

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra chovu hospodářských zvířat



**Česká zemědělská
univerzita v Praze**

**Diverzita kandidátních genů asociovaných se složkami
kančího pachu u čistokrevných populací prasat**

Diplomová práce

**Bc. Ivana Hovorková
Biotechnologie a šlechtění zvířat**

Ing. Kateřina Zadinová, Ph.D.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Diverzita kandidátních genů asociovaných se složkami kančího pachu u čistokrevných populací prasat" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 26. 4. 2021

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala Ing. Kateřině Zadinové, Ph.D. za ochotu a nesčetnou pomoc při zpracování diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala i ostatním zaměstnancům školy, obzvlášť Ing. Janu Caltovi, kteří se podíleli na sběru a zpracování dat.

Diverzita kandidátních genů asociovaných se složkami kančího pachu u čistokrevných populací prasat

Souhrn

Cílem diplomové práce bylo zjistit frekvence vybraných polymorfismů asociovaných s hladinou kančího pachu u vybraných čistokrevných plemen prasat. Dále byla hledána asociace mezi vybranými SNP a hladinou jednotlivých substancí kančího pachu. Stanoveny tak byly dvě hypotézy – v první hypotéze jsme předpokládali, že mezi vybranými plemeny bude existovat statisticky významný rozdíl v zastoupení genotypů u sledovaných SNP. V druhé hypotéze jsme se zaměřili na sledování frekvence alel asociovaných s hladinou kančího pachu u otcovských plemen Pietrain a Duroc.

V úvodu se práce věnovala přehledu odborné literatury, která shrnuje dosavadní poznatky o genetických markerech ve vztahu k výskytu hladiny kančího pachu a jeho jednotlivým složkám. Zároveň je zmíněna i problematika kastrace kanečků a ekonomické faktory s ní spojené.

Experimentální část diplomové práce zahrnuje dvě analýzy, Do první bylo zařazeno celkem 327 zvířat sedmi různých čistokrevných plemen (Bu, L, D, Pn, Pc, Mg, W) pocházejících z odlišných podmínek. U osmi vybraných SNP *CYP2E1*(g.1423G>A, g.1422C>T, g.2412C>T), *CYP17A1*(c.1220T>A), *SULT1A1*(c.439A>G, c.846T>A), *CYB5A*(c.8G>T) a *HSD3B1*(g.165262G>A) byly zjištěny genotypy s využitím RFLP-PCR. Za pomoci Pearsonova chí-kvadrát testu a Fisherova exaktního testu byly testovány rozdíly v zastoupení alel napříč populacemi.

Druhá analýza se týkala možné asociace SNP v genech *CYP2E1* a *HSD3B1* se složkami kančího pachu. Pro tento účel sloužily údaje zjištěné metodou HPLC z hřbetního tuku 73 hybridních jedinců ((BuxL)xBO), které byly statisticky vyhodnoceny pomocí GLM.

V případě první analýzy jsme nemohli podpořit ani jednu ze stanovených hypotéz. Dostatečnou variabilitu vykazovaly pouze polymorfismy g.1423G>A, g.2412C>T a g.165262G>A. U zbylých pěti SNP se v populaci vyskytoval převážně jeden genotyp. Rovněž u otcovských plemen Pietrain a Duroc ve čtyřech SNP výrazně převažovala jedna z alel, které jsou asociované s nižší hladinou androstenonu či skatolu. Očekávaných výsledků jsme dosáhli v asociační analýze SNP g.1423G>A, g.1422C>T a g.2412C>T pro které jsme statisticky podpořili asociaci s hladinou skatolu v tukové tkáni. Pro g.165262G>A jsme byli schopni stanovit pouze trend nikoliv významnost pro vazbu na hladinu androstenonu.

Z výsledků můžeme soudit, že diverzita české populace prasat je nízká a převážně se v ní vyskytují genotypy asociované s nižší hladinou kančího pachu. Ačkoliv jsme dospěli k některým statisticky průkazným výsledkům, je třeba podotknout, že asociace byla potvrzena pouze u hladina skatolu a nikoliv indolu, jehož koncentrace by dle dosavadních znalostí měla úzce korelovat s hladinou skatolu. Pro další výzkum tedy doporučujeme rozšířit počet testovaných zvířat.

Klíčová slova: prase, kančí pach, SNP, polymorfismus, gen

Diversity across candidate genes associated with boar taint components in pure pig breeds

Summary

The aim of the diploma thesis was to determine the frequencies of selected polymorphisms associated with the level of boar taint in selected purebred pig breeds. Furthermore, the association between selected SNPs and the level of individual boar taint substances was sought. Thus, two hypotheses were established - in the first hypothesis, we assumed that there will be a statistically significant difference in the representation of genotypes in the monitored SNPs between the selected breeds. In the second hypothesis, we focused on monitoring the frequency of alleles associated with the level of boar taint in paternal breeds Pietrain and Duroc.

In the introduction, the work was devoted to an overview of the literature, which summarizes the existing knowledge about genetic markers in relation to the occurrence of boar taint and its individual components. At the same time, the issue of castration of boars and economic factors associated with it are also mentioned.

The experimental part of the diploma thesis includes two analyzes. The first included a total of 327 animals of seven different purebred breeds (Bu, L, D, Pn, Pc, Mg, W) originating from different conditions. In eight selected SNPs CYP2E1 (g.1423G>A, g.1422C>T, g.2412C>T), CYP17A1 (c.1220T>A), SULT1A1 (c.439A>G, c.846T>A), CYB5A (c.8G>T) and HSD3B1 (g.165262G>A) genotypes were determined using RFLP-PCR. Differences in allele distribution across populations were tested using Pearson's chi-square test and Fisher's exact test.

The second analysis concerned the possible association of SNPs in the CYP2E1 and HSD3B1 genes with boar taint components. For this purpose, HPLC data from the back fat of 73 hybrid subjects ((BuxL) xBO) were used, which were statistically evaluated by GLM.

In the case of the first analysis, we could not support any of the established hypotheses. Only the polymorphisms g.1423G>A, g.2412C>T and g.165262G>A showed sufficient variability. For the remaining five SNPs, there was predominantly one genotype in the population. Also, in the paternal breeds Pietrain and Duroc in the four SNPs, one of the alleles significantly associated with lower levels of androstenone or skatole significantly predominated. We achieved the expected results in the association analysis of SNPs g.1423G>A, g.1422C>T and g.2412C>T for which we statistically supported the association with the level of skatole in adipose tissue. For g.165262G>A we were only able to determine the trend and not the significance for binding to androstenone levels.

From the results we can judge that the diversity of the Czech pig population is low and there are mostly genotypes associated with lower levels of boar taint. Although we have reached some statistically significant results, it should be noted that the association was confirmed only for the level of skatole and not for indole, the concentration of which should be closely correlated with the level of skatole to date. For further research, we therefore recommend expanding the number of animals tested.

Keywords: pig, boar taint, SNP, polymorphism, gene

Obsah

1	Úvod	10
2	Vědecká hypotéza a cíle práce	11
3	Literární rešerše	12
3.1	Pase domácí (<i>Sus scrofa</i>)	12
3.2	Genetická diverzita v populacích prasat	12
3.3	Kančí pach	13
3.3.1	Androstenon	14
3.3.1.1	Metabolismus androstenonu	14
3.3.2	Skatol	15
3.3.2.1	Metabolismus skatolu	15
3.3.3	Indol	16
3.4	Eliminace kančího pachu	17
3.4.1	Chirurgická kastrace	17
3.4.2	Imunokastrace	17
3.5	Ekonomika chovu prasat s alternativními způsoby kastrace	18
3.6	Využití hybridizace	19
3.6.1	Marketing	19
3.7	Eliminace kančího pachu s využitím genetických markerů	20
3.7.1	Genomika prasete domácího	20
3.7.2	Genetické markery	21
3.7.3	Polymorfismus	21
3.7.3.1	SNP	22
3.7.3.2	QTL	22
3.7.4	Kandidátní geny	22
3.8	Biotransformace a exkrece složek kančího pachu	23
3.8.1	Cytochrom P450	23
3.8.2	Sulfotransferázy	24
3.9	Geny kančího pachu	24
3.9.1	SSC1	25
3.9.2	SSC2	26
3.9.3	SSC3	26
3.9.4	SSC4	26
3.9.5	SSC6	27
3.9.6	SSC7	28
3.9.7	SSC10	29

3.9.8	SSC11	29
3.9.9	SSC13	29
3.9.10	SSC14	30
3.10	Molekulárně-genetické metody využité v této práci	31
3.10.1	Izolace DNA	31
3.10.2	PCR.....	31
3.10.3	PCR-RFLP	32
3.10.4	Elektroforéza	32
4	Metodika.....	33
4.1	Zvířata.....	33
4.2	Izolace DNA.....	33
4.3	PCR.....	33
4.4	PCR-RFLP.....	35
4.5	Elektroforéza	37
4.6	Chí-kvadrát test	37
4.7	Fisherův exaktní test.....	37
4.8	HPLC stanovení androstenonu, skatolu a indolu v tukové tkáni prasat	37
4.9	Asociační analýza	38
5	Výsledky.....	39
5.1	Porovnání genotypových frekvencí.....	39
5.1.1	CYP2E1, g.1423G>A	39
5.1.2	CYP2E1, g.1422C>T.....	39
5.1.3	CYP2E1, g.2412C>T.....	39
5.1.4	CYP17A1, c.1220T>A.....	40
5.1.5	SULT1A1, c.439A>G	40
5.1.6	SULT1A1, c.846T>C.....	40
5.1.7	CYB5A, c-8G>T.....	41
5.1.8	HSD3B1, g.165262G>A	41
5.2	Asociační analýza	41
5.2.1	CYP2E1, g.1423G>A	41
5.2.2	CYP2E1, g.1422C>T.....	41
5.2.3	CYP2E1, g.2412C>T.....	42
5.2.4	HSD3B1, g.165262G>A	42
6	Diskuse.....	43
6.1	Genotypové frekvence.....	43
6.1.1	CYP2E1, g.1423G>A	43
6.1.2	CYP2E1, g.1422C>T.....	43
6.1.3	CYP2E1, g.2412C>T.....	43

6.1.4	CYP17A1, c.1220T>A	44
6.1.5	SULT1A1, c.439A>G	44
6.1.6	SULT1A1, c.846T>C.....	44
6.1.7	CYP5A, c-8G>T.....	45
6.1.8	HSD3B1, g.165262G>A	45
6.2	Asociační analýza.....	45
6.2.1	CYP2E1 g.1423G>A.....	46
6.2.2	CYP2E1, g.1422C>T.....	46
6.2.3	CYP2E1, g.2412C>T.....	46
6.2.4	HSD3B1 g.165262G>A	46
7	Závěr	47
8	Literatura	48
9	Samostatné přílohy	I
9.1	Výsledky asociační analýzy	I
9.2	Výsledky porovnání genotypů	II

1 Úvod

Chov prasat patří mezi nepostradatelné součásti primárního hospodářského sektoru, který člověku poskytuje největší množství masa ze všech chovů hospodářských zvířat.

V současných chovech je produkce prasat založena převážně na vynikající genetice. Vysoce selektované genotypy a intenzivní systém produkce tvoří většinu produkovaného vepřového masa. Pro tento účel je potřeba podrobné fenotypové a genotypové charakterizace plemen. Získané poznatky se využívají k identifikaci polymorfismů vázaných na požadovaný znak a řídí následně výběr šlechtitelského postupu. Výsledkem je správné využití genetické informace pro ekonomický zisk.

Ekonomika je hlavním faktorem ovlivňující celé fungování chovu. Produkce jatečných hybridů s co možná nejnižšími náklady, ale zato ve výborné kvalitě jsou hlavním cílem. S využitím nejmodernějších genetických postupů je možné mnohem rychleji dosáhnout požadovaného výsledku.

Kvalitu masa snižuje například kančí pach. V mnoha zemích jsou kanečci chirurgicky kastrováni krátce po narození, aby se zamezilo produkci masa s nechtěným pachem a chutí. Kančí pach, jehož hlavními složkami jsou androstenon, skatol a indol, které se kumulují v tukové tkáni, vyvolávají fekální podobný zápach a chuť, především po tepelném zpracování masa. Na druhou stranu, kanečci ve srovnání s vepříky, vykazují mnohem lepší produkční vlastnosti, jako jsou vyšší růstová schopnost, nižší spotřeba krmiv, vyšší zmasilost jatečně opracovaného těla a také ne všichni komerčně produkovaní kanečci mají kančí pach. Kromě toho začali brát i spotřebitelé zřetel na welfare, životní pohodu zvířat, a proto také podporují zákaz nynějšího způsobu kastrace.

Veřejný tlak na opuštění chirurgické kastrace vedl k hledání možností eliminace kančího pachu jinými, humánními metodami, mezi které patří chirurgická kastrace s použitím anestezie a/nebo analgezie, imunokastrace, výkrm kanečků nebo využití genetických markerů. S rozvojem biotechnologií přibyly nové nástroje pro identifikaci genů odpovědných za kvantitativní vlastnosti. To vedlo k zapojení molekulární genetiky k tradičním metodám selekce a využití genetických markerů pro eliminaci kančího pachu.

2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je sledovat frekvence jednotlivých genotypů u vybraných polymorfismů asociovaných s hladinou kančího pachu a ověřit variabilitu mezi i v rámci populací.

Hypotéza 1: Mezi sledovanými plemeny bude rozdílná frekvence genotypů, respektive alel u vybraných SNP variant.

Hypotéza 2: U otcovských plemen (Duroc, Pietrain) bude vyšší frekvence alel asociovaných s vysokou hladinou kančího pachu, především androstenonu a skatolu.

3 Literární rešerše

3.1 Pase domácí (*Sus scrofa*)

Prase domácí je členem řádu sudokopytníků (*Aryodactyla*), podřád nepřezvýkavý (*Suiformes*) (Rothschild et al. 2011), který pochází z euroasijské divoké formy prasete (*Sus scrofa*). Domestikace z původních rodových forem započala přibližně už před 9000 lety na Blízkém východě. Historické záznamy uvádějí, že asijská prasata byla introdukována do evropské formy během 18. až 19. století (Giuffra et al. 2000), a tak vznikly dvě čeledi podřádu nepřezvýkaví – pekariové (*Tayassuidae*) a prasata (*Suidae*) (Rothschild et al. 2011).

Už na základě už Darwinových pozorování fenotypových rozdílů mezi druhy prasata přišla v úvahu jako genetický model. Jeho předpoklad o příbuznosti pekariů a prasat, i přes velkou geografickou vzdálenost mezi místy výskytu, potvrdila studie mitochondriální DNA, která je dědičná pouze ze strany matky. Další podrobnější výzkumy napomohly při zjišťování předka prasete domácího – evropského prasete divokého “divočáka”. (Giuffra et al. 2000). Tyto informace poskytly obecný přehled o systematickém postavení a fylogenezi rodu (Rothschild et al. 2011).

Prase je dnes uznáváno jako modelový organismus i v lidské medicíně. Po osekvenování celého lidského genomu přišla na řadu sekvenace genomů zvířat. Již během sekvenování DNA prasat byla nalezena podobnost mezi genomem lidským a prasečím. Rozkódování prasečího genomu má také podstatný ekonomický význam v produkci vepřového masa (Humphray et al. 2007).

3.2 Genetická diverzita v populacích prasat

Genetická diverzita je důležitá pro udržení životaschopnosti a evolučního nebo adaptivního potenciálu populací a druhů (Holdergger et al. 2006). Zachování genetické diverzity hospodářských i divokých druhů zvířat zajišťuje Úmluva o biologické diverzitě (Rio 1992) (Ollivier & Foulley 2011).

Existují dva typy genetické rozmanitosti – adaptivní a neutrální. Neutrální genetická rozmanitost nemá přímý vliv na kondici, tento typ genetické variace je tedy selektivně neutrální. Adaptivní genetická rozmanitost dokáže popsat evoluční potenciál populace a lze analyzovat kvantitativně v kontrolovaných experimentech (Holdergger et al. 2006). Většina šlechtitelských postupů využívaných v praxi je založena na získání co možná největšího profitu z genů patřících do kategorie adaptivní genetické diverzity (Ollivier & Foulley 2011; Holdergger et al. 2006).

Mezi nejstarší metody používané šlechtiteli patří selekce. Ta silně ovlivňuje genetickou variabilitu v genomu prasat. Při sledování kvantitativních znaků měnících své zastoupení v populaci prasat během selekce objevili vědci lokusy nesoucí geny pro kvantitativní znaky (QTL), které jsou dnes stále významné pro šlechtění a selekci (Fontanesi et al. 2015). Podobné vlastnosti jako QTL mají jednonukleotidové polymorfismy (SNP), jejichž zastoupení lze také ovlivnit selekcí v populaci (Ferreira et al. 2017). Ale selekce vždy není naprosto přesná a důkladná. Vždy nedochází k naprosto konkrétnímu výsledku při šlechtění na daný znak či znaky. Překážkou může být výskyt vazebné nerovnováhy (LD – linkage disequilibrium), při

kteře dochází k nenáhodné segregaci genů. To znamená vyšší výskyt některých kombinací genů na úkor ostatních variant (Nsegnimana et al. 2004).

Výše zmíněná LD může být odrazem rozdílného selekčního tlaku. Důkazem je rozdílný výskyt LD, kdy u evropských plemen prasat vyskytuje u mnohem více genů než u asijských plemen. Tyto poznatky konstatovali Amaral et al. (2008), při testování SNP v genomu prasat.

Sofistikovanější a rychlejší metodou ovlivňující genetickou diverzitu pomocí selekce v populaci prasat je použití klasického animal modelu BLUP (Fontanesi et al. 2015). S postupem času vznikly i přesnější a rychlejší metody k identifikaci změn v genomu prasat. Dostupnost sekvenace a NGS (sekvenování další generace), probíhající u prasat už několik desetiletí, umožnila sledovat vývoj vlivu genetických změn v genomu zvířat a porovnávat tak dřívější a nejnovější poznatky z pole molekulární genetiky (Ciobanu et al. 2011).

Nejnámější gen sledovaných u prasat je RYR1, který souvisí převážně s kvalitou masa, nejsledovanějším znakem u prasat (Ciobanu et al. 2011). Ciobanu et al. (2011) pozoroval alelické frekvence pro tento gen u plemene Large White a Pietrain. Mateřské plemeno Large White mělo zastoupení stres rezistentní alely *N* vyšší než 0,9. Zatímco otcovské plemeno Pietrain vykazovalo zastoupení stres rezistentní alely *n* nižší než 0,1 vlivem striktní selekce na tuto alelu. Pietrain je plemeno vyznačující se vysokou zmasilostí, kterou recesivní alela *n* genu RYR1 podporuje.

3.3 Kančí pach

Kančí pach je nechtěný zápach vyvolaný primárně zvýšenou hladinou androstenonu, skatolu a indolu v tukové tkáni prasat (Moe et al. 2009), která je nositelem vůně a chuti. Tyto složky následně negativně ovlivňují kvalitu masa po jeho tepelné úpravě (Duijvesteijn et al. 2010). Hladina komponent kančího pachu se zvyšuje především po dosažení pohlavní dospělosti zvířete (Zadinová et al. 2016). Detekovatelná hodnota v tukové tkáni je pro androstenon 0,5 - 1 $\mu\text{g/g}$ a pro skatol 0,2 - 0,25 $\mu\text{g/g}$ (Strahe et al. 2014). Mezi spotřebiteli je však velká variabilita v citlivosti na tyto látky. Zatímco u androstenonu je citlivost nižší a individuální, skatol je detekován většinou respondentů (Robic et al. 2008). I z hlediska geografického profilu je možné sledovat rozdílnou citlivost na kančí pach. V některých zemích je maso z kanců běžně konzumováno. Rozdíly jsou i mezi muži a ženami, které často bývají k látkám kančího pachu citlivější. Nicméně bylo zjištěno, že ne všichni komerčně chovaní kanci produkují kančí pach (Duijvesteijn et al. 2010).

Hladina androstenonu a skatolu je ovlivňována jak vnitřními, tak vnějšími faktory (Zamaratskaia & Squires 2009). Hladina kančího pachu se může významně lišit mezi plemeny i v rámci plemene. Rozdíly jsou i mezi samotnými komponenty. Heritabilita androstenonu odpovídá středním až vysokým hodnotám 0,25 - 0,88. Skatol má nižší heritabilitu 0,19 - 0,55 (Duijvesteijn et al. 2010). Existují i další látky ovlivňující v malé míře organoleptické vlastnosti masa. Například androstenol, p-kresol, aldehydy a mastné kyseliny s krátkým řetězcem (Zamaratskaia & Squires 2009).

Jedinou dosud známou a hojně využívanou možností, jak úplně eliminovat kančí pach, je chirurgická kastrace (Strahe et al. 2014). S postupem let se častěji využívá i více humánních postupů. Aplikace analgetik a anestezie při zákroku, imunokastrace nebo šlechtění s využitím genetických markerů asociovaných se sníženou produkcí kančího pachu (Prunier et al. 2006).

