

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zemědělská fakulta

Studijní program: N4101 – Zemědělské inženýrství
Studijní obor: Živočišné biotechnologie
Katedra: Katedra genetiky, šlechtění a výživy
Vedoucí katedry: prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.

Diplomová práce

KONGENITÁLNÍ CHOROBY PRASAT

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

Autor: Bc. Dagmar Musilová

České Budějovice, duben 2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Dagmar MUSILOVÁ**
Osobní číslo: **Z10734**
Studijní program: **N4101 Zemědělské inženýrství**
Studijní obor: **Živočišné biotechnologie**
Název tématu: **Kongenitální choroby prasat**
Zadávající katedra: **Katedra genetiky, šlechtění a výživy**

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

Cílem diplomové práce je provést genotypizaci vybraných lokusů, spojených s kongenitálními chorobami prasat, na vybraném panelu vzorků. Analýzy budou provedeny molekulárně-genetickými metodami. V závěru by měl být zhodnocen výskyt vybraných chorob ve zkoumaném souboru zvířat, popř. navrhnout vhodný metodický postup pro zabránění dalšího šíření těchto chorob do následujících populací

Práce bude členěna do kapitol:

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

Rozsah grafických prací: 5 - 6 tabulek, 5 - 10 obrázků
Rozsah pracovní zprávy: 50 stran
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam odborné literatury:

Seznam odborné literatury:

Maak S., Boettcher D., Tetens J., Wensch-Dorendorf M., Nurnberg G., Nimmers K., Swalve H.H., Thaller G. (2009): Identification of candidate genes for congenital splay leg in piglets by alternative analysis of DNA microarray data. *International Journal of Biology Sciences*, 5 (4), 331-337.

Reiner G., Hecht W., Buckhardt S., Kohler K., Haushahn P., Reinacher M., Erhardt G. (2008): A complex malformation in a pig: case report and review of the literature. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 115(5), 194-197.

Maak J., Jaesert S., Neumann K., von Lengerle G. (2003): Characterization of the porcine CDKN3 gene as a potential candidate for congenital splayleg in piglets. *Genetics Selection Evolution*, 35 (Suppl. 1), S157-S165.

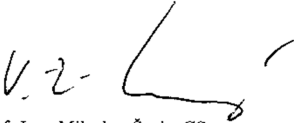
Ooi, P.-T.; da Costa, N.; Edgar, J.; Chang, K.-C. (2006): Porcine congenital splayleg is characterised by muscle fibre atrophy associated with relative rise in MAFbx and fall in P311 expression. *BMC Veterinary Research*, 2:23, 1 - 15.

Rothschild, M.F.; Ruvinsky, A. (1998): *The Genetics of the Pig*. CABI Publishing, 640 pp, ISBN: 978051992297


Vedoucí diplomové práce: **Ing. Lenka Hanusová**
Katedra genetiky, šlechtění a výživy

Datum zadání diplomové práce: **15. března 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **30. dubna 2012**


prof. Ing. Miloslav Šoch, CSc.
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA
studijní oddělení
Studentická 13
370 05 České Budějovice


prof. Ing. Jindřich Čížek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. března 2011

Poděkování:

Chtěla bych poděkovat paní Ing. Lence Hanusové, Ph.D. za všestrannou pomoc a čas, který musela obětovat a také za pevné nervy, jež musela projevit při mé tvorbě této diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat mé rodině a mým přátelům za podporu během celého studia.

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

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne

.....

Bc. Dagmar Musilová

Anotace

Tato diplomová práce navazuje na bakalářskou práci a její úkol spočívá ve zpracování analýzy výskytu PSE masa v populaci českého bílého ušlechtilého plemene jako důsledek kongenitální choroby stresového syndromu prasat. V literárním přehledu práce je uvedena obecná problematika vzniku kongenitálních poruch. Dále práce pojednává o stresovém syndromu prasat a o stresu, jež se podílí na vzniku vad masa jako vnější činitel. Popsány jsou také molekulárně – genetické metody, které se používají v praktické části.

Vlastní výzkum se zaměřil na genotypizaci lokusů vybraného panelu vzorků, na určení frekvence alel a genotypů ve vybraném lokusu a na statistický vztah mezi genotypem a projevem PSE masa. V závěru byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny výsledky.

Klíčová slova: kongenitální porucha; stresový syndrom prasat; PCR; RFLP; gen *RYS1*; PSE maso.

Annotation

This diploma thesis follows the bachelor thesis and its task is to processing analysis of the occurrence of PSE meat in a population of the Czech white breed as a pigs stress syndrome impact. General problem of congenital diseases is processed in literature review. Further, this work deals with pigs stress syndrome and stress, which causes the meat defects as an external factor. Molecular - genetic methods, which are used in the practical part, are described as well.

The research focused on genotyping of loci selected panel of samples, to determine the frequency of alleles and genotypes of selected locus and the statistical relationship between genotype and expression of PSE meat. Results were statistically processed and evaluated at the end.

Key words: congenital diseases; stress syndrome of pigs; PCR; RFLP; *RYS1* gene; PSE meat.

Obsah

1.	Úvod.....	7
2.	Literární přehled	9
2.1	Kongenitální choroby.....	9
2.1.1	Rozdělení vrozených vad.....	9
2.1.2	Příčiny způsobující vrozené vady	10
2.2	Genetické markery v chovu prasat.....	13
2.2.1	Lokusy pro kvantitativní znaky (QTL)	13
2.2.2	Marker asistovaná selekce (MAS).....	14
2.3	Stresový syndrom prasat (PSS).....	15
2.3.1	Klinické příznaky a výskyt	15
2.3.2	Důsledky PSS.....	16
2.3.3	Gen ryanodinového receptoru (<i>RYR1</i>)	18
2.4	Molekulárně - genetické metody	20
2.4.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR)	20
2.4.2	Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)	22
2.4.3	Elektroforéza.....	23
2.5	Plemeno české bílé ušlechtilé (ČBU).....	25
2.5.1	Charakteristika plemene	25
3.	Cíl práce.....	26
4.	Materiál a metodika	27
4.1	Materiál	27
4.2	Metodika.....	27
4.2.1	Izolace DNA z tkání.....	27
4.2.2	Polymorfismus <i>RYR1</i>	28
4.2.3	Složení PCR master – mixu	28
4.2.4	Průběh PCR v termocykleru.....	29

4.2.5	Agarózová elektroforéza pro kontrolu provedení PCR produktu.....	29
4.2.6	RFLP	29
4.3	Frekvence alel a genotypů.....	31
4.4	Vztah mezi genotypem a projevem PSE.....	32
5.	Výsledky	33
6.	Diskuze.....	38
7.	Závěr	40
8.	Seznam zkratk.....	41
9.	Seznam použité literatury	42

1. Úvod

Chov prasat je nedílnou součástí chovu hospodářských zvířat. Na rozdíl od jiných chovů není chov prasat v současnosti regulován a ani není přímo dotován z Evropské unie, a proto je možné srovnávat ekonomické podmínky chovatelů prasat v EU.

Na světě se odhadem chová asi 1,2 miliardy kusů. Největším chovatelem prasat je v současné době Čína, která chová přes 50 % zvířat. USA se podílí zhruba 10 %. EU má podíl na celosvětových stavech asi 20 % s počtem přibližně 150,15 milionů prasat k prosinci 2010. V Evropě jsou největšími chovateli Německo, Španělsko, Polsko, Rusko a Francie.

Celkový stav prasat v České republice k 1. srpnu 2011, který zveřejnil Český statistický úřad, potvrdil trend snižování celkových stavů prasat na 1 658 000 kusů z 1 948 634 kusů oproti 1. srpnu 2010. Stavby prasnic činily 103 500 kusů ze 130 054 kusů. Hlavním důvodem je stálý nárůst dovozu vepřového masa a živých prasat ze zahraničí.

V chovu prasat se neustále prohlubují problémy, zakládající se na neschopnosti producentů se sjednotit a mít společnou produkčně-odbytovou politiku. Někdy může spočívat problém také ve špatné zoohygieně v chovech. A hlavně stále ještě neumíme plně využít genetický potenciál chovaných zvířat, což mohlo způsobit, že chov prasat neměl mnoho let nároky na jakoukoliv podporu, jako je tomu například v chovu přežvýkavců.

Chov prasat zasahuje významně jednak do oblasti živočišné a rostlinné výroby, kde hraje důležitou roli v konzumaci obilovin, které se vypěstují v ČR, ale také do oblasti průmyslové výroby.

Vepřové maso je nejvíce konzumovaným druhem masa ve světě i u nás. Mezi hlavní příčiny tohoto stavu patří nepochybně jeho obliba u spotřebitelů a ekonomická efektivita jeho produkce. Spotřeba vepřového masa je v ČR téměř 51% z celkového množství masa. Proto patříme k zemím s nadprůměrnou spotřebou. Podle ČSÚ u nás v roce 2010 připadlo na 1 obyvatele přibližně 41,7 kg vepřového masa z celkové spotřeby 75,9 kg masa. Významnou roli hraje kvalita masa, tedy kvalita jatečných prasat, kvalita jatečně upravených těl prasat, kvalita masa (v širším i užším smyslu) a konečně i kvalita výrobků z vepřového masa.

Mezi hlavní požadavky na kvalitu jatečných prasat a na kvalitu vepřového masa, které kladou v současnosti zpracovatelé a spotřebitelé, patří co největší odolnost jatečných prasat vůči stresu. To je důležité pro kvalitu libového vepřového masa. Jedná se, jak o absenci vady PSE, u které je největším nedostatkem výrazně zhoršená schopnost vázat vodu, tak i o absenci vady DFD, u níž je hlavním problémem snadná zkazitelnost působením mikroorganismů. Proto je velmi důležité se touto problematikou neustále zabývat.

2. Literární přehled

2.1 Kongenitální choroby

Význam slova kongenitální pochází z latinského slova *congenitalis* a znamená vrozený. Kongenitální anomálie neboli vrozené vývojové vady jsou výrazy používané k označení vývojových poruch, které jsou přítomny již při narození (Šípek *et al.*, 2008). Tyto vady mohou být různě závažné, a to od nevýznamných přes málo významné až po vady velmi těžké.

Objevují se jednak strukturální vývojové vady, které je možno zjistit již během nitroděložního vývoje, a pokud se jedinec narodí, jsou tyto vady většinou ihned viditelné, anebo funkční vrozené vývojové vady, jenž se většinou neprojeví hned po narození a jejich velkou část tvoří poruchy metabolismu (Musilová, 2010).

2.1.1 Rozdělení vrozených vad

Vrozené vývojové vady se mohou z různých hledisek dělit do několika skupin. Nejčastěji se používá dělení podle dvou hledisek. Prvním z nich je rozdělení podle mechanismu vzniku a druhým rozdělení podle četnosti a komplexnosti.

1) Podle mechanismu vzniku lze vrozené (kongenitální) vady (poruchy) rozdělit do několika skupin:

- **Malformace** - morfologické defekty orgánů nebo částí orgánů.
- **Dysplazie** - abnormální organizace buněk tvořící příslušný orgán.
- **Disrupce** - sekundární chyba ve vývoji orgánu nebo jeho části.
- **Deformace** - abnormální tvar nebo poloha části těla plodu (Musilová, 2010; Hanusová, *in verb*).

2) Druhým nejčastěji využívaným hlediskem je četnost a komplexnost, kde rozlišujeme:

- **Sekvence** - vznik sekundárních kongenitálních anomálií v důsledku primární malformace (Mudráková, 2008).
- **Syndrom** - anomálie a symptomy vyskytující se společně.
- **Asociace** - určité znaky nebo abnormality vyskytující se společně častěji než by odpovídalo prosté náhodě.
- **Isolované vady**

Existují i další skupiny, které se vyznačují různými absencemi či abnormalitami určitých částí orgánů nebo celých orgánů. Jde zejména o:

- **Agenezi** - kompletní chybění orgánu i jeho základu.
- **Aplázii** - absence orgánu.
- **Hypoplázii** - orgán není dokonale vyvinut.
- **Atrézii** - chybění trubicovitého otvoru.
- **Hyperplázii** - zvětšení nějakého orgánu na základě zvýšení počtu buněk, z nichž se skládá (Musilová, 2010).

2.1.2 Příčiny způsobující vrozené vady

Příčiny vrozených vývojových vad mohou být různé. Obecně se dá říci, že na abnormálním prenatálním vývoji a na vzniku vrozené vývojové vady se mohou podílet faktory genetické, faktory zevního prostředí a faktory kombinované z obou těchto skupin (www.wikiskripta.eu/index.php/Vrozené_vývojové_vady).

