

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Zemědělská fakulta

Studijní program: N4103 Zootechnika

Studijní obor: Zootechnika

Katedra: Katedra genetiky, šlechtění a výživy zvířat

DIPLOMOVÁ PRÁCE

**Analýza genetického založení zbarvení u vybraných
populací koní v České republice**

Autor diplomové práce:
Bc. Anna Balcarová

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

2013

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH

Fakulta zemědělská
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Anna BALCAROVÁ**
Osobní číslo: **Z11531**
Studijní program: **N4103 Zootechnika**
Studijní obor: **Zootechnika**
Název tématu: **Analýza genetického založení zbarvení u vybraných populací koní v ČR**
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 analýzu genetického založení zbarvení ve vybrané populaci koní v ČR. Analýzy budou provedeny molekulárně genetickými metodami. V závěru by měl být zhodnocen výskyt jednotlivých genotypů ve vztahu ke konečnému zbarvení koní ve vybrané populaci a navržen optimálního přípařovacího plánu pro získání potomků s požadovaným zbarvením.

Práce bude členěna do kapitol:

- 1) úvod
- 2) literární přehled - genetika založení zbarvení obecně a s ohledem na vybraná plemena koní a principy molekulárně - genetických metod, využívaných při analýze genotypů v lokusech se vztahem ke zbarvení srsti u koní - převážně z vědeckých článků v anglickém jazyce
- 3) materiál a metodika - popis vybrané populace koní, 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

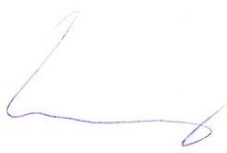
Při zpracování diplomové práce budou dodržena obvyklá formální pravidla.

Rozsah grafických prací: 5 - 7 tabulek, 5 - 10 obrázků
Rozsah pracovní zprávy: cca 50 stran textu
Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická
Seznam odborné literatury:


- Stachurska A., Ussing A.P. (2012): White markings in horses. *Medycyna Weterynaryjna*, 68(2), 74-78.
Rieder S. (2009): Molecular tests for chat colours in horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(6), 415-424.
Thiruvankadan A.K., Kandasamy N., Panneerselvam S. (2008): Coat colour inheritance in horses. *Livestock Science*, 17(2-3), 109-129.
Cook D., Brooks S., Bellone R. Bailey E. (2008): Missense Mutation in Exon 2 of SLC36A1 Responsible for Champagne Dilution in Horses. *PLOS Genetics*, 4(9), AN: e1000195.
Bellone R.R. (2010): Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses. *Animal Genetics*, 41(S2), 100-110.

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

Datum zadání diplomové práce: 15. března 2012
Termín odevzdání diplomové práce: 30. dubna 2013


Ing. Karel Suchý, Ph.D.
proděkan pověřený vedením ZF

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


prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
vedoucí katedry

V Českých Budějovicích dne 15. března 2012

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 25. 4. 2013

.....
Bc. Anna Balcarová

Poděkování

Děkuji Ing. Lence Hanusové, Ph.D. za cenné rady, připomínky, poskytnuté materiály, odborné vedení, všestrannou pomoc a bezmeznou trpělivost při zpracování diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat paní Haně Prenerové za pomoc v laboratoři se zpracováním vzorků. Paní Karle Mendlové z Q Ranche a paní Ivě Práškové z Ranče pod Jasany za poskytnutí vzorků a informací o jejich koních.

Abstrakt

Cílem mé diplomové práce bylo provést analýzu genetického založení zbarvení ve vybrané populaci koní v ČR. Pro analýzu jsem si zvolila koně plemene Paint horse. Charakterizovala jsem toto plemeno, zabývala se pigmentací a charakteristikou barev a typů vzorů u Paint horse. Dále jsem popsala metody, které jsem následně použila v praktické části. Bylo odebráno 11 vzorků krve koní, u kterých byla zjišťována přítomnost mutace v *KIT* genu.

Klíčová slova: genetika, zbarvení, koně

Abstract

The aim of this thesis was to analyze the genetic foundation of color in a selected population of horses in Czech Republic. For the analysis, I chose horse breed Paint horse. I characterized this breed, dealing with pigmentation and characteristic colors and patterns in the Paint horse. I also described the methods that I then used in the practical part. It was collected 11 blood samples from horses, in which was detected the presence of *KIT* gene mutation.

Keywords: genetics, colouring, horses

Obsah

1.	Úvod.....	10
2.	Paint horse.....	11
2.1.	Historie plemene Paint horse.....	11
2.2.	Standard plemene Paint horse	12
2.3.	Pravidla registru American Paint Horse Association	13
2.4.	Pigmentace a charakteristika barev u Paint horse	14
2.4.1.	Pigmentace	14
2.4.2.	Další faktory ovlivňující pigmentaci.....	15
2.4.3.	Charakteristika barev u Paint horse	15
2.4.3.1.	Bay	15
2.4.3.2.	Black	16
2.4.3.3.	Brown.....	16
2.4.3.4.	Sorrel.....	17
2.4.3.5.	Chestnut	17
2.4.3.6.	Dun.....	18
2.4.3.7.	Red Dun	18
2.4.3.8.	Grullo	19
2.4.3.9.	Buckskin	19
2.4.3.10.	Palomino.....	20
2.4.3.11.	Gray	20
2.4.3.12.	Red roan	21
2.4.3.13.	Blue roan	21
2.4.3.14.	Bay roan	22
2.4.3.15.	Cremello	22
2.4.3.16.	Perlino	23
2.5.	Typy zbarvení.....	23
2.5.1.	Tobiano	23
2.5.2.	Overo.....	24
2.5.3.	Frame overo	25
2.5.4.	Splashed white	25
2.5.5.	Sabino.....	26
2.5.6.	Tovero	27
3.	Genetika	28
3.1.	Genetika jednotlivých typů zbarvení.....	28
3.1.1.	Tobiano	30
3.1.2.	Overo.....	31
3.1.3.	Frame overo	31
3.1.4.	Sabino.....	32
3.1.5.	Splashed white	33
4.	Použité metody.....	34
4.1.	Příbuzenská plemenitba.....	34
4.2.	Izolace DNA.....	35
4.3.	Kontrola izolovaného DNA.....	35
4.3.1.	Popis průběhu elektroforézy	36
4.4.	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	37
4.4.1.	Historie PCR	37
4.4.2.	Princip PCR.....	39
4.4.3.	Složení PCR směsi	40

4.5.	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)	43
4.6.	Analýza genových a genotypových frekvencí v populacích	43
4.6.1.	Genotypové frekvence	43
4.6.2.	Genové (alelové) frekvence	44
4.7.	Pearsonův χ^2 test.....	44
5.	Materiál a metodika.....	45
5.1.	Materiál	45
5.2.	Výpočet koeficientu příbuzenské plemenitby podle Wrighta	50
5.3.	Izolování DNA	50
5.4.	PCR – exon 17 v <i>KIT</i> genu.....	50
5.5.	RFLP	51
5.6.	Statistické zhodnocení	52
5.7.	Připravovací plány	53
6.	Výsledky a diskuze	54
6.1.	Výpočet koeficientu příbuzenské plemenitby podle Wrighta	54
6.2.	Izolace DNA.....	54
6.3.	Genotypizace lokusu pro <i>KIT</i> gen.....	54
6.4.	Statistické zhodnocení	55
6.4.1.	Genotypové frekvence	55
6.4.2.	Genové (alelové) frekvence	56
6.4.3.	Testování odchylky od Hardy – Weinbergovy rovnováhy	57
6.5.	Návrh přípravovacích plánů podle Mendela	58
7.	Závěr	61
8.	Seznam literatury	62
9.	Přílohy	67

1. Úvod

Pro koně, dříve volně žijící zvíře, bylo důležité zbarvení jeho srsti. Dříve museli mít koně zbarvení takové, aby jim pomáhalo ukrýt se před predátory a splynout tak s přírodou. V dnešní době je zase zbarvení často rozhodujícím faktorem při koupi koně nebo při výběru plemeníka pro připouštěné klisny. Zbarvení koní je ovlivněno celou řadou genů, které působí na výsledný fenotyp.

Přesto, že výzkum dědičnosti barev u koní podléhá rychlému vývoji, je její znalost přínosná pro chovatele. Ti mohou díky znalosti genetiky barev u koní dosáhnout požadované barvy hříbete nebo předejít smrtelným dědičným chorobám, které jsou s genetikou spjaty. Také mohou předejít problémům při registraci koní, kde díky neznalosti jsou někteří koně zaregistrováni s jinou barvou, než ve skutečnosti mají.

Nejen v České republice došlo k velkému rozmachu tzv. westernových plemen. Důkazem toho je nárůst zaregistrovaných koní např. plemene Paint horse. Česká asociace Paint horse měla na začátku roku 2012 již 1018 zaregistrovaných koní v České republice.

Některé asociace zvyšují zájem o genetiku i tím, že pro registraci koní jsou povinné genetické testy na určení zbarvení nebo na přítomnost dědičných chorob. Výsledky takových testů pomáhají následně lépe sestavovat přípařovací plány, které slouží ke spojení jedinců, ze kterých chovatelé dostávají kvalitní, zdravá a často atraktivně zbarvená hříbata. Ta posléze mohou prodat za vyšší cenu, protože poptávka po méně častých zbarveních neustále roste.

Téma diplomové práce jsem si vybrala proto, že mě téma genetiky barev u koní zajímá, stejně jako westernová plemena. Pro svou práci jsem si vybrala koně plemene Paint horse, protože genetika jejich vzorů je pro mne zajímavá tím, že nikdy nenaleznete dva stejně strakaté jedince.

2. Paint horse

2.1. Historie plemene Paint horse

V roce 1519 se španělský mořeplavec Hernando Cortes plavil do Nového světa, aby našel jeho slávu a bohatství. Se svou družinou dobyvatelů přivedl koně, kteří měli sloužit k pomoci při hledání velkého pozemku, který měl skrývat bohatství. Podle španělského historika Diaz del Castillo, který cestoval s expedicí, jeden z koní byl popisován jako „pinto s bílými ponožkami na nohách“, další byl popisován jako „silně prokvetlý s bílými skvrnami“. Jednalo se o první záznamy popisů koní Paint v Novém světě.

Kolem roku 1800 byly západní pláně obydleny velkými stády koní, mezi nimiž se objevovali i zvláštní skvrnití koně. Pro jejich barvu, skvrnitost, honosnost a výkon se brzy stali oblíbenými koňmi amerických indiánů. Komančové, kteří byli považováni za nejrychlejší jezdce na rovinách, měli velká stáda strakatých koní. Důkazem toho jsou malby koní nalezené na stanech Komančů. (www.apha.com)

Dnes už ne zjistíme geny, které způsobily, že se strakaté zbarvení začalo objevovat i u dobytkařských koní, ze kterých později vzešlo plemeno Quarter horse. Pravdou zůstává, že barvu nikdo neřešil – výkonnost, pracovitost, odolnost a spolehlivost byly pro majitele koní větší prioritou. Pak ale přišlo v roce 1942 založení American Quarter Horse Association (AQHA). Z koní, kteří jeden den běhali po světě jako strakatí quarteři, se přes noc stal „bezpapírový odpad“. Nová asociace rozhodla, že z chovu quarterů vyloučí jakýkoli náznak skvrn a fleků.

Tím vznikla početná množina kvalitních koní, která se stala najednou chovatelsky bezcennou. Naštěstí se našly i osoby prozíravější, mezi nimi i dnes už legendární Rebecca Lockhartová. S přesvědčením o kvalitách strakatých rančerských koní oslovila další chovatele, kteří rovněž odmítali vzdát se dobrých koní jen kvůli barvě, a navrhla jim založení vlastního registru. (LEČÍKOVÁ, 2012)

V roce 1962 vzniká asociace pro zachování strakatého i jednobarevného typu koní – American Paint Stock Horse Association (APSHA). Po krušných začátcích asociace 11. srpna 1962 Rebecca Lockhartová zaznamenává rodokmen prvního amerického Paint horse, kterým byl černobílý tobiano hřebec Bandits Pinto, kterého vlastní pan McKinney z ranče Flying M v Texasu. Na konci roku 1962 má asociace 150 členů a 250 registrovaných koní.

Mezitím v Abilene v Texasu vzniká další asociace bojující za milovníky strakatých koní – the American Paint Quarter Horse Association. Tato skupina nikdy nebyla schopna fungovat samostatně, takže bojovala o fúzi s American Paint Stock Horse Association. Po dlouhých debatách byli členové obou asociací schopni dosáhnout shody a v květnu roku 1965 vede spolupráce k založení American Paint Horse Association. Stará asociace s novým názvem měla ke konci roku 1965 1300 členů a 3800 registrovaných koní. (www.apha.com)

Ke konci 80. let dochází k velkému nárůstu počtu registrovaných paintů a před několika lety překročil jejich počet milion. Tyto koně je možno najít v 59 zemích světa, na všech osídlených kontinentech. Po American Quarter Horse Association je American Paint Horse Association druhou největší koňskou asociací na světě se 64 tisíci aktivními členy. V celé řadě zemí fungují mezinárodní kluby a pobočky American Paint Horse Association a Česká republika není výjimkou.

Paint Horse Club ČR vznikl díky Zdence a Andree Polákových z Hořic u Blanska. Dosáhly toho, že český klub byl v roce 1998 zapsán u American Paint Horse Association jako oficiální klub. Přes nesnadné začátky je dnes klub stabilizovaným prvkem westernové scény s členskou základnou kolem 90 aktivních členů (LEČÍKOVÁ, 2012).

Na začátku roku 2012 má česká asociace Paint horse registrováno 1018 koní (www.czpha.cz). S tímto počtem patří Česká republika k lepší evropské polovině a předčila i státy, které začínaly s vedením klubu i s desetiletým předstihem. Dění klubu se soustřeďuje především na dvě akce – každoroční Paint Horse Show, která s počtem kolem 200 startovních koní patří do evropského nadprůměru, a dále Paint Trail Ride, což je rekreační vyjížďka přátel paintů a klubu a je jediná svého druhu v Evropě (LEČÍKOVÁ, 2012).

2.2.Standard plemene Paint horse

Paint horse je v podstatě Quarter horse s nepravidelnými bílými skvrnami po těle. (HERMSEN J., 1997)

Genetická provázanost obou plemen je velká, takže stavbou těla jsou prakticky tato plemena totožná. Také jejich využití bylo shodné – pomáhali osidlovat Nový svět, budovali legendy o Divokém Západu a sloužili k práci i zábavě. Právě jejich univerzálnost z nich dělala vyhledávané koně pro práci na ranči – painti, stejně jako

quarteri, byli schopni v jednom dni chodit v pluhu, ve voze, pod sedlem a ještě běhat dostihy.

Charakteristická kohoutková výška pro toto plemeno je kolem 155 cm. V dnešní době specializací – a zejména vlivem křížení s anglickým plnokrevníkem pro účely moderních anglických disciplín – nejsou výjimkou koně s kohoutkovou výškou přes 160 cm. Proto platí, že původní širokoplecí osvalení jedinci na krátké holeni stojí dnes v registru bok po boku s jedinci štíhlými, dlouhokrkými, na první pohled stěží rozeznatelnými od plnokrevníků.

Pro plemeno je typická obvykle hezká hlava s výraznými očima a malými ušima. Na první pohled zaujmou velké žuchly a nezvykle malá huba. Přední nohy jsou díky široké hrudi postavené daleko od sebe a při pohledu z boku jsou výrazně osvalené. Totéž platí i o zadních nohách. Stačí jeden pohled a i laik pozná, kde je největší síla paintů – mohutná záď s pletenci svalů sbíhajícími až k hlezňům v sobě ukrývá skutečně velkou sílu, nezbytnou jak pro práci s dobyt看em, tak i při moderních disciplínách westernového ježdění (LEČÍKOVÁ, 2012).

Paint horse se mohou vyskytovat ve všech barvách, které jsou uznané American Paint horse Association. K tomu se vyskytují ve dvou základních typech zbarvení – tobiano a overo. Typ zbarvení overo má ještě 4 podskupiny – frame overo, splashed white, sabino a tovero.

2.3. Pravidla registru American Paint Horse Association

Jestliže má být v dnešní době zaregistrován kůň jako Paint horse, musí mít alespoň jednoho z rodičů registrovaného u American Paint Horse Association. Druhý z rodičů může být neregistrovaný Paint, Quarter horse nebo anglický plnokrevník. S nástupem nového tisíciletí skončila doba, kdy se registrovali strakatí potomci dvou Quarter horse (tzv. „outcrops“).

