvolená hladina významnosti měla hodnotu $\alpha = 0,05$. Byl hodnocen vliv genotypu na: porážkovou hmotnost, hmotnost pravé půlky JUT, HMČ, výšku hřbetního tuku, pH, elektrickou vodivost a obsah androstenonu, skatolu a indolu.

5 Výsledky

Ze 49 zvířat testovaných na p.Asp298Asn bylo 13 genotypu GG, 20 GA a 16 AA, takže alela G se vyskytovala s frekvencí 0,47 a alela A s frekvencí 0,53. Pomocí GLM byla mezi genotypy a vybranými ukazateli provedena asociační analýza, jejíž výsledky znázorňuje Tabulka 2. Naopak u p.Arg236His asociační analýza vytvořena nebyla, jelikož se v populaci vyskytla jen jedna alela (G).

Tabulka 2: Vliv p.Asp298Asn v genu *MC4R* na vybrané ukazatele užitekivosti

ukazatel	GG (n = 13)	GA (n = 20)	AA (n = 16)	p-hodnota
	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	$\bar{x} \pm \sigma$	
<i>Kvantitativní znaky jatečné hodnoty</i>				
porážková hm. (kg)	107,48 ^A ± 11,38	108,10 ^A ± 6,98	114,56 ^B ± 7,42	0,042
pravá půlka JUT (kg)	41,40 ± 4,72	41,38 ± 2,48	43,70 ± 2,70	0,079
zmasilost (%)	59,65 ± 1,18	59,59 ± 1,15	59,70 ± 1,23	0,963
hřbet. tuk (mm)	18,25 ± 2,66	18,02 ± 2,28	19,22 ± 1,72	0,259
HMČ (kg)	21,48 ^A ± 2,42	21,46 ^A ± 1,31	22,79 ^B ± 1,16	0,037
HMČ (% z JUT)	52,46 ± 1,37	52,50 ± 1,39	52,79 ± 1,70	0,793
<i>Kvalitativní znaky jatečné hodnoty</i>				
pH45	6,31 ± 0,34	6,49 ± 0,26	6,56 ± 0,27	0,071
EV50	3,93 ± 0,46	3,73 ± 0,45	3,66 ± 0,44	0,252
androstenon (μg/g) ¹	2,888 ± 2,522	3,012 ± 2,975	4,641 ± 5,863	0,405
indol (μg/g) ¹	0,047 ± 0,052	0,057 ± 0,066	0,053 ± 0,026	0,865
skatol (μg/g) ¹	0,089 ± 0,118	0,064 ± 0,088	0,064 ± 0,058	0,689

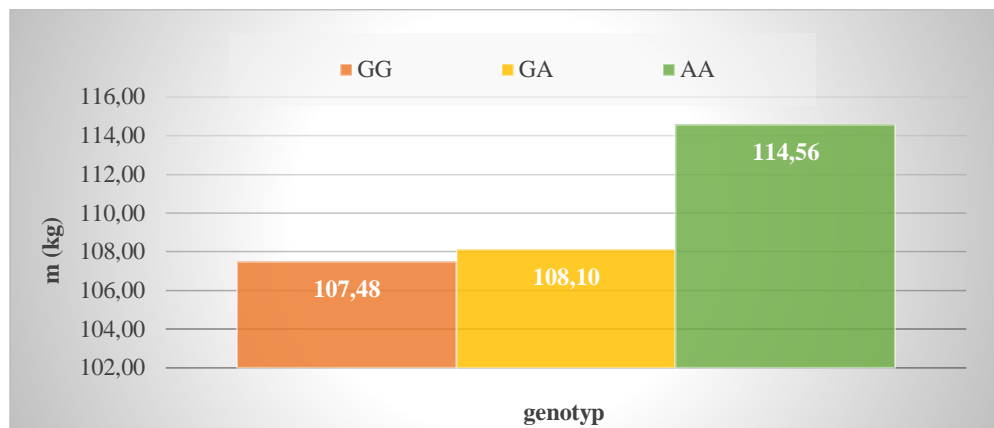
n = počet zvířat; HMČ = kýta, plec, krk, kořena; pH45 = měřen 45 min po porážce; EV50 = měřena 50 min. po porážce; ¹ = stanoveno v tuku; ^{A,B} = diference mezi třídami (pokud je p-hodnota < 0,05)

Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) byly zjištěny u porážkové hmotnosti (Graf 1) a HMČ (Graf 2). V obou těchto ukazatelích se projeví poměrně výrazné rozdíly mezi genotypem AA a GA či GG, přičemž nejvyšších průměrných hmotností dosáhli právě jedinci AA. K hladině 0,05 se se stejným trendem blížily rovněž průměrné hmotnosti JUT (Graf 3).

