

Studium genetické variability starokladrubských koní pomocí analýzy mitochondriální DNA

Vladimíra Czerneková¹

Tomáš Kott²

Ivan Majzlík³

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

² Výzkumný ústav živočišné výroby, Přátelství 815, 104 00 Praha - Uhřetěves; kott.tomas@vuzv.cz

³ 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 jediné české autochtonní plemeno koní, jež má některé pozoruhodné vlastnosti, díky kterým je zařazeno do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat významných pro výživu a zemědělství. Genetická variabilita tohoto plemene byla studována pomocí sekvenční analýzy 275 bp úseku D-smyčky mitochondriální DNA. Celkem bylo testováno 175 starokladrubských koní. Srovnáním s referenční sekvencí bylo nalezeno 23 polymorfních míst, přičemž ve všech případech se jednalo o substituci. Studované vzorky náležely k 14 haplotypům a 5 haplogrupám. Z předkládaných výsledků je patrné, že studovaní starokladrubští koně mají podobný stupeň polymorfismu jako již dříve studovaná plemena koní.

Klíčová slova Genetická variabilita, mitochondriální 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 Kladru 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. Bílky. Od roku 1996 je populace starokladrubských koní uzavřena přílivu krve jiných plemen koní. V současnosti se jedná o teplokrevné plemeno velkého rámce galakrosiérového typu. Původ starokladrubského koně je možno vysledovat zpět k 8 zakladatelkám čistokrevných klasických rodin (Africa, Almerina, Cariera, Deflorata, Madar, Ragusa, Rava a Sardinia) a 7 zakladatelkám čistokrevných neklasických rodin (Bárta, Dana, Favora, Gita, Narcis, Ritorna a Xandra) (Řád PK starokladrubského koně, 2012).

K popisu rozmanitosti na molekulární úrovni často slouží mitochondriální analýza. Mitochondriální DNA (mtDNA) je zajímavá pro svou velkou variabilitu, malou mírou mutace, maternální dědičnost a nepřítomnost rekombinací (Hagelberg et al. 1999). Nejvariabilnější částí mtDNA je D-smyčka neboli kontrolní oblast. Jedná se o nekódující oblast, jež obsahuje hlavní regulační prvky pro replikaci a expresi mitochondriálního genomu. V současné době je analýza kontrolní oblasti mtDNA jedním z hlavních nástrojů studia genetické variability uvnitř a mezi populacemi koní (Bowling et al. 2002; Cozzi et al. 2004; Ivanković et al. 2009; Kavar et al. 2002; Mirol et al. 2002; Priskin et al. 2010). Cílem této práce bylo zjištění úrovně genetické variability starokladrubských koní.

2. MATERIÁL A METODIKA

Analýzováno bylo celkem 175 zvířat obou barevných variant, jež náležejí k 23 rodinám starokladrubských koní (tabulka 1). Zdrojem DNA byla krev (n=171) a bukalní stěry (n=4). Genomická DNA byla izolována z krve pomocí BloodPrep chemikálií a přístroje ABIPrism 6100 Nucleic Acid PrepStation (Life Technologies, USA). Izolace DNA z bukalních stěrů byla provedena pomocí magnetických částic MagMAX™-96 DNA Multi-Sample Kit (Life Technologies, USA). Horní část D-smyčky (373 bp, nt 15 416 – 15 788) byla amplifikována pomocí primerů DLF a DLR (VÚŽV, Patentový spis CZ 302372 B6).

