

**JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
ZEMĚDĚLSKÁ FAKULTA**

DISERTAČNÍ PRÁCE

**Detekce, monitoring a implementace
genetických markerů u koní v ČR**

Ing. Irena Vrtková

2015

**Školitel: Prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.
Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zemědělská fakulta**

Děkuji svému školiteli prof. Ing. Jindřichovi Čítkovi CSc. za nekonečnou trpělivost, pomoc a podporu.

Za precizní, odpovědnou, spolehlivou laboratorní práci při fragmentačních analýzách MS koní děkuji především Mgr. Lence Putnové Ph.D. Za další laboratorní práce související s tématem disertace děkuji všem bývalým a současným pracovníkům Laboratoře agrogenomiky.

Poděkování za podporu a výdrž patří mé rodině.

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma: Detekce, monitoring a implementace genetických markerů u koní v ČR vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiloženém seznamu literatury.

Disertační práce je školním dílem a může být použita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího disertace a děkana ZF JU .

Práce byla zpracována s podporou grantů MZe ČR 1G58073 a QH 92277.

.....

V Českých Budějovicích dne 30.11.2015

SUMMARY

Background

Microsatellite markers are used for individual identification, parentage analysis, characterization of populations and diversity evaluation. Single nucleotide polymorphism markers in pigmentation loci are used for a prediction of colouring and elimination of some offspring diseases.

The goal of dissertation was to detect genomic markers and their implementation into a diversity characteristic of chosen horse breeds, genetic prediction of horse pigmentation, database EFABIS and forensic usage at CZ.

Results

Microsatellite markers

There were analysed 17 microsatellite markers (MS) in 7 682 horses from 13 breeds kept in the Czech Republic (CZ). Main parameters of diversity were: the average number of alleles in a single locus 11.29, expected heterozygosity 0.771, observed heterozygosity 0.737, polymorphic information content 0.738.

Diversity evaluated by Structure program showed clear distinction of Hutsul horse breed at K2. The specific breed in CZ, Equus Kinsky, separated at K4. Individual horses exhibit different share of Czech Warmblood, Slovak Warmblood and English thoroughbred in microsatellite markers.

Single nucleotide polymorphism (SNP)

From the point of view of pigmentation and the interest of breeders in CZ, Equus Kinsky is mostly interesting. There were genotypes of colouring determined at stallions. Allele frequency: *ASIP* (*A* 0.731 and 0.269), *MC1R* (*E* 0.115, *e* 0.885), *MATP* (*C* 0.596, *Cr* 0.404). On the basis of determined pigmentation genotypes, the approach was made for the mating of Equus Kinsky horses with a focus on colouring of offsprings (palomino, buckskin).

At Hutsul stallions who were involved into genetic resource, genotypes of colouring were determined. Allele frequency: *ASIP* (*A* 0,6, *a* 0,4), *MC1R* (*E* 0,9, *e* 0,1), *MATP* (*C* 1,0 *Cr* 0,0.), *KIT* (*sb1* 1,0, *Sb1* 0,0), (*To* 0,1, *to* 0,9), *EDNRB* (*O* 0,0 *o* 1,0). According to these results, Association of Hutsul horse breeders requires at every stallion embodied into genetic resource, a DNA test on tobiano depigmentation.

At western horses, breeders prefer various types of depigmentation. In order to restrict an appearance of OWLS syndrom, allele frequency of *EDNRB* (*O* 0,271, *o* 0,729) was determined at Paint Horse breed in CZ. On the basis of results, breeders regulate breeding according to given genotypes.

Microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for database horses in EFABIS

For Hutsul horse and Equus Kinsky, heterozygosities were determined at loci *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10*, *LEX3*, *VHL20*, and allelic frequencies at genes *ASIP*, *MC1R*, *MATP*, *KIT*, *EDNRB*.

Provisionally, there are molecular genetic data from CZ presented at european overview EFABIS (FAO-DADIS).

MS of horses for forensic usage in CZ

Sufficient reference databases of MS genotypes has to be built for each breed in order that a solution of forensic problems could be found. A part of dissertation is electronical attachment (CD) containing genotypes in 17 MS at 9 515 horses of 27 breeds including genetic resources.

The Laboratory of agrogenomics, where the dissertation was made, fulfills significant conditions for forensic laboratory in CZ, namely accreditation according to norm CSN EN ISO/IEC 17025:2005.

Conclusion

From the point of view of horse breeders, genetic prediction of colouring and OLWS restriction have the largest use.

Reference database of MS genotype, which is included in dissertation, is mostly important for applied research.

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. LITERÁRNÍ PŘEHLED	12
2.1. DETEKCE GENOMICKÝCH MARKERŮ	12
2.1.1. Odběry biologických vzorků, izolace/extrakce DNA, archivace, evidence	12
2.2.2. Metody detekce MS a SNP	13
2.2.2.1. Základní	13
2.2.2.2. Sekvence genomu koně a detekce tisíců SNPs	14
2.2.2.3. Forezní detekce MS	16
2.2. MONITORING GENOMICKÝCH MARKERŮ	18
2.2.1. Vhodnost genomických markerů	18
2.2.2. Vyhodnocování dat molekulárně genetických markerů	19
2.2.3. Monitoring MS	20
2.2.4. Údaje o molekulárně genetických markerech u koní	20
2.3. IMPLEMENTACE GENOMICKÝCH MARKERŮ	23
2.3.1. Implementace genetických markerů do paternit	23
2.3.1.1 Historie paternit	23
2.3.1.1.1 Odborná – genetická	23
2.3.1.1.2. Právní podmínky/úpravy ověřování původu hospodářských zvířat v ČR	23
2.3.1.2. Kam směřuje detekce a monitoring pro paternitu – trendy v ověřování paternit	25
2.3.1.2.1. Požadavky ICAR	25
2.3.1.2.2. Čipy a paternita	26
2.3.1.3. Paternita u koní	26
2.3.1.3.1. Hodnocení spolehlivosti markerů	26
2.3.2. Implementace genetických markerů do predikce zbarvení	27
2.3.2.1. Genomické markery zbarvení obecně	27
2.3.2.2. Gen <i>KIT</i> – lokus W – dominantní bílá	29
2.3.2.3. Některé další geny odpovědné za bílé zbarvení	29
2.3.2.4. Genomické markery zbarvení koní	30
2.3.3. Implementace genetických markerů do prezentace plemen koní z ČR v databázích HZ EFABIS a DADIS	32

2.3.3.1. Rámcové údaje o informačním systému EFABIS a DADIS	32
2.3.3.2. Požadavky na údaje v databázi EFABIS	34
2.3.4. Implementace genetických markerů do eliminace chorob a vad	34
2.3.5. Implementace do predikce výkonnosti	36
3. CÍLE DISERTACE	39
4. MATERIÁL A METODIKA	40
4.1. Analyzovaná zvířata	40
4. 1.1. Detekce mikrosatelitních markerů (MS)	40
4.1.2. Určení genetické determinace zbarvení	40
4.2. Laboratorní analýzy	40
4.2.1. Izolace DNA	40
4.2.2. PCR a fragmentační analýza mikrosatelitů	40
4.2.3. PCR a RFLP – stanovení genotypů zbarvení	42
4.2.3.1. Gen <i>ASIP</i> – Lokus Agouti – agouti-signaling protein	42
4.2.3.2. Gen <i>MC1R</i> – lokus Extension – melanokortinový receptor 1	42
4.2.3.3. Gen <i>MATP</i> – Lokus Cream – transportní protein asociovaný s membránou	42
4.2.3.4. Gen <i>EDNRB</i> – Lokus Overo – endothelinový receptor B	42
4.2.3.5. Gen <i>KIT</i> – Lokus Sabino 1	42
4.2.3.6. Gen <i>KIT</i> – Lokus Tobiano	43
4.3. Biostatistické analýzy	43
4.3.1. Stanovení diferencí v MS mezi plemeny	43
4.3.2. Stanovení příslušnosti jedince k plemeni/populaci	45
4.3.3 Stanovení genetické vzdálenosti	45
4.3.4. Predikce fenotypů zbarvení	45
5.VÝSLEDKY A DISKUZE	46
5.1. Detekce MS u vybraných plemen koní v ČR	46
5.1.1. Postup pro odběr vzorků chovateli a jejich distribuci; izolace DNA	46
5.1.2. Stanovené genotypy mikrosatelitů	46
5.2. Charakteristika diverzity populací	48
5.2.1. Genetická diverzita v MS u plemen koní v ČR	48
5.2.2. Určení příslušnosti jedince k populaci/plemeni	52
5.2.3. Stanovení genetické vzdálenosti plemenných hřebců koní Kinských a huculského koně	54

5.3. Genetická predikce zbarvení/pigmentace	55
5.3.1. Podle genů <i>MATP</i> , <i>MC1R</i> a <i>ASIP</i> u plemene kůň Kinský	55
5.3.2. Podle genů <i>MC1R</i> , <i>ASIP</i> , <i>MATP</i> , <i>EDNRB</i> a <i>KIT</i> u plemene huculský kůň	57
5.3.3 Podle genů <i>EDNRB</i> a <i>KIT</i> u plemene paint horse	59
5.4. Molekulárně genetické výsledky uplatnitelné v databázi EFABIS	60
5.5. DNA testy/analýzy MS pro forenzní účely	64
5.5.1. Podmínky pro laboratoře v ČR	64
5.5.2. Použití MS ve forenzních testech	66
5.5.2.1. Případové studie v ČR (Case Reports)	66
6. SOUHRN	76
7. NÁMĚTY K DALŠÍ APLIKACI VE VÝZKUMU A PRAXI	78
8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	79
9. SEZNAM ZKRATEK	86
10. PŘÍLOHY	87
11. ŘEŠENÉ PROJEKTY	141
12. VLASTNÍ PUBLIKACE	142

1. ÚVOD

Stabilita, udržitelný vývoj lidské populace, která dosáhla v prvním roce druhého desetiletí 21. století 7 miliard, je závislá na rozvoji vzdělávání a na ně navazující vědu, výzkum a inovace.

Udržitelnost vývoje zemědělství, lidské činnosti zajišťující nejen potraviny, ale i životní prostředí, je tradičně více chápána a proto i rozvíjena a podporována v rostlinné sféře. Dokladem uvedeného názoru pro ČR je například:

- převažující zastoupení základního výzkumu v oblasti rostlin a tím i vzdělávání doktorandů na všech přírodních univerzitách
- v rámci OP VaVaI je budováno pouze jedno regionální centrum aplikovaného výzkumu v zemědělství (RVC Haná) na univerzitě Palackého v Olomouci, které se uplatňuje v rostlinných biotechnologiích
- analýza podporovaných projektů ve výzkumných programech MZe ČR, provedena Dvořákem (2008) a následně Koníčkovou et al. (2010) ukázala 3-4 násobně vyšší finanční státní podporu rostlinné výroby nad živočišnou.

Udržitelnost chovu hospodářských zvířat je ve světě zvýrazňována a podporována ve výzkumu i vzdělávání. Viz například program vyhlášený FAO v r. 2010 (Ajmone-Marsan, P., Globaldiv Consortium, 2010) nebo evropský projekt EFABIS ukončený v roce 2010 – A European Farm Animal Biodiversity Information System (EFABIS), <http://efabis-devel.tzv.fal.de> – shromažďující informace o plemenech hospodářských zvířat v jednotlivých zemích, na kterém se však ČR nepodílela. Důvodem absence Česka může být mj. také okolnost, že orgány věcně odpovědné za zemědělství a výživu obyvatel nejsou podporovány přesnými a objektivními analýzami stavu v ČR a výsledky vědeckého poznání ve světě v genetice hospodářských zvířat.

Výzkum a vzdělávání v živočišných biotechnologiích pro udržitelnost chovu hospodářských zvířat vychází z vědního oboru genetika. Odrazem této skutečnosti jsou v biotechnologiích u hospodářských zvířat běžně používané termíny geny, sekvence DNA, molekulární genetické markery, genové zdroje, genomická selekce, nutrigenomika, atd.

Genetické pojmy jsou obsaženy v Evropských výzkumných a vývojových prioritách a jejich hlavních směrech výzkumu pro oblast zemědělství „Výzkum v oblasti biotechnologií hospodářských zvířat a rostlin a výzkum funkcí genů; výzkum genetických zdrojů; využití hospodářských zvířat a rostlin k produkci rekombinačních proteinů“, pro oblast potraviny a potravinový řetězec “Potraviny pro zdravou výživu; složení potravin; ukazatele jakosti, bezpečnosti a autenticity; moderní molekulární metody vyšetřování potravin“.

Pro oblast pokročilých biotechnologií jsou hlavním směrem výzkumu “Vlastnosti hybridních a transgenních organismů; získání informací o úloze genetických a epigenetických faktorů při regulaci základních molekulárně biologických procesů; příprava vysoce výkonných produkčních buněčných linií a organismů; vytvoření stabilních geneticky modifikovaných organismů (zvířat i rostlin) pro zemědělství a navazující obory“ (Přístup České republiky k přípravě nového rámcového programu Evropského společenství pro výzkum, technologický rozvoj a demonstrace a EURATOM, Podkladový materiál: www.msmt.cz).

K dalšímu pohledu na poměr genetiky rostlin a genetiky živočichů z úhlu tématu zaměření spisu na hospodářská zvířata mohou posloužit např. závěry některých recentních publikací (Maki-Tanila et al., 2008, Eaton, Aramyan, 2010), které zde uvádíme:

- a) u zvířat se pro genové zdroje musí vytvářet nákladné šlechtitelské/chovatelské programy, zatímco u rostlinných genetických zdrojů stačí genové banky
- b) v dynamice chovatelských programů je rizikové hodnocení a výběr vhodných zvířat do zdroje jen podle fenotypových a rodokmenových informací
- c) nová, vhodná a exkluzivní molekulárně genetická kritéria, znaky a postupy pro zachování biodiverzity a tím udržitelnosti daného druhu, plemene, populace zvířat jsou oproti rostlinám finančně, materiálově a pracovní nákladnější při jejich implementaci do praxe.

Pracoviště genetiky živočichů, kde byla zpracována experimentální část disertačního spisu, provádí dlouhodobě výzkum, vývoj a inovace v molekulárně genetických markerech hospodářských zvířat. V současnosti je tato činnost soustředěna do “Laboratoře agrogenomiky“ pod vedením autorky předloženého disertačního spisu.

Téma, specifikované názvem spisu Detekce, monitoring a implementace molekulárně genetických markerů u koní v ČR v podstatě uplatňuje postup řešení komplexního aplikovaného, molekulárně genetického výzkumu v agrárním živočišném sektoru.

Detekce molekulárně genetických markerů, vymezených genomickými sekvenčními repeticemi (MS – mikrosatelity) a jednoklueotidovými mutacemi (SNP–single nucleotide polymorphisms) je spojena s rychlou obměnou metod a technologií DNA analýz. V poslední době se rozšiřuje analýza funkčně významného polymorfismu pomocí určení SNPs – na bázi komerčně dostupných čipů ke stanovení tisíců SNP v jedné analýze. Velká část nových přístupů k detekci vychází ze základního výzkumu a je chráněna jako duševní vlastnictví tvůrců. Laboratorní detekce uvedených markerů pro aplikovaný výzkum je také tím cenově nákladná a i proto se začala u hospodářských zvířat v ČR více rozvíjet až v posledním desetiletí. Recentní je pak výzkum a vývoj forenzních metodik detekce genomických markerů pro zvířata.

Detekce, tj. zjištění výskytu a počtu polymorfních variant v sekvencích DNA různou měrou souvisejících se známými fenotypovými projevy je prvním krokem výzkumu a rovněž prvními subkapitolami v jednotlivých částech disertačního spisu.

Monitoring molekulárně genetické variability je v tomto spise pojat ve smyslu charakterizace, popisu meziplenné, vnitroplenné, mezipopulační diverzity u hospodářských zvířat. V souvislosti s biodiverzitou zvířat a jejími kritérii je dnes molekulárně genetická variabilita výzkumně řešena na úrovni nukleotidové, alelické, haplotypové, genotypové, dlouhých sekvencí DNA, chromozomálních bloků až k úrovni celého genomu. Vývojově zaměřené výzkumy využívají i polymorfismu mitochondriální DNA.

Nejrozšířenějším přístupem k monitorování aktuální genetické variability běžných a ohrožených populací hospodářských zvířat je analýza polymorfních repetitivních markerů (MS). Analýza MS a SNPs (jednonukleotidových polymorfismů) je základem hlavních kapitol disertace.

Monitorování stavu molekulární variability zvířat obecně umožňuje chovatelskému managementu plánovat a především inovovat biotechnologické postupy, obsažené dosud v zákoně, vyhláškách, nařízeních nebo pokynech plemenných knih, rad atd., převážně ve fenotypových ukazatelích. Z naší analýzy českých výzkumných aktivit je však stále patrná snaha realizovat uchování diverzity hospodářských zvířat především na bázi fenotypových znaků a projevů.

Současná genomika, diferencovaná na strukturální, funkční atd. (–omiky), přitom odhaluje stále nové pohledy na diverzitu a ukazuje tak, že podle fenotypů, morfologických znaků atd. lze dokumentovat, udržovat či uchovávat variabilitu jen rámcově a jen u populace, která se nevyvíjí.

Implementaci myšlenek, poznatků, zkušeností a výsledků z detekce a monitoringu molekulárně genetických markerů do chovatelských a plemenářských postupů genetického zlepšování (genetic improvement) hospodářských zvířat jsou věnovány části kapitol Literární přehled, Metodika a materiál, Výsledky a diskuze.

Seznamují a dokumentují výzkumnou práci autorky disertace odvedenou pro splnění významu latinského termínu “implementum“ = uskutečnění, naplnění (filozofický pohled na obsah pojmu implementace: čin je implementovaná myšlenka).

2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1. DETEKCE GENOMICKÝCH MARKERŮ

Velikost equinního genomu je 2 474,93 Mb DNA a 2 377,51 Mb (medián celkové délky je 2426,25 Mb). Tato DNA je rozložena ve 31 autozomech a dvou pohlavních chromozomech. K 10. 11. 2015 zahrnuje 21 744 genů (Horse genom project). Většina DNA je tvořena opakujícími se sekvencemi, které jsou složeny z mnoha typů: minisatelity, mikrosatelity, α satelity, SINE, LINE a telomerové sekvence.

Detekci markerů typu mikrosatelity (MS) a jednoduché bodové polymorfismy (SNP) lze zahrnout do genomiky. Genomika je obor, který se snaží o komplexní analýzu genomů a začíná postupně dominovat výzkumu živočišných biotechnologií. Zavádění a aplikace metod genomiky proto bude v příštích letech zásadně určovat kvalitu výzkumu a zprostředkovaně i úroveň a kvalitu zdrojů živočišných potravin v České republice.

Metodologie a jim odpovídající technologie detekce jsou v zásadě dvě:

- a) vyhledávání polymorfizmů v repeticích – mikrosatelity, vyhledávání bodových polymorfizmů – SNP, a dalších forem mutací (delece, inverze atd.), v částech sekvencí genomové DNA, vymezených různými způsoby mapování do větších nebo menších oblastí, tj. QTL, ETL, kandidátních genů.
- b) společné určení tisíců známých bodových mutací (SNPs), odhalených sekvenováním celého genomu

Laboratorní metody a metodiky detekcí MS a SNP jsou známé a používají se v mnoha variantách a modifikacích, především v závislosti na vybavení laboratoří a účelu stanovování markerů.

2.1.1. Odběry biologických vzorků, izolace DNA, archivace, evidence

Pro snadnost a spolehlivost odběrů vzorků a jejich transport existuje mnoho postupů a souprav, které jsou patentované a proto cenově nákladné. V různé míře zohledňují welfare zvířat (neinvazivnost odběrů), spolehlivost identity, nákladovost a bezpečnost práce, skladovatelnost atd.

Pro detekci MS a SNP jsou možné vzorky z kterékoliv tkáně, tělní tekutiny atd., např. krev, chlupové cibulky, ušní tkáň z aplikace ušních známek, mléko, sperma, stěry ze sliznic (mulce, dásní, pochvy), plodové vody, ale také výkaly a moč.

K porovnání současného stavu používání různých typů vzorků u hospodářských zvířat v zahraničí a ČR citujeme zde výběr z nejnověji zveřejněných informací.

Sik et al. (2011) popisuje nový kit pro jednoduché, bezpečné a rychlé získávání stabilní DNA, kterou je možné uchovávat při pokojové teplotě. Eggen (2010) na Interbull ICAR v sekci Využití genomiky ve šlechtění zvířat prezentuje pro DNA analýzy tyto biologické vzorky: krev, sperma, chlupové cibulky, ušní a nosní tkáň resp. stěry. Maclean (2010) deklaruje přednosti “all in one” systému pro stabilizaci, skladování a

získání DNA z nosních stěrů, kterými jsou vysoká výtěžnost DNA, stabilní při pokojové teplotě po dobu jednoho roku.

Pro české chovatele zveřejnila Českomoravská společnost chovatelů Anonym (2010) metodiku pro odběr, uchovávání a transport biologických vzorků určených k izolaci DNA a k dlouhodobé archivaci (http://www.cmsch.cz/docs/manual_biolvzorky.pdf).

K izolování DNA z živočišných tkání je rovněž publikováno značné množství metod a další se stále vyvíjí, podle potřeb na další práci se získanou DNA.

Jedna z recentních publikací, která cituje autory laboratorních protokolů izolace od klasického manuálu Sambrook et al. (1989) až po nové patentové dokumenty Heath, Shuman (2010) prezentuje především izolace s nízkou koncentrací DNA z roztoků po destrukci buněk. Podle našeho názoru bude možné tento princip použít pro izolaci určitých typů sekvencí DNA z forenzních vzorků. Druhým příkladem je recentní metodika izolace ze vzorků kontaminovaných různými látkami, což se v podmínkách odběrů u zvířat může vyskytovat (Sudhakar et al. 2007).

Pokračující výzkum v metodách izolací nukleových kyselin může reprezentovat Leon et al. (2012). Izolovali buňky plodu z krevní plasmy u 20 plnokrevných klisen v posledních třech měsících jejich březosti. U plodů určili pohlaví s přesností na 85%. Z uvedené práce odvozujeme, že postup může být u koní aplikován pro určení genotypů hříběte (plodu) z krve klisny.

K uchování vzorků a následné extrakci DNA pro PCR je k dispozici mnoho výzkumných i komerčních informací, postupů či manuálů. Např. komerčně dostupné IsoCode card firmy Bioscience nebo Quiagen kity pro uložení vzorků na celulozových FTA vycházejících z poznatků Orlandi, Lampe (2000).

Laboratoř agrogenomiky (LAG) experimentovala s archivací na chitosanu z hub, jehož příprava byla exkluzivitou navrhovaného výzkumného projektu. Vzhledem ke stanoviskům oponentů předloženého projektu NAZV byl vývoj v LAG ukončen. Podle našich současných poznatků pravděpodobně používá chitosan firma Agrobiogen v soupravě ušních známek s odběrem vzorku ušní tkáně hospodářských zvířat.

Nedílnou součástí detekce a monitoringu markerů je vhodná evidence výsledků pro další zpracování, vyhodnocování atd. I zde je v literatuře k dispozici mnoho softwarů. Recentní je např. publikace Paterson, Law (2011), ve které představují softwarovou aplikaci Genotypechecker pro kontrolu dat genetických markerů v původech.

Podle předpokládaných požadavků ICAR se pro ověřování parentity s využitím detekovaných markerů postupně musí vytvářet databáze vzájemně propojitelné mezi laboratořemi.

2.1.2. Metody detekce MS a SNP

2.1.2.1. Základní

Základním a prvním krokem v analýzách genomických markerů je polymerázová řetězová reakce (PCR). Nejaktuálnější přehled je obsažen v knize vydané Cambridge University na podzim r. 2009 (Bustin, 2009), jež popisuje i recentní inovace PCR

metod. Obrovský je rozvoj metod detekce MS a SNP. Vychází z aplikovaného výzkumu a experimentálního vývoje. Např. z Holandska recentní zveřejněná chronologie postupů pro multiplex detekci a kvantifikaci DNA variant ve vzorku (Ying, Van Beuningen, 2009). Část je věnována i analýzám SNPs a repetitivní DNA.

Výzkum se snaží vyvíjet stále efektivnější, levnější, finančně méně náročné laboratorní testační metodiky a protokoly detekce markerů. Publikace ve vědeckých časopisech nesou často „zlevnění“ přímo v názvu např. Peterson et al. (2012). Vhodnost a úspornost MS markerů pro populační studie popisuje Guichoux et al. (2011).

Z výsledků aplikovaného výzkumu vychází nové protokoly pro detekci MS (Equine Genotypes Panel 1.1, Bovine Genotypes Panel 3.1, Animaltype Pig kit).

2.1.2.2. Sekvence genomu koně a detekce tisíců SNPs

Sekvence genomu koně

Sekvence genomu byly získány ze vzorků krve plnokrevné klisny Twilight, u níž se předpokládala nízká genetická diverzita vzhledem k tomu, že plnokrevní koně pocházejí z relativně malého počtu předků a navíc byli vysoce selektováni na závodní výkon. Pro účely sekvenace a definování celého genomu byla omezená genetická variabilita nezbytná.

První kompletní sekvence genomu koně byla zveřejněna v roce 2007, je přístupná na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/seq/BlastGen/BlastGen.cgi?pid=1176>

Pro studii genetické diverzity koní byli sekvenováni koně různých plemen a výzkumníci vytvořili katalog více než 1 milionu SNP.

Koně v projektu “Horse genome project”



Obr.1 Twilight, plnokrevná klisna.

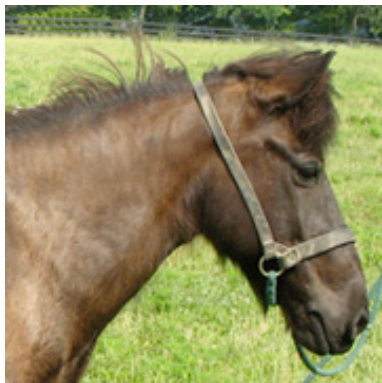
Poskytla DNA pro sekvenaci koňského genomu

<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/hgphorses.html>



Obr. 2 Bravo, plnokrevný hřebec blízce spřízněn s Twilight. Jeho DNA byla klonována a použita pro vytvoření BAC knihovny.

<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/hgphorses.html>



Obr.3 Hrafnhetta, islandská klisna. Byla vybrána pro nahodilé (random) sekvenování pro srovnání s DNA sekvencemi Twilight.

<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/hgphorses.html>



Obr.4 Desert Heir (Bisquette), American Saddlebred horse. Jeho krevní buňky sloužily cytogenetikům ke studii chromozomů.