3.3.1 Androstenon

Androstenon (5 α -androst-16-en-3-on) je steroidní hormon produkovaný Leydigovými buňkami ve varlatech (Zadinová et al. 2016). Jedná se primárně o samčí hormon uvolňující se ze slin kance jako feromon stimulující prasnice k páření. Kvůli lipofilním vlastnostem je ukládán i do tukové tkáně (Zamaratskaia & Squires 2009), kde jeho koncentrace vyvolává nepříjemný zápach a chuť po moči (Robic et al 2008).

Androstenon je produktem metabolismu cholesterolu stejně jako testosteron a estrogen (Moe et al. 2009). Jeho produkce je závislá, stejně jako u zbylých pohlavních hormonů, na pohlavní dospělosti jedince (Robic et al. 2008). Tvorba androstenonu ale není primární funkcí pouze varlat. V plazmě prasniček a vepřů detekovali Zamaratskaia & Squires (2009) nízkou hladinu androstenonu, což potvrzuje jeho produkci ovarii a kůrou nadledvin.

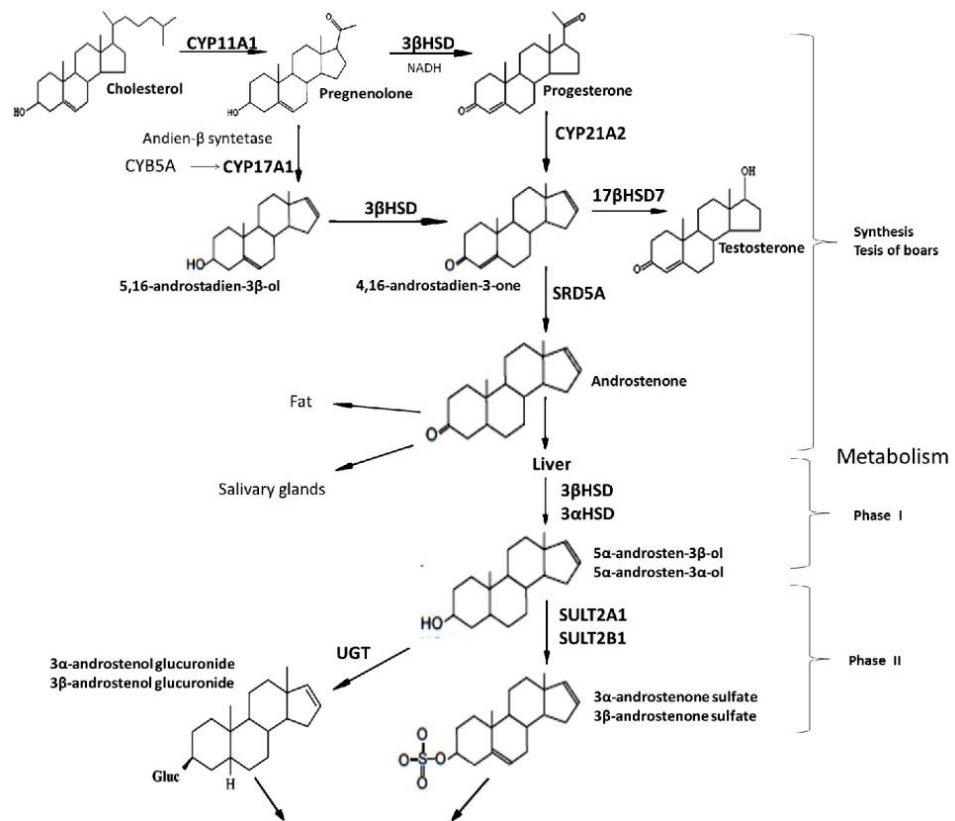
Produkce androstenonu a dalších testikulárních steroidů je řízena neuroendokrinním systémem. Produkci testikulárních hormonů aktivuje hypotalamo-hypofyzo-gonadární osa. Během postnatálního života (2. – 4. týden) má za následek zvýšení hladiny cirkulujících testikulárních hormonů v krvi. Jedná se ale o malé množství s porovnáním hladiny testikulárních hormonů po dosažení pohlavní dospělosti, se kterou úzce souvisí tvorba androstenonu a vznik kančího pachu. Proto je puberta kanečků hlavním aspektem při regulaci biosyntézy androstenonu a stimulaci neuroendokrinní soustavy. Stejně tak je důležitý i genotyp zvířete. Již dlouho je prokázáno, že existují genotypy, které mají souvislost s nízkou hladinou androstenonu v tukové tkáni (Zamaratskaia & Squires 2009). Obsah androstenonu v tukové tkáni roste také v souvislosti se zvyšujícím věkem kanců (Moe et al. 2009).

Z důvodu již výše zmíněné společné biochemické cesty pohlavních hormonů, je těžké snižovat hladinu androstenonu, aniž by současně neklesla i hladina ostatních steroidů a nebyla tak ovlivněna plodnost či růst zvířete (Moe et al. 2009).

3.3.1.1 Metabolismus androstenonu

Začátek geneze steroidních hormonů zahajuje gen CYP11A1 katalytickým štěpením řetězce cholesterolu za vzniku pregnenolonu. Z pregnenolonu je androstenon syntetizován ve varlatech andien- β syntázou za účasti genů CYP17A1, CYB5A a 3 β -HSD (Robic et al. 2008; Moe et al. 2009; Zamaratskaia & Squires, 2009; Zadinová et al., 2016).

Metabolická degradace androstenonu probíhá v játrech ve dvou fázích. Během první fáze, hydrogenace, je androstenon degradován 3 β -HSD na β -androstenol. V případě nízké aktivity v játrech stoupá hladina androstenonu v tukové tkáni. Enzymy sulfotransféraz SULT2A1 a SULT2B1 ukončují proces degradace androstenonu. Tento proces představuje 68 % z celého metabolismu probíhajícího v II. fázi nazývané sulfokonjugace. Během degradace vzniká i mnoho různých meziproductů i konečných produktů viz Obrázek 1 (Robic et al. 2008; Moe et al. 2009; Zamaratskaia & Squires 2009; Zadinová et al. 2016).



Obrázek 1 Hlavní enzymy zahrnuté do metabolismu androstenonu prasat.

3.3.2 Skatol

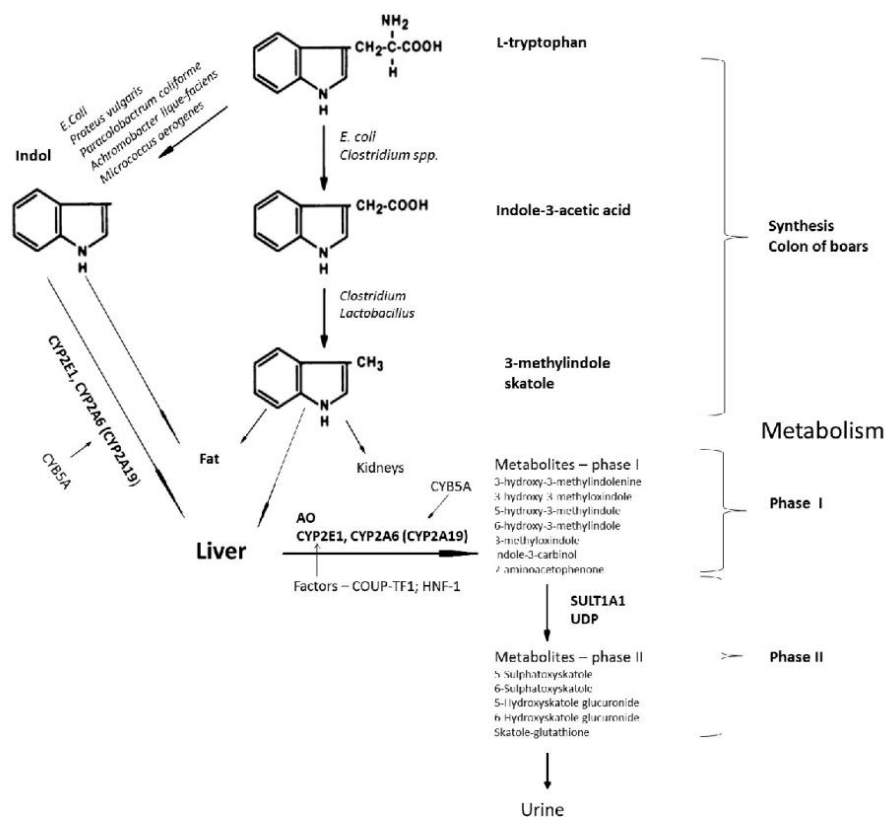
Skatol (3-methylindol) je produkt bakterií tlustého střeva, především monogastrů, při trávení bílkovin. Biochemickou přeměnou vzniká z L-tryptofanu a následně je z části vylučován výkaly a močí a z části vstřebáván do krve skrz střevní stěnu a ukládán v tukové tkáni (Robic et al. 2008; Zamaratskaia & Squires 2009). Obsah skatolu ve fekáliích je u všech pohlaví podobný, ale vysoké koncentrace skatolu v tukové tkáni jsou především u kanců (Denhard et al 1991). Zápach uvolňovaný při zpracování vepřového masa připomíná výkaly (Zadinová et al. 2016).

Bakterie *Clostridium spp.* (*C. difficile*, *C. sticklandii*, *C. lituseburensense*, *C. subterminale*, *C. putrefaciens*) a *Escherichia coli* syntetizují kyselinu 3-indoloctovou z tryptofanu. Činností bakterií rodu *Lactobacillus* a *Clostridium* vzniká skatol ze vzniklé 3-indoloctové kyseliny. Z toho vyplývá, že množství produkovaného skatolu je závislé na dostupnosti tryptofanu a složení intestinální mikroflóry (Zamaratskaia & Squires 2009). U přežvýkavců je v malé míře skatol tvořen také, ve větším množství působí jako pneumotoxin a způsobuje ABPE (acute bovine pulmonary edema and emphysema). Prasatům skatol neublíží, jelikož je metabolizovaný rozdílnými procesy (Robic et al. 2008).

3.3.2.1 Metabolismus skatolu

Skatol vzniklý syntézou bakterií v tlustém střevě je z části vstřebáván do krevního oběhu (Robic et al. 2008). Ten je dále metabolizován v játrech ve dvou na sebe navazujících fázích. V první fázi hrají podstatnou roli enzymy cytochromu P450 (CYP2E1, CYP2A6). Jejich funkcí

je přidání hydroxylové skupiny, aby mohla proběhnout reakce v druhé fázi (Robic et al. 2008). Tato část metabolismu probíhá v endoplazmatickém retikulu hepatocytů. Během první fáze vzniká 7 meziproductů, které následně podléhají oxidaci aldehyd oxidázou a některé konjugují s kyselinou sírovou nebo glukaronovou. V druhé fázi jsou meziproducty vystaveny sulfataci fenolsulfotransferázou SULT1A1. Vzniká pět konečných produktů, které jsou akumulovány v tukové tkáni a ledvinách. Z ledvin jsou poté vylučovány močí viz Obrázek 2 (Robic et al. 2008; Zamaratskaia & Squires 2009; Zadinová et al. 2016).



Obrázek 2 Hlavní enzymy metabolismu skatolu prasat.

3.3.3 Indol

Indol (2,3 - benzopyrol) je také metabolitem tryptofanu. Je součástí kančího pachu, ale v mnohem menší míře než androstenon a skatol. Avšak korelace mezi hladinou skatolu a indolu v tukové tkáni je vysoká (Moe et al. 2009).

Indol je, stejně jako skatol, produktem bakterií sídlících v tlustém střevě. Vzniká degradací bílkovin, přesněji L-tryptofanu. Indol se z části vylučován s výkaly a z části vstřebáván střevní stěnou do krevního oběhu. Metabolizován je v játrech, obdobně jako skatol, enzymy CYP2A6 a CYP2E1. Pokud dojde k transformaci indolu už v gastrointestinálním traktu na kyselinu indol 3- octovou, stává se tak prekurzorem skatolu (Zadinová et al. 2016).

Hladina indolu i skatolu je ovlivňována vnějšími faktory jako jsou čistota kotců a krmení (Zadinová et al 2016).

3.4 Eliminace kančího pachu

Kanečci jsou v mnoha zemích krátce po narození chirurgicky kastrováni z důvodu zamezení vzniku kančího pachu (Duijvesteijn et al. 2010). Kančí pach způsobuje nepříjemnou chuť a vůni masa po tepelné úpravě kvůli výše zmíněným látkám – androstenonu a skatolu. Tyto substance se hromadí převážně v hřbetním tuku kanců (Strahe et al. 2014). Kromě zamezení produkce kančího pachu se kanci kastrují z dalších důvodů, jako je redukce agresivity a sexuálního chování (Zamaratskaia & Squires 2009).

V rámci dodržování welfare vznikla v roce 2010 Evropská deklarace o alternativních metodách k chirurgické kastraci, které mají omezit bolest a stres z tohoto zákroku. Tento návrh měl vejít v platnost již v roce 2012 v podobně provádění chirurgické kastrace pouze pod vlivem analgetik a/nebo anestezie. Tak tomu mělo být do roku 2018, kdy se plánovalo úplné odstoupení od chirurgické kastrace (Prunier et al. 2006; Briyne et al. 2016). Jelikož se splnění zmíněných cílů nepodařilo dostát, hledají se jiné možnosti, jak minimalizovat hladinu kančího pachu (Zadinová et al. 2016).

3.4.1 Chirurgická kastrace

Přes 130 milionů kanečků je každý rok v 27 členských zemích kastrováno. To je více než 80 % samčí populace. Zbýlých 20 % je drženo pro chov (Briyne et al. 2016).

Chirurgická kastrace selat by měla být co nejrychlejší. Přibližně tento zákrok trvá 30 sekund. Mimo kastrování je selatům zkrácen ocásek, injekčně podáno železo, vitamíny a aplikují se ušní známky. Dle zákona se selata musí kastrovat do 7 dní po porodu, nejčastěji se dnes setkáváme s kastrací v den porodu nebo dva dny po porodu. Některé chovy upřednostňují kastraci později. Šestý den po porodu jsou plně sestouplá varlata, a proto je jejich extrakce úspěšnější. Nevýhodou však je vyšší výskyt inguinální kýly (Prunier et al. 2006). Nicméně se tato metoda považuje za velice bolestivou a stresující (Prunier et al. 2005).

Téměř bezbolestného, bezpečného a krátkého provedení kastrace lze docílit podáním anestezie a analgetik. (Marx et al. 2003). Přesto jsou zvířata stále vystavena stresu. Anestezie jim způsobuje dočasnou malátnost i po odstoupení zákroku. Po zákroku bylo pozorováno podchlazení selat a snížení příjmu mléka (Kohler et al. 1998; Prunier et al. 2006). Kastrace s využitím anestetik nebo analgetik je dnes běžná v zemích jako je Nizozemsko, Norsko a Švýcarsko (Prunier et al. 2006).

3.4.2 Imunokastrace

Imunokastrace se začíná stávat atraktivní alternativou k chirurgické kastraci. Čím dál tím více států, převážně v severní části Evropy a Německu, tuto metodu praktikuje. Imunokastrace má všechny benefity chirurgické kastrace, jako je eliminace kančího pachu, snížení agresivity a sexuálního chování. Kvalita jatečně upraveného těla a masa se neliší od chirurgicky kastrováných zvířat. Tato metoda se jistě dá označit z hlediska welfare mnohem přijatelnější (Zamaratskaia & Rasmussen 2015; Briyne et al. 2016). Avšak není jisté, že konzumenti tuto metodu vřele přijmou, jelikož se jedná o vpravování chemické látky do těla zvířete (Prunier et al. 2016).

Cílem imunokastrace je deaktivace testikulárních funkcí omezením produkce hormonů hypotalamu. Převážně je používaná vakcína mířená proti gonadotropin-releasing hormonu (GnRH) produkovaného hypotalamem. Alternativou je vakcína proti produkci luteinizačního hormonu (LH) v hypofýze (Zamaratskaia & Rasmussen 2015).

V souladu s výrobními doporučeními je nutné aplikovat dvě dávky v intervalu minimálně čtyř týdnů, aby se dosáhlo účinnosti. První dávka slouží k imunizaci systému a malému navýšení protilátek proti GnRH. Kanečci jsou fyziologicky pořád stejní. Druhá dávka pak dočasně potlačí funkci varlat včetně jejich růstu následkem vysoké produkce anti-GnRH protilátek (Dunshea et al. 2001; Zamaratskaia & Rasmussen 2015).

První dávka se podává v rozmezí od 17. - 18. týdne života a druhá dávka v 21. - 22. týdnu života. Za předpokladu, že jsou prasata porážena ve stáří 26. týdnů. Při splnění veškerých doporučení je u imunokastrátů srovnatelná hodnota androstenonu i skatolu jako u vepřů (Dunshea et al. 2001; Zamaratskaia & Rasmussen 2015). Každou dávku musí správně aplikovat dva různí lidé z důvodu bezpečnosti. Přemýšlí se i o jednorázové imunokastraci pouze jednou dávkou v období 4 týdnů před poražením, ale to může představovat bezpečnostní problém (IMPROVAC).

Jak je již zmíněno výše, u kanců dochází po aplikaci vakcíny ke zmenšení varlat v reakci na snížení steroidogeneze a spermatogeneze. Stejně tak dochází ke zmenšení bulbouretrálních žláz (Awoniyi et al. 1988).

3.5 Ekonomika chovu prasat s alternativními způsoby kastrace

Jako v každém chovu, je i v chovu prasat ekonomika na prvním místě. Roest et al. (2009) porovnávali ve své práci ekonomický důsledek čtyř různých alternativních způsobů kastrace v chovu: kastrace s lokální anestezií, kastrace s celkovou anestezií, imunokastrace a chov kanců. Náklady farmy stoupají s typem alternativní kastrace. Pokud je využíváno lokální anestezie, zvyšují se náklady o léky k tomu určené a o náklady za člověka, který anestezii provádí. V některých zemích musí anestezii provádět dokonce veterinář. Při celkové anestezii se ještě připočítávají náklady za inhalační zařízení.

Pro imunokastraci je rozhodujícím faktorem cena vakcíny. Její cena bude závislá na přijetí spotřebiteli konzumovat maso z imunokastrátů. Zátěží je také další práce pro zaměstnance, kteří budou vakcínu aplikovat (Roest et al. 2009).

Kromě lepšího welfare v chovech byla u chovů, kde se využívá imunokastrace nižší spotřeba krmiv na stejnou produkci masa, jako mají chirurgicky kastrování vepřů. Imunokastrati totiž dosahují lepšího růstu s vyšší konverzí živin. Pokud by se zvýšila obliba imunokastrace u chovatelů, cena vakcíny by mohla klesnout nebo se rovnat ceně ušetřené za krmivo (Roest et al. 2009).

Chov kanců nemusí být úplně přijatelný welfare, jelikož kanci jsou mnohem agresivnější vůči sobě a mohou si způsobovat ošklivá zranění. Nicméně má mnohé výhody v lepší konverzi živin, lepším růstu a nižším ukládání tuku, než je u vepřů. Všechna tato pozitiva ale za cenu možnosti výskytu kančího pachu v mase. Tento fakt nic nemění na tom, že v některých státech, jako je Velká Británie či Španělsko, je chov kanců běžný (Roest et al. 2009).

3.6 Využití hybridizace

Celosvětový průmysl s vepřovým masem získává velkou část svého genetického materiálu od společností, které poskytují inseminační dávky linií, které vyvinuli přesně pro šlechtitelský program. Společnosti jako Danbred, PIC, TOPIGS nebo Hypor kříží své vlastní linie na úrovni čistokrevných plemen, zatímco jiné jsou zástupci kříženců různých plemen. Takové šlechtění provádí tak dlouho, že vzniklé linie se mohou považovat za nezávislé na původních plemenech. Společnosti většinou prodávají spolu se šlechtitelským programem i speciální linie kanců a prasniček, podle požadavků chovatele. Například speciálně šlechtění hybridy Landrace a Large White jsou běžně využívané komerční prasničky s výbornými mateřskými vlastnostmi (Buchanan & Stalder 2011).

Postupy šlechtění, výběr genetického materiálu a fenotypové charakteristiky jsou soukromým tajemstvím společnosti. Linie těchto společností představují odklon od základních definic, co je plemeno. Pokrok v identifikaci genů napomáhá genetickému zlepšování a udržování znaků čistého plemene. Tyto nástroje v molekulární biologii vedly k lepšímu pochopení domestikace a rozmanitosti plemen. V rámci projektu Roslin Institute Pig Biodiverzity Project byl konstruován fylogenetický strom. Z dat jde znatelně vyčíst, že asijská plemena (Meishan) jsou geneticky vzdálená od plemen původem z Evropy. Plemeno Meishan se nachází uprostřed fylogenetického stromu, ačkoliv je takto geneticky vzdálené. Tento fakt podporuje teorii, že asijská prasata byla přivezena do Evropy a jejich geny byly začleněny do lokálních plemen prasat, a tak napomohla vývinu dnešních moderních evropských plemen. Prokazatelně dnes lze nalézt genetickou podobnost u plemene Berkshire s několika čínskými plemeny (Buchanan & Stalder 2011).