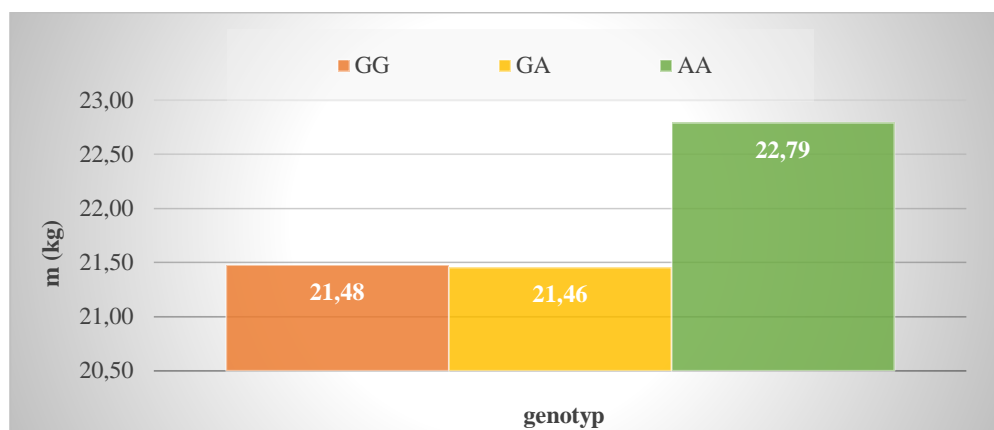
Tloušťka hřbetního tuku byla rovněž nejvyšší u genotypu AA, a to s patrným odstupem, avšak v tomto případě už byly výsledky statistiky neprůkazné. Analýza neodhalila ani vliv na zmasilost a podíl HMČ z JUT.

Z kvalitativních ukazatelů se hladině významnosti přiblížily pouze hodnoty pH45. Porovnání genotypů GG a AA vykazovalo dokonce statistickou průkaznost ($p < 0,05$). Naopak výsledky měření EV50 a obsahu látek způsobujících kančí pach v tukové tkáni statisticky průkazné asociace neodhalily.

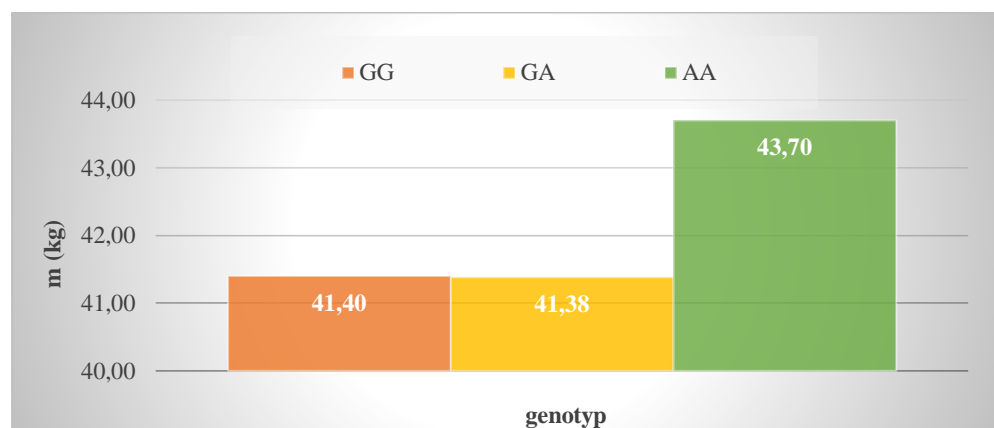
Graf 1: Vliv p.Asp298Asn v genu *MC4R* na porážkovou hmotnost



Graf 2: Vliv p.Asp298Asn v genu *MC4R* na hmotnost hlavních masitých částí



Graf 3: Vliv p.Asp298Asn v genu *MC4R* na hmotnost pravé půlky JUT



6 Diskuse

V den porážky měli nejvyšší průměrnou živou hmotnost kanci AA (genotyp podle p.Asp298Asn), což odpovídá předpokladům, které plynou z výsledků jiných studií. Například Van den Maagdenberg a kol. (2007), Piorowska a kol. (2010) či Van den Broeke a kol. (2015b) demonstrovali odlišnosti v růstové schopnosti tak, že poráželi zvířata postupně až po dosažení určité hraniční hmotnosti (tj. nehledě na jejich věk), což znamenalo, že u zvířat genotypu AA byla průměrná délka výkrmu nejkratší.