2.1.2.1 Genetické faktory

Za vznik vrozených vad z genetického hlediska zodpovídají mutace, což jsou změny v genotypu organismu oproti normálnímu stavu. Velké množství mutací je naprosto náhodných. Mutace, které vznikly díky chybě při replikaci DNA, se nazývají mutace spontánní (dochází k nim bez zásahu z vnějšího prostředí). Četnost těchto mutací je velice nízká. Buňky mají schopnost do určité míry tyto chyby díky reparačním enzymům eliminovat. Většina mutací patří mezi tzv. indukované mutace. Jejich vznik je podmíněn působením vnějších mutagenních faktorů (mutagenů) (Šípek, 2010).

Podle místa výskytu v genomu lze mutace zařadit do 3 základních druhů:

- 1) **Chromozomové mutace** (chromozomové aberace), které jsou zapříčiněny strukturálními (duplikace, delece, inverze, translokace a fragmentace) nebo numerickými odchylkami v karyotypu a často se projevují komplexně jako syndromy (www.wikiskripta.eu/index.php/Vrozené_vývojové_vady).
- 2) **Genové mutace** označují změny v genetické informaci odpovídající jedinému genu. Jde o změny, které postihují strukturu DNA, ale nenarušují jednotnost stavby chromozomu. Mají relativně nejmenší fenotypový důsledek. Ale tyto mutace mohou zasáhnout i některé geny s regulační

funkcí. Jednou z příčin nádorových onemocnění bývají právě mutace genů regulujících dělení buňky a její diferenciaci. Patří sem adice (inzerce), delece a substituce (Vlastík, 2004).

3) **Genomové mutace**, při nichž dochází ke zvýšení nebo snížení počtu chromozómů od normálního stavu.

- **Aneuploidie** - odchylky v počtu jednotlivých chromozómů.
- **Polyploidie** - znásobení celých chromozomálních sad.
- **Haploidie** - redukce celých chromozomálních sad (Šípek, 2010).

Podle významu mutace v etiologii choroby se rozlišují monogenně a polygenně podmíněné vrozené vady.

- Podstatou **monogenně podmíněných** vad je mutace DNA na úrovni genu (bodová mutace). Charakteristická je pro ně dědičnost jednoduchého mendelovského typu (autozomálně dominantní a recesivní dědičnost a gonozomálně dominantní a recesivní dědičnost) (www.upmd.cz/?lang=cz&category=1-4-11-63-78#monogenne-podminene-vady).
- U **polygenně podmíněných** vrozených vad jde o patologické stavy, na jejichž vzniku se podílí větší počet genů, mezi nimiž dochází k různým vzájemným propojením. Na těchto stavech se prostředí podílí jen minimálně nebo se nemusí podílet vůbec (Šípek, 2010).

2.1.2.2 Vnější faktory

Vnější faktory, které mohou zapříčinit vznik vrozené vývojové vady nebo riziko takové vady významným způsobem zvýšit, obecně označujeme jako teratogeny. Mechanismus působení teratogenů spočívá v poškození DNA plodu. Rozsahu a závažnosti poškození ubývá s postupujícím vývojem zárodku nebo plodu a snižuje se tak četnost výskytu vrozených vad. Rozlišují se teratogeny biologické, chemické a fyzikální povahy (www.wikiskripta.eu/index.php/Vrozené_vývojové_vady).

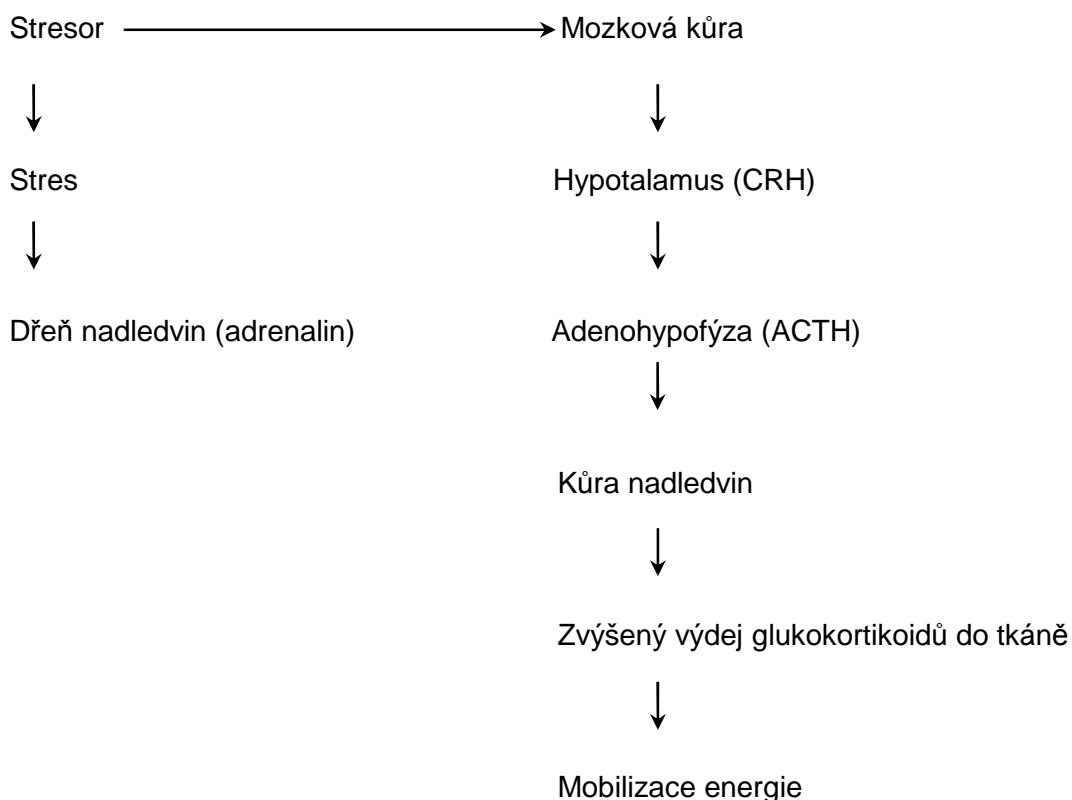
2.1.2.3 Stres – kombinace genetických a vnějších faktorů

Pokud se životní podmínky zvířete stanou příliš náročnými a zvíře se jim nedokáže přizpůsobit, popisuje se tato situace jako stresová. Dochází ke snížení fyzické kondice zvířete a tento stav se může měřit pomocí fyziologických reakcí.

Příčiny prostředí, jež vedou ke stresu, se nazývají stresory. Jedinci, kteří jsou stresu vystaveni, vykazují stresové reakce, které závisejí na typu, intenzitě a době trvání stresoru a na povaze zvířete. Reakce na stres byly rozděleny na akutní (krátkodobé) a chronické (dlouhodobé). Příkladem akutního stresoru může být útok zvířete z vlastní skupiny. Chronickým stresorem je například několikaměsíční ustájení prasnic v těsných klecích během březosti. Informace o stresoru je zpracována v mozku, který poté tělo informuje o možnostech reakcí prostřednictvím nervového systému nebo uvolněním hormonů.

Mechanismus vzniku stresu je přehledně znázorněn na obrázku č. 1. Dřeň nadledvin uvolní do krve adrenalin, který připravuje tělo na výkon a je základním hormonem stresové reakce, při níž jedinec zaútočí nebo naopak uteče. Kůra nadledvin produkuje steroidní hormony, tzv. glukokortikoidy, jež hrají důležitou roli v regulaci metabolismu (Arey *et al.*, 2006; cs.wikipedia.org/wiki/Stres).

Stres u prasat souvisí hlavně s intenzivním šlechtěním. Extrémní šlechtění u nich totiž vede ke snižování odolnosti vůči stresovým faktorům, což může vést ke vzniku stresového syndromu.



Obrázek č. 1 Humorální mechanismus stresu (www.cathleen.wz.cz/chovzviraII/cvika/8.doc)

2.2 Genetické markery v chovu prasat

Genetický marker je jakýkoliv genetický znak nebo projev organismu, který může být použitý na určení specifického chromozómu, buňky anebo jedince. Jedná se o krátký úsek DNA, heterochromatinovou oblast chromozómu, často označovanou jako polymorfni znak, jehož varianty se dědí podle mendelistické dědičnosti a vyskytují se v asociaci s genetickou variabilitou vlastnosti, důležitou v procesu šlechtění (Brascamp *et al.*, 1995; Dvořák *et al.*, 1996).

Ve šlechtění hospodářských zvířat mají genetické markery celou řadu využití díky svým vlastnostem. Dají se například zjistit v každém věku zvířete včetně embryí a spermatu, což je výhodou u znaků, které se projevují až v pozdějším věku, nebo se zjistí až po poražení. Dále se mohou stanovit i u pohlaví, u kterého se daný znak nevyskytuje (např. ukazatele velikosti vrhu u kanců). Využívají se u znaků s nízkými koeficienty heritability, které jsou obtížně ovlivnitelné pomocí klasických šlechtitelských metod.

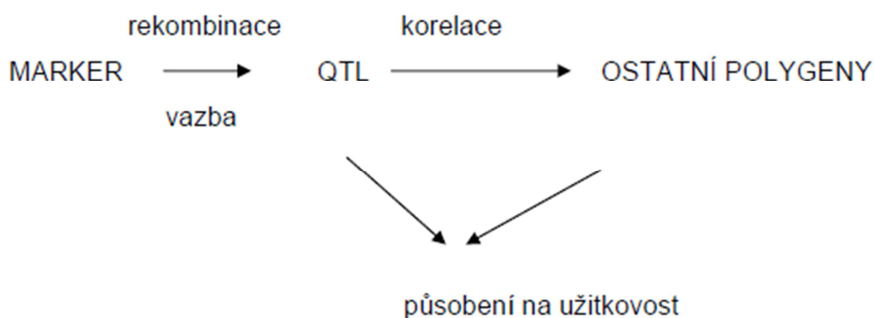
V praxi bylo navrženo několik postupů využití genetických markerů. Jako první se nabízí možnost využít informaci o nich k předselekcí na požadovaný genotyp (např. pro resistenci ke stresu) a následně provádět selekcí na základě užítkovosti jedince a jeho příbuzných (na základě odhadnuté plemenné hodnoty). Druhá možnost je postupovat obráceně. Nejprve selektovat na základě informace o plemenné hodnotě a následně podle informace o genetických markerech. Je také možné pomocí genetických markerů vybírat rodiče a provádět plemenitbu tak, aby se jejich potomci vyznačovali konkrétními vlastnostmi. Tyto postupy lze pojmenovat jako marker asistovaná selekce (marker assisted selection – MAS) (Humpolíček, 2005).

2.2.1 Lokusy pro kvantitativní znaky (QTL)

Poloha genu na chromozomu se nazývá lokus. Lokus pro gen, který ovlivňuje kvantitativní znak, se nazývá lokus pro kvantitativní znak, ve zkratce QT-lokus (nebo jednoduše QTL). Moderní molekulární techniky umožnily vyhledávání QTL v genomech různých druhů. Tyto lokusy byly identifikovány a zmapovány na konkrétní chromozomy také u prasat. Na 6. chromozomu byl zmapován QTL pro jatečnou hodnotu a kvalitu masa do oblasti lokalizace *RYS1* genu (Snustad *et al.*, 2009; Geldermann *et al.*, 1996).

2.2.2 Marker asistovaná selekce (MAS)

Úsek DNA nebo gen, který sám nevykonává žádnou funkci, ale je snadno rozpoznatelný laboratorními technikami, se označuje jako marker. Pomocí přesně plánovaných experimentů je možné dále zjistit, jak silná je vazba mezi markerem a QTL. Vazba je tím silnější, čím blíže jsou na chromozómu QTL a marker lokalizovány. Síla vazby pak může být charakterizována jako úplná či neúplná. V případě úplné vazby se gen a marker předávají jako komplex a při neúplné vazbě dochází k rekombinacím a u potomků se pak vyskytují nové kombinace marker-gen. Právě na síle vazby a na četnosti možných rekombinací závisí využitelnost markeru jako selekčního kritéria. Čím silnější je vazba, tím je selekce podle markeru spolehlivější. Obrázek č. 2 znázorňuje vztahy mezi markerem, QTL a ostatními polygeny, a jejich působení na užitkovost (Guimarães, 2007).