<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/hgphorses.html>



Obr. 5 Ssirena, Lusitano byla vybrána pro DNA sekvenování a srovnávání s Twilight.

<http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/hgphorses.html>

Detekce tisíců SNPs současně – SNP v čípech/microarrays/biochips

Největší rozvoj dnes zaznamenáváme v oblasti microarrays, které umožňují analýzu několika desítek vzorků a polymorfismů v jedné reakci. I v této oblasti je komerční nabídka široká, např. The MegAllele™ Genotyping Bovine 10K SNP Panel Assay, BeadChip™ a iSelect BeadChip™

Na trhu jsou dostupné např. čipy firmy Illumina: Bovine SNP50 DNA Analysis Kits obsahující 54 609 SNPs, nově vyvinutý BovineHD (high density) DNA Analysis Kits zahrnující více než 777 000 SNPs. Nový Bovine 3K panel s 3072 SNPs (GoldenGate Technology), který je cenově výhodnější a je kompatibilní s čipy SNP50. Vysoká finanční náročnost analýzy desítek tisíc SNP vede ke snaze snižovat množství SNP. Pro využití komerční se předpokládají čipy s menším počtem. U hospodářských zvířat jsou mikročipy s SNP využívány pro genomickou selekci. Efekt genomické selekce byl

prezentován na Interbullu ICAR 2010 v Rize (VanRaden et al.2010), a řadou následujících publikací.

Pro koně nabízí firma Illumina Equine SNP50 a SNP70 DNA Analysis Kits, které obsahují 54 a 65 tis. vysoce informativních SNP rovnoměrně rozmístěných po genomu koně.

Detekují se celé haplotypy markerů – v čípech to jsou SNP na jednom chromozomu nebo jeho velkém úseku. Jak pracovat s velkými úseky chromozomů – dlouhými sekvencemi DNA, tj. např. jejich izolace a separace je předmětem patentovaných výzkumných výsledků autorů Petersdorf et al. (2010).

SNP z čipů a asociační studie

Rychle se vyvíjí i jiné strategie genotypování SNP, např viz. Magee et al. (2010), které jsou velmi podnětné pro možnosti výzkumu v ČR. V citované publikaci je dokumentováno, že ve světě běžné DNA technologie TaqMan a iPLEXTM genotypizace jsou vhodnou platformou pro studování asociací SNPs genotypu a fenotypu u hospodářských zvířat.

Na sekvenacích či jinak zjištěné polymorfizmy SNP navazují výzkumy možných asociací. V první řadě se zaměřily na jednodušší kvalitativní znaky a především choroby a vady. V již zmíněné publikaci Fan et al. (2010) je i přehledná tabulka recentních asociačních studií s kandidátními geny vybranými z celogenomových sekvencí u hospodářských zvířat.

V současné době je známo nejvíce studií u skotu, následují prasata a ovce.

U koně je důležitá studie Brooks et al. (2010). V disertaci je podrobněji popsána v části 3.4.

Stále přesnější a rozsáhlejší detekce a monitoring genetických markerů a sekvencí v genomu koně prohlubuje i pohled na změny genetické struktury během domestikace, na kulturní historii koně. Jeden z pohledů je v publikaci Lippold et al. (2011). Studovali jednu část chromozomu Y ve vzorcích DNA z archeologických nálezů zbytků koní. Prokázali, že daná sekvence 4kb v Y chromozomu je vysoce variabilní ve srovnání se stejnou sekvencí DNA současných hřebců. Citovaná práce navazuje na výsledky švédské studie Lindgren et al. (2004), která ukázala vysokou shodnost určité sekvence v chromozomu Y mezi 52 současnými hřebci z 15 různých plemen.

2.1.2.3. Forezní detekce MS

Genetické analýzy a detekce markerů u zvířat jsou používány v nejrůznějších sférách lidské činnosti. Nejrozšířenější je identifikace jedinců, ověřování parentity, vyhledávání otců z více možných atd.

Druhou oblastí je charakterizace a dohledatelnost (traceability) potravinových zdrojů živočišného původu, vztažená k bezpečnosti potravin a k ochraně územních regionů (biosecurity).

Třetí oblastí je využití analýz DNA zvířat ve forenzním vyšetřování. V některých zemích je samozřejmostí. U zločinů, jako je pašování, pytláctví a nelegální obchod s chráněnými druhy jsou běžně využívány DNA důkazy a soudy je přijímají. Pomocí analýzy DNA je možné s vysokou mírou pravděpodobnosti určit druh a zeměpisný původ forenzního vzorku a také provést individuální identifikaci vzorku.

Forenzní analýzy DNA u zvířat v posledních letech zaznamenaly rychlý růst především díky technologickému pokroku v oblasti lidské forenzní genetiky, která umožnila převod metod a aplikace na různé zvířecí druhy.

Nicméně je pokrok z řady důvodů pozvolnější:

1. Forenzní analýzy DNA zvířat se musí vypořádat s množstvím druhů, které vedou k nedostatku optimálních genetických markerů. V Červeném seznamu IUCN (Mezinárodní svaz ochrany přírody) je v současné době uvedeno více než 20 000 ohrožených druhů. Seznam zahrnuje různé druhy suchozemských rostlin, obratlovce, jako jsou ryby, obojživelníci, plazi, ptáci a savci, a bezobratlých, jako jsou humři, krabi, a korály (IUCN, 2013).

Na rozdíl od forenzní genetiky člověka, kde je nejčastější potřeba individuální identifikace vzorku (například pro srovnání identity mezi důkazním vzorkem a podezřelým), při vyšetřování trestných činů zahrnujících živočichy je častěji potřeba identifikace druhu. Kromě toho je často nutné určit geografickou oblast populace, ze které jednotlivé vzorky pochází (stanovit populaci, ze které konkrétní vzorek pochází).

2. U volně žijících živočichů genetici vypracovali různé metody izolace z forenzního materiálu a bylo tak vytvořeno množství metodik a shromážděno mnoho markerů bez rozsáhlých ověřovacích postupů nezbytných pro forenzní řešení případů.

Ve světě je výzkum forenzní genomiky zvířat již od roku 2005 intenzivně rozvíjen a aplikován (např. Budowle et al., 2005). Další publikace (Van de Goor et al., 2009a,b, Van de Goor et al., 2010, Van de Goor et al., 2011a,b) jsou zaměřeny přímo na standardizaci a populační analýzy variabilit lokusů MS u skotu a koní.

Podmínkám forenzních detekcí MS pro specifické případy jsou věnovány publikace:

Díaz et al. (2008), Chen et al. (2010a) popisující nový multiplex dinukleotidových MS, kterými je možné forenzně diskriminovat DNA ve směsném vzorku moči koně a člověka. Případy takových směsných vzorků se vyskytly při drogovém screeningu závodních koní.

Ve stejném roce tým specialistů (Chen et al., 2010b) zveřejnil řešení případové studie od Pennsylvania Racing Commissions. Zde byl vzorek krve deklarovaný k určitému koni kontaminován DNA jiného koně. Následně bylo zjištěno, že odběry krve se provedly s různými jehlami, ale jednou injekční stříkačkou. K laboratorním analýzám DNA výzkumníci použili multiplex a single – lokus detekci všech 21 MS, které byly identifikovány u dvou sporných koní. Reálně použít šlo 17 MS a kompetentních bylo 6 MS. Pravděpodobnost nerozlišení dvou koní v jednom vzorku krve stanovili na $3,1 \times 10^{-13}$. Proto tento postup testace DNA pokládají za prakticky použitelný jako důkaz

v soudních sporech. Obecněji byla pojata publikace Dobosz et al. (2010), ve které autoři využívají MS pro doplnění rodokmenů koní.

V ČR jsme dosud žádné výzkumné aktivity v tomto směru nezaznamenali ani v anotacích řešených projektů MZe (viz ISI CEP) ani ve zveřejněných výsledcích (viz ISI RIV).

Van de Goor et al. (2011b) publikovali rozsáhlou studii o vhodnosti panelu 17 MS koní pro forenzní použití. Uvádějí frekvence alel, heterozygotnosti atd. u 8641 koní 35 plemen. V této souvislosti upozorňujeme na obdobně zaměřenou studii u skotu Vrtková et al. (2011) prezentovanou na EAAP.

Referát Rankina (Rankin, 2010) o vývoji forenzní genetiky ukazuje na výhody a možnosti spolupráce mezi vysokými školami, policií a justicí při poskytování vzdělávání a odborné přípravy s cílem zvýšit znalosti, dovednosti a kompetence.

Forenzní laboratoře jsou obvykle akreditovány podle mezinárodních norem, aby prokázaly svoji úroveň znalostí, schopností a zkušeností pracovníků, které jsou nezbytné pro použití jejich DNA testů jako důkaz v soudním jednání.

Při velkém počtu různých druhů chráněných živočichů si mnohé menší laboratoře nemohou dovolit vysoké náklady spojené s akreditačním procesem a nedostatek akreditace může mít za následek, že důkaz bude napadnut u soudu.

Proto mezinárodní “Vědecký výbor forenzních věd pro volně žijící živočichy” (SWGWILD) ze Společnosti pro ochranu přírody sestavil ucelený soubor norem a směrnic pro práci s volně žijícími zvířaty ve forenzní vědě (SWGWILD, 2013). Nabízí “Program testování způsobilosti a certifikace”. Jednotlivci zde mohou požádat o certifikaci “Forenzní vědec pro divoká zvířata”.

2.2. MONITORING GENOMICKÝCH MARKERŮ

V informacích o současném stavu poznání budou citovány práce z posledních cca 5 let. Největší pozornost bude věnována pracem z let 2010/11, v nichž byly zveřejněny publikace s komplexními podrobnými údaji, včetně genotypů mikrosatelitů jednotlivých zvířat v rozsáhlých populacích koní.

2.2.1. Vhodnost genomických markerů

O vhodnosti MS pro monitoring a dalších možných směrech sledování genetických markerů – MS u zvířat, se v r.2011 vyjádřil kolektiv francouzských autorů z centrálního výzkumného ústavu INRA. V rozsáhlém 20 stránkovém článku, publikovaném v oborově prestižním vědeckém časopisu *Molecular Ecology Resources* (Guichoux et al., 2011) autoři popisují trendy v detekci mikrosatelitních lokusů, standardizaci jejich stanovení, validaci metod detekce atd.

Výše citovaný časopis je zaměřen na konzervační genetiku, která je významným směrem prakticky uplatňovaným v populacích domácích zvířat i v přírodních populacích. Její přístupy jsou založeny na určení, analýze a monitorování genetické

diverzity ohrožených populací s následným vypracováním programu jejího uchování v blízké a vzdálené budoucnosti.

Současné metodické možnosti molekulární biologie umožňují využít různých typů markerů pro tento účel. Vývojově zaměřené studie využívají hojně polymorfismu mitochondriální DNA, zatímco standardním přístupem k monitorování genetické diverzity ohrožených populací je analýza polymorfních repetitivních markerů, mikrosatelitů. V poslední době se rozšiřuje analýza funkčně významného polymorfismu pomocí určení jendonukleotidových polymorfismů (SNPs).

2.2.2. Vyhodnocování dat molekulárně genetických markerů

Na monitoring molekulárně genetických ukazatelů v “konzervační” genetice je zaměřena např. recentní revue 9 významných genetiků ve spojení s Globaldiv Consorciem FAO, publikovaná v r. 2010 (Boettcher et.al., 2010). Diskutuje o tom, že 7500 ohrožených plemen hospodářských zvířat nelze udržet. Proto jednu kapitolu autoři věnují faktorům ovlivňujícím priority pro zachování plemen, kde jako objektivnější alternativu k odhadům populačně genetických parametrů zdůrazňují molekulárně genetické informace, především selektivně neutrální, anonymní genetické markery, hlavně mikrosatelity. Jinou část revue věnují důležitosti informací o molekulárně genetické struktuře plemen. Citují řadu programů vhodných pro výběr populací a jejich management vedoucí k udržitelnému chovu.

Např. program General genetic diversity analysis GENEPOP (Rousset, 2008), vhodný pro výpočty populační genetiky. Formát jeho souborů slouží jako vstup pro mnoho dalších aplikací.

ARLEQUIN (Schneider et al., 2000), jeho výhodou jsou všestranné aplikace v populační genetice. Pracuje s různými typy molekulárně genetických dat.

PHYLIP (Felsenstein, 2005), univerzální fylogenetický software, používaný např. pro výpočet genetických vzdáleností.

GENALEX (Peakall, Smouse, 2006) umožňuje jak výpočet základních parametrů (alelové frekvence, heterozygotnosti, efektivní počet alel atd.), tak i složitější procedury (geografická vzdálenost a Mantel test, AMOVA).

MICROSATELLITE TOOLKIT ref. Park (2001), slouží pro formátování dat pro další genetické analýzy. Také počítá alelové frekvence, heterozygotnosti, polymorfní informační index a očekávaný počet alel.

PYPEDAL (Cole, 2007), vhodný pro rodokmenové analýzy. Není velmi uživatelsky příjemný, ale má několik užitečných nástrojů vizualizace.

METAPOP (Pérez-Figueroa et al. 2009) počítá základní parametry (He, FSTATS, atd.), meziplemenné a vnitroplemenné diference. Umožňuje analýzu populací pro odhad míry inbreedingu atd.

K dispozici je řada dalších programů.

2.2.3. Monitoring MS

Podnětné aktuální práce k monitoringu MS jsou např. v práci Haslera et al. (2011). V publikaci navazující na jejich předchozí monitoring genetické variability u švýcarského plemene koní Franches Montagnes, jehož plemenná kniha byla uzavřena v r. 1998, vyhodnocují genetickou rozmanitost od roku 2003 do roku 2008. Jejich výsledky jsou postaveny na informacích o původu a z molekulárních markerů. Předpokládají nové možnosti posuzování genetické diverzity populací hospodářských zvířat na základě MS a SNP markerů. Ve sledovaných letech (2003-2008) se narodilo 17 tisíc hříbat, z nichž bylo testováno na SNP a MS 4,5 tisíc. Výsledky jejich výzkumu jsou zaměřeny na výběr hřebců a klisen pro přípařování s ohledem na snížení budoucího inbreedingu.

Kolektiv Laboratoře agrogenomiky publikoval informace o genetické variabilitě populací koní z ČR a Holandska získané na základě monitoringu MS (Kourková et al., 2009a). Do studie bylo zahrnuto 757 koní 5 různých plemen, u kterých bylo genotypováno 17 mikrosatelitních markerů. Nejvyšší genetická variabilita daná počtem alel a heterozygotní úrovní byla prokázána u plemene hucul.

Pro monitoring MS je důležitý počet sledovaných lokusů.

Panel mikrosatelitů *AHT4*, *AHT5*, *ASB17*, *ASB2*, *ASB23*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HTG10*, *HTG4*, *VHL20* umožňujících mezinárodní porovnávání výsledků monitoringu u koní z různých laboratoří byl uznáván do konce r. 2010. Od ledna 2011 je na doporučení Van de Goor et al. (2009b) sada doplněna 5 dalšími lokusy *CA425*, *HMS1*, *HMS7*, *HTG6* a *LEX3*.

Mezinárodní společností pro genetiku zvířat ISAG (International Society for Animal Genetics) byl do konce roku 2010 akceptován ISAG International Panel of Equine STR DNA Markers obsahující 9 MS. ISAG doporučuje, aby všechny DNA profily stanovené po 1. 1. 2011 obsahovaly panel rozšířený o 3 MS lokusy, tedy celkem 12 MS (Equine Genetics and Parentage Analysis Workshop ISAG, 2010). Od roku 2014 je společností ISAG doporučeno testovat 17 MS (Equine Genetics and Parentage Testing Workshop ISAG, 2014).

Kompletní sadu 17 MS použilo v ČR poprvé pracoviště Laboratoře agrogenomiky MENDELU. Výsledky byly prezentovány na konferenci ISAG 2006 (Putnová et al., 2006). Sada 17 MS byla rovněž použita k monitoringu mikrosatelitových genotypů koní v této disertační práci.

2.2.4. Údaje o molekulárně genetických markerech u koní

Přední evropské výzkumné molekulárně genetické laboratoře pro zvířata, podobně jako již více let pracoviště lidské genetiky, začínají zveřejňovat ve významných časopisech rozsáhlé molekulárně genetické údaje.

Např. u skotu Glowatzki-Mullis et al. (1995) zabývají se využitím MS lokusů při ověřování původů skotu, Peelman et al. (1998) vyhodnocují genetickou variabilitu ve 23 MS lokusech u čtyřech belgických plemen skotu, nebo populační studie zahrnující u

4162 kusů skotu náhodně vybraných z 20 plemen využívající 16 MS lokusů autorů Van de Goor et al. (2011a), ve které autoři přiřazovali neznámé jedince do správného chovu na základě genotypů v MS lokusech.

U koní je pouze omezený počet populačních údajů, např. Tozaki et al. (2001) ověřovali možnost využití 15 MS lokusů pro parentity u 250 plnokrevných koní, Zabek & Fornal (2009) hodnotili vhodnost 17 MS lokusů pro ověřování původů v populaci huculských a polských chladnokrevných koní.

U populací koní v ČR byly zatím zveřejněny některé charakteristiky struktury na bázi 17 lokusů MS převážně na konferencích (Putnová et al. 2006, Kourková et al. 2009a,b). Výzkumná skupina Leroye et al (2009) popisuje 39 populací především z Francie. Do studie bylo zahrnuto 1679 zvířat patřících do 34 plemen. Pro studii použili 11 MS markerů. Meziplenné rozdíly tvořily asi 10% celkové diverzity. Hodnoty očekávané heterozygotnosti byly v rozmezí 0,43 až 0,79 v závislosti na plemeni. Na základě statistických analýz MS markerů bylo možné plemena rozdělit do čtyř skupin: teplokrevná, tažná, nordická a pony. Z výsledků analýz a hodnocení stupně diverzity došli k závěru, že by se mělo zvláštní úsilí věnovat zachování pěti místních plemen: Boulonnais, Landais, Merens, Poitevin a Pottok.

Tab.1. Plemena analyzovaných koní, země původu a velikosti populací. Z pohledu synchronizace s našimi výsledky vybíráme ekvivalentní populace.(Leroy et al., 2009).

Basic information on the 39 populations studied					
Population code	Breed	Type ^a	Country ^b	Nb of foals registered in 2005	Sample size ^c
APPAL	Appaloosa	W	USA	84	29
CAM	Camargue	W	France	468	37
FJ	Fjord	P	Norway	237	33
FRI	Friesian	W	The Netherlands	53	37
HAF	Haflinger	P	Austria	344	32
IS	Iceland Pony	W	Iceland	96	48
NF	New Forrest Pony	P	UK	119	45
PRE	Pure Spanish Horse	W	Spain	146	50
PRW	Przewalsky horse	Pr	Mongolia	-	26
QH	Quarterhorse	W	USA	162	41

W- teplokrevná plemena, P-pony, Pr- primitvní plemena

Populační studie kolektivu Van de Goora (2011b) zahrnuje 35 populací koní s celkem 8641 jedinci. Pro studii použili panel 17 MS. Na základě získaných očekávaných a skutečných heterozygotností, pravděpodobností vyloučení nesprávného rodiče, polymorfního informačního obsahu a pravděpodobnosti identity dvou jedinců doporučili panel 17 MS k forenzním analýzám téměř všech plemen. Ověřovali také spolehlivost přiřazení neznámých vzorků k plemeni. Celkový podíl správně přiřazených jedinců byl 97,2%. Sledované populace pomocí analýzy klastrů rozdělily do třech

skupin: chladnokrevná plemena (hafling, holandské a fríské); pony plemena (shetland, miniaturní kůň, falabella, appaloosa, islandský) a teplokrevná plemena (teplokrevníci, plnokrevníci a arabští).

Tabulka 2. uvádí výsledky populační analýzy Van de Goora (2011b) u vybraných populací.

Statistical parameters of 35 horse populations based on 17 STR loci.

Population	Abbreviation	Number	N (HWD)	AR	PE1	PE2	HO	HO (SD)	HE	HE (SD)	PIC	HW P _{ID}	sib P _{ID}	F _{IS}
Appaloosa	APP	99	4	6,5	1	1	0,72	0,011	0,77	0,019	0,73	5,6973E-11	1,1340E-0	0,064
Fjord	FJO	544	0	5,7	0,999	1	0,7	0,005	0,71	0,033	0,67	7,7159E-14	3,3815E-0	0,010
Friesian	FRI	781	0	3,3	0,931	0,996	0,44	0,004	0,45	0,051	0,4	4,1344E-11	9,9098E-0	0,019
Haflinger	HAF	65	0	4,8	0,997	1	0,63	0,015	0,67	0,044	0,62	5,4811E-11	4,4332E-0	0,054
Icelandic	ICE	134	3	5,7	0,999	1	0,66	0,010	0,71	0,032	0,67	9,2618E-15	1,1344E-0	0,067
Irish Cob	IRI	123	1	5,9	0,999	1	0,68	0,010	0,72	0,021	0,68	6,4751E-13	8,8413E-0	0,057
Lipizaner	LIP	45	0	5,3	0,998	1	0,7	0,017	0,7	0,022	0,64	1,7547E-18	8,7189E-0	0,008
Miniature horse	MIN	250	2	6,1	0,999	1	0,67	0,007	0,72	0,029	0,69	2,0484E-13	1,1540E-0	0,067
New Forest	NEW	54	0	6,7	1	1	0,73	0,015	0,75	0,025	0,71	1,8161E-11	8,8349E-0	0,022
Shetland population 1 (Europe)	SHE1	98	3	5,4	0,998	1	0,64	0,012	0,69	0,027	0,64	1,5189E-10	9,2029E-0	0,068
Shetland population 2 (the Netherlands)	SHE2	462	4	5,1	0,997	1	0,64	0,005	0,68	0,027	0,64	2,3604E-10	9,7918E-0	0,061
Thoroughbred	THO	55	0	4,7	0,997	1	0,67	0,015	0,7	0,025	0,64	1,9496E-18	8,4738E-0	0,042
Warmblood population 1 (the Netherlands)	WAR1	1354	4	6	1	1	0,73	0,003	0,76	0,015	0,72	2,1998E-11	1,3815E-0	0,031
Warmblood population 2 (the Netherlands)	WAR2	356	6	6,4	1	1	0,72	0,006	0,77	0,017	0,74	2,6388E-10	9,5746E-0	0,066
Warmblood population 3 (Europe)	WAR3	1238	0	5,9	1	1	0,73	0,003	0,75	0,016	0,71	4,3884E-11	1,6610E-0	0,029
Welsh population 1	WEL1	73	3	6,3	1	1	0,69	0,013	0,75	0,017	0,71	3,4282E-11	1,7871E-0	0,080
Welsh population 2	WEL2	152	4	6,4	1	1	0,68	0,009	0,76	0,015	0,72	1,2418E-11	1,4273E-0	

N(HWD)-počet markerů, které nejsou v Hardy-Weinbergerově rovnováze ($P < 0.05$), AR- průměrný počet alel na lokus, PE1-pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, je-li k dispozici DNA profil potomka a jednoho z rodičů, PE2-pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, je-li k dispozici DNA profil potomka a obou rodičů, HO-skutečná heterozygotnost, HO(SD)-standardní odchylka HO, HE-očekávaná heterozygotnost, HE(SD)-standardní odchylka HE, PIC-polymorfni informační obsah, HWP_{ID}-pravděpodobnost identity náhodně vybraných jedinců v populaci, která je v HW rovnováze, sib P_{ID}-pravděpodobnost identity sourozenců, Fis-Weir a Cockerham fixační index

2.3. IMPLEMENTACE GENOMICKÝCH MARKERŮ

2.3.1. Implementace genetických markerů do paternit

2.3.1.1. Historie sledování parentit ve světě a v ČR

2.3.1.1.1. Odborná – genetická

V ČR definuje metody testování genetického typu a ověřování parentit hospodářských zvířat – koní – vyhláška 471/2000 Sb v §29 odst. 4, takto: „...se ověřuje vylučovací metodou pomocí krevních skupin, biochemických polymorfních znaků nebo určující metodou pomocí mikrosatelitů.”

Vyhláška 448/2006 Sb. v §21 odst. 1 písm. d) upřesňuje, že zdrojem DNA pro analýzy se rozumí biologický materiál, ze kterého byla DNA získána. Verifikace parentit koní byla od poloviny 20. století prováděna metodami imunogenetiky (krevní skupiny) a postupně rozšiřována či doplňována markery biochemické genetiky (polymorfizmy proteinů a enzymů krevního sera a erytrocytů). Práce se vzorky čerstvé krve je však náročná a pravděpodobnost vyloučení nesprávné parentity se ve vztahu k plemeni pohybuje mezi 96-98% (Bowling, 2001). Na doporučení Mezinárodní společnosti genetiky živočichů (ISAG) z roku 1998 byl sestaven základní panel devíti mikrosatelitů (*AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HGT10*, *HTG4*, *VHL20*) pro identifikaci jedince a ověření parentity. Dalších osm mikrosatelitů (*ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HMS1*, *HMS2*, *HTG6*, *HTG7*, *LEX3*) pak bylo do panelu přidáno z důvodu zvýšení pravděpodobnosti vyloučení nesprávného rodiče (Dimsoski, 2003). Společnost ISAG pořádá pravidelně mezinárodní srovnávací testy. Mezinárodních srovnávacích testů koní ISAG 2009-2010 se účastnilo 82 laboratoří. Vyhodnocení testů bylo prováděno na 9 MS markerech základního panelu (*AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HGT10*, *HTG4*, *VHL20*). Na konferenci ISAG konané v roce 2010 v Edinburghu bylo laboratořím doporučeno tento základní panel rozšířit o další STR markery – *ASB17*, *ASB23*, a *HMS2* – na celkový počet 12 MS. Ve vědeckých publikacích se setkáváme ve vztahu k paternitě s různým počtem MS markerů. Např. Monies et al. (2011) pracují s 15 MS lokusy při testování parentit, Van de Goor et al. (2011b) ve své studii používají 17 mikrosatelitů.

2.3.1.1.2. Právní podmínky/úpravy ověřování původu hospodářských zvířat v ČR

Zákon 154/2000 Sb. “O šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat” (plemenářský zákon) ze dne 17. května 2000 uvádí: Hlava II, §4: “Šlechtitelská činnost a šlechtitelská opatření spočívají“: písm.f): “v ověřování a osvědčování původu nebo stanovování genetického typu”. Dalším paragrafem citovaného zákona, z pohledu tématu disertace, je §12. V odst.1) vymezuje, že původ a genetické typy stanovují tzv. oprávněné osoby, které jsou schopny doložit: a) členství v mezinárodních organizacích a splňují podmínky srovnávacích testů, b) jsou způsobilé vést vlastní databázi stanovených genetických typů. Zákon dále vyjmenovává, kdy musí být původ ověřen a genetický typ stanoven. Nikde však nedefinuje co to je genetický typ.

