

Effekt av enskilda gener på ornelukt och reproduktionsparametrar – Slutrapport

Kerstin Lundström och Galia Zamaratskaia, Inst. för livsmedelvetenskap; **Lotta Rydhmer**, Inst. för husdjursgenetik, SLU, Uppsala; **Kristina Andersson**, Inst. för husdjurens utfodring och vård

Bakgrund

För närvarande kastreras nästan alla hangrisar som används för köttproduktion för att förhindra att ornelukt utvecklas. Denna obehagliga lukt förekommer endast hos vissa hangrisar och orsakas av förhöjda nivåer av framför allt två substanser, skatol och androstenon som ansamlas i fett. Om okastrerade hangrisar skulle slaktas i Sverige i dag, skulle andelen slaktkroppar med förhöjda androstenon- och skatolnivåer vara hög. En stor EU-studie (Walstra m.fl., 1999) har visat att androstenonnivåerna hos svenska grisar var bland de högsta i Europa och 42 % av hangrisarna låg över det rekommenderade gränsvärdet. Även skatolnivåerna var relativt höga med 12 % över gränsvärdet. Andelen grisar med både förhöjda androstenon- och skatolvärden var 9,5 % (P. Walstra, pers. medd.).

Androstenonnivån i fett är i hög grad ärftlig och arvbarhetsskattningar på ca 0,5 (0,25 - 0,88) har rapporterats (Jonsson & Andresen, 1979; Willeke m.fl., 1980; Sellier & Bonneau, 1988; Fouilloux m.fl., 1997). Androstenon bildas i testiklarna tillsammans med de könshormoner som påverkar produktionsegenskaper såsom tillväxthastighet och muskelansättning. Därför kan avel för låg androstenonnivå påverka såväl produktion som reproduktion. I testiklarna produceras androstenon och könshormoner såsom testosteron i två olika synteskedjor som båda utgår från pregnenolon. Det är enzymsystemet andien- β -synthase (som inkluderar cytochrom P450C17 och cytochrome b5) som styr valet mellan de två synteskedjorna (Davis & Squires, 1999). Om man identifierar de gener som reglerar bildningen av dessa enzym (eller markörgener som är kopplade till dessa gener) skulle det vara möjligt att minska syntesen av androstenon utan att minska syntesen av testosteron och andra könshormoner. Genom att arbeta med enskilda gener i avelsprogrammet skulle därmed problemet med ornelukt troligen kunna lösas utan att grisarnas reproduktion försämras.

Man känner inte till någon fysiologisk effekt av skatol, eller varför skatol huvudsakligen ansamlas i höga nivåer i fett hos hangrisar och inte hos sogrisar eller kastrater. På grund av att skatol bildas i tarmen påverkas koncentrationen i fett i stor utsträckning av foder och miljö, men även av grisarnas gener. Arvbarhetsskattningar på ca 0,3 för skatolhalt i fett har rapporterats i både en dansk och en svensk undersökning (Pedersen, 1998; N. Lundeheim, pers. medd.). Resultat från en svensk studie tyder på att en så kallad "major gene" (en enskild gen med stor effekt) påverkar skatolnivån (Lundström m.fl., 1994). Skatol bryts ned i levern med hjälp av enzymerna cytochrome P4502E1 och cytochrome P4502A6 och aldehydoxidase (Babol m.fl., 1998; Diaz & Squires, 2000a, 2000b; Diaz & Squires, 2003). Det tycks inte finnas några ogynnsamma genetiska korrelationer mellan skatolnivå och reproduktion eller produktionsegenskaper (Pedersen, 1998). Selektion mot skatol har alltså troligen inte någon negativ inverkan på andra egenskaper. En svårighet är att identifiera de grisar som har dålig förmåga att bryta ned skatol. Skatol påverkas nämligen i hög grad av miljön och en låg skatolnivå

vid ett tillfälle innebär inte alltid att grisen har god förmåga att bryta ned skatol. Det kan istället bero på en låg skatolbildning i tarmen vid just det tillfället. Således är det svårt att avelsvärdera djur med avseende på skatolnivån. Därför vore det värdefullt att identifiera de gener som reglerar bildandet av olika enzym som behövs för nedbrytningen av skatol i levern (eller markörgener som är kopplade till dessa gener). Djuret bär ju dessa gener oavsett vilken miljö det befinner sig i vid provtillfället.