Obrázek č. 2 Schéma vztahů marker – QTL – kvantitativní znak (Příbyl, 1995)

2.3 Stresový syndrom prasat (PSS)

Stresový syndrom prasat (Porcine Stress Syndrome – PSS), někdy také zátěžová myopatie nebo maligní hypertemie, je geneticky podmíněné onemocnění. Tuto poruchu způsobuje dědičně podmíněná nedostatečná látková výměna ultrastrukturálních organel svalových buněk. Buňky odpovídají za využívání kyslíku, a tím i za nedostatek vzniklého kyslíku ve tkáních s následným kompenzačním zrychlením anaerobní glykolýzy v bílých svalových vláknech (Dražan *et al.*, 1987).

Příslušná mutace se nachází na genu *RYR1*, který kóduje vápníkový kanál sarkoplazmatického retikula kosterních svalů. Touto mutací pak dochází ke zvýšení citlivosti kosterních svalů prasat na různé podněty (fyzikální, nervové, endokrinní nebo farmakologické). Nakonec toto všechno vede ke zvětšenému uvolňování vápenatých iontů, jež přispívá k předčasné a zintenzivněné svalové činnosti a poškozování na submolekulární úrovni.

Zvýšenou hladinu krevní glukózy způsobuje aktivace sympatiko-adrenergního systému (SAS) a zvětšenou hladinou glukokortikoidů. V intracelulárních prostorách je nedostatek glukózy kompenzován zvýšenou spotřebou glykogenu a ATP.

Hypermetabolismus zapříčiní zvýšení spotřeby kyslíku a svalového glykogenu, uvolňuje se teplo, kyseliny a draslík s oxidem uhličitým, což přispěje k cyanóze a tachykardii. Rychlý nástup anaerobního metabolismu vede k vyšší hladině laktátu s následnou metabolickou a respirační acidózou (www.soubory.vfu.cz/fvl/klinika_chorob_prasat/PSS-stresovy-syndrom.doc; Tvrdoš, 2004; Fujii *et al.*, 1991).

2.3.1 Klinické příznaky a výskyt

Mezi klinické příznaky patří potíže s dýcháním (dýchání s otevřenou dutinou ústní či zrychlené dýchání), zvýšená teplota, zrychlená srdeční činnost, svalové záškuby nebo cyanóza, zapříčiněná především teplotním či sociálním stresem (vzájemné boje, připouštění, míchání různých skupin). Dále se vyskytuje červené zbarvení kůže nebo nepravidelné vyblednutí způsobené zánětem, maligní hypertermie (svalová ztuhlost, fialové skvrny na kůži, metabolická acidóza, respirační acidóza), rychlý kolaps a téměř okamžitý *rigor mortis*.

Onemocnění se nejčastěji vyskytuje u plemen, u nichž se procesem šlechtění postupně snižoval podíl tuku v jatečném těle a zvyšovaly se nároky na co největší

osvalení (plemena landrace a pietrain). Pokud se u těchto plemen projeví gen pro stresový syndrom prasat, mají pak tyto jedinci zvýšenou náchylnost na postmortální zhoršení kvality svaloviny a citlivost ke stresu a anestetikům. Šlechtěná plemena vykazují nižší podíl tuku a vyšší hmotnostní přírůstky, což se zdá jako hlavní výhoda ekonomických ukazatelů, ale zhoršená postmortální kvalita masa a zvýšená citlivost ke stresu se pochopitelně jeví jako ekonomicky naprosto nevhodné vlastnosti (www.soubory.vfu.cz/fvl/klinika_chorob_prasat/PSS-stresovy-syndrom.doc; Křenková, 1999; Fujii *et al.*, 1991).

2.3.2 Důsledky PSS

2.3.2.1 PSE maso (bledá, měkká a vodnatá svalovina)

Jedinci se stresovým syndromem mají sklon k motorickému neklidu a i po menších zátěžových situacích se u nich vyskytuje svalový třes, rychlé a povrchní dýchání, dušnost, slabost, přehřátí a snadná unavitelnost. Vznik PSE (Pale Soft Exudative) masa je způsoben vystavením zátěži v předporážkovém období (např. manipulace, dehydratace, doba odpočinku atd.) (www.soubory.vfu.cz/fvl/klinika_chorob_prasat/PSS-stresovy-syndrom.doc).

Projev této vady masa je od velmi mírného až po zcela významný. Rozhoduje situace těsně před porážkou a bezprostředně po ní. U prasat s dispozicí k tvorbě PSE masa, se v okamžiku jejich zabití spustí velmi rychlý průběh degradace glykogenu a adenosintrifosfátu na kyselinu mléčnou a inosinovou. Hodnota pH poklesne do jedné hodiny *post mortem* na 5,80 a nižší. Rychlá glykogenolýza uvolní velmi mnoho energie a zvýší teplotu svaloviny třeba až na + 43 °C. Zvýšená teplota a kyselost svaloviny způsobí částečnou denaturaci svalových bílkovin, která má za následek zhoršení vaznosti masa (Ingr, 2003).

Z důvodu vyčerpání velké části glykogenu a ATP ještě před poražením dojde po poražení k typickým postmortálním změnám. To znamená, že má svalstvo světlou, šedobílou nebo šedožlutou barvu, křehkou konzistenci a vodnatý vzhled, jež je viditelné na obrázku č. 3 (Geldermann *et al.*, 1996). Nejčastěji se tyto změny nachází v hřbetních svalech, jako je především *m. longissimus dorsi* a ve svalech gluteálních. V těchto svalových skupinách se totiž nachází největší podíl právě bílých vláken s vysokou glykolytickou aktivitou (www.soubory.vfu.cz/fvl/klinika_chorob_prasat/PSS-stresovy-syndrom.doc).



Obrázek č. 3 PSE maso (Battersby *et al.*, 1999)

2.3.2.2 DFD maso (tmavá, tuhá a suchá svalovina)

Vznik DFD (Dark Firm Dry) masa je dán vyčerpáním zvířat, kdy se glykogen ve svalech snížil k nulové hladině, a vzniklá kyselina mléčná byla ze svaloviny odvedena krevní cestou, což způsobilo změny v konzistenci a barvě svaloviny a narušilo normální průběh zrání masa po poražení. V takové situaci poražené zvíře poskytne maso velmi tmavě zbarvené (spotřebitel ho může považovat za maso ze starého zvířete) s tuhou konzistencí a lepivým povrchem jako na obrázku č. 4. Hlavní negativní vlastností DFD masa je však jeho neúdržnost. Nemá obvyklou vlastní kyselost, a proto velmi rychle podléhá mikrobiálnímu kažení. Jeho pH hodnota je po 24 hodinách 6,20 a vyšší (Dražan *et al.*, 1987; Ingr, 2003).



Obrázek č. 4 DFD maso (Chambers *et al.*, 2001)

2.3.2.3 Akutní nekróza zádových svalů

K nekróze (pasivní buněčné smrti) dochází u prasat citlivých na stres po silném zatížení (např. zapouštění, veterinární zákrok apod.). Stane se tak, když prase

přežije toto zatížení déle jak 2 - 5 hodin. Svalová vlákna zadržují sodík, který váže vodu, a svalová vlákna pak otékají – viz obrázek č. 5. Naruší se zásobování krví a tím i kyslíkem a dojde k degeneraci a následnému odumírání buněk (vlastní nekróza). Jedinci mají vysokou teplotu, zhoršený pohyb, nechutenství a jejich hřbetní svaly jsou jednostranně nebo oboustranně zduřelé. Zvířata odmítají vstát a projevuje se u nich patrná bolestivost. Pokud jedinci přežijí akutní fázi, vyhojení trvá několik měsíců, ale většinou hynou právě během akutní fáze (Dražan *et al.*, 1987; www.soubory.vfu.cz/fvl/klinika_chorob_prasat/PSS-stresovy-syndrom.doc).



Obrázek č. 5 Makroskopický pohled na akutní nekrózu
(www.soubory.vfu.cz/fvl/klinika_chorob_prasat/PSS-stresovy-syndrom.doc)

2.3.2.4 Akutní zátěžová kardiomyopatie

Akutní kardiomyopatie je rychle probíhající selhání krevního oběhu, které zapříčiní nějaký stres (např. očkování, zapouštění, přeprava aj.) a vrcholí smrtí jedince nebo jeho nutným poražením. Vyléčení není možné kvůli velmi rychlému průběhu onemocnění (Dražan *et al.*, 1987).

2.3.3 Gen ryanodinového receptoru (*RYR1*)

Gen *RYR1*, označovaný také jako *HAL* (halotanový gen) nebo jako *CRC* (gen vápníkového kanálu), je svou mutací zodpovědný za vznik PSS. Gen *RYR1* kóduje vápníkový kanál sarkoplazmatického retikula kosterních svalů. Tato mutace následně způsobí zvýšení citlivosti kosterních svalů prasat na různé podněty (př. nervové, endokrinní, fyzikální). Následkem toho dochází ke zvýšenému uvolňování vápenatých iontů (Ca^{2+}) z vápníkového kanálu sarkoplazmatického retikula, což vede ke zvýšené a předčasné svalové činnosti (zvýšená interakce kontraktálních proteinů aktinu a myosinu) a poškozování svalů na submolekulární

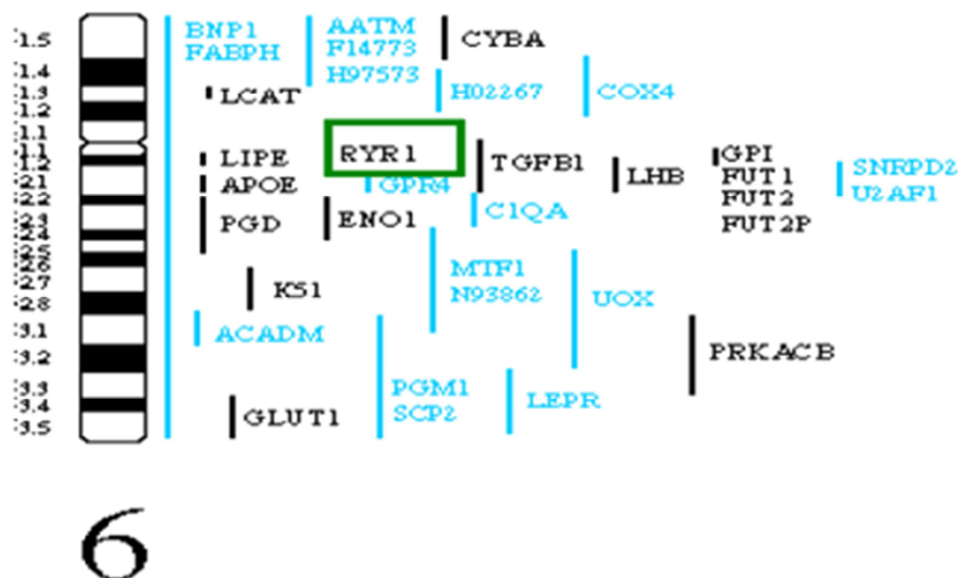
úrovni (www.soubory.vfu.cz/fvl/klinika_chorob_prasat/PSS-stresovy-syndrom.doc; Fujii *et al.*, 1991).

V roce 1991 byla nalezena bodová mutace na 6. chromozomu – 6p1.1-q2.1 (viz obr. č. 6). Metodami PCR-RFLP (označované jako DNA test) se běžně stanovují dvě varianty genu *RYR1*. Jedná se o alely známé pod symboly "N" a "n". Alely se od sebe liší záměnou jedné báze genetické informace genu *RYR1*. Je to v pořadí 1843. báze. Pokud se na tomto místě nachází báze cytosin (C), je to dominantní alela N. V případě, kdy je na místě báze thymin (T), jde o alelu recesivní n.

Konkrétní jedinec pak může mít genotyp:

- *NN* = odolné na stres
- *Nn* = odolné na stres, ale někteří potomci mohou být citliví na stres
- *nn* = citlivé na stres

Proto došlo k vytvoření rutinních laboratorních metod k určení genotypu v tomto genu a následně byl tento gen hojně využit k selekci prasat odolných vůči stresu. Gen *RYR1* má vztah také k vyššímu obsahu libové svaloviny u recesivních homozygotů a také k reprodukci (Humpolíček, 2005; Tvrdoň, 2004; Fujii *et al.*, 1991; Dvořák *et al.*, 1999).