Na terminologicko-genetické nepřesnosti plemenářského zákona, týkající se termínů “genetický typ” a “ověřování původu” upozornila autorka disertace v jedné z kapitol knižní publikace Dvořák, Vrtková, (2001): “Ověřování původu lze asi více chápat jako ověřování, zda současné prase např. plemene bílé ušlechtilé pochází z prasete divokého (*Sus scrofa*). Často se používá termín z latiny “paternita” (pater = otec), tzv. kontrola rodičovství. Toto označení je nejvíce správné u lidí, neboť zde nejvíce platí přísloví: “matka je vždy jistá, otec jen někdy”. V chovech hospodářských zvířat a u prasat zvlášť je několik běžných možností záměny i matky. Proto nejspřávnější termín by byl: “ověřování rodičovství” – “parentity” (parentes = rodiče). Na základě konzultací autorů s tvůrci zákona při přípravě uvedené publikace došlo k určitému upřesnění termínu “původ” na vztah mezi rodiči a potomkem v §29 vyhlášky MZe č. 471/2000 Sb.

Pro chovatele koní byly informace ze zákona zpracovány v publikaci Vrtková, Dvořák (2004).

Následující vyhláška, kterou se stanovovaly podrobnosti k plemenářskému zákonu č. 136/2004 Sb. §16 s názvem “genetický typ” se vztahuje přímo na koně.

V roce 2006 bylo vyhlášeno úplné znění plemenářského zákona 154/2000 Sb. V §2 odst. 2 písm. g je definováno, že “původem se rozumí otec a matka, popřípadě další generace předků evidovaného zvířete”. Kontroverzním paragrafem je §12 o “Ověřování a osvědčování původu a stanovování genetického typu plemenných zvířat” (str. 4386 zákona). Odst. 2: “Oprávněná osoba je povinna” písm. a) “doložit způsobilost osvědčením o akreditaci”. U slova akreditace je index 6 odkazující na poznámku uvedenou na straně 4381, která zní: §9b zákona č.166/1999 Sb, ve znění zákona č. 131/2003 Sb. Zákon 166/1999 je veterinární zákon, neobsahuje žádnou zmínku o akreditaci.

V roce 2007 vyhláškou 199/2007 Sb. MZe stanovilo podrobnosti označování zvířat. K žádné změně týkající se ověřování původů a stanovování genetických typů nedošlo.

Ke zrušení nesmyslu v zákoně vztahujícího se k akreditaci laboratoří došlo až v roce 2009 v zákoně č.291/2009 Sb. o zemědělství, (kterým se měnil zákon č.252/197 Sb., o zemědělství). V zákoně 291/2009 je v části šesté, „Změna zákona o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat”. V uvedené části šesté je čl.VIII, :“Zákon č.154/2000 Sb., o šlechtění, plemenitbě a evidenci hospodářských zvířat a o změně některých souvisejících zákonů (plemenářský zákon), ve znění zákona č.309/2002 Sb., zákona č.162/2003 Sb., zákona 282/2003 Sb., zákona č.444/2005 Sb., zákona 130/2006 Sb. a zákona č.182/2008 Sb., se mění takto :

Pod uvedeným textem jsou první dva odstavce, čítající 10 řádků, plné číslic a textu o vkládání různých nařízení komise ES.

V odstavci 3., pouze na polovině jednoho řádku je napsáno, pro možnosti testovat parentity hospodářských zvířat, v ČR podstatná podmínka: „V § 12 odst.2 písm. a) se poznámka č.6 zrušuje.“ Od roku 2010 je „Ověřování a osvědčování původů a stanovování genetického typu plemenných zvířat“ v seznamu podnikatelských činností v oblasti zemědělství – živočišná výroba.

Uvedení jen právních záležitostí podmiňujících implementaci detekce a monitoringu genomických markerů do ověřování parentit, ukazuje na složitost práce biotechnologicko – živočišných – molekulárně genetických laboratoří v regionu České republiky.

2.3.1.2. Kam směřuje detekce a monitoring pro paternitu – trendy v ověřování paternit

Pro ověřování parentit jsou mikrosatelity populární od začátku jejich využívání na konci osmdesátých let. Možnosti a současné trendy ve stanovování mikrosatelitů popisuje ve své práci Guichoux et al. (2011). Zabývá se možností využití SNPs pro ověřování původů a popisuje problémy, které se ve využití SNP vyskytují. Píše, že i přes velkou konkurenci nových genotypizací a sekvenačních technologií se stále ve velké míře používají mikrosatelitní lokusy. Jsou nákladově efektivní. V poslední době se výrazně zlepšily metody tvorby multiplex PCR, což snižuje cenu jejich genotypování. Je možné zvyšovat počty stanovovaných mikrosatelitních lokusů, čímž se zvyšuje kvalita a efektivnost multiplexů MS.

O využívání jiných než mikrosatelitních markerů i k ověřování původů a individuální identifikaci jedince svědčí i zavedení srovnávacích testů ISAG pro stanovování SNPs. Pro skot byly SNP poprvé předmětem srovnávacího testu v roce 2009– 2010.

Možnost využít SNPs pro testování parentity u koní byla diskutována na konferenci ISAG v Edinburghu v roce 2010. Počet SNP se stejnou vypovídací hodnotou jako 12 STR panel byl stanoven na 300 SNPs.

2.3.1.2.1. Požadavky ICAR

Cílem ICAR (International Committee for Animal Recording, mezinárodní výbor pro kontrolu užítkovosti) je zlepšit záznamy a hodnocení hospodářských zvířat. ICAR stanovuje pravidla, normy a konkrétní pokyny pro identifikaci zvířat a registraci jejich původů.

ICAR stanovuje minimální požadavky pro laboratoře, které provádí DNA analýzy a vymezuje konkrétní pravidla a pokyny pro určování/testování rodičovství na základě stanovení mikrosatelitů. Pro získání akreditace ICAR pro verifikaci původů musí laboratoř splňovat požadavky na mezinárodní certifikaci laboratoře, vzdělání pracovníků a vedení laboratoře, zařízení a přístrojové vybavení, účast v mezinárodních srovnávacích testech. Stanovuje také minimální počet stanovovaných MS markerů. Používané musí být MS markery, které jsou doporučeny společností ISAG. Minimální požadavek je na použití kompletního panelu ISAG (do roku 2010 to bylo 9 MS, od roku 2011 pak zvýšený počet 12 MS). V roce 2014 byl zvýšen požadavek na 17 MS markerů.

2.3.1.2.2. Čipy a paternita

Weller et al. (2010) testovali 576 izraelských holštýnských býků čipem BovineSNP50 BeadChip, a 38 828 SNPs (tj. 72% z čipu) vyhodnotili jako vhodné k ověřování paternity u skotu. SNPs jsou lokalizovány na autozomech, 747 SNPs na chromozomu X a 1672 SNPs s neznámou lokalizací.

Genotypy SNP u otců a jejich synů měli k dispozici u 204 býků. Na základě kritéria > 2% neshody mezi genotypem domnělého otce a syna, otcovství zamítli pro sedm býků (3,5%). Největší absolutní počet neshod u jednoho otce a jeho syna byl 4001 z 37tis. SNP. Četnost nesrovnalostí byla nad 0,025 pro 81 SNP, které proto vyřadili jako nevhodné pro paternitu. Tím snížili výskyt neshod na 0,0001 a proto konstatují, že testace SNPs pro genomickou selekci může sloužit i pro paternitu.

Obecnější stanovisko zaujímají Fan et al. (2010) z Center for Integrated Animal Genomics, Iowa State University. V článku uzavírají, že i přes některé výhrady je zapotřebí lépe využívat husté sítě SNPs a HapMap analýz genomu hospodářských zvířat v akademických výzkumech a inovacích živočišných biotechnologií.

2.3.1.3. Paternita u koní (MS, SNP, multiplexy, cena)

Implementace metod detekce markerů je vázaná na finanční náklady detekce/testování. Snahy o snížení nákladů na DNA testy jsou vedeny různými cestami.

Jednou je sdružování markerů do multiplexů. Pro paternitu jsou běžně užívané multiplexy mikrosatelitů = panely MS.

Protože se pro paternitu začínají používat SNP a testace chorob, barev atd., detekce je postavena na SNP, začínáme se v patentové literatuře setkávat s postupy spojující paternitu s dalšími znaky do jednoho testu. Např. Compositions, methods and systems for the simultaneous determination of parentage, identity, sex, genotype and/or phenotype and breed determination in animals (Ketchum, M. S., patent US20110129825A1 2011). Patent popisuje možnosti využití různých polymorfismů DNA pro současné stanovení více genetických charakteristik jako je například rodičovství, identita, pohlaví atd.

2.3.1.3.1 Hodnocení spolehlivosti markerů

Spolehlivost MS markerů pro ověřování původu u různých populací koní popisují Van de Goor et al. (2011b). Ve své studii analyzovali 35 populací koní s celkem 8641 jedinci. Pro práci použili panel 17 MS lokusů. Pro každý lokus u všech 35 populací koní stanovili polymorfni informační obsah (PIC), pravděpodobnosti vyloučení nesprávného rodiče, jsou-li genotypy obou rodičů známy (PE1) a pravděpodobnosti identického DNA profilu sourozenců (sib PID).

Provedli také vyhodnocení spolehlivosti panelů s 9, 12 a 17 MS lokusy pro uzavřenou populaci koní fríských (FRI) a outbredních populací plnokrevníků (THO), teplotekrevníků (WAR) a všech tří populací společně (ALL). Pravděpodobnost vyloučení

nesprávného rodiče, je-li znám genotyp pouze jednoho z rodičů (PE2) pro populaci zahrnující všechna plemena byla 0,9944, 0,9994 a 0,999, pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, jsou-li genotypy obou rodičů známe (PE1) se byla 0,9998, 0,9999 a 0,9999 pro panely s 9, 12 a 17 MS markery.

Tab. 3. Vyhodnocení spolehlivosti panelů 9, 12 a 17 MS lokusů u populací fríských (FRI) a outbredních populací plnokrevníků (THO), teplokrevníků (WAR) a všech tří populací společně (ALL)

	PE1				PE2				PIC			
	FRI	THO	WAR	All	FRI	THO	WAR	All	FRI	THO	WAR	All
9 STR	0.7282	0.9650	0.9852	0.9944	0.9330	0.9972	0.9992	0.9998	0.401	0.651	0.717	0.766
12 STR	0.9103	0.9877	0.9974	0.9994	0.9907	0.9996	0.9999	0.9999	0.465	0.646	0.732	0.780
17 STR	0.9305	0.9974	0.9997	0.9999	0.9957	0.9999	0.9999	0.9999	0.404	0.640	0.758	0.759

PE1 – pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče je-li znám genotyp potomka a obou rodičů
 PE2 – pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče je-li znám genotyp potomka a jednoho rodiče
 PIC – polymorfní informační obsah

Informace o spolehlivosti MS markerů pro identifikaci a ověřování parentit u různých populací koní v ČR jsou popsány v kapitole Výsledky a diskuze tohoto disertačního spisu.

2.3.2. Implementace genetických markerů do predikce zbarvení

2.3.2.1. Genomické markery zbarvení obecně

Jako jeden z prvních byl na úrovni DNA prozkoumán systém pigmentace u myší. V současnosti je známo 130 lokusů zapojených do pigmentace.

V roce 1995 proběhl workshop na podporu spolupráce vědců zabývajících se genomem koní a během posledního desetiletí byl udělán v molekulární genetice koní velký pokrok, což nám dnes umožňuje analyzovat základ fenotypu zbarvení koní na úrovni DNA. První publikovaná mutace ovlivňující zbarvení koní byla “chestnut alela” – jednonukleotidová (SNP) mutace (C901T; AF288357) v genu melanocortinového receptoru 1 (*MC1R*) (Marklund et al. 1996). Zbarvení srsti koní bylo mezi prvními studovanými znaky a pro některé z nich jsou dnes již komerčně dostupné DNA testy.



Obr.6.
 LEGACY'S FRONTIER GOLD
 Testována UCDAVIS
 genotyp zbarvení: *eeAaCrCr*

<http://www.legacyspottedwalkers.com>

Tyto testy umožňují chovatelům provádět individuální identifikace, ověřovat původy, selektovat na specifickou barvu. Genotyp zbarvení umožňuje chovatelům také zabránit šíření chorob, které jsou s určitými zbarveními spojené.

I přes velký pokrok v genetice zbarvení a určování genotypu zbarvení na úrovni DNA je stále zapotřebí plně rozlišit a přesně definovat některé fenotypy zbarvení koní (např. odstíny jako je tmavý ryzák nebo tmavý hnědák, sezónní změna barvy, problémy fenotypů, které se navzájem podobají, ale jsou geneticky odlišné a naopak, atd.). Např. geneticky stanovené zbarvení smoky black.

Obr.7. Geneticky stanovené zbarvení smoky black



<http://www.horsegroomingsupplies.com>

U nejvýznamnějšího genového zdroje koní v ČR starokladrubského koně se u vraníků různou intenzitou pigmentace zabývá Hofmanová et al. (2015). V práci vyhodnocovali vliv různých faktorů na intenzitu černého zbarvení. V závěru doporučují provést genetické analýzy.

Tak, jako fenotyp zbarvení hraje důležitou roli při vývoji moderních plemen hospodářských zvířat, včetně koní, genetika zbarvení nám může pomoci k lepšímu pochopení procesu domestikace (např. vliv bílých znaků na chování, temperament), protože fenotyp zbarvení hrál důležitou roli v časně domestikaci při počátečním výběru zvířat.

Archeologové diskutují, zda neolitické kresby puntíkatých koňů v jeskyni Pech – Merle jsou výplodem fantazie či realitou. Studie DNA prehistorických koní Pruvost et al. (2011) dokázala, že umělec zřejmě zachytil to, co skutečně kolem sebe viděl. Slavné obrazy “tečkovaných” koní vznikly ve Francii zhruba před 25 000 lety, ale nápadně připomínají zbarvení “leopard” moderních koní. Vědci testovali 9 lokusů zbarvení srsti u 31 prehistorických koní ze Sibíře, východní i západní Evropy a Iberského poloostrova. 18 koní bylo hnědáků, 7 černých a 6 neslo alelu asociovanou s barevným vzorem leopardí komplex (LP), která se vyskytuje u současných koní s „leopardím vzorem“. Podle výzkumu se tyto koně vyskytovali také v západní Evropě a je tak pravděpodobné, že se proháněli kolem jeskyní, kde se s nimi potkával pravěký člověk.

Geny, ovlivňující zbarvení srsti a kůže u savců je možné rozdělit do dvou skupin:

- ty, které hrají úlohu při syntéze pigmentu
- ty, které působí na pigment produkující buňky, melanocyty

Varianty ve zbarvení srsti a kůže jsou výsledkem efektu působení těchto jednotlivých genů nebo je zbarvení výsledkem jejich vzájemného působení (Rieder et al. 2001).

2.3.2.2. Gen *KIT* – lokus *W* – bílá barva u koní

V klasické genetice byl pro bílou barvu označen lokus *W* ovlivňující přítomnost pigmentu v kůži a srsti. Dominantní alela *W*, způsobuje neschopnost tvořit pigment v kůži a srsti. Její nositel má růžovou kůži a bílou srst, což je způsobeno úplnou absencí melanocytů a melaninu. Hříbata se rodí bílá, ale mohou mít pigmentovanou srst na uších a kolem nich, někdy i v hřívě a na hřbetě, časem pigment vymizí. Homozygoti (*WW*) působí letálně většinou již v embryonálním stádiu, případně hříbata hynou velmi brzy po narození (Bowling 1996). Detekcí MS *ABS23* Mau et al. (2004) lokalizovali *W* lokus na ECA3q, kde již byl lokalizován gen *KIT* (Marklund et al. 1996). U plemene „Montagnes“ byl v intronu genu *KIT* nalezen SNP vykazující vazbu s MS *ASB23* a dominantní alelou *W* lokusu *W*. Klasický lokus *W* pro bílé zbarvení tak byl specifikován jako molekulární marker – genomický – gen *KIT*.

Mau et al. (2004) z rodokmenových analýz výskytu fenotypů bílého zbarvení plemene „Montagnes“ dospěli k závěru, že jde o spontánní mutaci u jedné z klisen.

V současnosti novou mutaci v genu *KIT* pro dominantní bílé zbarvení popisují roce 2010 Holl et al. (2010). Jedná se o delecii 5-bp ve třetím exonu, která byla nalezena u potomka, jehož rodiče (plnokrevníci s potvrzenou parentitou k danému hříběti) tuto mutaci průkazně neměli. Tato de novo mutace je v pořadí dvanáctá pro dominantní bílou pigmentaci odhalenou ve třetím exonu. Celkový počet mutací pro dominantní bílou barvu se tak ze 14 polymorfizmů popsanych u Haase et al. (2009) zvyšuje na 15 různých alel (SNPs). Gen *KIT* vykazuje vůbec největší alelickou variabilitu mezi geny ovlivňujícími zbarvení koní. Recentní seznam mutací, které se ve fenotypu projeví dominantně pláštově bílým zbarvením (white) nebo strakatostí (tobiano, sabino) uvádí Hauswirth et al. (2013). Asociovány s *KIT* genem jsou příměsi bílé srsti (roan) a bílé skvrny na hlavě a odznaky na končetinách (white face a leg markings). Přehledná tabulak všech jím uvedených mutací je v příloze disertace.

2.3.2.3. Některé další geny odpovědné za bílé zbarvení

Za bílé zbarvení koní jsou odpovědné i další geny (lokusy). Jedním z nich je lokus Grey (gen syntaxin 17 – *STX17*) způsobující tzv. vybělování známé např. u starokladrubských koní. Jeho normální alela *g* se podílí na řízení dělení melanocytů. Duplikace v šestém intronu (alela *G*) podmiňuje postupné vybělování srsti. K vybělování dochází u jakékoli barvy, kůže a oči zůstávají pigmentovány. Pielberg et al. (2008) zjistili v souboru 694 lipických koní rychlejší a úplnější vybělování u dominantních homozygotů (*GG/GG*) ve srovnání s heterozygoty (*GG/Gg*).

2.3.2.4. Genomické markery zbarvení koní

U koní bylo doposud pojmenováno 31 lokusů ovlivňujících zbarvení, a identifikováno 11 genů.

Přehled identifikovaných genů a lokusů podmiňujících zbarvení koní (Rieder 2009)

Fenotyp	GEN Lokus (symbol)	Genotyp (Alely)	Dědičnost, interakce, asociace
Základní zbarvení			
Ryzák (Chestnut, sorrel)	<i>MC1R</i> Extensio (E)	<i>e/e</i>	Autozomálně recesivní Epistatický k černé Produkce červeného pigmentu
Hnědák (Bay, brown)	<i>MC1R</i> Extensio (E) <i>ASIP</i> Agouti (A)	<i>E/e, E/E</i> <i>A/a, A/A</i>	Autozomálně dominantní,
Vraník (Black)	<i>ASIP</i> Agouti (A)	<i>a/a</i>	Autozomálně recesivní
Ředící barvy			
Izabela, plavák (Palomino, buckskin)	<i>MATP</i> Cream (C)	<i>C/Cr</i>	Autozomálně kodominantní Epistatický k Chestnut/sorrel a bay, není nebo níže epistatický efekt na černou
Cremello, perlino	<i>MATP</i> Crem (C)	<i>Cr/Cr</i>	Autozomálně kodominantní Epistatický k černé u homozygotních koní Krémově bílé zbarvení s modrými očima.
Dun	Neznámý Dun (D)	<i>D/d, D/D</i>	Autozomálně dominantní Epistatický ke všem základním barvám Ředění základního zbarvení, výskyt primitivních znaků (pruhy na hřbetě, končetinách).
Silver Dapple	<i>PMEL 17</i> Silver (Z)	<i>Z/z, Z/Z</i>	Autozomálně dominantní Epistatický u bay a black (eumelanin ne nebo s nízkým efektem u chestnut/sorrel (pheomelanin) Čokoládové až rudé tělo s bílou nebo šedou hřívou a ocasem. U některých plemen asociace s vícečetnými kongenitálními okulárními anomáliemi (MCOA).
Champagne kovový odlesk	<i>SLC36A1</i> Champagne (CH)	<i>CH/ch, CH/CH</i>	Autozomálně dominantní Epistatický ke všem základním barvám Zbarvení duhovky očí a barvy kůže se může měnit s věkem.
Greying – vybělování			
Grey	<i>STX 17</i> Grey (G)	<i>G/g, G/G</i>	Autozomálně dominantní Epistatický ke všem barvám Vybělování s věkem. Vyšší výskyt melanomu u nositelů alely „a“ genu ASIP. Progresivní vybělování homozygotů <i>G/G</i> .

Fenotyp	GEN Lokus (symbol)	Genotyp (Alely)	Dědičnost, interakce, asociace
Depigmentace			
Roan	Asociovaný ke <i>KIT</i> Roan (RN)	<i>RN/rn, RN/RN</i>	Autozomálně dominantní Epistatický ke všem barvám Rozptýlené bílé chlupy v základní barvě. Homozygotní genotypy <i>RN/RN</i> jsou považovány za letální.
Overo	<i>EDNRB</i> Overo (O)	<i>O/o, O/O</i>	Autozomálně dominantní Epistatický ke všem barvám Nepravidelné bílé skvrny často s horizontálním rozložením. Homozygotní jedinci <i>O/O</i> jsou postiženi syndromem letální bílé (OLWS).
Tobiano	<i>KIT</i> Tobiano (TO)	<i>TO/to, TO/TO</i>	Autozomálně dominantní Epistatický ke všem barvám Pravidelné bílé skvrny často s vertikálním rozložením.
Sabino	<i>KIT</i> Sabino (SB)	<i>SB/sb, SB/SB</i>	Autozomálně dominantní Epistatický ke všem barvám Bílé skvrny. Homozygoti <i>SB/SB</i> mají téměř kompletní nebo kompletně bílé zbarvení.
Leopard (Appaloosa)	Asociovaný s <i>TRMP1</i> Leopard (LP)	<i>LP/lp, LP/LP</i>	Autozomálně neúplně dominantní Epistatický ke všem barvám Homozygoti <i>LP/LP</i> méně pigmentovaní než heterozygoti, postiženi noční slepotou (CSNB).
Bílá (white)	<i>KIT</i> White (W)	<i>W/w, W/W</i>	Autozomálně dominantní Epistatický ke všem barvám Různě rozsáhlá depigmentace. Homozygotní genotypy <i>W/W</i> jsou považovány za letální.
Bílé skvrny na hlavě a znaky na končetinách	Asociace s <i>MC1R</i> , <i>KIT</i> , <i>MITF</i> White Markings (WM)	<i>WM/wm, wm/wm</i>	Autozomálně recesivní. Epistatický k chestnut/sorrel V závislosti na základním zbarvení, buď <i>KIT</i> gen nebo gen <i>MITF</i> primárně způsobují bílé odznaky

2.3.3. Implementace genetických markerů do prezentace plemen koní z ČR v databázích hospodářských zvířat EFABIS a DADIS

Diverzita hospodářských zvířat je důležitá pro úspěšný chov a dává strategické možnosti pro genomickou selekci. Genetické zlepšování je důležité pro udržitelnost chovaných plemen v měnícím se prostředí.

Pro udržitelnost genových zdrojů a zachování biodiverzity hospodářských zvířat se ve světě stále více využívá poznatků a informací molekulární genetiky – genomiky. Dokladem je např. publikace Ajmone-Marsanet al. (2010) informující o tříletém projektu GLOBALDIV – globální pohled na diverzitu hospodářských zvířat a její zachování. Cílem projektu financovaného Evropskou komisí je zlepšit zachování, popis a využití genetických zdrojů v zemědělství v EU i mimo ni. Sdružuje partnery, kteří se na projektech zachování a udržení genetické diverzity hospodářských zvířat podíleli v rámci členských projektů EU nebo kontinentálních projektů. Zajišťuje tak větší počet odborníků, kteří se dané problematice věnují. Cílem publikace Boettcher et al. (2010) je podat přehled o přístupech, metodách a kritériích pro využití molekulárně genetických dat v zachování diverzity živočišných zdrojů. U hospodářských zvířat se stanovují kritéria pro zachování diverzity meziplenné a v rámci plemene.

Technologická platforma pro udržitelný chov a reprodukci hospodářských zvířat (FABRE-TP ,2008) definovala jako jednu z pěti priorit oblastí výzkumu diverzitu hospodářských zvířat. Očekávaný dopad projektu optimalizace metod pro udržení genetické diverzity jsou nové perspektivy pro biodiverzitu v různých systémech hospodaření, s přihlédnutím k variabilitě národních plemen.

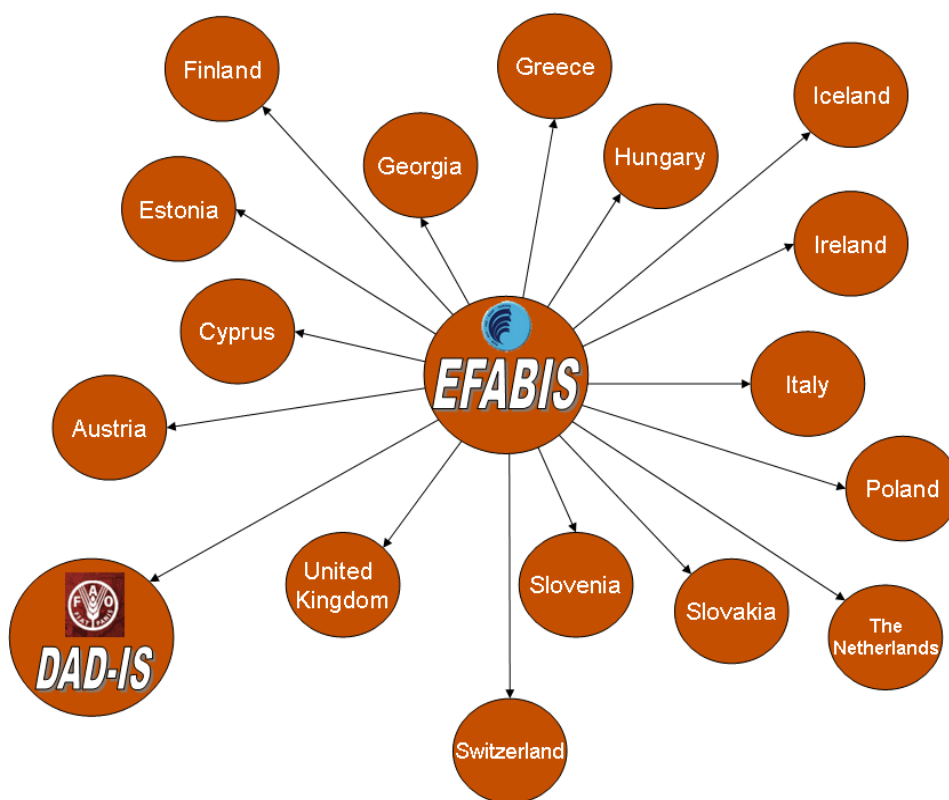
2.3.3.1. Rámcové údaje o informačním systému EFABIS a DADIS

Pod světovou organizací FAO (Organizace pro výživu a zemědělství) existuje rozsáhlá databáze pod označením DAD-IS (Domestic Animal Diversity), běžně dostupná přes internet, informující o plemenech zvířat v celém světě. Je celosvětovou databází.