Reakční směs o objemu 10 µl obsahovala 2 µl DNA (10 až 100 ng), 10 pmol obou primerů a 5 µl 2 x koncentrovaného PPP Master Mixu (Top-Bio, ČR). Amplifikace probíhala v termocykleru TGradient 96 (Whatman Biometra, Germany) podle následujícího programu: úvodní denaturace při teplotě 95 °C po dobu 5 min; pak následovalo 35 opakování následujícího cyklu: denaturace při teplotě 95 °C po dobu 60 s, při teplotě 62 °C po dobu 30 s, při teplotě 72 °C po dobu 60 s. Poté byly PCR produkty enzymaticky přečištěny pomocí alkalické fosfatázy (1,67 U) a exonukleázy ExoI (6,6 U). Sekvenční reakce byla provedena se stejnými primery jako PCR a s BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction chemií (Life Technologies, USA). Vzniklé produkty byly přečištěny BigDye Exterminator purifikačním kitem a poté elektroforeticky separovány přístrojem ABI PRISM™ 3130 Genetic Analyzer (Life

Technologies, USA). Analýza sekvencí byla provedena v programu SeqScape v 2.5 (Life Technologies, USA).

Mohočetné přiřazení sekvencí DNA bylo provedeno pomocí programu Clustal-W (Thompson et al. 1994). Parametry diverzity populace byly vypočteny pomocí DNASP v 5 (Librado et Rozas 2009). Genetické vzdálenosti byly vypočteny a fylogenetický strom byl sestaven pomocí programu PHYLIP (Felsenstein 1993), který byl rovněž použit k provedení bootstrap analýzy pro 1 000 datových souborů. Studované sekvence byly porovnány s 21 nukleotidovými sekvencemi kontrolního regionu mtDNA z databáze NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>). Jako srovnávací byla použita sekvence *Equus asinus* X97337.

Tabulka 1. Seznam sledovaných rodin starokladrbských koní a jejich charakterizace.

	Rodina	Nar.	Barva	Počet vzorků
1	Africa-Maestrosa	1740	bělka/vranka	7
2	Almerina-Albona	1769	bělka	15
3	Almerina-Aluta	1769	bělka	4
4	Almerina-Campanella	1769	bělka/vranka	8
5	Almerina-Egloga	1769	bělka	12
6	Almerina-Formosa	1769	vranka	6
7	Almerina-Maja	1769	bělka/vranka	8
8	Bárta	1953	bělka/vranka	9
9	Cariera	1894	bělka	12
10	Dana	1969	bělka	4
11	Deflorata-Plutona	1767	vranka	2
12	Favora	1963	bělka	9
13	Madar VI	1782	bělka	4
14	Narcis	1939	bělka/vranka	7
15	Ragusa	1888	bělka	13
16	Ragusa-Raguza	1888	bělka/vranka	6
17	Rava-Maga	1755	bělka/vranka	4
18	Rava-Ravana	1755	bělka	6
19	Ritoma	1974	vranka	6
20	Sardinia-Magura	1770	vranka	10
21	Sardinia-Neapolitana	1770	bělka/vranka	7
22	Sardinia-Septimia	1770	bělka/vranka	7
23	Xandra	1938	bělka/vranka	9

