

# Genetická analýza starokladrubských koní pomocí mikrosatelitních markerů

Vladimíra Czerneková<sup>1</sup>

Luboš Vostrý<sup>2</sup>

Ivan Majzlík<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 00 Praha - Uhřetěves; czernekova.vladimira@vuzv.cz

<sup>2</sup> Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 00 Praha - Uhřetěves; vostry.lubos@vuzv.cz

<sup>3</sup> Česká zemědělská univerzita v Praze, Kamýcká 129, 165 21 Praha - Suchbátka; majzlik@af.czu.cz

Grant: MZE0002701404

Název grantu: Udržitelný rozvoj chovu hospodářských zvířat v evropském modelu multifunkčního zemědělství

Oborové zaměření: Genetika a molekulární biologie

© GRANT Journal, MAGNANIMITAS Assn.

**Abstrakt** Starokladrubský kůň je nejstarší plemeno koní chované na území České republiky. Je významnou genovou rezervou s jedinečnými vlastnostmi a vysokou kulturní a historickou hodnotou. Ke studiu variability tohoto plemene bylo použito 16 mikrosatelitních markerů: AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, LEX3 a VHL20. Pro jednotlivé lokusy byly vypočítány frekvence alel, heterozygotnosti a fixační koeficienty. Celkový počet alel nalezených na 16 mikrosatelitních lokusech byl 86, průměrný počet alel na mikrosatelitní lokus byl 8,25. Průměrná hodnota pozorované heterozygotnosti byla 0,637 a hodnota očekávané heterozygotnosti 0,678. Genetická diference mezi otcovskými liniemi dosahovala střední hodnoty (hodnoty  $F_{ST}$  se pohybovaly od 0,020 až 0,017). Rozdíly mezi otcovskými liniemi byly zjištěny pomocí genetických vzdáleností. Jeden genetický shluk zahrnoval otcovské linie černé varianty a druhý shluk zahrnoval otcovské linie bílé varianty. Z uvedených výsledků vyplývá, že genetická diverzita starokladrubských koní je srovnatelná s ostatními plemeny koní.

**Klíčová slova** Genetická variabilita, mikrosatelitní DNA, starokladrubský kůň

## 1. ÚVOD

Starokladrubský kůň je jediné české autochtonní plemeno koní, chované více jak 400 let na našem území. Je rovněž zařazen do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat významných pro výživu a zemědělství. V roce 1995 získalo toto plemeno statut národní kulturní památky. Starokladrubský kůň je teplokrevné plemeno vzniklé na podkladě starošpanělské a staroitalské krve. Vznik tohoto plemene se váže na založení hřebčína v Kladrubech nad Labem r. 1579, po němž bylo plemeno pojmenováno. Původně byli starokladrubští koně chováni v různých barevných variantách, od konce 18. století v barvě bílé a černé. Po pádu habsburské monarchie začal tento kůň ztrácet na oblibě a jeho chov téměř zanikl. V letech 1938 – 1973 probíhala regenerace vraného stáda pod vedením prof. Bílka. Od roku 1996 je populace starokladrubských koní uzavřena přílivu krve jiných plemen koní. V současnosti se jedná o teplokrevné plemeno velkého rámce

galakarosiérového typu. Dnešní populace je rozdělena na 5 čistokrevných klasických linií a 3 čistokrevné neklasické linie, z nichž jsou Generale, Favory a Rudolfo bělouši, Solo a Siglavi Pakra vraníci a Generalissimus, Sacramoso a Romke se vyskytují v obou barevných variantách (1).