Evropský, regionální, rozsah má databáze EFABIS (European Farm Animal Biodiversity Information System), spadající pod Evropskou asociaci pro živočišnou výrobu (EAAP). Evropská databáze, (vývoj softwaru a koncepce FABISnet) se začala tvořit v rámci projektu EAAP s podporou Evropské komise v r. 2002. Ukončení projektu EFABISNet – závěrečnou konferencí – proběhlo v prosinci 2010 (Palermo, Itálie).

V projektu EFABIS byla vytvořena webová síť Národních databází, v níž je zapojeno celkem 16 zemí. ČR zde bohužel není zapojena – nemá svoji národní databázi

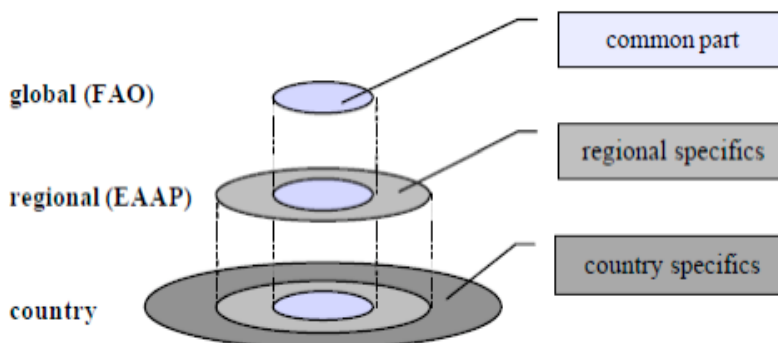
Obr. 8. Schéma zapojení zemí mezi informační systémy sítě biodiverzita hospodářských zvířat



<http://efabis.tzv.fal.de>

Národní databáze jsou nejnižšími jednotkami systému EFABISnet, ale komunikují s databázemi na regionální nebo globální úrovni. Národní databáze jsou většinou širší podle specifik daných zemí a nemusí být obsaženy / synchronizovány ve vyšších databázích.

obr. 9. Schéma hierarchie databází



<http://www.fao.org/dad-is>, <http://efabis-eaap.tzv.fal.de/>

2.3.3.2. Požadavky na údaje v databázi EFABIS

V databázích na webových stránkách EFABIS, provozovanou Evropskou asociací pro živočišnou výrobu (EAAP) a DADIS, provozovanou FAO, je v současnosti zahrnuto ze 189 zemí 38 druhů a 14873 plemen hospodářských zvířat. U více jak 1000 plemen jsou zveřejněny i jejich fotografie.

Pro koně jsou zde údaje o 1547 plemenech chovaných v zemích celého světa. V Evropských zemích je v databázi registrován chov celkem 774 plemen koní. Za ČR je v databázi EFABIS zařazeno 21 plemen koní. Pro každé plemeno je v databázi jeden „list“. Na listu pro každé plemeno pod záhlavím následují jednotlivé oddíly, ve kterých mají být základní charakteristiky daného plemene.

Po ukončení velkého mezinárodního projektu v roce 2010, kdy se vytvářel informační systém EFABIS, byl do listu plemene zařazen nový, speciální oddíl pod označením **“Genetic features“** Podle požadavků Evropské asociace pro živočišnou výrobu, mají se v tomto novém oddíle uvádět údaje o molekulárně genetické variabilitě daného plemene. V nápovědě k oddílu **“Genetic features“** je uvedeno, jaké informace by měl obsahovat, aby byla možnost srovnání mezi plemeny nebo populacemi stejných plemen v různých zemích. Návod je platný obecně pro všechny druhy hospodářských zvířat. Každá země má poskytnout informace, tzn. genetické údaje, které má k dispozici.

Uvádění molekulárně genetických informací o plemenech svědčí, podle nás, o úrovni rozvíjení aktuálních směrů genetického výzkumu v té které zemi.

2.3.4. Implementace genetických markerů do eliminace chorob a vad

Detekce a monitoring variability genomických markerů asociovaných s fyziologickými procesy v organismu přináší důležité poznatky o genetice chorob u koní, umožňující jejich cílenou eliminaci. Poznatky získané studiem u koní jsou významné i pro lidskou populaci, neboť přes 90 dědičných chorob má obdobu u lidí. V prioritách strategického plánu EU-USA je zvláště vyzvednuta oblast genetiky imunitní odpovědi u koní pro možnost využití poznatků v humánní medicíně.

Pro mapování sekvencí imunitní odpovědi jsou využívány MS. V ČR na této problematice spolupracují pracoviště VFU Brno a Mendelovy univerzity Brno, např. Futas et al. (2012) na modelové populaci starokladrubského koně analyzovali asociace mezi přítomností kožního melanomu u vybělujících koní, mikrosatelitními markery a kandidátními geny imunitní odpovědi. Byly stanoveny genotypy v 50 MS markerech a 36 polymorfních markerech. Na základě výsledků byly lokalizovány tři oblasti na chromozomech ECA 25, 9 a 20 signifikantně asociované s výskytem melanomu.

Pro návaznost a ucelenost informací o vývoji poznání asociací, tj. výzkumu jak pokračuje implementace detekovaných markerů do studia chorob, uvádíme dva příklady:

1) podrobněji popíšeme příklad, který byl na světové konferenci v prosinci 2010 představen jako první informace popisující u koní asociaci genové exprese s genotypem zbarvení srsti a oční chorobou.

Vrozená noční slepota (CSNB) u některých plemen koní je již mnoho let spojována se zbarvením typu appaloosa a leopard strakatostí. Z klasického zkoumání dědičnosti uvedeného zbarvení byl závěr, že se jedná o jeden inkompletně dominantní autozomální lokus Lp. Následovalo zjišťování genetických vazeb (Terry et al. 2001,2002) s genem *KIT* (tyrosin kinasa receptor) jako kandidátním genem pro strakatost typu leopard. Detekcí mikrosatelitních markerů o dva roky později Terry et al. (2004) mapoval lokus Lp na chromozom ECA1 v délce 6-cM. Srovnáním úseku ECA1 s homology u člověka a u myši vybrali jako kandidátní gen *TRPM1*, (transient receptor potential cation channel subfamily M, member 1), označovaný i jako melastatin (*MLSN1*).

Za další čtyři roky Bellone et al. (2008) studovali genotypy *TRPM1* a ukázali, že homozygotně dominantní genotyp (*LP/LP*) je pravděpodobně spojen s vrozenou noční slepotou (CSNB), související s regulací exprese *TRPM1* v oku. Jen s ročním odstupem Audo et al. (2009) v markeru *TRPM1* identifikovali 3 SNP a prokázali asociace některých alel leopard komplexu s kongenitální stacionární noční slepotou. Projev/působení biomarkeru *TRPM1* měřili hladinou syntetizované mRNA, technologií kvantitativní real-time RT-PCR. Vyslovili hypotézu, že *TRPM1* molekulárním mechanismem reguluje oba lokusy: LP (zbarvení) a CSNB (slepota). Citují i Zeitz et al. (2007), kteří u lidí detekovali mutaci v genu *CABP4*, který je členem genové rodiny pro kalcium vážící proteiny a z 30-40% se podílí na redukci transkriptu u genu autozomálně recesivní formy noční slepoty u člověka.

V roce 2010 Bellone et al. (2010) pak u souboru 400 koní z 5ti plemen odhalili 6 SNP v genu *TRPM1*. Pro tři z nich detekovali signifikantní asociace mezi genotypem strakatého zbarvení a noční slepotou. Na závěr konstatují, že kterýkoliv z těchto SNP může být kausativní mutací a pak by šel použit jako reálný a objektivní DNA marker v praktickém DNA testu.

2) Další přesvědčivý důkaz využití detekce genomických markerů, byl publikován v dubnu 2010 v otevřeném internetovém časopise „PloSGenetics“ výzkumným týmem z univerzit v USA (Brooks et al. 2010). Recenze označují zveřejněné postupy a výsledky za první úspěšnou implementaci sekvenování celého genomu koně pro objev mutace vyvolávající úhyn hříbat a spojenou se zbarvením.

Jedná se o letální, autozomálně recesivní, dědičnou chorobu koní nazývanou „Lavender Foal Syndrome“ (LFS) – Syndrom levandulového hříbete. LFS je charakterizován neurologickými abnormalitami a zředěním zbarvení (dilute coat color) u geneticky recesivního homozygota. (Lavender syndrom je záchvatovité onemocnění, které vede k úhynu hříbat brzy po narození).

Výzkumníci provedli u vybraných koní scan genomů s 56000 SNP čipem. Asociaci s LFS našli s genem „myosinVa“ = *MYO5A*. Mutace spočívá pouze v deleci jedné

báze v třicátém exonu, která mění čtecí rámeček, porušuje čtení stop kodonu. Gen je na chromozomu ECA1. K detekování jednobázové delecce v DNA lze využít i jednodušší metodu PCR-RFLP. LFS byl primárně identifikován u arabského plnokrevníka, jeho egyptské linie. Molekulárně genetické testy na danou mutaci ukázaly, že všechna postižená hřebata byla homozygotní v SNP (deleci) genu *MYO5A*.

Pro chovatele araba je závažný odhad více jak 10% frekvence recesivní alely v populaci a skutečnost, že tři ze šesti zjištěných heterozygotů přenašečů byli plemenní hřebci. Znalost genotypů hřebců může velmi rychle negativně nebo pozitivně ovlivnit cenu hřebců.

Na následujícím obrázku je hříbě s Lavender Foal Syndrome, s patrnými křečemi svalstva, levandulovým zbarvením a recesivně homozygotním genotypem v markeru *MYO5A* – obr.10.

Obr. 10. Hříbě s Lavender Foal Syndromem.

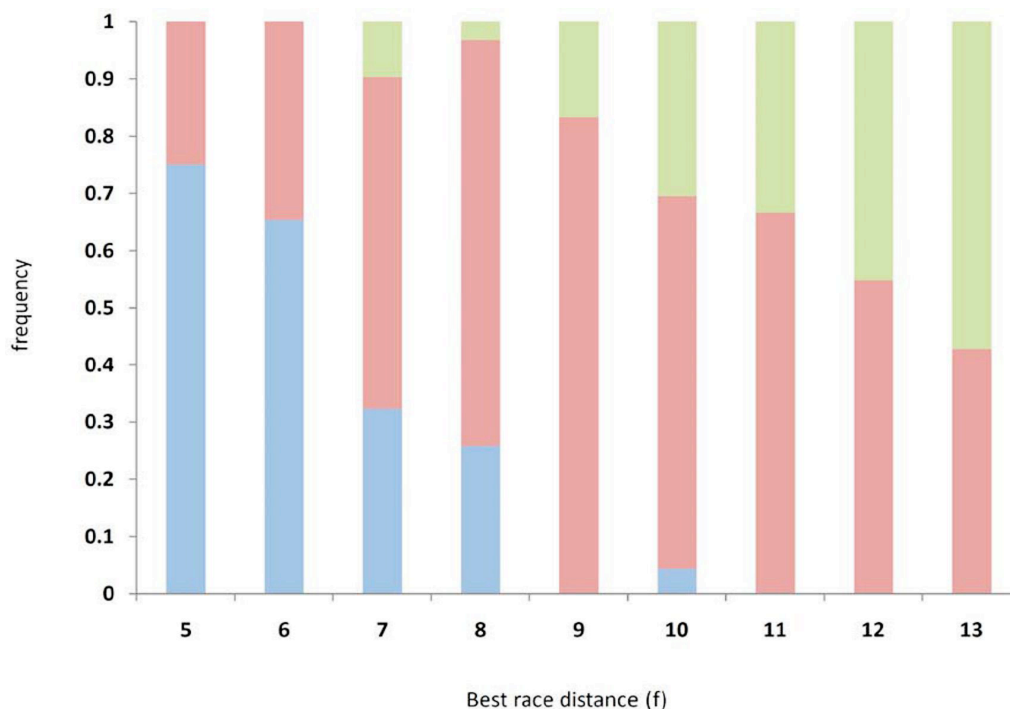


PLoS Genet. 2010 April; 6(4): e1000909.

2.3.5. Implementace genetických markerů do predikce výkonnosti

Na základě znalostí vlivu různých variant genu myostatinu (*MSTN*) na svalovou hypertrofii u řady savců a k vysokému obsahu svalové hmoty v poměru k tělesné hmotnosti se kolektiv vědců University College of Dublin (Hill et al., 2010) soustředil na zkoumání sekvenčních variant genu *MSTN* u koní. Souvislost mezi variantami *MSTN* genu a fenotypem závodních koní (dostihovou výkonností) ověřovali na 148 plnokrevných koních. Identifikovali nový SNP polymorfismus (g.66493737C>T), který je silně asociován s optimální dostihovou vzdáleností pro elitní závodní koně. Zjistili, že genotyp *CC* je vhodný pro rychlé, krátké vzdálenosti, *CT* pro střední a genotyp *TT* se vyznačuje vyšší vytrvalostí. Při retrospektivním hodnocení výkonů koní u 142 hřebců a jejich potomků predikují, že koně genotypů *CC* a *CT* budou pravděpodobně úspěšnější jako dvouletí závodní koně než jedinci genotypu *TT*.

Obr.11. Varianty genu *MSTN* pro optimální dostihovou vzdálenost u skupiny 179 vítězných plnokrevníků. Genotypy *CC* (modrá), genotypy *CT* (červená), genotypy *TT* (zelená). (Hill et al., 2010).



Neočekávaný výsledek přinesl univerzitní základní výzkum v genomice a neurovědách financovaný grantem švédské agentury pro strategický výzkum. Výzkumníci na Zemědělské univerzitě v Uppsale u islandských koní zkoumali, proč někteří z nich mohou přecházet z klusu do cvalu a někteří ne a objevili nonsense mutaci na 23. chromozomu v genu *DMRT3* (*DMRT3_Ser301STOP*) asociovanou s chody koní (Andersson et al., 2012). Analyzovali 352 islandských koní a zjistili, že jedinci homozygotního genotypu pro nonsense mutaci *AA* nejsou schopni při zrychlování chodu přecházet z klusu do cvalu.

Ze širšího pohledu uvádíme několik stanovisek obsažených v materiálu – Anonym (2011): „Nový pětiletý strategický plán EU-USA v oblasti biotechnologií“ na období 2011-2015 zveřejněném na www.ec.europa.eu/research/biotechnology, koncem listopadu 2011.

Pracovní skupina živočišných biotechnologií doporučuje pracovat ve výzkumu zaměřeném na:

- zlepšování vizualizací genomických dat
- integrovat genomické a genotypové informace s fenotypovými údaji

- vylepšovat nástroje a databáze pro stimulaci výzkumu a vývoj technologií genomiky, inovace markery podporované selekce a predikce fenotypů na bázi genomických informací
- další prioritu směřuje komise do přípravy a vedení mladých výzkumníků ke spolupráci s biomedicínským a přírodovědeckým genetickým výzkumem

Členové pracovní skupiny upozorňují na poddimenzovanost výzkumu genomiky zvířat, od které se očekává řešení dříve nemožných problémů zdraví a šlechtění. Předpokládají, že více než dosud se, vedle celogenomové sekvenace, popisu genů a asociačních studií, bude muset v agrogenomice využívat komplexity genové exprese, genové regulace a genomové metylace.

Poukazují na význam genetiky hospodářských zvířat pro jiné oblasti, především v možnostech testování výzkumných hypotéz, vyžadujících křížení jedinců majících dlouhodobé a přesné geneticko-rodokmenové údaje a dobře definované fenotypy.

Shodují se v názoru, že prioritami pro chovatele zvířat budou objevy dalších genomických markerů, přímo souvisejících s chorobami a jejich validace, selekční studie a predikce fenotypů.

Přehled současného stavu genomického živočišného výzkumu ukončíme aktuálním výsledkem z technologie genové editace u prasete. Výzkumníci z univerzity v Soulu editovali změnu *MSTN* genu, která vedla k dvojtému osvalení. Výsledky popisuje v prestižním časopise Nature v červnu 2015 Cyranoski D.

Genová editace má velký potenciál i u koní, především pro jejich pigmentaci.

Předložený disertační spis přináší dílčí genetické poznatky využité v ČR, je v souladu s uvedenými prioritami akčního plánu spolupráce USA a EU.

3. CÍLE DISERTACE

3.1. Detekovat MS a SNP u vybraných plemen koní v ČR

3.2. Implementovat sledované genomické markery do:

3.2.1. Charakteristiky diverzity populací

3.2.2. Genetické predikce zbarvení

3.2.3. Informačního systému EFABIS

3,2.4. Forezního použití v ČR

4. MATERIÁL A METODIKA

4.1. Analyzovaná zvířata

4.1.1. Detekce mikrosatelitních markerů (MS)

Stanovení diferencí v MS mezi plemeny bylo provedeno u 7682 jedinců obou pohlaví (hřebců a klisen) 13 plemen. Český teplokrevník (ČT, 3789 ks), slovenský teplokrevník (CS, 1659 ks), appaloosa (APP, 145 ks), achaltekinský kůň (ACHT, 179 ks), huculský kůň (HK, 473 ks), paint horse (PH, 327 ks), quarter horse (QH, 418 ks), fjord (FJO, 193 ks), kůň Kinský (KK, 95 ks), českomoravský bekgický kůň (ČMB, 111 ks), slezský norik (SN, 177 ks), starokladrubský kůň (STKL, 280 ks), anglický plnokrevník (A1/1, 111 ks) a shetlandský pony (SHP, 136 ks). Biologické vzorky (krevní vzorky, sperma a chlupové kořínky) pocházely od koní chovaných v České republice v letech 2000 až 2014.

111 náhodně vybraných jedinců plemen ČT, CS, A1/1, KK a HK bylo vybráno pro klastrování.

Pro sestavení dendrogramů a určení genetické vzdálenosti bylo vybráno 9 plemenných hřebců HK zařazených do genového zdroje a 15 plemenných hřebců KK.

4.1.2. Určení genetické determinace zbarvení

Pro stanovení genotypů zbarvení byly analyzovány soubory 26 koní plemene KK, především plemenných hřebců, 10 plemenných hřebců plemene HK a 24 jedinců plemene PH. Soubory byly pro genotypizaci zbarvení vybrány vzhledem k prováděné predikci fenotypů zbarvení a postižení syndromem letální bílé (OLWS) u potomků.

4.2. Laboratorní analýzy

4.2.1. Izolace DNA

Pro izolaci DNA byly použity biologické vzorky krve, spermatu a chlupových folikul. Krev byla odebírána do zkumavek s antikoagulačním roztokem. Jako zdroj spermatu byly použity pejetý s inseminačními dávkami koní. Pro izolaci DNA z chlupových cibulek bylo použito 15–30 kusů folikulů. Genomová DNA byla izolována pomocí běžných postupů a komerčně dodávaných kitů. Při izolacích byl dodržován protokol výrobce. Pro izolaci z krve a spermatu byl použit JETQUICK Blood Spin Kit (Genomed GmbH, Germany), pro izolaci z chlupových cibulek JETQUICK Tissue Spin Kit (Genomed GmbH, Germany).

4.2.2. PCR a fragmentační analýza mikrosatelitů

Pro stanovení mikrosatelitů byl použit panel 17 MS lokusů (*AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10*, *LEX3*, *VHL20*). Lokusy byly určovány komerčně dodávaným kitem firmy Applied Biosystems/Life Technologies (USA) na stanovení DNA polymorfismů u koní (StockMarks® for Horses Equine 17-plex Genotyping Kit). Kit byl použit v souladu s

pokyny výrobce. PCR reakce probíhala na termálním cykleru GeneAmp™ PCR System 9700 (Applied Biosystems/Life Technologies). Polymorfismy byly vyhodnoceny prostřednictvím fragmentační analýzy DNA v automatickém sekvenátoru ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer a vyhodnoceny pomocí programů GeneScan 3.7 a Genotyper 3.7.

Názvy MS lokusů, jejich lokalizace na chromosomech, struktura a sekvence opakování, primery a velikosti PCR produktů (Van de Goor et al., 2009b)

Locus	Chrom. Location	Repeat structure	Repeat sequence	Original reference	Primer sequences (Forward and Reverse)	Amplicon length (bp)
AHT4	24q14	Compound	(AC) _n AT(AC) _n	Binns et al. (1995)	F: AACCGCCTGAGCAAGGAAGT R: CCCAGAGAGTTTACCCT	144-164
AHT5	8	Simple	(GT) _n	Binns et al. (1995)	F: ACGGACACATCCCTGCCTGC R: GCAGGCTAAGGAGGCTCAGC	126-144
ASB2	15q21.3-q23	Simple	(GT) _n	Breen et al. (1997)	F: CCACTAAGTGTCTTCAGAAGG R: CACAACCTGAGTTCTCTGATAGG	216-250
ASB17	2p14-p15	Simple	(AC) _n	Breen et al. (1997)	F: ACCATTTCAGGATCTCCACCG R: GAGGGCGGTACCTTTGTACC	87-129
ASB23	3q22.1-q22.3	Simple and Compound	(TG) _n and (TG) _n TT(TG) ₄	Irvin et al. (1998)	F: GAGGGCAGCAGGTTGGGAAGG R: ACATCTGGTCAAATCACAGTCC	175-211
CA425 UCDEQ425	28q18	Simple	(GT) _n	Eggleston-Stott et al. (1997)	F: AGCTGCCTCGTTAATTCA R: CTCATGTCCGCTTGCTC	226-246
HMS1	15	Simple	(TG) _n	Guerin et al. (1994)	F: CATCACTCTTCATGTCTGCTTGG R: TTGACATAAATGCTTATCCTATGGC	170-186
HMS2	10	Compound	(CA) _n (TC) ₂	Guerin et al. (1994)	F: CTTGCAGTCGAATGTGTATTAAATG R: ACGGTGGCAACTGCCAAGGAAG	222-248
HMS3	9	Compound	(TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) _n and (TG) ₂ (CA) ₂ TC(CA) ₂ GA(CA) ₅	Guerin et al. (1994)	F: CCATCCTCACTTTTTCACCTTGT R: CCAACTCTTTGTACATAACAAGA	148-170
HMS6	4	Simple	(GT) _n	Guerin et al. (1994)	F: GAAGCTGCCAGTATTCAACCATTG R: CTCCATCTTGTGAAGTGAACTCA	151-169
HMS7	1q25	Compound	(AC) ₂ (CA) _n	Guerin et al. (1994)	F: TGTTGTTGAAACATACCTTGACTGT R: CAGGAAACTCATGTTGATACCATC	165-185
HTG4	9	Complex	(TG) _n AT(AG) ₅ AAG(GA) ₅ ACAG(AGGG) ₃	Ellegren et al. (1992)	F: STATCTCAGTCTTGATTGCAGGAC R: CTCCTCCCTCCCTCTGTTCTC	127-139
HTG6	15q26-q27	Simple	(TG) _n	Ellegren et al. (1992)	F: GTTCACTGAATGTCAAATTCTGCT R: CCTGCTGGAGGCTGTGATAAGAT	84-102
HTG7	4	Simple	(GT) _n	Marklund et al. (1994)	F: CCTGAAGCAGAACATCCCTCCTTG R: ATAAAGTGTCTGGGCAGAGCTGCT	118-128
HTG10	21	Simple and Compound	(TG) _n and TATC(TG) _n	Marklund et al. (1994)	F: TTTTATTCTGATCTGTACATTT R: CAATCCC GCCCACC CCGGCA	95-115
LEX3	Xq	Simple	(TG) _n	Coogler et al. (1996)	F: ACATCTAACCACTGCTGAGACT R: GAAGGAAAAAAGGAGGAAGAC	142-164
VHL20	30	Simple	(TG) _n	Van Haeringen et al. (1994)	F: CAAGTCCTTACTTGAAGACTAG R: AACTCAGGGAGAATCTTCTCAG	87-105

4.2.3. PCR a RFLP – stanovení genotypů zbarvení

4.2.3.1. Gen *ASIP* – Lokus Agouti – agouti-signaling protein

Genotypizace dle Rieder et al. (2001).

Primery:

F 5'-CTTTTGTCTCTCTTTGAAGCATTG -3'

R 5'-GAGAAGTCCAAGGCCTACCTTG -3'

alela *A* (102 bp)

alela *a* (91 bp)

4.2.3.2. Gen *MC1R* – lokus Extension – melanokortinový receptor 1

Genotypizace dle Marklund et al. (1996)

Primery:

F 5'-ATTCCTGATGGGCTCTTCCT-3'

R 5'-TAAGCGATGAAGAGGGTGCT-3'

Restrikční enzym: *Taq I*

alela *E* (428 bp)

alela *e* (297 bp, 131 bp)

4.2.3.3. Gen *MATP* – Lokus Cream – transportní protein asociovaný s membránou

Genotypizace dle Brooks S.A, Bailey E. (2005).

Primery:

F 5'-CTTTGATTGCTGACCGAAGGAAGAA-3'

R 5'-TAATACCGATGCTACATTGCTGTCT-3'

Restrikční enzym: *Mse I*

alela *C* (478 bp, 26 bp, 22 bp)

alela *Cr* (406 bp, 72 bp, 26 bp, 22 bp)

4.2.3.4. Gen *EDNRB* – Lokus Overo – endothelinový receptor B

Genotypizace dle Metallinos D.L. et al. (1998).

Primery:

F 5'- GAACCATCGAGATCAAGGAGAC-3'

R 5'- TGCAGCARGTCTCCCAGAGC-3'

Restrikční enzym: *Mse I*

alela *O* (175 bp)

alela *o* (97 bp, 78 bp)

4.2.3.5. Gen *KIT* – Lokus Sabino 1

Genotypizace dle Brooks S.A, Bailey E. (2005).

Primery:

F 5'-GGTCCTRACGATGAGAAACACAAGT -3'

R 5'-TTTGACCACATAATTAGAATCATTC -3'

Restrikční enzym: *Mnl I*
alela **SB1** (252 bp, 74 bp)
alela **sb1** (205 bp, 74 bp, 47 bp)

4.2.3.6. Gen *KIT* – Lokus **Tobiano**

Genotypizace dle Brooks S.A. et al. (2007).