Cílem šlechtitelského programu je zvýšení efektivity výroby vepřového masa. Šlechtitelský program přesně stanovuje cíle šlechtění s ekonomickým ziskem na nejdůležitějších znacích za co nejkratší čas. Při šlechtění prasat se využívá rozdělení populací na dvě části, na plemena mateřská a plemena otcovská. Každá tato plemena mají specifické užitkové znaky s měřitelnými ukazateli v oblasti reprodukce, jako je počet mláďat na vrh, počet struků, délka mezidobí, zabřezávání atd., mléčnosti prasnic, konverze krmiv, průměrného denního přírůstku, zmasilosti a podílu *Musculus longissimus*. Při vzájemném křížení vzniká rentabilní produkt – víceplemenný hybrid s přesně požadovanými vlastnostmi na užitkovost. Takový postup se nazývá hybridizační program, který využívá převážně heterozního efektu u nízké dědivých znaků u mateřských plemen a zmasilosti u hybridů. Heterozní efekt je nejvíce znatelný u kříženců rozdílných plemen nebo populací. Důležitá je taky pozice plemene v roli otce a matky při křížení. Heterozní efekt je pouze jednorázový efekt projevující se v první generaci. Výsledkem je zvíře s lepšími vlastnostmi jako je životaschopnost, odolnost, přírůstek i konverze krmiva. Respektive ideální jatečné prase s maximálním ekonomickým ziskem, při jehož chovu je dosaženo maximální efektivity (Krupa et al. 2019).

3.6.1 Marketing

Evropa je příkladem industrializované ekonomiky, kde tvoří zemědělství 2–5 % hrubého domácího produktu. Živočišná výroba tvoří přibližně 50–60 % celkových příjmů zemědělských podniků z toho 10–15 % představuje výroba potravin a nápojů. Domácnosti utratí přibližně

20 % svých výdajů pouze za potraviny z nichž asi 40 % tvoří výdaje za maso, mléčné výrobky a vejce. Polovinu zakoupeného masa spotřebiteli tvoří maso vepřové. A trend nadále upřednostňuje spotřebu vepřového (Whittemore & Kyriazakis 2006).

Různé vzorce spotřeby způsobují, že zvířata jsou konzumována v různých hmotnostech. Živá zvířata se mohou uvádět na trh už od několika týdnů věků v rozmezí 10–20 kg, až po extrémní v podobě 180–300 kg. Pro mnoho asijských typů prasat, která jsou menší, jsou jatečné hmotnosti obvykle menší. V evropských zemích, Austrálii, Severní a Jižní Americe jsou tradičně zpracována zvířata o hmotnosti 90–120 kg jak pro distribuci čerstvého vepřového, tak pro různé výrobky z nich. Výjimkami jsou zvířata například pro výrobu sušených šunek v Itálii a Španělsku, kde se porázejí prasata s mnohem vyšší hmotností. Na porážku se mohou posílat i prasnice, které mají hmotnost až 300 kg. Maso z nich se začleňuje často do řady produktů a lahůdkářských výrobků. Dospělí kanci využívaní k plemenitbě, jsou pro lidský konzum nevhodní, protože obsahují kančí pach. Tento problém se však nemusí týkat rychle rostoucích plemen, pokud se kanečci poráží při nízké hmotnosti (do 110 kg) (Whittemore & Kyriazakis 2006).

3.7 Eliminace kančího pachu s využitím genetických markerů

Kančí pach způsobuje ekonomické ztráty na jatečném těle prasat. Poslední roky je jedním z nejřešenějších problémů v chovu prasat. Genetici při řešení této problematiky potvrdili asociaci hladiny substancí kančího pachu s mnoha polymorfismy (Zamaratskaia & Squires 2009). Studie celého genomu GWAS a identifikace kandidátních genů, QTL a SNP tomu velice napomohla (Zadinová et al. 2016). S využitím šlechtitelských programů a správným křížením by se následně mohlo od kastrace upustit úplně. Nejlepší genetický marker (identifikovaný polymorfismus) zaznamenává změny v genu, které přímo ovlivňují daný znak. Takto vhodně zvolené markery lze pak snadno použít pro markerem podporovanou selekci (MAS) (Zamaratskaia & Squires 2009). Tento postup také podporuje fakt, že hladiny androstenonu a skatolu vykazují střední hodnoty heritability (Strahe et al. 2013; Zadinová et al. 2016).

3.7.1 Genomika prasete domácího

Přečtení celého genomu prasete domácího bylo zásadní pro kompletní analýzu genetického obsahu a pochopení fungování celého organismu. Identifikace různých genetických polymorfismů umožnila v chovu prasat značný benefit při šlechtění nových plemen a linií pro specifické využití v chovu. Nejznámějšími genetickými pokroky je větší zmasilost nebo odolnost vůči stresu a následné snížení výskytu vady PSE masa a mnoho dalších. Investice do tohoto oboru dala chovatelům prasat velké výhody napříč celým zemědělským průmyslem (Groenen et al. 2011).

Domácí zvířata jsou neocenitelným zdrojem při studiu molekulární genetiky. Studium celého genomu (GWAS) bylo analyzováno mnoho nových genů řídicích významné znaky a vlastnosti. Tato studie je založena na identifikaci jednonukleotidových polymorfismů, které jsou hustě zastoupeny napříč celým genomem. Narozdíl od QTL, které nejsou schopné popsat veškeré variace vlastností (Zhang et al. 2011).

3.7.2 Genetické markery

Nedávné pokroky v molekulární biologii se staly zásadními pro řešení mnoha otázek, které dříve bylo nemožné vyřešit. Některé změny v genech se nemusí projevit na fenotypu. Těžko rozlišitelné jsou ty nejmenší změny na úrovni nukleotidů. Ty nejmenší změny v molekule DNA jsou právě ty, které jsou nejvíce využívány jako genetické markery. S jejich identifikací došlo k posunu na úrovni výzkumu i chovu (Duran et al. 2009).

Genetické markery lze označit jako takové značky, které v genomu označí polohu genu (lokus) a podávají informaci o konkrétním genu. Jsou účinným nástrojem pro šlechtění a reprezentují genetickou variabilitu (Collard et al. 2005). Nejlépe detekovatelnými a stále nejčastěji využívanými jsou SNP. Metody jako sekvenace, genotypování i genová exprese jsou dnes lehce dostupné jak pro chovatele, tak i šlechtitele (Ciobanu et al. 2011). Mezníkem pro využití genetických informací na úrovni DNA u prasat bylo vytvoření referenční sekvence dokončené v roce 2012 Swine Genome Sequencing Consortium (Groenen 2016). Genetické markery jsou vysoce polymorfní, přítomné napříč celým genomem, početné, rychle, levně a lehce identifikovatelné krátké sekvence DNA určující genetickou diverzitu populace (Ollivier & Foulley 2011). To potvrzuje i Knoll & Vykoukalová (2002), kteří genetické markery popsali ve čtyřech bodech. Souhlasí s výše zmíněným tvrzením, že jsou genetické markery lehce identifikovatelné, početné a vysoce informativní. Také jim připisují výhodu při jejich získání již z mikroskopického množství tkáně z jakéhokoliv jedince v jakémkoliv věku (včetně zárodečných buněk (Knoll & Urban 2002). Získané DNA lze nadále dlouhodobě uchovávat a je možné se k analýze opakovaně vracet.

Biotechnologické metody přinesly i vývoj do šlechtění zvířat. V chovech se začalo využívat selekce podporované genetickými markery (MAS) s cílem zvýšení užitkovosti. Pro realizaci MAS je nutné znát nejprve genovou mapu, lokusy vázané na kvantitativní znaky, identifikovat důležité geny a kandidátní geny a následně provádět jen experimenty na testovací skupině (Knoll & Urban 2002). MAS pomáhá šlechtiteli dosáhnout včasného zachycení požadovaného znaku a jeho zařazením do chovného programu. Zvýšením frekvence asociované s požadovaným znakem už u malé části populace můžeme předpokládat její následné rozšíření do celé populace a konečný výsledek plemenitby. Tato manipulace může vést až k snížení frekvence nechtěné alely na minimum, nebo k jejímu úplnému odstranění (Duran et al. 2009).

Jako první případ markerem podporované selekce v chovu prasat vstoupil do historie pokus o snížení výskytu syndromu maligní hypertemie (PSS). Recesivní forma genu má negativní účinek na kvalitu masa (PSE) a sníženou životaschopnost. Cílem bylo snížení výskytu negativní alely *n* u halothanového genu (RYR1, HAL, CRC) a sensibilitu prasat ke stresu v mateřských liniích. První pokus dopadl úspěšně a dnes můžeme najít i populace, ve kterých se recesivní forma genu nevyskytuje vůbec (Groenen et al. 2011; Fontanesi et al. 2015).

3.7.3 Polymorfismus

Genetický polymorfismus je vysvětlován jako rozdíl v sekvenci DNA mezi jednotlivci, skupinami nebo populacemi. Mezi polymorfismy se řadí rozdíly v počtu tandemových opakování různých vzorů, delece, inserce nebo trasverze na úrovni jednoho nebo více nukleotidů. Polymorfismy se nazývají změny na úrovni DNA, které se běžně vyskytují v populaci a jsou spojeny s užitkovými vlastnostmi. Užitkové vlastnosti tak tvoří spektrum

různých vlastností – variant daného genu. Polymorfismy jsou často označovány mutacemi. Mutace jsou ale přesněji označení pro zřídka se vyskytující změny na úrovni DNA v důsledku vlivu záření, virového onemocnění nebo náhodnou chybou během embryonálního vývoje (Ismail & Esswawi 2012).

DNA polymorfismy lze detekovat pomocí molekulárně genetických metod. Mezi ně patří RFLP, RFLP-PCR, SSCP, DGGE, microarrays nebo sekvenovací (Ismail & Esswawi 2012).

3.7.3.1 SNP

Jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphism) patří mezi nejvíce rozšířené zdroje genetické variability. Jsou definovány změnou v jedné bázi mezi dvěma jedinci v definovaném úseku DNA. Existují tři typy SNP. Bodové mutace vzniklé záměnou bází stejného původu – tranzice, kdy se vymění purin za purin nebo pyrimidin za pyrimidin (*C/T* nebo *G/A*). Pokud se vymění purin s pyriminidem nebo naopak, nazývá se tato změna transverze (*C/G*, *A/T*, *C/A* či *T/G*). Dále SNP mohou způsobit změny typu jako delece či inserce. SNP tvořené změnou více alel jsou v podstatě vzácné. Nejčastěji se vyskytují pouze bialelické. Ačkoliv jsou takto malé, jejich výskyt je vysoký a často v oblastech kódujících genů. Oproti větším polymorfismům, multialelickým, jako jsou například mikrosatelity (Duran et al. 2009).

SNP jsou evolučně velice stabilní a nemění se z generace na generaci (Duran et al. 2009). I jediný SNP může ovlivnit až 22 % fenotypové variability (Zadinová et al. 2016). Prasečí genom obsahuje přibližně 60 000 SNP (Illumina PorcineSNP60 BeadChip) významných pro šlechtění (Duran et al. 2009; Zhang et al. 2011). V budoucnu by se mohlo využít SNP asociovaných s hladinou skatolu a androstenonu k jejich snížení. Mnohé studie nad touto možností uvažují a hledají data k realizaci (Zadinová et al. 2016).

3.7.3.2 QTL

QTL jsou geny ovlivňující kvantitativní znaky. Z toho vyplývá, že jsou řízena mnoha geny, jsou tedy multialelické (Zhang 1994). Tyto geny mohou být identifikovány porovnáním genotypů neznámých markerů s fenotypem nebo specifickou vlastností (Zadinová et al. 2016).

QTL jsou již dlouho známe markery využívané ve šlechtění zvířat. Ke každé významné vlastnosti v chovu prasat byly přiřazeny ekonomické parametry. Každá vlastnost, jako je jatečná hodnota, kvalita masa nebo reprodukční užitkovost, má v produkci vepřového masa různou váhu pro konečný finanční zisk. Takto vybrané markery jsou pak součástí metody pro markerem podporovanou selekci (MAS) (Jeon et al. 2003). Správně vybraný QTL marker se vyznačuje přímým vlivem na daný znak, aniž by byl ovlivněn nebo ovlivňoval negativně jiné znaky (Zamaratskaia & Squires 2009). I kančí pach je řízen mnoha geny. Existují QTL asociovaná s hladinou skatolu a androstenonu na několika chromozomech (Zadinová et al. 2016).

3.7.4 Kandidátní geny

Kandidátními geny se označují takové skupiny genů, které jsou nebo mohou být vázané k nějaké vlastnosti a mají na ní velký vliv. Prvním identifikovaným kandidátním genem byl gen RYR1. Nalézt se ho povedlo díky analogii mezi prasečím a lidským genomem, jelikož lidský

genom byl mnohem více prozkoumaný před 20 lety, než genomy hospodářských zvířat (Zamaratskaia & Squires 2009).

Kandidátní gen pro kančí pach by měl potencionálně ovlivňovat buď syntézu steroidů nebo metabolismus steroidů a tryptofanu. Zatím se nabízí oblasti na SSC6, kde můžeme najít dva geny spojené s hladinou kančího pachu blízko sebe (Duijvesteijn et al. 2010).

3.8 Biotransformace a exkrece složek kančího pachu

Metabolismus je součet všech chemických reakcí, které se v organismu vyskytují na buněčné úrovni k udržení života. Hlavním účelem je přeměna potravin na energii, vytváření makromolekul (Saghir & Ansari 2019) a odstranění veškerých potencionálně nebezpečných látek z organismu (Martínková et al. 2000). Biotransformace probíhá z největší části v játrech, kde je exprimováno velké množství enzymů degradujících toxické i fyziologické látky. Enzymy účastníci se metabolismů jsou významně zastoupeny v místech primárního kontaktu s xenobiotiky. Mezi tyto orgány patří například kůže, plíce, gastrointestinální trakt etc. Enzymy, které mají fyziologické funkce se vyskytují i v jiných orgánech, které nepodléhají primárnímu styku s toxickými látkami. Biotransformační enzymy jsou součástí ledvin, varlat, vaječníků etc. (Dvořák & Pávek 2008).

Jak již bylo zmíněno v kapitole Metabolismus androstenonu a Metabolismus skatolu, metabolismus se odehrává ve dvou fázích. V první fázi je výsledkem zvýšení polarity odstraňované látky. Většinou je během tohoto děje připojena nebo odkryta funkční skupina oxidací, redukcí nebo hydrolýzou. Látka tak zároveň mění svůj účinek. Metabolity jsou poté neúčinné, méně účinné nebo dokonce více účinné. V druhé fázi se tvoří vazba mezi metabolity a jejich funkčními skupinami s funkčními skupinami endogenních polárních molekul. Výsledkem je polární a lehce degradovatelný produkt (Martínková et al. 2000).

Hlavním místem odbourávání a metabolismu, jak toxických látek, tak i fyziologických, je membrána endoplazmatického retikula (lipofilní povaha). Mezi další místa biotransformace v buňce patří mitochondrie nebo cytosol. Do metabolismu xenobiotik mohou být zahrnuty i transportní bílkoviny, které přenáší metabolity z buňky ven. Metabolity jsou nejčastěji vylučovány močí nebo žlučí (Martínková et al. 2000).

3.8.1 Cytochrom P450

Enzymy cytochromu P450 patří mezi nejvýznamnější s nejšířší substrátovou specifitou. Největší zastoupení mají v játrech, hlavním metabolickém orgánu obratlovců. Hrají nezastupitelnou roli při tvorbě steroidních hormonů, cholesterolu, žlučových kyselin, vitamínu D a hydroxylaci mastných kyselin (Hsu et al. 2007).

Enzymy CYP jsou součástí první fáze metabolismu. Jsou povahou hemové proteiny podobné peroxidázám či katalázám. Přes velmi širokou specifitu obsahují všechny druhy enzymů CYP vysoce konzervovanou oblast v blízkosti vazebného místa pro hem. Hemový protein je takový protein, který na své membráně obsahuje hemovou skupinou, která zajišťuje přenos elektronů. Podobně jako u hemoglobinu je hem b (protoporfyrin IX), avšak železo je v oxidované formě Fe³⁺ (White & Marletta 1992). Spolu s cytochrom P450 oxidoreduktázou, cytochromem b5 a účastí NADPH na membráně endoplazmatického retikula tvoří tzv. jaterní mikrosomální monooxygenázový systém (Azenbacher & Azenbacherová 2001).

Do skupiny cytochromů patří také cytochrom b. Je to také enzym hemového charakteru, který plní převážně funkci v přenosu elektronů při některých reakcích cytochromu P450. Avšak ne vždy je účinným donorem elektronů pro některé CYP, je například médiem pro interakce mezi CYP a jinými enzymy (Lee & Witchel 2014).

Cytochrom b je nejčastěji definován jako mitochondriální enzym patřící mezi nejrozsáhleji sekvenované geny napříč obratlovci. Na mitochondriích se účastní dýchacího řetězce. Při studiu kančího pachu je významný cytochrom b5, který je výjimečný svým původem. Jeho výjimečnost spočívá ve způsobu syntézy na volných polysomech a jeho následného vložení nezávisle na SRP (signál rozpoznávající částice). To znamená, že se tento enzym sám spontánně vloží do ER narozdíl od enzymů cytochromu P450, které jsou syntetizovány na ribozomech endoplazmatického retikula připojených na SRP (Reithmeier 1996; Miller & Flück 2014). Witchel & Lee označují cytochrom b jako nezbytnou součást pro syntézu pohlavních steroidů. Při zjištění ztráty funkčnosti enzymu mutací v úseku genu *CYB5* byla popsána souvislost s nízkou koncentrací testosteronu a mikropenisem u dětí.

3.8.2 Sulfotransferázy

Sulfotransferázy katalyzují tvorbu esterů kyseliny sírové za vzniku sulfátů. Katabolizují širokou škálu xenobiotik a jejich metabolitů, stejně jako různé endogenní neurotransmitery, hormony, žlučové kyseliny, sacharidy a bílkoviny (Duffel 2010).

Ve většině případů přidání sulfátové skupiny do sloučeniny zvyšuje rozpustnost ve vodě a snižuje biologickou aktivitu. Z několika rodin *SULT* je s hladinou kančího pachu asociovaný *SULT1*. Enzymy *SULT* mají širokou tkáňovou distribuci a působí jako hlavní detoxifikační systém (Gamage et al. 2006).

Při reakci je hlavním dárce zbytku kyseliny sírové SO_3^{2-} 3'fosfosanosin 5'fosulfát (PAPS) na hydroxylovou nebo amino skupiny. Byly identifikovány dvě třídy *SULT*. První třída jsou enzymy *SULT*, které jsou vázané na membránu Golgiho aparátu a jsou zodpovědné za sulfonaci peptidů, proteinů, lipidů a glykosaminoglykanů. Druhá třída jsou enzymy *SULT* lokalizované v cytosolu buňky, které jsou zodpovědné za metabolismus xenobiotik a malých endogenních substrátů, jako jsou steroidy, žlučové kyseliny a neurotransmitery (Gamage et al. 2006).

3.9 Geny kančího pachu

Geny pro substance kančího pachu se nacházejí na různých chromozomech. Sekvence genů řídící syntézu pohlavních steroidů, a především androstenonu byly identifikovány na *SSC1*, *SSC2*, *SSC3*, *SSC4*, *SSC6*, *SSC7*, *SSC9*, *SSC11*, *SSC12*, *SSC13*, *SSC14* a *SSC15*. Geny řídící syntézu skatolu byly identifikovány na chromozomech *SSC1*, *SSC3*, *SSC5*, *SSC6*, *SSC7*, *SSC9*, *SSC10*, *SSC11*, *SSC13* a *SSC14* (Grindflek et al. 2011). Největší hustota QTL pro kančí pach je na chromozomech *SSC6*, *SSC7*, *SSC10*, *SSC13* a *SSC14* (Große-Brinkhaus et al. 2015).

Geny řídící syntézu androstenonu jsou exprimovány především v játrech a varlatech. Jsou rozděleny do dvou skupiny na geny řídící syntézu (*CYP17A1*, *HSD3B*, *CYB5A*) a geny řídící metabolismus (*SULT1A1*, *HSD3B*). Mimo geny vybrané do této práce jsou další potenciální geny, které mohou mít vliv na hladinu androstenonu a souvislost s kančím pachem (*HSB17B4*,

FDX1, CYP11A1, DHRS4, PRDX1, FTL, IDI1, SULT2A1, RDH12, TEAD3, LHB, CYP2C49, SRD5A2, FTL) (Leung et al. 2010; Zadinová et al. 2016).

