

Poglavje 5

Genski test na sindrom maligne hipertermije

Tina Flisar^{1,2}, Gregor Gorjanc¹, Špela Malovrh¹, Irena Ule¹, Milena Kovač¹

Izvleček

Povečani občutljivosti na stres in slabi kvaliteti mesa je deloma vzrok tudi mutacija na genu RyR1. Nosilce mutacije na genu RyR1 odkrivamo z genskim testom na sindrom maligne hipertermije. V Sloveniji test izvajamo od leta 1994. Najbolj občutljivi na stres so recesivni homozigoti (PP), saj imajo spremenjeno obliko gena na obeh kromosomih. Mutirana alela (P) je najpogostejša pri pasmi pietrain, medtem ko imamo pri maternalnih pasmah nizke deleže. Med najodpornejše pasme na stres sodita pasmi duroc in large white. Pri zmanjševanju deleža alele P smo bili uspešni predvsem pri pasmi švedska landrace, large white, nemška landrace in hibridu 54. Zaradi povezave z mesnatostjo, večjih napredkov pri zniževanju frekvence alele P brez vključevanja na stres odpornih linij, ni možno pričakovati.

Ključne besede: prašiči, sindrom maligne hipertermije, stresni sindrom, genski test, rianodinski receptor, RyR1

Abstract

Title of the paper: **Gene test for the malignant hyperthermia-susceptible pigs.**

Mutation in the gene RyR1 leads to increased sensitivity of stress and quality deterioration in meat. The presence of a mutation in the gene RyR1 is identified by gene test for the malignant hyperthermia. In Slovenia, animals have been tested since 1994. The most stress susceptible are recessive homozygotes (PP), because they have changed the form of the gene on both chromosomes. Mutant allele (P) is the most frequent in Pietrain breed, meanwhile frequencies are low in maternal breeds. Duroc and Large White are one of the most stress resistant breeds. We managed to decrease the frequency of allele P in Swedish landrace, Large White, German landrace and hybrid 54. We can not expect large decrease of frequency of mutant gene without including stress-resistant lines, because of the relationship with lean meat content.

Keywords: pigs, malignant hyperthermia, porcine stress syndrome, gene test, ryanodine receptor, RyR1

¹Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko, Groblje 3, 1230 Domžale

²E-pošta: tina.flisar@bfro.uni-lj.si

5.1 Uvod

V zadnjih letih poleg lastnosti, ki določajo prirejo svinjskega mesa, prihajajo do veljave tudi lastnosti kakovosti mesa. To je še posebej pomembno, če želimo doseči višjo dodano vrednost na enoto proizvoda. Kakovost mesa lahko opišemo na več načinov oziroma z več lastnostmi. Ena izmed njih je pojav bledega mehkega in vodenega mesa (BMV). Pojav BMV je močno povezan s sindromom maligne hipertermije pri prašičih (SMH). Pri prašiči občutljivih na stres so večje izgube od rojstva do zakola. Hkrati se pogosteje pojavlja BMV meso, kar lahko znatno zmanjša gospodarnost prireje (Lahucky in sod., 1997). BMV je posledica aktivnega metabolizma v mišicah po zakolu, ki se kaže v spremenjeni maščobni sestavi, nižjem nivoju vitamina E, oksidaciji maščob, zmanjšane vrednosti pH in povečane izgube tekočine zaradi izceje (Nurnberg in sod., 2002).