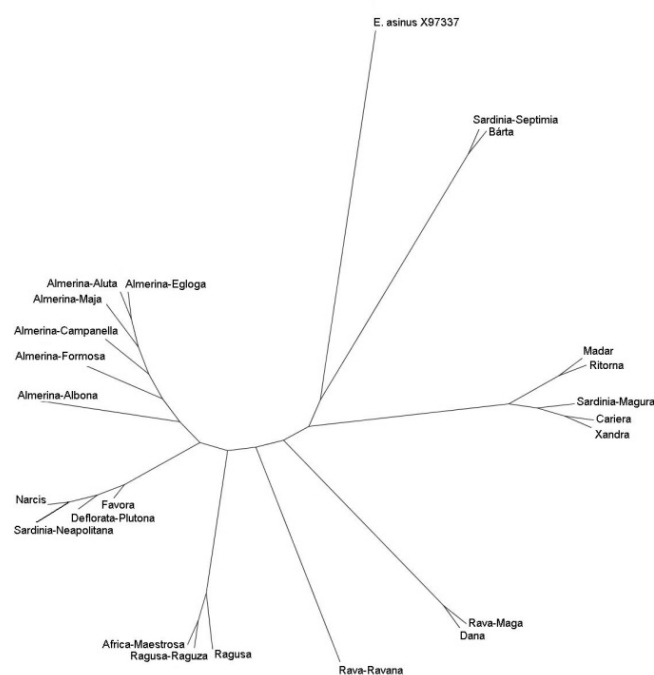
3. VÝSLEDKY A DISKUSE

Byl sekvenován 275 bp úsek D-smyčky mitochondriální DNA. Soubor tvořilo 175 vzorků, jenž náleží k 14 haplotypům (tabulka 2). Srovnáním s referenční sekvencí bylo nalezeno 23 polymorfních míst, ve všech případech se jednalo o substituci. Z tabulky 2 je patrné, že některé haplotypy jsou stejné pro více rodin. Například haplotyp B mají převážně zástupci rodiny Almerina (mimo Almerina-Albona), také haplotyp H je společný 4 rodinám (Deflorata-Plutona, Favora, Narcis a Sardinia-Neapolitana). Studované vzorky se liší o 1 – 9 nukleotidů od srovnávací sekvence (GenBank X79547). Nejméně polymorfni je haplotyp M (rodina Ritoma), jenž má substituci T – C v pozici 15 495. Tato substituce je společná pro všechny sledované haplotypy. Po čtyřech substitucích mají rodiny Africa-Maestrosa, Dana a Madar VI, následují rodiny Deflorata-Plutona, Favora, Narcis, Sardinia-Neapolitana, Ragusa a Ragusa-Raguza s 5 nukleotidovými záměnami. Šest substitucí mají zástupci rodiny Rava-Ravana, sedm záměn mají zástupci rodin Cariera, Rava-Maga, Sardinia-Septimia a Xandra. Mezi nejvíce polymorfni patří rodiny Almerina-Albona

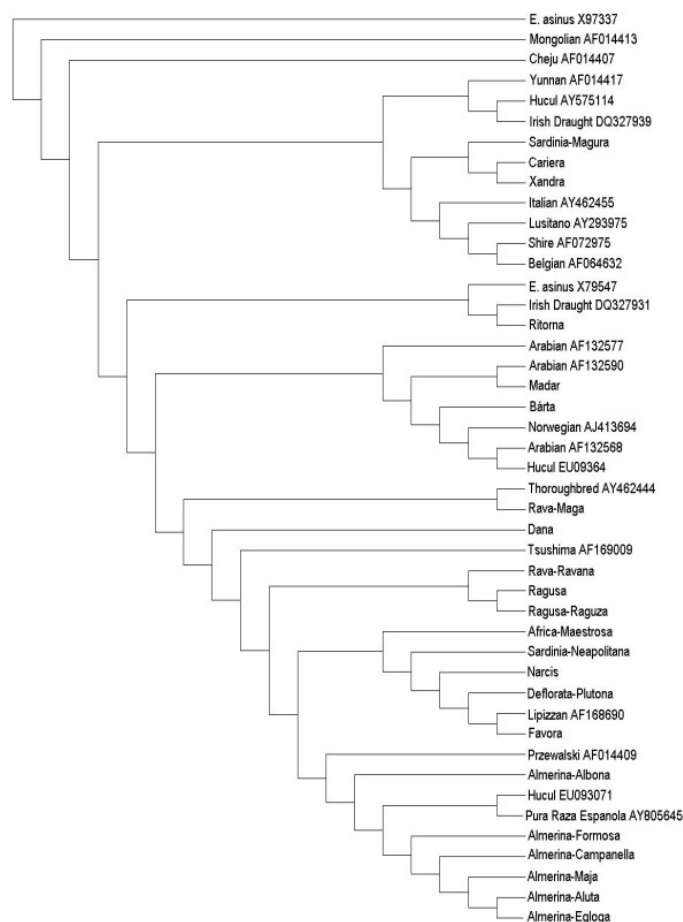
a Bárta s 8 substitucemi a rodiny Almerina-Aluta, Almerina-Campanella, Almerina-Egloga, Almerina-Formosa, Almerina-Maja a Sardinia-Magura s 9 substitucemi. Z uvedeného výčtu je patrné, že studovaní starokladrbských koní vykazují velkou genetickou a malou nukleotidovou diverzitu ($h=0,900$, $\pi=0,018$).