Analýza hmotnosti pravé poloviny JUT sice projevila méně průkazné rozdíly, ale vzhledem k jasné korelaci mezi tělesnou hmotností a hmotností JUT lze tento výsledek považovat spíše za odchylku způsobenou poměrně malým vzorkem zvířat. Dokresluje to i skutečnost, že rozdíly v průměrných hmotnostech HMČ byly statisticky průkazné ($p < 0,05$). Tato práce tedy podporuje hypotézu, že p.Asp298Asn působí na růstovou schopnost prasat.

Naopak neprůkazná byla asociace genotypu AA s větší tloušťkou hřbetního tuku, byť kanci AA měli oproti GG vrstvu sádla průměrně o cca 1 mm vyšší. Je tedy možné, že i tyto výsledky ovlivnil nízký počet zvířat, protože převážná část studií – jako Kim a kol. (2000a), Houston a kol. (2004), Óvilo a kol. (2006) či Fontanesi a kol. (2013) – zdůrazňuje právě vliv na výšku hřbetního tuku. Na druhou stranu v některých populacích (Stachowiak a kol., 2005) i navzdory mnohem většímu počtu zvířat tento efekt odhalen nebyl.

Autoři dřívějších studií také zpravidla zmiňují, že alela A působí negativně na zmasilost. Asociační analýza v této práci však možný efekt alely A na zmasilost neodhalila.

Z ukazatelů kvality masa se statistické významnosti přiblížil pouze pH. Na první pohled se může zdát, že alela A hodnotu pH zvyšuje, jenže výsledky jiných prací ukazují, že takový závěr by byl přinejmenším sporný. Korelace p.Asp298Asn s pH je proto možná náhodná.

Možnost uplatnění *MC4R* jako markeru pro kančí pach tato práce nepodpořila. Nicméně další výzkum by mohl být velkým přínosem, a to s ohledem na důležitost problematiky a rovněž na výsledky Van den Broeke a kol. (2015a a 2015b), kteří došli k opačným závěrům možná kvůli využití většího počtu zvířat odlišné populace, jiných podmínek výkrmu či odlišné metodiky.

7 Závěr

Tato práce měla za cíl otestovat vhodnost využití genu *MC4R* jako markeru pro užitkové vlastnosti prasat, především pak s ohledem na růstovou schopnost a zmasilost. Tento gen zasahuje do regulace příjmu potravy, a proto by jeho polymorfizmy mohly sloužit účelům MAS.

Velké množství vědeckých prací vzniklo na téma p.Asp298Asn, jenž je dáván do souvislostí s ukazateli výkrmnosti a jatečné hodnoty. Mezi genotypy se projevují zejména rozdíly v růstu, příjmu krmiva a tučnosti, ovšem objevují se rovněž studie, které popisují vlivy na kvalitu masa. Tytéž ukazatele jsou sledovány také v případě p.Arg236His.

Data, která sloužila účelům této práce, umožnila provést asociační analýzu pouze u p.Asp298Asn. V případě porážkové hmotnosti, hmotnosti pravé půlky JUT a hmotnosti HMČ byly zjištěny značné rozdíly mezi genotypem AA a GG či GA. Zato hodnoty zmasilosti takové rozdíly neprojevily. V souladu s výsledky jiných autorů lze tedy závěrem doporučit, aby SNP v *MC4R* byly nadále zkoumány.

8 Seznam literatury

8.1 Tištěné publikace

Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. Základy buněčné biologie. Espero Publishing. Ústí nad Labem. 630. ISBN: 80-902906-2-0

Al-Samarai, F. R., Al-Kazaz, A. A. 2015. Applications of Molecular Markers in Animal Breeding: a review. American Journal of Applied Scientific Research. 1(1). 1–5.

Andersson, L. 2003. Identification and characterization of AMPK γ 3 mutations in the pig. Biochemical Society Transactions. 31(1). 232–235.