Obrázek č. 6 Cytogenetická mapa 6. chromozomu prasete (Křenková, 1999)

2.4 Molekulárně - genetické metody

2.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

V současné době jsou známy kompletní nebo téměř kompletní nukleotidové sekvence mnoha genomů. Dostupnost těchto sekvencí v databázích umožňuje izolovat geny nebo další vybrané sekvence DNA. Namnožení sekvence DNA je prováděno *in vitro*. Sekvence mohou být prakticky během několika hodin amplifikovány milionkrát nebo i víckrát. Tuto metodu vyvinul v roce 1980 Kary Mullis a v roce 1993 za ni obdržel Nobelovu cenu za chemii (Snustad *et al.*, 2009).

Polymerase Chain Reaction (PCR) je enzymatické namnožení cílové sekvence DNA, umístěného mezi dvěma oligonukleotidovými primery (malé úseky DNA o známé sekvenci tvořené 20 – 25 nukleotidy), pomocí termostabilní DNA-polymerázy procesem teplotního cyklování. Zpravidla se jedná o *Taq* polymerázy izolované z termofilní bakterie *Thermus aquaticus*. *Taq* a další polymerázy jsou znázorněny v tabulce č. 1. Jeden z primerů je komplementární k jednomu řetězci molekuly DNA na jedné straně cílové sekvence a druhý primer je komplementární k druhému řetězci molekuly DNA na opačné straně cílové sekvence. Kromě primerů a DNA-polymerázy je k provedení PCR dostatečná zásoba volných deoxynukleotidů (dNTP) (Nussbaum *et al.*, 2004; www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/; Kočárek, 2003).

Polymerasa	5' → 3' exonukleasa	3' → 5' exonukleasa
<i>Taq</i>	ano	ne
<i>Tfl</i>	ano	ne
<i>Tbr</i>	ano	ne
<i>Tth</i>	ano	ne
Stoffelův fragment	ne	ne
<i>Tli</i>	ne	ano
<i>Pfu</i>	ne	ano
<i>Pwo</i>	ne	ano
UI <i>Tma</i>	ne	ano

Tabulka č. 1 Přehled termostabilních DNA polymeráz podle jejich exonukleasové aktivity (Průša, 1997)

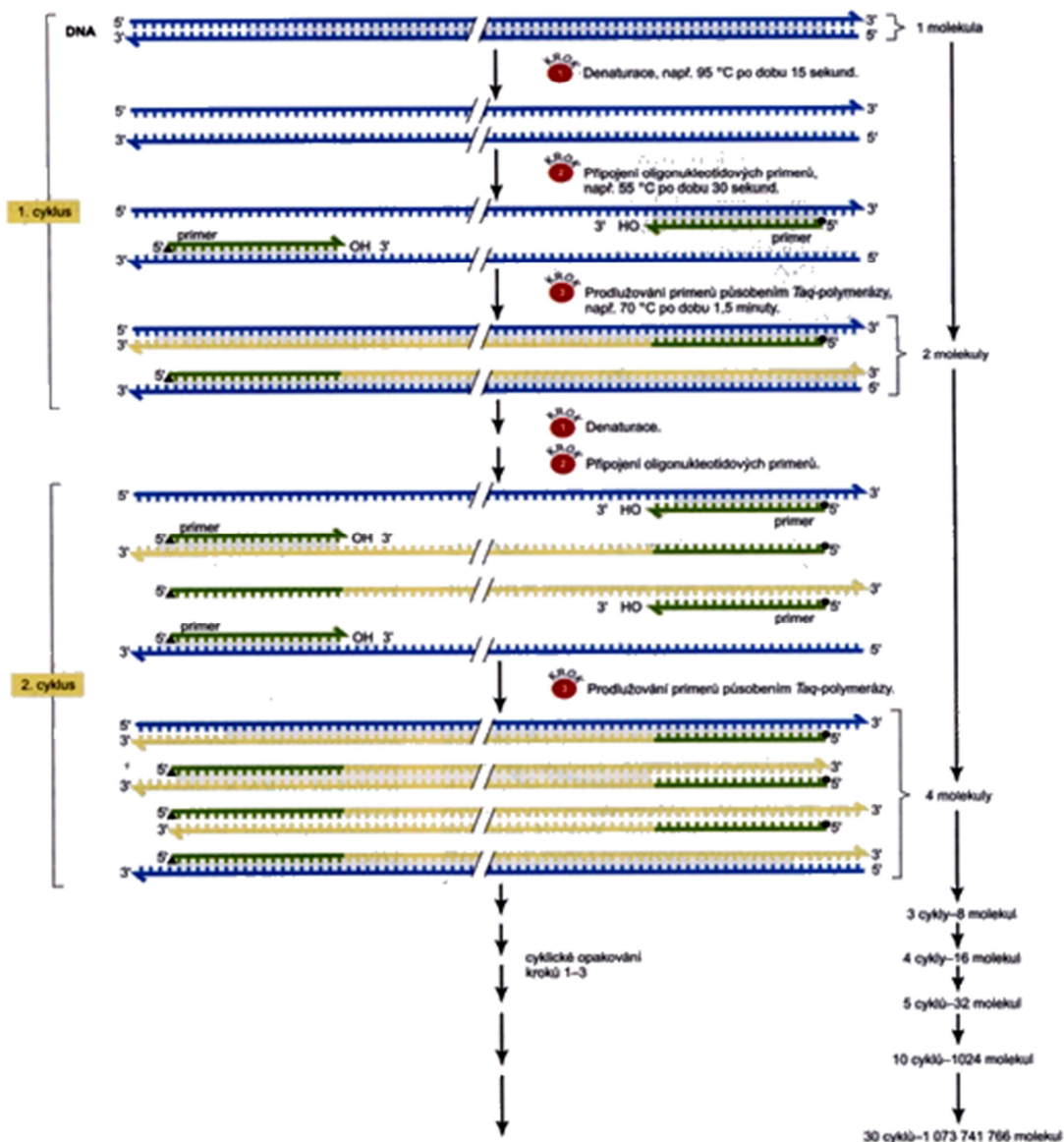
Metoda zahrnuje tři kroky, které se mnohokrát opakují (cyklují):

- 1) **Denaturace** - v prvním kroku je genomová DNA, obsahující sekvence, jež mají být namnoženy, denaturována zahřátím na 92 – 96 °C po dobu asi 30 sekund.
- 2) **Annealing** - ve druhém kroku je denaturovaná DNA hybridizována s nadbytkem syntetických oligonukleotidových primerů. Společně se inkubují při teplotě 45 – 65 °C po dobu přibližně 30 sekund. Ideální teplota pro připojení primerů je závislá na počtu a typu bází, ze kterých jsou složeny.
- 3) **Elongace** – ve třetím kroku je použita DNA-polymeráza pro replikaci úseků DNA mezi místy komplementárními k oligonukleotidovým primerům. Primer poskytuje volnou 3'-OH skupinu potřebnou pro kovalentní navázání dalšího nukleotidu a následné prodlužování řetězce ve směru 5'→3'. Denaturovaná genomová DNA přitom zajišťuje funkci templátu. K polymeraci obvykle dochází při 70-72 °C podobu 1,5 minuty.

Po doběnutí jednoho cyklu se počet úseků DNA zdvojnásobí. V dalším cyklu se produkty prvního cyklu replikace denaturují a po připojení primerů replikují DNA polymerázou, což je znázorněno na obrázku č. 7. Proces se opakuje zpravidla ve 20 - 40 cyklech, dokud se nedosáhne požadovaného stupně amplifikace (Snustad *et al.*, 2009; Kočárek, 2003).

K provedení PCR reakce jsou potřebné tyto složky:

- H₂O
- pufr – pro udržení stabilních podmínek směsi
- MgCl₂ – nezbytný pro „start“ polymerázy
- dNTP's – stavební jednotky pro vytváření úsek DNA
(960 µl H₂O + 10 µl dATP + 10 µl dCTP + 10 µl dGTP + 10 µl dTTP)
- primery (P₁ a P₂) – syntetické oligonukleotidové řetězce, vážící se na specifické místo DNA
- *Taq* polymeráza – katalyzuje syntézu DNA z volných nukleotidů
- DMSO – pro efektivnější a rychlejší vstřebávání substancí
- izolát – biologický vzorek obsahující DNA, která má být amplifikována

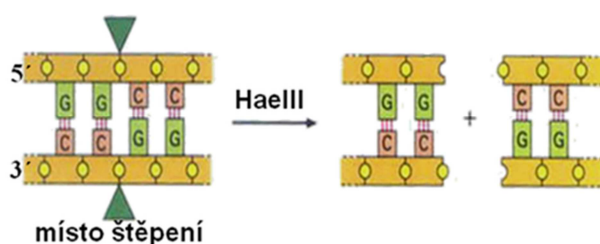


Obrázek č. 7 Použití PCR k namnožení molekul DNA *in vitro* (Snustad *et al.*, 2009)

2.4.2 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Podstatou metody polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism; RFLP) je enzymatické štěpení molekul DNA ve specifickém štěpném (restrikčním) místě enzymem, který se nazývá restrikční endonukleáza (Bártová, 2011). Identifikace a analýza produktů štěpení se provádí elektroforetickým dělením. Bakteriálních restrikčních endonukleáz je známo velké množství (asi 1500). Liší od sebe tím, že rozpoznávají různé krátké sekvence nukleotidů [4, 6, 8] a že štěpí DNA na různě dlouhé fragmenty podle individuálního pořadí bází a podle rozpoznané sekvence. Počet a délka fragmentů je pro daného

jedince specifická. Některé restriční endonukleázy jsou citlivé na metylaci DNA. Někdy methylace adeninu a cytosinu inhibují štěpení, jindy je methylace pro štěpení nezbytná. Rozlišení různých DNA se provádí na základě polymorfismu délky štěpných úseků. Tento polymorfismus vzniká na základě přítomnosti nebo nepřítomnosti rozpoznávacích a štěpných míst. Restriční endonukleázy, rozpoznávající kratší sekvenci, štěpí DNA častěji na menší úseky, zatímco restriční endonukleázy, které rozpoznávají delší sekvenci, štěpí méně často a na delší fragmenty. Ukázka restriční endonukleázy *HaeIII* a jejího štěpného místa je na obrázku č. 8 (Průša, 1997; Bártová, 2011).



Obrázek č. 8 Restriční endonukleáza *HaeIII* a její štěpné místo (Bártová, 2011)

2.4.3 Elektroforéza

Elektroforéza je metodou využívající schopnosti nabitých částic v elektrickém poli. Rychlost pohybu částic je závislá na velikosti náboje a molekuly, proto se různě velké a různě nabitě molekuly budou pohybovat odlišnou rychlostí (biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm#princip).

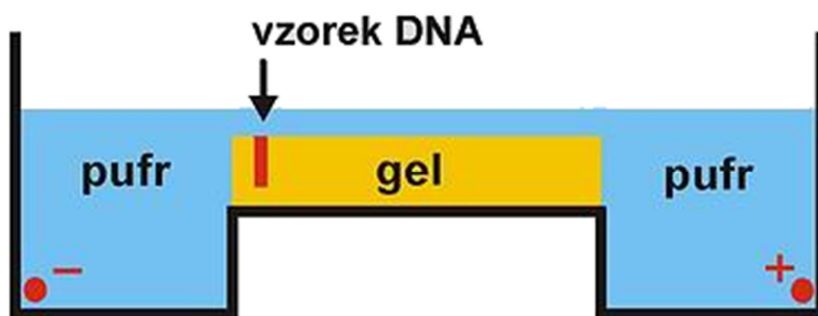
K elektroforéze je potřeba elektroforetická vana s elektrodami. Dále je třeba gel, v němž proběhne separace, a zdroj stejnosměrného elektrického proudu. DNA migruje od záporného ke kladnému pólu. Rychlost migrace je kromě její velikosti dána také vlastnostmi gelu, pufru a napětím (Šmarda, 2005).

Elektroforéza se z praktických důvodů provádí na vhodném nosiči. Jako nejčastější nosiče jsou využívány agarózové nebo polyakrylamidové gely.