Sindrom maligne hipertermije, znan tudi pod imenom prašičji stresni sindrom (PSS), je avtosomna recesivna genetska bolezen, ki se izraža s povečanim metabolizmom. Na stres občutljivi prašiči reagirajo na dejavnike stresa s tipičnimi simptomi maligne hipertermije. Klinični znaki bolezni so: povečanje telesne temperature (hipertermija), tresenje, togost mišic, pospešeno dihanje, metabolična acidoza (zakisanje) in povečanje koncentracije ogljikovega dioksida v arterijski krvi (Lahucky in sod., 1997). Na organizem vplivajo tako zunanji kot tudi notranji dejavniki. Genetsko ozadje maligne hipertermije je spremenjen gen RyR1, ki se prepiše v protein kalcijevega kanala na sarkoplazmatskem retikulumu skeletnih mišic (MacLennan in sod., 1990). Gen se pri prašičih nahaja na šestem kromosomu (Davies in sod., 1988). Ime RyR1 je dobil zaradi sposobnosti vezave strupenega rastlinskega alkaloida rianodina. Včasih so gen poimenovali tudi Hal, saj prašiči občutljivi na stres reagirajo na anestetik halotan s simptomi maligne hipertermije. Vzrok bolezni je sprememba (mutacija) oblike gena na mestu, kjer nukleotid s bazo citozin zamenja nukleotid z bazo timin, kar se posledično odraža v spremembi aminokislina arginin v cistein (Fujii in sod., 1991). Mutiran gen tako spremeni protein kalcijevega kanala, kar povzroči, da se kanali ne zapirajo pravočasno in se kalcijevi ioni sproščajo nenadzorovano. Posledica je povečana vezava ionov z beljakovino troponin, kar povzroči intenzivno krčenje mišic.

Uporaba neposrednega genskega testa na sindrom maligne hipertermije omogoča natančno določitev genotipov gena RyR1. Za določanje genotipov uporabljamo PCR-RFLP metodo (Fujii in sod., 1991). Diagnostika, ki temelji na polimorfizmu dolžine restrikcijskih fragmentov (RFLP), v povezavi s polimerazno verižno reakcijo (PCR), ima prednost pred tradicionalnimi metodami (npr. halotanski test), zaradi svoje enostavnosti, zanesljivosti, neinvazivnosti in neodvisnosti rezultatov od okoljskih vplivov ter starosti živali. Na tem lokusu ugotavljamo tri različne genotipe: dominantni homozigotni genotip NN, heterozigotni genotip NP in recesivni homozigotni genotip PP. Poznavanje genotipov je zelo pomembno, saj so raziskovalci (Whittemore, 1993, 21-23) našli razlike v občutljivosti na stres in kvaliteti mesa med posameznimi genotipi. Največja verjetnost, da se bo napaka izražala, je pri recesivnih homozigotih PP, saj imajo le-ti mutirano obliko gena prisotno na obeh homolognih kromosomih. Guardia in sod. (2004) so ugotovili, da je tveganje za pojav BMV mesa pred zakolom štirikrat večje pri recesivnih homozigotih. Največjo odpornost na stres in najmanjše

Tabela 1: Število in delež vzorcev za test na sindrom maligne hipertermije v letu 2003

Farma	Odvzeti vzorci	Analizirani vzorci	Delež analiziranih vzorcev (%)
A	1228	69	5.62
B	1495	182	12.17
C	558	90	16.13
D	369	35	9.49
Skupaj	3650	376	10.30

tveganje za pojav BMV kažejo prašiči genotipa NN. Dedni material (DNK) lahko izoliramo iz kateregakoli tkiva npr. krvi, sperme, tkiva uhljev ali celo iz mešičkov ščetin. Test lahko opravimo že pri pujskih v gnezdu, kar omogoča zgodnjo selekcijo.

V Sloveniji smo poskusno začeli z direktnim genskim testom na SMH v letu 1994 (Šalehar in sod., 1998). Od leta 1995 jemljemo vzorce tkiva uhljev vsem merjascem v preizkusu, ki so odbrani pri vmesni odbiri 60 kg, genski test na SMH pa naredimo tistim, ki so po končanem preizkusu uvrščeni v kakovostne razrede za pleme. Tako zajeti vzorec ni povsem naključen, kljub temu pa nam daje oceno frekvence alel za prihodnjo generacijo. Namen določanja genotipov je spremljanje frekvence alel in morebitna uporaba za selekcijo na slovenskih farmah. Želimo namreč zmanjšati pogostost mutirane alele P, ki je deloma odgovorna za slabo kvaliteto svinjskega mesa. V tem prispevku bomo prikazali pogostost alel pri posameznih genotipih v zadnjih letih.