Nyligen har en kanadensisk forskargrupp under ledning av professor J. Squires, som vi samarbetar med, identifierat mutationer inblandade i skatolmetabolismen. Mutationer i CYP2A6- och SULT1A1-generna medförde lägre enzymaktiviteter i lever och högre skatolnivåer i fettvävnad (Lin et al., 2004a, b). Forskargruppen har även identifierat en SNP (single nucleotide polymorphism) i cytochrom b5-genen (CYB5-genen), som påverkar androstenonhalten (Lin et al., 2005). De fann att grisar med mutationen G --> T hade lägre nivåer av CYB5-protein i testiklarna och lägre androstenonnivå i fettvävnad. Denna polymorfism i CYB5-genen skulle kunna användas som en möjlig genetisk markör för att selektera grisar med låg androstenonproduktion. Det är därför av stort intresse att undersöka genfrekvensen för ovanstående mutationer i svenskt djurmaterial.

Det ökade intresset för djurskyddsaspekter gör att vi i framtiden kan förvänta förbud mot kastrering av grisar. Innan dess måste nuvarande problem med hög frekvens av luktande slaktkroppar minska, eftersom kött med förhöjda värden upplevs som mycket oaptitligt av många människor. På lång sikt är målet att avla bort ornelukt, så att hangrisar inte behöver kastreras. Bestämning av genotyp samt halten av androstenon hos hangrisar kan vara av värde för att identifiera grisar med avvikande låg förmåga att syntetisera androstenon, men med normal förmåga att syntetisera testosteron och andra könshormoner. Syftet med den här redovisade studien var att undersöka enskilda geners betydelse för ornelukt och reproduktionsegenskaper. Vi har fått medel för att kunna preparera DNA och utföra genetiska studier på redan insamlat material från tidigare försök med finansiellt stöd från bl.a. Jordbruksverket och Formas. De molekylärgenetiska studierna har gjorts i Guelph, Kanada, av Galia Zamaratskaia, SLU. De kinetiska studierna och de statistiska analyserna samt arbetet med den vetenskapliga publiceringen har gjorts i Sverige.

Material och metoder

Djurmaterial

Blodprover från 99 yorkshiregaltar och 74 lantrasgaltar som var presumtiva AI-galtar användes för att bestämma genfrekvenserna av CYB5 i aktuellt svenskt avelsmaterial.

För att fastställa genfrekvenserna av CYB5 i djurmaterial från tidigare studier, analyserades leverprover från totalt 245 grisar av båda könen (svensk yorkshire x svensk lantras). Blod- och fettprover från 190 hangrisar (svensk yorkshire x svensk lantras) har analyserats för att studera samband mellan polymorfism i CYB5-genen, ornelukt, produktions- och reproduktionsegenskaper. Dessa djur har ingått i en tidigare studie på SLU:s forskningsbesättning på Funbo-Lövsta (Andersson m.fl., 2005; Lundström m.fl., 2006) där grisarna slaktades vid 90 resp. 115 kg levande vikt.

Leverprover från hangrisar och sogrisar efter yorkshiresuggor och lantrasgaltar från tidigare försök användes för inhibition och kinetiska studier.

Analys av polymorfism i en gen som påverkar androstenonsyntesen

DNA från leverprover extraherades med hjälp av ett kommersiellt kit (GenElute Mammalian Genome DNA miniprep kit, Sigma) enligt den metod som rekommenderas av tillverkaren. Detta DNA användes för att söka efter polymorfism i CYB5-genen med hjälp av PCR (polymerase chain reaction) med efterföljande agarosgelelektrofores. Denna metod för genotypning har utvecklats i Guelph av J. Squires forskargrupp (Peacock et al., 2007).