K hodnocení genetické variability ohrožených druhů hospodářských zvířat jsou nejvíce využívány DNA markery mikrosatelity (2), (3). Mikrosatelity se nacházejí v celém genomu eukaryotických i prokaryotických organismů (4), (5), nejvíce pak v jeho nekódujících oblastech (6). První molekulární analýzy u starokladrubského koně založené na průměrné heterozygotnosti krevních skupin uskutečnil Hořín (7). Další genetické analýzy plemene byly provedeny Volencem (8) a Jakubcem (9). Průměrný koeficient inbreedingu klesl během let 1993 až 2003 z hodnoty 7,75 % na 4,88 %. Pokles koeficientu je zřejmě způsoben aplikací rotačního skupinového páření a rychlým nárůstem počtu klisen (o 67,5 %). Cílem této práce bylo zjištění úrovně genetické variability uvnitř a mezi otcovskými liniemi starokladrubského koně.

## 2. MATERIÁL A METODIKA

Krevní vzorky byly odebrány 324 starokladrubským koním v rozmezí let 1990 až 2000, vždy cca u 10 % jedinců z každé linie. Genomická DNA byla izolována z krve pomocí izolačního kitu NucleoSpin Blood (Clontech Laboratories, USA). Genotypování zahrnovalo 16 mikrosatelitních lokusů (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, LEX3, VHL20) rozptýlených na 10 chromozómech.

Reakční směs o objemu 7,5  $\mu$ l obsahovala 80 – 100 ng templátové DNA, 1,25  $\mu$ l reakčního pufru (10x Stockmarks Buffer), 2  $\mu$ l směsi primerů (20 nmol/l), 2  $\mu$ l směsi dNTP (1,25 mmol/l) a 1,25 U Taq Gold polymerázy. Uvedené komponenty jsou součástí kitu StockMarks for Horses Equine Genotyping Kit (Life Technologies, USA). Amplifikace fluorescenčně značených markerů probíhala v termocykleru TGradient 96 (Whatman Biometra, Germany). Počáteční denaturace při 95 °C trvala 10 min., pak následovalo 31 opakování teplotního cyklu: 30 s 95 °C, 30 s 60 °C a 60 s 72 °C. Na

závěr byla reakční směs vystavena teplotě 72 °C po dobu 60 minut. Produkty PCR byly zředěny vodou v poměru 1:1. Kapilární elektroforéza PCR produktů probíhala v sekvenátoru ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, USA). Výpočet délky alel byl proveden pomocí softwaru GeneMapper® 4.0 (Life Technologies, USA).

Frekvence alel, pozorovaná heterozygotnost, očekávaná heterozygotnost, test Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HWE) a genetické vzdálenosti byly odhadnuty s využitím softwarového balíku TFGPA 1.3 (10). Tento program vytváří standardizovanou matici genetických distancí s korekcí na malé vzorky (11). Shluková analýza, provedená diskriminační metodou UPGMA, byla vyjádřena jako dendrogram s využitím analýzy bootstrap. Robustnost dendrogramu byla testována s 1000 bootstrap vzorky. Genetické difference uvnitř a mezi sledovanými otcovskými liniemi byly zjištěny pomocí fixačních koeficientů ( $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  a  $F_{ST}$ ) odhadnutých programem FSTAT (12).

### 3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Celkový počet alel nalezených na 16 mikrosatelitních lokusech u starokladrubského koně byl 86. Průměrný počet alel na mikrosatelitním lokusu byl 8,25 s rozsahem 4 – 14. Průměrná pozorovaná heterozygotnost ( $H_o$ ) všech mikrosatelitních lokusů měla hodnotu 0,637 a hodnota očekávané heterozygotnosti ( $H_e$ ) byla 0,678. Pozorovaná heterozygotnost pro jednotlivé mikrosatelity se pohybovala v rozmezí od 0,374 pro mikrosatelit HTG6 do 0,827 pro mikrosatelit AHT4. Také u očekávané heterozygotnosti byla nejnižší hodnota zjištěna u mikrosatelitu HTG6 (0,406). Nejvyšší hodnota očekávané heterozygotnosti však byla u mikrosatelitu VHL20 (0,835). Celkové informace o souhrnných statistikách jsou uvedeny v tabulce 1. Statisticky průkazná odchylka ( $P < 0,01$ ) od HWE byla zjištěna u lokusů ASB23, HMS3, HMS7, HTG7 a VHL20. Podobné hodnoty pozorované a očekávané heterozygotnosti byly zjištěny u španělských keltských koní (13), u plemene lipicán (14), u německých tažných koní (15) a u bílorajského koně (16). Naopak Iwanczyk (17) uvádí hodnoty heterozygotnosti pro polské těžké koně výrazně nižší.