5.2 Material in metode

Za analizo smo zbrali podatke Republiške selekcijske službe v prašičereji o preizkušnji merjascev v obdobju od 1.1.1994 do 31.12.2003 za štiri selekcijske farme v Sloveniji. Vzorce tkiva smo vzeli iz uhljev in jih shranili do konca preizkusa. Merjascem, ki so bili odbrani v kategorijo dom oz. dom - ohranitev linije, smo določili SMH.

Genske analize izvajamo na Oddelku za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Dedni material iz vzorcev izoliramo z molekularnimi metodami po standardnem protokolu. S polimerazno verižno reakcijo pomnožimo specifičen odsek kromosoma (134 baznih parov), v katerem se nahaja mutacija, kasneje pa produktu dodamo restrikcijski encim HhaI. Encim razreže gen na določenem mestu, ki ga prepozna po zaporedju nukleotidov. Če mesta ne prepozna, ga ne reže. Rezultati restrikcije so tipični odseki DNA. Produkta restrikcije ločimo z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu, kjer različno dolgi odseki gena potujejo z različno hitrostjo, kar omogoča določitev genotipa. Genotipe označujemo z oznakami: NN, NP in PP.

V letu 2003 smo analizirali 376 vzorcev za SMH, kar znaša dobrih 10 % od vseh odvzetih vzorcev (tabela 1). Največ genskih testov za SMH smo opravili na vzorcih s farme B, glede na število odvzetih vzorcev pa je bil delež analiziranih največji na farmi C. Na farmi A je bil

delež analiziranih vzorcev najmanjši. Genski test je bil opravljen za merjasce pasem švedska landrace, large white, nemška landrace, duroc, pietrain in hibrida 54.

Po opravljenih genskih testih smo izračunali deleže posameznih alel. Alela N je normalna oblika, P pa mutirana alela gena RyR1. Na podlagi teh rezultatov smo ovrednotili frekvence alel gena RyR1 po pasmah in posameznih letih in s tem želeli pripraviti pregled uspešnosti selekcije proti mutirani aleli pri posameznih pasmah na farmah. Ugotavljali smo tudi razlike (t-test) v frekvencah mutirane alele med populacijami, ki smo jih analizirali v prvih letih (leti 1994 in 1995 skupaj), ko smo uvedli genski test in jih primerjali s populacijami, analiziranimi v zadnjih letih (leti 2002 in 2003 skupaj).

5.3 Rezultati

Rezultate smo prikazali ločeno za pasmi švedska landrace in large white ter za ostale terminalne genotipe (duroc, pietrain, nemška landrace, large white 66 in hibrid 54). Prikazali smo število analiziranih živali in frekvenco alele P na posameznih farmah v različnih letih. Poleg smo izpisali še stanje pri merjascih v plemenski čredi, ki se je v letu 2003 uporabljala za osemenjevanje.