Hřebci, kteří mají působit v chovu, musí být staří alespoň 2 roky, musí mít test DNA a musí být uchovněni u APHA. Klisny nejsou v chovu limitovány, nemusí mít ani test DNA, který je požadován například u klisen Quarter horse.

Hříbě, které má být registrováno v základním registru strakatých koní, musí splňovat minimální požadavky na barvu, tzn. musí mít alespoň jednu bílou skvrnu o průměru 5 a více centimetrů na barevném podkladě mimo oblast nohou a hlavy. Doplnkové znaky, jako jsou pruhovaná kopyta nebo modré oči, nestačí pro zařazení

do základního registru. Pokud se však neprokáže ani minimální rozsah bílých znaků potřebných k registraci, je kůň zaregistrován do takzvaného solid paint bred registru. (LEČÍKOVÁ, 2012)

Do solid paint bred registru může být registrován takový jedinec, který splňuje podmínku jednoho rodiče plemene Paint horse. Strakatí koně jiných plemen, například teplokrevníci, arabi, koně chladnokrevní nebo jejich kříženci, se u APHA neregistrují. (www.czpha.cz)

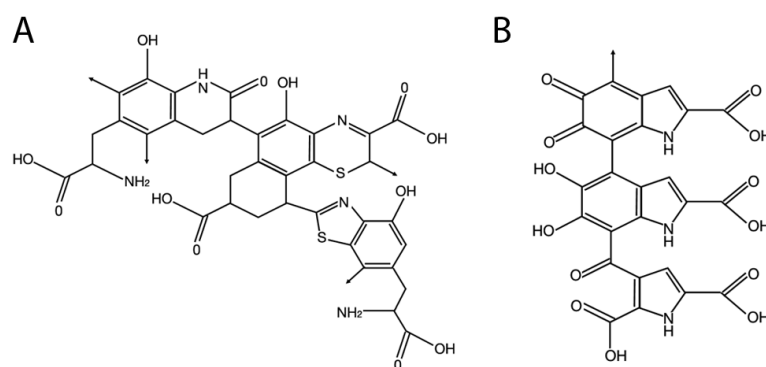
2.4.Pigmentace a charakteristika barev u Paint horse

2.4.1. Pigmentace

Barva srsti koně je podmíněna celou řadou faktorů. Tím nejzákladnějším je pigmentace.

Při všech barvách koní, které se navíc vyskytují v desítkách odstínů, je téměř neuvěřitelné, že všechno to mají na starost pouhé dva typy pigmentů. Prvním z nich je eumelanin (černohnědý) a druhým feomelanin (červenozlutý). Na tyto pigmenty následně působí řada genů, které modifikují základní zbarvení srsti, ředí základní barvu nebo vytvářejí skvrny a fličky (LEČÍKOVÁ, 2005).

Melanin je označení pro hnědý až černý pigment, který se vyskytuje v tělech živočichů, rostlin i prvoků. Z chemického hlediska je odvozen z aminokyselin tyrosinu či tryptofanu, jež jsou oxidovány a zpolymeryzovány. Nejběžnější formou je hnědočerný polymer eumelanin. Další běžná forma je červenohnědý polymer feomelanin, který je zodpovědný za zrzavé vlasy a pihy. Oba mají mírně odlišnou chemickou strukturu (KING, 2006).



Obr. 1: Molekulární struktura feomelaninu (A) a eumelaninu (B).

2.4.2. Další faktory ovlivňující pigmentaci

Na vnímání barvy působí též dopad a odraz světla, šířka dřevného sloupce krycích chlupů a množství v nich obsaženého vzduchu, od kterého se odrážejí světelné paprsky. Při větším množství vzduchu v dřevné vrstvě i při pigmentované korové vrstvě působí srst světleji; pokud by v korové vrstvě pigment nebyl, bude se jevit taková srst jako bílá. Koně s bílou srstí na tmavošedě pigmentované kůži jsou leucističtí bělouši; pokud kůže není pigmentovaná, jsou to albíni. Koně, jejichž srst je zbarvena jen normálním pigmentem, mají srst buď po celém těle červenou v různých odstínech – ryzáci, nebo mají srst žlutou v různých odstínech – isabely. Koně, kteří kromě žlutého nebo červeného pigmentu mají srst zbarvenou též melaninem (buď po celém těle, nebo na spodní části končetin, hřívě a hlavě), jsou plaváci, hnědáci a vraníci (DUŠEK A KOL., 2007).

2.4.3. Charakteristika barev u Paint horse

Charakteristika barev je totožná s jinými plemeny, vynecháno je pouze zbarvení white. V práci uvádím anglické názvosloví, protože dle mého názoru je přesnější než české názvosloví. U Paint horse je možnost jakékoliv základní barvy, ale na rozdíl od jiných plemen je možnost bílých znaků.

2.4.3.1. Bay

Srst je hnědé barvy v různých odstínech od světle až po tmavě rezavou. Hřívá, ohon a nohy jsou černé. Oči a kůže jsou tmavé. V českém názvosloví označován jako světlý hnědák.



Obr. 2.: zbarvení bay u Paint horse



Obr. 3.: zbarvení u Clevelandského hnědáka

2.4.3.2. Black

Chlupy bývají vždy černé, bez příměsi jiné barvy. Ocas a hříva jsou černé, nebo kombinované s bílou. Kůže a oči mají tmavou barvu. Často se rodí s modrošedým nádechem, ale přelínají na čistě černou. Nemají světlejší odstín barvy ve slabinách nebo na hlavě. V českém názvosloví vraník.



Obr. 4.: zbarvení black u Paint horse

2.4.3.3. Brown

Barva srsti je tmavě hnědá bez nádechu do rezava. Od vraníka jej poznáme podle světlejších míst kolem očí, nozder a ve slabinách. Ocas a hříva mají černou barvu. Kůže i oči bývají tmavé. V českém názvosloví je toto zbarvení tmavý hnědák.



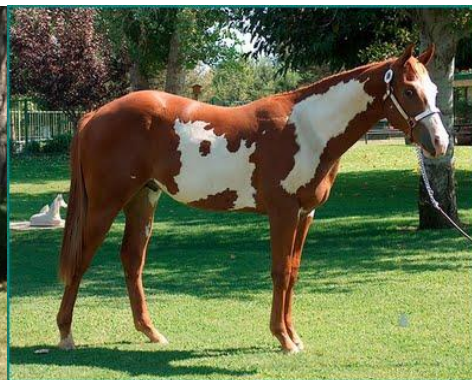
Obr. 5.: zbarvení brown

2.4.3.4. Sorrel

Tělo bývá červené, rezavé či s měděným nádechem. Ohon a hřívu mají ve stejné barvě nebo bývají světlejší. Oči a kůže jsou tmavé. V českém názvosloví ryzák.



Obr. 6.: zbarvení sorrel



Obr. 7.: zbarvení sorrel u Paint horse

2.4.3.5. Chestnut

Barva chlupů je tmavě rezavá až rezavohnědá (játrová barva), někteří jedinci mohou připomínat zbarvení black, ale chestnut poznáme podle světlejších míst ve slabinách. Hřívá a ohon jsou stejné barvy jako tělo, nebo mohou být světlejší. Kůže i oči mají tmavou barvu. V českém jazyce by bylo možno označit za tmavého ryzáka.



Obr. 8.: zbarvení chestnut

2.4.3.6. Dun

Srst je žluté až plavé barvy. Ocas a hřívá jsou černé nebo tmavě hnědé. Kůže a oči mají tmavou barvu. Objevují se primitivní znaky, jako například úhoří pruh nebo zebrování. České názvosloví nemá ekvivalent pro toto zbarvení.



Obr. 9.: zbarvení dun

2.4.3.7. Red Dun

Obdoba barvy dun s červeným nádechem. Hřívá a ohon jsou rezavé, kůže a oči tmavé. Český jazyk nemá ekvivalent pro toto zbarvení.



Obr. 10.: zbarvení red dun

2.4.3.8. Grullo

Tělo je kouřového nebo myšího zbarvení. Nejde o směs bílých a černých chlupů, každý jednotlivý chlup musí být šedý. Hříva a ohon jsou černé. Oči a kůže tmavé. Běžně se vyskytuje úhoří pruh. Český ekvivalent není.



Obr. 11.: zbarvení grullo

2.4.3.9. Buckskin

Tělo je žluté, zlatavé nebo v barvě jelenice. Ohon a hříva jsou černé, stejně tak jako nohy. Oči a kůže mají tmavou barvu. Neobjevují se primitivní znaky. Česky označen jako plavák.



Obr. 12.: zbarvení buckskin

2.4.3.10. Palomino

Vyznačuje se žlutou až zlatavou barvou. Hříva a ohon jsou bílé, žluté nebo zlaté. Oči a kůže mají kontrastní tmavou barvu. Nikdy se neobjevují primitivní znaky. Česky označeno jako isabela nebo žluták.



Obr. 13.: zbarvení palomino

2.4.3.11. Gray

Tělo pokrývá směsice chlupů bílé barvy a ostatních barev. Tito koně se rodí úplně nebo částečně tmaví a s věkem světlají. S věkem vyběluje i hříva a ohon. Kůže a oči jsou tmavé. V češtině se nazývají jako vybělující bělouši.



Obr. 14.: Zbarvení gray

2.4.3.12. Red roan

Tělo tvoří směsice bílých a rezavých chlupů. Ohon a hříva jsou ve stejné barvě. Česky nevybělující bělouš červený.



Obr. 15.: zbarvení red roan

2.4.3.13. Blue roan

Má směs bílých a černých chlupů. Hříva a ohon jsou ve stejné barvě. Kůže a oči jsou tmavé. Se vzrůstajícím věkem toto zbarvení nevyběluje. Česky nevybělující bělouš mourek.



Obr. 16.: Zbarvení blue roan

2.4.3.14. Bay roan

Srst bay roan tvoří směsice bílých a hnědých chlupů. Hřívá a ohon jsou černé. Česky nevybělující bělouš hnědý.



Obr. 17.: zbarvení bay roan

2.4.3.15. Cremello

Tělo má smetanovou, žlutavou, slonovinovou či téměř bílou barvu. Hřívá a ohon jsou stejné barvy. Oči bývají modré nebo bezbarvé. Kůže je růžová. Čestina zatím ekvivalent nemá.



Obr. 18.: zbarvení cremello

2.4.3.16. Perlino

Koně zbarvení perlino se vyznačují smetanovou až téměř bílou barvou. Hřívá a ohon jsou tmavší než tělo, většinou světle rezavé nebo světle hnědé. Oči bývají modré nebo bezbarvé. Kůže je růžová. Čeština zatím ekvivalent nemá.



Obr. 19.: zbarvení perlino

2.5. Typy zbarvení

U koní Paint horse se vyskytují nepravidelné, asymetrické skvrny, kdy je bílá v kombinaci s jednou ze základních barev. Dělí se do dvou skupin tobiano a overo. Vzor overo je rozdělován ještě na frame overo, sabino a splashed white (THIRUVENKADAN, 2008). Americká asociace Paint horse ještě zařazuje vzor tovero, který je kombinací vzorů tobiano a overo.

2.5.1. Tobiano

Název genu má historii v Argentině, kde je zvykem pojmenovávat barvy po významné události nebo člověku. Tobiano získalo pojmenování po události z roku 1800, kdy generál Tobias zachránil Buenos Aires během vojenské akce. Mnoho členů Tobiasova vojska jelo na koních z Brazílie, kteří měli právě vzor později známý jako tobiano (BOWLING, SPONENBERG, 1996).

Obecnou charakteristikou tobiano vzoru jsou všechny čtyři nohy bílé, přinejmenším pod kolena nebo hlezna, bílé skvrny na těle přecházející přes hřbet, mezi ušima a ocasem. Hlava má zpravidla minimální značení, stejně jako u jednobarevných koní a oči jsou tmavé (THIRUVENKADAN, 2008).

Skvrny tobiano mají pravidelný, oválný nebo kulatý tvar. Rozsah pigmentace se pohybuje mezi 20 – 80 % (HAASE, 2008).

Dalším znakem tohoto zbarvení je pigmentovaná kůže na přechodu barevné a bílé srsti, což vytváří dojem stínu či svatozáře. Poslední zvláštnost tvoří tzv. inkoustové skvrny, tj. menší barevné skvrnky ve větší bílé ploše. Tyto skvrny jsou většinou malé a kulatého tvaru (BOWLING, SPONENBERG, 1996).

Vzor je přítomný již při narození hříběte a zůstává stabilní po celý život, tedy nemění se s věkem koní (HAASE, 2008).

Tobiano vzor se nevyskytuje u Quarter horse, plnokrevníků a arabských koní. Je však přítomný u bohaté škály plemen jako je Paint horse, Tennessee walking horse, islandských, shetlandských nebo miniaturních koní (THIRUVENKADAN, 2008).



Obr. 20.: Vzor tobiano

2.5.2. Overo

Druhým typem uznávaného skvrnění je overo. Název pochází ze španělštiny a znamená strakatý. Dříve, v jižní Americe, byl tento termín používán pro všechny typy strakatosti, ať už tobiano, overo nebo blanket a leopard vzory, které jsou typické pro plemeno Appaloosa. V Argentině se název užívá stále pro všechny druhy skvrnitosti odlišných od tobiano. Ve Spojených státech jednotný název vedl ke směšování tří různých typů skvrnitosti a výsledkem byl zmatek při registracích a v chovných programech. Dnes název overo zahrnuje tři geneticky odlišné formy: frame overo, sabino a splashed white (BOWLING, SPONENBERG, 1996).



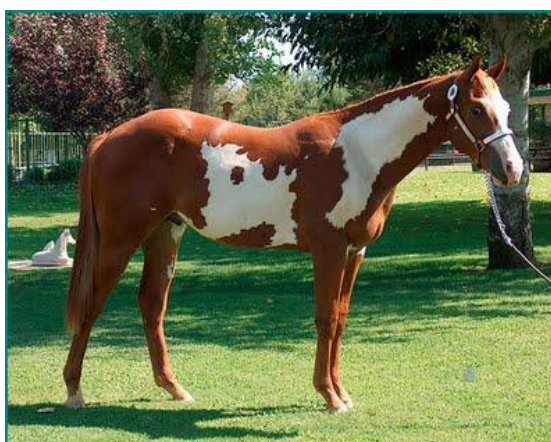
Obr. 21.: Vzor overo



Obr. 22.: Vzor overo

2.5.3. Frame overo

Anglický název frame overo, tedy orámovaný, poukazuje na vzhled, kdy bílá skvrna ve středu těla je orámovaná barevnými plochami. Hlava je poměrně obvykle hodně bílá, oči bývají modré. Nohy jsou většinou tmavé, i když bílé znaky nejsou závadou. Bílé plochy jsou ostře a čistě ohraničené od barevných ploch. Kůže na přechodu barev je pigmentovaná, takže vytváří dojem stínu či svatozáře. Vzor frame overo se vyskytuje v omezeném rozsahu plemen koní. Zatím vše naznačuje tomu, že se objevuje pouze v chovech, které mají španělské předky, jako např. Paint horse (BOWLING, SPONENBERG, 1996).



Obr. 23.: Vzor Frame overo

2.5.4. Splashed white

Splashed white je nejvzácnější skvrnitý vzor, i když je dnes stále častější díky chovatelům používajícím více skvrnitých koní ve šlechtitelských programech. Toto zbarvení vypadá, jako by byl kůň namočený do bílé barvy. Nohy jsou bílé, stejně jako spodní partie břicha. Hlava bývá také bílá a oči modré. Okraje skvrn jsou ostré a čisté, bez prokvetlosti (BOWLING, SPONENBERG, 1996).



Obr. 24.: Vzor Splashed white

2.5.5. Sabino

Ze španělštiny se tento výraz překládá jako kropenatý. Koně se zbarvením sabino mají obvykle čtyři bílé končetiny. Bílá barva se rozšiřuje na tělo koně v jakoby rozedraných záplatách. Hlava je z větší části bílá a oči modré. Často se také vyskytuje jedno oko modré a druhé hnědé. Často dochází k zaměňování s koňmi zbarvení roan, ale na rozdíl od nich nemají typické tmavé hlavy. Také dochází k zaměňování s koňmi plemene Appaloosa, protože někteří jedinci jsou téměř bílí, pouze s barvou na uších, hrudi a kořeni ocasu (BOWLING, SPONENBERG, 1996).