**Tabulka 1.** Charakteristiky a souhrnné statistiky pro mikrosatelitní lokusy analyzované u populace starokladrubského koně.

Lokus	Počet alel	Rozsah (bp)	$H_o^a$	$H_e^b$	Lokace na chromozómu
AHT4	10	143 – 160	0,827	0,821	24
AHT5	6	130 – 140	0,716	0,752	8
ASB2	14	236 – 255	0,821	0,846	15
ASB17	11	95 – 121	0,784	0,778	2
ASB23	12	178 – 207	0,534	0,703	3
CA425	6	234 – 244	0,651	0,622	28
HMS1	5	174 – 184	0,519	0,543	15
HMS2	12	217 – 238	0,725	0,734	15
HMS3	10	148 – 168	0,509	0,607	9
HMS6	10	155 – 172	0,685	0,713	4
HMS7	8	117 – 125	0,549	0,625	1
HTG4	6	127 – 137	0,682	0,700	9
HTG6	6	79 – 95	0,374	0,406	15
HTG7	4	117 – 125	0,556	0,600	4
LEX3	5	144 – 156	0,497	0,561	X
VHL20	7	85 – 105	0,765	0,835	30
Průměr	8,25	–	0,637	0,678	–

a  $H_o$  je pozorovaná heterozygotnost, b  $H_e$  je očekávaná heterozygotnost.

Popisné statistiky mikrosatelitů napříč otcovskými liniemi jsou uvedeny v tabulce 2. Pozorovaná heterozygotnost a očekávaná heterozygotnost vykazovaly pro všechny linie podobné hodnoty. Nejnižší hodnota heterozygotnosti byla zjištěna pro linii Generale (0,569) a nejvyšší hodnota pro linii Favory (0,680). Také pro

očekávanou heterozygotnost vykazovala nejvyšší hodnotu linie Favory (0,677). Naopak nejnižší hodnotu očekávané heterozygotnosti vykazovala linie Rudolfo (0,547).

**Tabulka 2.** Charakteristiky a souhrnné statistiky pro mikrosatelitní lokusy analyzované u otcovských linií starokladrubského koně.

Linie	$N^a$	$Ne^b$	$Ho^c$	$He^d$
Generale	20	4,38	0,569	0,575
Generale-Generalissimus	63	5,50	0,623	0,600
Favory	30	6,06	0,680	0,677
Favory-Generalissimus	10	5,69	0,656	0,622
Sacramoso	100	6,75	0,637	0,660
Solo	60	5,44	0,624	0,618
Siglavi Pakra	14	4,25	0,647	0,604
Romke	16	4,63	0,630	0,605
Rudolfo	11	3,94	0,659	0,547

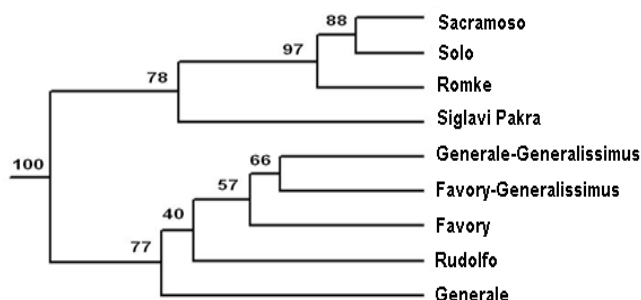
a  $N$  je počet jedinců, b  $Ne$  je průměrný počet alel, c  $Ho$  je pozorovaná heterozygotnost, d  $He$  je očekávaná heterozygotnost.