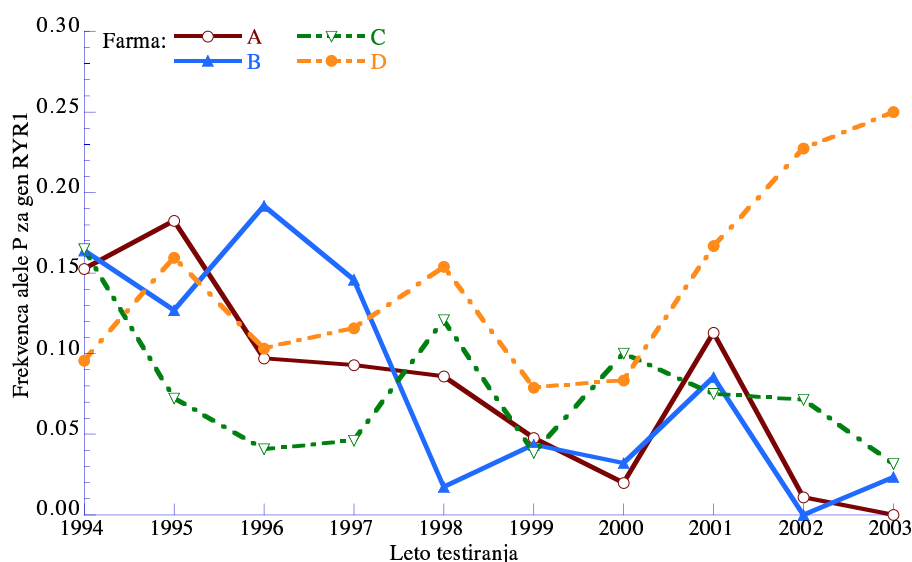
5.3.1 Švedska landrace

Merjasce pasme švedska landrace smo preizkušali na štirih farmah (tabela 2). Frekvenca alele P gena RyR1 je bila v letu 2003 nizka tako na farmi B (2.3 %) kot tudi farmi C (3.1 %). Na farmi A alele P nismo našli. Odstopa farma D, kjer je bila alela P prisotna v 25.0 %, vendar ti rezultati niso dovolj zanesljivi, zaradi majhnega števila analiziranih vzorcev. Za primerjavo podajamo tudi deleže alele P v plemenski čredi merjascev, ki se je v letu 2003 uporabljala za osemenjevanje. Alela P je bila prisotna le na farmi D in sicer kar v 23.8 %, kar zanesljiveje napoveduje večjo pogostnost alele P pri na farmi D.

Tabela 2: Frekvenca alele P gena RyR1 pri pasmi švedska landrace

Farma	Leto										p-vred.
	1994		1995		2002		2003		2003*		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
A	251	15.5	149	18.1	46	1.1	28	0.0	34	0.0	0.0002
B	61	16.4	62	13.7	29	0.0	43	2.3	21	0.0	0.0009
C	98	16.3	84	6.6	35	7.1	16	3.1	10	0.0	0.3007
D	229	9.6	128	13.3	11	22.7	2	25.0	21	23.8	0.0132

n - število analiziranih živali; * - stanje pri merjascih v plemenski čredi v letu 2003; p-vrednost za oceno razlik med leti 1994-1995 in 2002-2003



Slika 1: Frekvenca alele P gena RyR1 pri pasmi švedska landrace

Spreminjanje frekvenca alele P za gen RyR1 s časom (slika 1) je v veliki meri odvisno od izločanja recesivnih homozigotov PP in heterozigotov NP iz populacij. Tako je mogoče sorazmerno hitro zmanjšati frekvenco alele P. Leta 1994 je bil delež mutirane alele razmeroma visok in smo ga s selekcijo uspeli do leta 1999 zmanjšati pod 10.0 % na vseh štirih farmah.

V letu 2001 smo ponovno zasledili višje deleže alele P (slika 1), ki smo jih postopoma uspeli zmanjšati v treh populacijah in s tem deloma zmanjšati občutljivost na stres, kar je za maternalne pasme zelo pomembno. Na farmi D se je frekvenca mutirane alele vztrajno povečevala. Pomembne razlike v frekvencah alele P med populacijami, ki smo jih testirali v obdobju med leti 1994-1995 in 2002-2003, smo ugotovili na treh farmah. Pri farmi C razlike niso bile statistično značilne ($p=0.3007$), verjetno zaradi zmanjšanja frekvenca alele P v letu 1994.