Akumulace skatolu v tukové tkáni prasat je vysoce závislá na clearance v játrech pomocí enzymů rodiny CYP450 a SULT. Skatol je více ovlivnitelný dalšími vlivy, jako je věk, krmivo a pohlaví než samotnou expresí genů (Rasmussen & Zamaratskaia 2014). Geny skatolu jsou umístěny převážně na chromozomech SSC6, SSC7, SSC13 a SSC14 (Groß-Brinkhaus et al. 2015). Geny řídící metabolismus skatolu jsou rozděleny na fázi I (CYP2E1, CYB5A) a fázi II (SULT1A1) (Zadinová et al. 2016). Další geny asociované s hladinou skatolu, které mohou mít souvislost s hladinou kančího pachu, jsou např. *CYP1A2, CYP2A19, CYP2C49, CYP3A22* etc. (Rasmussen & Zamaratskaia 2014).

3.9.1 SSC1

Androstenon

Na chromozomu 1 se vyskytuje přibližně devět QTL, které mají souvislost s androstenonem. Duijvesteijn et al. (2010) analyzovali 3 SNP pomocí PorcineSNP60 Beadchip of Illumina, které by měli mít souvislost s různou hladinou androstenonu. Jedno SNP identifikovali v oblasti 58 Mb na SSC1, kde se vyskytuje gen kódující alfa řetězec choriového gonadotropinu. Ačkoliv by mohlo být SNP nalezený Duivesteijn et al. (2010) průkazné, Grindflek et al. (2011) ani jedno z identifikovaných SNP nepotvrdili v souvislosti s hladinou androstenonu. Le Mignon et al. (2010) identifikovali 3 QTL asociované s hladinou skatolu pomocí LDLA v oblasti 20,83 Mb, 176,81 Mb a 242,64 Mb. Významným genem na SSC1 je *CYB5A*. *CYB5A* je cytochrom P450, rodina 21, podrodina A, polypeptid 2 (149 737 537 - 149 783 623 bp) (Ensembl 2019). *CYB5A* je důležitým regulátorem aktivity CYP17A1. Existuje pozitivní korelace mezi hladinou androstenonu v tukové tkáni (Zamaratskaia et al. 2008). Sekvenováním mRNA produktu genu *CYB5A* identifikovali polymorfismus na 8 bp ve směru 3' -> 5' od ATG kodonu. Tento SNP by měl mít spojitost s nízkou expresí genu a snížením hladiny androstenonu v tukové tkáni (Robic et al. 2008).

Polymorfismus *CYB5A* c-8G>T vykazuje u mutované alely *T* nízkou hladinu androstenonu (Zadinová et al. 2016). Zamaratskaia et al. (2008) prokázali vliv alely *T* u hybridů švédských prasat (Švédský Yorshire x Švédská Landrace). Nicméně výskyt alely *T* byl velice nízký, homozygot *TT* se vyskytoval pouze jednou. Nízké hodnoty androstenonu byly ale v silné korelaci s živou hmotností zvířat. Proto vliv alely nepotvrdili. Grindflek et al. (2010) udělali podobný pokus na základě rozdílné exprese genu *CYB5A*. Sledovali výskyt polymorfismu a sílu exprese genu vůči obsahu androstenonu v tukové tkáni. Kanci (Duroc x Norské Landrace) měli za přítomnosti alely *T* vždy vůči testované skupině nižší hodnoty.

Skatol

Na chromozomu 1 nebylo zatím identifikováno mnoho genů pro skatol. Le Mignon et al. (2010) identifikovali 2 QTL v oblasti 109,5 Mb a 288,75 Mb SSC1. Grindflek et al. (2011) našli další OTL v oblasti 165-170 Mb. Avšak tento výsledek nebyl v souladu se studií Große-Brinkhaus et al. (2015).

Gen *CYB5A* je zapojen i do metabolismu skatolu v játrech. Mikrozomální enzym *CYB5A* zvyšuje aktivitu *CYP2E1* u lidí. Předpokládá se podobná aktivita i u prasat (Wiercinska et al. 2012). Podobně, jako tomu bylo u androstenonu, Zamaratskaia et al. (2008) popsali souvislost s nízkou hladinou skatolu v tuku, při výskytu mutované alely *T*. Její nízký výskyt potvrdili i Muñoz et al. (2018), kteří testovali významné geny u lokálních plemen prasat.

3.9.2 SSC2

Chromozom 2 je významně lemován geny asociovanými s androstenonem. Chromozom zahrnuje nejméně šest QTL, které jsou součástí metabolismu androgenů a estrogenů. Nachází se zde i gen *CYP2R1*, který kóduje enzym katalyzující mnoho reakcí při syntéze cholesterolu, steroidů a lipidů (Grindflek et al. 2011).

3.9.3 SSC3

Androstenon

Na chromozomu 3 se vyskytují čtyři oblasti QTL, které mají souvislost s androstenonem (Große-Brinkhaus et al. 2015). Mezi významné QTL patří QTL3a, které bylo identifikováno na pozici 32,2 - 53,6 Mb u Landrace 38–40 Mb u Duroca. Quantanilla et al. (2003) toto QTL definovali jako marker ovlivňující androstenon. Grindflek et al. (2011) připojil ještě jeho vliv na estrogeny. Jako kandidátní gen byl vybrán na chromozomu 3 gen *CYP1A1*, u kterého se předpokládala souvislost s metabolismem skatolu. Toto tvrzení bylo vyloučeno na základě pozdějších pokusů, kde se ukázalo jeho zapojení v steroidogenezi (Diaz et al. 2000; Fan et al. 2010).

Skatol

Chromozom 3 není významně lemován QTL pro skatol. Dosud byly identifikovány dvě oblasti (Große-Brinkhaus et al. 2015).

Gen pro sulfotransferázu rodiny 1A, člen 1 (*SULT1A1*) je umístěn na SSC3 v oblasti (18 352 022 - 18 354 465) (Ensembl 2019). Enzym zodpovědný za sulfataci ve fázi II metabolismu skatolu, byl identifikován jako termostabilní fenol-sulfotransferasa (*SULT1A1*), jeho metabolitem je 5- sulfátokyskatol. Modifikací exprese případně aktivity tohoto enzymu by vznikla velice užitečná metoda, jak redukovat skatol v tukové tkáni tzn. kančí pach (Diaz & Squires 2003; Zamaratskaia & Squires 2008). Uvnitř genu identifikovali Lin et al. (2004b) SNP, které bylo asociováno se sníženou aktivitou enzymu. Mutace se nachází na pozici 546 bp, kde došlo k záměně *A>G*, která způsobila transformaci lysinu za glutamin. Vzhledem ke snížení katalycké aktivity enzymu *SULT1A1* se zvyšuje koncentrace skatolu v tukové tkáni. Studie Skinner et al. (2006) tuto mutaci v dánské populaci prasat nenašli.

3.9.4 SSC4

Androstenon

Chromozom 4 je z hlediska zastoupení genů a QTL velice zajímavý. Na chromozomu 4 jsou identifikovány tři oblasti QTL pro androstenon z nichž jedna je velmi dobře prostudována mnohými studiemi (Quantanilla et al. 2003; Lee et al. 2004; Große-Brinkhaus et al. 2015). Grindflek et al. (2011) v blízkosti tohoto QTL identifikovali další v poloze 48 Mb u plemene

Duroc. Při detekci zjišťovali vliv na další steroidní hormony, ten však nepotvrdili. Proto je tato oblast dnes velice zajímavá s ohledem na selekci snížení obsahu androstenonu. V úzké blízkosti QTL identifikovaného Grindflek et al. (2011) byly identifikovány geny *DECRI*, které kódují mitochondriální enzym zapojený do beta-oxidace. Druhý gen, *CALBI*, je exprimován ve varlatech. Mimo vlivu na množství androstenonu ovlivňuje i ostatní steroidní hormony.

Významnou skupinou genů lokalizovaných na SSC4 jsou hydroxysteroidní dehydrogenázy zapojené do biosyntézy cholesterolu. Patří do skupiny aromatáz CYP tvořící množství různých izoenzymů (Zadinová et al. 2016).

Gen *HSD17B7* (hydroxysteroid-17-beta-dehydrogenáza 7) je gen u prasat lokalizovaný na SSC4 (95 571 648 - 95 594 175 bp) (Ensembl). Enzym *HSD17B7* katalyzuje poslední část metabolismu androgenů a estrogenů, kdy mění jejich prostorové uspořádání (izomerii) (Chen et al. 2007). Názory na expresi *HSD17B7* jsou různé. Moe et al. (2008) a Chen et al. (2007) souhlasí s jeho rozdílnou expresí v játrech negativní korelací s obsahem androstenonu v tukové tkáni. Naopak Grindflek et al. (2010) detekovali asociaci mezi hladinou androstenonu a expresí genu ve varlatech. Rozdílnou expresí v játrech nepotvrdili.

Gen *HSD3B1* (3-betahydroxysteroid dehydrogenáza) nacházející se na SSC4 (101 563 728 - 101 573 906 bp) je součástí počátku metabolismu androstenonu v játrech i varlatech (Robic et al. 2007). Přednostně a více je redukována forma beta-androstenolu 3betaHSD (Zamaratskaia & Squires 2009). Předpokládá se, že *HSD3B* a jeho exprese je řízena množstvím pohlavních hormonů, jelikož jeho exprese je závislá na pohlaví i hmotnosti zvířete. Se zvyšující hmotností se snižovala exprese a zvyšovalo se ukládání androstenonu do tukové tkáně, jak uvádí Nicolau-Solano et al. (2007). Moe et al. (2007) potvrdili jejich teorii s rozdílnou expresí u různých plemen prasat. Grindflek et al. (2010) s touto teorií však nesouhlasí.

3.9.5 SSC6

Androstenon

Chromozom 6 je velice genově bohatou oblastí. Již na začátku studia genomu prasat, patřil SSC6 mezi hlavní místo zájmu. Je na něm lokalizovaný první identifikovaný gen. SSC6 je ale i významně lemován QTL oblastmi pro androstenon. Dosud bylo identifikováno celkem šest oblastí (Große-Brinskhaus et al. 2015). Podobně tomu je i u SNP. Třicet jedna SNP bylo nalezeno v oblasti 36,9 - 44,9 Mb Duisteijn et al. (2010) u kanců plemene Duroc. Zajímavé ale je, že tuto teorii podpořili v případě zkoumání Duroců i Grindflek et al. (2011), ale u plemene Landrace nedetekovali žádné ze zmíněných SNP (Grindflek et al. 2011).

SSC6 jak je již výše zmíněno velice genově hustý. Mezi jednotlivé zástupce patří např. i gen pro luteinizační hormon beta polypeptidu (*LHB*), který je zodpovědný za začátek syntézy steroidních hormonů v Leydigových buňkách a ovariích na začátku puberty (Zadinová et al. 2016). Dle Duijvesteijn et al. (2010) je možným kandidátním genem pro androstenon.

Dalšími významnými geny v metabolismu androstenonu jsou geny pro sulfotransferázu *SULT2A1* a *SULT2B1*. *SULT2A1* je lokalizován na SSC6 v oblasti 53 522 129 - 53 536 676 bp (Ensemble). Je aktivní v testikulární i hepatalní tkáni, kde konjuguje sulfátovou skupinu na 5 α -androstenon (Sinclair et al. 2006; Zadinová et al. 2016). Sinclair et al. (2006) ukázali, že exprese genu *SULT2A1* ovlivňuje i akumulaci androstenonu v tukové tkáni. To však Grindflek et al. (2010) vyloučili, když u Duroca a Landrace zaznamenali souvislost pouze s obsahem

androgenonu v plazmě. U genu *SULT2BA* byla pozorována ještě navíc souvislost mezi expresí enzymu v játrech a varlatech s hladinou androgenonu v těle zvířete a plemenem. Moe et al. (2008) pozorovali výrazné rozdíly v rámci plemene Duroc a Landrace při pozorování zvířat ve dvou skupinách podle hladiny androgenonu.

Skatol

Chromozom 6 je velice významnou oblastí pro geny a QTL skatolu i indolu. Velké zastoupení QTL pro skatol a indol identifikovali Grindflek et al. (2011) v oblasti 3,7 - 5,0 Mb. Druhou významnou oblastí je oblast 35,9 - 39,4 Mb, která je součástí stejného regionu bohatého na několik genů s biologicky relevantní aktivitou, jež identifikovali Duijvesteijn et al. (2010). Gen cytochromu P450, rodiny 2 a podrodiny A, *CYP2A6*, byl identifikován Diaz & Squires (2000a) a Lin et al. (2004a). Je lokalizovaný v oblasti 44 853 498 - 44 876 802 bp na SSC6. Enzym *CYP2A6* je součástí první fáze metabolismu skatolu a je označován jako nejdůležitější. Místem působení jsou stejně, jako u *CYP2E1*, játra (Robic et al. 2008). Aktivita *CYP2A6* negativně koreluje s množstvím skatolu v tukové tkáni. V případě identifikace bodové mutace v tomto genu, byla zaznamenána úplná ztráta enzymu ve vzorcích jater a mnohonásobně zvýšená akumulace skatolu v tukové tkáni (Diaz & Squires 2000a; Lin et al. 2004). V případě genu *CYP2A6* byly zkoumány různé inhibitory jeho aktivity (Diaz & Squires 2000a; Zamaratskaia & Squires 2009).

3.9.6 SSC7

Androstenon

Široká oblast na chromozomu 7 je významně zastoupena mnoha QTL v pozici okolo 33 a 88 Mb. Chromozom 7 obsahuje také několik SNP, které se však vyskytují v nekódujících oblastech mezi geny (Große-Brinskhaus et al. 2015).

Na chromozomu 7 se nachází hned několik genů pro steroidogenezi. Geny cytochromu P450 jako *CYP11A1* je začleněný nejen do metabolismu skatolu, ale i steroidogenezi. Gen *CYP11A1* (59 175 820 - 59 188 720 bp) (Ensembl) kóduje enzym katalyzující konverzi cholesterolu na pregnolenon v první fázi syntézy (Grindflek et al. 2011). Rozdílnou expresi genu v játrech nepotvrdili Grindflek et al. (2011) u Norské Landraci, ani Quintanilla et al. (2003) u kříženců Large White a Meishan. Robic et al. (2011b) došli ke stejným výsledkům.

V oblasti 27,4 - 27,9 Mb se nachází QTL v oblasti kandidátního genu pro androstenon *CYP21A2* (27 722 258 - 27 725 371 bp) (Grindflek et al. 2011). Enzym *CYP21A2* je také začleněn do první fáze syntézy androgenonu z progesteronu. Jeho exprese je lokalizována převážně v kůře nadledvin (Zadinová et al. 2016).

V oblasti bohaté na QTL se vyskytuje gen *TEAD3* na pozici 36 085 701 - 36 100 686 bp (Ensembl). Na základě poznatků z humánní genetiky je gen podobný prasečímu *TEAD3* lokalizovaný na lidském chromozomu 6. Jeho funkce souvisí s regulací transkripce *HSD3B*, která přímo souvisí s degradací androgenonu v játrech. U prasat tento efekt nebyl přímo potvrzen (Robic et al. 2012).

Skatol

QTL asociované s různou hladinou skatolu a indolu se překrývají s QTL a geny řídicími syntézu a metabolismus androstenonu. Proto se nabízí myšlenka, že gen *CYP11A1* a *CYP21A2* zasahuje do metabolismu skatolu (Grindflek et al. 2011).

3.9.7 SSC10

Androstenon

Chromozom 10 se z hlediska rozdílné hladiny androstenonu v tukové tkáni a jeho souvislosti s kančím pachem nejeví nijak zajímavý. Nejsou zatím známé geny lokalizované v testovaných oblastech. Lee et al. 2005 a Grindflek et al. 2011 identifikovali ve stejné oblasti na chromozomu QTL, které by mohlo být v asociaci s abnormálním zápachem.

Skatol

Chromozom 10 je z hlediska výskytu regionů řídicích metabolismus skatolu a indolu mnohem zajímavější. Ačkoli na chromozomu nebyly zatím identifikovány žádné významné geny, byly identifikovány celkem čtyři oblasti QTL asociované s hladinou skatolu a pět oblastí QTL asociovaných s hladinou indolu (Große-Brinkhaus et al. 2015). Tyto QTL byly identifikovány Grindflek et al. (2011) a Gregersen et al. (2012).

3.9.8 SSC11

Androstenon

Na chromozomu 11 zatím nejsou známy žádné významné geny asociované s hladinou androstenonu (Große-Brinkhaus et al. 2015). Grindflek et al. (2011) detekovali na pozicích 11,8 Mb a 64,2 - 64,5 Mb QTL u plemene Duroc a Landrace. U francouzského Large White detekovali Le Mignon et al. (2010) QTL asociované s androstenonem v odlišné pozici (37,1 - 37,8 Mb).

Skatol

V případě skatolu bylo na chromozomu 11 identifikováno zatím jedno QTL Grindflek et al. (2011) v oblasti 15,7 - 16,7 Mb. Pro indol byly identifikovány dvě oblasti. Jednu uvádí studie Gregersen et al. (2012), která se překrývá s QTL řídicí androstenon a druhou Große-Brinkhaus et al. (2015). Na SSC11 prvně identifikovali SNP asociované s hladinou skatolu Filardi de Campos et al. (2015) na pozici 76 733 364 bp.

3.9.9 SSC13

Androstenon

Chromozom 13 je lemován čtyřmi oblastmi QTL asociovanými s hladinou androstenonu (Große-Brinkhaus et al. 2015). Grindflek et al. 2011 identifikovali jednu oblast v regionu 19,3 - 19,6 Mb u Duroca a Landrace. Ani jejich ani žádné jiné studie však nenalezli žádný kandidátní gen v této oblasti. Avšak nedaleko tohoto intervalu se nachází dva kandidátní geny (*SLC22A13*, *SLC22A14*). Jako substráty reakcí, do kterých jsou jejich enzymy součástí, jsou například tryptofan a sulfatované steroidy. Druhé QTL identifikovali u Landrace v oblasti 87,8 - 92,5 Mb, které se z části překrývá s QTL identifikovaným Lee et al. (2004).

Skatol

Širokou oblast na chromozomu 13 identifikovali Lee et al. (2004) jako QTL pro skatol. S částí této oblasti se shoduje i oblast pro QTL mezi 60,5 až 65,6 Mb, kterou identifikovali Le Mignon et al. (2010). S tímto výrokem se však neslučuje studie Grindflek et al. (2011). Na chromozomu 13 jsou také identifikovány dvě oblasti související s metabolismem indolu (Lee et al. 2004; Grindflek et al. 2011; Große-Brinkhaus et al. 2015). Práce Filardi de Campos et al. (2015) na SSC13 neidentifikovala žádné QTL ani SNP asociované s hladinou skatolu.

3.9.10 SSC14

Androstenon

Chromozom 14 je vysoce bohatý na geny, SNP a QTL asociovaných s hladinou kančího pachu. Celkem čtyři vědecké studie identifikovali šest oblastí QTL napříč celým chromozomem (Große-Brinkhaus et al. 2015). Gregersen et al. (2012) identifikovali u plemene Duroc QTL v oblasti 19,421 - 21,826 Mb. Od této oblasti dále lemují chromozom QTL oblasti detekované Quintanilla et al. (2003) a Lee et al. (2004), jež oba studovali křížence plemen Large White & Meishan. Identifikované oblasti se však nijak nepřekrývají. Lee et al. (2004) považují SSC14 jako významný pro regulaci hladiny kančího pachu v tukové tkáni.

Gregersen et al. (2012) identifikovali u plemene Yorkshire SNP asociované s androstenonem v oblasti 138,164 Mb. V genu cytochromu P450 rodiny 17 podrodiny A polypeptidu 1 (*CYP17A1*) v oblasti 113 805 753 - 113 812 504 bp se nachází SNP vzniklé substitucí *T>A*, kterou identifikovali Lin et al. (2005). Enzym CYP17A1 je součástí chemické reakce enzymu CYP17A1 při syntéze pohlavních steroidů z pregnolenonu (Lin et al. 2005). Gen se exprimuje ve varlatech a ovariích (Zadinová et al. 2016).

Mutace vedoucí ke změně aminokyselin (*Leu > His*) nemění dle Lin et al. (2005) aktivitu enzymu, tudíž se nemění ani hladina kančího pachu v tukové tkáni. Grindflek et al. (2010) s návazností na jejich dřívější studie upozorňují na možnou souvislost tohoto genu s hladinou androstenonu. Na základě zvýšené hladiny androstenonu zkoumali míru exprese genu *CYP17A1* v játrech testovaných zvířat, která měla statistickou souvislost mezi SNP a hladinou androstenonu.

Skatol

Široká oblast QTL na chromozomu 14 je asociována se skatolem a indolem. Tyto oblasti se překrývají s QTL androstenonu. Gregersen et al. (2012) identifikovali QTL asociované s indolem u plemene Landrace i Yorkshire (150,832 - 153,786 Mb, 149,326 - 153,593 Mb). U kříženců Large White & Meishan Quintanilla et al. (2003) objevili jako první region od 38,1 do 39,1 Mb QTL pro skatol.