Standardní genetické vzdálenosti ( $D$ ) mezi otcovskými liniemi podle Nei (12) a difference pomocí párového koeficientu ( $F_{ST}$ ) jsou uvedeny v tabulce 3. Nejnižší hodnota genetických distancí podle Nei (12) byla zjištěna mezi liniemi Sacramoso a Solo (0,049) a nejvyšší hodnota genetické vzdálenosti byla odhadnuta mezi liniemi Romke a Rudolfo (0,429). Podobné hodnoty genetické diverzity publikoval Zabek (16) při porovnání malé populace bílorajských koní s běžnými plemeny koní. Párové koeficienty ( $F_{ST}$ ) vykazovaly u většiny párů otcovských linií střední hodnoty. Pouze mezi otcovskými liniemi Generale vs. Solo, Generale vs. Siglavi Pakra, Generale vs. Romke, Generale-Generalissimus vs. Siglavi Pakra, Generale-Generalissimus vs. Romke a Siglavi Pakra vs. Rudolfo byla zjištěna vysoké hodnoty  $F_{ST}$ . Vysoké hodnoty  $F_{ST}$  poukazují na vyšší genetickou distanci mezi zmíněnými otcovskými liniemi. Na druhé straně mezi otcovskými liniemi Sacramoso vs. Solo či Napoleon vs. Romke byly odhadnuty hodnoty  $F_{ST}$  nízké. Z hodnot párového koeficientu ( $F_{ST}$ ) je zřejmé, že od 2,0 do 17,4 % je možné mikrosatelitní variabilitu u starokladrubského koně vysvětlit podrozdělením populace. Jde o to, že po dlouhou dobu byli zástupci černého a bílého stáda chování odděleně, tj. nedocházelo mezi nimi k výměně plemeniků ani plemenic. Hodnoty  $F_{ST}$  odpovídají hodnotám genetické vzdálenosti ( $D$ ). Odhad genetického toku je znázorněn jako průměrný počet migrantů za populaci  $Nm$  (tabulka 3). Největší poměr migrantů byl zjištěn mezi otcovskými liniemi Napoleone vs. Solo (12,1) a naopak nejnižší mezi otcovskými liniemi Siglavi Pakra vs. Rudolfo (1,1). Počty migrantů za populaci jsou ve shodě s hodnotami genetické vzdálenosti a párového koeficientu. Vyšší počet migrantů odpovídá cíli šlechtění, tzn. připravit co nejméně příbuzné jedince.

Z UPGMA dendrogramu (obrázek 1) je zřejmé, že otcovské linie byly rozděleny do dvou základních shluků. Tyto dva hlavní shluky představují rozdělení linií podle barevné varianty. Otcovské linie Solo, Romke a Siglavi Pakra a Sacramoso jsou liniemi vraníků a otcovské linie Generale, Generale-Generalissimus, Favory, Favory-Generalissimus a Rudolfo jsou liniemi běloušů. Jedinci otcovské linie Sacramoso se vyskytují v obou barevných variantách.

Z prvního shluku jsou si nejvíce podobné otcovské linie Sacramoso a Solo. Jedná se o nejstarší vrané otcovské linie starokladrubského koně. Vysoká podobnost mezi těmito dvěma liniemi je také způsobena skutečností, že jeden hřebec otcovské linie Sacramoso byl v rámci regenerace starokladrubských vraníků přejmenován na Solo a podílel se rozhodujícím způsobem na regeneračním procesu jako zakladatel nové linie. K těmto dvěma otcovským liniím je také v úzkém vztahu otcovská linie Romke. Tyto tři otcovské linie vykazovaly nejvyšší podobnost mikrosatelitních lokusů z celé populace. Podobně je tomu i u druhého shluku, jenž zahrnuje

jedince bílé varianty. Otcovské linie Generale-Generalissimus a Favory-Generalissimus vykazovaly nejvyšší genetickou podobnost.