5.3.2 Large white

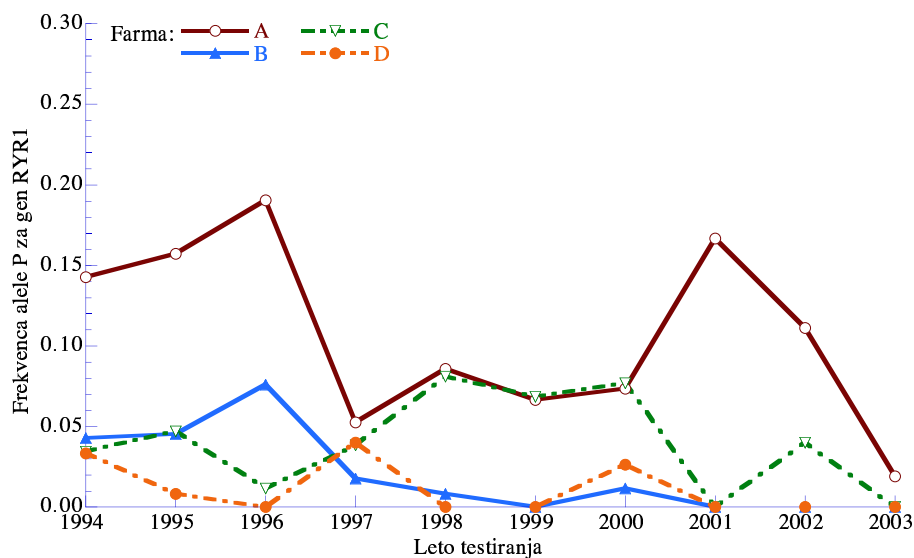
Naši rezultati potrjujejo, da pasma large white spada med manj občutljive pasme na stres, saj je zanjo značilna nizka frekvenca alele P za RyR1 (tabela 3). Med populacijami pasme large white najbolj odstopa farma A, kjer so delež mutirane alele uspeli znižati na 1.9 %. Ostale farme so imele že na začetku nizek delež alele, v zadnjih letih pa je skoraj ne zasledimo več (slika 2). V plemenskih čredah, ki smo jih uporabljali v letu 2003, smo alelo P našli na treh farmah. Največji delež je bil na farmi C (5.6 %). V plemenski čredi na farmi B alele P nismo našli.

Tabela 3: Frekvenca alele P gena RyR1 pri pasmi large white

Farma	Leto										p-vred.
	1994		1995		2002		2003		2003*		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
A	59	16.1	35	15.4	18	11.1	26	1.9	23	4.3	0.0462
B	70	4.3	54	4.6	51	0.0	33	0.0	27	0.0	0.0489
C	29	3.4	60	4.2	25	4.0	19	0.0	9	5.6	0.7010
D	30	3.3	62	0.8	5	0.0	9	0.0	36	1.4	0.2769

n - število analiziranih živali; * - stanje pri merjascih v plemenski čredi v letu 2003; p-vrednost za oceno razlik med leti 1994-1995 in 2002-2003

Začetna visoka frekvenca leta 1994 na farmi A je bila nepričakovana (Šalehar in sod., 1998) in je podobna tisti, ki smo jo zasledili pri populacijah pasme švedska landrace (slika 1). Do leta 1997 so delež mutirane alele na farmi A bistveno zmanjšali, vendar se je v letu 2001 ponovno dvignila na nivo leta 1994. Farmi B in D ohranjata nizko frekvenco alele P, temu pa se je pridružila tudi farma C. Med populacijami analiziranimi med leti 1994-1995 in 2002-2003 so razlike v frekvencah alele P značilne na farmah A in B (p-vrednost 0.0462 in 0.0489).