Gen cytochromu P450 rodiny 2 podrodiny E polypeptidu 1 (*CYP2E1*) hraje hlavní roli v metabolismu skatolu. Jedná se o kandidátní gen, který je umístěn v oblasti (141 690 553 - 141 703 677 bp) QTL pro skatol (Moe et al. 2009). CYP2E1 se v játrech podílí na odbourání xenobiotik, u prasat je součástí prvního kroku metabolismu skatolu (Robic et al. 2007). V případě nízké aktivity tohoto genu dochází k vyššímu ukládání skatolu v tukové tkáni (Robic et al. 2007; Zamaratskaia & Squires 2009). Substitucí *G>A* vzniklo v genu *CYP2E1* SNP, které

je asociovaná s vysokou hladinou skatolu v tukové tkáni prasat (Lin et al. 2006). Moe et al. (2009) se zabývali i SNP vzniklé náhradou *C* za *T*. U kanců Duroc i Landrace potvrdili jeho souvislost s hladinou skatolu i indolu. Muñoz et al. (2018) tvrdí, jako mnozí další vědci, že tento polymorfismus představuje velkou část změny fenotypu obsahu skatolu v tukové tkáni.

3.10 Molekulárně-genetické metody využité v této práci

3.10.1 Izolace DNA

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je základní genetickou informací, uloženou v jádře jakékoliv živé buňky. Pro její izolaci je hypoteticky vhodná jakákoliv tkáň obsahující jádro. Uvádí se, že nejlepší výtěžnost DNA je při izolaci tkáně čerstvé. Jako nejvhodnější tkáň se v laboratořích pro izolaci zvířecí DNA využívá krev, vzorky tkání (svalovina), které mohou být čerstvé i hluboce zmražené, nebo vlasové cibulky etc. (Lefferts & Lefferts 2017).

Metody izolace je nepřeborné množství a mohou trvat od řádů minut po několik hodin (Elkins 2013). Základní kroky v procesu izolace jsou však vždy stejné – lýza buňky, odstranění bílkovinných a jiných zbytků, umístění DNA do roztoku (Lefferts & Lefferts 2017). Lýza buněk a separace DNA závisí na porušení buněčné a jaderné membrány. Jejich degradace se může provádět teplem nebo detergenty jako je dodecylsulfát sodný (SDS) (Elkins 2013). Pokud je přítomna tkáň, proteiny se musí degradovat lyzujícími pufrů jeho je proteinkináza K nebo zaživací enzymy. Při degradaci tkáně je vzorek inkubován na dobu kratší 20 minut do 60 °C. Při dalších úkonech je využíváno často odstředivé síly. Ta dopraví vždy nedegradované molekuly DNA na dno zkumavky. Molekuly DNA se během těchto kroků očišťují od bílkovinných nečistot, připojují se na různé nosiče či jdou skrz různé kolonky, které slouží jako síta oddělující DNA od zbytku směsi. Následně se vymývá pomocí mycích pufrů a uchovává se ve vhodném pufru jako je tri-EDTA nebo deionizovaná voda (Elkins 2013; Lefferts & Lefferts 2017).

3.10.2 PCR

Objevem PCR byla započata nová doba a tento první biotechnologický nástroj umožnil tak rozvoj dalších metod a technik k identifikaci a zkoumání DNA (Lefferts & Lefferts 2017).

Podstatou PCR je napodobení replikace DNA *in vitro*. PCR je polymerázová řetězová reakce, při které dochází k duplikaci DNA nebo její specifické sekvence za použití DNA polymerázy (Elkins 2013).

Enzymatické namnožení DNA probíhá v cyklu ve třech fázích. První fází je denaturace, kdy při teplotě okolo 94 °C dochází k denaturaci molekul DNA na jednotlivá vlákna. Druhou fází je annealing, při kterém specificky nasedají primery, které slouží jako počáteční místo replikace. Teplota této fáze se odvíjí od vzhledu primerů. Přibližně se udává v rozmezí od 45–65 °C. Třetí fází je fáze elongace, při které polymeráza syntetizuje nové vlákno. Teplota je nejčastěji 72 °C, což je teplota termostabilní polymerázy (upravené Taq polymerázy), při které je schopná pracovat. (Dvořáková & Vrtková 2001).

Dnes se nejčastěji využívají k izolaci DNA v laboratoři kity, které nahradili extrakci pomocí fenolu nebo chloroformu. Jedná se tedy o pohodlnou paralelní metodu zpracování více vzorků s DNA do velikosti 150 kb. Genomické kity firmy QIAGEN jsou schopny izolovat

velice čistou DNA s vysokou molekulovou hmotností ze široké škály biologických vozků (QIAGEN). Microarray sada PorcineSNP60 DNA Analysis Kit obsahuje dostatečně velké množství s rovnoměrně rozmístěnými sondami a nabízí dostatečně husté sledování SNP a jejich genotypů pro asociační studie. Tento chip představuje řešení pro rychlé vyšetřování genetických variací u více plemen prasat (Illumina).

3.10.3 PCR-RFLP

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) je starší metoda na které je založena metoda PCR-RFLP. Metoda je založena na restrikci fragmentů získaných PCR specifickými enzymy (Williams et al. 1990). Restrikční enzymy jsou takové endonukleázy, které jsou složeny ze dvou podjednotek a dokážou rozpoznat specifické sekvence v DNA a přerušit fosfodiesterovou vazbu na obou vláknech. Specifické sekvence na DNA se nazývá palindrom, to znamená, že sekvence se čte ve směru 3'→5' jako ve směru 5'→3', dlouhý čtyři až šest nukleotidů. Vzniklé fragmenty definovaných délek jsou vizualizovány pomocí elektroforézy, kde se oddělí podle jejich velikosti (Botstein et al. 1980; Knoll & Vykoukalová 2002).

3.10.4 Elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda pro separaci fragmentů DNA o různých velikostech pomocí stejnosměrného proudu. Rozeznatelné jsou fragmenty od velikosti 100 bp do 25 000 Kb. Agaróza je látka extrahovaná z mořských řas. Chemické složení je polymer galaktózových podjednotek. Rozmícháním agarového prášku v pufru (TAE) a zahřátím, dochází následně k polymeraci podjednotek při chladnutí gelu. Asociované polymery vytváří síto, skrz něž prostupují molekuly různou rychlostí a oddělují se dle jejich velikosti, respektive mobility (Lee et al. 2012).

Různá koncentrace gelu umožňuje různé rozlišovací schopnosti. Běžně využívanou koncentrací gelu je 0,5 až 2 % v závislosti na velikosti fragmentů DNA. Obarvená směs DNA po restrikci (např. Ethidium bromid) se přenesse do jamek na začátku gelu, který je umístěn ve vodivém pufru (TAE). Záporně nabitě fragmenty DNA se v elektrickém poli pohybují ke kladně nabitě anodě a rozdělují se podle velikosti. Rychlost migrace fragmentů ovlivňuje jejich velikost, koncentrace gelu, velikost napětí, typ gelu a pufru. Vizualizace po elektroforéze je možná pod UV lampou díky fluorescenčnímu barvivu jako je GelRed nebo GelGreen. Velikost fragmentů se určuje podle standardu o známé velikosti (Lee et al. 2012).

4 Metodika

4.1 Zvířata

Celkem bylo testováno 327 zvířat 7 různých plemen - 50 Pietrain, 53 Duroc, 50 Landrace, 50 Bílé ušlechtilé, 50 Přeštické černostrakaté, 38 Divočák, 36 Mangalica. U komerčních plemen byly odebrány vzorky krve z jungulární žíly živým zvířatům v 6 měsících po dohledem veterináře. Zvířata pocházela z několika českých chovů a více turnusů. Soubor divočáků byly odebrány vzorky tkáně po ulovení na území ČR v průběhu let 2014-18).

Pro ilustrační asociační analýzu bylo testováno 73 hybridních zvířat ((BuxL)xBO). Experiment byl zpracován na kancích pocházejících ze stejného chovu. U všech byl proveden stejný způsobu výkrmu v testační stáji Ploskov České zemědělské univerzity v Praze. Kanci byli naskladněni ve věku 28 dní v přibližné váze 7 kg a poraženi ve věku 153 dní s průměrnou hmotností 116 kg.

U všech čistokrevných zvířat bylo sledováno 5 genů a v nich 8 polymorfismů. Vzorky krve byly uchovávány ve zkumavkách s K₂EDTA a skladovány při -20 °C. Vzorky tkáně byly po odebrání uloženy při teplotě - 20 °C.

U kříženců byly sledovány stejné polymorfismy, ale vzhledem k tomu, že variabilita byla zjištěna pouze u genů CYP2E1 a HSD3B1, byla asociační analýza provedena pouze pro tyto SNP (g.1423G>A, g.1422C>T, g.2412C>T, c.1220T>A).

4.2 Izolace DNA

Genomická DNA byla izolována ze vzorků krve na základě přítomnosti jaderných buněk leukocytů pomocí Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell). Z tkáně byla DNA izolována z jader svalových buněk pomocí Genomic DNA Mini Kit (Tissue). Kontrola koncentrace izolované DNA byla kontrolována za využití elektroforéza s 1% agarózovým gelem nebo na přístroji NanoDrop[™] One (Thermo Scientific[™]). Genomická DNA byla uložena při -20 °C.

4.3 PCR

Z genomické DNA byly metodou PCR amplifikovány fragmenty pomocí specifických primerů ohraničujících oblast s hledanými polymorfismy. Studované geny a jím příslušné primery jsou uvedeny v Tabulce 1.

PCR proběhla v PCRcykleru s objemem směsi 25 ul, která vznikla smísením 16,3 ul H₂O, 1-1,5 ul MgCl₂, 0,5 ul dNTP, 0,5 ul DMSO, 2,5 ul LA pufru, 1 ul od každého primeru, 0,2 ul DNA polymerázy a 1,5 ul genomické DNA. Druhou reakční směsí byl PPP Combi MasterMix od firmy TopBio s.r.o.

Tabulka 1 Polymorfismy vybraných genů a jejich primery pro PCR.

Gen	Lokalizace SNP	Polymorfismus	Primer	MgCl ₂ (mM)	Délka fragmentů (bp)	Anelační teplota (°C)	Počet cyklů
<i>CYP2E1</i>	SSC14 exon 9	g.1423G>A	A – GCT TAG GGT GAT GGT TTA CAC A	1,5	524	55	30
	SSC14 exon 9	g.1422C>T	B – GGA ACC CAA CAC AGA CTC AA	1,5	524	55	30
	SSC14 promotor	g.2412C>T	L – GTC CCC AGA AAC AAC CTA ACA N – AGC AAC CCC AGT GGT ACT GA	1,0	369	55	30
<i>CYP17A1</i>	SSC14 exon 7	c.1220T>A	A – GCT GCC ACC CAC TGA CTA AT	1,5	659	57	31
			B – GCT GCA AAG AAT CTG GGT AAG T				
<i>SULT1A1</i>	SSC3 exon 5	c.439A>G	C – GCC CAC ACT GCA GGT CGA CAG	1,5	271	55	30
	SSC3 exon 5	c.846T>C	D – CCC ACC CCT TCC TCC AAA GTC	1,5	271	55	30
<i>CYB5A</i>	SSC1 5'UTR region	c-8G>T	A – ACA CGA GTT CTG GCC AAT CAT C	1,5	401	55	32
			B – GTG CAG GTC TAT CCC GAC AT				
<i>HSD3B1</i>	SSC4 intron 3	g.165262G>A	A – CCCAGTGTT TTCTG GTTCCCT	PPP combi master mix	512	55	30
			B – TTCTCCTCCAGCAACAAGTG				

4.4 PCR-RFLP

Výsledné genotypy daného polymorfismu byly zjištěny pomocí restričních enzymů, které specificky štěpily molekulu DNA během PCR-RFLP reakce. Do reakční směsi s objemem 15 μ l bylo přidáno 10,2 μ l H₂O, 3 μ l restriktázy, 1,5 μ l pufru a 3 μ l amplikovaného DNA fragmentu.

Pro každý polymorfismus existuje specifický restriční enzym, se specifickými podmínkami reakce. Restriční enzymy a reakční podmínky pro vybrané polymorfismy jsou uvedeny v Tabulce 2.

K určení výsledného genotypu v případě polymorfismů g.1423G>A a g.1422C>T, vzhledem k jejich sousední poloze, bylo využito třech enzymů podle práce Zadinová et al. (2017) viz Obr. 3.

SNPs/genotypes		Digestion with restriction enzymes ^a		
c.1422C > T	c.1423G > A	<i>Bsp</i> 68I (<i>Nru</i> I) (tCG/cga) ^b	<i>Hpy</i> 188III (tC/Nnga) ^b	<i>Bsr</i> DI (<i>Bse</i> MI) (nn/catTGc) ^b
CC	GG	B	B	A
TT	GG	A	A	B
CT	GG	AB	AB	AB
CC	AA	A	B	A
TT	AA	A	A	A
CT	AA	A	AB	A
CC	AG	AB	B	A
TT ^c	AG ^c	A	A	AB
CT	AG	A	AB	AB
TC	AG	AB	AB	A

^a *Bsp*68I: A – 524 bp, B – 301 + 223 bp; *Hpy*188III: A – 465 + 59 bp, B – 302 + 163 + 59 bp; *Bsr*DI: A – 524 bp, B – 306 + 218 bp.

^b The capital letters are nucleotides in positions c.1422 and c.1423.

^c The genotype combination TT/AG was not found in the analysed samples.

Obrázek 3 Určení genotypů SNP c.1422C>T a c.1423G>A pomocí štěpení restričními enzymy (Zadinová et al. 2017)

Tabulka 2 Restrikční enzymy a podmínky reakce pro PCR-RFLP

Primer	Polymorfismus	Restrikční enzym	Alela (bp)	Teplota (°C)	Čas (h)
CYP2E1 – A,B	g.1423G>A	Bsp68I	A: 524, B: 301+223	37	4
	g.1422C>T	Hpy188III	A: 465+59, B:302+163+59	37	4
		BsrDI	A: 524, B: 306+218	65	3
CYP2E1 – L,N	g.2412C>T	TscAI	C: 271+92+6, T: 363+6	55	3
CYP17A1 – A,B	c.1220T>A	BshNI	A: 443+216, T: 659	37	4
SULT1A1 -C,D	c.439A>G	MscI	G: 271, A: 194+77	37	4
	c.846T>C	SduI	C: 271, T: 203+68	37	4
CYP5A – A,B	c-8G>T	Bsh1236I	G: 226+175, T: 401	60	3
HSD3B1 – A,B	g.165262G>A	BsmAI	A: 442+70, G: 259+183+70	37	4

4.5 Elektroforéza

Přímo do směsi po rozštěpení PCR-RFLP bylo přidáno barvivo 6x loading dye (Top Bio) a takto obarvené vzorky s neštěpenými fragmenty byly přeneseny na agarózový gel o koncentraci 1,5 - 2 %. Separace fragmentů probíhala při napětí 230 V po dobu 20 minut. Výsledné genotypy byly vizualizovány po přenesení gelu pod UV lampu, kde byly pořízeny snímky.

4.6 Chí-kvadrát test

Chí-kvadrát test byl proveden pomocí funkce v programu SAS (Statistical Analysis System, Inst. Verze 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA). Tato procedura zahrnovala jednotlivé genotypy SNP u všech vybraných plemen. Ve výsledcích jsou zahrnuty jednotlivé genotypy a celkový počet zvířat, dále stupně volnosti, součet diferencí a p-hodnota.

V příložených tabulkách jsou uvedeny výsledky podporující první hypotézu o rozdílech ve výskytu alel u vybraných SNP u čistokrevných plemen.

4.7 Fisherův exaktní test

Fisherův exaktní test byl vypočítán v programu SAS (Statistical Analysis System, Inst. Verze 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA). Tato procedura zahrnovala jednotlivé genotypy u vybraných plemen. Ve výsledcích jsou zahrnuty jednotlivé genotypy, počet zvířat v populaci a p-hodnota.

V Příloze jsou uvedeny tabulky s výsledky porovnávající vybraná otcovská plemena jednotlivě z ostatními plemeny.

Fisherův exaktní test byl zvolen na základě nízké četnosti u některých genotypů a malého počtu sledovaných zvířat v jednotlivých skupinách.

4.8 HPLC stanovení androstenonu, skatolu a indolu v tukové tkáni prasat

Pro stanovení hladiny androstenonu, skatolu a indolu v tukové tkáni byla použita kapalinová chromatografie Jasco sestava (Watrex) HPLC dle metodiky Okrouhlá et al. (2016). Ke stanovení byl extrahován tuk z hřbetní tukové tkáně kanců dle protokolu. Pro stanovení množství substancí kančího pachu ve vzorku v kapalinové chromatografii byly analyty extrahovány z čistého tuku postupem derivatizace a následně přeneseny do kolony. Pro stanovení androstenonu byla použita kolona Agilent Eclipse XDB. Pro stanovení skatolu a indolu byla použita kolona Kinetex C18 100A.

Pro standardizaci androstenonu a skatolu byl použit hřbetní tuk prasniček poražených do 80 kg živé hmotnosti. Výsledkem byla kalibrační křivka pro každou substanci, vůči kterým byly stanoveny hodnoty reálných vzorků hřbetní tukové tkáně kanců.

4.9 Asociační analýza

Asociační analýza byla počítána pomocí zobecněného lineárního modelu (GLM) v programu SAS (Statistical Analysis System, Inst. Verze 9.4, SAS Institute, Cary, NC, USA). V tomto modelu byly zahrnuty genotypy vybraných SNP a výsledky plynové chromatografie pro zastoupení androstenonu, skatolu a indolu v tukové tkáni.

Provedená asociační analýza na hybridních zvířatech má ilustrovat vliv sledovaných SNP na hladinu dominantních složek kančího pachu (androstenon, skatol a indol).

5 Výsledky

5.1 Porovnání genotypových frekvencí

U osmi vybraných SNP byla provedena identifikace genotypů celkem u 327 zvířat. Genetický materiál pocházel od prasat z nukleových chovů, ale i z prasat divokých pro doplnění celkového pohledu na diverzitu prasečí populace v České republice.

V prvním kroku analýzy byla srovnána všechna plemena mezi sebou a popsána jejich vzájemná variabilita jako celkové populace.

V druhém kroku byla vybrána dvě otcovská plemena, Duroc a Pietrain, vůči kterým byla jednotlivě porovnána vybraná plemena a pozorovány odlišnosti mezi populacemi.

5.1.1 CYP2E1, g.1423G>A

V rámci populace byly pozorovány všechny genotypy v počtu AA 149, AG 134 a GG 44. Výjimka byla zaznamenána u plemene Pietrain, kde se vyskytovaly pouze genotypy AA a AG. Alelu G asociovanou s vyšší hladinou skatolu v tukové tkáni jsme pozorovali převážně u kanců Bílé ušlechtilé. V případě tohoto polymorfismu byla p-hodnota Pearsonova chí-kvadrát testu nižší než 0,05.

Při porovnání plemene Pietrain s vybranými plemeny bylo prokázáno, že existují statisticky významné rozdíly v zastoupení sledovaných genotypů v populaci. Podrobnější výsledky jsou uvedeny v Příloze 2.

Při srovnání populace Duroců s populací Bílého ušlechtilého, Pietraina a divočáka byla prokázána statistická odlišnost mezi plemeny. Při srovnání s plemeny Landrace, Mangalica a Přeštické černostrakaté už signifikantní rozdíl ve frekvencích genotypů v populaci zaznamenán nebyl.

5.1.2 CYP2E1, g.1422C>T

Pouze u tří ze sedmi plemen byly pozorovány všechny genotypy. Zastoupení jednotlivých genotypů bylo CC 237, CT 76 a TT 14. U plemen Duroc, Mangalica, Pietrain a divočák se vyskytoval převážně genotyp CC. Pro tento polymorfismus nebyl Pearsonův chí-kvadrát test validní, jelikož nesplňoval podmínky výpočtu, ačkoliv mohou být z tabulky v Příloze 3 odlišnosti v zastoupení genotypů ve vybraných populacích zřejmé.

Výsledky Fisherova exaktního testu byly u obou vybraných otcovských plemen velice podobné. V případě porovnání Pietraina i Duroca s Bílým ušlechtilým, Landrace a Přeštickým černostrakatým byla p-hodnota nižší než hladina významnosti. Naopak při porovnání Pietraina a Duroca s Mangalicí, divočákem a jich samotných navzájem nebyly nalezeny žádné statisticky průkazné rozdíly.

5.1.3 CYP2E1, g.2412C>T

Všechna plemena kromě Pietraina měla zastoupena všechny genotypy. Celkově bylo identifikováno 47 zvířat s genotypem CC, 163 s CT a 117 s TT. Podrobněji jsou výsledky uvedeny v Příloze 4. Alela C asociovaná s vysokou hladinou skatolu se v populaci vyskytovala

v genotypu *CC* nejméně. Podle provedené analýzy Pearsonova chí-kvadrát testu byly potvrzeny signifikantní rozdíly ve frekvencích genotypů mezi populacemi.