Na obrázku 1 vidíme, že studované vzorky patří do následujících haploskupin A, B, C, D a F (dle Jansen et al. 2002). Nejvíce zastoupenou skupinou je haploskupina A s 66,28 % jedinci. K této skupině patří haplotypy A, B, C, H, J, L a M. Druhou nejpočetnější skupinou je skupina D s 17,73 %, k níž náleží haplotypy E a F. Haplotypy D, I a N mají střední zastoupení (11,43 %) a patří k haploskuni F. Nejmenší počet zástupců mají haploskupiny B a C (2,28 %).

Obrázek 2 porovnává předkládané výsledky s 21 koňskými sekvencemi převzatými z databáze GenBank. Je zřejmé, že D-smyčka mtDNA je velmi polymorfni (Bowling et al., 2002; Cozzi et al., 2004; Hill et al., 2002; Kavar et al., 2002; McGahern et al., 2006; Mirol et al., 2002 a Priskin et al. 2010). Není překvapující, že současná plemena koní nejsou geneticky izolovaná (viz Cieslak et al., 2010). Podobný stupeň polymorfismu byl nalezen v předchozích studiích mtDNA u lipických koní (Cozzi et al., 2004; Kavar et al., 2002). Na základě analýzy pěti vzorků Cozzi et al., 2004 uvádí, že téměř polovina z lipických sekvencí patří k haploskupině C a zbývající k haploskupinám A, B a D (po 20 %). Toto zjištění pravděpodobně pochází z velmi omezeného počtu zkoumaných jedinců. Naproti tomu Kavar et al., 2002 zkoumali 212 jedinců z 56 rodin. Nalezli 37 haplotypů a 4 haploskupiny (C1-C4).



Obrázek 1. Neighbour-joining dendrogram mtDNA haplotypů starokladrbských koní. Sekvence *Equus asinus* (X97337) byla použita jako referenční.



Obrázek 2. Neighbour-joining dendrogram sekvencí D-smyčky mtDNA zástupců rodu *Equus*, včetně sekvencí starokladrubských koní.

4. ZÁVĚR

Jak již bylo zmíněno v úvodu, starokladrubský kůň je jediné české autochtonní plemeno koní, jež má některé pozoruhodné vlastnosti, díky kterým je zařazeno do Národního programu konzervace a využívání genetických zdrojů zvířat významných pro výživu a zemědělství. Pro výběr optimální strategie pro jeho zachování je nezbytné stanovit parametry popisující genetickou rozmanitost tohoto plemene. Předkládané výsledky, které byly získány studiem polymorfismu D-smyčky mitochondriální DNA starokladrubských koní, budou využity v šlechtitelském procesu tohoto plemene.

PODĚKOVÁNÍ

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

Tabulka 2. Haplotypy a nukleotidové substituce studovaných rodin starokladrubských koní. Jako referenční je použita sekvence *Equus caballus* GenBank X79547.