Pro sabino jsou charakteristické bílé znaky na hlavě, od několika bílých chlupů po rozsáhlou lucernu. Není předepsáno, kolik nohou musí mít sabino bílé, ale vždy to musí být alespoň jedna s bílou korunkou až po punčochu. Bílé skvrny začínají na bříše a rozpínají se ke hřbetu. Okraje skvrn jsou prokvetlé, neostré. Prokvétání nemusí být u hříbat patrné a může se věkem rozšiřovat. Kůže bývá na některých místech tečkovaná. Některá minimálně projevená sabina nemusí mít odznaky na hlavě vůbec (CHALUPOVÁ, 2006).

Skvrnitost podobná vzoru sabino byla nalezena také u myší, prasat a lidí. Mezi mnoha zdokumentovanými vzory u myší se sabinu nejvíce podobaly ty, které byly vytvářeny působením *KIT* genu na lokusu *W* (white, způsobující bílé zbarvení). Heterozygoti s tímto genem mají bílé znaky na trupu, které se rošiřují až na končetiny a bílé skvrny na hlavě. Homozygoti mají černé oči a jinak jsou zcela bílí. Dominantní forma a jiné podobné skvrnitosti na *W* lokusu jsou způsobeny mutací, která se týká kinázové domény na *KIT* receptoru (BROOKS, 2005).

Vzhledem k podobnosti mezi fenotypy sabino vzoru u koní a dominantní bílou u myší, se předpokládá, že *KIT* gen je zodpovědný za vzor sabino.



Obr. 25.: Vzor Sabino

2.5.6. Tovero

Je zbarvení, které nastává při narození hříběte, které nese charakteristické rysy obou zbarvení – tedy tobiano a overo. Tovero můžeme charakterizovat pomocí tmavého pigmentu kolem uší, na čele, někdy až kolem očí, jindy kolem huby, odkud stoupá na líce. Jedno nebo obě oči jsou modré. Mívá tmavé skvrny na hrudi, které mohou stoupat na krk, skvrny ve slabinách, které mohou menšími skvrnami pokračovat dopředu na trup a skvrny okolo kořene ocasu (LEČÍKOVÁ, 2005).



Obr. 26.: Vzor tovero



Obr. 27.: Vzor tovero

3. Genetika

3.1. Genetika jednotlivých typů zbarvení

Geny způsobující bílou barvu a skvrnitost jsou zodpovědné za skupinu fenotypů zahrnující smíšení bílých a barevných chlupů. Patří mezi ně zbarvení roan, kdy je tělo prokvetlé a hlava zůstává nedotčena, skvrnitost tobiano, overo, sabino, frame overo, splashed white a leopard komplex, kde se objevují bílé skvrny různé velikosti, rozsahu a umístění. Třetí skupinou je úplná depigmentace, ke které dochází v důsledku působení dominantní bílé (RIEDER, 2009).

U koní byly nezávisle na sobě zmapovány čtyři nepigmentované fenotypy: roan, dominantní bílá, sabino a tobiano. Všechny byly zmapovány v oblasti chromozomu 3 (*ECA3*) ukrývající *KIT* gen. Sabino vzor je způsoben vnitřní mutací v *KIT* genu, který způsobuje částečné vynechání exonu 17. Tobiano vzor je způsoben velkou chromozomální inverzí, která narušuje případný regulační prvek po proudu *KIT* genu.

KIT obsahuje extracelulární doménu složenou z pěti domén imunoglobulinů, jedné transmembránové domény, juxtamembránové domény a intracelulární protein kinázy. *KIT* ligand, také faktor kmenových buněk (stem cell factor), se váže na *KIT* gen přes druhou a třetí extracelulární doménu imunoglobulinu.

KIT gen má potenciál podílet se na různých signálních drahách, které tvoří jeho důležitou roli v regulaci buněčné diferenciaci, proliferaci, přežití a motilitě. Úplná ztráta funkce *KIT* genu způsobuje prenatální či perinatální úhyn v důsledku anémie. *KIT* gen je zásadní pro vývoj a přežití melanoblastů, žírných buněk, spermatogonií a intersticiálních Cajalových buněk v zaživacím traktu (HAASE *et al.*, 2007).

U lidí, myší, prasat a koní byly stanoveny různé mutace v *KIT* genu. Kromě poruch pigmentace má *KIT* gen i pleiotropní účinky. U myší vedou mutace v *KIT* genu ke změně barvy srsti, anémii nebo samčí sterilitě. U lidí byla *KIT* mutace identifikována jako příčina piebaldismu – autozomálně dominantní porucha pigmentace. *KIT* mutace se považuje také jako příčina gastrointestinálních stromálních nádorů, leukémie a mastocytózy. U prasat

způsobuje *KIT* mutace bílé zbarvení srsti a smíšenou barvu srsti u plemene Hampshire (HAASE *et al.*, 2009).

Ve chvíli, kdy prekursor melanocytů potlačující *KIT* gen dosáhnou epidermis, rozšiřují se během dalších 2 - 3 dnů po povrchu embrya. Exprese začíná od hlavy a pokračuje přes hřbet k ohonu. Mutace v *KIT* genu nebo *KITLG* blokují migraci stejně, jako přežití částic melanocytů. Mnoho z mutací v *KIT* genu je charakterizováno rozsáhlými chromozomálními inverzemi nebo delecemi (WEHRLE-HALLER, 2003).

U koní se *KIT* gen nachází na *ECA3q21*. Chromozom *ECA3* je dlouhý 119 479 920bp, obsahuje 32 genů kódujících známý protein, 803 genů kódujících nový protein a 146 pseudogenů. *KIT* gen je dlouhý asi 80 tisíc bp a obsahuje 22 exonů (CHALUPOVÁ, 2008).

Fenotyp	Lokus, symbol a zkratka genu	Alely a typ mutace	Způsob dědění, asociace, interakce
Overo	Overo (O), <i>EDNRB</i>	<i>O/o, O/O</i> Mutace dinukleotidu <i>IC353-354AG</i>	epistatická ke všem barvám, homozygotní jedinci mají OLWS, OLWS se dědí recesivně
Tobiano	Tobiano (TO), <i>KIT</i>	<i>TO/to, TO/TO</i>	autosomálně dominantní
Sabino	Sabino (SB), <i>KIT</i>	<i>SB/sb, SB/SB</i> , KI16 + 1037 A báze nahrazeny T s A - přeskočení exonu 17 (Sabino 1 - <i>SBI</i>)	autosomálně dominantní, epistatická ke všem barvám, homozygoti <i>SBI</i> jsou téměř zcela bílí

Tab. 1: přehled fenotypů, označení genů, způsob dědění (RIEDER, 2009)

3.1.1. Tobiano

Zbarvení tobiano má na starosti dominantní gen *TO*. Nejčastěji se vyskytují heterozygotní tobiano s genotypem *TOto*. Plná polovina hříbat narozených po tomto rodiči by měla být znovu tobiano. Existují i dominantně homozygotní jedinci s genotypem *TOTO*, každé hříbě po takovém rodiči vždy zdědí dominantní gen, takže bude opět tobiano.

Stává se, že homozygotní tobiano dá téměř jednobarevného, nestrakatého koně, který má tmavou hlavu bez odznaků, ale bílé nohy. Na odznacích na nohou se mohou vyskytovat tmavé skvrny kolem korunky. Takový kůň se registruje jako breeding stock, i když je ve skutečnosti tobiano.

Tobiano gen se vyskytuje ve shluku genů, které leží na jednom chromozomu blízko sebe, a předává se na další generaci společně. Jde o gen *E*, *Rn*, *ALB* a *Gc*. Gen *Rn* označuje zbarvení roan. Geny *ALB* a *GC* označují protein v krvi. Protein *ALB* se vyskytuje ve dvou formách – A nebo B. Gen *GC* se vyskytuje také ve dvou formách, označovaných f nebo S. Dnes je známo, že homozygotní tobiano gen se v 90 % případů vyskytuje v kombinaci s formou B genu *ALB* a s formou S genu *GC*. Formu obou genů dokáže určit krevní test.

Tobiano gen lze určit i přes geny ovlivňující barvu tak, že leží v blízkosti genu, který určuje, zda základní barva koně bude rezavá (*e*) nebo černá (*E*) (LEČÍKOVÁ, 2005).

Přestože genetické založení zbarvení tobiano a overo není ještě zcela pochopeno, některé důležité faktory jsou ustanoveny. Vzor tobiano se dědí jako autozomálně dominantní rys a byl zmapován do vazebné skupiny, která obsahuje bílkoviny a vitamin D vázající protein (PARRY, 2005).

Silným kandidátem na tobiano gen je protoonkogen *c-kit* (*KIT*). *KIT* gen kóduje mast cell growth faktor receptor, který je součástí receptoru tyrozin kinázy (BROOKS, 2002).

Vzor tobiano je způsoben velkými chromozomálními inverzemi narušující regulační prvek *KIT* genu. Homozygotní a heterozygotní jedinci jsou fenotypově nerozeznatelní (HAASE, 2009).

Molekulární podstata vzoru tobiano však zatím není objevena (HAASE, 2002).

3.1.2. Overo

O genetických zákonitostech fungování overo genu nebylo zjištěno mnoho informací. Předpokládá se, že tento typ zbarvení řídí jeden či více dominantních genů, ale také je možné, že se jedná o jeden dominantní gen v kombinaci s různými genetickými modifikátory.

Z informací, které dosud byly zjištěny, vyplývá, že zbarvení overo mohou ovlivňovat geny, které mají na starost odznaky na hlavě a končetinách, zejména u typu sabino a splashed white.

3.1.3. Frame overo

V minulosti se vědci domnívali, že frame overo je způsobeno recesivním genem, protože nepředpokládaně vznikala hříbata frame overo od dvou jednobarevných koní. Podle Ann Bowling (1996), která přezkoumala záznamy v plemenných knihách a fotografický archiv APHA se zjistilo, že frame overo je děděno dominantně. Kdyby bylo frame overo děděno recesivně, chovatelé by získali z křížení dvou frame koní zase jenom frame. Při takovém křížení je však výsledkem 50% frame overo (*Frfr*), 25% jednobarevný kůň (*frfr*) a 25% letální bílá (*FrFr*), což naznačuje dominantní alelu. Bílým hříbatům selže, kvůli nedostatku nervových buněk v trávicím traktu, průchod potravy střevem. V případě dominantního modelu, vyvstává otázka, jak je možné, že dva jednobarevní koně mohou zplodit frame overo. Bowling (1996) zastává teorii, že gen u jednobarevných koní, potenciálně ovlivňující skvrnitost vzácně mutuje, avšak rychleji, než je obvyklé u většiny genů. Zmutovaný gen produkuje frame znaky a přechází na dominantní gen, který je v dominantně homozygotní formě letální (CHALUPOVÁ, 2006).

V homozygotní formě má gen frame overo letální účinky, koně jsou postiženi Overo Lethal White Syndromem (OLWS), jinak také syndromem letální bílé. Hříbata kvůli nepřítomnosti melanocytů v kůži jsou téměř nebo zcela bílá a umírají během několika dní na komplikace, které jsou způsobené intestinální agangliózou. U lidí se objevuje Hirschsprungova nemoc, která je charakterizována nepřítomností ganglií v různě dlouhém úseku gastrointestinálního traktu. Také je možno pozorovat abnormální zbarvení kůže a pigmentové vzory. Podobné onemocnění je pozorováno i u hlodavců. Jako příčina byla zjištěna mutace v genu pro endothelinový receptor B

(EDNRB). Gen reguluje tvorbu buněk neurální lišty, ze které se diferencují střevní ganglia a melanocyty (SANTSCHI *et al.*, 1998).

Hříbata, která jsou postižená syndromem letální bílé by měla být humánně uspána. Je však důležité být si jistý, že je hříbě opravdu syndromem postiženo, protože někteří bílí koně mohou být výsledkem kombinace několika vzorů, které jsou maximálně vyjádřeny a takoví jedinci jsou zcela životaschopní (*Color Information*, 2002-2004).

3.1.4. Sabino

Skvrnitost sabino je způsobena alelou *Sb*. Dominantní homozygoti (*SbSb*) jsou téměř nebo zcela bílí, heterozygoti vykazují skvrnitost sabino, recesivně homozygotní jedinci (*sbsb*) nejsou vzoru sabino (*Color Information*, 2003).

Na základě podobného fenotypu u lidí a prasat je *KIT* gen považován za původce skvrnitosti sabino. Byl zkoumán jeden z typů sabina, který byl označený jako sabino 1 (*SBI*). Heterozygoti se projevují třemi ze čtyř charakteristik: bílými odznaky na dvou a více končetinách, širokou lysinou na hlavě, skvrnami nebo prokvétáním trupu a neostrými okraji bílých skvrn. Homozygotní jedinci jsou téměř nebo zcela bílí. Sekvenování odhalilo v *KIT* genu substituci T -> A v intronu 16, která vede k přeskočení exonu 17. Ztráta exonu 17 může vést k částečnému nebo zcela nefunkčnímu proteinu. Exon 17 kóduje část druhé domény tyrozin kinázy. Mutovaná alela ruší restriční místo, což umožňuje detekci PCR-RFLP. Všichni koně homozygotní pro mutaci byli bílí, všichni heterozygoti vykazovali fenotyp sabino 1. Fenotypy sabino a white jsou heterogenní a existují i další mechanismy, jak mohou vznikat. Pravděpodobně jde o další mutace uvnitř genu *KIT* nebo ostatních genů (BROOKS *et BAILEY*, 2005).

Koně heterozygotní sabino se vyznačují intenzivními bílými skvrnami na nohách a v obličejové části. Často v kombinaci s bílými skvrnami na těle a prokvetlými oblastmi. Koně, kteří jsou homozygotní sabino, jsou téměř celí bílí (HAASE, 2009).

3.1.5. Splashed white

Hříbata splash white se rodí z kombinací, kdy jeden rodič má a druhý nemá toto zbarvení. Dosud nebyl zdokumentován žádný dominantně homozygotní jedinec typu splash overo, takže se předpokládá, že tento gen nemůže existovat v homozygotní formě (LEČÍKOVÁ, 2005).

Mnoho chovatelů těchto koní poznamenalo, že koně s tímto vzorem jsou neslyšící. To není překážkou, pokud lidé pracující s takovým koněm si uvědomují jeho omezení a přizpůsobí se mu (BOWLING, SPONENBERG, 1996).

Do dnešní doby nebyl zjištěn žádný homozygotní jedinec se zbarvením splashed white, takže se předpokládá, že takoví jedinci nejsou životaschopní (SPONENBERG, 2008).

Gen pro splashed white nebyl dosud zmapován (BROOKS *et* BAILEY, 2005).

4. Použité metody

4.1. Příbuzenská plemenitba

Z plemenářské práce je známé, že příbuzenská plemenitba se nevyužívá jenom v rámci čistokrevné plemenitby, kam je zařazena podle klasického rozdělení metod plemenitby, ale i při různých metodách křížení. Příbuzenská plemenitba se podílela na vzniku celé řady plemen hospodářských zvířat.

V praxi se pojem příbuzenská plemenitba používá tehdy, vyskytuje-li se společný předek spolu pářených zvířat do páté generace. Společných předků v rodokmenu může být i více. Pokud se vyskytuje společný předek v obou polovinách rodokmenu do páté generace včetně a jeho potomek je různý, pak je vytvořen příbuzenský vztah v rodokmenu.

Podmínky pro existenci příbuzenského vztahu jsou:

- a) Výskyt společného předka v obou polovinách rodokmenu
- b) Společný předek se v rodokmenu vyskytuje do páté generace předků včetně.
Pokud je předek ve vzdálenější generaci, pak se nejedná o příbuzenskou plemenitbu.
- c) Potomek daného společného předka je v obou polovinách rodokmenu různý

Nejvýstižněji je stupeň příbuzenské plemenitby charakterizován koeficientem intenzity příbuzenské plemenitby podle Wrighta, jinak také nazývaným koeficientem příbuzenské plemenitby. Autorem jsou uváděny dva typy vzorce.

Pro jednoduchý výpočet, kdy se na obou stranách rodokmenu nevyskytuje společný předek, znamenající příbuzenský vztah, který by byl již sám příbuzensky prochován:

$$Fx = \sum (0,5^{n_1 + n_2 + 1})$$

n_1 ... představuje počet generací stojící mezi jedincem a společným předkem v otcovské části rodokmenu

n_2 ... představuje počet generací stojící mezi jedincem a společným předkem v mateřské části rodokmenu

V případě, že je v rodokmenu ze strany otce i matky společný předek, který je sám příbuzensky prochován, používá se složitější výpočet. Nejprve se vypočte koeficient příbuzenské plemenitby F_a daného příbuzensky prochovaného předka a následně se vypočte koeficient příbuzenské plemenitby sledovaného jedince.

$$F_x = \sum (0,5^n \cdot I_2^{n+1}) \cdot (1 + F_a)$$

F_a ... koeficient příbuzenské plemenitby společného předka

Pokud se v rodokmenu vyskytuje více různých společných předků, kteří jsou vůči sledovanému jedinci v příbuzenském vztahu a sami také vznikli příbuzenskou plemenitbou, pak se vypočítají jednotlivé hodnoty F_a těchto různých společných předků a pak se sečtou (HAJIČ *et. KOŠVANEC*, 1998).