Analys av polymorfism i gener involverade i skatolmetabolismen

RNA extraherades från leverprover med Tri-Reagent (Sigma, St Louis, MO, USA). SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen) användes för att överföra RNA till cDNA. PCR-SSCP-teknik användes för att identifiera prover med polymorfism i de gener som styr enzymerna CYP2E1, CYP2A6 och SULT1A1.

Övriga analyser

Analysmetoder för bestämning av androstenon- och skatolnivåer i plasma och fett, testosteron- och estronsulfatnivåer i plasma samt aktiviteter av de två skatol-metaboliserade enzymer CYP2E1 och CYP2A6 i lever finns beskrivna av Zamaratskaia m.fl. (2005a, b).

Statistisk bearbetning

Effekt av genotyp på androstenon- och skatolnivåer, reproduktionsegenskaper och hormonnivåer analyserades med proceduren MIXED i statistikprogrammet SAS (version 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA). Modellen inkluderade genotyp, levande vikt och genotyp inom levande vikt som fixa faktorer och box, far, mor inom far och år (vid behov) som slumpmässiga faktorer. För att skatta inverkan av steroider på aktiviteterna av CYP2E1 och CYP2A i levermikrosomer in vitro inkluderades kön och steroidkoncentration inom kön i modellen.

Resultat och diskussion

Gen involverad i androstenonbiosyntesen — cytochrom b5-genen

Genotypfrekvens

Antalet grisar med G/G-, G/T- och T/T-genotyp och allelfrekvenser för CYB5 framgår av tabell 1. Frekvensen av T-allelen, som har samband med låg androstenonhalt, var låg i de tre undersökta djurmaterialen, 7 -13 %. Det fanns endast 2 individer som var homozygota för T-allelen, medan 13 – 26 % var heterozygoter (bärare). Fördelningen av genotyperna i de studerade grispopulationerna avvek inte från Hardy–Weinbergs jämvikt. Genen tycks alltså inte påverkas av dagens avelsarbete eller av naturlig selektion.

Tabell 1. Genotyp- (% och antal) och allelfrekvenser (%) av G-T polymorfism i CYB5 genen i olika svenska populationer

Ras	Antal grisar	Genotyp			Allel	
		G/G, % (n)	G/T, % (n)	T/T, % (n)	G, %	T, %
Svensk yorkshire x svensk lantras	245	86,9 (213)	12,7 (31)	0,4 (1)	93,3	6,7
Svensk yorkshire	99	87,9 (87)	11,1 (11)	1,0 (1)	93,5	6,5
Svensk lantras	74	74,3 (55)	25,7 (19)	0 (0)	87,2	12,8

Ornelukt och polymorfism i CYB5-genen

Nivån av androstenon i plasma var vid en levande vikt av 90 kg lägre hos grisar med allel T än hos grisar som inte hade denna allel ($p = 0,005$, Tabell 2). Vid 115 kg fanns däremot ingen skillnad i androstenonnivå i plasma mellan genotyperna ($p = 0,250$). Androstenonnivån i fett påverkades inte av CYB5-genotyp. Vid en levande vikt av 115 kg fann vi att grisar med allel T hade en tendens till lägre skatolnivå i både plasma och fett än grisar som inte hade denna allel ($p = 0,061$ respektive $0,053$), medan det hos grisar som vägde 90 kg inte fanns någon skillnad mellan genotyperna. Eftersom det bara fanns en individ som var homozygot för T-allelen, kunde vi endast jämföra djur som var bärare av denna allel (G/T) med icke-bärare (G/G). Lägre androstenonnivåer hos kanadensiska grisar med allel T i fett hos både heterozygoter (G/T) och homozygoter (T/T) har rapporterats av Lin et al. (2005).

Vi har tidigare visat att en eventuell ökning av skatolnivåerna kommer efter det att steroidnivåerna ökar i samband med puberteten (Zamaratskaia m.fl., 2005c). Även resultaten från denna studie styrker detta. Den något högre skatolhalten i både fett och plasma hos grisar med G/G-genotyp jämfört med G/T-genotyp var märkbar först vid 115 kg och inte vid 90 kg, medan skillnaden i androstenonhalt i plasma i stället fanns vid 90 kg men inte vid 115 kg. Grisar med G/T-genotyp med lägre androstenonnivåer vid 90 kg visade inte någon ökning av skatol vid 115 kg. Detta bör studeras ytterligare för att kunna användas som en potentiell markör för selektion mot höga androstenon- och även skatolnivåer utan inverkan på övriga reproduktionsegenskaper.