2.4.3.1 Agarózová elektroforéza

Agaróza je lineární polysacharid, jehož základní jednotka se skládá z β -D-galaktózy a 3,6-anhydro- α -L-galaktózy. V agarózovém gelu se nachází dlouhé sacharidové polymery mezi sebou spojeny nekovalentními vodíkovými můstky a hydrofóbními vazbami. Tato struktura vytváří trojrozměrnou síť, jejíž póry slouží

jako molekulové síto. Čím vyšší má agaróza koncentraci, tím menší fragmenty lze od sebe oddělit. Důležitá součást elektroforézy je také volba elektroforetického pufru. Mezi nejčastěji používané pufrů patří TAE (Tris-Acetate-EDTA) a TBE (Tris-Borate-EDTA). K určení velikosti fragmentu na základě jeho elektroforetické pohyblivosti slouží hmotnostní standardy o známé velikosti. Jedná se především o fragmenty plazmidových molekul nebo genomu bakteriofágů, jejichž přesná velikost byla určena sekvenováním. Pro identifikaci polohy separovaných fragmentů je používán ethidium bromid (EtBr), který funguje jako interkalační činidlo a vmezeřuje se mezi sousední páry bází. Při UV ozáření o vlnové délce 320 nm se fluorescence EtBr zvyšuje na viditelnou úroveň. Elektroforéza probíhá v elektroforetické vaně, jejíž schéma je znázorněné na obrázku č. 9 (Brody *et al.*, 2004; LePecq *et al.*, 1967; Stellwagen, 2009).



Obrázek č. 9 Schéma elektroforetické vany
(biologie.upol.cz/metody/Slovník/Elektroforetika%20vana.htm)

2.4.3.2 Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE)

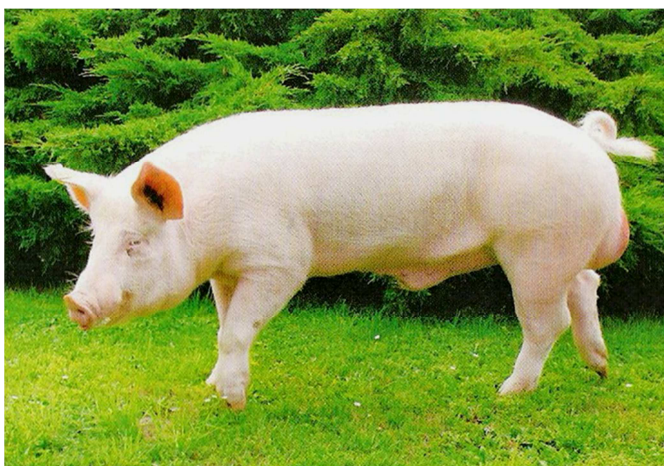
Dalším nejčastěji používaným elektroforetickým médiem v molekulární biologii je polyakrylamidový gel. Jde o vertikální elektroforézu. Směs akrylamidu a bisakrylamidu polymerizuje při pokojové teplotě v pufru (TAE) pomocí volných radikálů poskytovaných persulfátem amonným (APS), který způsobuje homolytické štěpení vazeb O-O. K urychlení polymerizace se používá volná zásada tetrametylendiaminu (TEMED), který katalyzuje tvorbu volných radikálů persulfátu amonného. Dalším užívaným iniciátorem polymerizace je riboflavin, který je účinný již ve velmi nízkých koncentracích 5 - 10 ng/l. Polymerizace se neuskuteční při nízkém pH nebo za přítomnosti O₂ (Průša, 1997).

2.5 Plemeno české bílé ušlechtilé (ČBU)

Plemeno českého bílého ušlechtilého prasete (ČBU) vzniklo z původního klapouchého prasete „český štětinač“ křížením s dovezenými plemeny z Německa a Anglie. V roce 1927 došlo k zahájení tvorby bílého ušlechtilého plemene převodným křížením s německým ušlechtilým plemenem a také s velkým bílým anglickým plemenem. V meziválečném období začala čistokrevná plemenitba a kontrola užitkovosti. V poválečném období byl rozvoj plemene spíše kvantitativní. Snahy o zlepšení vlastností přišly později s využitím importu landrace. V 70. – 90. letech 20. století bylo plemeno začleněno do hybridizačního programu, kde má své místo jako mateřské plemeno. Při intenzivním šlechtění masného typu vznikla otcovská linie, ze které se vytvořilo samostatné plemeno bílé otcovské (Brody *et al.*, 2004).

2.5.1 Charakteristika plemene

Charakteristický je pro ČBU větší až velký tělesný rámec, mírně prohnutá hlava se vzpřímeným uchem, středně dlouhé končetiny, jemnější, ale pevná kostra, pevná konstituce s vysokým stupněm odolnosti vůči stresům a bílá barva kůže a štětín. Toto plemeno má velmi dobré reprodukční vlastnosti, vynikající růstovou schopnost, velmi dobrou konverzi živin, velmi dobrou masou užitkovost a dobrou kvalitu masa. Hmotnost kance se pohybuje od 300 do 320 kg a hmotnost prasnice mezi 220 a 250 kg. Kanec měří v kohoutku 88 až 95 cm a prasnice 80 až 85 cm. Typický zástupce tohoto plemene je kanec znázorněný na obrázku č. 10 (Sambraus, 2006; www.sous.ji.cz/pages/sipvz/stahni.php?soubor=552.pps).



Obrázek č. 10 Plemeno české bílé ušlechtilé (www.sous.ji.cz/pages/sipvz/stahni.php?soubor=552.pps)

3. Cíl práce

Cílem diplomové práce bylo provést genotypizaci vybraného lokusu, spojeného s kongenitální chorobou PSS, na vybraném panelu vzorků. Analýzy byly provedeny molekulárně-genetickými metodami. Na závěr byl zhotoven výskyt této choroby ve zkoumaném souboru zvířat a byly provedeny výpočty frekvence alel a genotypů a také statistické vyhodnocení vztahu mezi genotypem a projevem PSE. V závěru byla formulována chovatelská doporučení.

4. Materiál a metodika

4.1 Materiál

K analýze genu *RYR1* byla použita tkáň od 60 plemeníků plemene české bílé ušlechtilé z chovu polského chovatele, který si nepřál být v práci uveden. Vybraný panel obsahoval 20 jedinců bez projevu PSE, 20 se slabým projevem a dalších 20 s výrazným projevem PSE.

4.2 Metodika

4.2.1 Izolace DNA z tkání

Pro izolaci DNA byla využita ušní tkáň, získaná při vrubování zvířat. Při izolaci se použil komerčně dostupný kit od firmy Macherey-NagelNucleoSpin® Tissue. Postup izolace vycházel z manuálu výrobce.

4.2.1.1 Postup izolace

V prvním kroku se připraví vzorky rozřezáním 25 mg tkáně na malé kousky a vloží se do eppendorfky. Druhým krokem je pre – lýza, kdy se ke vzorkům přidá 180 µl pufru T1 a 25 µl roztoku proteinázy K. Vše se promíchá na vortexu. Zkontroluje se, zda jsou vzorky úplně překryty lyzačním roztokem. Inkubuje se na 56 °C do kompletní lýzy (nejméně 1 až 3 hod). V průběhu inkubace se občas vzorky promíchají na vortexu. Ve třetím kroku proběhne lýza, při které se vzorky promíchají na vortexu. Přidá se 200 µl pufru B3, důkladně se promíchá a 10 min se nechá inkubovat na 70 °C. Krátce se promíchá. Pokud jsou viditelné nerozpuštěné částice, centrifuguje se 5 min při vysokých otáčkách (11 000 x g) a supernatant se přenesse do nové eppendorfky. Čtvrtým krokem dojde k vytvoření DNA-binding podmínek. Ke vzorkům se přidá 200 µl etanolu (96 – 100%) a důkladně se promíchá. Po přidání etanolu se mohou srážet vlákna, což neovlivní DNA izolaci. Všechny precipitáty se přenesse do kolony v následujícím bodě. Pátým

krokem je navázání DNA. Pro každý vzorek se umístí jedna kolona NucleoSpin®Tissue do 2 ml tuby a do kolony se nanese vzorek. Centrifuguje se 1 min při 11 000 x g. Odstraní se proteklý roztok a kolona se umístí zpět do tuby. V šestém kroku se proplachuje silica membrána. Při prvním přemývání se do kolony přidá 500 µl pufru BW a centrifuguje se 1 min při 11 000 x g. Odstraní se proteklý roztok a kolona se umístí zpět do tuby. Ve druhé přemývání se do kolony přidá 600 µl pufru B5 a centrifuguje se 1 min při 11 000 x g. Odstraní se proteklý roztok a kolona se umístí zpět do tuby. Sedmým krokem je sušení silica membrány, kdy se kolona centrifuguje 1 min při 11 000 x g. Zbytek etanolu se v průběhu centrifugace odstraní. V posledním kroku se vymyje vysoko čistá DNA. Kolona se umístí do 1,5 ml eppendorfky a přidá se 100 µl temperovaného pufru BE (70 °C). Inkubuje se 1 min při pokojové teplotě. Centrifuguje se 1 min při 11 000 x g.

Po dokončení izolace je provedena kontrola získání DNA elektroforézou na 1% agarózovém gelu. Získaná DNA se po dobu analýz uchovává při + 4 °C.

4.2.2 Polymorfismus *RYR1*

Pro analýzu polymorfismu (*Arg615Cys*) v genu *RYR1* se vycházelo z práce Fujiiho J. *et al.* (1991). Tato práce byla následně modifikována na použitou tkáň a laboratorní podmínky laboratoře molekulární genetiky na katedře genetiky, šlechtění a výživy zvířat ZF JU.

K analýze mutace nukleotidu 1843 je amplifikována sekvence 74 bp za využití následujících primerů: P₁ (forward) 5'-GTTCCCTGTGTGTGTGCAATGGTG-3', který odpovídá prasečím *ryr1* cDNA nukleotidům 1811 až 1834, a P₂ (reverse) 5'-ATCTCTAGAGCCAGGGAGCAAGTTCTCAGTAAT-3', ve kterých posledních 24 nukleotidů je komplementárních k *ryr1* cDNA nukleotidům 1861 až 1884.

4.2.3 Složení PCR master – mixu

Pro gen *RYR1* je složení master – mixu na jeden vzorek následující:

- 12,5 µl H₂O
- 2 µl pufru
- 2,5 µl MgCl₂
- 2 µl dNTP's
- 1 µl P₁

- 1 μl P₂
- 1 μl DNA
- 1 μl DMSO
- 2 μl Tag polymerázy (1,8 μl H₂O + 0,2 μl Tag DNA polymerázy)

4.2.4 Průběh PCR v termocykleru

Na termocykleru se zvolí příslušný program, v tomto případě program pro gen *RYR1*. Vlastní průběh PCR začíná přípravným zahřátím na 94 °C po dobu 2 min. Dále proběhne 35 cyklů, při nichž se opakovaně střídají všechny tři fáze PCR. Denaturace probíhá při 94 °C, anealing při 59 °C a elongace při 72 °C. Každá fáze trvá 45 vteřin. Dokončení PCR je při 72 °C po dobu 2 min. Nakonec dojde ke zchlazení na 15 °C, aby se vzorky mohly uskladnit v lednici pro další použití.

4.2.5 Agarózová elektroforéza pro kontrolu provedení PCR produktu

PCR produkt je následně zkontrolován elektroforeticky na agarózovém gelu. Gel se připraví smícháním 100 ml 1% roztoku TBE s 2,5 g agarózy a dá se zahřát na 3 min do mikrovlnné trouby, dále se pracuje ve flowboxu, kde se přidá 17 μl ethylium bromidu a směs se nalije na předem připravenou formu s hřebínky a nechá se zatuhnout.

Gel se ponoří do elektroforetické vany a do jednotlivých jamek gelu se vkládá směs 5 μl barviva bromfenolové modři a 5 μl DNA. Vlastní elektroforéza pak probíhá při napětí 120 V po dobu 45 min. Následuje vizualizace vzorků pod UV světlem a výsledek se zaznamená pomocí fotografie.

Po provedení kontrolní agarózové elektroforézy pro stanovení přítomnosti PCR produktu se ukáže, které vzorky obsahují namnoženou DNA a u jakých vzorků se musí zopakovat celý postup.

4.2.6 RFLP

Do vzorků, u nichž kontrolní elektroforéza potvrdila přítomnost PCR fragmentů, se přidá restriční endonukleáza (restriktáza) *HinPI* a reakční směs se následně inkubuje přes noc při 37 °C.

Následná genotypizace se provede elektroforézou na 3,5% agarózovém gelu. Pro přípravu gelu se smíchá 100 ml 1% roztoku TBE s 3,5 g agarózy a zahřeje se 3 min v mikrovlnné troubě: Následně se ve flowboxu přidá 17 μ l ethylium bromidu a vše se nalije na předem připravenou formu s hřebínky a nechá se ztuhnout.

Do elektroforetické vany se ponoří gel a do jednotlivých jamek gelu se vkládá směs 5 μ l barviva bromfenolové modři a 5 μ l DNA. Elektroforéza probíhá při napětí 100 V po dobu 60 min. Na základě vizualizace vzorků pod UV světlem se výsledek zaznamená pomocí fotografie, ze které se provede genotypizace.