4.2. Izolace DNA

Většinou je izolována DNA, která je přítomna v nitrobuněčném obsahu. Jestliže se ve vzorku nachází více druhů buněk (např. různých živočišných nebo rostlinných druhů), pak je možno tyto druhy od sebe oddělit, v nejčastějším případě centrifugací. Pak lze izolovat DNA pouze určitého druhu.

Pokud je ve zkoumání DNA obsažená v určité organely, je potřeba ji před samotným izolačním procesem separovat z buněčného obsahu dané organely.

K uvolnění buněčného obsahu se používají detergenty, které rozrušují membrány. Detergenty mohou být iontové povahy, nejčastěji dodecylsulfát sodný nebo soli žlučových kyselin. Druhou variantou jsou neionogenní (nenabité) detergenty, jako např. Triton X100. Další možností je použití různých fyzikálních nebo fyzikálně-chemických metod, jako například rozrušení membrán ultrazvukem.

Následně je potřeba oddělit izolovanou látku z roztoku buněčného obsahu, čehož lze docílit dočasnou denaturací. Použít lze teplotní denaturaci, techniku vsolování a vysolování nebo srážení organickými rozpouštědly (JANOCHOVÁ, 2009).

4.3. Kontrola izolovaného DNA

Elektroforéza nukleových kyselin je jednou z nejběžnějších metod, používaných v molekulárně genetických laboratořích. Studium deoxyribonukleové kyseliny (DNA) poskytuje obrovské množství informací, které jsou použitelné nejen v základním, ale i při aplikovaném výzkumu.

K rozšíření studia DNA neobyčejně přispěl objev polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje za použití enzymu namnožit předem zvolený úsek DNA ve zkumavce (Storchová, 1998). Třebaže molekula DNA je obrovská, není ani po namnožení za běžných podmínek viditelná. Abychom ověřili výsledek kteréhokoliv pokusu nebo práce s DNA, musíme danou DNA zviditelnit a zjistit její velikost. Nejjednodušší metodou je právě elektroforéza.

Princip elektroforézy není složitý. Nukleové kyseliny jsou záporně nabitě molekuly. Za jejich záporný náboj jsou zodpovědné fosfátové spojky mezi jednotlivými nukleotidy. V elektrickém poli stejnoměrného proudu se tedy vždy pohybují od katody k anodě. Aby bylo možné rozdělit jednotlivé molekuly podle velikosti, probíhá elektroforéza v gelu, který je obvykle připraven z agarózy nebo polyakrylamidu. Volba gelu závisí na tom, jak velké molekuly DNA chceme rozdělovat. Do agarózového gelu navíc musíme přidat barvivo (většinou se používá ethidiumbromid). Tato barva se vmezeří do záhybů dvoušroubovice a zůstane tam pevně navázána. Po provedení elektroforézy pak gel prosvítíme ultrafialovým světlem. Barva, která je vmezeřená do DNA svítí oranžově. Vidíme tedy jednotlivé fragmenty DNA, rozdělené podle jejich velikosti.

Základní věc, kterou nám elektroforéza DNA umožňuje určit, je určit velikost molekuly. Máme-li fragment DNA známé velikosti, můžeme s jejich pomocí určit velikost neznámého fragmentu DNA. Elektroforéza DNA je běžně používanou metodou kontroly.

4.3.1. Popis průběhu elektroforézy

Existuje celá řada způsobů, jak provádět elektroforézu. Může probíhat v poloze horizontální nebo vertikální, můžeme použít různé gely, ve kterých dochází k rozdělení fragmentů, také složení pufu, ve kterém elektroforéza probíhá může být rozdílné (Storchová, 1998). Způsob elektroforézy měníme a vybíráme podle toho, jakou látku nebo jak velké fragmenty chceme rozdělit.

Následně se zaměřím na popis nejčastěji voleného způsobu – horizontální elektroforézu v agarózovém gelu. Nejprve je potřeba si připravit agarózový gel. Do připravené nádoby dáme 1 g agaru spolu se 100 ml pufu TBR. Nádobu s neutáhlým víčkem dáme na 3 minuty do mikrovlnné trouby a necháme rozvařit agarózu v příslušném pufu. Po zchladnutí roztoku zhruba na 60°C přidáme 17 μ l ethidiumbromidu a roztok promícháme. Následně jej vlijeme do speciální vaničky,

ve které se nachází hřeben. Po utužení agarózy, které trvá přibližně jednu hodinu, a po vyjmutí hřebene získáme obdélník gelu s jamkami, které slouží k nasazení vzorku.

Zkoumané vzorky DNA smícháme s nasazovacím pufrem, který obsahuje modrou barvu. Ta je také záporně nabitá a slouží jako kontrola, jak rychle se záporně nabitě fragmenty určité velikosti pohybují gelem.

Po zapnutí stejnosměrného elektrického proudu se molekuly DNA pohybují agarózovým gelem směrem k anodě. Rychlost pohybu je nepřímo úměrná velikosti fragmentu.

V průběhu elektroforézy se DNA váže s ethidiumbromidem přítomným v gelu, popřípadě i v pufru. Po skončení elektroforézy položíme obdélník gelu na prosvětlovací desku a prosvítíme ultrafialovým světlem. Pod UV světlem DNA obarvená ethidiumbromidem svítí oranžově. Obrázek gelu může být dokumentován digitálním fotoaparátem nebo CCD kamerou. Tento obraz lze použít k následnému manuálnímu nebo počítačovému zpracování (KAŇKA, 2008).

4.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

4.4.1. Historie PCR

První práce o PCR, která popisovala hlavní principy, tedy replikaci části DNA použitím primerů, byl dvacetistránkový dokument publikovaný v časopise *Journal of Molecular Biology* v roce 1971 norským vědcem Kjellesem Kleppeem a laureátem Nobelovy ceny za lékařství pro rok 1968 Harem Gobundem Khoranaou. Rozvoj metody byl na několik let zastaven kvůli problémům se syntézou primerů a čištěním DNA polymerázy.

Ovšem za objevitele této metody je považován Dr. Kary Banks Mullis, který pracoval pro společnost Fetus Corporation a na jaře roku 1983 přišel s myšlenkou PCR. Téhož roku, spolu se svým asistentem Fredem Fallonom, se pokusil myšlenku zrealizovat. Na výzkumu se podíleli i další zaměstnanci firmy. Část týmu tvořili vědci, kteří se zabývali diagnostikou DNA a identifikací mutací lidského genomu. První článek popisující metodu PCR byl publikován v roce 1985 v časopise *Science* a zabýval se použitím PCR pro stanovení mutace genomické DNA, která způsobuje srpkovitou anémií. Detaily a použití PCR byly kompletně odhaleny v článcích, které

byly vydávány v následujících dvou letech. Nakonec se z metody na analýzu mutací DNA stala metoda k amplifikaci jakékoli části DNA.

Metodu Dr. Mullis postupem času zdokonaloval od teoretických schémat k praktickému provedení. Jeho pracovní postup byl následující: do zkumavky vložil malé množství DNA, které obsahovalo požadovaný gen, velkou skupinu oligonukletidů a primery. Zkumavku zahříval na teplotu blízkou 100°C a poté zkumavku opět zchladil. Ke směsi přidal DNA polymerázu, čímž došlo k syntéze DNA. Tento proces několikrát opakoval. Kvůli tepelné denaturaci DNA polymerázy bylo nutné ji přidat k reakční směsi před každým cyklem. Tento proces zajišťoval mnohonásobnou amplifikaci daného úseku DNA a jeho snadnější pozdější detekci. Tento postup byl však velmi neefektivní, kvůli neustále pozornosti, časové náročnosti a velké spotřebě DNA polymerázy. Díky tomu vědci hledali způsob automatizace procesu, což vedlo k sestrojení prvního termocykleru, který pomohl celý proces urychlit. V době vývoje termocyklerů vstoupila firma Cetus do partnerství s firmou PerkinElmer. Jejich spolupráce vedla nejenom k vývoji termocyklerů, ale také k vývoji reakčních souprav pro lékařský výzkum.

Dalším problémem byla termolabilita přidávané DNA polymerázy. Během reakce byla spotřeba této látky velmi vysoká, také hrozila kontaminace reakční směsi, kvůli otevírání zkumavky po každém cyklu, čímž by byla znehodnocena celá analýza. Proto byla hledána látka, která bude mít stejně vlastnosti jako přidávaná DNA polymeráza, ale její termolabilita bude minimální. Po několika letech výzkumu byla objevena termostabilní DNA polymeráza, která byla izolována z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v termálních pramenech v Yellowstonenském národním parku. Následné spojení termocyklerů a termostabilní DNA polymerázy udělalo tuto metodu plně automatickou, kdy v dnešní době vyžaduje pouze obsluhu, která vloží reakční směs, zapne a vypne přístroj.

Techniku PCR má patentovanou firma Cetus z 28. července 1987 a jako hlavní vynálezce byl uveden Dr. Mullis. Následující rok firma Cetus obdržela žádosti o propůjčení licence k provádění PCR pro komerční diagnostické účely. Cetus oznámil rozhodnutí 15. ledna 1989 spolupracovat s firmou Hoffmann – La Roche Incorporated na vývoji a komercializaci lidské *in vitro* diagnostiky a službách založených na PCR technologii.

V dalších letech proběhlo několik soudních sporů o patentová práva na pracovní postupy a technologii. Všechny spory byly pro Cetus vítězné. V roce 1992

firma Roche Molecular Systems odkupuje od firmy Cetus, po letech spolupráce, patentová práva na PCR a další související technologie. Patentová práva vlastní do dnešní doby.

V roce 1993 Dr. Kary B. Mullis dostává Nobelovu cenu za chemii za objev PCR techniky (Dvořáková, 2007).

4.4.2. Princip PCR

Metoda PCR slouží k amplifikaci kratších úseků genomu do délky několika kb (ŘEHOUT, 2000).

Tyto úseky musí být lemovány sekvencí, která je alespoň z části známá, aby bylo možné navrhnout vhodnou dvojici primerů komplementárních k lemující sekvenci. Výhodou metody PCR je její vysoká citlivost. Stačí jen malé množství DNA, aby mohlo dojít k amplifikaci daného úseku. Pro analýzu je možno použít vzorek i velmi starý nebo degradovaný. Podmínkou je, aby obsahoval alespoň jeden zachovaný cílový úsek DNA. Základní jednotkou polymerázové řetězové reakce je jeden cyklus, který se stává ze tří fází: denaturační, anelační a syntetické. Tento základní cyklus se opakuje mnohokrát, nejčastějším případem je opakování cyklů 25 - 35x (DVOŘÁKOVÁ, 2011).

Prvním krokem je denaturace dvouvlákové DNA, tj. uvolnění vodíkových můstků mezi bázemi (ŘEHOUT, 2000). Pokud dojde pouze k částečnému rozestoupení, molekula DNA by se rychle neasociovala a nedošlo by k navázání primerů. Proto je důležité zvolit správnou denaturační teplotu a dobu, po kterou teplota působí. Při volbě teploty a doby je brán ohled na zastoupení GC párů v rámci amplifikovaného fragmentu, na koncentrace a zastoupení iontů v reakční směsi a na pH roztoku. Většinou je používaná teplota 90 – 98°C a doba 10-60 sekund. Pokud by byla teplota příliš vysoká nebo doba příliš dlouhá, došlo by k degradaci prekurzorů, enzymů, DNA a primerů. Přesto je vhodné první denaturace v rámci celé PCR prodloužit na 2 - 5 minut, aby došlo k úplnému oddělení řetězců DNA (DVOŘÁKOVÁ, 2011).

Následuje fáze annealingu s primery. Optimální teplota pro nasedání primerů je závislá na nukleotidové sekvenci, délce a koncentraci primerů. Většinou je teplota nasedání primerů o 5°C nižší než jejich teplota tání. Proto by anelační teplota měla být v rozmezí 55 - 70°C v závislosti na parametrech primeru. Čím je teplota annealingu vyšší, tím se snižuje pravděpodobnost špatného navázání primeru na

templářovou DNA nebo reasociace primerů navzájem, protože při nízkých teplotách mohou primery nasedat i na sekvence, které jsou komplementární jen z části a tím se vytvoří nespecifický produkt. Teplota nesmí překročit hranici, při které by už docházelo ke vzniku trvalé vazby primeru s templářem. Doba annealingu má být dostatečně dlouhá pro úplné obsazení komplementárních sekvencí na templátové DNA. Obvykle bývá v rozmezí 30 – 60 sekund.

Doba syntetické fáze závisí na teplotě a na délce a koncentraci templátové DNA. Syntéza je prováděna enzymem – dependentní DNA polymerázou. Ta musí být termostabilní, aby nedošlo k její degradaci během denaturační fáze. Nejčastěji je používána *Taq* polymeráza, která je izolována z bakterie *Thermus aquaticus* žijící v termálních pramenech Yellowstonekého národního parku. Se zvyšující se teplotou roste rychlost syntézy *Taq* polymerázou.

Teplota (°C)	Počet nesyntetizovaných nukleotidů za vteřinu
22	0,25
37	1,5
55	24
70	Více než 60
75 - 80	150

Tab. 2: Počet nesyntetizovaných nukleotidů za vteřinu při určité teplotě

Obvykle je syntetická fáze prováděna při teplotě 72°C, protože při této teplotě je *Taq* polymeráza schopna syntetizovat více než 3500 nukleotidů za minutu. Kvůli tomu se syntéza krátkých úseků do 3 kb provádí při 72°C po dobu 1 minuty. Syntetická fáze posledního cyklu PCR je protáhována na 5 – 10 minut, aby byly dokončeny všechny syntézy (DVOŘÁKOVÁ, 2011).

4.4.3. Složení PCR směsi

PCR směs obsahuje následně uvedené složky: templátová DNA, primery, pufr, DNA polymeráza, dNTP, dvojmocné kationy, PCR voda. Také mohou být přidána aditiva a minerální olej.

Templátová DNA obsahuje cílovou sekvenci, kterou chceme amplifikovat a zároveň slouží jako matrice pro tvorbu nového vlákna. PCR je možno aplikovat na

jadernou, mitochondriální i plastidovou DNA. Rozhodující vliv na výsledek PCR má koncentrace a kvalita templátové DNA. Pro běžnou PCR je použito řádově 10^4 - 10^7 molekul templátové DNA. Čím větší množství chceme amplifikovat, tím větší množství musíme použít templátové DNA (DVOŘÁKOVÁ, 2011).

Primery jsou uměle připravené jednovláknové oligonukleotidy o délce většinou 20 – 25 nukleotidů, protože je vysoce pravděpodobné, že v geonomu nejsou dva tak dlouhé úseky s naprosto stejným pořadím bází (ŘEHOUT, 2000). Výjimečně mohou dosáhnout až délky 80 nukleotidů, naopak pro některé rozборы jsou vhodnější primery o délce 13 či méně nukleotidů. Pokud jsou primery příliš dlouhé a nepurifikované, je riziko zvýšení počtu nesprávně zařazených bází do oligonukleotidu. Sekvence primerů by se měla v místě vazby co nejvíce shodovat se sekvencí templátu, což platí především pro poslední bázi na 3'- konci a neměla by obsahovat repetitivní sekvence, aby nedocházelo k vazbě primerů na více různých míst najednou. Dva primery ležící naproti sobě by neměly být vůči sobě komplementární, aby nedošlo ke vzniku stabilních duplexů.

Dvě různé primerové sekvence se váží na vlákna templátové DNA, která má být amplifikována. Jeden primer je komplementární se začátkem cílové oblasti vlákna jednoho a primer druhý je komplementární se začátkem cílové oblasti na vlákně druhém. Oba tyto primery mají 3'- konce přizpůsobené tomu, aby se na ně mohly vázat volné dNTP. Navázání primerů na vlákna DNA umožňuje připojení DNA polymerázy a tak může začít syntéza cílové sekvence (BUSTIN, 2004).

Pufrovací roztok je součástí reakční směsi, která zajišťuje vytvoření potřebných podmínek pro aktivitu DNA polymerázy. Určuje hodnotu pH, která se pohybuje od 8,3 do 9. Ve většině případů obsahuje Tris-HCl, KCl nebo někdy také $MgCl_2$ (LERCH, 2011).