Tabell 2. Androstenon- och skatolnivåerna i plasma och fett hos grisar vid 90 och 115 kg hos de två CYB5-genotyperna (minsta-kvadrat medelvärden och 95% konfidensintervall inom parantes)

Genotyp	90 kg		115 kg		P-värde, genotyp
	G/G	G/T	G/G	G/T	
Androstenon i plasma, ng/ml	5,8 (1,21 – 28,14)	1,9 (0,34 – 10,20)	10,8 (2,29 – 51,11)	7,6 (1,48 – 39,31)	0,005
	N = 44	N = 8	N = 124	N = 14	
P-värde, genotyp inom levande vikt	0,005		0,250		
Androstenon i fett, µg/g	1,2 (0,88 – 1,64)	1,0 (0,58 – 1,68)	1,2 (0,92 – 1,54)	1,0 (0,63 – 1,51)	0,249
	N = 44	N = 8	N = 126	N = 14	
P-värde, genotyp inom levande vikt	0,452		0,329		
Skatol i plasma, ng/ml	2,2 (1,00 – 4,89)	1,7 (0,62 – 4,84)	3,6 (1,68 – 7,80)	1,7 (0,61 – 4,79)	0,094
	N = 43	N = 8	N = 72	N = 8	
P-värde, genotyp inom levande vikt	0,539		0,061		
Skatol i fett, µg/g	0,07 (0,046 – 0,108)	0,06 (0,034 – 0,114)	0,11 (0,078 – 0,174)	0,07 (0,038 – 0,128)	0,106
	N = 44	N = 8	N = 73	N = 8	
P-värde, genotyp inom levande vikt	0,624		0,053		

P-värde anger sannolikheten att det finns en skillnad mellan genotyperna.

Produktionsegenskaper, könshormonkoncentrationer och storleken på reproduktionsorganen

Grisarnas tillväxt, köttinnehåll, testosteron- och estronsulfatnivåer i plasma, estronnivåer i fett, testikelvikt och längden av bulbourethral körteln jämfördes mellan djur av G/G och G/T-genotyp. Grisarnas dagliga viktökning påverkades inte av genotyp ($p=0,394$; Tabell 3), medan köttinnehållet var något högre hos grisar av G/T-genotyp ($p=0,054$). Varken könshormonkoncentrationer (testosteron i plasma, $p = 0,997$; estronsulfat i plasma, $p = 0,744$; estron i fett, $p=0,150$) eller storleken på reproduktionsorganen (testikelvikt och längd av bulbourethral körteln; Tabell 3) påverkades av genotyp. Resultaten är intressanta, eftersom polymorfism i CYB5-genen tycks kunna påverka androstenonnivån och även skatolnivån selektivt utan negativ effekt på reproduktionsparametrar.

Tabell 3. Tillväxt, köttinnehåll och storleken på reproduktionsorganen hos hangrisar med G/G och G/T genotyp (minsta-kvadratmedelvärden \pm standard error)

	Genotyp		P-värde	
	G/G (n=158-170)	G/T (n=22)	Genotyp	Genotyp inom levande vikt
Daglig viktökning, g	957 \pm 13	940 \pm 22	0,394	0,470
Köttinnehåll, %	59,5 \pm 0,3	60,2 \pm 0,4	0,054	0,912
Testikelvikt, g	521,8 \pm 16,7	550,2 \pm 29,5	0,315	0,953
Bulbourethral körtelns längd, cm	10,0 \pm 0,3	10,3 \pm 0,4	0,415	0,895

Enzymaktiviteten hos CYP2E1 och CYP2A

Enzymaktiviteten hos CYP2E1 påverkades inte av genotyp ($p = 0,284$), medan enzymaktiviteten hos CYP2A var något högre hos grisar med G/T genotyp vid en vikt av 90 kg ($p = 0,053$).