Slika 2: Frekvenca alele P gena RyR1 pri pasmi large white

5.3.3 Terminalni genotipi

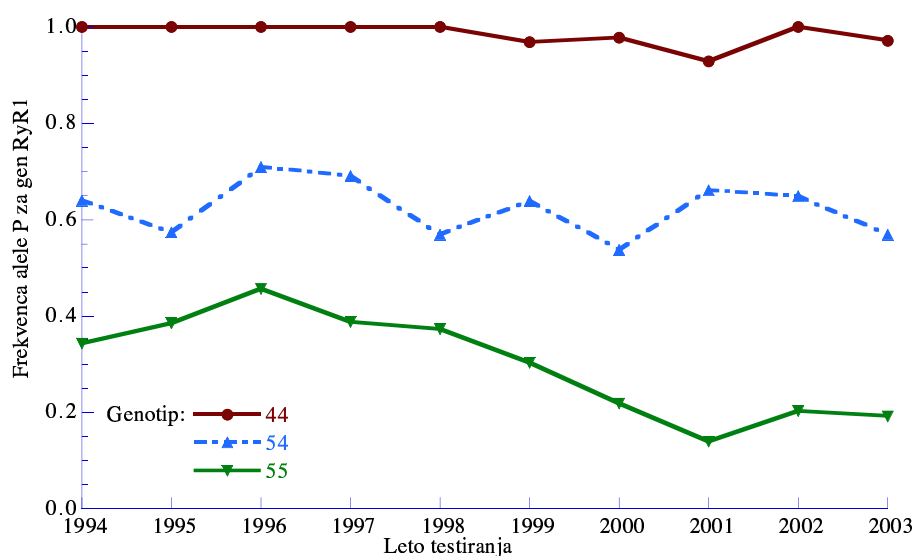
Delež alele P, ki je odgovorna za SMH, je najvišji v populacijah pasem nemška landrace in pietrain (tabela 4). Med analiziranimi pasmami je najbolj odstopala slednja, pri kateri so bili deleži mutirane alele P zelo veliki, saj so bili recesivni homozigoti (genotip PP) najpogostejši. Populacije pasme pietrain smo v letu 2003 imeli na dveh farmah. Na farmi B je bila frekvenca alele P 97.2 %, na farmi D pa 75.0 % (tabela 4). Dominantnih homozigotov (genotip NN), ki so odporni na stres, nismo našli. Frekvenca alele P je bila vsa leta blizu 100.0 %, kar pomeni, da so bili merjasci večinoma recesivni homozigoti glede na gen RyR1 in zato občutljivi na stres. V plemenski čredi, ki se je leta 2003 uporabljala za osemenjevanje, je bil delež alele P na farmi B le 74.1 %, na farmi D pa 64.6 %. Na farmi B ni bilo značilnih razlik v deležu alele P med populacijami merjascev analiziranimi med leti 1994-1995 in 2002-2003 ($p=1.0000$).

Tabela 4: Frekvenca alele P gena RyR1 pri terminalnih genotipih

Farma	Leto										p-vred.
	1994		1995		2002		2003		2003*		
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	
— Duroc —											
A	66	0.0	64	0.0	18	0.0	4	0.0	7	0.0	1.0000
C	42	0.0	82	0.0	35	0.0	55	0.0	20	0.0	1.0000
— Pietrain —											
B	1	100.0	5	100.0	28	100.0	36	97.2	29	74.1	1.0000
D	-	-	-	-	4	62.5	12	75.0	24	64.6	-
— Hibrid 54 —											
B	25	64.0	39	59.0	37	64.9	36	56.9	18	61.1	0.9159
D	-	-	-	-	4	50.0	12	45.8	26	48.1	-
— Nemška landrace —											
A	80	42.5	29	34.5	-	-	-	-	-	-	-
B	172	34.3	129	37.9	32	20.3	34	19.1	12	16.7	0.0008
D	79	22.2	72	17.4	11	27.3	-	-	12	33.3	-
— Large white - 66 —											
A	-	-	-	-	17	0.0	11	0.0	10	0.0	-

n - število analiziranih živali; * - stanje pri merjascih v plemenski čredi v letu 2003; p-vrednost za oceno razlik med leti 1994-1995 in 2002-2003

V letu 2003 smo pasmo nemška landrace testirali le na farmi B, kjer je bil delež alele P 19.1 % (tabela 4). V plemenski čredi na farmi B je bila alela P manj pogosta (16.7 %), medtem ko je bila na farmi D prisotna pri 33.3 % merjascev. Razlike v frekvencah alele P med populacijami analiziranimi med leti 1994-1995 in 2002-2003 so bile značilne ($p=0.0008$).