Při srovnání Pietrainu s ostatními plemeny byla *p*-hodnota vždy nižší než 0,01.

U plemene Duroc byla výjimka v případě porovnání s plemeny Landrace a Přeštické černostrakaté, pro které nebyly potvrzeny statisticky významné rozdíly.

5.1.4 CYP17A1, c.1220T>A

U tohoto polymorfismu se vyskytoval u všech plemen genotyp *AA* s 324 zástupci, genotyp *AT* měl pouze jeden jedinec Mangalice a genotyp *TT* byl zastoupen pouze u jednoho jedince plemene Duroc a Landrace. Z výsledků je patrné, že se ve všech populacích vyskytoval pouze jeden genotyp, proto je zřejmá podobnost mezi populacemi a nelze tudíž vypočítat Pearsonův chí-kvadrát test.

Ve srovnání Pietrainu s Bílým ušlechtilým, Přeštickým černostrakatým a divočákem nebyla žádná variabilita. Při srovnání ostatních plemen jsme nedostali žádné statisticky významné výsledky. Více podrobností je uvedeno v Příloze 5.

5.1.5 SULT1A1, c.439A>G

Pro gen *SULT1A1* u SNP c.439A>G bylo u studovaných populací identifikováno celkem 309 zvířat s genotypem *AA*, 14 *AG* a 4 *GG*. U plemen Mangalica a Přeštické černostrakaté se vyskytoval pouze genotyp *AA*. Zastoupení genotypu *AA* asociovaného s vysokou hladinou skatolu v tukové tkáni bylo napříč populacemi převažující nad ostatními genotypy. Právě proto je zřejmé narušení variability v populaci a nelze ji testovat pomocí Pearsonova chí-kvadrát testu.

Při srovnání Pietrainu s Bílým ušlechtilým, Durocem, Mangalicí a Přeštickým černostrakatým byla prokázána statisticky významná odlišnost v zastoupení genotypů mezi populacemi. Při srovnání otcovských plemen se zbývajících populacemi nebyla potvrzena žádná statisticky významná rozmanitost. Podrobněji jsou výsledky uvedeny v tabulce v Příloze 6.

5.1.6 SULT1A1, c.846T>C

V sledovaných populacích prasat byly identifikovány pouze dva genotypy. Zastoupení genotypu *TT* bylo majoritní s počtem 321 zvířat. Genotyp *TG* neslo pouze 6 jedinců plemene Landrace. Již pouhým okem je viditelné narušení rozmanitosti v populaci prasat. Lépe jsou výsledky znázorněny v Příloze 7. Z tohoto důvodu nejsou splněny podmínky pro výpočet Pearsonova chí-kvadrát testu, a tudíž není vhodným testem.

U většiny vybraných plemen nebyla při srovnání s Pietrainem a Durocem nalezena variabilita, proto u nich Fisherův exaktní test ani nebyl počítán. Pouze při porovnání Pietrainu a Duroca s Landrace jsme došli k signifikantním rozdílům.

5.1.7 CYB5A, c-8G>T

U sledovaných populací bylo sledováno celkem 273 zvířat s genotypem *GG*, 46 *GT* a 8 *TT*.

U plemene Mangalica se vyskytoval pouze genotyp *GT*. Plemena Bílé ušlechtilé a Pietrain měla většinové zastoupení genotypu *GG* v populaci, pouze jeden jedinec měl genotyp *GT* a žádné zvíře nemělo genotyp *TT*. Pro vysoký výskyt pouze jednoho genotypu není Pearsonův chí-kvadrát test vhodným výpočtem. Nicméně lze dle přiložené tabulky v Příloze 8 soudit, že variabilita populací je narušena a podobnost mezi frekvencemi genotypů je značná.

U většiny srovnávaných skupin nebyly odhaleny žádné signifikantní rozdíly ve frekvenci genotypů. Výjimka byla při srovnání Pietrain a Duroca s Landrace a Přestickým černostrakatým, mezi kterými byly statisticky významné rozdíly.

5.1.8 HSD3B1, g.165262G>A

Z celkového počtu 327 testovaných zvířat byl genotyp *AA* zastoupen u 222 jedinců, genotyp *AG* u 55 jedinců a genotyp *GG* u 50 jedinců. U plemen Mangalica, Pietrain a divočák se vyskytoval pouze genotyp *AA* oproti tomu Duroc měl převážně zastoupen genotyp *GG*. Pomocí Pearsonova chí-kvadrát testu jsme potvrdili rozdílný zastoupení genotypů v populacích a její variabilitu.

Jedinci, mezi kterými existovala variabilita byly signifikantně odlišní v rozložení jednotlivých genotypů v populaci. Výsledky jsou uvedeny podrobněji v Příloze 9.

5.2 Asociační analýza

U polymorfismů genu *CYP2E1* a genu *HSD3B1* byla zpracována asociační analýza pomocí GLM modelu u 73 kříženců (BuxL)xBO na základě zjištěných genotypů a jejich vlivu na hladinu skatolu, androstenonu a indolu v tukové tkáni. Asociace mezi genotypy a substancemi kančího pachu jsou uvedeny detailněji v Příloze 1.

5.2.1 CYP2E1, g.1423G>A

U sledovaného polymorfismu g.1423G>A v genu *CYP2E1* byly identifikovány všechny tři genotypy *AA*, *AG* a *GG*. Statisticky významná asociace byla pouze u hladiny skatolu v tukové tkáni. Nejvyšší hladina skatolu byla zaznamenána u genotypu *GG*.

5.2.2 CYP2E1, g.1422C>T

U testovaných zvířat byly nalezeny v genu *CYP2E1* u sledovaného polymorfismu g.1422C>T všechny genotypy. Na základě modelu GLM byla vyhodnocena signifikantní asociace mezi SNP a hladinou skatolu v tukové tkáni. Zvířata s genotypem *TT* měla nejvyšší hladinu.

5.2.3 CYP2E1, g.2412C>T

Podobně jako u předchozích SNP byly v rámci testované populace identifikovány všechny tři genotypy *CC*, *CT* a *TT*. Statisticky významná asociace byla pozorována s hladinou skatolu v tukové tkáni. U genotypu *CC* byla pozorována nejvyšší hladina skatolu.

5.2.4 HSD3B1, g.165262G>A

U testovaných zvířat v genu *HSD3B1* byly identifikovány tři genotypy *GG*, *AG* a *AA*. V žádném ze sledovaných ukazatelů se neprojevily statisticky významné asociace. Avšak polymorfismus inklinoval k asociaci mezi genotypem a hladinou androstenonu v tukové tkáni, což podporují i výsledky odborných publikací.

6 Diskuse

Výsledky české populace jsou dřívějšího data než výsledky v diskutovaných publikacích, proto je možno předpokládat, že vlivem selekce a šlechtění na určité užitkové znaky mohlo dojít k posunu variability genotypů u vybraných SNP.

6.1 Genotypové frekvence

Cílem této práce bylo prokázat rozdílné frekvence genotypů vybraných polymorfismů asociovaných s hladinou kančího pachu u sedmi čistokrevných plemen.

6.1.1 CYP2E1, g.1423G>A

Z výsledků je patrné, že polymorfismus je vysoce rozšířen napříč všemi populacemi a zastoupení alely *A* asociované s nižší hladinou skatolu v tukové tkáni je převažující. Upevnění alely *A* v tomto případě by mohlo nasvědčovat skryté genové vazbě či vazbě na nějaký požadovaný fenotypový projev. Naproti tomu můžeme postavit k porovnání ryze mateřské plemeno Bílé ušlechtilé, které mělo ze všech vybraných populací nejvyšší zastoupení alely *G*. Tím může být podpořena teorie o vazbě alely *A* na znaky požadované u masných plemen jako je Pietrain.

Při srovnání s výsledky Moe et al. (2009) u sledovaného SNP byly pozorovány rozdíly mezi výsledky u české Landrace a Duroca. V jejich studii měla norská Landrace signifikantně nejvyšší zastoupení genotypu *GG* oproti české populaci, kde převažoval genotyp *AG*. V případě Duroca bylo u čínské populace prasat zaznamenáno rovnoměrnější rozdělení genotypů oproti výsledkům u norské Landrace, avšak nejvyšší zastoupení měl genotyp *AG* na rozdíl od české populace Duroců, která měla nejvíce rozšířen genotyp *AA*.

6.1.2 CYP2E1, g.1422C>T

Při srovnání otcovských a mateřských plemen jsme dospěli u tohoto polymorfismu k významným rozdílům. Alela *T* asociovaná s vyšší hladinou skatolu v tukové tkáni se vyskytovala s vysokou převahou právě u mateřských plemen, převážně v genotypu *CT*, ale i u pár jedinců s genotypem *TT*. To potvrzují i výsledky studie Moe et al. (2009) u norské Landrace. Naopak právě otcovská plemena jako Duroc a Pietrain spolu s Mangalicí a Divočákem měli tuto alelu zastoupenou pouze z 1-3 %. S těmito výsledky je v rozporu práce Zadinová et al. (2017), kde bylo zastoupení alely *T* vyšší. Divočák měl dokonce tuto alelu zastoupenou ze 44 %. Ve studii Moe et al. (2009) nebyl polymorfismus u plemene Duroc dokonce vůbec identifikován.

Vyšší výskyt mutované alely *T* u mateřských plemen může znamenat její vliv na znaky vázané na plodnost či jiné podstatné vlastnosti mateřských plemen. Popřípadě existence genové vazby s dalším SNP asociovaným s produkčními vlastnostmi.

6.1.3 CYP2E1, g.2412C>T

V případě tohoto polymorfismu se projevíly statisticky významné rozdíly ve frekvencích genotypů u vybraných populací. Plemeno Bílé ušlechtilé a divočák mělo nejvyšší

frekvenci alely *C* ($\geq 60\%$) ze všech. Rovnoměrné rozdělení alely *C* a *T* lze pozorovat u plemene Mangalica. Postupně u ostatních plemen narůstalo zastoupení alely *T*, až u Pietrainy dosáhla její frekvence 99 %.

Když vynecháme Bílé ušlechtilé, můžeme vidět změnu v zastoupení alel, respektive genotypů, v populacích prasat na základě jejich prošlechtění. Nejvyšší zastoupení alely *C*, respektive genotypu *CC*, který je asociovaný s vyšší hladinou skatolu, má divoké prase. Frekvence alely *C* se snižuje u zušlechtěného rustikálního plemene Mangalica a postupně přes plemeno Landrace a Duroc významně klesá, až je její zastoupení u Pietrainy skoro mizivé.

U práce Zadinová et al. (2007) však můžeme vidět, že divočák měl dokonce nulové zastoupení alely *T* v populaci. Naopak u Pietrainy byla frekvence alely *C* desetkrát vyšší než u námi pozorované populace.

Studie Muñoz et al. (2018), která sledovala zastoupení alel u lokálních plemen prasat, došla k podobným výsledkům jako má náš divočák a Mangalice. Našly se však i mezi španělskými prasaty výjimky, které měly vyšší frekvenci alely *T*.

6.1.4 CYP17A1, c.1220T>A

Převažující zastoupení genotypu *AA* napříč všemi populacemi vypovídá o jejich nízké variabilitě. Nejen z výsledků uvedených v Příloze 5 je zřejmé, že polymorfismus nepřináší příliš zajímavé výsledky. V odborné literatuře nebyla při identifikaci tohoto polymorfismu potvrzena statisticky významná asociace s hladinou androstenonu, ačkoliv k významným výsledkům došly mnohé odborné studie zabývající se expresí genu v játrech – u prasat s nízkou a vysokou hladinou androstenonu v tukové tkáni.

Lin et al. (2005), kteří pozorovali pouze genotyp *TT* u čistokrevných plemen Pietrain, Duroc a Landrace, došli k opačným výsledkům než my, kde jsme identifikovali převažující genotyp *AA*.

6.1.5 SULT1A1, c.439A>G

Výsledky genu *SULT1A1* jsou velice podobné výsledkům genu *CYP17A1*. Výhradní zastoupení genotypu *AA* asociovaného s nižší hladinou skatolu narušuje přítomnost několika jedinců s genotypem *AG* a *GG*.

Nejvyšší zastoupení alely *G* má Pietrain. Vzhledem k charakteristice tohoto plemene můžeme polemizovat o vazbě polymorfismu na některé znaky zmasilosti.

Pro tento polymorfismus nebylo možné dohledat práci, ve které by byly popsány genotypy u čistokrevné populace prasat.

6.1.6 SULT1A1, c.846T>C

V případě tohoto SNP byly identifikovány pouze dva genotypy. Respektive všechna zvířata měla genotyp *TT* kromě Landrace, u které mělo 6 zvířat genotyp *TC*.

Pro tento polymorfismus nejsou publikovány zatím žádné výsledky. SNP byl identifikován u plemene Meishan pomocí Sangerovy dideoxy metody na půdě České zemědělské univerzity. Souvislost mezi hladinou kančího pachu a genem *SULT1A1* je už znám, proto můžeme předpokládat i vliv tohoto polymorfismu na kančí pach.

6.1.7 CYB5A, c-8G>T

V genu *CYB5A* mají vybrané populace mnohem vyšší variabilitu než u předešlých dvou genů. Vyšší frekvenci měla u všech plemen nemutovaná alela *G*, u Mangalice tvořila 100 %. U plemen Landrace a Přeštické černostrakaté bylo nejvyšší zastoupení genotypu *CT* a celkově nejvyšší frekvence alely *T* ze všech.

U lokálních španělských plemen v práci Muñoz et al. (2018) můžeme vidět stejný trend u zastoupení divoké alely *G*. Ve studii Moe et al. (2009) měla čistokrevná plemena Duroc i norská Landrace nejvyšší zastoupení genotypu *GG*, a dokonce se ani u jednoho nevyskytoval genotyp *TT*. Ke skoro identickým výsledkům jako my došli i Peacock et al. (2007) u Landrace, Pietrain a Duroca.

Genotyp *GG* je asociován s vyšší hladinou androstenonu v tukové tkáni a je vysoce zastoupen u rustikálních i otcovských plemen prasat. Jelikož je *CYB5A* zainteresovaný do metabolismu androstenonu, který je důležitý pro plodnost i růst samců, může být z tohoto důvodu upřednostňován v populacích otcovských plemen. U mateřských plemen je androstenon stejně tak důležitý, avšak jeho efekt nemusí být tolik sledovaný. Právě vyšší frekvence genotypu *GT* u Landrace a Přeštického černostrakatého může mít souvislost i s jinými užitkovými vlastnostmi.

6.1.8 HSD3B1, g.165262G>A

V případě polymorfismu genu *HSD3B1* byly identifikovány rozdílné frekvence genotypů ve vybraných populacích prasat. U plemen Mangalica, Pietrain a u divokého prasete se vyskytoval pouze genotyp *AA*. Oproti tomu mateřská plemena (Bu, L, Pc) měla zastoupení i genotyp *AG*, marginálně *GG*. Naprosto opačné zastoupení genotypů měl Duroc, u něhož se vyskytoval nejvíce zastoupen genotyp *GG*.

Právě genotyp *GG* by měl dle Kim et al. (2013) být asociován s nižší hladinou androstenonu v tukové tkáni. Nicméně jak upozorňují Duivesteijn et al. (2010) snížený obsah androstenonu v těle samce může mít neblahý vliv na růstové vlastnosti, plodnost a libido sexualis.

Podle dosud nepublikovaných dat byla u plemene Duroc pozorována snížená sexuální aktivita, což by právě mohlo být zapříčiněno vysokou frekvencí alely *G* v případě genu *HSD3B1*. Navíc u genotypu *GG* docházelo k náhlým úhynům kvůli nemoci končetin po zařazení do plemenitby.

U sledovaného polymorfismu byl statisticky prokázán vliv na základní ukazatele kvality ejakulátu. Z důvodu úhynu zvířat můžeme pozorovat vliv alely *G* pouze v heterozygotní soustavě. Tato zvířata měla lepší hodnoty aktivity spermií, koncentrace spermií v cm³ a přežitelnosti po 24 hod. Nicméně objem ejakulátu byl nižší než u genotypu *AA* a zvířatům musel být vždy injekčně podán stimulační preparát.

6.2 Asociační analýza

Ačkoliv v této práci bylo zahrnuto osm SNP, asociační analýza mohla být provedena pouze u čtyř: *CYP2E1* g.1423G>A, *CYP2E1* g.1422C>T, *CYP2E1* g.2412C>T a *HSD3B1* g.165262G>A. Výsledky pro polymorfismy genu *CYP2E1* korespondovaly se všemi dřívějšími

studiemi. V případě polymorfismu *HSD3B1* se objevil trend asociace mezi genotypem a hladinou androstenonu v tukové tkáni, jako u dalších dříve publikovaných prací.

Rozdílné výsledky v asocičních studiích mohou být způsobeny výběrem testovaných populací prasat či počtem zvířat zařazených do testu.

6.2.1 CYP2E1 g.1423G>A

Studie Skinner et al. (2005) nepotvrdila žádnou asociaci mezi polymorfismem a hladinou skatolu ani indolu v tukové tkáni u dánských komerčních hybridů. Naproti tomu studie Moe et al. (2009) a Zadinová et al. (2017) potvrdily asociaci alely *G* s vyšší hladinou skatolu a indolu v tukové tkáni. V naší práci oproti tomu signifikantně vyšla asociace pouze s hladinou skatolu v tukové tkáni.

Nesoulad ve výsledcích může způsobovat synonymní mutace v blízkosti vybraného polymorfismu, což může komplikovat genotypizaci a zkreslovat výsledky.

6.2.2 CYP2E1, g.1422C>T

Výsledky této práce potvrdily pouze asociaci SNP s hladinou skatolu v tukové tkáni, nikoliv s hladinou indolu. V práci Zadinová et al. (2017) byly výsledky u komerčních kříženců opačné, tedy se objevila signifikantní asociace mezi hladinou indolu a genotypem *TT*. Asociace mezi tímto genotypem a hladinou skatolu nepotvrdili, ačkoliv měl nejvyšší hodnoty podobně jako v naší práci. Ve studii Moe et al. (2009), kteří testovali populaci norská Landrace sledovali též pouze asociaci genotypu *TT* na hladinu indolu v tukové tkáni.

6.2.3 CYP2E1, g.2412C>T

Pro SNP g. 2412C>T došli Mörlein et al. (2012) ke stejným výsledkům u populace hybridů křížených s Durocem v otcovské pozici. Pro genotyp *CC* potvrdili asociaci na vyšší hladinu skatolu v tukové tkáni, navíc k tomu potvrdili i asociaci na hladinu indolu, kterou jsme my statisticky zamítli. Následně označili tento genotyp jako možný k využití pro bezpečnou selekci na redukci kančího pachu v mase spotřebitelů. Vliv tohoto genu údajně vysvětluje až 10 % variability indolu v tukové tkáni.

6.2.4 HSD3B1 g.165262G>A

Statisticky významné výsledky, které hovoří o asociaci polymorfismu g.165262G>A v genu *HSD3B1* s některou ze složek kančího pachu, dosud publikoval pouze Kim et al. (2013). V této studii u plemene Duroc vykazovala zvířata genotypu *GG* nejnižší hodnoty androstenonu v tukové tkáni. Stejného výsledku bylo dosaženo u populace českých hybridů v této práci.

Možnému využití tohoto polymorfismu jako markeru pro kančí pach napovídají také výsledky Nicolau-Solano et al. (2006), kteří u kříženců identifikovali vztah mezi expresí jaterního proteinu *HSD3B1* a hladinou androstenonu – u zvířat s vysokou hladinou androstenonu v tukové tkáni byla potlačena genová exprese v játrech. Ve varletní tkáni ale rozdílnou expresí tohoto genu nezjistili.

V novější studii Zimmer et al. (2018) uvedli, že pozorovali odlišnou expresi *HSD3B1* v nadvarlatech a dodali tak podnět k dalšímu studiu expresního systému tohoto genu.

7 Závěr

Závěrem lze říci, že u první hypotézy jsme našli rozdíl u tří sledovaných SNP (g.1423G>A, g.2412C>T a g.165262G>A), u dalších pěti vybraných polymorfismů (g.1422C>T, c.1220T>A, c.439A>G, c.846T>C a c-8G>T) nebylo možné rozdíly v zastoupení genotypů identifikovat. Lze tedy konstatovat, že u plemen v České republice ve většině sledovaných SNP došlo k fixaci jedné z alel.

Díky zařazení divočáka a lokálních plemen jako je Mangalica a Přeštické černostrakaté můžeme vidět, že šlechtění nemělo výrazný vliv na alelové ani genotypové frekvence u vybraných SNP. To však nevylučuje jejich vztah k dalším užitkovým vlastnostem, pro které si dnešních moderních plemen ceníme.

Opravdu zajímavou výjimkou představoval SNP v genu *HSD3B1*, který vystupuje v metabolismu androstenonu. Duroc měl oproti ostatním plemenům vysokou frekvenci genotypu *GG*, jelikož dle dosavadních studií je tato alela asociovaná s nižší hladinou androstenonu v tukové tkáni. Tuto asociaci však nebylo v naší práci možné potvrdit, ikdyž trend u ní byl patrný.