Haplotyp	Rodina	15494	15495	15496	15534	15538	15542	15585	15597	15600	15602	15603	15604	15635	15649	15650	15666	15667	15703	15709	15720
X79547		T	T	A	C	A	C	G	A	G	C	T	G	C	A	A	G	A	T	C	G
A	1	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	A
B	3, 4, 5, 6, 7	.	C	.	.	.	T	A	.	.	T	.	.	T	.	G	A	.	C	.	A
C	2	.	C	.	.	.	T	A	.	.	T	.	.	T	.	G	A	.	.	.	A
D	8	.	C	.	.	.	.	A	G	.	T	.	A	T	.	.	.	G	.	.	A
E	9, 23	C	C	G	T	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	A
F	20	C	C	G	T	.	T	A	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	.	.	A
G	10	.	C	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
H	11, 12, 14, 21	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	.	.	A
I	13	.	C	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
J	15, 16	.	C	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	G	.	.	.	.	A
K	17	.	C	.	.	G	.	A	.	A	T	.	.	.	.	.	.	.	.	T	A
L	18	.	C	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	G	.	.	C	.	A
M	19	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
N	22	.	C	.	.	.	.	.	G	.	T	.	A	.	.	.	G	C	.	.	A

Zdroje

1. Bowling A.T., Del Valle A. & Bowling M. (2000). A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. *Animal Genetics* **31**, 1–7.
2. Cieslak M., Pruvost M., Benecke N., Hofreiter M., Morales A., Reissmann M. & Ludwig A. (2010). Origin and History of Mitochondrial DNA Lineages in Domestic Horses. *Plos One* **5**, Article Number: e15311. Cozzi M.C., Strillacci M.G., Valianti P., Bighignoli B., Cancedda M. & Zanotti M. (2004). Mitochondrial D-loop sequence variation among Italian horse breeds. *Genetics Selection Evolution* **36**, 663–672.
3. Felsenstein J. (1989). PHYLIP - Phylogeny Inference Package v3.2. *Cladistics* **5**, 164–166.
4. Hagelberg, E., Goldman, N., Lió, P., Whelan, S., Schiefenhover, W. Clegg, J.B., Bowden, D.K. (1999). Evidence for mitochondrial DNA recombination in a human population of island Melanesia. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 266, 485–492.
5. Hill E.W., Bradley D.G., Al-Barod M., Ertugrul O., Splan R.K., Zakharov I. & Cunningham E.P. (2002). History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Animal Genetics* **33**, 287–294.
6. Jansen T., Forster P., Levine M.A., Oelke H., Hurles M., Renfrew C., Weber J. & Olek K. (2002). Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **99**, 10905–10910.
7. Kavar T., Brem G., Habe F., Solkner J. & Dovč P. (2002.) History of Lipizzan horse Materna lines as revealed by mtDNA analysis. *Genetics Selection Evolution* **34**, 635–648.
8. Librado P. & Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* **25**, 1451–1452.
9. McGahern A.M., Edwards C.J., Bower M.A., Heffernan A., Park S.D., Brophy P.O., Bradley D.G., MacHugh D.E. & Hill E.W. (2006) Mitochondrial DNA sequence diversity in extant Irish horse populations and in ancient horses. *Animal Genetics* **37**, 498–502.
10. Mirol P.M., Garcia P.P. & Dulout F.N. (2002) Mitochondrial variability in the D-loop of four equine breeds shown by PCR-SSCP analysis. *Genetics and Molecular Biology* **25**, 25–8.
11. Priskin K., Szabó K., Tömöry G., Bogácsi-Szabó E., Csányi B., Eördögh R., Downes C.S. & Raskó I. (2010) Mitochondrial sequence variation in ancient horses from the Carpathian basin and possible modern relatives. *Genetica* **138**, 211–8.
12. Řád plemenné knihy starokladubského koně, 2012. Národní hřebčín Kladruby nad Labem s.p.o., 2012. Dostupné z WWW: <<http://www.nhkladruby.cz/rad-plemenne-knihy>>.
13. Thompson J.D., Higgins D.G. & Gibson T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673–4680.
14. VÚŽV, v.v.i. *Způsob selektivní amplifikace fragmentu mitochondriální DNA u koní*. Původce vynálezu: Czerneková, V., Kott, T., Kyselová, J. Úřad průmyslového vlastnictví. Patentový spis CZ 302372 B6. 13.4.2011.