DNA polymeráza je enzym, díky jehož činnosti dochází k syntéze DNA. Má schopnost rozpoznávat ssDNA jako templář a vázat dNTP. Váže se na primer a tak vzniká řetězec, který je komplementární s templářem a slouží k jeho prodloužení. K tomu se používají jednotlivé druhy volných dNTP (DVOŘÁKOVÁ, 2007). Dnes se používá termostabilní DNA polymeráza, která je odolná teplotám až 98°C. Aktivita DNA polymerázy je ovlivněna reakčními podmínkami, jako například hodnotou pH nebo koncentrací přítomných solí (BUSTIN, 2004). Nejčastěji používanou DNA polymerázou je *Taq* polymeráza, která je izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*. Její teplotní minimum se pohybuje v rozmezí teplot 75-80 °C.

V tomto rozmezí je schopna nesyntetizovat 150 nukleotidů za vteřinu. Při denaturační teplotě 95 °C je poločas života této polymerázy přibližně 40 minut, což stačí na více než 30 cyklů PCR (BARLETT *et* STIRLING, 2003). Protože *Taq* polymeráze chybí 3'-5' exonukleázová aktivita, její přesnost se pohybuje kolem $1,3 \times 10^5$ bází, tzn. že správně zainkorporuje průměrně $1,3 \times 10^5$ bází, než udělá chybu (SLATER *et al.*, 1998). Dalšími příklady DNA polymeráz jsou například *Tth*, *Tfl*, *Pfu* apod.

Další složkou jsou dNTP, tedy deoxynukleotidtrifosfáty. Vyskytují se v roztoku samostatně. Jako cukerná složka vstupuje deoxyribosa, mezi přítomné nukleové kyseliny patří adenin, cytosin, guanin a thymin, poslední složkou jsou tři zbytky kyseliny fosforečné. Tyto dNTP se v reakční směsi vyskytují ve formě sodných nebo litných solí. Při prodlužování primeru se váží OH- skupinou, kterou mají, poslední kyseliny fosforečné na 3'-OH konec posledního nukleotidu prodlužovaného řetězce. Váže se vždy dNTP, který je komplementární k nukleotidu na templátovém řetězci (BUSTIN, 2004).

Jako dvojmocné kationy jsou nejčastěji využívány Mg^{2+} nebo Mn^{2+} . Slouží k aktivaci DNA polymerázy. Koncentrace dvojmocných iontů je v rozmezí 0,5 – 5 mM, závisí na templátové DNA, primerech a dNTPs. Vysoká koncentrace kationů má za následek chybovost DNA polymerázy a zvyšuje pravděpodobnost zařazení nesprávného nukleotidu. Volba vhodného kationu záleží na DNA polymeráze. Polymerázy, které využívají Mn^{2+} , jsou obvykle méně procesivní a pomalejší než polymerázy, které využívají Mg^{2+} , přičemž procesivita udává počet nukleotidů nesyntetizovaných předtím, než polymeráza oddisociuje z DNA templátu (BARTLETT *et* STIRLING, 2003).

Pro PCR se používá neionizovaná a tzv. double-distilled voda, ze které jsou odstraněny přítomné kationy a anionty (DVOŘÁKOVÁ, 2011). Přidávání vody do reakčních směsí musí být obezřetné, může totiž být zdrojem kontaminace a tím dojde k znehodnocení pokusu (BUSTIN, 2004).

Aditiva se přidávají pro zvýšení efektivity reakce. Využívá se například glycerol, ten zvyšuje rezistenci *Taq* polymerázy proti tepelné degradaci, nebo dimethylsulfoxid (DMSO), ten snižuje teplotu pro separaci vláken DNA. Jako další aditiva jsou používána Triton X-100, Tween 20, Ficoll 400 nebo etanol.

Minerální olej se používá pro zabránění odpaření vzorku při vysokých teplotách tehdy, kdy termocycler nebo vyhřívané víko (DVOŘÁKOVÁ, 2011).

4.5. Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP)

Metoda RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, polymorfismus délky restričních fragmentů) je založená na enzymatickém štěpení molekul DNA ve specifickém restričním místě pomocí tzv. restričních endonukleáz (RE). Dnes je známo přibližně 1500 restričních endonukleáz (RE). RE produkují různé druhy bakterií. Slouží jako ochrana proti cizorodé DNA. Každý typ RE rozpoznává různé krátké sekvence nukleotidů a štěpí cílovou DNA na různých místech, v závislosti na sekvenci DNA. Endonukleázy, které rozpoznávají kratší sekvenci, štěpí DNA častěji na menší úseky. Ty, které rozpoznávají delší sekvenci, štěpí méně často a vznikají delší fragmenty. Délka a počet fragmentů je pro každého jedince specifická.

Inkubace reakční směsi probíhá při 37°C po dobu 1 hodiny. Separované fragmenty srovnáváme pomocí gelové elektroforézy na základě jejich počtu a velikosti. Ze získaných údajů stanovíme tzv. polymorfizmy. Polymorfizmy délky restričních fragmentů zapříčiňují přestavby, například delece, inserce a substituce bází. Změny v pořadí bází nukleotidů pak vedou ke změně počtu restričních míst (KOSOBUĐOVÁ, 2012).

4.6. Analýza genových a genotypových frekvencí v populacích

4.6.1. Genotypové frekvence

V tabulce 3 jsou uvedeny vzorce pro výpočet absolutních a relativních genotypových frekvencí.

Genotypy	absolutní frekvence	relativní frekvence
AA	D	$d=D/N$
Aa	H	$h=H/N$
aa	R	$r=R/N$
Σ	$D+H+R=N$	$d+h+r=1$

Tab. 3: Způsob výpočtu genotypových frekvencí

D – AA: absolutní počet jedinců dominantně homozygotních

H – Aa: absolutní počet jedinců heterozygotních

R – aa: absolutní počet jedinců recesivně homozygotních

N: celkový počet jedinců

d: frekvence dominantních homozygotů

h: frekvence heterozygotů

r: frekvence recesivních homozygotů

4.6.2. Genové (alelové) frekvence

Tabulka 4 uvádí vzorce pro výpočet frekvencí alel, a to absolutních i relativních.

Alely	absolutní frekvence	relativní frekvence
A	$P= 2D+H$	$p= P/2N = d + 1/2 h$
a	$Q= 2R+h$	$q= Q/2N = r + 1/2h$
Σ	$P+Q=2N$	$p+q=1$

Tab. 4: Způsob výpočtu genových (alelových) frekvencí

P: absolutní četnost dominantní alely

Q: absolutní četnost recesivní alely

p: frekvence dominantní alely

q: frekvence recesivní alely

4.7. Pearsonův χ^2 test

Pearsonův χ^2 test, nebo také test dobré shody, vychází z tabulky frekvencí a testuje nulovou hypotézu (H_0), která tvrdí, že četnosti v jednotlivých kategoriích se rovnají četnostem očekávaným. Pokud je hodnota H_0 nižší než zvolená hodnota významnosti (tradičně se udává 5% = 0,05), nulová hypotéza se zamítá. To znamená, že rozdíl mezi četnostmi zjištěnými ve vzorku a očekávanými četnostmi je příliš velký na to, aby byl pouze důsledkem náhodného výběru, tedy je statisticky významný.

Pokud je hodnota H_0 rovna nebo vyšší než zvolená hladina významnosti, pak nulovou hypotézu nelze zamítnout. Znamená to, že rozdíl mezi četnostmi zjištěnými ve vzorku a očekávanými četnostmi může být důsledkem náhodného výběru, tedy není statisticky významný (RIMARČÍK, 2008).

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(X_i - Np_i)^2}{Np_i}$$

Obr. 28: Vzorec χ^2 test (ANDĚL, 1985).

5. Materiál a metodika

5.1. Materiál

K dispozici bylo celkem 11 koní plemene Paint horse, od kterých byl odebrán vzorek krve. Od pěti koní byl vzorek odebrán do zkumavek s citrátem, které byly řádné označeny jménem a číslem. Od šesti koní byl vzorek odebrán do hemosek s roztokem EDTA, které byly označeny číslem. Následně byly všechny vzorky uloženy do chladu a převezeny do laboratoře ke zpracování.

- **Objekt číslo 1: Freedoms Betty Time**

Klisna plemene Paint horse, narozena 17.7. 2009, dovezena z Německa. Zbarvení bay tobiano.



Obr. 29: Freedoms Betty Time



Obr. 30: Freedoms Betty Time

- **Objekt číslo 2: EMH Magic Chatan**

Hřebec plemene Paint horse. Zbarvení black tobiano.



Obr. 31: EMH Magic Chatan



Obr. 32: EMH Magic Chatan

- **Objekt číslo 3: Docs Sunfire**

Hřebec plemene Paint horse, narozen 23. 2. 2007, dovezen z Německa v roce 2009. Je to velice krásný, atletický, osvalený hřebec s velmi atraktivním zbarvením s korektní stavbou těla, krásnou hlavou, 100% zdravotní stav, bez vad postojе, v moderním sportovním typu, KVH 152 cm.



Obr. 33,34,35: Docs Sunfire

- **Objekt číslo 4: Pepino San Bar**

Hřebec plemene Paint horse, narozen 8. 5. 2006. Pepino San Bar je krásný, atraktivně zbarvený černobílý mohutný hřebec, ověřený plemeník s nasvalenou a louprou zádí, širokým hrudníkem a ušlechtilou hlavou s výraznými žuchvami, korektní stavbou těla s výrazným osvalením, 100% zdravotní stav, bez vad postojce, má velmi kvalitní kopyta a silné nohy i klouby. KVH 150 cm.

Pepino San Bar je z obou tobiano rodičů, testovaný v Německu jako heterozygot.

Vyznačuje se klidnou, vyrovnanou povahou, velice hodný a mazlivý.



Obr. 36,37: Pepino San Bar

- **Objekt číslo 5: Freedoms Ella Chex**

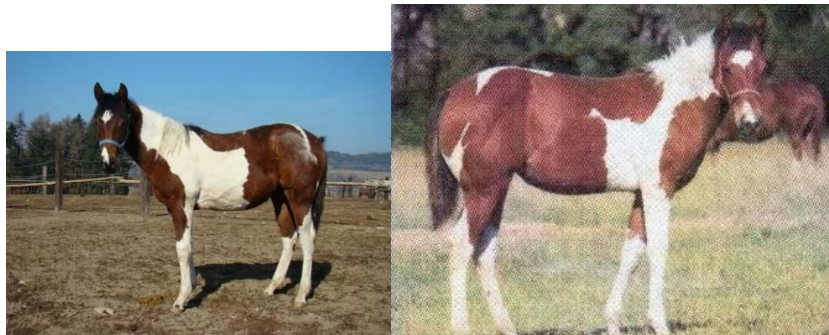
Klisna plemene Paint horse, narozena 4. 1. 2010, dovezená z Německa, zbarvení black tobiano. Společný otec s Freedoms Betty Time.



Obr. 38, 39: Freedoms Ella Chex

- **Objekt číslo 6: Domingo Topsail Jeff**

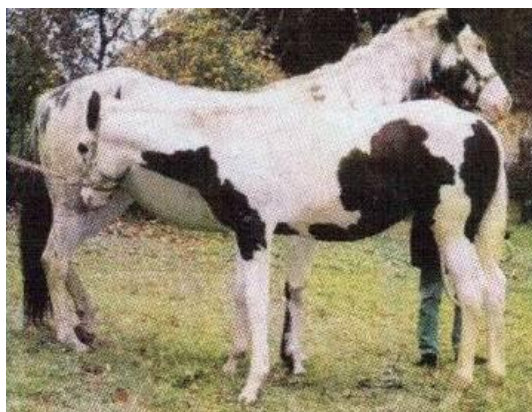
Klisna plemene Paint horse, po otci Quarter Horse. Narodena 16. 3. 2010.
Registrovaná na zbarvení bay tobiano.



Obr. 40, 41: Domingo Topsail Jeff

- **Objekt číslo 7: Daffne**

Klisna plemene Paint horse, matka Domingo Topsail Jeff. Narodena 15. 5. 2002.
Registrovaná jako black tobiano.



Obr. 42: Daffne

- **Objekt číslo 8: Snowboards Hotrod**

Hřebec plemene Paint horse, narozen 14. 4. 2001. Registrován jako black tobiano.
Na základě domluvy s majitelem nebyly poskytnuty fotografie.

- **Objekt číslo 9: Fancer Jimmy Cherokee**

Hřebec plemene Paint horse, narozen 13. 6. 2011. Registrován jako bay tobiano.



Obr. 43, 44: Fancer Jimmy Cherokee

- **Objekt číslo 10: Charlotte Joe Jackie**

Klisna plemene Paint horse, narozena 16. 5. 2012. Registrovaná jako black tobiano.



Obr. 45: Charlotte Joe Jackie

- **Objekt číslo 11: Am Charly Brown**

Hřebec plemene Paint horse, narozen 21. 5. 2009. Registrován jako black tobiano.

Podle chovatelských zkušeností pravděpodobně dominantně homozygotní jak pro tobiano gen, tak pro zbarvení black.



Obr. 46, 47: Am Charly Brown

5.2. Výpočet koeficientu příbuzenské plemenitby podle Wrighta

Byl vypočten koeficient příbuzenské plemenitby dle Wrighta.

$$F_x = \sum (0,5^n \cdot 1^{+n} \cdot 2^{+l}) \cdot (1 + F_a)$$

Fa... koeficient příbuzenské plemenitby společného předka

5.3. Izolování DNA

Pro izolování DNA byl použit postup využívající lyzačního pufru o složení 20ml Tris, 50ml 1M KCl, 2,5ml 1M MgCl₂ a 5ml Tween 20 (detergent). Při této metodě izolování DNA je možno použít pouze krev, která není odebrána do heparinu.

Nejprve se vzorek krve, pokud je zmrazený, nechá rozmrazit. Dále jsme si označili ependorfky tak, aby nedošlo k záměně vzorků. Vzorek krve jsme protřepali rukou a následně pomalu nasáli do pipety. Do připravené ependorfky jsme dali 50μl vzorku krve, EDTA jsme smíchali s 500μl TE pufru a také jsme přidali do ependorfky. Stáčeli jsme při 14 000 rpm, při 25°C po dobu 5 minut. Po stočení jsme odsáli tekutinu a opět jsme doplnili 500μl TE pufru. Tento postup jsme opakovali třikrát.

Po třetím odsátí jsme přidali 100μl lyzačního pufru. Vzorek jsme nechali inkubovat při 54°C přes noc. Ráno jsme vzorek opatrně promíchali a pomalu rozjeli na 1% agarózovém gelu.

Kvalita izolace DNA byla ověřena elektroforeticky.

5.4. PCR – exon 17 v *KIT* genu

Byla provedena PCR dle metodiky Brooks *et. Bailey* (2005). Sekvence primerů vycházela z výše citované práce a byla

KIT16aF	5'-GGT CCT GAC GAT GAG AAA CAC AAG T-3'
KITe17-117R	5'-TTT GAC CAC ATA ATT AGA ATC ATT C-3'

Složení reakční směsi bylo následující (tab. 5)

Chemikálie	Množství
Pufř	2,5 μ l
MgCl ₂	2 μ l
dNTP's	2 μ l
Primer 1	1 μ l
Primer 2	1 μ l
DNA	1 μ l
<i>Taq</i> polymeráza	2 μ l
H ₂ O	8,5 μ l
Σ	20 μ l

Tab. 5: Složení reakční směsi pro PCR

Jako první byl připraven mastermix smíchaný v pořadí H₂O, pufr, MgCl₂, dNTP's, primery. Dále byl mastermix rozpipetován do připravených a označených eppendorfek. Následně byla přidána DNA daného vzorku. Takto připravené vzorky byly vloženy do termocykleru a byl spuštěn program. Po uplynutí přibližně 2 minut trvající denaturaci při 97°C byla přidána naředěná *Taq* - polymeráza a pokračovalo se v programu. *Taq* - polymeráza není přidávána do vzorku ihned z důvodu dosud aktivní proteinázy K, kterou je potřeba inaktivovat.

Amplifikace byla zahájena počáteční denaturací při 97°C po dobu 2 minut. Poté následovalo 35 cyklů o složení:

- denaturace při 97 °C po dobu 30 sekund
- anelace při 57 °C po dobu 30 sekund
- elongace při 72 °C po dobu 30 sekund

Závěrečná elongace probíhala při 72°C po dobu 5 minut. Pro PCR bylo využíváno přístroje T3 Thermocycler firmy Biometra[®].