Výsledky naší studie ukázaly, že se u českých čistokrevných populací prasat vyskytují převážně genotypy asociované s nižší hladinou kančího pachu v tukové tkáni. To platilo rovněž u otcovských plemen, takže nebylo možné přijmout druhou hypotézu. U všech polymorfismů genu *CYP2E1* jsme potvrdili i v naší práci asociaci na hladinu skatolu. Otcovské plemeno Pietrain mělo v polymorfismech genu *CYP2E1*, *CYP17A1* a *SULT1A1* vysoký počet zvířat s genotypem asociovaným s nižší hladinou kančího pachu, naopak u genů *CYB5A* a *HSD3B1* byly výsledky opačné. Duroc dosahoval podobných výsledků jako Pietrain, navíc však u něj odporovala hypotéze i data identifikovaná u genu *HSD3B1*.

U všech sledovaných polymorfismů měl Pietrain vždy výrazně vyšší četnost jedné alely oproti druhé. Důvodem je zřejmě fakt, že se jedná o velice prošlechtěné plemeno, které prošlo silnou selekcí.

Celkově můžeme říci, že rozdíly mezi populacemi tvoří obzvláště variabilita mezi otcovskými a mateřskými plemeny. To není překvapivé, protože otcovská plemena jsou šlechtěna jiným směrem než mateřská. Vzhledem k silnější selekci se snižuje i diverzita genotypů u populací otcovských plemen. Nedostatek genetické variability v populaci může následně vést k selhání pokusů o snížení hladiny kančího pachu v tukové tkáni prostřednictvím genetických markerů. Je ale třeba brát v potaz, že zafixování alely vázané na nižší hladinu kančího pachu, hlavně androstenonu, může mít za následek i snížení plodnosti, libida sexualis nebo dokonce i jiných vlastností nesouvisejících s rozmnožováním vlivem nečekané genetické vazby.

Mateřská plemena, oproti otcovským, jsou selektována především na vysokou plodnost, mléčnost, počet struků atd. a s mnohem nižší přísností, proto je u nich patrná vyšší variabilita napříč všemi studovanými SNP. Tato plemena mají čteně zastoupena i „nechtěné“ genotypy. Může to být důsledek neznámé vazby na typicky mateřské vlastnosti, popřípadě snahy o zachování diverzity v populaci prasat pro získání heterozního efektu u mláďat po užitkovém křížení.

8 Literatura

Amaral AJ, Megens HJ, Crooijmans RPMA, Heuven HCM, Groenen MAM. 2008. Linkage equilibrium decay and haplotype block structure in the pig. *Genetics* **179**:569–579.

Awoniyi CA, Chandrashekar V, Arthur RD, Schanbacher BD, Falvo RE. 1988. Changes in Testicular Morphology in Boars Actively Immunized Against Gonadotropin Hormone-Releasing Hormone. *Journal of Andrology* **9**:160-171.

Azenbacher P, Azenbacherová E. 2001. Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cellular and molecular life sciences*. **58**:737-747.

Borowska A, Szwaczkowski T, Koćwin-Podsiadła M, Kamiński S, Ruść A, Krzęcio-Nieczyporuk E. 2014. Associations of fifty single nucleotide polymorphisms within candidate genes with meatness in pigs. *Czech Journal of Animal Science* **5**:227-237.

Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis R. W. 1980. Constriction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *American journal of human genetics* **32**:314-331.

Boudný J, Špička J. 2012. The effect of production on economic results in pig breeding. *Research in pig breeding* **6**:1-8.

Briyne ND, Berg Ch, Blaha T, Temple D. 2016. Pig castration: will the EU manage to ban pig castration by 2018? *Porcine Health Management* **2**:1-11.

Buchanan DS, Stalder K. 2011. Breeds of Pigs. Pages 445-472 in Rothschild MF, Ruvinsky A, editors. *The Genetics of the Pig*. CAB International, Oxfordshire.

Ciobanu D, Bastiaansen J, Malek M, Helm J, Woollard J, Plastow G, Rothschild M. 2011. Evidence for new alleles in the protein kinase adenosine monophosphate-activated gamma(3)-subunit gene associated with low glycogen content in pig skeletal muscle and improved meat quality. *Genetics* **159**:1151-1162.

Ciobanu DC, Lonergan SM, Huff-Lonergan EJ. 2011. Genetics of Meat Quality and Carcass Traits. Pages 355-378 in Rothschild MF, Ruvinsky A, editors. *The Genetics of the Pig*. CAB International, Oxfordshire.

Davis S, Squires E. 1999. Association of cytochrome b5 with 16-androstenone steroid synthesis in the testis and accumulation in the fat of male pigs. *Journal of Animal Science* **77**:1230-1235.

Dehnhard M, Bernal-Barragan H, Claus R. 1991. Rapid and accurate high-performance liquid chromatographic method for the determination of 3-methylindole (skatole) in faeces of various species. *Journal of Chromatography* **566**: 101–107.

Diaz GJ, Squires EJ. 2000a. Metabolism of 3-methylindole by porcine liver microsomes: responsible cytochrome P450 enzymes. *Toxicological Sciences* **55**:284–292.

Dietze K. 2012. *Pigs for prosperity*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

- Duffel MW. 2010. Sulfotransferases. *Comprehensive Toxicology*. **4**:367-384.
- Duijvesteijn N, Knol EF, Merks JWM, Crooijmans RPMA, Groenen MAM, Bovenhuis H, Harlizius B. 2010. A genome-wide association study on androstenone levels in pigs reveals a cluster of candidate genes on chromosome 6. *BMC Genetics* **11**:1-11.
- Dunshea FR, Colantoni C, Howard K, McCauley I, Jackson P, Long KA, Lopaticki S, Nugent EA, Simons JA, Walker J, Hannessy DP. 2001. Vaccination of boars with a GnRH vaccine (Improvac) eliminates boar taint and increases growth performance. *Journal of animal science* **79**:2524-2535.
- Duran Ch, Appleby N, Edwards D, Batley J. 2009. Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualisation. *Current Bioinformatics* **4**:16-27.
- Dvořák J, Vrtková I. 2001. Malá genetika prasat II. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno.
- Elkins KM. 2013. *Forensic DNA Biology*. Academic Press, Towson.
- Ensembl. 2018. Ensembl. Trust Genome
 Campus Cambridge, England. Available from http://www.ensembl.org/Pig/Search/Results?q=:site=ensembl:facet_species=Pig (accessed April 2019).
- FAO. 2014. Pigs and Animal Production. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/pigs/production.html> (accessed November 2014).
- FAO. 2017. FAOSTAT: Production - Live Animals. FAO, Rome. Available from <http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QA> (accessed December 2017).
- Ferreira IM, Vieira GS, Braga TF, Silva TCF, Franco MM, Antunes RC. 2017. Study of genetic variability in pigs after the traditional breeding program. *Genetics and Molecular Research* **16**: 1-10.
- Filardi de Campos C, Lopes MS, e Silva FF, Veroneze R, Knol EF, Lopes PS, Guimaraes SEF. 2015. Genomic selection for boar taint compounds and carcass traits in a commercial pig population. *Livestock Science* **174**:10-17.
- Fontanesi L, Schiavo G, Scotti E, Galimberti G, Calò DG, Samorè AB, Gallo M, Russo V, Buttazzoni L. 2015. A retrospective analysis of allele frequency change of major genes during 20 years of selection in the Italian Large White pig breed. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **132**: 239-246.
- Gamage N, Barnett A, Hempel N, Duggleby RG, Windmill KF, Martin JL, McManus ME. 2006. Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism. *Toxicological sciences*. **90**:5-22.

Giuffra E, Kijas JM, Amarger V, Carlborg O, Jeon JT, Andersson L. 2000. The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics* **154**: 1785-1791.

Gondim VS. 2015. Polimorfismos nos genes MC4R, FABP3, DGAT1 e LEPR e suas associações com produtividade em matrizes suínas [Doctoral thesis]. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo.

Grindflek E, Berget I, Moe M, Oeth P, Lien S. 2010. Transcript profiling of candidate genes in testis of pigs exhibiting large differences in androstenone levels. *BMC Genetics* **11**:1-11.

Grindflek E, Lien S, Hamland H, Hansen MHS, Kent M, van Son M, Meuwissen THE. 2011. Large scale genome-wide association and LDLA mapping study identifies QTLs for boar taint and related sex steroids. *BMC Genomics* **12**:362.

Groenen MAM, Schook LB, Archibald AL. 2011. Pig Genomics. Pages 179-194 in Rothschild MF, Ruvinsky A, editors. *The Genetics of the Pig*. CAB International, Oxfordshire.

Große-Brinkhaus C, Strock LC, Frieden L, Neuhoff C, Schellander K, Looft C, Tholen E. 2015. Genome-wide association analyses for boar taint components and testicular traits revealed regions having pleiotropic effects. *BMC Genetics* DOI: [10.1186/s12863-015-0194-z](https://doi.org/10.1186/s12863-015-0194-z).

Hansen LL, Larsen AE, Jensen BB, Hansen-Møller J. 1997. Short time effect of zinc bacitracin and heavy fouling with faeces plus urine on boar taint. *Animal Science* **64**: 351-363.

Hay M, Vulin A, Génin S, Sales P, Prunier A. 2003. Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioural and physiological responses over the subsequent 5 days. *Applied Animal Behaviour Science* **82**:201-218.

Hsu MH, Savas U, Griffin KJ, Johnson EF (2007). Human cytochrome p450 family 4 enzymes: function, genetic variation and regulation. *Drug Metab Rev.* **39**:515-538.

Humphray SJ, Scott CE, Clark R, Marron B, Bender C, Camm N, Davis J, Jenks A, Noon A, Patel M, Sehra H, Yang F, Rogatcheva MB, Milan D, Chardon P, Rohrer G, Nonneman, D., de Jong, P., Meyers, S. N., Archobald, A., Beever, J. E., Schook, L. B., Rogers, J. 2007. A high utility integrated map of the pig genome. *Genome Biology* **8**:R139.1-R139.11.

Chen G, Bourneuf E, Marklund S, Zamaratskaia G, Madej A, Lundström K. 2007. Gene expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in relation to androstenone, testosterone, and estrone sulphate in gonadally intact male and castrated pigs. *Journal of Animal Science* **85**:2457-2463.

Ismail S, Essawi M. 2012. Genetic polymorphism studies in humans. *Middle East Journal of Medical Genetics* **1**:57-63.

Jeon JT, Park EW, Jeon HJ, Kim TH, Lee KT, Cheong ICh. 2003. A Large-Insert Porcine Library with Sevenfold Genome Coverage: A Tool for Positional Cloning of Candidate Genes for Major Quantitative Traits. *Molecules and Cells* **16**:113-116.

Kim JM, Ahn JH, Kim KS, Lee EA, Chun T, Hong KC. 2013. Effects of 3 β -hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 1 polymorphisms on fat androstenone level and gene expression in Duroc pigs. *Animal Genetics*. **44**:592-595.

Knoll A, Urban T. 2002. Aktuální metody používané v molekulární genetice zvířat. In: Sb. XX. Genetické dny. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno.

Knoll A, Vykoukalová Z. 2002. Molekulární genetika zvířat (Metody detekce polymorfizmů DNA genů). Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně. Brno.

Kohler I, Moens Y, Busato A, Blum J, Schatzmann U. 1998. Inhalation Anaesthesia for the Castration of Pigs: CO₂ Compared to Halothane. *Journal of Veterinary Medicine* **45**:625-633.

Lanthier F, Lou Y, Squires EJ. 2007. Skatole metabolism in the intact pre-pubescent male pig: The relationship between hepatic enzyme activity and skatole concentrations in plasma and fat. *Livestock Science* **106**:145-153.

Lee GJ, Archibald AL, Law AS, Lloyd S, Wood J, Haley CS. 2004. Detection of quantitative trait loci for androstenone, skatole and boar taint in a cross between Large White and Meishan pigs. *Animal Genetics* **36**:14-22.

Lee PY, Costumbrady J, Hsu Ch, Kim Y. 2012. Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments. *Journal of Visualized Experiments* **62**:1-3.

Lefferts CL, Lefferts JA. 2017. Essential Concepts and Techniques in Molecular Biology in Coleman WB, Tsongalis GJ, editors. *The Molecular Basis of Human Cancer*. The Humana Press, Springer Anture, New York.

Leung MCK, Bowley K-L, Squires EJ. 2010. Examination of testicular gene expression patterns in Qorkshire pigs with high and low levels of boar taint. *Animal Biotechnology* **21**:77-87.

Li CL, Pan YC, Meng H. 2006. Polymorphism of the H-FABP, MC4R and ADD1 genes in the Meishan and four other pig populations in China. *South African Journal of Animal Science* **36**: 1-6.

Lin Z, Lou Y, Squires EJ. 2004. Molecular cloning, expression and functional characterization of the cytochrome P450 2A6 gene in pig liver. *Animal Genetics* **35**:314-316.

Lin Z, Lou Y, Squires EJ. 2004b. Molecular cloning and functional analysis of porcine SULT1A1 gene and its variant: a single mutation SULT1A1 causes a significant decrease in sulfation activity. *Mammalian Genome* **15**:218-226.

Lin Z, Lou Y, Peacock J, Squires EJ. 2005. A novel polymorphism in the 5' untranslated region of the porcine cytochrome b5 (CYB5) gene is associated with decreased fat androstenone level. *Mammalian Genome* **16**:367-373.

Lin Z, Lou Y, Squires EJ. 2005. Identification of a Single Nucleotide Polymorphism in Porcine Testis Cytochrome P450.c17 (CYP17) and Its Effect on Steroidogenesis. *Biochemical Genetics* **43**:531-542.

Lin Z, Lou Y, Squires EJ. 2006. Functional polymorphism in porcine CYP2E1 gene: Its association with skatole levels. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* **99**:231-237.

Martínková J, Chládek J, Mičuda S, Cermanová J, Grim J: *Obecná farmakologie jako základ studia farmakologie experimentální a klinické*, Hradec Králové (2000), str. 26

Marx G, Horn T, Thielebein J, Knubel B. 2003. Analysis of pain-related vocalization in young pigs. *Journal of Sound and Vibration* **266**:387-398.

Mathieson L, Nalon E. 2018. Pig welfare crisis continues European declaration on alternative to painful surgical castration fails to deliver. Eurogroup for animals, Belgium. Available from <https://www.eurogroupforanimals.org/pig-welfare-crisis-continues-european-declaration-alternatives-painful-surgical-castration-pigs-fails-deliver> (accessed January 2018).

Miller WL, Flück CE. 2014. Adrenal cortex and its disorders. *Pediatric Endocrinology*. **13**:471-532.

Moe M, Grindflek E, Doran O. 2007. Expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, cytochrome P450-c17, and sulfotransferase 2B1 proteins in liver and testis of pigs of two breeds: Relationship with adipose tissue androstenone concentration. *American Society of Animal Science* **85**:2924-2931.

Moe M, Lien S, Bendixen C, Hedegraad J, Hornshøj H, Berget I, Meuwissen THE, Grindflek E. 2008. Gene expression profiles in liver of pigs with extreme high and low levels of androstenone. *BMC Veterinary Research* **4**:1-16.

Moe M, Lien S, Aasmundstad T, Meuwissen THE, Hansen MHS, Bendixen Ch, Grindflek E. 2009. Association between SNPs within candidate genes and compounds related to boar taint and reproduction. *BMC Genetics* **10**:1-14.

Mörlein D, Lungerhausen M, Steinke K, Sharifi AR, Knorr Ch. 2012. A single nucleotide polymorphism in the CYP2E1 gene promoter affects skatole content in backfat of boars of two commercial Duroc-sired crossbred populations. *Meat Science* **92**:739-744.

Muñoz M, Bozzi R, García F, Núñez Y, Geraci C, Crovetti A, García-Casco J, Alves E, Škrlep M, Charneca R, Mrtins JM, Quintainlla R, Tibau J, Kušec G, Djukin-Kušec I, Mercat MJ, Riquet J, Estellé J, Zimmer Ch, Razmaite V, Araujo JP, Radović Č, Savić R, Karolyi D, Gallo M, Čandek-Potokar M, Fontanesi L, Fernández AI, Óvilo C. 2018. Diversity across major and candidate genes in European local pig breeds. *PLoS ONE* **13**: 1-30.

Nicolau-Solano SI, McGivan JD, Whittington FM, Nieuwhog GJ, Wood JD, Doran O. 2006. Relationship between the expression of heptaci but not testicular 3 β -hydroxysteroid

dehydrogenase with androstenone deposition in pig adipose tissue. *Journal of Animal Science* **84**: 2809-2817.

Nicolau-Solano SI, Whittington FM, Wood JD, Doran O. 2007. Relationship between carcass weight, adipose tissue androstenone level and expression of the hepatic 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in entire commercial pigs. *Animal* **1**:1053-1059.

Nsengimana J, Baret P, Haley CS, Visscher PM. 2004. Linkage disequilibrium in the domesticated pig. *Genetics* **166**:1395–1404.

OECD-FAO. 2018. OECD-FAO Agricultural Outlook 2018-2027. FAO, Rome. Available from https://stats.oecd.org/viewhtml.aspx?datasetcode=HIGH_AGLINK_2017&lang=en (accessed July 2018).

Okrouhlá M, Stupky R, Čítek J, Urbanová D, Vehovský K, Kouřimská L. 2016. HPLC stanovení androstenonu, skatolu a indolu ve hřbetním tuku u prasat. *Chemické listy* **110**:593-597.

Ollivier L, Foulley J-L. 2011. Pig Genetic Resources. Pages 306-320 in Rothschild MF, Ruvinsky A, editors. *The Genetics of the Pig*. CAB International, Oxfordshire.

Pávek P, Dvořák Z (2008). Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolising enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues. *Curr Drug Metab.* **9**:129-143.

Peacock J, Lou Y, Lundström K, Squires EJ. 2007. The effect of a c.-8G>T polymorphism on the expression of cytochrome b5A and the boar taint in pigs. *Animal Genetics* **39**:15-21.

Prunier A, Mounier AM, Hay M. 2005. Effect of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pig. *Journal of Animal Science* **83**:216-222.

Prunier A, Bonneau M, Borell EH von, Cinotti S, Gunn M, Fredriksen B, Giersind M, Morton DB, Tuytens FAM, Velarde A. 2006. A review of the welfare consequences of surgical castration in piglets and the evaluation of non-surgical methods. *Animal Welfare* **1**:277-289.

Rasmussen MK, Zamaratskaia G, Ekstrand B. 2011. In vitro cytochrome P450 2E1 and 2A activities in the presence of texticular steroids. *Reproduction in domestic animals* **46**:149-154.

Reithmeier RAF. 1996. Assembly of proteins into membranes. *New Comprehensive Biochemistry.* **31**:425-471.

Robic A, Larzul C, Bonneau M. 2008. Genetic and metabolic aspects of androstenone and skatole deposition in pig adipose tissue. A review. *Genetics, selection, evolution* **40**:129-143.

Robic A, Larzul C, Grindflek E, Chevillon P, Hofer A, Fève K, Iannuccelli N, Milan D, Prunier A, Riquet J. 2012. Molecular characterization of the porcine TEAD3 (TEF-5) gene: examination of a promoter mutation as the causal mutation of a quantitative trait loci affecting the androstenone level in boar fat. *Journal of Animal Breeding and Genetics* **129**:325-335.

Roest K, Montanari C, Fowler T, Baltussen W. 2009. Resource efficiency and economic implications of alternatives to surgical castration without anaesthesia. *Animal* **3**:1522-1531.

Rothschild MF, Ruvinsky A. 2011. *The Genetics of the Pig*. CAB International. Oxfordshire.

Saghir SA, Ansari RA. 2019. Metabolism (Biotransformation). *Biomedical Sciences* **4**:24-35.

Sinclair PA, Gilmore WJ, Lin Z, Squires EJ. 2006. Molecular cloning and regulation of porcine SULT2A1: relationship between SULT2A1 expression and sulfoconjugation of androstenone. *Journal of Molecular Endocrinology* **36**:201-311.

Skinner TM, Doran E, McGivan JD, Haley SC, Archibald AL. 2005. Cloning and mapping of the porcine cytochrome-p450 2E1 gene and its association with skatole levels in the domestic pig. *Animal Genetics* **36**:417-422.

Skinner TM, Anderson JA, Haley CS, Archibald AL. 2006. Assessment of SULT1A1, CYP2A6 and CYP2C18 as candidate genes for elevated back fat skatole levels in commercial and experimental pig populations. *Animal Genetics* **37**:521-522.

Strahe AB, Velander IH, Mark T, Kadarmideen HN. 2013. Genetic parameters for androstenone and skatole as indicators of boar taint and their relationship to production and litter size traits in Danish Landrace. *Journal of Animal Science* **91**:2587-2595.

White KA, Marletta MA (1992). Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry*. **31**:6627-6631.

Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JL, Tingey SV. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* **18**:6531-6535.