Slika 3: Frekvenca alele P gena RyR1 pri terminalnih pasmah na farmi B

To dokazuje, da je bila selekcija proti genotipu, ki povzroča SMH, uspešna. V letu 2003 smo analizirali 34 živali, od katerih je bila ena recesivni homozigot glede na gen RyR1, 11 nosilcev mutacije in 22 živali odpornih na stres. Od leta 1994 do 2002 smo to pasmo testirali tudi na farmi D. Začetna frekvenca je bila najvišja na farmi A (42.5 %), a so rejo pasme kasneje opustili. Tudi na farmi B je bila alela P pogosta (34.3 %) in se do leta 1996 pojavljala še pogosteje, vendar so jo do leta 2001 uspešno zmanjšali (slika 3). Na farmi D so do leta 1999 imeli nekoliko nižjo frekvenco alele P. Zaradi zmanjševanja števila preverjenih vzorcev, je frekvenca alele P po letu 2001 precej variirala, zato so rezultati povsem naključni.

Ker je v populacijah križancev med pasmama nemška landrace in pietrain alela P razmeroma pogosta, sklepamo, da so tudi hibridi 54 občutljivi na stres. Delež alele P se pri križancih pojavlja s frekvenco na sredini med izhodiščnima pasmama (slika 3), kar tudi pričakujemo. V letu 2003 smo hibrid 54 preizkušali na dveh farmah. Največji je bil delež heterozigotov (farma B 75.0 % in farma D 58.0 %), ki jih sicer nismo izločali, in tudi lahko prenašajo na potomce-pitance občutljivost na stres in več BMV mesa. V letu 2003 je bila frekvenca alele P višja na farmi B (56.9 %), kar je posledica večjega deleža te alele P pri pietrainu. Na farmi D so frekvenco uspeli zmanjšati na 45.8 %, vendar rezultatov na sliki nismo prikazali, saj je bilo analiziranih le 12 živali. Pri hibridu 54 na farmi B niso bile ugotovljene statistično značilne razlike med frekvencami alele P med populacijama analiziranima med leti 1994 - 1995 in 2002 - 2003 ($p=0.9159$).

Občutljivost na stres smo ugotavljali tudi v populacijah pasme duroc in large white, kjer so bile vse živali, ki smo jih analizirali dominantni homozigoti za gen RyR1 (tabela 4). V letih

od 1994 do 2003 alele P nismo našli, kar dokazuje, da sodita pasmi duroc in large white med najodpornejše pasme na stres.

5.4 Razprava

Mutirana oblika gena RyR1 je pri pasmah različno pogosta, zato je verjetnost, da živali reagirajo na stres s SMH, različna. Verjetnost negativnih posledic je večja pri pasmi pietrain in nemška landrace, saj je delež recesivnih homozigotov in heterozigotov velik (tabela 4). Pri pasmi pietrain smo to pričakovali, saj je znano, da so pasme, ki so selekcionirane na mesnatost, občutljivejše na stres. To je posledica povezave lokusov za mesnatost in SMH. Predvidevajo, da se gen za mesnatost nahaja blizu RyR1 gena in se zato dedujeta skupaj. V preteklosti so z izboljšanjem mesnatosti povečali tudi frekvence te alele. Pasma, ki so imajo večji odstotek mišičnega tkiva, imajo slabšo kvaliteto mesa, ki je deloma posledica SMH. V zadnjih letih prašičerejci poskušajo izločiti mutacijo iz populacij nukleusa, kar ima za posledico manjši delež mesa. Po svetu pasmo pietrain intenzivno selekcionirajo na odpornost na stres in dandanes že obstajajo linije z zelo majhnim deležem genotipa PP. Pri pasmi duroc in large white naj bi bila verjetnost SMH manjša, saj so recesivni homozigoti in heterozigoti zelo redki.