5.5. RFLP

Po amplifikaci DNA následovala metoda RFLP. Ke každému vzorku PCR produktu byl přidán červený pufr R a restriční enzym *MnII*. Po smíchání složek byly vzorky vloženy do termostatu a inkubovány při 37°C přes noc.

Další den proběhla separace fragmentů pomocí horizontální elektroforézy. Vzorčky byly obarveny bromfenolovou modří a nanесeny do hřebínků na 3,5% agarózový gel značený ethidium bromidem. Průběh elektroforézy byl nastaven 100V po dobu 60 minut. Vizualizace fragmentů se provedla pomocí UV záření.

5.6. Statistické zhodnocení

Na základě zjištěných výsledků genotypizace testovaných jedinců byla vypočtena frekvence výskytu alel a genotypů. Pomocí χ^2 testu byla stanovena odchylka populace od rovnovážného stavu podle Hardy-Weinbergova zákona. K výpočtům bylo použito několik základních vztahů, které tvoří podstatu populační genetiky.

Hardy-Weinbergův zákon vyjadřuje matematický vztah mezi frekvencemi genů (alel) a frekvencemi genotypů.

$$AA = p^2$$

$$Aa = 2pq$$

$$aa = q^2$$

p a q jsou frekvence alel A a a .

Platí vztah:

$$p + q = 1$$

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Uvažujeme-li jeden lokus se dvěma alelami (A, a), platí:

$$p = f(A)$$

$$q = f(a)$$

Relativní zastoupení jednotlivých genotypů:

$$d = \frac{D}{N} \quad h = \frac{H}{N} \quad r = \frac{R}{N}$$

$$d + h + r = 1$$

Relativní genové (alelové) frekvence:

$$p = d + \frac{1}{2} h$$

$$q = r + \frac{1}{2} h$$

Rovnovážný genetický stav v populaci nastane, pokud platí, že genovým frekvencím odpovídají příslušné genotypové frekvence. Tato definice vychází ze základní rovnice genetické rovnováhy.

$$p^2 q^2 = \left(\frac{2pq}{2} \right)^2$$

Populace se nachází v genetické rovnováze, jestliže P jako frekvence genotypů pozorovaných (skutečných) se statisticky neliší od O jako frekvencí genotypů (očekávaných) za genetické rovnováhy. K vyhodnocení se používá χ^2 test.

$$\chi^2_{n-p-1} = \sum \frac{(P-O)^2}{O}$$

n ...počet porovnávaných tříd dat)

p ...počet odhadovaných parametrů

Vypočítaná hodnota χ^2 testu se porovnává s tabulkovou hodnotou pro příslušnou hladinu významnosti a stupeň volnosti (df) (Tab. 6).

$$df = n-p-1$$

Stupně volnosti (df)	Hladina významnosti	
	0,05	0,01
1	3,84	6,63
2	5,99	9,21
3	7,81	11,34
4	9,49	13,28
5	11,07	15,09
6	12,59	16,81

Tab. 6: Hladiny významnosti pro jednotlivé stupně volnosti

V případě lokusu se dvěma genotypy a třemi genotypy bude hodnota $df = 3-1-1 = 1$.

Populace je pro daný lokus v genetické rovnováze, jestliže platí $\chi^2_{\text{tab.}} > \chi^2_{\text{vyp.}}$.

Pokud je zjištěn průkazný rozdíl mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi, $\chi^2_{\text{tab.}} < \chi^2_{\text{vyp.}}$, pak populace pro daný lokus není v genetické rovnováze (KOSOBUDOVA,2012).

5.7. Přípařovací plány

Přípařovací plány byly stanoveny na základě Mendelistické genetiky.

Pro ilustraci bylo využito Mendelistického čtverce, ve kterém byly v záhlaví rozepsány gamety rodičů. Ty následně byly sepsány k sobě a tím bylo dosaženo genotypů potomstva.

6. Výsledky a diskuze

6.1. Výpočet koeficientu příbuzenské plemenitby podle Wrighta

Z registračních certifikátů jednotlivých koní byly sestaveny rodokmeny do páté generace předků (viz. přílohy). Společní předci se vyskytují u koní EMH Magic Chatan (na mateřské straně shoda po klisně Miss Lady Bird 2 ve 4. a 5. generaci, na otcovské straně shoda klisna Seekers Sassy obojí v 5. generaci), Docs Sunfire (na otcovské straně shoda po hřebci Doc Bar obojí ve 4. generaci), Domingo Topsail Jeff (na mateřské straně shoda po klisně Expect obojí v 5. generaci) a Daffne (shoda na mateřské straně klisna Expect obojí ve 4. generaci).

Vzhledem k podmínkám k výpočtu koeficientu příbuzenské plemenitby podle Wrighta, tedy že výskyt společného předka musí být v obou polovinách rodokmenu, jak na mateřské, tak otcovské straně, dále že společný předek se musí vyskytovat do páté generace včetně a poslední, že potomek daného společného předka je v obou polovinách rodokmenu různý, je ze sestavených rodokmenů zřejmé, že v žádném z nich není výskyt společného předka v obou polovinách rodokmenu.

Proto můžeme o všech sledovaných jedincích říci, že žádný z nich nebyl příbuzensky prochován.

6.2. Izolace DNA

Byla izolována DNA ze vzorků krve od vybraných jedinců plemene Paint Horse. Elektroforetický byl potvrzen úspěšnost izolace u všech 11 vzorků.

6.3. Genotypizace lokusu pro KIT gen

Na základě výsledků metody PCR/RFLP byla provedena genotypizace. Dle délky jednotlivých fragmentů byly určeny následující genotypy.

Dominantní homozygot s genotypem *SBISB1* obsahoval fragmenty o délce 252 bp, 74 bp a 46 bp. Heterozygot *SB1sb1* byl potom determinován přítomností fragmentů o délkách 252 bp, 207 bp, 74 bp a 47 bp. DNA fragmenty s délkami 207 bp, 74 bp a 47 bp určovaly recesivního homozygota *sb1sb1*.

Z celkového počtu 11 sledovaných koní byl jako dominantní homozygot určen 1 vzorek. Konkrétně se jednalo o klisnu Freedoms Ella Chex. Jako heterozygoty jsem

určila 2 hřebce (AM Charly Brown, Docs Sunfire). Zbýlých 8 jedinců (Freedoms Betty Time, Domingo Topsail Jeff, Daffne, Charlotte Joe Jackie, Snowboards Hotrod, EMH Magic Chatan, Pepino San Bar, Fancer Jimmy Cherokke) bylo stanoveno jako recesivní homozygoti.

Zbarvení tobiano a sabino jsou kódovány rozdílnými mutacemi v rozdílných částech *KIT* genu (RIEDER, 2009). Existuje zde možnost, že koně se zbarvením tobiano mají ve své genetické výbavě i mutaci mající za následek zbarvení sabino, která však v takových případech může být překryta zbarvením tobiano. BROOKS a BAILEY (2005) zjišťovali výskyt mutace v exonu 17, mající za následek u vybraných plemen koní s výskytem zbarvením sabino. Prokázali, že je zde vztah mezi mutací *KII6+1037* a výskytem zbarvení sabino. Naše výsledky ukázaly, že u tří koní se mutace s ověřeným vztahem k sabino zbarvení prokázala. Ale ani u koně s homozygotním založením se vzor sabino fenotypově neprojevil, neboť byl překryt vzorem tobiano.

6.4. Statistické zhodnocení

Získané výsledky genotypizace byly následně statisticky vyhodnoceny. Byly stanoveny genotypové a genové (alelové) frekvence. Na základně zjištěných výpočtů byla ověřena rovnováha ve studované populaci.

6.4.1. Genotypové frekvence

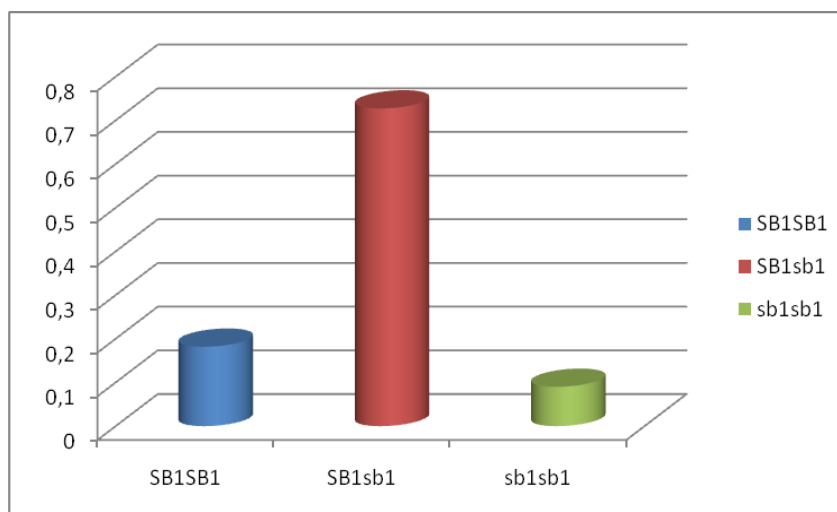
Absolutní frekvence genotypů byla: 1 dominantní homozygot (D), 2 heterozygoti (H) a 8 recesivních homozygotů (R). Relativní genotypové frekvence byly vypočteny následovně (viz. Tab. 7):

Genotypy	Frekvence genotypů		
	<i>SBISBI</i>	<i>SBIsbI</i>	<i>SbIsbI</i>
Absolutní frekvence	1	2	8
Relativní frekvence	0,091	0,1818	0,7273

Tab. 7: Frekvence genotypů ve sledované populaci

Vyjádříme-li zjištěné výsledky slovně, lze říci, že recesivně homozygotní genotyp naprosto převažuje s frekvencí 72,73 %. Druhým nejčastějším genotypem je

genotyp *SB1sb1* s frekvencí 18,18 %. Nejméně četný genotyp *sb1sb1* se vyskytoval s frekvencí 9,09 %. Výsledky jsou graficky znázorněny v grafu 1.



Graf 1: Relativní frekvence genotypů ve studované populaci

BROOKS a BAILEY (2005) testovali na přítomnost mutace celkem 320 koní 13ti odlišných plemen. Z tohoto počtu bylo pouze 5 koní s dominantně homozygotním genotypem *SB1SB1*, což činí 1,56% frekvenci. Nejčetnějším genotypem byl genotyp *sb1sb1*, zjištěný u 248 koní (frekvence 77,5 %). Heterozygotů se v celkové studované populaci nacházelo 68 (frekvence 21,25 %). Mé výsledky se tedy podobají výsledkům z původní studie.

Zůžim-li sledovaný vzorek pouze na plemeno American Paint Horse, který byl v práci zastoupen 27 jedinci, dostanu se k následujícím údajům: žádný dominantní homozygot, 4 heterozygoti (frekvence 14,81 %) a 23 recesivních homozygotů (85,19 %). Naprosto převažovali jedinci s genotypem *sb1sb1*. Výsledky obou porovnávaných prací se liší, zejména díky tomu, že se v mé práci vyskytl 1 dominantní homozygot a v původní práci žádný dominantní homozygot zjištěn nebyl.

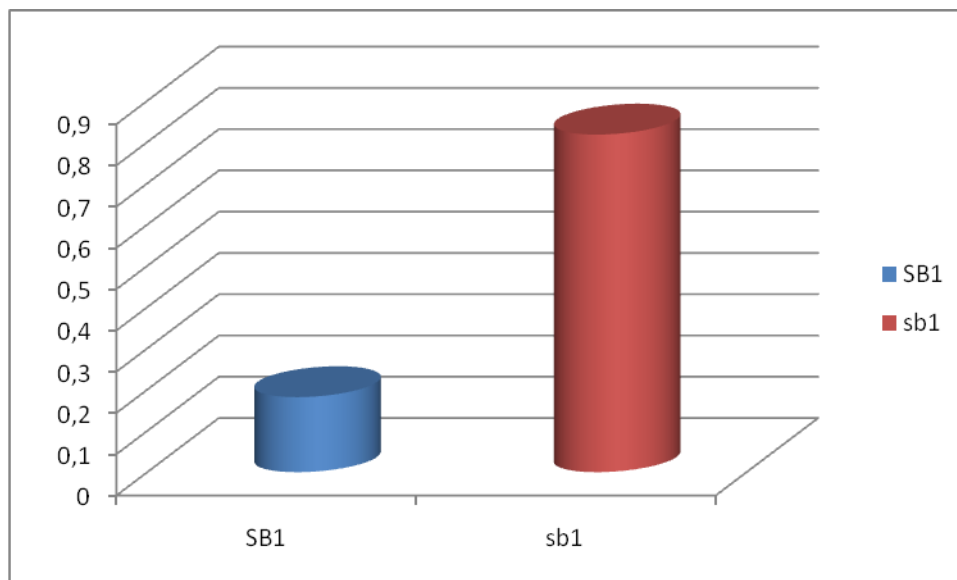
6.4.2. Genové (alelové) frekvence

Absolutní a relativní frekvence byly vypočteny a jsou uvedeny v tabulce 8.

Alely	Frekvence alel	
	<i>SB1</i>	<i>sb1</i>
Absolutní frekvence	4	18
Relativní frekvence	0,1818	0,8182

Tab. 8: Frekvence alel ve studované populaci

Četnější alelou v mnou studované populaci koní byla alela *sb1* s frekvencí 81,82 %. Alela *SB1* se tedy vyskytovala s frekvencí 18,18 %. Lze říci, že recesivní alela byla převažující, jak lze pozorovat i z grafu 2.



Graf 2: Relativní frekvence alel ve studované populaci

Pokud porovnáím mnou zjištěné výsledky frekvencí alel s frekvencemi vyplývajícími z původní práce (BROOKS a BAILEY, 2005), lze konstatovat, že frekvence alel jsou v obou pracích téměř totožné. Frekvence alely *SB1* zde byla 12,19 % a alely *sb1* 87,81 %. Při zúžení původní populace pouze na jedince plemene American Paint Horse lze odvodit následující frekvence alel: *SB1* 7,41 % a *sb1* 92,59 %. Převaha recesivní alely je zde ještě zřetelnější než v mnou studované populaci.

6.4.3. Testování odchylky od Hardy – Weinbergovy rovnováhy

K výpočtu byl použit χ^2 test. Vzorec a postup pro výpočet χ^2 testu je uveden v kapitole Materiál a metodika. Tabulka 9 uvádí skutečné a teoretické poměry genotypů a rozdíly mezi nimi.

	<i>SB1SB1</i>	<i>SB1sb1</i>	<i>sb1sb1</i>
Skutečné	0,09091	0,18182	0,72727
Teoretické	0,033058	0,297521	0,669421
diference	0,057851	-0,1157	0,057851

Tab. 9: Podklady pro výpočet χ^2 testu

Výpočet:

$$\chi^2 = \frac{(0,057851)^2}{0,033058} + \frac{(-0,1157)^2}{0,297521} + \frac{(0,057851)^2}{0,669421} = 0,151231256$$

$$\chi^2_{\text{vyp.}} = 0,15$$

$$\chi^2_{\text{tab. } 3,84} > \chi^2_{\text{vyp. } 0,15}$$

Na základě výpočtu χ^2 testu (0,15) a porovnání s tabulkovým χ^2 testem, při stupni volnosti 1 a hladině významnosti 0,05, můžeme říci, že testovaná populace se nachází v Hardy – Weinbergově rovnováze.

6.5. Návrh přípařovacích plánů podle Mendela

Byly uvedeny možnosti křížení studovaných jedinců. Vzhledem k tomu, že při výpočtu koeficientu příbuzenské plemenitby bylo zjištěno, že v mnou studované populaci se nevyskytují jedinci, kteří by byli příbuzensky prochováni, lze je mezi sebou volně připouštět. V dalším textu tedy uvádím jednotlivé možnosti připouštění podle genotypů a následnou prognózu přenosu mutace pro zbarvení označené jako sabino1.

Prvním případem je křížení jediného nositele dominantně homozygotního genotypu (*SBISBI*) klisny Freedoms Ella Chex s hřebcem nesoucím recesivně homozygotní genotyp (*sb1sb1*). Zde je možnost výběru z hřebců Snowboards Hotrod, EHM Magic Chatan, Pepino San Bar, Fancer Jimmy Cherokee. Možnost křížení je znázorněna pomocí mendelistického čtverce v tabulce 10.