Barb, C., Hausman, G., Houseknecht, K. 2001. Biology of leptin in the pig. Domestic Animal Endocrinology. 21(4). 297–317.

Barb, C. R., Robertson, A. S., Barrett, J. B., Kraeling R. R., Houseknecht, K. L. 2004. The role of melanocortin-3 and -4 receptor in regulating appetite, energy homeostasis and neuroendocrine function in the pig. Journal of Endocrinology. 181. 39–52.

Bruun, C. S., Jorgensen, C. B., Nielsen, V. H., Andersson, L., Fredholm, M. 2006. Evaluation of the porcine melanocortin 4 receptor (MC4R) gene as a positional candidate for a fatness QTL in a cross between Landrace and Hampshire. Animal Genetics. 37(4). 359–362.

Burgos, C., Carrodegua, J. A., Moreno, C., Altarriba, J., Tarrafeta, L., Barcelona, J. A., López-Buesa, P. 2006. Allelic incidence in several pig breeds of a missense variant of pig melanocortin-4 receptor (MC4R) gene associated with carcass and productive traits; its relation to IGF2 genotype. Meat Science. 73(1). 144–150.

Ciobanu, D. C., Day, A. E., Nagy, A., Wales, R., Rothschild, M. F., Plastow, G. S. 2001. Genetic variation in two conserved local Romanian pig breeds using type 1 DNA markers. Genet Sel Evol. 33. 417–432.

- Ciobanu, D. C., Bastiaansen, J. W. M., Lonergan, S. M., Thomsen, H., Dekkers, J. C. M., Plastow, G. S., Rothschild, M. F. 2004. New alleles in calpastatin gene are associated with meat quality traits in pigs1. *Journal of Animal Science*. 82(10). 2829–2839.
- Collard, B. C. Y., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B., Pang, E. C. K. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. 142(1–2). 169–196.
- De Briyne, N., Berg, C., Blaha, T., Temple, D. (2016). Pig castration: will the EU manage to ban pig castration by 2018? *Porcine Health Management*. 2(1).
- De Oliveira, J., Guimaraes, S. E. F., Lopes, P. S., Soares, M. M., Pires, A. V., Barbosa, M. V. G., Torres, De Almeida, R., De Almeida, M. 2006. Associations of leptin gene polymorphisms with production traits in pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 123(6). 378–383.
- Doran, E., Whittington, F. W., Wood, J. D., McGivan, J. D. 2002. Cytochrome P450IIE1 (CYP2E1) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated pig hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*. 140(1). 81–92.
- Dvořáková, V., Stupka, R., Šprysl, M., Čítek, J., Okrouhlá, M., Kluzáková, E., Kratochvílová, H. 2011. Effect of missense mutation Asp298Asn in MC4R on growth and fatness traits in commercial pig crosses in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 56(4), 176–180.
- Enfält, A.-C., von Seth, G., Josell, Å., Lindahl, G., Hedebrö-Velander, I., Braunschweig, M., Andersson, L., Lundström, K. 2006. Effects of a second mutant allele (V199I) at the PRKAG3 (RN) locus on carcass composition in pigs. *Livestock Science*. 99(2–3). 131–139.
- Fan, B., Onteru, S. K., Plastow, G. S., Rothschild, M. F. 2009. Detailed characterization of the porcineMC4R gene in relation to fatness and growth. *Animal Genetics*. 40(4). 401–409.
- Farooqi, S. I., Keogh, J. M., Yeo, G. S. H., Lank, E. J., Cheetham, T., O’Rahilly, S. 2003. Clinical Spectrum of Obesity and Mutations in the Melanocortin 4 Receptor Gene. *The New England Journal of Medicine*. 148 (12). 1085–1095.