**Obrázek 1.** UPGMA dendrogram zkonstruovaný z genetických vzdáleností podle Nei (12).

#### 4. ZÁVĚR

Cílem práce bylo provést analýzu variability 16 mikrosatelitů u starokladubského koně. Celkem bylo zgenotypováno 324 zvířat. Celkový počet alel nalezených na sledovaných mikrosatelitních lokusech byl 86, průměrný počet alel na mikrosatelitní lokus byl 8,25. Průměrná hodnota pozorované heterozygotnosti byla 0,637 a hodnota očekávané heterozygotnosti 0,678. Genetická diference mezi otcovskými liniemi dosahovala střední hodnoty (hodnoty  $F_{ST}$  se pohybovaly od 0,020 až 0,017). Rozdíly mezi otcovskými liniemi byly zjištěny pomocí genetických vzdáleností. Jeden genetický shluk zahrnoval otcovské linie černé varianty a druhý shluk zahrnoval otcovské linie bílé varianty. Z uvedených výsledků vyplývá, že genetická diverzita starokladubských koní je srovnatelná s ostatními plemeny koní.

#### PODĚKOVÁNÍ

Tato práce byla realizována za podpory projektu Ministerstva zemědělství ČR (MZE0002701404).

**Tabulka 3.** Genetické vzdálenosti ( $D$ ) nad diagonálou a párový koeficient ( $F_{ST}$ ) spolu s počtem efektivních migrantů za populaci ( $v$  závorce) pod diagonálou.

Linie	Gene	G Gens	Fav	F Gens	Sac	Sol	SigP	Rom	Rud
Gene		0,197	0,144	0,204	0,212	0,356	0,390	0,367	0,214
G Gens	0,093 (2,5)		0,133	0,104	0,173	0,287	0,404	0,359	0,172
Fav	0,059 (4,0)	0,054 (4,4)		0,119	0,112	0,183	0,267	0,219	0,161
F Gens	0,092 (2,5)	0,045 (5,4)	0,045 (5,3)		0,121	0,212	0,319	0,249	0,166
Sac	0,091 (2,5)	0,075 (3,1)	0,042 (5,5)	0,051 (4,7)		0,049	0,191	0,093	0,176
Sol	0,153 (1,4)	0,127(1,7)	0,076 (3,1)	0,095 (2,4)	0,020 (12,1)		0,171	0,061	0,253
SigP	0,159 (1,3)	0,160 (1,3)	0,094 (2,4)	0,126 (1,7)	0,072 (3,2)	0,071 (3,3)		0,169	0,429
Rom	0,152 (1,4)	0,147 (1,5)	0,079 (2,9)	0,102 (2,2)	0,031 (7,7)	0,017 (14,6)	0,062 (3,8)		0,316
Rud	0,100 (2,3)	0,078 (3,0)	0,062 (3,8)	0,072 (3,2)	0,072 (3,2)	0,113 (2,0)	0,174 (1,1)	0,135 (1,6)	

Označení linií: Gene = Generale, G Gens = Generale-Generalissimus, Fav = Favory, F Gens = Favory-Generalissimus, Sac = Sacramoso, Sol = Solo, SigP = Siglavi Pakra, Rom = Romke, Rud = Rudolfo.