	<i>sb1</i>	<i>sb1</i>
<i>SB1</i>	<i>SB1sb1</i>	<i>SB1sb1</i>
<i>SB1</i>	<i>SB1sb1</i>	<i>SB1sb1</i>

Tab. 10: Znázornění mendelistického čtverce při křížení jedinců s genotypy *SBISBI* x *sb1sb1*

Výsledkem křížení jedinců s výše uvedenými genotypy bude se 100% pravděpodobností hříbě s heterozygotním genotypem *SB1sb1*. Vzhledem k tomu, že hříbě bude nositelem 1 dominantní alely, má v sobě genetický potenciál pro zbarvení typu sabino1. Zda se toto zbarvení projeví, závisí na tom, zda se projeví i původní rodičovské zbarvení tobiano.

Další možností by bylo křížení klisny Freedoms Ella Chex (*SB1SB1*) a jednoho z hřebců s heterozygotním genotypem (*SB1sb1*) AM Charly Brown nebo Docs Sunfire. V tabulce 11 je znázorněn mendelistický čtverec pro takové křížení.

	<i>SB1</i>	<i>sb1</i>
<i>SB1</i>	<i>SB1SB1</i>	<i>SB1sb1</i>
<i>SB1</i>	<i>SB1SB1</i>	<i>SB1sb1</i>

Tab. 11: Znáornění mendelistického čtverce při křížení jedinců s genotypy *SB1SB1* x *SB1sb1*

Z tohoto křížení, jak je vidět, je 50% šance na hříbě nesoucí mutaci pro zbarvení sabino1 a mající heterozygotní genotyp. Rovněž je tu 50% pravděpodobnost na narození hříběte s dominantně homozygotním genotypem, jehož výsledkem bude rovněž genetické založení pro zbarvení sabino1, které by se však fenotypově mohlo projevit jako téměř bílé zbarvení.

Třetí možností je křížení klisen Freedoms Betty Time, Domingo Topsail JEff, Daffne nebo Charlotte Joe Jackie s recesivně homozygotním genotypem (*sb1sb1*) s heterozygotními hřebci AM Charly Brown nebo Docs Sunfire (*SB1sb1*). Mendelistický čtverec (tab. 12) znázorňuje teoretické schéma takového křížení.

	<i>SB1</i>	<i>sb1</i>
<i>sb1</i>	<i>SB1sb1</i>	<i>sb1sb1</i>
<i>sb1</i>	<i>SB1sb1</i>	<i>sb1sb1</i>

Tab. 12: Znáornění mendelistického čtverce při křížení jedinců s genotypy *SB1sb1* x *sb1sb1*

V případě takového křížení existuje 50% pravděpodobnost narození hříběte s heterozygotním genotypem *SB1sb1* a možností na projev zbarvení sabino1. Je zde však i 50% pravděpodobnost na narození jedince s recesivně homozygotním genotypem *sb1sb1*, které s sebou nese fakt, že takové hříbě by nemělo sabino zbarvení.

V posledním případě zvažují křížení jedné z klisen Freedoms Betty Time, Domingo Topsail Jeff, Daffne, Charlotte Joe Jackie (všechny recesivní homozygoti *sb1sb1*) s jedním z hřebců EHM Magic Chatan, Pepino San Bar, Snowboards Hotrod nebo Fancer Jimmy Cherokke (všichni recesivní homozygoti *sb1sb1*). Se 100%

pravděpodobností bude hříbě recesivní homozygot *sb1sb1* a vzor sabino se u něj tedy neprojeví.

	<i>sb1</i>	<i>sb1</i>
<i>sb1</i>	<i>sb1sb1</i>	<i>sb1sb1</i>
<i>sb1</i>	<i>sb1sb1</i>	<i>sb1sb1</i>

Tab. 13: Znázornění mendelistického čtverce při křížení jedinců s genotypy *sb1sb1* x *sb1sb1*

7. Závěr

Cílem práce bylo provést analýzu genetického založení zbarvení u vybrané populace koní. K testování bylo vybráno 11 koní plemene Paint Horse chovaných u soukromých chovatelů v České republice. Byly od nich odebrány vzorky krve a provedena následná analýza genetického založení.

Byl testován exon 17 *KIT* genu. Ve sledované populaci byl výskyt genotypů 1 dominantní homozygot, 2 heterozygoti a 8 recesivních homozygotů. Frekvence výskytu dominantní alely *SBI* byla 18,18 % a frekvence výskytu recesivní alely 81,82 %. V porovnání s výsledky jiných autorů je četnost alel téměř totožná.

Pro dosažení zbarvení sabino můžeme doporučit křížení dominantně homozygotního jedince s recesivně homozygotním (*SBISBI x sbIsbI*), ze kterého je 100% pravděpodobnost dosažení hříběte s požadovaným fenotypem. Dále křížení dominantního jedince s heterozygotem (*SBISBI x SBIsbI*), kde je pravděpodobnost 50 %. A v posledním případě křížení heterozygota s recesivně homozygotním jedincem (*SBIsbI x sbIsbI*), u kterých je pravděpodobnost také 50 %. Vyloučit můžeme křížení dvou recesivně homozygotních jedinců, u kterých požadovaného fenotypu nedosáhneme.

Zbarvení koně je pro mnoho lidí hlavním faktorem pro jeho výběr. Přestože jsou důležitější faktory při výběru, jako např. zdraví koně nebo stavba těla, je dobré se věnovat i genetickému založení. Pomocí znalostí genetiky můžeme předcházet spojení genů, které způsobují různé nemoci nebo syndromy zapříčiňující letální stavy. Preventivní genotypizace je dnes podmínkou u některých asociací plemen koní. Například u koní plemene Paint horse se dnes testují plemeníci i klisny a předchází se tím pravděpodobnosti výskytu nemocí a smrtelných syndromů.

I když došlo v posledních letech k velkému pokroku v oblasti genetiky barev a zbarvení u koní, stále jsou k nalezení další otázky a neprokázané hypotézy. Je proto nutné ve výzkumech pokračovat a odhalit tak další geny, které pomohou objasnit nejasné syndromy a další otázky týkající se dědičnosti barev.

8. Seznam literatury

- ANDĚL, J. Test dobré shody. *Wikipedie* [online]. 2013 [cit. 2013-04-19]. Dostupné z: <http://cs.wikipedia.org/wiki/Test_dobr%C3%A9_shody>.
- BARLET, J. M. S., STIRLING, D. (2003). *Methods in Molecular Biology*, Vol. 226: PCR Protocols, Sekond Edition: Grunenwald, H: Optimization of Polymerase Chain Reactions: 89-99.
- BOWLING, Ann T., et al. (2007): American Paint Horse Association [online]. . American Paint Horse Association's Guide to Coat Color Genetics. Dostupné z WWW: <<http://www.apha.com/forms/PDFFiles/guidebooks/07ColorGen.pdf>>.
- BROOKS, S.A., BAILEY, E., Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mammalian Genome*, 2005, Vol. 16, No. 11, p. 893-902.
- BROOKS, Samantha A., R. B. TERRY a E. BAILEY. A PCR-RFLP for KIT associated with tobiano spotting pattern in horses. *Animal Genetics*. 2002, č. 33.
- BUSTIN, Stephen A. *A-Z of Quantitative PCR*. La Jolla, California: International University Line, 2004. ISBN 0-9636817-8-8.
- Color Information* [online]. 2002-2004, © 2001 [cit. 2013-4-19]. Dostupné z: <<http://www.equinecolor.com/color.html>>.
- DUŠEK, Jaromír. *Chov koní*. Vyd. 2., přeprac. Praha: Brázda, 2007. ISBN 80-209-0352-6.
- DVOŘÁKOVÁ, Magdaléna. *Základní principy a využití kvantitativní PCR s ohledem na onkologickou diagnostiku*, Brno, 2007. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně.
- DVOŘÁKOVÁ, Lenka. *Využití metod PCR ve forenzní genetické analýze*, Praha, 2011, Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze.
- HAASE, Bianca, Samantha A. BROOKS, Angela SCHLUMBAUM, Pedro J. AZOR, Ernest BAILEY, Ferial ALAEDDINE, Meike MEVISSSEN, Dominik BURGER, Pierre-André PONCET, Stefan RIEDER a Tosso LEEB. *Allelic Heterogeneity at the Equine KIT Locus in Dominant White (W) Horses*. 2007.
- HAASE B., et al. (2008): An equine chromosome 3 inversion is associated with the tobiano spotting pattern in German horse breeds. *Animal genetics*. 39. Dostupný z WWW: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2052.2008.01715.x/abstract>>.
- HAASE, B., S.A. BROOKS, T. TOZAKI, D. BURGER, P.-A. PONCET, S. RIEDER, T. HASEGAWA, C. PENEDO a T. LEEB. Seven novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Animal Genetics*. 2009, č. 40, s. 623-629.

HAJIČ, František a Karel KOŠVANEC. *Obecná zootechnika: cvičení*. 1998. vyd. České Budějovice: JU ZF České Budějovice, 1998, s. 165-169. ISBN 80-7040-322-5.

HERMSEN, Josée. *Westernové ježdění*. Praha 1: Rebo production, 1997, s. 16-20. ISBN 80-85815-75-3.

CHALUPOVÁ, Pavla. *Genetika pigmentace u koní*, Brno, 2006. Bakalářská práce. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně.

JANOCHOVÁ, Jana. *Izolace DNA: Výtěžnost a kvalita*. Brno, 2009. Bakalářská práce. Masarykova univerzita.

KAŇKA, Jiří. *Automatické vyhodnocování obrazů z gelové elektroforézy*. Praha, 2008. Bakalářská práce. české vysoké učení technické v Praze.

KING R. C., STANSFIELD W. D., MULLIGAN P.K. (2006): Melanin. A Dictionary of Genetics. 7. vyd. Oxford university Press, 2006.

KOSOBUDOVÁ, Hana. *Kongenitální choroby skotu*. České Budějovice, 2012. Diplomová práce. Jihočeská univerzita.

LEČÍKOVÁ, Silvie. Genetika barev a zbarvení: 1. část: Geny a něco o nich. *Jezdectví*. 2005, č. 3. ISSN 1210-5406.

LEČÍKOVÁ, Silvie. Genetika barev a zbarvení: 2. část: Geny a barvy. *Jezdectví*. 2005, č. 4, s. 42-43. ISSN 1210-5406.

LEČÍKOVÁ, Silvie. Genetika barev a zbarvení: 3. část: Výroba barvy I. *Jezdectví*. 2005, č. 5, s. 42-43. ISSN 1210-5406.

LEČÍKOVÁ, Silvie. Genetika barev a zbarvení: Genetika a painti. *Jezdectví*. 2005, č. 10, s. 54. ISSN 1210-5406.

LEČÍKOVÁ, Silvie. Genetika barev a zbarvení: Výroba zbarvení. *Jezdectví*. 2005, č. 11, s. 48-49. ISSN 1210-5406.

LEČÍKOVÁ, Silvie. Paint Horse: Trochu strakatý kůň. *Jezdectví*. 2012, č. 10, s. 72-73. ISSN 1210-5406.

LERCH, Stanislav. *Význam real-time PCR pro stadium historické DNA*. Brno, 2011. Bakalářská práce. Masarykova univerzita v Brně.

PARRY, Nicola M. A. Overo lethal white foal syndrome. *Overo lethal white foal syndrome* [online]. 2005, [cit. 2013-04-19]. Dostupné z: <http://www.parrymedicalwriting.com/wp-content/uploads/2011/09/28-olwfs-copy.pdf>

ŘEHOUT V., et al. (2000): Genetika I. : Úvod do studia genetiky. 2000. 256 s. ISBN 80-7040-405-1.

RIEDER, Stefan. Molecular tests for coat colours in horses. *J. Anim. Breed. Genet.* 2009, č. 126, s. 415-424. ISSN 0931-2668.

RIMARČÍK, Marián. Chi-kvadrát test dobrej zhody. *Štatistický navigátor* [online]. 2000 [cit. 2013-04-19]. Dostupné z: <http://rimarcik.com/navigátor/chi.html>

SANTSCHI, E.M., PURDY, A.K., VALBERG, S.J., VROTOS, P.D., KAESE, H., MICKELSON, J.R., Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mammalian Genome*, 1998, Vol. 9, p. 306-309.

SLATER, M., SELMAN, S., MOGILEVSKY, B., AMMONS, H., HARTNETT, J., (1998). *Pfu* DNA Polymerase: A High Fidelity Enzyme for Nucleic Acid Amplification. *Promega Notes* 68: 7-12

SPONENBERG, D.P. *Genetic Equation* [online]. American Paint Horse Association, © 2008 [cit. 2013-4-19]. Dostupné z: <http://www.apha.com/breed/geneticeq.html>.

THIRUVENKADAN, A. K.; KANDASAMY, N.; PANNEERSELVAM, S. (2008): Coat colour inheritance in horses. *Science Direct*. 2008, 117, s. 109-129.

WEBEROVÁ, Esther, Jitka KYNCLOVÁ a Silvie LEČÍKOVÁ. Těžký výběr pro labužníky: Appaloosa, quarter nebo paint?. *Jezdeckví*. 2009, č. 3, s. 10-14. ISSN 1210-5406.

WEHRLE-HALLER, Bernhard. The Role of Kit-Ligand in Melanocyte Development and Epidermal Homeostasis. *Pigment Cell Research*. 2003, č. 16, s. 287-296.

Internetové zdroje

Adios Blu - APHA Tovero. *HorseClicks* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: http://www.horseclicks.com/adios_blu_apha_tovero/horses/174902

Aktuality. *Paint Horse Club ČR, o.s.* [online]. ©2009-2012 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: <http://www.czpha.cz>

BURÁŇOVÁ, Zuzana. *Fotografie koní a psů: Zuzana Buráňová* [online]. ©2007–2013 [cit. 2013-04-17]. Dostupné z: <http://www.zuzule.com/>

Colorado Red Roan Mare. *Mustang-Photography* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://mustang-photography.deviantart.com/art/Colorado-Red-Roan-Mare-131393534>

Dun It Smart Chic. *Breeding-Stallions.com* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.breeding-stallions.com/stallion1272.html>

Genotypy zbarvení plemenných hřebců. *Svaz chovatelů koní Kinských* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.schkk.cz/clanky/aktuality/genotypy-zbarveni-plemennyh-hrebcu.html>

History of the Breed. *American Paint Horse Association* [online]. ©2013 [cit. 2013-03-31]. Dostupné z: <http://www.apha.com/breed/history>

Horse color genetics in simple Laymen terms: Creme. *Examiner.com* [online]. © 2006-2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://en.allexperts.com/q/Horses-702/2010/2/cremello-color.htm>

Horses/Cremello Color. *All Experts* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://en.allexperts.com/q/Horses-702/2010/2/cremello-color.htm>

Horse forum. *Horse Topia.com* [online]. © 2000 - 2007 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://forum.horsetopia.com/breeding-genetics/136922-paint-horse-question.html>

HQH Melody Bay Roan. *Lynn's Quarter Horses* [online]. © 2001-2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: http://www.lynnquarterhorses.com/detail_121_hqh-melody.htm

Kirtzinger Quarter Horses Stallions. *Kirtzinger Quarter Horses* [online]. © 2008 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.freewebs.com/kirtzingerquarterhorses/stallions.htm>

Meet the characters. *Winter Beauty Books* [online]. © 2008 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.freewebs.com/winterbeautybooks/meetthecharacters.htm>

Our Stallion. *Heisler Quarter Horses* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.virginiacowboy.com>

Overo Pattern. *American Paint Horse Association* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.apha.com/breed/overo>

Paint Horse. *Horse Pictures* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://horses.mediarift.com/photo/view/69#.UVdGF7-tj1o>

PARRY, Nicola M. A. Overo lethal white foal syndrome. *Overo lethal white foal syndrome* [online]. 2005, [cit. 2013-04-19]. Dostupné z: <http://www.parrymedicalwriting.com/wp-content/uploads/2011/09/28-olwfs-copy.pdf>

Q Ranch u pramene Dyje. *Q Ranch* [online]. © 2012 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.qranch.cz>

Ranč pod jasany. *Ranč pod jasany* [online]. [26. 3. 2013] [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.rancpodjasany.wbs.cz>

Sabino?. *Horse Topia.com* [online]. © 2000-2007 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://forum.horsetopia.com/breeding-genetics/64197-sabino.html>

Splashed White Overo. *Animal Genetics* [online]. © 1995-2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.horsetesting.com/splash.htm>

Stallions. *Delorme Livestock: South Shadow Angus, Paint & Quarter Horses Ranch and Performance Horses* [online]. © 2002-2012 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://southshadow.homestead.com/Stallions.html>

The Cleveland Bay Horse Breed. *Local Riding* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.localriding.com/cleveland-bay.html>