- Fontanesi, L., Buttazzoni, L., Galimberti, G., Calò, D. G., Scotti, E., Russo, V. 2013. Association between melanocortin 4 receptor (MC4R) gene haplotypes and carcass and production traits in Italian Large White pigs evaluated with a selective genotyping approach. *Livestock Science*. 157(1). 48–56.
- Fujii, J., Otsu, K., Zorzato, F., de Leon, S., Khanna, V., Weiler, J., O'Brien, P. J., MacLennan, D. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 253(5018). 448–451.
- Hamilton, D. N., Ellis, M., Miller, K. D., McKeith, F. K., Parrett, D. F. 2000. The effect of the Halothane and Rendement Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs. *Journal of Animal Science*. 78(11). 2862.
- Han, S. H., Lee, S. S., Ko, M. S., Seong, P. N., Park, B. Y., Cho, I. C. 2007. Effects of a Porcine MC4R Polymorphism(892G>A) on Carcass Traits in Commercial Pigs. *Journal of Animal Science and Technology*. 49(5). 569–576.
- Hansen-Møller, J. 1994. Rapid high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of androstenone, skatole and indole in back fat from pigs. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 661(2). 219–230.
- Heinz, G., Hautzinger, P. 2007. *Meat Processing Technology for Small- to Medium- Scale Producers*. Food and Agriculture Organization of the United Nations Regional Office for Asia and the Pacific. Bangkok. 456. ISBN: 978-974-7946-99-4.
- Hinney, A., Volckmar, A., Knoll, N. 2013. Melanocortin-4 Receptor in Energy Homeostasis and Obesity Pathogenesis. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 154. 147–191.
- Hong, J., Kim, D., Cho, K., Sa, S., Choi, S., Kim, Y., Park, J., Schmidt, G. S., Davis, M. E., Chung, H. 2015. Effects of genetic variants for the swine FABP3, HMGA1, MC4R, IGF2, and FABP4 genes on fatty acid composition. *Meat Science*. 110. 46–51.

- Hovorka, F. 1983. Biologické aspekty užítkovosti prasat. Vysoká škola zemědělská v Praze. Praha. 148.
- Houston, R. D., Cameron, N. D., Rance, K. A. 2004. a melanocortin-4 receptor(MC4R) polymorphism is associated with performance traits in divergently selected large white pig populations. *Animal Genetics*. 35(5). 386–390.
- Huff-Lonergan, E., Lonergan, S. M. 2005. Mechanisms of water-holding capacity of meat: The role of postmortem biochemical and structural changes. *Meat Science*. 71(1). 194–204.
- Chen, C.-C., Chang, T., Su, H.-Y. 2004. Characterization of Porcine Leptin Receptor Polymorphisms and Their Association with Reproduction and Production Traits. *Animal Biotechnology*. 15(1). 89–102.
- Choi, J. S., Jin, S. K., Jeong, Y. H., Jung, Y. C., Jung, J. H., Shim, K. S., Choi, Y. I. 2016. Relationships between Single Nucleotide Polymorphism Markers and Meat Quality Traits of Duroc Breeding Stocks in Korea. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 29(9). 1229–1238.
- Jeon, J. T., Carlborg, O., Tornsten, A., Giuffra, E., Amarger, V., Chardon, P., Anderssonklund, L., Andersson, K., Hansson, I., Lundström, K., Andersson, L. 1999. a paternally expressed QTL affecting skeletal and cardiac muscle in pigs maps to the IGF2 locus. *Nature Genetics*. 21. 157–158.
- Jokubka, R., Maak, S., Kerziene, S., Swalve, H. H. 2006. Association of a melanocortin 4 receptor (MC4R) polymorphism with performance traits in Lithuanian White pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 123(1). 17–22.
- Kim, K. S., Larsen, Short, T., Plastow, G., N. J., Rothschild, M. F. 2000a. a missense variant of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene is associated with fatness, growth, and feed intake traits. *Mammalian Genome*. 11. 131–135.

- Kim, K. S., Larsen, N. J., Rothschild, M. F. 2000b. Rapid communication: Linkage and physical mapping of the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene. *Journal of Animal Science*. 78 (3). 791–792.
- Kim, K. S., Reecy, J. M., Hsu, W. H., Anderson, L. L., Rothschild, M. F. 2004. Functional and phylogenetic analyses of a melanocortin-4 receptor mutation in domestic pigs. *Domestic Animal Endocrinology*. 26(1). 75–86.
- Knoll, A., Vykoukalová, Z. 2002. Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfizmů DNA genů). Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno. 100. ISBN: 80-7157-616-6.
- Kočárek, E. 2008. Genetika. SCIENTIA. Praha. 211. ISBN: 978-80-86960-36-4
- Kwon, K., Cahyadi, M., Park, H., Seo, D. W., Jin, S., Kim, S., Choi, Y., Kim, K., Gotoh, T., Lee, J. H. 2015. Association of Variation in the MC4R Gene with Meat Quality Traits in a Commercial Pig Population. *Journal- Faculty of Agriculture Kyushu University*. 60. 113–118
- Lee, Y. B., Choi, Y. I. 1999. PSE (pale, soft, exudative) Pork : The Causes and Solutions - Review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 12(2). 244–252.
- Lefferts, C. L., Lefferts, J. A. 2016. Essential Concepts and Techniques in Molecular Biology. In: W. B. Coleman, G. J. Tsongalis (eds.). *The Molecular Basis of Human Cancer*. Springer. New York. 25–42.
- Li, X., Wei, X., Wang, H., Zhang, C., Mehmood, W. 2017. Relationship Between Protein Denaturation and Water Holding Capacity of Pork During Postmortem Ageing. *Food Biophysics*. 13(1). 18–24.
- Liu, L., Ngadi, M. O., Prasher, S. O., Gariépy, C. 2012. Objective determination of pork marbling scores using the wide line detector. *Journal of Food Engineering*, 110(3). 497–504.
- Ma, J., Fill, M., Knudson, C., Campbell, K., Coronado, R. 1988. Ryanodine receptor of skeletal muscle is a gap junction-type channel. *Science*. 242(4875). 99–102.