Sambandet mellan polymorfism i CYP2E1-genen och låg skatolnivå samt högre enzymaktivitet av CYP2A är intressanta resultat. Det är välkänt att variationen i skatolnivå mellan individer kan bero på skillnader i aktiviteten av de enzymer som metaboliserar skatol i levern. Dessa skillnader i enzymaktivitet är i stor utsträckning genetiskt betingade (Lin m.fl., 2004a, b), men är även influerade av omgivningsfaktorer, bland annat ålder (Zamaratskaia m. fl., 2005b) och troligen även av androstenhalten (Doran m.fl., 2002). Det är troligt att hög androstenonkoncentration också direkt kan påverka aktiviteten hos de skatolnedbrytande enzymerna. För att kontrollera denna hypotes studerade vi hur olika koncentrationer av vissa steroider (androstenon, testosteron och estradiol) påverkar enzymaktiviteten hos CYP2E1 och CYP2A *in vitro*. I våra studier har vi använt inkubation av levermikrosomer i närvaro av steroider och specifika substrat för CYP2E1 och CYP2A. Enzymaktiviteterna bestämdes efter inkubationen med olika koncentrationer av respektive steroid. För att skatta inverkan av steroider på enzymaktiviteterna testades två olika inkuberingar – med och utan pre-inkubation med NADPH. Detta gjordes för att undersöka om steroidernas inverkan sker direkt eller via NADH-beroende metaboliter.

De undersökta steroiderna påverkade inte enzymaktiviteten hos CYP2A. Däremot minskade enzymaktiviteten av CYP2E1 i närvaro av androstenon och estradiol (Tabell 4). Resultaten tyder på att både androstenon och estradiol spelar en viktig roll för att reglera skatolnivåerna i fett.

Även resultaten från våra tidigare studier visade att estrogener är viktigare än testosteron för regleringen av skatolnivåerna (Zamaratskaia m.fl., 2005c).

Tabell 4. Effekt av androstenon, testosteron och estradiol på enzymaktiviteten av CYP2E1 i mikrosomer från hangrisar samt signifikansnivån för skillnader jämfört med kontrollen (utan tillsatta steroider)

		CYP2E1-aktivitet, %	
		Icke preinkuberade	Preinkuberade 15 min. med NADPH
Tillsatt androstenon, μM	0,1	104,7 \pm 14,1	99,8 \pm 6,6
	1,0	107,3 \pm 14,1	92,3 \pm 4,6
	10	113,5 \pm 14,5	88,9 \pm 7,3
	50	96,0 \pm 13,9	85,3 \pm 6,5*
Tillsatt estradiol, μM	0,1	80,7 \pm 7,2	99,9 \pm 1,9
	1,0	66,4 \pm 6,3**	97,7 \pm 0,3
	10	62,3 \pm 5,6**	101,5 \pm 4,2
	50	66,9 \pm 4,7**	100,6 \pm 2,6

Enzymaktiviteten i kontrollinkubationen (0 μM tillsatt steroid) är satt till 100%.

Gener involverade i skatolmetabolism – CYP2E1, CYP2A6 och SULT1A1

För att analysera effekten av polymorfism i generna CYP2E1, CYP2A6 och SULT1A1 på skatolnivån i fett, valdes två grupper djur ut; en med hög (n=7) och en med låg (n=59) skatolnivå. Polymorfism i SULT1A1-genen (A-->G) fanns i ett prov med låg skatolkoncentration i fett (0,03 ppm). Ingen polymorfism för CYP2A6-genen fanns i proverna. En 'silent mutation' hos CYP2E1-genen fanns i två prover med skatolkoncentrationer i fett på 0,03 (låg) respektive 0,5 ppm (hög). Denna mutation har därför inget direkt samband med skatolnivån. Aktiviteterna för enzymet CYP2E1 i levern hos dessa prover var 286 respektive 136 pmol/min/mg protein, d.v.s. högre enzymaktivitet har samband med låg skatolnivå och tvärtom.