Tovero. *Paint Horse Club Slovak Republic* [online]. © 2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.phcsr.sk/painthorse-tovero.html>

VÁCHOVÁ, Martina. *Rajče.net. Léto Betty a Ella* [online]. © 2005 – 2013 [cit. 2013-04-19]. Dostupné z: http://pepinosan.rajce.idnes.cz/leto_Betty_a_Ella/#IMGP9623.jpg

VÁCHOVÁ, Martina. *Rajče.net. Léto Betty a Ella* [online]. © 2005 – 2013 [cit. 2013-04-19]. Dostupné z: http://pepinosan.rajce.idnes.cz/leto_Betty_a_Ella/#IMGP9623.jpg

What's your favorite horse color?. *HorseForum.com* [online]. © 2000-2013 [cit. 2013-03-30]. Dostupné z: <http://www.horseforum.com/horse-talk/whats-your-favorite-horse-color-60898/>

9. Přílohy

- Rodokmen hřebce Docs Sunfire

Docs Sunfire	Sun Doc Olena	Lenas Diamond Chex	Doc O Lena	Doc Bar	Lightning Bar
					Dandy Doll
			Poco Lena	Poco Bueno	
				Sheilwin	
		Diamond Lill	Diamond Chex	Dandy Diamond	
			Satin Sage	Halli Chex	
				Yucca King	
				Angel Vee	
		Smorspots Bymarlin	Docs Marlin	Doc Bar	Lightning Bar
					Dandy Doll
	Tianna Leo		Leo		
			Poco Tianna		
	Smooth Marble Cake		Heza Smooth Jess	Smooth N Easy	
			Dias Bay Nugget	North Side	
			Dino Dollar Maker		
			Dia De Las Madres		
	Carmi Dancing Cat	Cats Coco Dancer	Cats Lad	Sir Cat	Mr Irresistable
					Little Polecat
			Gayla Streak	Scooter Streak	
				Miss Tammy Bond	
Miss Double Hand		Double Degree	Double Bid		
			Dulcie Five		
		Hand It Up	Alexanders Hand		
			Miss Pep 91		
Charming Carmin		Tom Tom Sundance R	Cherokee War Chief	Leo San Siemon	
				Papoose	
	Zees Immage	Nickel Dividend			
		Zee Etta Star			
Carmi	Panic Bar				
	Vagas Twist				

• **Rodokmen hřebce Pepino San Bar**

Pepino San Bar	Billy Skip Bars	Jack D Sanbars	Fantastic Sanbars	Sunny Cimota Bars	Steel Bars Skip 2H Barbi Sox	
				Dainty Gal San	Baldy Leo San Lime Star Gal	
			General Glamor Gal	The General	Robert E Lee Wimpys San	
				Go Ashley San	Junior San Man Go Buffie Babe	
			Doctor Honey Bar	Doctor Como	Son Ofa Doc	Doc Bar Jazzy Socks
					Baby Foot	King Bootsy Lena Cottoneye
		Gay Bar Honey		Gay Bar King	Three Bars Gay Widow	
				Gold Dust Blonde	Billy Joe Bob Conchita B	
		Susies Magic Girl	Hyland Poco San	Poco Dell Weed	Nunes Pocoweed	Poco Dell Sable
					Cimarron Tobosa	Cimarron King Miss Tobosa
				Bavarian Crown	Colonel Cause	Colonel Frost Brown Foot
					Miss Question San	Half Moon San Question Squaw
	Susies First Girl		Jacks Back	Jackets Scat	Jacket Bars Helios Miss	
				Princess Taco	taco Three Star Pintoresca	
			Girl Most Likely	Kokomingo	Hanks Koko War Bonnet Belle	
				Jessie	Images Ace Fancy Miss Quincy	

- **Rodokmen hřebce EMH Magic Chatan**

EMH Magics Chatan	Magic On Ice	MKS Magic Johnson	Magic Cash	Midnite Cash	Skip A Sure Cash Neiowa Robin		
				Mindy Sue Pepper	M KS Black Pepper Mellisa Sue		
			Ultimate Chex Mix	The Ultimate Dude	Dudes Tinky Robin O Kies Velvet		
				Chex Spiffie Tiffany	Monarchs Checkers Danger Ebony Babe		
		Seeking Lucy Dean	Mr Class Seeker	Mr Seeker Bar	Bunyon Bonanza Bar Seekers Sassy		
				Seekert Class	Classic Finale Seekers Sassy		
			Miss Lucy Dean	Pattons Joe Dean	MR Joe Trouble Deanos Marty Bar		
				Miss Lucy San	Gray Showdown Skip Leos Echo Sans		
			Marble Onyx Bay	Tuffs Gentleman Onyx	Tuff Black Panther	Tuff Kid	Son Of Tuff Miss Lady Bird 2
						Miss Lady Bird 2	Joe Reed Twist Miss Lady Bird
	McCue Onyx	Iner McCue			King Stormy McCue Dawn Sunset		
		Spicys Sugar			Satin N Sugar Spicy Doolin		
	Cinnamon Bay	Kilado Bey		Kiladoc	Quick Doc Toni Kila Bar		
				Sheze Trouble Jane	Mr Trouble San Jack Eyed Brett		
		Salt N Pepper		Pitch Pepper	Ima J Bar Too Ready Josette		
				Gold Strikes Lady	Kipty Top Moon Lonsum Strikes		

- **Rodokmen hřebce AM Charly Brown**

AM Charly Brown	CK Buck Iowa Bar	Bucks A Ten	Sun Of A Buck	Buck McCue	Kingfisher
					Gypsy McCue
			Carmen Rey	Pauls Yacqui	
				Ro Linda	
			Nikis Impressive	Keystone Kid	Breeze Bar
					Flapperetta Jo
		Impressive Amanda	My Impressive		
			Mars Beauty		
		Devil Anne Lasan	The Ole Man Brush	The Ole Man	Three Bars
					Chicado V
			Ms Riverboat Brush	Riverboat Joe	
				Brushs Marie	
	Specks Annie Lasan		Deck Bar Skip	Speck Deck	
				Little Penny Bar	
	Annie Lasan	Cowans Lasan			
		Annie Oakley			
	Morning Cloud Bell	Justa Joe	Justa Ranger	J Justa Touch	Taurus Jing
					Barton Girl
			Comars Lisa Bar	Mystic Rusty	
				Comar Senoya Bar	
			Patty Columbo	Buzzs Clown	Buzz Bar Jr
					Tips Penny
		Blaines Rose	Columbo		
			Dyna Go Rose		
		Misty Milkmate	Chief Eagle	Q Ton Eagle	Freno
					Q Ton Dixie Alpha
Little Squaw			Bert		
			Huggins Paint Mare		
Lads Poco Paula			Poco Lad	Poco Champ	
				Bright Star Shoot	
	Paula A				
Pauladitto	Mitzi Doane				

- **Rodokmen hřebce Snowboards Hotrod**

Snowboards Hotrod	Big Steps Snowboy	Big Steps Dude	Greyhound Step Jr	Greyhound Step	Big Step
					Greyhound Doll
			My Trixie Surprise		
		Bucks Perky Lady	Tabanos Juan Son	Tabano King	
			Lady Buckless	Lady Juan	
				Sheiks Buckless	
				Cinnamon	
		Lasans Frostedlace	Lasan Smoky Rascal	Joes Dyna Rascal	Dyna Joe
					Romper Rascal
	Smokin Lady Lasan		Lasans Diamond Dan		
			Mladys Whim		
	Frosted Lace	Mighty Start	Newstart		
			Mighty Sharp		
	Gindecka	Mr Rebel Charge			
		Gordies Deck			
	Doolins Nschotschi	Doolins Hotrodder	Doolins Daddy	Dial Leos Boy	Broetta
					Penny Parade
			Less Doolin	Begger Lee	
				Lucky Doolin	
		Gallanu	Dayeynu	Intentionally	
				Jolie Deja	
		Gallahads Lady	Tarry Long		
		Gallahads Gal			
Satisfactiongaronted		Styled To Win	Skip In Style	String Venture	
				Skip A Dream	
	Skip Two Three	Skip 3 Bar			
		Wells Honey			
Skippa Leann	Skippa Prince	Skippa String			
		Skips Princess			
Leanna Dial	Jet Dial				
	Monta Leann				

• **Rodokmen hřebce Fancer Jimmy Cherokee**

Fancer Jimmy Cherokee	Smart Cherokee Dee	Cherokee Blanca	Casablanca	Emphasis	War Leo Bonanza
					EE Black Dart
			Kaci Ann	King Kongo	
				Frijolita	
				Cherokee Boogie	
		Kee Chero	Sandy Jo		
			Berta	Tommy Bert	
			Unable		
		MS Patty Dee	Country Pattern	Mr Bud Bars	Sugar Bars
					Thirstys Doll
	Amigos Babe			Amigo Raider	
	MS Q Dee McCue			Gay Survivor	
			Sandy John Mc Cue	Sandy Streak Joe	
				Dixie R Mc Cue	
		Wimpys Marquessa	Handy Wimpy Jr		
			Marquessa		
	Fancys Charity	Somethingfancy	No Double	Three Bars	Percentage
					Myrtle Dee
				Miss Bound Away	Chick Away
					Thyralet
Crescendo			Mr Music	Balladier	
				Mata Hari	
		Local - Annie	On Location		
			Liberty Ann		
Pocono Averett		Tabano Bay		King	
			Tabano King	Little Red Annie	
				Silver Wimpy	
			Carmen Five	Sue Scharbauer	
		Cheeta Celine		Tom Adair	
			George East	Jeep Adair	
	Will Stead				
	Juarez Adair	J A Mare			

- **Rodokmen klisny Charlotte Joe Jackie**

Charlotte Joe Jackie	Am Charly Brown	CK Bucks Lowa Bar	Bucks A Ten	Sun Of A Buck	Buck McCue
					Carmen Rey
			Nikis Impressive	Keystone Kid	
				Impressive Amanda	
		Devil Anne Lasan	The Ole Man Brush	The Ole Man	
				Ms Riverboat Brush	
		Specks Annie Lasan	Deck Bar Skip		
			Annie Lasan		
		Morning Cloud Bell	Justa Joe	Justa Ranger	J Justa Touch
					Comars Lisa Bar
	Patty Columbo		Buzzs Clown		
			Blaines Rose		
	Misty Milkmate	Chief Eagle	Q Ton Eagle		
			Little Squaw		
		Lads Poco Paula	Poco Lad		
			Pauladitto		
	FH Dears Joe Jackie	Buckskin Dear	Gay Britches	Handy Britches	Little Britches
					Helen Minnick
			Bessie Gray	Copper Nick	
				Betty May	
Jo's Little Lady			Jo Jo Dear	Rambeleon	
				Trumpet Hancock	
Texas Lady Hutson		Miacho			
		Ray Barnes Mare			
Watch For Georgia		Watch For Sunup	Watch Tyree	Watch Joe Jack	
				Ima Tyree	
	Star Eyed Charm	Star Eyed Jack			
		EZ Georgia			
Georgia Sonny Que	George Paul	Bert			
		N R Jacci			
		Question Marks Sonny			
	WRS Sonnys McCue	Little Bay McCue			

- Rodokmen klisny Daffne

Daffne	Skips Diablo Bar	Stardust Diablo	Diamond H Mark Two	Mark IV	Sonny Dee Bar
					Patty Star Zan
			Billys Candy	Billy Lloyd	
				Paint Mare 19	
		Diablo Doncella	Diablo Blanco	Diablo Cochise	
				Four Spots	
		Badger Waggoner	Black Hughes		
			Flo Bust		
		Painted Jillee	Charlies Trouble	Skip A Dickson	Skipper Dude
					Fast Morning Star
	Yellow Again		Againu		
			Bar O Goldie Cue		
	Boston Jillee	Impressive Boston	Barnone Impressive		
			Boston Cameo		
		Sigar Jillee	Olee Bar		
			Chubby Jill		
	Bravo Lady Dallas	Priceless	Skips Ransom	Triple Skip	Brujo
					Readers Skip
			Silver Star Rose	Silver Ariel	
				Rose Dream	
		Show Me Skip	Skip Sandman	Skipster	
				La Muneca Star	
		Pines Rosalie	Poco Pine		
			Miss Ginger Bee		
Lady Perfection		Jim's Perfection	Jim Yo Yo	Jim Harlan	
				Smiths babe	
	Expect	Kings Count			
		Twalla			
Deanna's Bay Lady	Guadalupe Bill	Jack Godley			
		Dark Ruby			
	Expect	Kings Count			
		Twalla			

• **Rodokmen klisny Domingo Topsail Jeff**

Domingo Topsail Jeff	Topsail Lucero Jeff	Girl Leos Jac	Little Pie Jac	Jacs Little Pine	Hollywood Jac 86	
				Peseta Pie	Miss Doll Pine	
			Green Star Girl	Leos Three Jets	Gray Pie Too	
				Possums Girl	Peseta Gris	
		Topsail Playgirl	Palomino Lucero	Docs Voyager	Ima Three Jets	
				Venessas Story	Golddust Zero	
			Sanditch Cody	Topsail Cody	Possum Clegg	
				Sanditch Dude	Doc Bar	
					Bar Ditch Dude	Pepina Kay
					Misty Penny Bar	Freckles Playboy
	Daffne	Skips Diablo Bar	Stardust Diablo	Diamond H Mark Two	Lynn O Lena	
				Diablo Doncella	Joe Cody	
			Painted Jillee	Charlies Trouble	Doc Bar Linda	
				Boston Jillee	Bar Ditch Dude	
		Bravo Lady Dallas	Priceless	Skip's Ransom	Misty Penny Bar	
				Show Me Skip	Mark IV	
			Lady Perfection	Jim's Perfection	Billys Candy	
				Deanna's Bay Lady	Expect	Diablo Blanco
					Expect	Badger Waggoner
					Expect	Skip A Dickson

• **Rodokmen klisny Freedoms Betty Time**

Freedoms Betty Time	Cherokee Black Max	Cherokee Blanca	Casablanca	Emphasis	War Leo Bonanza
					EE Black Dart
			Kaci Ann	King Kongo	
				Frijolita	
			Kee Chero	Cherokee Strip	Cherokee Boogie
				Sandy Jo	
		Berta	Tommy Bert		
			Unable		
		All Star Review	Blue Review	Blue Max	Blue Mark
					Im A Fawago
	Claudes Moon Deck		Moon Decker		
			Claudes Cat		
	All Star Sis		Scenic All Star	Suprise Tag	
			Croton Oils Star		
	Cactus Dawn	Cactus Banner B			
		Snap On Wench			
	Dans Prime Time	Dan Dooley	Sir Quincy Dan	Quincy Dan	Mighty Bars
					Leo Princess
			Saneta	Joe Reed II	
				Waneta Of West Woodlawn	
Dooleys Muchacha			Dooley M	Little Joe Jr	
			Susie Sykes		
Bills Baby		Senor Bill			
		Babe			
Six Bar Time		Cherrio Kid	Winken Wayne	Spotted Bull	
				Comical Sue	
	Dot Bar	Chicaros 4 Bars			
		Tequesquite Lady 39			
	Six Bar Gold	Driftys Poco	Poco Speedy		
		Woodfern			
Six Bar Brown	Redwood Jake				
	Lidless				

• **Rodokmen klisny Freedoms Ella Chex**

Freedoms Ella Chex	Cherokee Black Max	Cherokee Blanca	Casablanca	Emphasis	War Leo Bonanza
					EE Black Dart
			Kaci Ann	King Kongo	
				Frijolita	
			Kee Chero	Cherokee Strip	Cherokee Boogie
				Sandy Jo	
		Berta	Tommy Bert		
			Unable		
		All Star Review	Blue Review	Blue Max	Blue Mark
					Im A Fawago
	Claudes Moon Deck		Moon Decker		
			Claudes Cat		
	All Star Sis		Scenic All Star	Suprise Tag	
		Cactus Dawn	Croton Oils Star		
			Cactus Banner B		
			Snap On Wench		
	Kings gene Chex	Brioso King Raffles	Three King Raffles	Continental King	King
					Sue Hunt
			Athenian Lady 2	King Bars	
				Raffles Baby	
Shesa Peppy Royal			Royal De King	Majors Manana	
			Queen Royal		
Briosos Pat		Poco Brioso			
		James Sally			
Gene Sugar Chex		Genuine Sugar	Genuine Doc	Doc Bar	
				Gay Bars Gen	
	Ima Sugar Vandy	Sugar Vandy			
		Morris Chesty			
	Chex Clymer	Wolverton Chex	King Fritz		
		Lori Chex			
Goldi Clymer		Fred B Clymer			
		Bit A Sugar			