4.3 Frekvence alel a genotypů

Frekvence (četnost) vyjadřuje pravděpodobnost výskytu. Pro jednoduchost se aplikuje model lokusu se dvěma alelami, značené písmeny „A“ a „a“ → 3 genotypy. Rozsah populace znázorňuje písmeno „N“. Rozlišují se frekvence absolutní (velká písmena) a frekvence relativní (malá písmena). V případě genu *RYR1* se používají písmena „N“ a „n“, proto byl rozsah populace označen jako N_p .

Pro výpočet frekvence alel a genotypů byly použity následující vzorce:

			<u>Součet</u>
Alely	N	n	
<u>Absolutní frekvence</u>	$P = 2D + H$	$Q = 2R + H$	$P + Q = 2N_p$
<u>Relativní frekvence</u>	$p = \frac{2D + H}{2N_p} = \frac{P}{2N_p}$	$q = \frac{2R + H}{2N_p} = \frac{Q}{2N_p}$	$p + q = 1$
	nebo	nebo	
	$p = d + \frac{1}{2}h$	$q = r + \frac{1}{2}h$	

				<u>Součet</u>
Genotyp	NN	Nn	nn	
<u>Absolutní frekvence</u>	D	H	R	$D + H + R = N_p$
<u>Relativní frekvence</u>	$d = \frac{D}{N_p}$	$h = \frac{H}{N_p}$	$r = \frac{R}{N_p}$	$d + h + r = 1$

Kde: D, d – dominantní homozygoti

H, h – heterozygoti

R, r – recesivní homozygoti

4.4 Vztah mezi genotypem a projevem PSE

K vyhodnocení vztahu mezi jednotlivými genotypy a projevem PSE byl použit statistický program Microsoft Minitab 15.1. V programu se použila jednocestná funkce ANOVA (One-way Analysis of variance).

Pomocí této funkce byla ověřena pravdivost P nulové hypotézy H_0 – jednotlivé stupně PSE (1, 2, 3) jsou podmíněny jednotlivými genotypy ($NN \rightarrow$ bez PSE, $Nn \rightarrow$ slabé PSE, $nn \rightarrow$ výrazné PSE). Pokud vyjde hodnota $P < 0,05$ lze s 95% spolehlivostí hypotézu H_0 zamítnout, v opačném případě hypotéza platí.

Ve statistickém programu Microsoft Minitab 15.1 byly funkcí ANOVA použity následující vzorce:

Stupeň volnosti

$$N = n - 1$$

Suma všech čtverců

$$SS = \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Rozptyl

$$s^2 = \frac{SS}{N}$$

F-hodnota

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

P-hodnota

$$P = 1 - f(F)$$

Kde: n – počet faktorů

x_i – hodnota znaku i

\bar{x} – aritmetický průměr znaků ve skupině

s_1, s_2 – rozptyl první a druhé skupiny

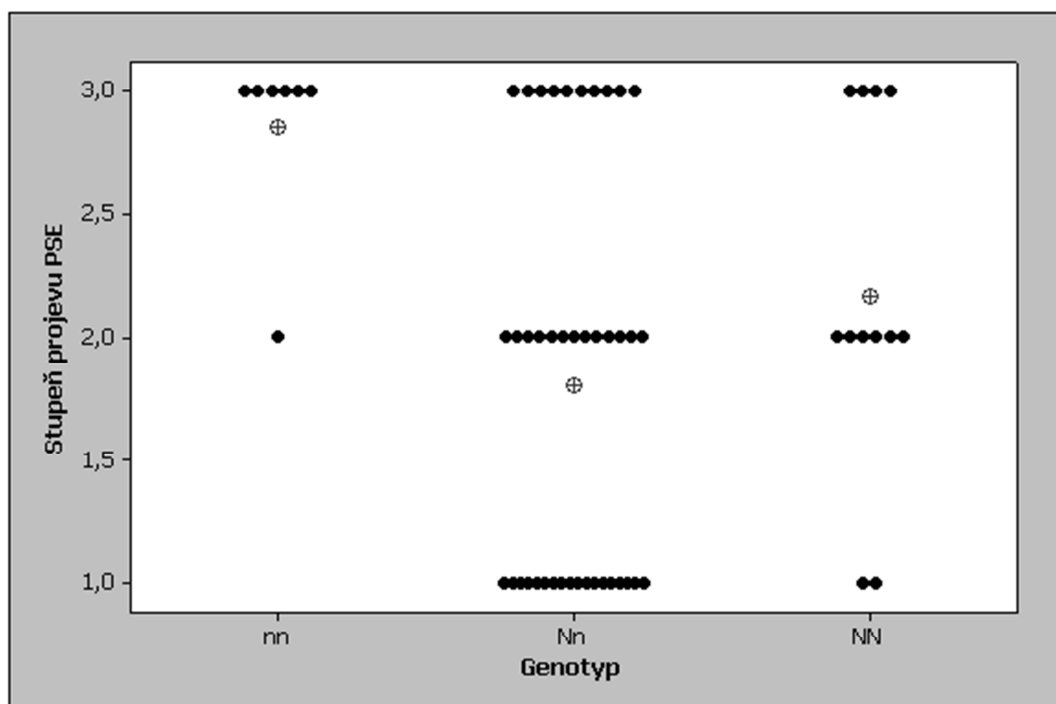
5. Výsledky

Zvolenou metodikou bylo určeno ze souboru 60 plemeníků českého bílého ušlechtilého plemene 12 dominantních homozygotů, 41 heterozygotů a 7 recesivních homozygotů. Rozdělení jednotlivých genotypů v jednotlivých kategoriích s ohledem na projev PSE je uveden v tabulce č. 2.

Pořadí vzorku	Genotyp	Bez projevu PSE	Pořadí vzorku	Genotyp	Slabý projev PSS	Pořadí vzorku	Genotyp	Výrazný projev PSE
1	<i>Nn</i>	1	21	<i>NN</i>	2	41	<i>Nn</i>	3
2	<i>Nn</i>	1	22	<i>Nn</i>	2	42	<i>Nn</i>	3
3	<i>Nn</i>	1	23	<i>Nn</i>	2	43	<i>Nn</i>	3
4	<i>Nn</i>	1	24	<i>Nn</i>	2	44	<i>nn</i>	3
5	<i>Nn</i>	1	25	<i>Nn</i>	2	45	<i>Nn</i>	3
6	<i>Nn</i>	1	26	<i>Nn</i>	2	46	<i>Nn</i>	3
7	<i>Nn</i>	1	27	<i>Nn</i>	2	47	<i>Nn</i>	3
8	<i>NN</i>	1	28	<i>Nn</i>	2	48	<i>nn</i>	3
9	<i>Nn</i>	1	29	<i>NN</i>	2	49	<i>nn</i>	3
10	<i>Nn</i>	1	30	<i>NN</i>	2	50	<i>Nn</i>	3
11	<i>Nn</i>	1	31	<i>NN</i>	2	51	<i>Nn</i>	3
12	<i>Nn</i>	1	32	<i>Nn</i>	2	52	<i>nn</i>	3
13	<i>Nn</i>	1	33	<i>Nn</i>	2	53	<i>NN</i>	3
14	<i>Nn</i>	1	34	<i>Nn</i>	2	54	<i>NN</i>	3
15	<i>Nn</i>	1	35	<i>NN</i>	2	55	<i>nn</i>	3
16	<i>Nn</i>	1	36	<i>Nn</i>	2	56	<i>nn</i>	3
17	<i>Nn</i>	1	37	<i>Nn</i>	2	57	<i>Nn</i>	3
18	<i>Nn</i>	1	38	<i>nn</i>	2	58	<i>Nn</i>	3
19	<i>Nn</i>	1	39	<i>Nn</i>	2	59	<i>NN</i>	3
20	<i>NN</i>	1	40	<i>NN</i>	2	60	<i>NN</i>	3

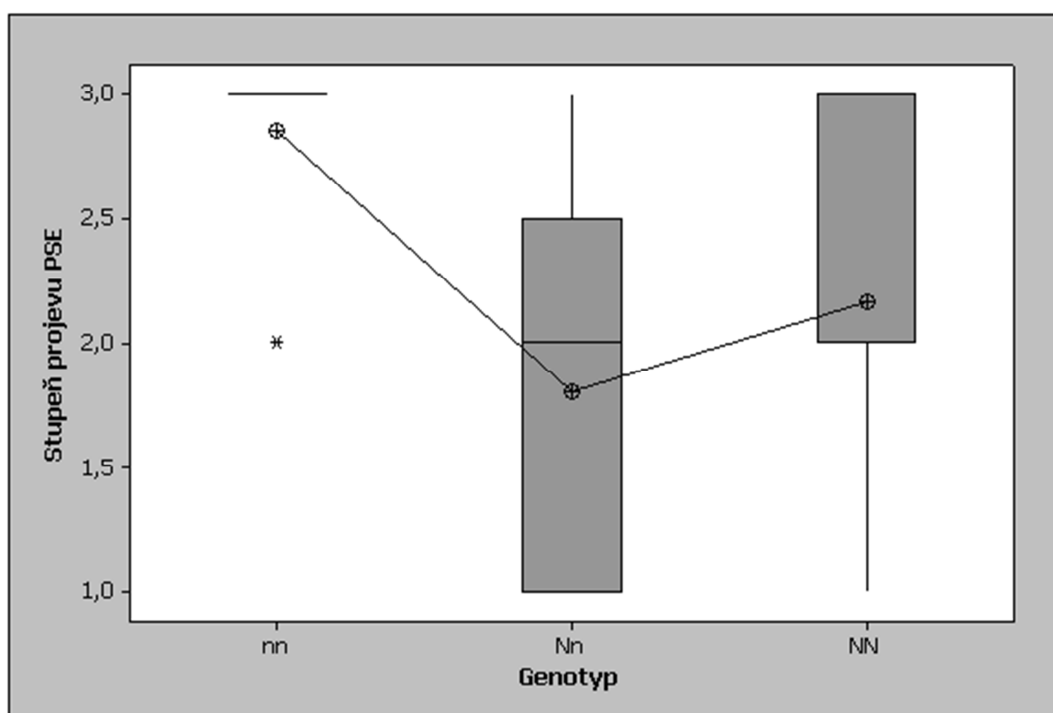
Tabulkač. 2 Přehled zjištěných genotypů a projevů PSE

Graf č. 1 znázorňuje rozložení získaných dat společně s aritmetickým průměrem projevů PSE masa u jednotlivých genotypů. Všichni zástupci *nn* genotypu, kromě jednoho, měli 3. stupeň projevu PSE a aritmetický průměr genotypu *nn* se tedy blíží hodnotě 3,0. U genotypu *Nn* se projev PSE nerovnoměrně snižoval od 1. stupně po 3. stupeň, z grafu pak vyplývá, že aritmetický průměr genotypu *Nn* dosahuje hodnoty mírně pod 2,0. Genotyp *NN* byl nejvíce zastoupen ve 2. stupni projevu PSE a jeho aritmetický průměr v grafu přesahuje hodnotu 2,0.



Graf č. 1 Zjištěná závislost mezi stupněm projevu PSE a genotypem

Na grafu č. 2 je viditelné, kromě aritmetického průměru projevů PSE masa u jednotlivých genotypů, jako v předešlém grafu, také rozložení získaných dat pomocí krabicových diagramů. U genotypu *nn* se vyskytoval, až na jednoho jedince, 3. stupeň projevu PSE a jeho rozptyl je tedy v grafu téměř nulový. Rozptyl genotypu *Nn* nabývá hodnot mezi 1,0 a 2,5, což vyplynulo z postupného snižování počtu genotypů *Nn* od 1. k 3. stupni projevu PSE. Genotyp *NN* byl nejvíce zastoupen ve 2. a nejméně v 1. stupni projevu PSE, a proto je jeho rozptyl v grafu znázorněn v rozpětí hodnot 2,0 a 3,0.