S pomočjo direktnega genskega testa smo živalim določili genotip za gen RyR1, ki je deloma odgovoren za prašičji stresni sindrom. Poznavanje genotipov je zelo pomembno, saj so bile ugotovljene statistično značilne razlike v občutljivosti na stres in kvaliteti mesa med posameznimi genotipi (Lahucky in sod., 1997). Ti avtorji navajajo razlike v lastnostih, ki vplivajo na kvaliteto mesa, med posameznimi genotipi. Ugotovili so zmanjšane vrednosti pH in povečane izgube tekočine zaradi izcejanja v mesu recesivnih homozigotov.

5.5 Zaključki

Ugotovili smo, da imata pasmi pietrain in nemška landrace največjo frekvenco nezaželene alele. Naši rezultati potrjujejo, da sta najodpornejši pasmi duroc in large white, saj v naših populacijah pasme duroc mutirane alele P pri nismo našli, v populacijah pasme large white pa se alela P pojavlja v majhnem deležu. V populaciji pasme large white na farmi A so veliko začetno frekvenco mutirane alele z eliminacijo recesivnih homozigotov uspeli zmanjšati. Ugodne trende smo zabeležili tudi pri populaciji pasme nemška landrace, saj je bil delež mutirane alele na farmi B v primerjavi s predhodnimi leti razmeroma majhen, ter pri populacijah pasme švedske landrace, kjer smo pri treh populacijah delež zmanjšali pod 5 %. Frekvenca alele P je bila pri hibridu 54 pričakovano med frekvencami izhodiščnih pasem. Statistične razlike med populacijami analiziranimi med 1994-1995 in 2002-2003 smo ugotovili pri pasmah švedska landrace (farme A, B in D), large white (farmi A in B) in nemška landrace (farma B), kar kaže na spremembo frekvence, v primerjavi z leti, ko smo selekcijo uvedli. Poznavanje genotipov gena, ki je deloma odgovoren za SMH, je zelo pomembno, predvsem za načrtovanje selekcijskih programov. Pri izločanju te alele lahko zaradi povezave z mesnatostjo pričakujemo tudi manjše genetske napredke pri klavnih lastnostih.

5.6 Viri

- Davies W., Harbitz I., Fries R., Stranzinger G., Hauge J.G. 1988. Porcine malignant hyperthermia carrier detection and chromosomal assignment using a linked probe. *Anim. Genet.*, 19: 203–212.
- Fujii J., Otsu K., Zorzato F., Leon S.D., Khanna V.K., Weiler J.E., O'Brien P.J., McLennan D.H. 1991. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science*, 253: 448–451.
- Guardia M.D., Estany J., Balasch S., Oliver M.A., Gispert M., Diestre A. 2004. Risk assessment of PSE condition due to pre-slaughter conditions and RyR1 gene in pigs. *Meat Sci.*, 67: 471–478.
- Lahucky R., Christian L.L., Kovac L., Stalder K.J., Bauerova M. 1997. Meat quality assessed ante- and post mortem by different ryanodine receptor gene status of pigs. *Meat Sci.*, 47: 277–285.
- MacLennan D.H., Duff C., Zorzato F., Fujii J., Phillips M., Korneluk R.G., Frodis W., Britt B.A., Wortont R.G. 1990. Ryanodine receptor gene is a candidate for a predisposition to malignant hyperthermia. *Nature*, 343: 559–561.
- Nurnberg K., Kuchenmeister U., Jakstadt M., Ender K., Kuhn G., Nurnberg G., Grune T. 2002. Compositional changes in muscle of malignant hyperthermia-susceptible pigs due to postmortem alterations in lipid metabolism, lipid peroxidation and protein oxidation. *J. Food Compos. Anal.*, 15: 283–292.
- Šalehar A., Dovč P., Kovač M. 1998. Frekvence genov RYR1 po pasmah v Sloveniji v letih od 1994 do 1997. *Sodobno kmetijstvo. Priloga: Slovenska prašičereja VIII*, 31: 340–341.
- Whittemore C. 1993. *The science and practice of pig production*. Harlow, Longman Scientific and Technical: 661 str.