- McKeith, F. L., Ellis, M., Miller, K. D., Sutton, D. S. 1998. The Effect of RN Genotype on Pork Quality. *Muscle Biochemistry*. 51. 118–124.
- Meidtner, K., Wermter, A.-K., Hinney, A., Remschmidt, H., Hebebrand, J., Fries, R. 2006. Association of the melanocortin 4 receptor with feed intake and daily gain in F2 Mangalitsa x Pietrain pigs. *Animal Genetics*. 37(3). 245–247.
- Nezer, C., Moreau, L., Brouwers, B., Coppeters, W., Detilleux, J., Hanset, R., Karim, L., Kvasz, A., Leroy, P., Georges, M. 1999. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pigs. *Nature Genetics*. 21. 155–156.
- Nonneman, D., Lindholm-Perry, A. K., Shackelford, S. D., King, D. A., Wheeler, T. L., Rohrer, G. A., Bierman, C. D., Schneider, J. F., Miller, R. K., Zerby, H., Moeller, S. J. 2011. Predictive markers in calpastatin for tenderness in commercial pig populations. *Journal of Animal Science*. 89(9). 2663–2672.
- Oczkowicz, M., Tyra, M., Ropka-Molik, K., Mucha, A., Żukowski, K. 2012. Effect of IGF2 intron3-g.3072G>A on intramuscular fat (IMF) content in pigs raised in Poland. *Livestock Science*. 149(3). 301–304.
- OECD/FAO. 2016. OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025. OECD Publishing. Paříž. 133. ISBN: 978-92-64-25322-3.
- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y.-K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I., Barsh, G. S. 1997. Antagonism of Central Melanocortin Receptors in Vitro and in Vivo by Agouti-Related Protein. *Science*. 278(5335). 135–138.
- Óvilo, C., Fernández, A., Rodríguez, M. C., Nieto, M., Silió, L. 2006. Association of MC4R gene variants with growth, fatness, carcass composition and meat and fat quality traits in heavy pigs. *Meat Science*. 73(1). 42–47.

- Piorowska, K., Tyra, M., Rogoz, M., Ropka-Molik, K., Oczkowicz, M., Różycki, M. 2010. Association of the melanocortin-4 receptor (MC4R) with feed intake, growth, fatness and carcass composition in pigs raised in Poland. *Meat Science*. 85(2). 297–301.
- Pipek, P., Pour, M. 1998. Hodnocení jakosti živočišných produktů. KUFŘ. Praha.139. ISBN: 80-213-0442-1
- Pulkrábek, J., Čerovský, J., Dolejš, J., Drábek, J., Dubanský, V., Hájek, J., Kernerová, N., Kvapilík, J., Matoušek, V., Novák, P., Pražák, Č., Pytloun, J., Rozkot, M., Špinko, M., Toufar, O., Vališ, L., Zeman, L. 2005. Chov prasat. Profi Press. Praha. 156. ISBN: 80-86726-11-8.
- Roh, J.-G., Kim, S.-W., Choi, J.-S., Choi, Y.-I., Kim, J.-J., Choi, B.-H., Kim, T.-H., Kim, K.-S. 2012. Characterization and Evaluation of Melanocortin 4 Receptor (MC4R) Gene Effect on Pork Quality Traits in Pigs. *Journal of Animal Science and Technology*. 54(1). 1–8.
- Rohrer, G. A., Nonneman, D. J., Miller, R. K., Zerby, H., Moeller, S. J. 2012. Association of single nucleotide polymorphism (SNP) markers in candidate genes and QTL regions with pork quality traits in commercial pigs. *Meat Science*. 92(4). 511–518.
- Rothschild, M. F., Ruvinsky, A. 2011. *The Genetics of the Pig*. CABI. Wallingford. 507. ISBN: 978-1-84593-756-0.
- Saintilan, R., Sellier, P., Billon, Y., Gilbert, H. 2011. Genetic correlations between males, females and castrates for residual feed intake, feed conversion ratio, growth rate and carcass composition traits in Large White growing pigs. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 129. 103–106.
- Schroyen, M., Janssens, S., Stinckens, A., Brebels, M., Bertolini, F., Lamberigts, C., Bekaert, K., Vanhaecke, L., Aluwé, M., Tuytens, F. A. M., Millet, S., Buys, N. 2015. The MC4R c.893G>A mutation: a marker for growth and leanness associated with boar taint odour in Belgian pig breeds. *Meat Science*. 101. 1–4.