Primery:

F 5'-TGATAGATCAGTGTAGACGTAGTGTGACAGAGAC-3'

xR 5'-AACAGCTACTCCCCTCTAGCATAGGTTC-3'

toR 5'-TTCACCACAGAGTATCCAATTATGTCTTTCACATAATGC-3'

alela **To** (209 bp)

alela **to** (152 bp)

4.3. Biostatistické analýzy

4.3.1. Stanovení diferencí v MS mezi plemeny

Frekvence alel, počet alel na lokus (N_a), průměrný počet alel na lokus (MNA), polymorfní informační index (PIC), skutečná a očekávaná heterozygotnost (H_o , H_e) byly stanoveny s využitím programu Excel Microsatellite Toolkit v. 3.1.1. (Park, 2001). Počet efektivních alel (N_e), Hardy-Weinbergova rovnováha (HW), Fixační index (F), pravděpodobnosti vyloučení nesprávných rodičů (PE1, PE2, PE3), pravděpodobnosti identity dvou jedniců (PI, PISibs) byly stanoveny s využitím programu Genalex (<http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>).

Pro posouzení genetické variability byly vypočteny alelové frekvence jednotlivých MS lokusů, které byly použity ke stanovení:

počtu efektivních alel

$$N_e = \frac{1}{\sum_{j=1}^{n_i} p_i^2}, \text{ kde } p_i \text{ je frekvence alel}$$

očekávané heterozygotnosti H_e

$$H_e = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2, \text{ kde } p_i \text{ je frekvence } i\text{-té alely a } n \text{ je kvantita alel}$$

skutečné, pozorované heterozygotnosti H_o

$$H_o = \frac{\sum_{x=1}^k H_x}{k}, \text{ kde } k \text{ je počet jedinců a } H_x \text{ počet heterozygotů}$$

polymorfního informačního obsahu – PIC

$$PIC = H - 2 \sum_{i=1}^{n-1} p_i^2 \sum_{j=i+1}^n p_j^2, \text{ kde } p_i, p_j \text{ jsou frekvence alel a } n \text{ počet alel}$$

fixačního indexu

$$F = \frac{H_E - H_O}{H_E}, \text{ kde } H_O \text{ je průměrná pozorovaná heterozygotnost jedince v subpopulaci}$$

a H_E je průměrná očekávaná heterozygotnost v populaci.

chí kvadrát testu

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}, \text{ kde } k \text{ je počet jedinců, } O_i \text{ je skutečný počet jedinců s } i\text{-tým}$$

genotypem a E_i je očekávaná heterozygotnost i -té alely pro $DF = \frac{[Na(Na-1)]}{2}$, kde Na je počet alel v lokusu.

pravděpodobnosti genetické identity dvou nezávislých jedinců– PI

$$PI = 2(\sum p_i^2)^2 - \sum p_i^4, \text{ kde } p_i \text{ je frekvence } i\text{-té alely v lokusu.}$$

pravděpodobnosti genetické identity sourozenců– PISibs

$$PISibs = 0.25 + (0.5 \sum p_i^2) + [0.5(\sum p_i^2)^2] - 0.25 \sum p_i^4, \text{ kde } p_i \text{ je frekvence alel}$$

Pro stanovení spolehlivosti MS lokusů byly vypočteny – PE1, PE2, PE3 (Jameison, Taylor, 1997):

PE1 – pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče v případě, že je znám genotyp potomka a obou rodičů

$$P=1-2\sum_{i=1}^n p_i^2 + \sum_{i=1}^n p_i^3 + 2\sum_{i=1}^n p_i^4 - 3\sum_{i=1}^n p_i^5 - 2\left(\sum_{i=1}^n p_i^2\right)^2 + 3\sum_{i=1}^n p_i^2 \sum_{i=1}^n p_i^3, \text{ kde } p_i \text{ je frekvence } i\text{-té alely.}$$

PE2 – pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče v případě, že je znám genotyp pouze jednoho z rodičů

$$P=1-4\sum_{i=1}^n p_i^2 + 2\left(\sum_{i=1}^n p_i^2\right)^2 + 4\sum_{i=1}^n p_i^3 - 3\sum_{i=1}^n p_i^4, \text{ kde } p_i \text{ je frekvence } i\text{-té alely.}$$

PE3 – pravděpodobnost vyloučení obou rodičů, je-li znám genotyp potomka a obou rodičů

$$P=1+4\sum_{i=1}^n p_i^4 - 4\sum_{i=1}^n p_i^5 - 3\sum_{i=1}^n p_i^6 - 8\left(\sum_{i=1}^n p_i^2\right)^2 + 8\left(\sum_{i=1}^n p_i^2\right)\left(\sum_{i=1}^n p_i^3\right) + 2\left(\sum_{i=1}^n p_i^3\right)^2, \text{ kde } p_i \text{ je frekvence } i\text{-té alely.}$$

4.3.2. Stanovení příslušnosti jedince k plemeni/populaci

Pro stanovení příslušnosti jedinců k populaci byl použit program Structure verze 2.2. (Pritchard et al., 2000). Program je schopen vyhodnotit pro každého analyzovaného jedince podíl pocházející z K potenciálních klastrů. Metodou Monte Carlo (MCMC) definuje přirozený algoritmus pravděpodobnosti, že daný genotyp patří do určitého klastru. Soubor byl testován v rozsahu 2 až 6 klastrů, s 500 iteracemi.

3.3 Stanovení genetické vzdálenosti

Pro stanovení genetické vzdálenosti (dendrogramů) byl použit program Mega verze 6. (Tamura et al., 2013)

3.4. Predikce fenotypů zbarvení

Pro predikci zbarvení potomků/hříbat byl použit Offspring Coat color calculator – <http://www.horsetesting.com/CCalculator1.asp>

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1. Detekce MS u vybraných plemen koní v ČR

5.1.1. Postup pro odběr vzorků chovatelů a jejich distribuci; izolace DNA

Jako biologický materiál k DNA analýzám jsou v ČR v největší míře využívány krevní vzorky. Naším cílem bylo využít pro DNA analýzy biologické vzorky, které je možné odebrat neinvazivním způsobem a aplikovat nejnovější poznatky o neinvazivních metodách odběrů biologických vzorků koní, izolacích DNA a formách archivace DNA. Uchovávání krevních vzorků je náročné jak finančně (energie na zmrazení), tak na plochu (mrazicí přístroje). Z toho důvodu byl ověřován postup archivace vybraných biologických vzorků a izolované DNA na chitosanovém nosiči, mikrotitrační destičce s aplikovaným nosičem silikagel+chitosan v neznámém poměru) a ověřován postup izolace DNA ze vzorků na nosiči uložených v různých teplotních podmínkách. Archivace biologických vzorků a izolované DNA na chitosanovém nosiči se ukázala jako nevyhovující. Archivaci krve lze provést, avšak nelze očekávat uspokojivý výsledek izolace DNA (obtížnost manipulace, ztráty výchozího materiálu při manipulaci). Nejlepší výsledky izolace DNA poskytovaly vzorky tkání (maso, uši), avšak tady lze jako nevýhodu zdůraznit nutnost manuálního zpracování vzorku (mechanické rozdrčení) před aplikací na nosič.

Byla hledána jiná forma biologických vzorků, která by nahradila invazivní metody a byla z ní získána DNA v kvalitě vyhovující následným analýzám. Jako nejlepší varianta biologických vzorků byly vyhodnoceny chlupové cibulky z žíní koní. Není třeba je uchovávat na žádném nosiči a je možné je skladovat při pokojové teplotě. Byla odzkoušena izolace z chlupových cibulek žíní archivovaných 3,6, 12 a 24 měsíců. DNA byla ve všech případech vyhovující pro námi prováděné analýzy.

V rámci disertace byl v Laboratoři agrogenomiky vypracován postup pro objednání, odběr, značení, doručení, archivaci a evidenci biologických vzorků koní viz příloha č. 1.

5.1.2. Stanovené genotypy mikrosatelitů

K definici biodiverzity, individuální identifikaci, sledování parentit jsou ve světě dnes používány panely s různými počty mikrosatelitních lokusů. Pro naši práci byl jako nejvhodnější vybrán panel 17 STR lokusů (*AHT4, AHT5, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, VHL20, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, LEX3*.)

U souboru 7682 koní 13 plemen byly stanoveny genotypy 17 MS lokusů .

Velikosti alel jsou dány počty opakování nukleotidových repetit. Jsou vyjádřeny v písmenném kódu podle nomenklatury ISAG viz obrázek č. 12. Velikosti alel byly srovnávány dle ISAG v rámci mezinárodních srovnávacích testů ISAG.

Obrázek č. 12. Počty nukleotidových repetic jednotlivých STR markerů odpovídající alelám dle nomenklatury ISAG:

~~Repeat nomenclature~~ (ISAG Size to Repeat Number Conversion)

Conversion of ISAG nomenclature to repeat-number nomenclature (ISAG, International Society for Animal Genetics).

Repeat number	ISAG																		
	AHT4	AHT5	ASB2	ASB17	ASB23	CA425	HMS1	HMS2	HMS3	HMS6	HMS7	HTG4	HTG6	HTG7	HTG10	LEX3	VHL20		
9			B																
10			C																
11				D															
12					D	F							G						
13			F	F		G				K	G						F	I	
14		H	G	G		H	I			L			I				G	J	
15		I		H	G	I	J	H		M			J	K			H	K	
16		J	I	I	H	J	K	I		N	J		K			H	I	L	
17		K	J	J	I	K	L	J		O	K				M	I	J	M	
18		L	K	K	J	L	M	K		P	L		M	N	J	K	N		
19		M	L	L	K	M	N	L		Q	M		N	O	K	L	O		
20		N	M	M	L	N		M	H		N		O	P	L	M	P		
21		O	N	N		O			I		O		P		M	N	Q		
22			O	O		P	Q	O			P		Q		N	O	R		
23		Q	P	P				P			Q					O	P		
24			Q	Q	P			Q	L							P	Q		
25	H		R	R	Q			R	M							Q			
26	I		S	S	R			S	N							R			
27	J			T	S				O							S			
28	K				T			U	P							T			
29	L			V	U				Q										
30	M			W	V				R				K						
31	N								S				L						
32	O			Y									M						
33	P												N						
34	Q												O						
35	R												P						
36													Q						

Mikrosatelitová struktura populace vybraných plemen koní v ČR je souhrnně popsána v tab. č. 4

Tabulka č. 4. Mikrosatelitová struktura koní

n	MNA	HE	HO	PIC
7682	11,29	0,7711	0,737	0,738
SD	2,47	0,016	0,0013	

n= počet zvířat, MNA= průměrný počet alel na lokus, HE= očekávaná heterozygotnost, HO= skutečná heterozygotnost, PIC= polymorfni informační obsah/index, SD = směrodatná odchylka

U souboru zahrnujícího 7682 koní 13 plemen bylo detekováno v průměru 11.29 alel na lokus. Celková očekávaná heterozygotnost 0.771 byla vyšší než skutečně zjištěná heterozygotnost 0.737. Celkový polymorfni informační obsah MS lokusů byl 0.738.

5.2. Charakteristika diverzity populací

Charakterizovat, hodnotit a srovnávat mikrosatelitovou strukturu uvnitř populací a mezi populacemi je možno s využitím mnoha různých programů a diskutovat rozdíly v získaných výsledcích. Recentním příkladem je publikace případové studie u ovcí ve Francii Leroy et al. (2015). Naším cílem nebylo srovnávání jednotlivých programů, ale především diagnostika mikrosatelitové struktury.

5.2.1. Genetická diverzita v MS u plemen koní v ČR

U vybraných plemen koní chovaných v ČR v letech 2000 až 2014 bylo analyzováno 17 MS lokusů a vyhodnocena jejich variabilita. Údaje o genetické struktuře plemen jsou shrnuty v tabulce č. 5.

Celkový počet alel N_a se pohyboval od 6,29 u plemene STKL po 10,06 u plemene ČT. Rozdíl v celkově detekovaném počtu alel může mít příčinu v tom, že genový zdroj STKL je chován jako uzavřená populace, zatímco v plemeni ČT se uplatňuje větší počet hřebců a klisen. Výrazný rozdíl v celkovém počtu alel může být dán i počtem jedinců zařazených v experimentu (280 jedinců STKL a 3489 koní ČT). Přestože rozdíly v celkovém počtu alel mezi STKL a ČT dosahovaly téměř 4 alel, počet efektivních alel N_e se u jednotlivých plemen tolik nelišil, pohyboval se v rozmezí 3,57 (STKL) po 4,46 (ČT).

Jediné relevantní srovnání námi stanovených charakteristik diverzity je s prací Van de Goor et al. (2011b), ve které zveřejnili výsledky více jak 8641 koní různých plemen chovaných v Holandsku. Sledovali 35 populací koní (počet se pohyboval od 17 do 1354 jedinců v populaci).

Z tabulky č. 5 lze pokládat vzhledem k využití MS markerů pro charakteristiku diverzity plemen, individuální identifikaci jedinců a ověřování paternit za nejdůležitější PIC – polymorfni informační obsah, vyjadřující míru polymorfismu MS markerů. Pohyboval se od 0,643 (ACHT) po 0,720 u ČT. Van de Goor et al. (2011b) uvádí nejnižší PIC 0,404 u 781 jedinců plemene fríského. Plemeno fríské není v naší práci samostatně hodnoceno, ale můžeme srovnat populace plemen fjord, appaloosa a populace teplokrevníka. V následujícím porovnáváme hodnoty PIC Van de Goor et al. (2011b) a naše. FJO 0,671 versus 0,641, APP 0,729 versus 0,717, holandský teplokrevník 0,719 versus 0,720 (ČT).

Fixační index F informující o míře inbreedingu/příbuznosti nabýval hodnot -0,023 (SN) až 0,030 (SHPON, APP). Zápornou hodnotu v námi sledovaných populacích koní má i plemeno FJO (-0,017), Van de Goor et al. (2011b) uvádí v Holandsku F 0,010.

Mikrosatelitní markery jsou využívány k ověřování rodičovství (původů). Z tohoto pohledu jsou velmi důležité hodnoty pravděpodobností vyloučení nesprávných rodičů PE1, PE2 a PE3. U všech námi sledovaných plemen byly vyšší než 99%. Pro pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče jsme pro srovnání vybrali hodnoty PE2 (je znám genotyp pouze jednoho rodiče). Výsledky Van de Goor et al. (2011b) a naše se

u plemen APP a holandský teplokrevník (versus ČT) nelišily 0,9997 a 0,9996. Rozdílné hodnoty byly nalezeny u plemene FJO 0,9991 v. 0,9999.

Při možnosti využití MS markerů pro forenzní účely mají velkou váhu hodnoty pravděpodobnosti výskytu jedinců se shodným genotypem jak u jedinců nepříbuzných (PI), tak u příbuzných jedinců (PISibs). V námi sledovaných populacích koní nabývají hodnot od $1,2585 \cdot 10^{-18}$ po $9,0027 \cdot 10^{-14}$, respektive od $8,5646 \cdot 10^{-07}$ do $1,3446 \cdot 10^{-07}$. Uvádíme výsledky PI, PISibs Van de Goor et al. (2011b) versus naše hodnoty: APP $5,6973 \cdot 10^{-19}$, $1,1340 \cdot 10^{-07}$ v. $9,0027 \cdot 10^{-14}$, $1,549 \cdot 10^{-07}$, FJO $7,7159 \cdot 10^{-17}$, $4,3815 \cdot 10^{-07}$ v. $8,1873 \cdot 10^{-16}$, $8,5646 \cdot 10^{-07}$, teplokrevník $2,1998 \cdot 10^{-18}$, $1,3815 \cdot 10^{-07}$ v. $1,2629 \cdot 10^{-18}$ $1,3446 \cdot 10^{-07}$. Pravděpodobnosti výskytu shodných genotypů jsou závislé na počtu testovaných lokusů. Při testování 12 MS, které se v ČR provádělo do roku 2009, pravděpodobnost PI dosahovala hodnoty $1,4031 \cdot 10^{-13}$. V současné době při používání 17 MS jsou, jak je patrné v tabulce č. 5, tyto hodnoty až o 5 řádů přesnější. Např. u ČT to je konkrétní hodnota $1,2629 \cdot 10^{-18}$.

Zajímavé je také srovnání celkového počtu detekovaných alel Van de Goor et al. (2011b) APP (131 alel), FJO (128 alel) a teplokrevník (139 alel) s našimi zjištěními 141, 118 a 171 (ČT). Výrazný rozdíl v počtu alel u holandského teplokrevníka a ČT (32 alel) může být dán počtem testovaných jedinců (1354 jedinců holandského teplokrevníka a 3489 ČT).

Protože publikace Van de Goor et al. (2011b) neobsahuje údaje o plemeni HK a toto plemeno je genovým zdrojem ČR, uvádíme srovnání s jinými autory. Z rešerše studia mikrosatelitů u huculského koně jsme našli první zmínku o HK na Slovensku z roku 2006 (Trandžík et al., 2006). U 48 koní testovali 12 MS. V lokusech MS, které jsou zařazeny i v našich výsledcích vyplývá následující: nejmenší počet alel detekovali stejně jako my v lokusu *HTG7* (4 alely) naše výsledky jsou 5 alel. Nejvyšší počet alel uvádí u lokusů *VHL20*, *HTG10*, *ASB2* (9). My jsme detekovali ve všech třech těchto lokusech také vyšší počet alel (10), ale vyšší počet jsme zaznamenali v lokusu *AHT4* (11). Polymorfni informační obsah (PIC) uvádí od 0,466 (*HTG7*) do 0,825 (*VHL20*), námi stanovené hodnoty jsou 0,518 (*HTG6*) a 0,825 (*AHT4*). Stanovili průměrnou očekávanou heterozygotnost H_e na 0,734, naše hodnota je 0,748. Hodnota skutečné heterozygotnosti H_o byla Trandžíkem et al. (2006) stanovena stejná jako námi 0,738, což svědčí o dostatečné a v průběhu let se neměnicí heterozygotnosti (heterogenitě) mezi zvířaty.

Georgescu et al. (2008) zveřejnil informace o genetické struktuře u rumunského hucula. Skutečnou a očekávanou heterozygotnost stanovil 0,662 a 0,676. Uvádí tyto počty alel u konkrétních lokusů *VHL20* - 10, *HTG4* - 5, *AHT4* - 7, *HMS7* - 6, *HTG6* - 7, *AHT5* - 7, *HMS6* - 5, *ASB2* - 7, *HTG10* - 9, *HTG7* - 5, *HMS3* - 7, *HMS2* - 5. Nejvíce alel našel u markeru *VHL20* (10). Fornal et al. (2013), která publikuje výsledky 216 koní tří populací plemene HK ze Západních Karpat uvádí 9 alel v markeru *VHL20*. V následujícím srovnáváme hodnoty Fornal et al. (2013) versus naše výsledky. Očekávaná heterozygotnost H_o 0,729 v. 0,738, skutečná heterozygotnost H_e 0,703 v. 0,748, PIC

0,666 v. 0,715 a celkový počet alel 112 v. 148. I zde může být výrazný rozdíl v počtu alel (36) dán více než polovičním množstvím sledovaných koní. Nejmenší počet alel uvádí v lokusech *HTG6* a *HTG4* (4 alely).

Další informace o plemeni HK zveřejnili Kusza et al. (2013). Na základě 71 koní testovaných na 17 MS zjistili celkem 130 alel s průměrným počtem 7,647 alel na lokus. Počet efektivních alel 4,401, skutečná heterozygotnost 0,706, očekávaná 0,747. Fixační index pro celý panel MS byl -0,128 a ukazoval na nízkou hladinu příbuznosti. Rozdíl v hodnotách fixačního indexu při porovnání našich výsledků se studií Kusza et al. (2013), 0,014 v. -0,128 může být důsledkem toho, že populace huculských koní v práci Kusza et al. (2013) se skládala ze tří různých evropských zemí (Maďarska, Rakouska a Slovenska).

Mackowski et al. (2015) při srovnávání genetické diverzity hucula a polských primitivních plemen koní s využitím 12 MS otestovat 1627 huculů a 3865 polských primitivních koní (Polski Konik). Uvádí průměrný fixační index 0,013. Přitom uvádí, že genetické diference mezi huculem a ostatními polskými primitivními plemeny je relativně nízká.

Pro charakteristiku populací a jejich diverzitu se využívá i variabilita mitochondriální DNA. U huculského koně v ČR ji studovali výzkumníci z VÚŽV Uhřetěves a ČZU Praha a publikovali v roce 2013 (Czerneková, Kott, Majzlík, 2013). Jejich výsledky vychází ze 168 vzorků mtDNA 15 mateřských linií. Zjistili 38 mutací reprezentujících 14 haplotypů, které rozdělili do 6 haploskupin. Publikace obsahuje Neighbourův strom mtDNA haplotypů znázorňující rodiny v jednotlivých haploskupinách. Jejich seznam literatury obsahuje výčet publikací o mtDNA u hucula do roku 2012.

Dalšími genovými zdroji ČR zařazenými v našem sledování jsou českomoravský belgický kůň (ČMB) a slezský norik (SN). Pro tato dvě plemena můžeme naše výsledky srovnat s Polak, Fornal (2015), kteří popisují genetickou variabilitu stanovenou analýzou 17 MS u dvou lokálních polských chladnokrevných plemen koní (Sztumski a Sokolski kůň). U 105 jedinců sokolského koně a 75 sztumského určili skutečnou heterozygotnost H_o 0.693 a H_o 0.729 resp. Průměrný PIC byl 0,7. Námi zjištěné hodnoty H_o jsou pro ČMB (0,707) a SN (0,737). PIC pro ČMB 0,669, pro SN 0,683.

Z vyhodnocení Hardy Weinbergovy rovnováhy (HW) viz příloha č. 2 vyplývá, že vysoce průkazné rozdíly ($p < 0.01$) se ukázaly v jednotlivých lokusech MS u různých plemen. Nejvíce vysoce průkazných rozdílů bylo v 9 lokusech u CS, v 8 u ČT, 5 u FJO, 4 u HK a jeden u KK a ČMB. V žádném lokuse nebyl průkazný rozdíl u plemene SN. Populace plemen CS a ČT se v 5 lokusech liší v průkaznosti HW (*HMS2*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG10* a *ASB17*). U plemene KK byl průkazný rozdíl pouze v jednom lokuse a to *VHL20*, u ČMB v *ASB2*. Huculský kůň vykázal vysoce průkazný rozdíl v lokusech shodných s ČT a CS, v *HMS3*, *HTG7*, *ASB17* a navíc v *CA425*.

Nejdůležitější genový zdroj v ČR, starokladrubský kůň, měl vysoce průkazný rozdíl ve 4 lokusech. V *HTG7*, *VHL20*, *ASB17* a oproti všem ostatním sledovaným plemenům vykázal vysoce průkazný rozdíl i v *AHT4*.

Tabulka č. 5. Genetická struktura vybraných plemen koní

plemeno	n	Na SE	Ne SE	Ho SE	He SE	F SE	PIC	PE1	PE2	PE3	PI	PISibs
ACHT	179	6.353 0.453	3.638 0.317	0.680 0.036	0.685 0.033	-0.003 0.028	0,6432	0,9999	0,9983	0,9999	6.9961.10 ⁻¹⁶	8.5156.10 ⁻⁰⁷
PH	327	8.824 0.570	4.359 0.341	0.737 0.029	0.748 0.020	0.010 0.031	0,7104	0,9999	0,9997	0,9999	2.7281.10 ⁻¹⁸	1.7173.10 ⁻⁰⁷
APP	145	8.235 0.450	4.289 0.268	0.727 0.017	0.753 0.017	0.030 0.036	0,7166	0,9999	0,9970	0,9999	9.0027.10 ⁻¹⁴	1.5490.10 ⁻⁰⁷
QH	418	8.294 0.491	4.284 0.314	0.761 0.027	0.747 0.018	-0.022 0.029	0,7106	0,9999	0,9996	0,9999	3.3111.10 ⁻¹⁸	1.7354.10 ⁻⁰⁷
CS	1659	9.000 0.522	4.381 0.277	0.749 0.026	0.754 0.018	0.006 0.026	0,7164	0,9999	0,9997	0,9999	2.0987.10 ⁻¹⁸	1.4395.10 ⁻⁰⁷
ČT	3489	10.059 0.578	4.455 0.302	0.743 0.024	0.756 0.018	0.016 0.023	0,7195	0,9999	0,9996	0,9999	1.2629.10 ⁻¹⁸	1.3446.10 ⁻⁰⁷
ČMB	111	6.941 0.552	4.004 0.399	0.707 0.040	0.704 0.034	-0.014 0.037	0,6688	0,9999	0,993	0,9999	5.4176.10 ⁻¹⁷	4.6737.10 ⁻⁰⁷
FJO	193	6.941 0.466	3.636 0.285	0.694 0.045	0.681 0.041	-0.017 0.029	0,6406	0,9999	0,9999	0,9999	8.1873.10 ⁻¹⁶	8.5646.10 ⁻⁰⁷
HK	473	8.706 0.554	4.414 0.338	0.738 0.029	0.748 0.022	0.014 0.023	0,7149	0,9999	0,9998	0,9999	1.2585.10 ⁻¹⁸	1.5840.10 ⁻⁰⁷
KK	95	6.824 0.439	3.802 0.272	0.711 0.026	0.714 0.021	0.001 0.026	0,6733	0,9999	0,9989	0,9999	1.2059.10 ⁻¹⁸	4.2136.10 ⁻⁰⁷
SHPON	136	7.529 0.563	3.612 0.241	0.680 0.034	0.700 0.023	0.030 0.034	0,6624	0,9999	0,9984	0,9999	3.0386.10 ⁻¹⁶	5.8193.10 ⁻⁰⁷
SN	177	7.588 0.601	4.007 0.347	0.737 0.028	0.722 0.023	-0.023 0.027	0,6830	0,9999	0,9993	0,9999	3.0333.10 ⁻¹⁷	3.3193.10 ⁻⁰⁷
STKL	280	6.294 0.391	3.570 0.289	0.677 0.030	0.688 0.026	0.017 0.019	0,6483	0,9999	0,9981	0,9999	6.7924.10 ⁻¹⁶	7.8766.10 ⁻⁰⁷

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfni informační obsah, PE1= pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, jsou-li známe genotypy obou rodičů, PE2 = pravděpodobnost vyloučení nesprávného rodiče, je-li znám genotyp pouze jednoho rodiče, PE3 = pravděpodobnost vyloučení obou nesprávných rodičů, PI = pravděpodobnost identity genotypů dvou nezávislých jedinců, PISibs= pravděpodobnost identity genotypů u příbuzných jedinců

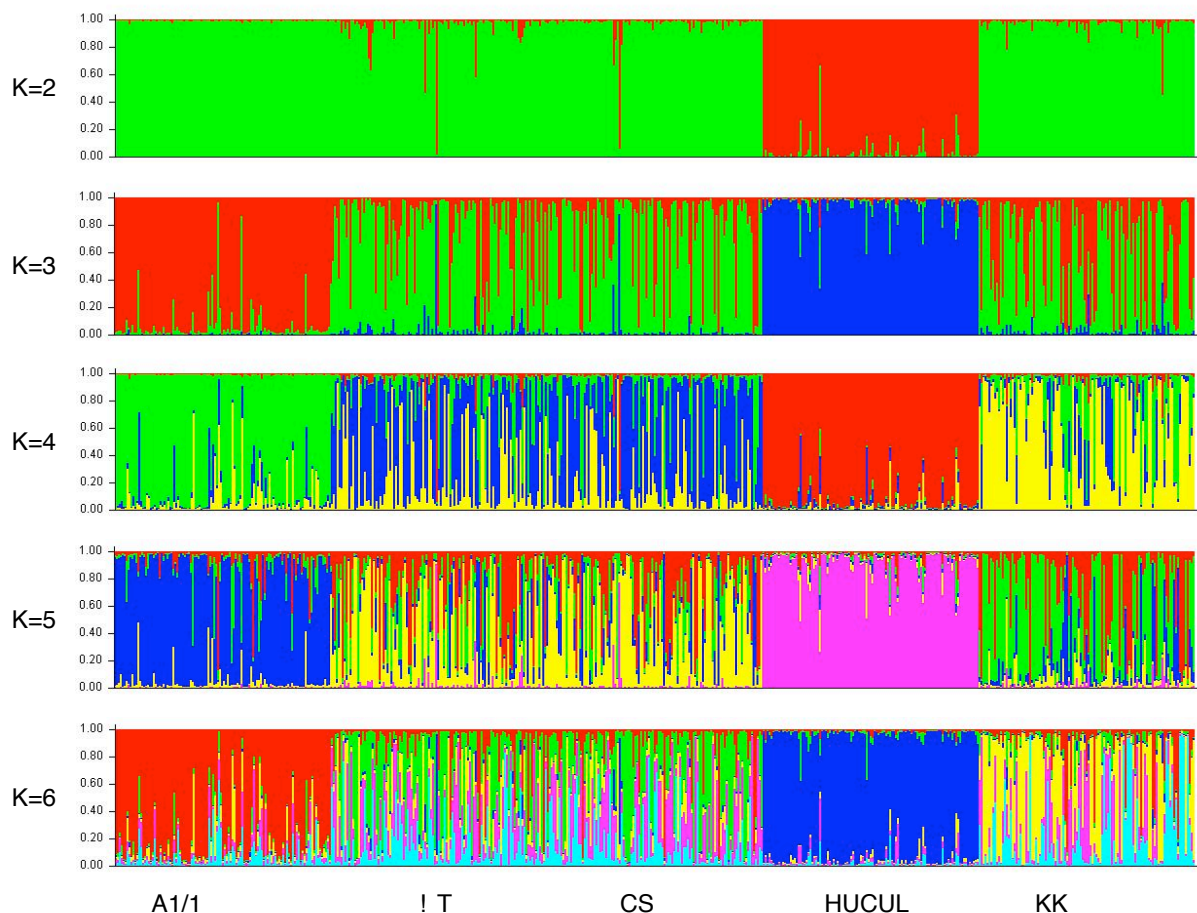
Podrobnější údaje o vnitropopulační diverzitě jednotlivých námi sledovaných plemen viz příloha č. 2.