#### Zdroje

- Řád plemenné knihy starokladubského koně, 2012. Národní hřebčín Kladruby nad Labem s.p.o., 2012. Dostupné z WWW: <<http://www.nhkladruby.cz/rad-plemne-knihy>>.
- GORNAS, N.; WEIMANN, C.; EL HUSSEIN, A.; ERHARDT, G. Genetic characterization of local Sudanese sheep breeds using DNA markers. *Small Ruminant Research*. 2011, vol. 95, s. 27-33. ISSN 0921- 4488.
- GUASTELLA, A. M., ZUCCARO, A., CRISCIONE, A., MARLETTA, D., BORDONARO, S. Genetic Analysis of Sicilian Autochthonous Horse Breeds Using Nuclear and Mitochondrial DNA Markers. *Journal of Heredity*. 2011, vol. 102, s. 753-758. ISSN 0022-1503.
- FIELD, D.; WILLS, C. Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*. 1996, vol. 263, s. 209-215. ISSN 0962-8452.
- TÓTH, G.; GÁSPARI, Z.; JURKA, J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*. 2000, vol. 10, s. 967-981. ISSN 1088-9051.
- METZGAR, D.; BYTOF, J.; WILLS, C. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research*. 2000, vol. 10, s. 72–80. ISSN 1088-9051.
- HOŘÍN, P.; COTHAN, E. G.; TRTKOVÁ, E.; MARTI, E.; GLASNAK, V.; HENNEY, P.; VYSKOCIL, M.; LAZARY, S. Polymorphism of Old Kladruber horses, a surviving but endangered baroque breed. *European Journal of Immunogenetics*. 1998, vol. 25, s. 357 – 363. ISSN 0960-7420.
- VOLENEC, J.; JAKUBEC, V.; JELÍNEK, J.; PŘIBYL, J.; ZÁLIŠ, N. Analysis of Inbreeding of Old Kladrub Horses. *Scientia Agriculturae Bohemica*. 1995, vol. 26, 279 – 96. ISSN 1211-3174.
- JAKUBEC, V.; VOLENEC, J.; MAJZLÍK, I.; SCHLOTE, W. Analysis of inbreeding in the genetic resource of “Old Kladrub horse” in the period from 1993 to 2003. In: *55th Annual Meeting of the European Association for Animal Production: 5.-9.9.2004*. Bled, Slovenia, 2004, s. 85-90. ISBN 90-76998-79-5.
- MILLER, M.P. Tools for population genetic analyses (TFPGA): A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. 1997.

- Dostupný z WWW:  
<<http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>>.
11. NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 1978, vol. 89, 583 – 590. ISSN 0016-6731.
  12. GAUDET, J. FSTAT (v. 2.9.3). A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. 2001. Dostupný z WWW:  
<<http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>>.
  13. CANON, J.; CHECA, M.L.; CARLEOS, C.; VEGA-PLA, J.L.; VALLEJO, M.; DUNNER, S. The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data. *Animal Genetics*. 2000, vol. 31, s. 39-48. ISSN 0268-9146.
  14. ACHMANN, R.; CURIK, I.; DOVC, P.; KAVAR, T.; BODO, I.; HABE, F.; MARTI, E.; SÖLKNER, J.; BREM, G. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics*. 2004, vol. 35, s. 285 – 292. ISSN 0268-9146.
  15. ABERLE, K. S.; HAMANN, H.; DRÖGEMÜLLER, C.; DISTL O. Genetic diversity in German draught horse breeds compared with a group of primitive, riding and wild horses by means of microsatellite DNA markers. *Animal Genetics*. 2004, vol. 35, s. 270 – 277. ISSN 0268-9146.
  16. ZABEK, T.; NOGAJ, A.; RADKO, A.; NOGAJ, J.; SLOTA, E. Genetic variation of Polish endangered Biłgoraj horses and two common horse breeds in microsatellite loci. *Journal of Applied Genetics*. 2005, vol. 46, s. 299-305. ISSN 1234-1983.
  17. IWANCZYK, E.; JURAS, R.; CHOLEWINSKI, G.; COTHRAN, E. G. Genetic structure and polygenetic relationships of the Polish Heavy Horse. *Journal of Applied Genetics*. 2006, vol. 47, s. 353 -359. ISSN 1234-1983.