Schwab, C. R., Mote, B. E., Du, Z.-Q., Amoako, R., Baas, T. J., Rothschild, M. F. 2009. An evaluation of four candidate genes for use in selection programmes aimed at increased intramuscular fat in Duroc swine. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 126(3). 228–236.

Siljee, J. E., Wang, Y., Bernard, A. A., Ersoy, B. A., Zhang, S., Marley, A., Von Zastrow, M., Reiter, J. F., Vaisse, C. 2018. Subcellular localization of MC4R with ADCY3 at neuronal primary cilia underlies a common pathway for genetic predisposition to obesity. *Nature Genetics*. 50(2). 180–185.

Stachowiak, M., Szydlowski, M., Obarzanek-Fojt, M., Switonski, M. 2006. An effect of a missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene on production traits in Polish pig breeds is doubtful. *Animal Genetics*. 37(1). 55–57.

Steinhauser, L., Beňovský, R., Bystrický, P., Cabadaj, R., Černý, R., Dvořák, J., Ingr, I., Kerkréty, J., Kubíček, K., Máté, D., Minks, J., Nagy, J., Novák, P., Pipek, P., Simeonovová, J., Sovjak, R., Steinhauserová, I., Straková, E., Suchý, P., Šubrt, J., Švický, E., Večerek, V., Vrchlabský, J., Zabloudil, F. 2000. *Produkce masa*. Polygra. Brno. 464. ISBN: 80-900260-7-9

Stupka, R., Šprysl, M., Čítek, J. 2009. *Základy chovu prasat*. PowerPrint. Praha. 182. ISBN: 978-80-904011-2-9.

Stupka, R., Čítek, J., Fantová, M., Ledvinka, Z., Navrátil, J., Nohejlová, L., Stádník, L., Šprysl, M., Štolc, L., Vacek, M., Zita, L. 2013. *Chov zvířat*. PowerPrint. Praha. 289. ISBN: 978-80-87415-66-5.

Szyndler-Nędza, M., Ropka-Molik, K., Piórkowska, K. 2016. Changes in body weight and fatness of sows during reproductive activity depending on LEPR and MC4R genes polymorphism. *Livestock Science*. 192. 25–32.

Šimeček, K., Zeman, L., Heger, J. 2000. *Potřeba živin a tabulky výživné hodnoty krmiv pro prasata*. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. 124.

Tao, Y. X. 2010. The Melanocortin-4 Receptor: Physiology, Pharmacology, and Pathophysiology. *Endocrine Reviews*. 31 (4). 506–543.