Witchel SF, Lee PA. 2014. Ambiguous genitalia. *Pediatric Endocrinology*. **4**:107-156

Zamaratskaia G, Gilmore WJ, Lundström K, Squires EJ. 2007b. Effect of testicular steroids on catalytic activities of cytochrome P450 enzymes in porcine liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology* **45**: 676-681.

Zadinová K, Stupka R, Stratil A, Čítek J, Vehovský K, Urbanová D. 2016. Boar taint – the effect of selected candidate genes associated with androstenone and skatole levels – a review. *Animal Science Papers and Reports* **34**:107-128.

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.

Zamaratskaia G, Rydhmer L, Andersson HK, Chen G, Lowagie S, Andersson K, Lundström K. 2008. Long-term effect of vaccination against gonadotropin-releasing hormone, using Improvac™ on hormonal profile and behaviour of male pigs. *Animal Reproduction Science* **108**:37-48.

Zamaratskaia G, Lou Y, Peacock J, Rydhemer L, Andersson HK, Junaje RK, Chen G, Lundström K, Squires EJ. 2008. Effect of polymorphism in the porcine cytochrome b5 (CYB5A) gene on androstenone and skatole and sexual development in Swedish pig populations. *Animal* **2**:190-196.

Zamaratskaia G, Squires EJ. 2009. Biochemical, nutritional and genetic effects on boar taint in entire male pigs. *Animal* **3**:1508-1521.

Zamaratskaia G, Rasmussen MK. 2015. Immunocastration of male pigs – situation today. *Procedia Food Science* **5**:324-327.

Zeng ZB. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* **136**:1457-1468.

Zimmer B, Tenbusch L, Klymiuk MC, Dezhkam Y, Schuler G. 2018. Expression of *SULT2A1*, *SULT2B1* and *HSD3B1* in the porcine testis and epididymis. *Journal of Molecular Endocrinology*. **61**: M41-M55.

9 Samostatné přílohy

9.1 Výsledky asociační analýzy

Příloha 1: Asociace genotypů s hladinou androstenonu, skatolu a indolu v tukové tkáni u polymorfismu genu *CYP2E1* (g.2412C>T, g.1422C>T, c.1423G>A) a *HSD3B1* (g.165262G>A) u populace hybridů (BuxL)xBO

SNP/genotyp		Androstenon	Skatol	Indol
	n	průměr (μg/g)	průměr (μg/g)	průměr (μg/g)
g.2412C>T				
CC	22	2.8142	0.0691	0.0916
CT	39	2.5972	0.0411	0.0723
TT	13	3.0895	0.0273	0.0612
p-hodnota GML		0.4169	0.0171	0.5107
výhodná alela		X	C	X
c.1422C>T				
CC	20	1.5834	0.0502	0.0916
CT	43	3.4019	0.0450	0.0723
TT	11	1.2183	0.0554	0.0612
p-hodnota GML		0.9041	0.0107	0.4363
výhodná alela		X	T	X
c.1423G>A				
AA	16	2.9409	0.0307	0.0640
AG	35	2.7773	0.0417	0.0783
GG	23	2.5699	0.0665	0.0811
p-hodnota GML		0.9469	0.0256	0.7484
výhodná alela		X	A	X
g.165262G>A				
AA	23	1.5834	0.0502	0.0615
AG	48	3.4019	0.0450	0.0854
GG	3	1.2183	0.0554	0.0378
p-hodnota GML		0.0864	0.8508	0.2758

9.2 Výsledky porovnání genotypů

Příloha 2: Frekvence genotypů čistokrevných plemen prasat u polymorfismu g.1423G>A a Pearsonův chí-kvadrát test. Porovnání genotypů vybraných plemen s otcovskými plemeny prasat (Pn, D) Fisherovým exaktním testem.

CYP2E1 g.1423G>A				
Plemeno	Genotyp			Součet
	A	AG	G	
Bu	7	31	12	50
D	25	24	4	53
L	19	24	7	50
Mg	20	11	5	36
Pc	19	25	6	50
Pn	48	2	0	50
W	11	17	10	38
Součet	149	134	44	327

	DF	Součet diferencí	p-hodnota
Chi-Kvadrát	12	85.2185	<.0001

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	A	G		A	G				
Pn	0.98	0.02	Bu	0.45	0.55	Pn vs. Bu	0.98 vs. 0.45	68.0485	<0.0001
Pn	0.98	0.02	D	0.70	0.30	Pn vs. D	0.98 vs. 0.70	29.7999	<0.0001
Pn	0.98	0.02	L	0.62	0.38	Pn vs. L	0.98 vs. 0.62	38.1676	<0.0001
Pn	0.98	0.02	Mg	0.71	0.29	Pn vs. Mg	0.98 vs. 0.71	21.0387	<0.0001
Pn	0.98	0.02	Pc	0.63	0.37	Pn vs. Pc	0.98 vs. 0.63	38.1448	<0.0001
Pn	0.98	0.02	W	0.51	0.49	Pn vs. W	0.98 vs. 0.51	44.2316	<0.0001

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. Frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	A	G		A	G				
D	0.70	0.30	Bu	0.45	0.55	D vs. Bu	0.70 vs. 0.45	14.9412	0.0004
D	0.70	0.30	L	0.62	0.38	D vs. L	0.70 vs. 0.62	1.5503	0.4535
D	0.70	0.30	Mg	0.71	0.29	D vs. Mg	0.70 vs. 0.71	2.3332	0.3054
D	0.70	0.30	Pc	0.63	0.37	D vs. Pc	0.70 vs. 0.63	1.1522	0.5958
D	0.70	0.30	Pn	0.98	0.02	D vs. Pn	0.70 vs. 0.98	29.7999	<0.0001
D	0.70	0.30	W	0.51	0.49	D vs. W	0.70 vs. 0.51	6.9267	0.0338

Příloha 3: Frekvence genotypů čistokrevných plemen prasat u polymorfismu g.1422C>T a Pearsonův chí-kvadrát test. Porovnání genotypů vybraných plemen s otcovskými plemeny prasat (Pn, D) Fisherovým exaktním testem.

CYP2E1 g.1422C>T				
Plemeno	Genotyp			Součet
	C	CT	T	
Bu	17	24	9	50
D	52	1	0	53
L	17	29	4	50
Mg	35	1	0	36
Pc	33	16	1	50
Pn	47	3	0	50
W	36	2	0	38
Součet	237	76	14	327

	DF	Součet diferencí	p-hodnota
Chi-Kvadrát	12	135.5316	<.0001

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
Pn	0.97	0.03	Bu	0.58	0.42	Pn vs. Bu	0.97 vs. 0.58	39.3958	<0.0001
Pn	0.97	0.03	D	0.99	0.01	Pn vs. D	0.97 vs. 0.99	1.1661	0.3533
Pn	0.97	0.03	L	0.63	0.37	Pn vs. L	0.97 vs. 0.63	39.1875	<0.0001
Pn	0.97	0.03	Mg	0.99	0.01	Pn vs. Mg	0.97 vs. 0.99	0.49	0.6366
Pn	0.97	0.03	Pc	0.82	0.18	Pn vs. Pc	0.97 vs. 0.82	12.3447	0.0008
Pn	0.97	0.03	W	0.97	0.03	Pn vs. W	0.97 vs. 0.97	0.0219	1

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
D	0.99	0.01	Bu	0.58	0.42	D vs. Bu	0.99 vs. 0.58	47.8669	<0.0001
D	0.99	0.01	L	0.99	0.01	D vs. L	0.99 vs. 0.99	47.8402	<0.0001
D	0.99	0.01	Mg	0.63	0.37	D vs. Mg	0.99 vs. 0.63	0.0775	1
D	0.99	0.01	Pc	0.99	0.01	D vs. Pc	0.99 vs. 0.99	18.4106	0.0001
D	0.99	0.01	Pn	0.82	0.18	D vs. Pn	0.99 vs. 0.82	1.1661	0.3533
D	0.99	0.01	W	0.97	0.03	D vs. W	0.99 vs. 0.97	0.7914	0.569

Příloha 4: Frekvence genotypů čistokrevných plemen prasat u polymorfismu g.2412C>T a Pearsonův chí-kvadrát test. Porovnání genotypů vybraných plemen s otcovskými plemeny prasat (Pn, D) Fisherovým exaktním testem.

CYP2E1				
<i>g.2412 C>T</i>				
Plemeno	Genotyp			Součet
	C	CT	T	
Bu	16	28	6	50
D	2	29	22	53
L	3	30	17	50
Mg	7	26	3	36
Pc	4	26	20	50
Pn	0	1	49	50
W	15	23	0	38
Součet	47	163	117	327

	DF	Součet diferencí	p-hodnota
Chi-Kvadrát	12	156.4094	<.0001

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
Pn	0.01	0.99	Bu	0.60	0.4	Pn vs. Bu	0.01 vs. 0.60	74.7561	<0.0001
Pn	0.01	0.99	D	0.31	0.69	Pn vs. D	0.01 vs. 0.31	38.3461	<0.0001
Pn	0.01	0.99	L	0.36	0.64	Pn vs. L	0.01 vs. 0.36	45.6442	<0.0001
Pn	0.01	0.99	Mg	0.56	0.44	Pn vs. Mg	0.01 vs. 0.56	70.4278	<0.0001
Pn	0.01	0.99	Pc	0.34	0.66	Pn vs. Pc	0.01 vs. 0.34	39.3366	<0.0001
Pn	0.01	0.99	W	0.70	0.3	Pn vs. W	0.01 vs. 0.70	84.094	<0.0001

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
D	0.31	0.69	Bu	0.60	0.4	D vs. Bu	0.31 vs. 0.60	19.9789	<0.0001
D	0.31	0.69	L	0.36	0.64	D vs. L	0.31 vs. 0.36	0.7713	0.6661
D	0.31	0.69	Mg	0.56	0.44	D vs. Mg	0.31 vs. 0.56	14.6694	0.0004
D	0.31	0.69	Pc	0.34	0.66	D vs. Pc	0.31 vs. 0.34	0.8389	0.7323
D	0.31	0.69	Pn	0.01	0.99	D vs. Pn	0.31 vs. 0.01	38.3461	<0.0001
D	0.31	0.69	W	0.70	0.3	D vs. W	0.31 vs. 0.70	31.0033	<0.0001

Příloha 5: Frekvence genotypů čistokrevných plemen prasat u polymorfismu c.1220T>A a Pearsonův chí-kvadrát test. Porovnání genotypů vybraných plemen s otcovskými plemeny prasat (Pn, D) Fisherovým exaktním testem.

CYP17A1 c.1220T>A				
Plemeno	Genotyp			Součet
	A	AT	T	
Bu	50	0	0	50
D	52	0	1	53
L	49	0	1	50
Mg	35	1	0	36
Pc	50	0	0	50
Pn	50	0	0	50
W	38	0	0	38
Součet	324	1	2	327

	DF	Součet diferencí	p-hodnota
Chi-Kvadrát	12	12.4777	0.4081

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	A	T		C	T				
Pn	1.00	0	Bu	1.00	0	Pn vs. Bu	1.00 vs. 1.00	X	X
Pn	1.00	0	D	0.98	0.02	Pn vs. D	1.00 vs. 0.98	0.9526	1
Pn	1.00	0	L	0.98	0.02	Pn vs. L	1.00 vs. 0.98	1.0101	1
Pn	1.00	0	Mg	0.99	0.01	Pn vs. Mg	1.00 vs. 0.99	1.4052	0.4186
Pn	1.00	0	Pc	1.00	0	Pn vs. Pc	1.00 vs. 1.00	X	X
Pn	1.00	0	W	1.00	0	Pn vs. W	1.00 vs. 1.00	X	X

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	A	T		C	T				
D	0.98	0.02	Bu	1.00	0	D vs. Bu	0.98 vs. 1.00	0.9526	1
D	0.98	0.02	L	0.98	0.02	D vs. L	0.98 vs. 0.98	0.0017	1
D	0.98	0.02	Mg	0.99	0.01	D vs. Mg	0.98 vs. 0.99	2.1532	0.6481
D	0.98	0.02	Pc	1.00	0	D vs. Pc	0.98 vs. 1.00	0.9526	1
D	0.98	0.02	Pn	1.00	0	D vs. Pn	0.98 vs. 1.00	0.9526	1
D	0.98	0.02	W	1.00	0	D vs. W	0.98 vs. 1.00	0.7249	1

Příloha 6: Frekvence genotypů čistokrevných plemen prasat u polymorfismu c.439A>G a Pearsonův chí-kvadrát test. Porovnání genotypů vybraných plemen s otcovskými plemeny prasat (Pn, D) Fisherovým exaktním testem.

SULT1A1 c.439A>G				
Plemeno	Genotyp			Součet
	A	AG	G	
Bu	49	0	1	50
D	51	2	0	53
L	46	3	1	50
Mg	36	0	0	36
Pc	50	0	0	50
Pn	41	7	2	50
W	36	2	0	38
Součet	309	14	4	327

	DF	Součet diferencí	p-hodnota
Chi-Kvadrát	12	24.3426	0.0183

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	A	G		A	G				
Pn	0.89	0.11	Bu	0.98	0.02	Pn vs. Bu	0.89 vs. 0.98	8.0444	0.0074
Pn	0.89	0.11	D	0.98	0.02	Pn vs. D	0.89 vs. 0.98	5.7823	0.0431
Pn	0.89	0.11	L	0.95	0.05	Pn vs. L	0.89 vs. 0.95	2.2207	0.3933
Pn	0.89	0.11	Mg	1.00	0	Pn vs. Mg	0.89 vs. 1.00	7.2374	0.0134
Pn	0.89	0.11	Pc	1.00	0	Pn vs. Pc	0.89 vs. 1.00	9.8901	0.0026
Pn	0.89	0.11	W	0.97	0.03	Pn vs. W	0.89 vs. 0.97	3.5318	0.216

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	A	G		A	G				
D	0.98	0.02	Bu	0.98	0.02	D vs. Bu	0.98 vs. 0.98	2.9551	0.3631
D	0.98	0.02	L	0.95	0.05	D vs. L	0.98 vs. 0.95	1.3715	0.5116
D	0.98	0.02	Mg	1.00	0	D vs. Mg	0.98 vs. 1.00	1.3897	0.5128
D	0.98	0.02	Pc	1.00	0	D vs. Pc	0.98 vs. 1.00	1.9242	0.4955
D	0.98	0.02	Pn	0.89	0.11	D vs. Pn	0.98 vs. 0.89	5.7823	0.0431
D	0.98	0.02	W	0.97	0.03	D vs. W	0.98 vs. 0.97	0.1169	1

Příloha 7: Frekvence genotypů čistokrevných plemen prasat u polymorfismu c.846 T>C a Pearsonův chí-kvadrát test. Porovnání genotypů vybraných plemen s otcovskými plemeny prasat (Pn, D) Fisherovým exaktním testem.

SULT1A1 c.846 T>C			
Plemeno	Genotyp		Součet
	T	TG	
Bu	50	0	50
D	53	0	53
L	44	6	50
Mg	36	0	36
Pc	50	0	50
Pn	50	0	50
W	38	0	38
Součet	321	6	327

	DF	Součet diferencí	p-hodnota
Chi-Kvadrát	6	33.8613	<.0001

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
Pn	1.00	0	Bu	1.00	0	Pn vs. Bu	1.00 vs. 1.00	X	X
Pn	1.00	0	D	1.00	0	Pn vs. D	1.00 vs. 1.00	X	X
Pn	1.00	0	L	0.94	0.06	Pn vs. L	1.00 vs. 0.94	6.383	0.0267
Pn	1.00	0	Mg	1.00	0	Pn vs. Mg	1.00 vs. 1.00	X	X
Pn	1.00	0	Pc	1.00	0	Pn vs. Pc	1.00 vs. 1.00	X	X
Pn	1.00	0	W	1.00	0	Pn vs. W	1.00 vs. 1.00	X	X

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
D	1.00	0	Bu	1.00	0	D vs. Bu	1.00 vs. 1.00	X	X
D	1.00	0	L	0.94	0.06	D vs. L	1.00 vs. 0.94	6.7534	0.0111
D	1.00	0	Mg	1.00	0	D vs. Mg	1.00 vs. 1.00	X	X
D	1.00	0	Pc	1.00	0	D vs. Pc	1.00 vs. 1.00	X	X
D	1.00	0	Pn	1.00	0	D vs. Pn	1.00 vs. 1.00	X	X
D	1.00	0	W	1.00	0	D vs. W	1.00 vs. 1.00	X	X

Příloha 8: Frekvence genotypů čistokrevných plemen prasat u polymorfismu c-8G>T a Pearsonův chí-kvadrát test. Porovnání genotypů vybraných plemen s otcovskými plemeny prasat (Pn, D) Fisherovým exaktním testem.

CYB5A c-8G>T				
Plemeno	Genotyp			Součet
	G	GT	T	
Bu	49	1	0	50
D	47	4	2	53
L	25	21	4	50
Mg	36	0	0	36
Pc	33	16	1	50
Pn	49	1	0	50
W	34	3	1	38
Součet	273	46	8	327

	DF	Součet diferencí	p-hodnota
Chi-Kvadrát	12	79.8476	<.0001

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
Pn	0.99	0.01	Bu	0.99	0.01	Pn vs. Bu	0.99 vs. 0.99	X	0.7525
Pn	0.99	0.01	D	0.92	0.08	Pn vs. D	0.99 vs. 0.92	3.7575	0.209
Pn	0.99	0.01	L	0.71	0.29	Pn vs. L	0.99 vs. 0.71	29.9656	<0.0001
Pn	0.99	0.01	Mg	1.00	0	Pn vs. Mg	0.99 vs. 1.00	0.7285	1
Pn	0.99	0.01	Pc	0.82	0.18	Pn vs. Pc	0.99 vs. 0.82	17.3572	<0.0001
Pn	0.99	0.01	W	0.93	0.07	Pn vs. W	0.99 vs. 0.93	3.1327	0.2058

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
D	0.92	0.08	Bu	0.99	0.01	D vs. Bu	0.92 vs. 0.99	3.7575	0.209
D	0.92	0.08	L	0.71	0.29	D vs. L	0.92 vs. 0.71	18.8775	<0.0001
D	0.92	0.08	Mg	1.00	0	D vs. Mg	0.92 vs. 1.00	4.3701	0.1077
D	0.92	0.08	Pc	0.82	0.18	D vs. Pc	0.92 vs. 0.82	9.9044	0.0036
D	0.92	0.08	Pn	0.99	0.01	D vs. Pn	0.92 vs. 0.99	3.7575	0.209
D	0.92	0.08	W	0.93	0.07	D vs. W	0.92 vs. 0.93	0.0926	1

Příloha 9: Frekvence genotypů čistokrevných plemen prasat u polymorfismu g.165262G>A a Pearsonův chí-kvadrát test. Porovnání genotypů vybraných plemen s otcovskými plemeny prasat (Pn, D) Fisherovým exaktním testem.

HSD3B1 g.165262G>A				
Plemeno	Genotyp			Součet
	A	AG	G	
Bu	21	22	7	50
D	1	10	42	53
L	43	7	0	50
Mg	36	0	0	36
Pc	33	16	1	50
Pn	50	0	0	50
W	38	0	0	38
Součet	222	55	50	327

	DF	Součet diferencí	p-hodnota
Chi-Kvadrát	12	284.468	<.0001

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
Pn	1.00	0	Bu	0.64	0.36	Pn vs. Bu	1.00 vs. 0.64	40.8451	<0.0001
Pn	1.00	0	D	0.11	0.89	Pn vs. D	1.00 vs. 0.11	99.0751	<0.0001
Pn	1.00	0	L	0.93	0.07	Pn vs. L	1.00 vs. 0.93	7.5269	0.0125
Pn	1.00	0	Mg	1.00	0	Pn vs. Mg	1.00 vs. 1.00	X	X
Pn	1.00	0	Pc	0.82	0.18	Pn vs. Pc	1.00 vs. 0.82	20.4819	<0.0001
Pn	1.00	0	W	1.00	0	Pn vs. W	1.00 vs. 1.00	X	X

Plemeno	Frekvence alel		Plemeno	Frekvence alel		Plemeno vs. Plemeno	Frekvence vs. frekvence alel	Rozdíl diferencí	p-hodnota
	C	T		C	T				
D	0.11	0.89	Bu	0.64	0.36	D vs. Bu	0.11 vs. 0.64	47.6348	<0.0001
D	0.11	0.89	L	0.93	0.07	D vs. L	0.11 vs. 0.93	82.603	<0.0001
D	0.11	0.89	Mg	1.00	0	D vs. Mg	0.11 vs. 1.00	84.9607	<0.0001
D	0.11	0.89	Pc	0.82	0.18	D vs. Pc	0.11 vs. 0.82	70.5678	<0.0001
D	0.11	0.89	Pn	1.00	0	D vs. Pn	0.11 vs. 1.00	99.0751	<0.0001
D	0.11	0.89	W	1.00	0	D vs. W	0.11 vs. 1.00	86.9937	<0.0001