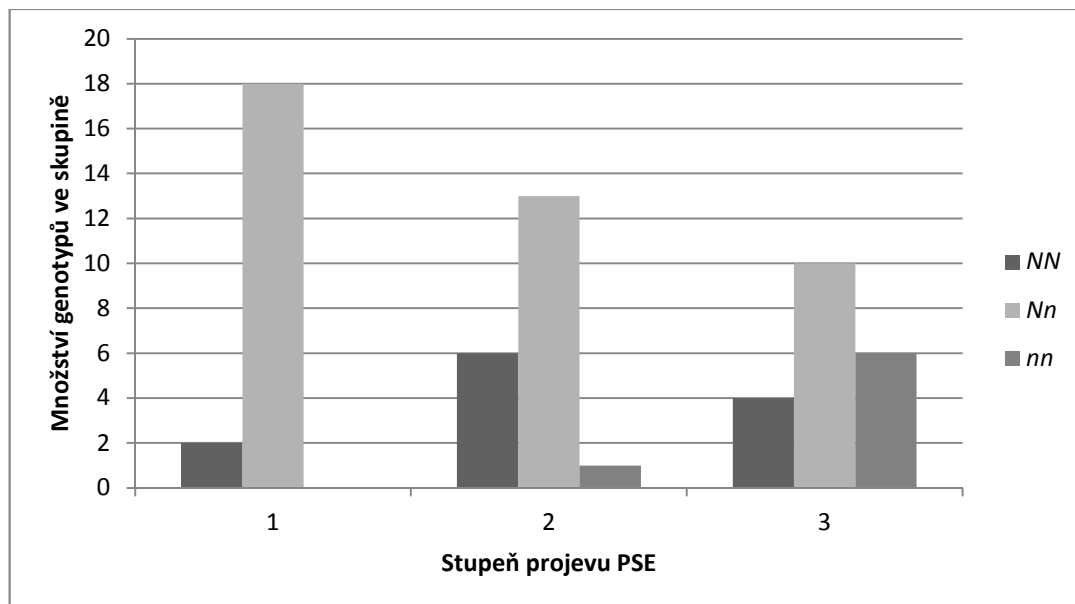


Graf č. 2 Rozložení změřených výsledků pomocí krabicových diagramů

Z tabulky č. 3 a následného grafu č. 3 vyplývá, že ve skupině projevu 1. stupně PSE (tj. bez příznaků) se nevyskytoval žádný recesivní homozygot *nn*. Počet jedinců s heterozygotním genotypem *Nn* byl u této skupiny 18 a počet dominantních homozygotů *NN* byl pouze 2. Ve skupině projevu 2. stupně PSE (tj. slabý projev) se objevilo také nejvíce heterozygotů – 13 jedinců, dominantní homozygoti zde měli svoje nejpočetnější zastoupení ze všech 3 skupin – 6 jedinců a recesivní homozygot byl v této skupině pouze 1. Genotyp *nn* měl nejvíce jedinců - 6 ve skupině projevu 3. stupně PSE (tj. výrazný projev), genotyp *Nn* se tady projevil počtem 10 jedinců a genotyp *NN* počtem 4 jedinců.

	1. stupeň projevu PSE	2. stupeň projevu PSE	3. stupeň projevu PSE
Genotyp <i>NN</i>	2	6	4
Genotyp <i>Nn</i>	18	13	10
Genotyp <i>nn</i>	0	1	6

Tabulka č. 3 Přehled početního zastoupení genotypů v jednotlivých stupních projevu PSE



Graf č. 3 Grafické znázornění hodnot z tabulky č. 3

Postupem, uvedeným v metodice, byla zjištěna relativní frekvence alel a genotypů. Alela *N* měla relativní frekvenci 54 % a alela *n* 46 %. Jednotlivé genotypy byly v populaci zastoupeny v následujících procentech - *NN* 20 %, *Nn* 68 % a *nn* 12 %.

Jednocestnou funkcí ANOVA byla vygenerována tabulka č. 4, ve které je důležitá pouze P-hodnota. Z tabulky vyplývá, že se P-hodnota rovná 0,004, což je menší než 0,05, proto lze předpokládanou počáteční hypotézu H_0 zamítnout. Platí tedy hypotéza H_1 , že jednotlivé stupně PSE nejsou u zkoumané populace podmíněné jednotlivými genotypy.

Znak	<i>N</i>	SS	s^2	<i>F</i>	<i>P</i>
Genotypy	2	7,037	3,519	6,08	0,004
Rezidua	57	32,963	0,578		
Celkem	59	40,000			

Tabulka č. 4 Přehled výsledků funkce ANOVA

Tato studie 60 jedinců plemene české bílé ušlechtilé ukázala, že 12 z nich bylo dominantních homozygotů, 41 heterozygotů a 7 recesivních homozygotů. Z toho první stupeň PSE masa měli pouze dominantní homozygoti a heterozygoti, kde genotyp *NN* byl zastoupen 2 a *Nn* 18 jedinci. Druhým stupněm se projeví všechny tři genotypy – *NN* 6, *Nn* 13 jedinců a *nn* 1 jedinec. Ve třetím stupni se nacházely také všechny tři genotypy – *NN* 4, *Nn* 10 a *nn* 6 jedinců. Z výše uvedeného vyšlo, že frekvence alely *N* byla 54% a *n* 46%. Frekvence jednotlivých genotypů se podílely následujícími procenty: *NN* 20 %, *Nn* 68 % a *nn* 12 %. Statistickým vyhodnocením vyšla P-hodnota 0,004, což vedlo k zamítnutí hypotézy H_0 . Ze získaných dat tedy vyplynulo, že vznik různého stupně PSE masa nebyl u zkoumané populace jednoznačně podmíněn genotypy. Důležitou roli při vzniku PSE masa tedy hrál také vliv vnějšího prostředí – stresu.

6. Diskuze

Výskyt jednotlivých stupňů PSE masa u zkoumané populace 60 plemeníků českého bílého ušlechtilého plemene nebyl jednoznačně podmíněn projevem genu *RYR1*.

Fujii *et al.* (1991) jako první identifikoval mutaci na prasečím *RYR1*, která je spojena s rostoucím obsahem libového masa u prasat, ale také s maligní hypertemií (stresovým syndromem prasat). De Smet *et al.* (1996), Hamilton *et al.* (2000) a Sellier *et al.* (1998) se shodli na tvrzení, že tyto výsledky více ovlivňují vznik PSE masa u prasat s genotypem *Nn* a *nn* v porovnání s dominantními homozygoty (*NN*), kteří jsou negativní. Monin *et al.* (1999) zjistil negativní ovlivnění jemnosti masa alelou *n* *RYR1*.

Rybarczyk *et al.* (2010) se zabýval vztahem mezi polymorfismem *RYR1* a kvalitou kosterní svaloviny, zvláště pak u křížených prasat plemena Pietrain. Významné rozdíly v kvalitě jatečného masa mezi genotypy *CC* (*NN*) a *CT* (*Nn*) na lokusu *RYR1* neodhalil. Výsledky od několika autorů, kteří se zabývali studiem kvality jatečného masa ve stejných genotypech, nejsou jednoznačné. Busk *et al.* (2000) uvedl, že jatečná těla prasat *CT* obsahovala více libového masa s horší kvalitou ve srovnání s prasaty *CC*. Kusec *et al.* (2005) nepozoroval významné rozdíly v řeznické hodnotě jatečně upravených těl mezi prasaty s *CC* a *CT* genotypem. Autoři však zjistili, že kvalita masa heterozygotů byla horší. Také Krzeczio *et al.* (2005) a Kuhn *et al.* (2005) pojednávali o horší kvalitě masa získané z *CT* prasat. Na druhé straně Koćwin-Podsiadla *et al.* (2003) nenašel významné rozdíly v kvalitě masa mezi pojednávanými genotypy *RYR1*.

Otto *et al.* (2006) shromáždil informace o vztahu fenotypů a kvalitě vepřového masa u 1155 tržních prasat. Hlavním objektem studie bylo zkoumání vlivu několika genetických markerů na kvalitu masa v reprezentativním vzorku tržních prasat německých jatek. Bylo zjištěno, že polymorfismus *RYR1* má největší vliv na kvalitu masa ze všech sledovaných markerů. Každý heterozygot přenáší recesivní *RYR1* pro citlivost na stres, což má negativní dopad na kvalitu masa. Heterozygotní prasata vykazovala menší výtěžnost skoro ve všech vlastnostech kvality masa v porovnání s homozygoty odolnými na stres.

Maagdenberg *et al.* (2007) zkoumal účinek otcovské alely *IGF-II* na vlastnostech kvality jatečného masa u genotypů *Nn* a *NN* *RYR1*. Zjistil, že genotyp *RYR1* má více negativní účinek na kvalitu masa než mutace *IGF-II*. Zabýval se také rolí

genu *RYR1* v přetěžování metabolismu *postmortem* a zjistil zvýšený výskyt Ca^{2+} , což urychluje metabolismus *postmortem*, a to urychluje metabolismus uhlohydrátových rezerv v souladu s vývojem PSE.

Výsledky analýzy zkoumané populace naprosto neodpovídají výsledkům ostatních autorů, což vyplývá z předešlých informací. Tato skutečnost může být podpořena faktem, že předchozí studie byly prováděny na jiných plemenech prasat a významnou roli zde mohla hrát i plemenná predispozice. Nicméně by bylo potřeba tyto domněnky doplnit dalšími srovnávacími studiemi.

7. Závěr

Cílem diplomové práce bylo provést genotypizaci 60 plemeníků plemene české bílé ušlechtilé, u *RYS1* určit frekvenci alel *N*, *n* a frekvenci genotypů *NN*, *Nn* a *nn*. A také statisticky vyhodnotit vztah mezi genotypem a projevem PSE. Z výsledků vyplynulo, že vliv projevu genu *RYS1* u tohoto plemene na vznik různého stupně PSE masa není zcela průkazný.

Z diskuze je patrné, že problematikou genu *RYS1* a s ním souvisejícími problémy s kvalitou jatečného masa se neustále zabývá spousta prací. V literatuře různých tvůrců se pojednává také o jiných vlivech na kvalitu masa, ale všechny jsou finálně spojeny s *RYS1*, který má největší váhu. Autoři se vesměs shodují ve tvrzení, že vznik PSE masa je mnohem častější u prasat s genotypem *Nn* a *nn* v porovnání s dominantními homozygoty (*NN*). Ale v některých dalších výrocích se jejich názory rozcházejí, jako například, že jsou nebo naopak nejsou podstatné rozdíly v kvalitě masa mezi genotypy *NN* a *Nn*.

Pro chovatele českého bílého ušlechtilého plemene vyplývá z výsledků této práce doporučení - jestliže je provedena genotypizace jedinců na náchylnost ke vzniku některého stupně PSE masa, není tato genotypizace průkazným důkazem o pozdějším projevu PSE masa, ale má pouze informační charakter. Na vzniku PSE masa má také v určité míře vliv stres. Rozhodující je doba před porážkou a těsně po porážce. Proto je důležité udržovat zvířata v klidu při přepravě na jatka, zajistit jim dostatečný přísun vody a tím snížit riziko výskytu PSE masa.

Problematikou kvality vepřového masa, jež ovlivňují faktory genetické, negenetické nebo propojení obou těchto případů, se zabývalo, zabývá a bude zabývat nadále spousta studií, jelikož hlavním cílem je snižovat náklady a při tom maximalizovat možný ekonomický zisk na trhu s vepřovým masem.

8. Seznam zkratek

ANOVA	Analysis of variance (analýza rozptylu)
APS	persulfát amonný
ATP	adenosintrifosfát
CRC	gen vápníkového kanálu
ČBU	české bílé ušlechtilé plemeno
DFD maso	Dark Firm Dry (tmavé, tuhé, suché) maso
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTP's	2'-deoxynucleoside triphosphates
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (polyaminokarboxylová kyselina)
EtBr	ethidium bromid
<i>HAL</i>	halotanový gen
MAS	Marker Assisted Selection (markery asistovaná selekce)
PAGE	polyakrylamidový gel
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PSE maso	Pale Soft Exudative (bledé, měkké, vodnaté) maso
PSS	Porcini Stress Syndrome (stresový syndrom prasat)
QTL	Quantitative Trait Locus (lokus pro kvantitativní znak)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (polymorfismus délky restrikčních fragmentů)
<i>RYR1</i>	Ryanodine Receptor (gen ryanodinového receptoru)
SAS	sympatiko-adrenergní systém
TAE	Tris-Acetate-EDTA
TBE	Tris-Borate-EDTA
TEMED	tetrametylendiamin

9. Seznam použité literatury

1. AREY, Dale a Phil BROOKE. Animal welfare aspects of good agricultural practice: pig production [online]. Petersfield, Hampshire: Compassion in World Farming Trust, 2006 [cit. 2012-03-09]. ISBN 19-001-5638-5. Dostupné z: www.ciwf.org.uk/includes/documents/cm_docs/2008/g/gap_book.pdf
2. Atlas plemen hospodářských zvířat. Střední škola obchodu a služeb Jihlava [online]. 2003 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: www.sous.ji.cz/pages/sipvz/stahni.php?soubor=552.pps
3. BÁRTOVÁ, Eva. RFLP – restriční reakce. Molekulární biologie [online]. VFU Brno, 2011 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: opvk2011.ptacisvet.cz/?title=popis_metod-rflp&lang=cz
4. BATTERSBY, Colin a Karen BATTERSBY. Post-mortem Changes in Meat. Murrellen Pork [online]. 1999 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: www.murrellenspork.co.nz/Science%20PostMortem%20Changes%20in%20Me.htm
5. BRASCAMP, E.W. et al. PigNews and Information, 1995, 16:41N-46N
6. BRODY, J.R. a S.E. KERN. History and principles of conductive media for standard DNA electrophoresis. *AnalBiochem.* 2004, č. 1, s. 1-13.
7. BUSK, H., A. KARLSSON, S. H. HERTEL. 2000. Halothane gene effect on carcass and meat quality by use of Duroc x Pietrain Boars. In: WENK, C., J. A. FERNANDEZ, M. DUPUIS (eds.). Quality of meat and fat in pigs as affected by genetics and nutrition (pp.129-123). *Proceedings of the joint session of the EAAP commissions on pig production, animal genetics and animal nutrition*, Zurich, Switzerland, Wageningen Pers. Wageningen, The Netherlands.