- Tuytens, F. A. M., Vanhonacker, F., Langendries, K., Aluwé, M., Millet, S., Bekaert, K., Verbeke, W. 2011. Effect of information provisioning on attitude toward surgical castration of male piglets and alternative strategies for avoiding boar taint. *Research in Veterinary Science*. 91(2). 327–332.
- Van den Broeke, A., Aluwé, M., Janssens, S., Wauters, J., Vanhaecke, L., Buys, N., Millet, S., Tuytens, F. A. M. 2015a. The effect of the MC4R gene on boar taint compounds, sexual maturity and behaviour in growing-finishing boars and gilts. *Animal*. 9(10). 1688–1697.
- Van den Broeke, A., Aluwé, M., Tuytens, F. A. M., Ampe, B., Vanhaecke, L., Wauters, J., Janssens, S., Coussé, A., Buys, N., Millet. 2015b. An intervention study demonstrates effects of MC4R genotype on boar taint and performances of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science*. 93(3). 934–943.
- Van den Maagdenberg, K., Stinckens, A., Claeys, E., Seynaeve, M., Clinquart, A., Georges, M., Buys, N., De Smet, S. 2007. The Asp298Asn missense mutation in the porcine melanocortin-4 receptor (MC4R) gene can be used to affect growth and carcass traits without an effect on meat quality. *Animal*. 1(8). 1089–1098.
- Walstra, P., Merkus, G. S. M. 1995. Procedure for assessment of the lean meat percentage as a consequence of the new EU reference dissection method in pig carcass classification. DLO-Research Institute for Animal Science and Health Research Branch. Zeist. 1–22.
- Whittemore, C. T., Kyriazakis, I. 2006. *Whittemore's Science and Practice of Pig Production* Blackwell Publishing. Hoboken. 685. ISBN: 978-1-4051-2448-5.
- Yang, W., Kang, X., Yang, Q., Lin, Y., Fang, M. 2013. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 4(1). 2.
- Zadinová, K., Stupka, R., Stratil, A., Čítek, J., Vehovský, K., Lebedová, N., Šprysl, M., Okrouhlá, M. 2017. Association analysis of SNPs in the porcine CYP2E1 gene with skatole,

indole, and androstenone levels in backfat of a crossbred pig population. Meat Science. 131. 68–73.

8.2 Internetové zdroje

European Declaration on alternatives to surgical castration of pigs [online]. Evropská komise. 15. prosince 2010 [cit. 20-03-2018]. Dostupné z: https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/aw_prac_farm_pigs_cast-alt_declaration_en.pdf

Pig QTL/associations data summary [online]. National Animal Genome Research Program. 21. prosince 2017 [cit. 10-03-2018]. Dostupné z: <https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/summary?summ=clas&qtl=26,076&pub=601&trait=647>

Plemenné standard a chovné cíle pro plemena prasat v plemenné knize [online]. Svaz chovatelů prasat v Čechách a na Moravě (SCHP). 1. ledna 2010 [cit. 08-03-2018]. Dostupné z http://www.schpcm.cz/slechtění/metodiky/02_plem_stan.pdf

Počet odchovaných selat na prasnici podle krajů [online]. Český statistický úřad (CŠÚ). 7. února 2018 [cit. 2018-02-28]. Dostupné z <https://www.czso.cz/documents/10180/45994855/27013617p212.pdf/abe83c0d-36c0-443d-88d5-c503872add0e?version=1.0>

Melanocortin 4 receptor [online]. National Center for Biotechnology Information (NCBI). 5. února 2018 [cit. 2018-02-14]. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4160>

PRKAG3 protein kinase AMP-activated non-catalytic subunit gamma 3 [online]. National Center for Biotechnology Information (NCBI). 29. března 2018 [cit. 2018-04-02]. Dostupné z <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/53632>

OECD-FAO Agricultural Outlook 2017-2026 [online]. Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD). [cit. 2018-02-25]. Dostupné z http://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH_AGLINK_2017&lang=en

9 Seznam použitých zkratek

CAST – calpastatin

CYP2E1 – cytochrom P450 2E1

ETL – lokusy ekonomicky významných vlastností (economic trait loci)

IGF2 – inzulinu podobný růstový faktor 2

IMF – intramuskulární tuk (intramuscular fat)

JUT – jatečně upravené tělo

LEP – leptin

MAS – markery asistovaná selekce (marker assisted selection)

MC4R – melanokortin 4 receptor

MUFA – mononenasyčené mastné kyseliny

p. – polymorfismus

PCR – polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)

PRKAG3 – nekatalytická γ 3 podjednotka adenosinmono fosfátem aktivované proteinkinázy

PSE – bledé, měkké, vodnaté maso (pale, soft, exudative)

RFLP – p. délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)

RN – Rendement Napole

RYR1 – ryanodinový receptor 1 (také HAL, CRC)

SNP – jednonukleotidový polymorfismus (single-nucleotide polymorphism)

SSR – krátké tandemové repetice = mikrosatelity (simple sequence repeat)

QTL – lokus kvantitativních vlastností (quantitative trait locus; mn. č. loci)