Slutsatser

Frekvensen av T-allelen, som har samband med låg androstenonhalt, var låg i de tre undersökta djurmaterialen, 7 -13 %. Det fanns endast 2 individer som var homozygota för T-allelen, medan 13 – 26 % var heterozygoter (bärare). Vi kunde påvisa ett samband mellan polymorfism i CYB5-

genen och androstenonnivån i plasma, där bärare av T-allelen hade lägre androstenonnivå i plasma vid 90 kg men inte vid 115 kg. Androstenonnivåerna i fett skilde sig däremot inte mellan olika genotyper, varken vid 90 eller vid 115 kg levande vikt. En annan intressant observation i vår studie var att skatolnivåerna också påverkades av CYB5-genotypen. Grisarnas tillväxt, könshormonkoncentrationer och storleken på reproduktionsorganen påverkades inte av CYB5-genotyp, medan däremot köttinnehållet var något högre hos bärare av T-allelen. Bättre kunskap om den genetiska bakgrunden och olika markörgener kan i förlängningen leda till en möjlighet att selektera mot androstenon och troligen även skatol utan försämring av reproduktionsegenskaperna. Den låga effekten av T-allelen i heterozygot form tillsammans med den låga allelfrekvensen idag försvårar utnyttjandet kommersiellt.

Skatolhalten hos grisar kan relativt lätt minskas genom utfodring med skatolsänkande foder den sista perioden före slakt (Zamaratskaia m.fl., 2005a; Chen m.fl., 2007), men en lösning av skatolproblematiken genom att selektera för lägre skatolhalt är att föredra på längre sikt. För skatolmetabolismen har dock inte några gener av intresse kunnat identifieras i vårt djurmaterial.

Vetenskapliga publikationer

Projektet har redovisats i följande vetenskapliga publikationer:

Zamaratskaia G., Lou Y., Peacock J., Rydhmer L., Andersson H.K., Juneja R.K., Chen G., Lundström K., Squires E.J., 2007. Effect of polymorphism in the porcine cytochrome b5 (CYB5) gene on androstenone concentrations and reproductive parameters in entire male pigs. (submitted for publication).

Zamaratskaia G., Gilmore W.J., Lundström K., Squires E.J., 2007. Effect of testicular steroids on catalytic activities of cytochrome P450 enzymes in porcine liver microsomes. *Food and Chemical Toxicology* 45, 676-681. doi:10.1016/j.fct.2006.10.023

Övrig resultatförmedling till näringen

Eftersom det nu redovisade projektet är svårt att kommunicera på ett pedagogiskt sätt, kommer vi i stället att inkludera resultaten i det FAKTA-blad som vi kommer att skriva om vårt pågående försök ”Alternativ till kirurgisk kastrering av gris – effekt av immunokastrering, boxyta och skatolsänkande foder på djurvälstånd och ornelukt” med medel från Djurskyddsmyndigheten. Vi kommer givetvis även att i det sammanhanget nämna att vi fått finansiellt stöd från SLF till projektet ”Effekt av enskilda gener på ornelukt och reproduktionsparametrar”.

Referenser

Andersson H.K., Andersson K., Zamaratskaia G., Rydhmer L., Chen G., Lundström K. 2005. Effect of single-sex or mixed rearing and live weight on performance, technological meat quality

and sexual maturity in entire male and female pigs fed raw potato starch. *Acta Agric. Sci. A* 55 80-90.

Babol J., Squires E. J. & Lundström K. 1998. Relationship between oxidation and conjugation metabolism of skatole in pig liver and levels of skatole in fat. *J. Anim. Sci.* 76 829-838.

Chen G., Zamaratskaia G., Andersson H.K., Lundström K. 2007. Effects of raw potato starch and live weight on fat and plasma skatole, indole and androstenone levels measured by different methods in entire male pigs. *Food Chemistry* 101 439-448.

Davis S.M. & Squires E.J. 1999. Association of cytochrome b₅ with 16-androstene steroid synthesis in the testis and accumulation in the fat of male pigs. *J. Anim. Sci.* 77 1230-1235.