8. DE SMET, S., H. PAUWELS, S. DE BIE, D. DEMEYER, J. CALLEWIER a W. EECKHOUT. Effect of halothane genotype, breed, feed with drawal, and lairage on pork quality of belgian slaughter pigs. *Journal of Animal Science*. 1996, roč. 74, č. 8, s. 1854-1863.
9. DRAŽAN, Jaroslav, et al. *Nemoci prasat*. 1. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1987. 240 s.
10. DVOŘÁK, J., I. VRTKOVÁ, D. HRUŠKA a M. COUFALOVÁ. Genetické markery pro masnou užitkovost prasat. Ústav genetiky - Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Brno, 1999.
11. DVOŘÁK, J., J. BULLA a S. ČEPIKA. Uplatnění molekulární genetiky ve šlechtění zvířat. In: XVII. genetické dny. Zborník abstrakt ov. Brno: MZLU, 1996, s. 11-15.
12. Elektroforetická vana. Ústav biologie Lékařské fakulty [online]. 2008 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: biologie.upol.cz/metody/Slovník/Elektroforetická%20vana.htm
13. Elektroforéza. Biochemical web [online]. 2004 [cit. 2012-03-02]. Dostupné z: biochemie.sweb.cz/x/metody/elektroforeza.htm#princip
14. FUJII, J, K OTSU, F ZORZATO, S DE LEON, V. KHANNA, J. WEILER, P. O'BRIEN a D. MACLENNAN. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*. 1991-07-12, roč. 253, č. 5018, s. 448-451. ISSN 0036-8075. DOI: 10.1126/science.1862346.
15. GELDERMANN, H., E. MÜLLER, P. BEECKMANN, C. KNORR, G. YUE a G. MOSER. Mapping of quantitative-trait loci by means of marker genes in F2 generations of Wild Boar: Piétrain and Meishan pigs. *J. Anim. Bredd. and Genet.*

16. GUIMARÃES, Elcio P. Marker-assisted selection: current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2007, 471 s. ISBN 92-510-5717-6.
17. HAMILTON, D. N., M. ELLIS, K. D. MILLER, F. K. MCKEITH a D. F. PARRETT. The effect of the Halothane and Rendement Napole genes on carcass and meat quality characteristics of pigs. *Journal of Animal Science*. 2000, roč. 78, č. 11, s. 2862-2867.
18. HUMPOLÍČEK, Petr. Genoservis [online]. 22.02.2005 [cit. 2011-11-02]. Perspektivní markery v chovu prasat. Dostupné z: www.genoservis.cz/cz/poradenstvi/clanky/slechtene-prasat/226-perspektivni-geneticke-markery-v-chovu-prasat
19. CHAMBERS, Philip G., Temple GRANDIN, Gunter HEINZ a Thinnarat SRISUVAN. Effects of stress and injury on meat and by-product quality. FAO CORPORATE DOCUMENT REPOSITORY [online]. 4. vyd. 2001 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: www.fao.org/DOCREP/003/X6909E/x6909e04.htm#TopOfPage
20. Chov zvířat II. Česká zemědělská univerzita [online]. 2008 [cit. 2012-04-04]. Dostupné z: www.cathleen.wz.cz/chovzviratII/cvika/8.doc
21. INGR, Ivo. Atypické zrání a kažení masa. Český svaz zpracovatelů masa [online]. 2003 [cit. 2012-03-12]. Dostupné z: www.cszm.cz/clanek.asp?typ=1&id=895
22. KOĆWIN-PODSIADŁA, M., J. KURYŁ, E. KRZĘCIO, A. ZYBERT a W. PRZYBYLSKI. The interaction between calpastatin and RYR1 genes for some pork quality traits. *Meat Science*. 2003, roč. 65, č. 2, s. 731-735. ISSN 03091740. DOI: 10.1016/S0309-1740(02)00275-9.

23. KOČÁREK, Eduard. *Výukové materiály z lékařské biologie a genetiky* [online]. 2003 [cit. 2011-10-11]. Přírodovědecká fakulta. Dostupné z: camelot3.lf2.cuni.cz/turnovec/ublg/vyuuka/prf/Cytogenetika_cloveka_PrFUK_3.ppt
24. KRZĘCIO, E., J. KURYŁ, M. KOĆWIN-PODSIADŁA a G. MONIN. Association of calpastatin (CAST/Mspl) polymorphism with meat quality parameters of fatteners and its interaction with RYR1 genotypes. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2005, roč. 122, č. 4, s. 251-258. ISSN 0931-2668. DOI: 10.1111/j.1439-0388.2005.00517.x.
25. KŘENKOVÁ, Leona. Vztah polymorfismů kandidátních genů k proměnlivosti produkce a kvality masa prasat. Brno, 1999. 139 s. Dizertační práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Agronomická fakulta.
26. KUHN, G., I. FIEDLER, K. ENDER a W. MATTES. Kuhn, Duroc and Pietrain breedings in comparison. *Fleischwirtschaft*. roč. 85, s. 92-96.
27. KUSEC, G., U. BAULAIN, M. HENNING, P. KÖHLER a E. KALLWEIT. Fattening, carcass and meat quality traits of hybrid pigs as influenced by MHS genotype and feeding systems. *Archiv Tierzucht Dummerstorf*. 2005, roč. 48, s. 40-49.
28. LEPECQ, J.B. a C. PAOLETTI. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleicacids.: Physical-chemical characterization. *J Mol Biol*. 1967, č. 27, s. 87-106.
29. MONIN, G., C. LARZUL, P. LE ROY, J. CULIOLI, J. MOUROT, S. ROUSSET-AKRIM, T. TALMANT, C. TOURAILLE a P. SELLIER. Effects of the halothane genotype and slaughter weight on texture of pork. *Journal of Animal Science*. 1999, roč. 77, č. 2, s. 408-415.
30. MUDRÁKOVÁ, Dominika. *Sledování chromosomových změn u dětí s vrozenými vývojovými vadami*. Brno, 2008. 69 s. Bakalářská práce. Masarykova univerzita, Lékařská fakulta. Dostupné z: is.muni.cz/th/175603/lf_b/Bakalarka-zacatek.doc

31. MUSILOVÁ, Dagmar. Kongenitální choroby prasat. České Budějovice, 2010. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, Katedra genetiky, šlechtění a výživy. Vedoucí práce Ing. Lenka Hanusová, Ph.D.
32. NUSSBAUM, Robert L., Roderick R. MCINNES a Huntington F. WILLARD. Klinická genetika. 6. Praha: TRITON, 2004. ISBN 80-7254-475-6.
33. OTTO, G., R. ROEHE, H. LOOFT, L. THOELKING, P.W. KNAP, M.F.ROTHSCHILD, G.S. PLASTOW a E. KALM. Associations of DNA markers with meat quality traits in pigs with emphasis on drip loss. Meat Science. 2007, roč. 75, č. 2, s. 185-195. ISSN 03091740. DOI: 10.1016/j.meatsci.2006.03.022.
34. PRŮŠA, Richard. Základy analytických metod v klinické molekulární biologii [online]. 1. vyd. Praha: Lambda Bio-Med, 1997, 45 s. [cit. 2012-03-01]. ISBN 80-238-0940-7. Dostupné z: www.lf2.cuni.cz/projekty/prusa-DNA/newlook/defa12.htm
35. PŘIBYL, J. Využití markerů při selekci hospodářských zvířat. Živočišná Výroba. 1995, roč. 8, č. 40, s. 375-382.
36. RYBARCZYK, Artur, Marek KMIEĆ, Roman SZARUGA, Filip NAPIERALA a Arkadiusz TERMAN. Theeffect of calpastatin and its interaction with RYR1 genotypes on carcass and meat quality of cross bred pigs. AGRICULTURAL AND FOOD SCIENCE. 2010, 19., č. 3, s. 294-301.
37. SAMBRAUS, Hans Hinrich. Atlas plemen hospodářských zvířat: skot, ovce, kozy, koně, osli, prasata: 250 plemen. Vyd. v češtině 1. Praha: Brázda, 2006, 295 s. ISBN 80-209-0344-5.
38. SELLIER, P. Genetics of meat and carcass traits. In: ROTHCHILD, Max Frederick and Anatoly RUVINSKY (eds.). The genetics of the pig (pp. 463-510). New York, NY, USA: CAB International, 1998. ISSN 0-85199-229-3.

39. SNUSTAD, D a Michael J SIMMONS. Genetika. 5th ed. Překlad Jiřina Relichová. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 871 s. ISBN 978-802-1048-522.
40. STELLWAGEN, N. C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis* 1. 2009, s. 188-195.
41. Stres. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-04-23]. Dostupné z: cs.wikipedia.org/wiki/Stres
42. ŠÍPEK, Antonín, et al. *Vrozené vady* [online]. c2008-2011 [cit. 2011-10-11]. Vrozené vývojové vady. Dostupné z: www.vrozene-vady.cz/vrozene-vady
43. ŠÍPEK, Antonín. *Genetika - Biologie* [online]. c2010-2011 [cit. 2011-10-11]. Mutace. Dostupné z: www.genetika-biologie.cz/mutace
44. ŠÍPEK, Antonín. *Genetika - Biologie* [online]. c2010-2011 [cit. 2011-10-11]. Polygenní dědičnost. Dostupné z: www.genetika-biologie.cz/polygenni-dedicnost
45. ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno, 2005, 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
46. TVRDOŇ, Zdeněk. *Genoservis* [online]. 06.09.2004 [cit. 2011-11-02]. Náchylnost prasat na stres a kvalita masa. Dostupné z www.genoservis.cz/cz/poradenstvi/clanky/slechtene-prasat/223-nachylnost-prasat-na-stres-a-kvalita-masa
47. *ÚPMD-Podolí* [online]. c2004-2011 [cit. 2011-10-11]. Vrozené vývojové vady. Dostupné z: www.upmd.cz/?lang=cz&category=1-4-11-63-78#monogenne-podminene-vady

48. VAN DEN MAAGDENBERG, K., A. STINCKENS, E. CLAEYS, N. BUYS a S. DE SMET. Effect of the insulin-like growth factor-II and RYR1 genotype in pigs on carcass and meat quality traits. *Meat Science*. 2008, roč. 80, č. 2, s. 293-303. ISSN 03091740. DOI: 10.1016/j.meatsci.2007.12.008.
49. *Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, FVL* [online]. c2008 [cit. 2011-11-02]. Soubory ke stažení.
Dostupné z: www.soubory.vfu.cz/fvl/klinika_chorob_prasat/PSS-stresovy-syndrom.doc
50. VLASTÍK, Tomáš. *Biology.webz.cz* [online]. c2004 [cit. 2011-10-11].
Nukleové kyseliny. Dostupné z: www.biology.webz.cz/nuk.php
51. *Wikiskripta* [online]. 2008, 22.09.2011 [cit. 2011-10-11]. Vrozené vývojové vady. Dostupné z: www.wikiskripta.eu/index.php/Vrozené_vývojové_vady
52. Základní principy kvantitativní real-time PCR (qPCR). GENERI BIOTECH [online]. 2009, 2012 [cit. 2012-02-27].
Dostupné z: www.generi-biotech.com/real-time-pcr-sondy-kvantitativni-real-time-pcr/