5.2.2. Určení příslušnosti jedince k populaci/plemeni

Pro vyhodnocení příslušnosti jedince k plemeni (populaci) bylo provedeno klustrování u plemen CS, ČT, KK, A1/1, a HUC. Naším zájmem bylo zjištění, zda se vymezi populace KK, která vychází z ČT a CS a v plemenné knize KK jsou zakladatelé převážně plemenní hřebci A1/1. Plemeno HK bylo do klustrování přidáno proto, že je to genový zdroj a uzavřená populace a mělo by se jasně vymezovat/ oddělovat od ostatních zde hodnocených plemen.

Pro analýzu bylo náhodně vybráno 111 jedinců každého plemene. Plemena A1/1, HK a KK obsahovala náhodný výběr zvířat narozených v letech 2005 až 2015, plemena ČT a CS pak náhodný výběr z jedinců narozených v letech 2010 až 2015. Výsledky klustrování pro $K=\{2,3,4,5,6\}$, kde K je předpokládaný počet populací, ukazuje obrázek č. 13.

Obr. č. 13. Grafické znázornění odhadu příslušnosti jedince k plemeni/populaci, pro $K=2$ až $K=6$



Při K=2 bylo jasně vymezeno plemeno HK-HUCUL (červená), plemena A1/1, ČT, CS a KK byla zařazena do stejné populace (zelená) .

Při K=3 došlo k oddělení plemene A1/1 (červená) a jako samostatnou populaci vidíme plemeno HK (modrá). Plemena ČT, CS a KK byla definována jako jedna populace (zelená s příměsí červené – A1/1).

Při K=4 došlo k oddělení populace KK (žlutá s větší příměsí zelené – A1/1 a menší příměsí modré – ČT, CS). Plemena A1/1 (zelená) a HK (červená) jsou také jako samostatné populace. Plemena ČT a CS od sebe oddělena nejsou (modrá s příměsí zelené a modré).

Při K=5, což je počet analyzovaných populací plemen, je jako nejhomogennější určeno plemeno HK (fialová) a plemeno A1/1 (modrá). Plemeno KK (zelená) je také určeno jako samostatná populace, ale s příměsí plemen ČT, CS a A1/1.

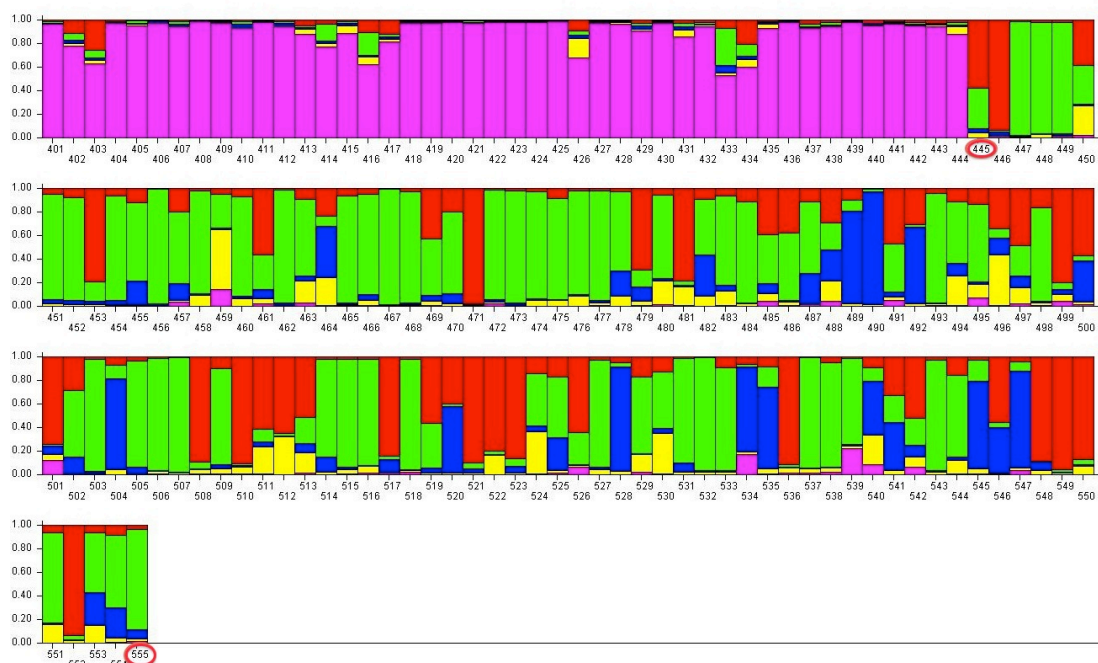
Pro K=6 je situace téměř stejná jako pro K=5. K oddělení plemen ČT a CS nedošlo. Jsou oddělena plemena HK (modrá), A1/1 (červená), KK (žlutá) a ČT zůstává společně s CS (zelená).

Z výsledků klastrování je patrné, že plemeno KK se vyznačilo od plemen ČT, CS a A1/1. Plemena ČT a CS jsou definována jako jedna populace.

Pro klastrování bylo analyzováno 17 MS lokusů. Van de Goor et al. (2011b) uvádí, že na základě hodnot PIC, očekávaných a skutečných heterozygotností je námi použitý panel 17 MS dostatečný i pro forenzní analýzy. Spolehlivost přiřazení jedince k populaci (plemeni) stanovili na 97,2 %.

Klastrování je založené na frekvencích alel a podobnosti genotypu jedince s ostatními genotypy dané populace. Tyto údaje lze využít i ve forenzní praxi.

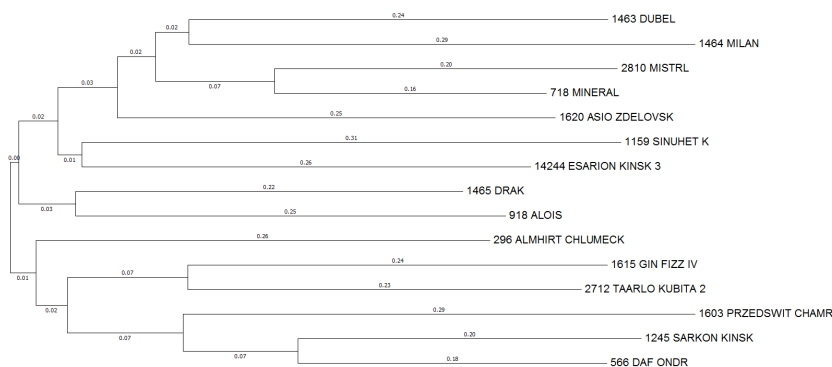
Obrázek č. 14. Analýza klastru plemene KK



Přestože bylo plemeno KK na základě mikrosatelitů odděleno jako samostatná populace, z obrázku 14, kde od čísla 445 k číslu 555 jsou koně zařazeni v plemenné knize KK, je patrná příměs plemen ČT, CS (žlutá a červená) a plemene A1/1 (modrá). Pokud bychom tuto populaci hodnotili pouze podle MS tak bychom 53 % jedinců zařadili do skupiny KK, 9 % do A1/1 a zbytek, to je 38 %, do ČT, CS. Z jiného úhlu pohledu na tento klastr můžeme konstatovat, že u 20 % jedinců je větší než 10 % příměs plemene A1/1.

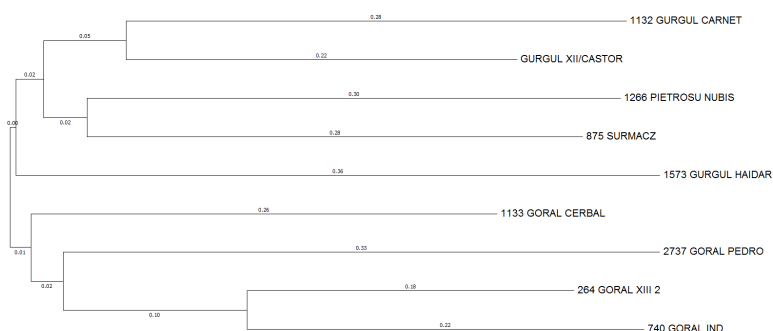
5.2.3. Stanovení genetické vzdálenosti plemenných hřebců KK a HK

Plemenní hřebci KK



V dendrogramu KK lze dle MS rozeznat dvě skupiny hřebců. Ve druhé skupině je samostatně hřelec Alhmirt Chlumecký. Analýza rodokmenů nebyla provedena. Dendrogram mohou využít chovatelé.

Plemenní hřebci HK



V dendrogramu je zřejmá odlišná struktura MS u zástupců linie Goral a linie Gurgul. Mezi linií Gurgul jsou podle MS včleněni dva hřebci s polským původem. Z pohledu fenotypu pigmentace je vhodné upozornit na klasické tobiano zbarvení u hřebce Surmacz.

5.3. Genetická predikce zbarvení/pigmentace

5.3.1. Podle genů *MATP*, *MC1R* a *ASIP* u plemene kůň Kinský

U KK byly sledovány tři geny zabrevní, z toho dva geny základního zbarvení (*ASIP* (lokus Agouti (A) a *MC1R* (lokus Extension (E))) a gen ovlivňující “ředění” barev *MATP* (lokus Cream (C)). Fenotyp isabela a plavák v zásadě podmiňuje gen *MATP* (lokus C). Proto v tabulce č. 6 jako první uvádíme frekvence kombinací genotypů seřazených podle genotypu v genu *MATP* u 26 koní plemene KK, převážně plemenných hřebců.

Tabulka č. 6. Frekvence kombinací genotypů predikujících zbarvení v populaci KK.

Genotypy v genech-lokusech			n	%
<i>MATP</i> Cream	<i>MC1R</i> Extension	<i>ASIP</i> Agouti		
<i>CrCr</i>	<i>Ee</i>	<i>Aa</i>	1	3,85
<i>CCr</i>	<i>Ee</i>	<i>Aa</i>	3	11,53
<i>CCr</i>	<i>Ee</i>	<i>aa</i>	1	3,85
<i>CCr</i>	<i>ee</i>	<i>AA</i>	8	30,77
<i>CCr</i>	<i>ee</i>	<i>Aa</i>	6	23,07
<i>CCr</i>	<i>ee</i>	<i>aa</i>	1	3,85
<i>CC</i>	<i>Ee</i>	<i>AA</i>	1	3,85
<i>CC</i>	<i>ee</i>	<i>AA</i>	5	19,23

Frekvence alel stanovená z uvedené tabulky činí:

Cr 0,404 (0,4), *C* 0,596 (0,6)

E 0,115, *e* 0,885

A 0,731, *a* 0,269

Vyhodnocení skutečné a teoretické frekvence chí kvadrát testem ukázalo neprůkazný rozdíl.

Stanovené genotypy odpovídají fenotypovému zbarvení:

Genotyp *CrCr*, *Ee*, *Aa* – fenotypové zbarvení perlino

Genotyp *CCr*, *Ee*, *Aa* – fenotypové zbarvení plavák

Genotyp *CCr*, *Ee*, *aa* – fenotypové zbarvení smoky black

Genotyp *CCr*, *ee*, *AA* – fenotypové zbarvení isabela

Genotyp *CCr*, *ee*, *Aa* – fenotypové zbarvení isabela

Genotyp *CCr*, *ee*, *aa* – fenotypové zbarvení isabela

Genotyp *CC*, *Ee*, *AA* – fenotypové zbarvení hnědák

Genotyp *CC*, *ee*, *AA* – fenotypové zbarvení ryzák

U sledovaných koní jsme detekovali pouze jedenkrát genotyp, *CrCr*, *Ee*, *Aa*, odpovídající zbarvení perlino. Jedná se o hřebce 1463 Dubel, který jako jediný s tímto zbarvením byl zařazen do plemnitby KK.

Z výše uvedených frekvencí alel v genu *MATP* *Cr* 0,4 a *C* 0,6, pokud budeme tyto frekvence uvažovat u obou pohlaví tohoto plemene, je pro hříbata teoretická frekvence genotypů *CrCr* 0,16, *CCr* 0,48 a *CC* 0,36. To znamená, že u hříbat by se měl vyskytovat v 64 % genotyp *CrCr* a *CCr*, což je fenotyp bílý (pseudoalbín) nebo zesvětlený (plavák, isabela) a v 36 % genotyp *CC*, zbarvení hnědák, ryzák nebo vraník.

Protože hříbata s fenotypem bílého zbarvení nebyla většinou do chovu KK zařazována, provedli jsme analýzu fenotypového zbarvení u hříbat narozených od roku 2007 do roku 2014 podle fenotypu uvedeného v záznamech narozených zvířat. V osmi ročnících narozených hříbat byl u 57 uveden fenotyp isabela, u 21 fenotyp plavák, což je celkem 67,2 %. U 30 hříbat fenotyp ryzák, u 5 hnědák, to je 30,2 %. A u tří (to je 2,6 %) fenotyp perlino, bělouš, cream. Celkem bylo vyhodnoceno 116 hříbat. Z uvedených fenotypových hodnot tedy předpokládáme v genu *MATP* v 67,2 % genotyp *CCr*, ve 30,2 % genotyp *CC* a ve 2,6 % genotyp *CrCr*.

V seznamech narozených hříbat se až v roce 2013 na základě předání výsledků chovatelům dokladovaných v certifikované metodice Vrtková et al. (2011) vyskytuje označení perlino u jednoho hřebečka a v roce 2014 označení cream u jednoho heřebečka a bělouš také u jednoho hřebečka.

Při průzkumu jiných databází jsme našli, že některá zvířata s odhadnutým genotypem *CrCr* byla prodána do zahraničí. Např. v roce 1996 klisna Agáta s fenotypovým označením pseudoalbín byla prodána do Švédska, v roce 2001 valach Fanfán fenotypově označen jako bělouš prodej Německo, 2002 klisna Miládka fenotypový albín, 2006 hřelec Scarlet fenotypově perlino prodej do USA, 2009 hřelec Artemis, fenotyp bělouš prodej Německo, 2009 klisna Sáva, fenotypově perlino prodej Německo, 2013 klisna Genevel, fenotypově pseudoalbín.

Na základě výsledků metodiky Vrtková et al. (2011) svaz chovatelů KK provedl změny ve svých dokumentech, které byly schváleny MZe ČR 13.5.2015. Jedna z těchto změn, jejíž základ je v implementaci výsledků této disertace týkajících se zbarvení KK je, že u všech hřebců v plemenné knize KK musí být uvedeny genotypy zbarvení.

Podrobný návod na postupy využití genotypů zbarvení při připouštění KK je uveden v příloze č. 3.

5.3.2. Podle genů *MC1R*, *ASIP*, *MATP*, *EDNRB* a *KIT* u plemene huculský kůň

U 10 plemenných hřebců plemene HK bylo sledováno šest genů zbarvení, z toho dva geny základního zbarvení (*ASIP* a *MC1R*), gen “ředění” barev (*MATP*) a tři lokusy depigmentace ovlivněné mutacemi v genu *KIT* (lokusy Sabino (Sb) a Tobiano (To)) a gen *EDNRB* (lokus Overo (O)). Zastoupení genotypů zbarvení uvádí tabulka č. 7.

Jelínek (2015) předpokládá, že v sezoně 2015 bude pro národní program genových zdrojů (NPGZ) působit 10 plášt'ových huculských hřebců a 2 strakatí. Aktuální populaci plášt'ových huculských klisen zapsaných do plemenné knihy tvoří 446 klisen a 13 je zařazených v oddílu starkatých huculských koní.

Podle řádu plemenné knihy HK z roku 2009 je k barvám uváděno, že se zpravidla jedná o hnědáka nebo plaváka všech odstínů. Zde je také vzpomenut výskyt dalších barev s tím, že ryzák je méně žádaný a odznaky jsou nežádoucí. K tomu je zde připomenuto, že obvykle se vyskytuje výrazný úhoří pruh, někdy oslí kříž a zebrování berce a předloktí. V mezinárodní databázi EFABIS (2015) je zbarvení huculského koně v ČR charakterizovaná takto:

“**Breed colours Colour Comment** uni coloured: usually dun or bay, sometimes chestnut or piebald”

<http://efabis.tzv.fal.de/cgi-bin>

Doslovný překlad znamená – zbarvení plášt'ové: obvykle úhoří pruh nebo hnědák, občas ryzák nebo strakáč. Z takto udávaných fenotypů dovozené konkrétní genotypy jsou v lokusech: Dun (*DD*, *Dd*) – úhoří pruh, Aqouti (*AA*, *Aa*) – hnědák, Extension (*ee*) – ryzák a čímž autor tohoto údaje v EFABIS pravděpodobně myslel fenotyp tobiano (*ToTo*, *Toto*) eventuletně fenotyp cryptotobiano – strakáč .

Tabulka č. 7. Frekvence kombinací genotypů predikujících zbarvení v populaci plemene HK.

Genotypy v genech - lokusech						n	%
<i>ASIP</i> Agouti	<i>MC1R</i> Extension	<i>MATP</i> Cream	<i>KIT</i> Sabino	<i>EDNRB</i> Overo	<i>KIT</i> Tobiano		
<i>AA</i>	<i>EE</i>	<i>CC</i>	<i>sb1sbl</i>	<i>oo</i>	<i>Toto</i>	1	10
<i>AA</i>	<i>EE</i>	<i>CC</i>	<i>sb1sbl</i>	<i>oo</i>	<i>toto</i>	1	10
<i>Aa</i>	<i>EE</i>	<i>CC</i>	<i>sb1sbl</i>	<i>oo</i>	<i>toto</i>	4	40
<i>Aa</i>	<i>Ee</i>	<i>CC</i>	<i>sb1sbl</i>	<i>oo</i>	<i>toto</i>	4	40

Frekvence alel v genu *ASIP* $A = 0,6$, $a = 0,4$. Z toho je teoretická frekvence homozygotních genotypů *AA* 0,36, heterozygotů *Aa* 0,48 a homozygotů *aa* 0,16.

To znamená, že v 16 % by se u huculů v ČR měl vyskytovat černý fenotyp podmíněný genotypem v genu *ASIP aa*.

V genu *MC1R* je frekvence alel: dominantní alela *E* 0,9, recesivní *e* 0,1. Při těchto frekvencích je teoretický výskyt homozygotního genotypu *EE* 0,81, heterozygotů *Ee* 0,09 a homozygotů *ee* 0,1. Skutečný výskyt genotypů byl 80 % dominantních homozygotů *EE* a 20 % heterozygotů *Ee*.

U testovaných hřebců se ani v jednom případě nevyskytoval homozygotní genotyp *aa* v genu *ASIP* a *ee* v genu *MC1R*. V *MATP* byli všichni hřebci homozygotní *CC*.

Heterozygotní genotyp v lokusu Tobiano (gen *KIT*) se vyskytl pouze v jednom případě. Z pohledu fenotypu se v našem průzkumu vyskytl jedinec s bílými odznaky na končetinách, u něhož jsme v *KIT* genu (lokus Tobiano) zjistili recesivní genotyp *toto*. Takovýto fenotyp je v literárních zdrojích někdy nazýván crypto-tobiano.

Leiský (1999) uvádí, že v posledních sto letech byly pokusy o “zušlechtování” huculského koně jinými plemeny. Z pohledu zbarvení uvádí, že z těchto pokusů zůstala poměrně častá příměs hnědé barvy v srsti a vzácně se objevující bílé skvrny na končetinách.

Zbarvení tobiano je pravděpodobně nejlépe známé ze všech bílých vzorů. Někteří autoři např. Alford (2013) uvádí, že při tomto zbarvení jsou téměř vždy skvrny na nohou. Z pozorování fenotypů tobiano uvádí, že ve směsi s jinými vzory může být kůň téměř celý bílý. Naopak při velmi malém rozsahu depigmentace chovatelé někdy používají název crypto-tobiano. To se obvykle projevuje jako čtyři bílé ponožky nebo punčochy na končetinách. Někdy je bílý vzor v místě kohoutku nebo krku. Jako zajímavé vyzvedává informace o výskytu bílých odznaků u huculského koně v Polsku. Připomíná význam mutací v genu *KIT* a uvažuje, zda mutace tobiano zvyšuje možnost nových mutací (převážně recesivních) u potomstva.

Negro et al. (2015) u 140 koní dvou plemen (čistokrevná Menorca a Pura Raza Español) analyzovali vztah mezi výskytem bílých odznaků a mutacemi v genech *KIT*, *PAX3* a *MITF*. Jejich předběžné výsledky ukazují, že mutace (c.2045A>G) v exonu 14 genu *KIT* je asociována s bílými odznaky na hlavě, mutace v genu *MITF* (g.20147039C>T) s bílými odznaky na zadních nohou a bílé odznaky na předních nohou jsou asociovány s mutacemi v intronu 1 (g.20189177T>A) a exonu 14 (c.2045A>G) genu *KIT*.

Recentní přehled mutací v genu *KIT* uvádíme v příloze č. 4.

Bílé odznaky u huculského koně jsou, jak vyplývá z údajů v plemenné knize, pro genový zdroj nežádoucí, ale někteří chovatelé hucula o ně zájem mají.

Analýzu výskytu bílých odznaků na končetinách u huculského koně v Polsku jako první publikovali Stachurska z univerzity z Lublinu a Jansen z rakouské asociace chovatelů koní (Stachurska a Jansen, 2015). Chtěli u plemene hucul potvrdit hypotézu, že koně s neklasickým tobianem (crypto-tobiano) mohou předávat (v případě homozygotního

genotypu musí) alelu klasického tobiana *To* do dalšího potomstva. Proto vybrali sedm koní s bílými skvrnami na končetinách a sledovali 36 jejich potomků. Z pohledu molekulární genetiky bylo všech sedm koní dominantních homozygotů *ToTo* a v jejich potomstvu se vyskytovalo fenotypové zbarvení tobiano, crypto-tobiano a non-tobiano. Závěrem naznačují, že existuje inhibitor, který vyvolává různou penetranci tobiano alely *To* u crypto-tobiano fenotypu.

Na podkladě výsledků obsažených v této disertační práci stanovila Asociace chovatelů huculského koně pro všechny hřebce zařazované do genového zdroje podmínku DNA testu na tobiano depigmentaci.

5.3.3. Podle genů *EDNRB* a *KIT* u plemene paint horse

Celkem byl analyzován gen *EDNRB* (lokus Overo) u 24 jedinců, z toho 11 (45,8 %) mělo genotyp homozygotní *oo*. U 13 (54,2 %) jedinců byl detekován genotyp heterozygotní *Oo*. Těmto genotypům odpovídají frekvence alel: $o = 0,729$ a $O = 0,271$. Z výše uvedených frekvencí alel lze spočítat, že v populaci PH v ČR by se teoreticky mohl vyskytovat homozygotní letální genotyp *OO* v 7,3 %, ve 39,5 % heterozygotní genotyp *Oo* a v 53,2 % homozygotní genotyp *oo*.

Za pozornost stojí rozdíl mezi teoretickým a skutečným počtem homozygotů *oo* a heterozygotů *Oo* v populaci v ČR. Homozygotů *oo* se ve skutečnosti vyskytuje 46 % a teoreticky by jich mělo být přítomno 53 %. Naopak heterozygotů je v naší populaci PH 54 %, zatímco teoreticky by jich mělo být 39 %. Velká část testovaných PH byla do ČR importována, a diference na úrovni 5 % mezi teoretickým a skutečným počtem heterozygotů ukazuje na větší import heterozygotů na úkor homozygotů *oo*.