Diaz G.J. & Squires E.J. 2000a. Role of aldehyde oxidase in the hepatic in vitro metabolism of 3-methylindole in pigs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48 833-837.

Diaz G.J. & Squires E.J. 2000b. Metabolism of 3-methylindole by porcine liver microsomes: responsible cytochrome P450 enzymes. *Toxicological Sciences* 55 284-292.

Diaz G.J. & Squires E.J. 2003. Phase II in vitro metabolism of 3-methylindole metabolites in porcine liver. *Xenobiotica* 33 485-498.

Doran E., Whittington F.W., Wood J.D., McGivan J.D. 2002. Cytochrome P450IIE1 (CYP2E1) is induced by skatole and this induction is blocked by androstenone in isolated pig hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 140 81-92.

Foilloux M. N., Le Roy P., Gruand J., Renard C., Sellier P. & Bonneau M. 1997. Support for single major genes influencing fat androstenone level and development of bulbo-urethral glands in young boars. *Genet. Sel. evol.*, 29 357-366.

Jonsson P. & Andresen Ø. 1979. Experience during two generations of within lines boar performance testing using 5 α -androst-16-en-3-one (5 α -androstenone) and an olfactory judgement of boar taint. *Ann. Génét. Sél. anim.* 11 241-250.

Lin Z., Lou Y., Squires E.J. 2004a. Molecular cloning, expression and functional characterization of the cytochrome P450 2A6 gene in pig liver. *Anim Genet.* 35(4), 314-316.

Lin Z., Lou Y., Squires E.J. 2004b. Molecular cloning and functional analysis of porcine SULT1A1 gene and its variant: a single mutation SULT1A1 causes a significant decrease in sulfation activity. *Mamm Genome*, 15(3), 218-226.

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

Lundström K., Andersson K., Rydhmer L., Zamaratskaia G., Chen G. & Andersson K. 2006. Problem om vi slutar att kastrera hangrisar. *Fakta Jordbruk* 5/2006. SLU, Uppsala.

Lundström K., Malmfors B., Stern S., Rydhmer L., Eliasson-Selling L., Mortensen A. B. & Mortensen H. P. 1994. Skatole levels in pigs selected for high lean tissue growth rate on different protein levels. *Livest. Prod. Sci.* 38 125-132.

Peacock J., Squires E.J. 2007. A polymorphism in the 5' untranslated region affects cytochrome b5 gene expression and boar taint in entire male pigs (manuscript).

Pedersen, B. 1998. Heritability of skatole in back fat. (Chapter 7) In: W. Klinth Jensen (Editor) *Skatole and Boar Taint*. Danish Meat Research Institute, Roskilde, Denmark, pp 129-136.

Sellier P. & Bonneau M. 1988. Genetic relationship between fat androstenone level in males and development of male and female genital tract in pigs. *J. Anim. Breed. Genet.* 105 11-20.

Willeke H., Claus R., Pirchner F. & Alsing W. 1980. A selection experiment against 5 α -androst-16-en-3-one, the boar taint steroid, in adipose tissue of boars. *Z. Tierzüchtg. Züchtgsbiol.* 97 86-94.

Zamaratskaia G., Babol J., Andersson H.K., Andersson K., Lundström K. 2005a. Effect of live weight and dietary supplement of raw potato starch on the levels of skatole, androstenone, testosterone and oestrone sulphate in entire male pigs. *Livest. Prod. Sci.* 93 235-243.

Zamaratskaia G., Squires E.J., Babol J., Andersson H.K., Andersson K., Lundström K. 2005b. Relationship between the activities of cytochromes P4502E1 and P4502A6 and skatole content in fat in entire male pigs fed with and without raw potato starch. *Livest. Prod. Sci.* 95 83-88.

Zamaratskaia G., Rydhmer L., Chen G., Madej A., Andersson H.K., Lundström K. 2005c. Boar taint is related to endocrine and anatomical changes at puberty but not to aggressive behaviour in entire male pigs. *Reprod. Domest. Animal* 40 500-506.