Na gen *KIT* (lokus tobiano) bylo otestováno celkem 46 jedinců. Nejvíce, to je 27 koní, bylo heterozygotních genotypů *Toto*, 18 bylo dominantních homozygotů *ToTo* a jeden jedinec, kterého chovatel vzhledem k fenotypu zbarvení požadoval testovat na tento lokus měl genotyp *toto*.

5.4. Molekulárně genetické výsledky uplatnitelné v databázi EFABIS

Vkládat údaje do databáze EFABIS smí pouze národní koordinátor genových zdrojů a poskytování dat do navazujících databází EFABIS a FAO-DADIS pro ČR, Ing. Věra Mátlová z VÚŽV Uhřetěves. Na základě výsledků Laboratoře agrogenomiky Mendelu byly v roce 2011 vloženy do EFABIS údaje o skutečné heterozygotnosti MS u plemen STKL a HK. Informace o heterozygotnostech v MS u hucula navrhujeme aktualizovat na základě výsledků uvedených v této disertaci.

Z výsledků disertace byly zpracovány pro vložení do oddílu “**Genetic features**“ EFABIS skutečné heterozygotnosti 17 mikrosatelitních markerů a frekvence alel genů predikujících pigmentaci u populací plemen KK a HK v ČR viz následující text.

Konkrétní forma a obsah vkládaných údajů o variabilitě populace KK v ČR, vyjádřená heterozygotností v jednotlivých lokusech mikrosatelitů:

Genetic marker : **Microsatellite**

Observed heterozygosity :

- AHT4 H=0.710; - AHT5 H=0.791; - HMS1 H=0.634; - HMS2 H=0,753; - HMS3 H=0,762; -HMS6 H=0,606; -HMS7 H=0,755; -HTG4 H=0,617; - HTG6 H=0,660; - HTG7 H=0,631; - HTG10 H=0,815; - VHL20 H=0,851; - ASB2 H=0,720; - ASB17 H=0,899; - ASB23 H=0,809; - CA425 H=0,589; - LEX3 H=0,489;

Konkrétní forma a obsah vkládaných údajů o variabilitě populace HK v ČR, vyjádřená heterozygotností v jednotlivých lokusech mikrosatelitů:

Genetic marker : **Microsatellite**

Observed heterozygosity :

- AHT4 H=0.838; - AHT5 H=0.774; - HMS1 H=0.599; - HMS2 H=0,787; - HMS3 H=0,870; -HMS6 H=0,710; -HMS7 H=0,908; -HTG4 H=0,788; - HTG6 H=0,539; - HTG7 H=0,588; - HTG10 H=0,782; - VHL20 H=0,844; - ASB2 H=0,803; - ASB17 H=0,764; - ASB23 H=0,911; - CA425 H=0,822; - LEX3 H=0,521;

Konkrétní forma a obsah vkládaných údajů o variabilitě v genech pigmentace u hřebců KK v ČR, vyjádřená frekvencí alel:

Genetic marker : **Genes – colouring**

ASIP – agouti: A = 0,731 , a= 0,269

MC1R – extenstion: E= 0,115, e= 0,885

MATP- cream: Cr= 0,404, C= 0,596

Konkrétní forma a obsah vkládaných údajů o variabilitě v genech pigmentace u hřebců HK v ČR, vyjádřená frekvencí alel:

Genetic marker : **Genes – colouring**

ASIP – agouti: A = 0,600 , a= 0,400

MC1R – extenstion: E= 0,900, e= 0,100

MATP- cream: Cr= 0,000, C= 1,000

KIT – sabino Sb1 = 1,000 sb1=0,000

KIT – tobiano To = 0,050 , to = 0,950

EDNRB O= 0,000 , o= 1,000

Další požadovanou informací v oddílu “**Genetic features**“ je uvedení kdo a kde uchovává vzorky DNA daného plemene.

Od dosud testovaných koní plemene KK a HK, z nichž jsou údaje o mikrosatelitech a alelách zbarvení doporučené pro zveřejnění v EFABIS, jsou vzorky DNA uchovány na pracovišti autorky disertační práce v Laboratoři agrogenomiky, Mendelu Brno.

V oddílu “ **Genetic features**“ - presence and address of DNA storages, by pak mělo být uvedeno následující:

Laboratory of Agrogenomics, Mendel University Brno, Zemědělská 1 613 00 Brno,
e-m : irenav@ mendelu.cz

Podle DADIS-FAO je v současné době na světě 44 milionů oslů, 11 milionů mul a mezků a 59 milionů koní, přičemž většina těchto koňovitých působí jako pracovní síla v rozvojových zemích (Rodrigues et al., 2015). V databázích EFABIS (<http://efabis.tzv.fal.de>) a DADIS (<http://da.fao.org>) je v současnosti zahrnuto ze 189 zemí 38 druhů a 14873 plemen hospodářských zvířat. Pro koně jsou zde údaje o 1547 plemenech chovaných v zemích celého světa. V evropských zemích je v databázi registrován chov celkem 874 plemen koní. Z toho nejvíce uvádí Německo 152 plemen, následuje Anglie s 96 s plemeny Rusko se 71 pemeny. Francie informuje o 56, Belgie 41, Itálie 39, Švédsko 26 a Slovensko 11 chovaných plemenech koní.

Česká republika má v systému informací o chovaných plemenech hospodářských zvířat vloženo 21 listů pro následující plemena koní:

U každého názvu plemene uvádíme výsledek kontroly množství doplněných údajů z požadovaných a jejich poslední aktualizaci.

Achal-Teke – uveden jen počet 35 jedinců za r. 2004

Anglický plnokrevník – v roce 2013 aktualizována pouze populační data

Arabský kůň – v roce 2013 aktualizována populační data, vyplněno asi 10% dalších údajů

Českomoravský belgický kůň – v roce 2013 aktualizována populační data, vyplněno asi 60% dalších údajů

Český sportovní pony – v roce 2013 aktualizována pouze populační data

Český teplokrevník – v roce 2013 aktualizována pouze populační data

Hafling – v roce 2013 aktualizována pouze populační data

Huculský kůň – informace aktualizovány v r. 2013, od r. 2011 doplněn oddíl **Genetic features** o variabilitě plemene, vyjádřené heterozygotností mikrosatelitů DNA

Irský cob – vyplněna pouze populační data za rok 2013

Klusák – v roce 2013 aktualizována pouze populační data

Kůň Kinský – vyplněna pouze populační data za rok 2013

Lipický kůň – informace aktualizovány v r. 2013, vyplněno asi 40 % dalších údajů

Moravský teplokrevník – vyplněna jen populační data za rok 2013

Norik – v roce 2013 aktualizována pouze populační data

Shagya Arab – informace aktualizovány v r. 2013, vyplněno asi 20 % dalších údajů

Shetland Pony – v roce 2014 aktualizována pouze populační data

Slezský norik – informace aktualizovány v r. 2013, vyplněno asi 40 % dalších údajů

Slovenský teplokrevník – v roce 2013 aktualizována pouze populační data

Starokladrubský kůň – informace aktualizovány v r. 2013, od r. 2011 doplněn oddíl **Genetic features** o variabilitě plemene, vyjádřené heterozygotností mikrosatelitů DNA

Traken – vyplněna jen populační data za rok 2013

Velšská plemena pony – v roce 2013 aktualizována pouze populační data

Výše uvedený stav je z především hlediska genetiky nedostatečný. Například se vyskytují případy, kdy ve vědeckých publikacích, kde se hovoří o územích, kde se chová huculský kůň se Česká republika nevyskytuje viz publikace Georgescu et al. (2008).

V ČR v roce 2015 byla vyvolána diskuze o importu exmorského pony k umístění do oblasti Mílovic a národního parku Podyjí. Odborníci i chovatelé huculského koně v ČR zastávají názor, že vhodnější by k těmto účelům bylo domácí plemeno, to je huculský kůň (např. Maršálek – Jezdectví 2015 a další). Autoři projektu s exmorským pony (ochranářská společnost Česká krajina ve spolupráci s vědci z Biologického centra Akademie věd České republiky, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, Univerzity Karlovy, Ústavu biologie obratlovců Akademie věd České republiky, České zemědělské univerzity a dalších institucí) odůvodňují jeho výběr v publikaci Dostál et al. (2014) i tím, že huculský kůň vznikl křížením různých plemen včetně arabského

koně. Žádná země s chovem huculských koní kromě ČR, v popisu huculského koně v EFABIS oddíl v odstavci o původu (description of origin) však tuto informaci neobsahuje.

Avšak za ČR je v EFABIS u HK uvedeno:

Description of origin? primitive and developed, local Carpatian type of Tarpan: composite of Tarpan, Kertak and **Arab**, established in 17th and 18th century

Podle nás je možné, že výše uvedená informace o arabovi v původu HK v EFABIS mohla být zdrojem pro autory projektu v uvádění arabského koně v původu HK v ČR.

Z hlediska fenotypu pigmentace huculského koně jsou zde zajímavé i následující údaje o importu HK do ČR:

Import? since 1950 from Hucul (Romania, Poland and Ukraine) and from Fjord (Poland)

<http://efabis.tzv.fal.de/cgi-bin>

V listu EFABIS huculského koně na Ukrajině sice nejsou uvedeny molekulárně genetické markery, ale z publikace Melnyk, Dzitsiuk (2015) v ukrajinštině dokazuje, že na národní univerzitě enviromentálních věd se pracuje na mikrosatelitové struktuře plemen koní.

Z uvedené diskuze vyplývá, že v mezinárodní databázi EFABIS je třeba věnovat údajům o huculském koni neustále pozornost.

Ukázky listů plemen KK a HK z databáze EFABIS viz příloha č. 5.

5.5. DNA testy/analýzy MS pro forenzní účely

Požadavky na forenzní detekci u zvířat jsou stále častější i v ČR a podle nás se budou rozšiřovat i u hospodářských zvířat. Tento názor podporuje následující. V srpnu 2015 německá policie zadržela nedaleko Hannoveru řidičku, která v kufru svého vozu převážela živého koně – shetlandského pony. Se zvířetem údajně takto ujela asi 100 kilometrů. Řidička uvedla, že chtěla takto dojet až do České republiky, tedy dalších asi 500 kilometrů. Pokud by dojela do ČR, pak by jako důkaz týrání či pašování posloužil DNA test z žíní, slin, které by se v autě mohly nalézt.

Náročnost na přesnost, opakovatelnost, jednoznačnost atd. analýz DNA markerů při jejich uplatňování v právních sporech vzrůstá se vzrůstajícím povědomím obhájců i odborné veřejnosti o limitujících faktorech a možnostech interpretace výsledků DNA testů.

Laboratoře, jejichž výsledky jsou uznávány, musí splňovat přísná kritéria a jsou pod pravidelnou kontrolou.

5.5.1. Podmínky pro laboratoře v ČR

Podmínkou pro provádění DNA analýz/testů pro forenzní použití je v celé Evropské unii nutná mezinárodně platná akreditace systému managementu laboratoře dle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2005. Českým akreditačním orgánem je Český institut pro akreditaci, o.p.s., který od roku 2010 je, se všemi důsledky, orgánem státní správy.

Aktuální akreditace Laboratoře agrogenomiky (první připravila autorka spisu v roce 2007), kde byla tato disertace zpracována, proběhla úspěšně v roce 2015. Jejím výstupem je “Osvědčení o akreditaci” a jeho příloha viz obrázek č. 15.

Obr. č. 15. Osvědčení o akreditaci a příloha osvědčení o akreditaci



Příloha je nedílnou součástí osvědčení o akreditaci č.: 421/2015 ze dne: 09.06.2015
Akreditovaný subjekt podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2005:
Mendelova univerzita v Brně
Laboratoř agrogenomiky
Zemědělská 1/665, 613 00 Brno

Laboratoř poskytuje odborná stanoviska a interpretace výsledků zkoušek

Zkoušky:

Poradové číslo	Přesný název zkusebního postupu/metody	Identifikace zkusebního postupu/metody	Předmět zkoušky
1.	Určení genotypů polymorfních lokusů DNA metodou fragmentační analýzy*	SOP č. LAG/01	Biologický/živočišný materiál obsahující DNA (kůži a tělní tekutiny)
2.	Detekce alel genomových markerů asociovaných s fenotypem metodou RFLP	SOP č. LAG/02 (příloha č. 4 HAL příloha č. 5 ČSN)	Biologický/živočišný materiál obsahující DNA (kůži a tělní tekutiny)

* skot (mikrosatelity: TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SP515, SP513, TGLA126, TGLA122, INRA023, BM1818, RM067, ETH3, ETH225, BM1824, CSRM60, MGTG4B, CSSM66, ILST006)

kůň (mikrosatelity: VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425)

prase (mikrosatelity: S0655, SBH18, SBH2, SBH4, SBH1, SBH10, SBH20, SBH23, 387A12F, SBH13, SBH19, SBH22)

koza (mikrosatelity: SRCRSP0024, INRA0063, HSC, INRA0005, ILST019, MAF0065, SRCRSP0005, SRCRSP0008)

ovce (mikrosatelity: INRA0063, HSC, OarCP0049, OarFCB0304, CSRD0247, OarAE0129, MAF0214)

pes (mikrosatelity: AHT121, AHT137, AHT171, AHTK260, AHTK211, AHTK253, CXX279, FH2054, Amelogenin, FH2848, INRA21, INU005, INU030, INU055, REN162C04, REN169D01, REN169D01, REN169018, REN247M23, REN54P11)

kočka (mikrosatelity: FCA069, FCA005, FCA293, FCA678, FCA441, FCA453, FCA075, ZFX1, FCA105, FCA310, FCA229, FCA220)

ptáci - dravci (mikrosatelity: Aa50, Aa11, Aa26, Aa15, Aa27, Aa53, Aa56, Aa43, Aa02, Aa39, Aa35, Aa36, Aa49, Aa04, Aa51)

Vysvětlivky:
DNA – deoxyribonukleová kyselina
RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů
HAL – stresový syndrom
CSN – kasein



Strana 2 z celkového počtu 1 stran

Akreditace laboratoří podle mezinárodní normy 17025:2005 je složitou procedúrou. Komise složená z vědecko-výzkumných pracovníků v daném oboru (v případě LAG molekulární biologie) a odborníků na systém managementu posuzují např.: zda používané laboratorní metody a metodiky odpovídají současnému stavu poznání, zda alespoň jeden z pracovníků má absolvovaný vysokoškolský kurz molekulární genetiky (biologie) atd.

Akreditační prověrka probíhá 3-5dnů a je spojena, podle počtu akreditovaných zkoušek, se značnými finančními náklady. Proto i velké laboratoře v EU tuto akreditaci podstoupili až se zahájení forenzních zkoušek pro zvířata. Např. jedna z nejvýznamnějších evropských laboratoří “dr. Van Haeringen Laboratorium”, získala akreditaci dle normy ISO/IEC 17025:2005 v roce 2009 tzn. o dva roky později než LAG Mendelu .

V USA jsou forenzní laboratoře akreditovány podle programu ASCLD/LAB (American Society of Crime Laboratory Directors / Laboratory Accreditation Board), který zahrnuje stejnou normu ISO/IEC 17025:2005, kterou pro LAG Mendelu obhájila autorka disertace. První takto akreditovanou laboratoří pro “domestikovaná” zvířata v USA je od roku 2010 The Veterinary Genetics Laboratory Forensic Unit (VGLForensics) University of California, Davis.

Pro porovnání rozsahu testovaných MS lokusů, uvádíme v následující tab. č.8 lokusy doporučené ISAG a testované ve dvou laboratořích USA, jedné v EU, jedné v SR a jedné v ČR. Je v ní patrná shoda laboratoří v EU.

Tab.č.8 Mikrosatelitní markery testované světovými laboratořemi a markery doporučené společností ISAG

STR lokus	ISAG doporučuje	LABORATOŘ				
		University of Kentucky	U.C.Davis (VGL) Californie	Van Haeringen laboratoroty Holandsko	Vetgene Slovensko	Laboratoř agrogenomiky Česká republika
AHT4	●	●	●	●	●	●
AHT5	●	●	●	●	●	●
HMS1	●	●		●	●	●
HMS2	●	●		●	●	●
HMS3	●	●	●	●	●	●
HMS6	●	●	●	●	●	●
HMS7	●	●	●	●	●	●
HTG4	●	●	●	●	●	●
HTG6	●	●		●	●	●
HTG7	●	●		●	●	●
HTG10	●	●	●	●	●	●
VHL20	●	●	●	●	●	●
ASB2	●	●	●	●	●	●
ASB17	●	●	●	●	●	●
ASB23	●	●	●	●	●	●
CA425	●	●		●	●	●
LEX3	●	●		●	●	●
LEX33			●			
UM011						
AME		●	●			

Do roku 2012 bylo společností ISAG pro identifikaci a parentity doporučeno pouze 12 MS markerů (*AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, VHL20*) v roce 2014 byl společností ISAG zvýšen počet doporučených markerů na 17.

5.5.2. Použití MS ve forenzních testech

Historicky první případ využití DNA testů v trestním řízení ve věci pytláctví několika vlků z roku 2008 v Itálii popisuje Caniglia et al. (2010). Analýzou DNA extrahované z vlčích zubů nalezených v náhrdelníku pomocí 12 MS identifikovali, že zuby patří šesti jedincům, třem samcům a třem samicím. Rendo et al. (2011) popisuje příklad úhynu mrchožravého supa otráveného návnadou jehněčího masa. Otestováním MS u stád ovcí a zpracováním v programu Structure identifikovali stádo, ze kterého otrávené jehněčí pocházelo.

Od té doby byla publikována v kriminalistické literatuře řada případových studií.

O DNA testech zvířat pro policii ČR jsme nezískali žádnou informaci. Kriminalistický ústav Policie ČR DNA testy zvířat neprovádí.

5.5.2.1. Případové studie v ČR (Case Reports)

Výsledky forenzních DNA testů se nevyužívají pouze jako důkazy u soudu, ale uplatňují se i při policejním vyšetřování.

Při vyšetřování zločinů na zvířatech bývají k dispozici různé druhy biologických vzorků. V ČR se setkáváme se vzorky jako jsou kapky krve na různých nosičích, zbytky tkání, vzorky masa zajištěných u podezřelého, srst zachycená na stromech, postrojích a obojcích zvířat, od vysoké zvěře paroží nebo rohy atd. V některých případech jsou to i exkrementy.

V období zpracování disertace jsme řešili 7 identifikací různých zvířat pro Policii ČR a přes 10 pro chovatele koní.

V následující části uvádíme dva řešené případy (případové studie – case report) z vyžádaných policií a tři řešení vyžádané chovateli.

Případ č.1

Krajským ředitelstvím policie byla do Laboratoře agrogenomiky zaslána žádost o odborné vyjádření z oboru genetika zvířat ve věci pytláctví.

Do LAG byly doručeny 4 vzorky/stopy pro určení shody jednotlivých stop se srovnávacím materiálem. Vzorky/stopy byly doručeny jako stěry z červených skvrn, srovnávací materiál jako krev, část srsti a část slechu ze zastřelené zvěře (laně).

Výsledek odborné expertizy:

Laboratoří agrogenomiky byla provedena izolace DNA, PCR reakce a fragmentační analýza panelu 9 MS specifických pro jelena.

Dvě ze čtyř dodaných stop se amplifikovaly ve všech 9 MS a byly označeny jako shodné se srovnávacím materiálem. Další dvě stopy se amplifikovaly pouze v 6 MS, ve kterých byly shodné se srovnávacím materiálem.

Případ č.2

Krajským ředitelstvím policie byla do LAG zaslána žádost o odborné vyjádření – genetickou expertizu – ve věci pytláctví, zastřelení březí samice prasete divokého.

Do LAG byly dodány 3 vzorky/stopy:

stopa č. 1 – část tkáně z ostatků vývrhu zajištěné na místě zastřelení prasete

stopa č. 2 – část igelitové plachty se zaschlou tekutinou červené barvy zajištěné v kontejneru na tříděný odpad

stopa č. 3 – část igelitové plachty se zaschlou tekutinou červené barvy zajištěné u podezřelého

Předmětem genetické expertizy bylo:

Zjistit, zda jsou zajištěné vzorky shodné a tedy pocházejí z jednoho a toho samého jedince.

Výsledek odborné expertizy:

Laboratoří agrogenomiky byla provedena izolace DNA, PCR reakce a fragmentační analýza panelu 12 MS specifických pro prase obsahujícím pohlavně specifický marker pro gen amelogeninu (*SBH23*).

U stop č. 1 a 3 se amplifikovalo všech 12 MS. Na základě genotypu markeru *SBH23* bylo stanoveno, že obě stopy pochází ze samice.

Stopy se všech 12 MS shodovaly, byly shodné a byly tedy označeny jako pocházející z jednoho a toho samého jedince.

Stopa č. 2 nedávala při opakování analýzy standardní výsledky (pravděpodobnost kontaminace) a nebyla dále posuzována.

Příklady pro chovatele koní

Příklad č. 1.

Asociace chovatelů huculského koně měla podezření na nesprávné údaje o jednom hřebci. Pochybnosti vycházely z výskytu bílých odznaků. Asociací byla do LAG doručena žádost a dodán vzorek žíní. Požadováno bylo jeho srovnání s DNA profilem již dříve testovaného koně se stejným jménem.

Odborné vyjádření:

Srovnání identity dvou vzorků chlupových cibulek označených jako hřebec Lxxxx.

1 - vzorek označen jako hřebec Lxxxx, dodán [REDACTED] 22.6.2015 je v Laboratoři agrogenomiky evidován pod laboratorním číslem K263/15.

2 - vzorek označen jako hřebec Lxxxx, dodán ASCHK 21.9.2015 je v Laboratoři agrogenomiky evidován pod laboratorním číslem K713/15.

Laboratoř agrogenomiky stanovila na základě provedených analýz 17 mikrosatelitních markerů genetické typy (DNA profily) vzorků K263/15 a K713/15.

Závěr:

DNA profily vzorků K263/15 a K713/15 se ve všech 17 MS markerech shodují, jsou od jednoho jedince, jedná se o shodného koně.

V Brně dne 13.10.2015

Ing. Irena Vrtková
vedoucí Laboratoře agrogenomiky

Přílohy odborného vyjádření:

DNA profil vzorku K 263/15

Výsledek analýzy:

Genetický typ = DNA typ = genotypy mikrosatelitů

AHT4	L	N
AHT5	J	N
HMS1	J	J
HMS2	H	P
HMS3	N	P
HMS6	L	M
HMS7	L	M
HTG4	M	N
HTG6	M	O

HTG7	K	K
HTG10	R	S
VHL20	N	N
ASB2	Q	Q
ASB17	O	O
ASB23	K	K
CA425	M	O
LEX3	N	N

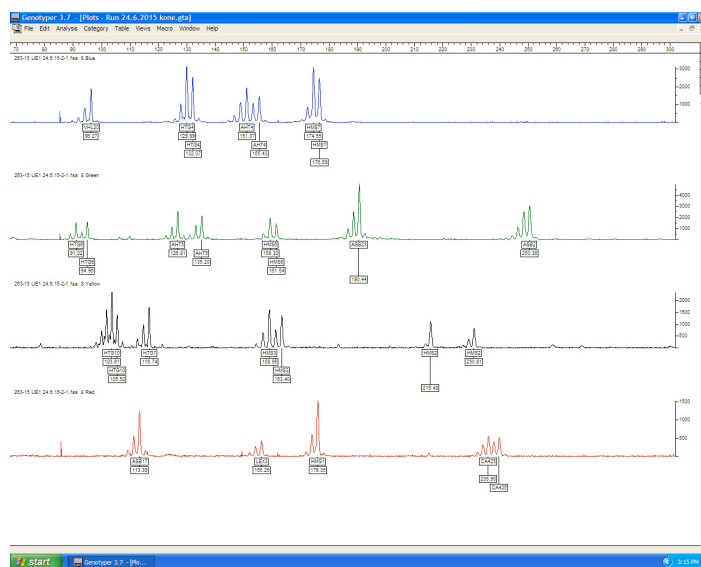
DNA profil vzorku K 713/15

Výsledek analýzy:
Genetický typ = DNA typ = genotypy mikrosatelitů

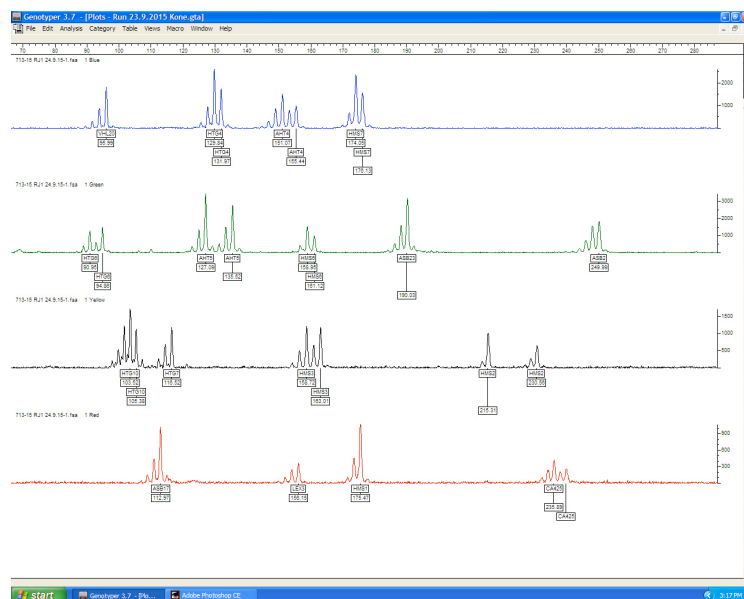
AHT4	L	N
AHT5	J	N
HMS1	J	J
HMS2	H	P
HMS3	N	P
HMS6	L	M
HMS7	L	M
HTG4	M	N
HTG6	M	O

HTG7	K	K
HTG10	R	S
VHL20	N	N
ASB2	Q	Q
ASB17	O	O
ASB23	K	K
CA425	M	O
LEX3	N	N

Výstup z fragmentační analýzy vzorku K 263/15



Výstup z fragmentační analýzy vzorku K 713/15



Příklad č. 2.

Žádost chovatele koní o srovnání identity biologického vzorku koně s DNA profilem stanoveným v zahraniční laboratoři. Do Laboratoře agrogenomiky byl doručen vzorek žíní koně a bylo požadováno srovnání identity s DNA profilem stanoveným v Kalifornii.

Odborné vyjádření:

Věc: Srovnání identity koně – porovnání DNA profilu

Na základě žádosti o srovnání biologického vzorku hřebce Moritzbergs Fancy Buck dodaného dne 26.5.2014 do Laboratoře agrogenomiky a DNA profilu hřebce Moritzbergs Fancy Buck stanoveného 7.1.2013 Veterinary Genetics Laboratory University of California bylo porovnáno 12 mikrosatelitních markerů doporučených společností ISAG pro individuální identifikaci koní. Ve všech 12 mikrosatelitních markerech se DNA profily stanovené v Laboratoři agrogenomiky a Veterinary Genetics Laboratory University of California shodovaly.

Na základě výsledků srovnání se jedná o identického koně.

Přílohy: protokoly DNA profilů hřebce Moritzbergs Fancy Buck K172/14, MI69256

V Brně dne 29.05. 2014

Ing. Irena Vrtková
vedoucí Laboratoře agrogenomiky

Přílohy odborného vyjádření:

DNA profil vzorku K 172/14

Výsledek analýzy:

Genetický typ = DNA typ = genotypy mikrosatelitů

AHT4	K	O
AHT5	N	N
HMS1	M	M
HMS2	H	P
HMS3	P	R
HMS6	O	P
HMS7	N	O
HTG4	M	M
HTG6	O	O

HTG7	M	O
HTG10	K	O
VHL20	M	R
ASB2	M	Q
ASB17	F	J
ASB23	J	S
CA425	M	M
LEX3	N	N

Dodaný DNA profil MI69256

Veterinary Genetics Laboratory
School of Veterinary Medicine
University of California
Davis, CA 95616
(530)752-2211 fax (530)752-3556

EQUINE GENETIC MARKER REPORT

Animal
Name: MORITZBERGS FANCY BUCK Reg: A199419
Breed: MI Sex: S Color: SGL YOB: 10
Sample: Hair
Case: MI69256 Test: 07/01/2013 Printed: 07/04/2013
Country: GER
Sire: SRF NOBLE FLAIRE
Dam: GRACELANDS SURE IS FANCY

DNA Results

ASB17:	FJ
VHL20:	MR
HTG10:	KO
HTG4:	M
AHT5:	N
AHT4:	KO
HMS3:	FR
HMS6:	OP
HMS7:	NO
LEX3:	N
LEX33:	GO
ASB2:	MQ
ASB23:	JS

Příklad č. 3.

Laboratoř agrogenomiky byla chovatelkou koní požádána o ověření “ pravosti” koně. Majitelka měla v držení koně, ke kterému jí nebyly poskytnuty žádné doklady, pouze ústně jí bylo sděleno, že se jedná o koně GHAMAR po otci 2945 GAZAL II-CZ (WIZARD) z matky GHAJARIY CZ-SH-A-207. Na základě uloženého DNA profilu již dříve testovaného hřebce GHAMAR bylo provedeno srovnání identity.

Odborné vyjádření:

Potvrzení identity koně

Na základě srovnání DNA profilu dvou vzorků uložených v Laboratoři agrogenomiky

1. vzorek K673/12 označený jako hřebec GHAMAR (otec 2945 GAZAL II-CZ (WIZARD), matka GHAJARIY CZ-SH-A-207)
a
2. vzorek K795/15 označený jako hřebec GHAMAR (otec 2945 GAZAL II-CZ (WIZARD), matka GHAJARIY CZ-SH-A-207)

potvrzujeme shodnost obou uvedených vzorků.

V Brně dne 23.10.2015

Ing. Irena Vrtková
vedoucí Laboratoře agrogenomiky

Přílohy odborného vyjádření:

DNA profil vzorku K 673/12

Výsledek analýzy:

Genetický typ = DNA typ = genotypy mikrosatelitů

AHT4	M	O
AHT5	-	O
HMS1	I	J
HMS2	I	I
HMS3	M	Q
HMS6	L	P
HMS7	J	L
HTG4	L	M
HTG6	G	O

HTG7	O	O
HTG10	L	O
VHL20	N	P
ASB2	Q	Q
ASB17	R	R
ASB23	J	M
CA425	N	O
LEX3	N	N

DNA profil vzorku K 795/15

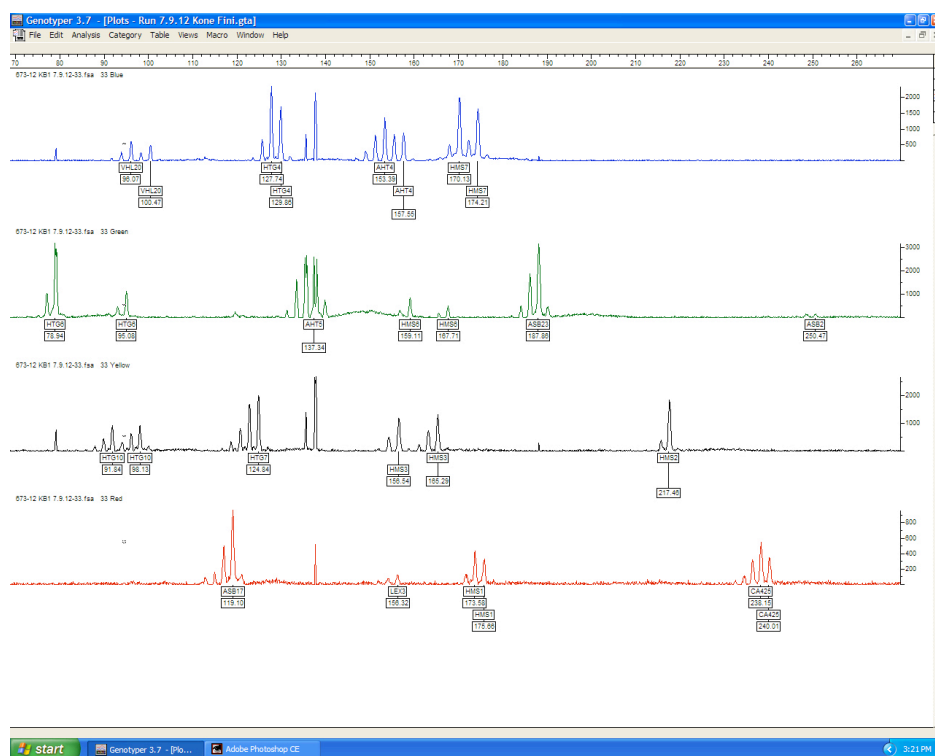
Výsledek analýzy:

Genetický typ = DNA typ = genotypy mikrosatelitů

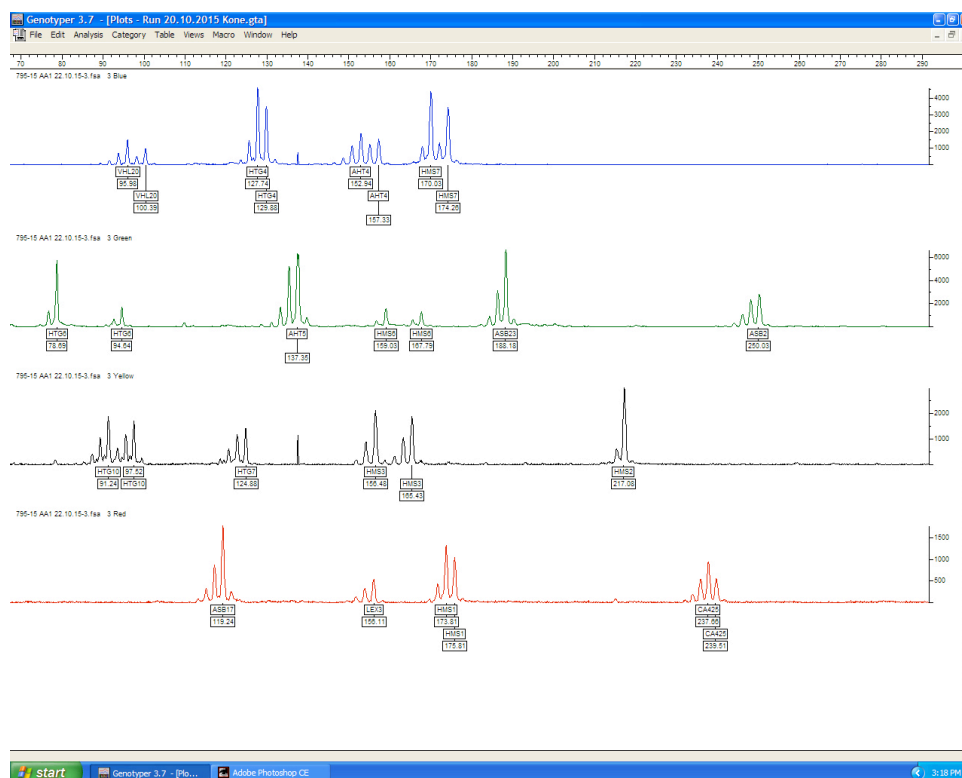
AHT4	M	O
AHT5	O	O
HMS1	I	J
HMS2	I	I
HMS3	M	Q
HMS6	L	P
HMS7	J	L
HTG4	L	M
HTG6	G	O

HTG7	O	O
HTG10	L	O
VHL20	N	P
ASB2	Q	Q
ASB17	R	R
ASB23	J	J
CA425	N	O
LEX3	N	N

Výstup z fragmentační analýzy vzorku K 673/12



Výstup z fragmentační analýzy vzorku K 795/15



Námi výše zveřejněné případové studie pro policejní vyšetřování a chovatele zahrnují různé typy vzorků.

Přehled o různorodosti vzorků s kterými se může LAG v budoucnosti setkat, s citacemi, ze kterých mohou laboratorní operátoři čerpat, podáváme v následujících dvou tabulkách (č. 9, 10). V nich je výběr z recentní, rozsáhlé publikace Iyengar (2014) o forenzních DNA analýzách u zvířat v souvislosti se zachováním biodiverzity. Využívání MS pro forenzní DNA testy se stále rozšiřuje, především na chráněné a volně žijící druhy živočichů a jsou publikovány postupy, které rozvíjejí další forenzní aplikace.

Tab. č. 9

. Výběr případů, které byly projednávány před soudem

Typ biologického důkazu	DNA marker	Typ testu/ vyšetření	Druh	Reference
Maso, kůže	Southern blot a hybridizace	Identifikace druhů (pytláctví)	Čínský vodní jelen	Fang a Wan (2003)
Vařené maso, střeva, sušená tkáň z prkénka	sekvenování mtDNA (cyt b , 472 bp)	Identifikace druhů (pytláctví)	Indiánský páv	Gupta et al. (2005)
Kůže, krev	sekvenování mtDNA (CR, 1079 bp)	Identifikace poddruhů (pytláctví)	Čínská sika poddruh	Wu a kol.(2005)
Krevní skvrny z nože, kostry	STR	Individuální identifikace (pytláctví, týrání zvířat)	Divočák	Lorenzini (2005)
Maso, vlasy	sekvenování mtDNA (cyt b , 900 bp)	Identifikace druhů (pytláctví)	Srniec	A kol. (2007)
tkáň, tampony, oblečení, krev potřísněný koberec	sekvenování mtDNA (CR, 503 bp)	Identifikace druhů (smíšené forenzní vzorky)	Několik druhů savců	FUMAGALLI a kol. (2009)
Zuby	STR	Individuální identifikace (nezákonného zabíjení)	Vlk	Caniglia a kol. (2010)
Dráp a rozkládající se kůže	sekvenování mtDNA (CR), STR	Individuální identifikace (nezákonného zabíjení)	Tygr	Gupta, Bhagavatula, a kol. (2011)
Krev	STR, přiřazení k populaci	Stanovení zeměpisného původu (nelegální pašování zvířat / lovecký)	Šimpanzi	Ghobrial a kol. (2010)
Krevní skvrny z místa činu, kostry	STR	Individuální identifikace (pytláctví)	Sardinský muflon	Lorenzini a kol. (2011)
Krev, tkáň	STR	Individuální identifikace (vyšetřování záměrného vypuštění z přírodní rezervace)	Liška	Wesselink a Kuiper (2011)
Krevní skvrny z kufru podezřelého a džínů, jatečně upravených těl	sekvenování mtDNA (cyt b , 1140 bp), STR	Individuální identifikace (pytláctví)	Kyperský muflon	Barbanera a kol. (2012)
Vzorky slin z jatečně upravených těl	STR	Individuální identifikace (krádeže hospodářských zvířat / falšované doklady)	Vlci nebo psi	Caniglia a kol. (2013)

Tab. č. 10

Výběr vývojových studií pro forenzní aplikaci

Druh	Typ testovaných biologických důkazů	DNA marker	Forenzní aplikace	Reference
Zvíře				
Nosorožec	Roh	sekvenování mtDNA (cyt b , 402 bp)	Identifikace druhů (nelegální obchod)	Hsieh et al.(2003)
Tygr	Krev	STR	Individuální identifikace (pytláctví / pašování)	Xu et al. (2005)
Jezevec lesní	Kousky uší, krev	STR	Vývoj STR profilování (nezákonné zabíjení)	Dawnay et al. (2009)
Mezek	Pevná tkáň	STR	Vývoj STR profilování (nezákonné zabíjení)	Jobin et al. (2008)
Šest druhů dravých ptáků	Pevná tkáň, krev, bukální stěry, peří	STR	Vývoj validovaných STR (nezákonné zabíjení)	Dawnay et al. (2009)
Jelen červený	Vlasy, krev, jiná tkáň	STR	Individuální identifikace (pytláctví)	Szabolsci et al. (2008)
Jelen červený	Pevná tkáň	STR	Individuální identifikace (pytláctví)	Socratous et al. (2009)
Divoké prase	Pevná tkáň	STR	Vývoj STR profilování (nezákonné zabíjení)	Caratti et al. (2010)
Kůň	Kořeny vlasů	sekvenování mtDNA (CR, 662 bp + 209 bp)	Pokusy o individualizaci pro forenzní účely	Gurney et al. (2010)
Různé druhy divoké zvěře	Krev, čerstvé a sušené pevné tkáně, zpracované kožené produkty	sekvenování mtDNA (COI, 645 bp)	Identifikace druhů (nelegální obchod)	Eaton et al. (2010)
Tetřev	Svalovina, peří	PCR v reálném čase (druhově specifické 12S rRNA, 142 bp, univerzální eukaryotické 18S rRNA, 141 bp)	Identifikace druhů, z masa a masových směsí (nelegální lov / obchod)	Rojas et al. (2011)

Navzdory tomu, že v současné době se rozvíjí genomické technologie na určování velkého počtu jednonukleotidových polymorfismů (SNPs) z celého genomu zvířat mikrosatelity (MS) zůstanou, podle našeho názoru i z ekonomického pohledu, nadále využívanými markery, protože již existují a stále se hromadí referenční genetické údaje MS u různých druhů zvířat.

Z hospodářských zvířat byly u koní referenční údaje velkého rozsahu zveřejněny, podle dostupných informací, pouze pro Nizozemí v publikaci Van de Goor et al. (2011b). Elektronická příloha k této publikaci zahrnuje 8641 koní různých plemen.

Pro ČR jsou referenční údaje koní součástí této disertace. viz příloha č.6 – pouze v elektronické podobě.

Elektronická příloha disertace (v disertačním spisu na vloženém CD), obsahuje konkrétní genotypy 17 MS u 9515 koní z 27 plemen včetně genových zdrojů.

Komentář k elektronické příloze:

V některých lokusech MS jsou u několika zvířat ojediněle pomlčky, což znamená, že alela nebyla identifikovaná nebo se jednalo o nulovou alelu. V další práci s touto databází budeme, a pro uživatele výsledků disertace doporučujeme, používat recentní informace z publikace Suez et al. (2015) informující o softwaru MicNeSs využívajícího algoritmu v jazyce Python, který vychází z alelových frekvencí a nahrazuje chybějící alely na základě výskytu alel u ostatních jedinců dané populace.

6. SOUHRN

Cílem disertační práce bylo detekovat genomické markery a jejich implementace do charakteristiky diverzity vybraných plemen koní, genetické predikce pigmentace koní, do databáze EFABIS a forenzního použití v ČR.

Charakteristika diverzity populací

Pro charakteristiku diverzity jsou v práci shrnuty výsledky od 7682 koní 13 plemen zastoupených v ČR. U nich bylo analyzováno 17 mikrosatelitních (MS) lokusů a určeno celkem 261 188 genotypů. Z nich stanovené hlavní parametry byly: průměrný počet alel na lokus 11,29, očekávaná heterozygotnost 0,771, skutečná heterozygotnost 0,737, polymorfni informační obsah (PIC) 0,738.

Pro praktické využití je z uvedených údajů nejdůležitější PIC, jehož hodnota je zásadní pro ověřování parentit koní. Pro plemena appaloosa (APP), fjord (FJO), shetlandský pony (SHPON) a populaci teplokrevníka (v Holandsku a českého teplokrevníka) jsme provedli srovnání hodnot PIC námi stanovených pro tato plemena chovaná v ČR s výsledky koní chovaných v Holandsku uveřejněnými Van de Goor et al. (2011b). Dále uváděné hodnoty PIC jsou v pořadí: naše výsledky versus Van de Goor et al. (2011b): APP 0,717 v. 0,729, FJO 0,641 v. 0,671, SHPON 0,662 v. 0,636, teplokrevník 0,720 v. 0,719. U srovnávaných plemen hodnoty nevykazují významný rozdíl. Další námi testovaná plemena v práci z Holandska nejsou uvedena.

U huculského koně (HK) jako genového zdroje ČR pokládáme pro trvalou udržitelnost za důležitý parametr skutečné heterozygotnosti (H_e). U námi sledované populace 473 jedinců byla 0,738, což ukazuje vysokou úroveň genetické variability. Stejnou H_e (0,738) uvádí u HK na Slovensku u 48 jedinců i Trandžik et al. (2006).

Odlišnost v genetické struktuře vybraných plemen jsme testovali Bayesovou metodou na bázi frekvencí alel a podobnosti genotypu jedince s ostatními genotypy v populaci. Diverzita hodnocená programem Structure ukázala odlišnost plemene HK. Od ostatních se vymezilo už při K2.

Dalším specifickým plemenem v ČR je kůň Kinský (KK). V programu Structure se ohraničilo při K4. Jednotliví koně vykazují v MS různý podíl plemen český teplokrevník, slovenský teplokrevník a anglických plnokrevník. S údaji v plemenné knize nebyly tyto údaje srovnávány.

Pro přehled o genetických vztazích mezi plemennými hřebci HK i KK jsme pro stanovení jejich genetické vzdálenosti konstruovali dendrogramy.

Genetická predikce zbarvení

Z pohledu pigmentace srsti a zájmu chovatelů v ČR je zajímavý především kůň Kinský. Proto u plemenných hřebců byly stanoveny genotypy zbarvení ve dvou genech základního zbarvení (*ASIP*, *MC1R*) a genu ovlivňujícím "ředění" barev (*MATP*).

Frekvence alel v genech *ASIP* (*A* 0,731, *a* 0,269), *MC1R* (*E* 0,115, *e* 0,885), *MATP* (*C* 0,596, *Cr* 0,404). Na základě stanovených genotypů pigmentace byl vypracován postup pro připarování KK se zaměřením na zbarvení u potomků (isabela, plavák). Postup byl předán chovatelům a na jeho podkladě svaz chovatelů KK zavedl v roce 2015 povinnost u hřebců uvádět genotypy zbarvení v plemenné knize.

U hřebců HK zařazených do genového zdroje byly stanoveny genotypy v genech *ASIP*, *MC1R*, *MATP* a třech lokusech depigmentace (gen *KIT* – lokusy Sabino a Tobiano, gen *EDNRB* – lokus Overo). Frekvence alel: *ASIP* (*A* 0,6, *a* 0,4), *MC1R* (*E* 0,9, *e* 0,1), *MATP* (*C* 1,0 *Cr* 0,0), *KIT* (*sb1* 1,0, *Sb1* 0,0), (*To* 0,1, *to* 0,9), *EDNRB* (*O* 0,0 *o* 1,0). Na podkladě těchto výsledků Asociace chovatelů huculského koně pro všechny hřebce zařazované do genového zdroje vyžaduje DNA test na tobiano depigmentaci.

U westernových koní chovatelé upřednostňují různé typy depigmentace. Typ overo podmíněný genem *EDNRB* při genotypu *OO* způsobuje syndrom OLWS (Overo Lethal White Syndrom). Pro omezení jeho výskytu bylo otestováno 24 koní plemene paint horse (PH) v ČR. Ze stanovených frekvencí alel v genu *EDNRB* (*O* 0,271, *o* 0,729) byl vypočítán teoretický výskyt homozygotní letálního genotypu *OO* v ČR 7,3%. Heterozygotní genotyp *Oo* byl detekován u 54,2 % jedinců. Na základě zveřejnění těchto výsledků chovatelé v ČR již usměrňují připouštění s ohledem na genotypy.

Informační systém EFABIS

V mezinárodním projektu tvorby databáze EFABIS (European Farm Animal Biodiversity Information System) byl na "listech" jednotlivých plemen koní v oddíle "Breed morphology information" doplněn odstavec "Genetic features". Pro prezentaci plemen HK a KK v uvedeném odstavci "Genetic features" byly připraveny genetické parametry skutečné heterozygotnosti v MS lokusech *AHT4*, *AHT5*, *ASB2*, *ASB17*, *ASB23*, *CA425*, *HMS1*, *HMS2*, *HMS3*, *HMS6*, *HMS7*, *HTG4*, *HTG6*, *HTG7*, *HTG10*, *LEX3*, *VHL20* a frekvence alel v genech pigmentace *ASIP*, *MC1R*, *MATP*, *KIT*, *EDNRB*.

Poprvé tak jsou ve evropském přehledu EFABIS (FAO-DADIS) prezentovány molekulárně genetické údaje z ČR.

Forezní použití MS v ČR

Disertační spis obsahuje řešené forezně genetické případy pro Policii ČR a chovatele koní. Výsledky mohly být Policií ČR pro vyšetřování použity, protože Laboratoř agrogenomiky splňuje zásadní podmínku, to je akreditaci podle normy ČSN EN ISO/IEC 17025:2005.

K řešení forezních problémů musí být vytvořeny u jednotlivých plemen dostatečné referenční databáze genotypů MS. Součástí disertačního spisu je elektronická příloha (CD) obsahující genotypy v 17 MS u 9515 koní 27 plemen včetně genových zdrojů.

Srovnatelnou databázi genotypů zveřejnila pouze Van de Goor et al. (2011b) pro 8641 koní pro Nizozemí.

7. NÁMĚTY K DALŠÍ APLIKACI VE VÝZKUMU A PRAXI

Náměty pro výzkum

- vytvořit dostatečné databáze MS referenčních populací plemen koní chovaných v ČR. Schneider 2007 uvádí dostatečnou velikost referenční populace 500 jedinců.
- využít recentní informace z publikace Suez et al. (2015) informující o softwaru MicNeSs používající algoritmus v jazyce Python, který vychází z alelových frekvencí a nahrazuje chybějící alely na základě výskytu alel u ostatních jedinců dané populace.
- rozpracovat (podle recentních publikací) a zavést v ČR analýzy mtDNA koní a určit mtDNA haplotypy.
- zpracovat metodiky detekce mutací v dalších genech ovlivňujících pigmentaci koní na základě recentních vědeckých publikací se zaměřením na mutace v genu *KIT* (Hauswirth et al., 2012)
- připravovat sady SNP efektivně kombinující ověřování paternit, detekci chorob a vad a predikci pigmentace pro konstrukci biochipů (microarray). Tento výzkum nelze provádět bez potřebné technologie.

Náměty pro chovatele

- využít MS, mtDNA a SNP pro trvalou udržitelnost genových zdrojů koní v ČR.
- určené haplotypy mtDNA používat při “hodnocení podílu” genů pro zařazování do hlavních a vedlejších plemenných knih (např. u plemen KK, HK).
- u plemen HK, KK a PH využívat při hodnocení zbarvení genotypy v genech pigmentace.
- aktualizovat v databázi EFABIS oddíl “Genetic features”.
- MS a SNP podmiňující pigmentaci využít u specifického souboru exmorského pony importovaného do ČR.

8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- AJMONE-MARSAN P., THE GLOBAL CONSORTIUM (2010): A global view of livestock biodiversity and conservation - GLOBALDIV. *Animal Genetics*, 41: 1-5.
- ANDERSSON L. S., LARHAMMAR M., MEMIC F., WOOTZ H., SCHWOCHOW D., RUBIN C. J., PATRA K., ARNASON T., WELLBRING L., HJÄLM G., IMSLAND F., PETERSEN J. L., MCCUE M. E., MICKELSON J. R., COTHRAN G., AHITUV N., ROEPSTORFF L., MIKKO S., VALLSTEDT A., LINDGREN G., ANDERSSON L., KULLANDER K. (2012): Mutations in DMRT3 affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature*, 488: 642-646.
- ANONYM (2010): Metodika pro odběr, uchovávání a transport biologických vzorků určených k izolaci DNA a k dlouhodobé archivaci. http://www.cmsch.cz/docs/manual_biolvzorky.pdf
- ANONYM (2011): „Nový pětiletý strategický plán EU-USA v oblasti biotechnologií“ na období 2011-2015 zveřejněný na www.ec.europa.eu/research/biotechnology, listopad 2011.
- BELLONE R. R., ARCHER S., WADE C. M., CUKA-LAWSON C., HAASE B., LEEB T. FORSYTH G., SANDMEYER L., GRAHN B. (2010): Association analysis of candidate SNPs v TRPM1 with leopard complex spotting and congenital stationary night blindness. *Animal Genetics*, 41: 100-110.
- BELLONE R., LAWSON S., HUNTER N., ARCHER S., BAILEY E. (2006): Analysis of a SNP in exon 7 of equine OCA2 and its exclusion as a cause for appaloosa spotting. *Animal Genetics*, 37: 525.
- BOETTCHER P. J., TRIKIER-BIOCHARD M., TORO M. A., SIMIANER H., EDING H., GANDINI G., COLLI L., AJMONE-MARSAN P. GLOBALDIV CONSORTIUM. (2010): Objectives, criteria and methods for using molecular genetic data in priority setting for conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41: 64-77.
- BOWLING A. T.: Horse genetics. Wallingford, Oxon, UK: CAB International, xvii, 1996, 200 s.
- BROOKS S. A., BAILEY E. (2005): Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mammalian Genome* 16: 893-902.
- BROOKS S. A., GABRESKI N., MILLER D., BRISBIN A., BROWN H. E., STREETER C., MEZEY J., COOK D., ANTCZAK D. F. (2010): Whole-Genome SNP Association in the Horse: Identification of a Deletion in Myosin Va Responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS Genetics*, 6: e1000909.
- BROOKS S. A., LEART T. L., ADELSON D. L., BAILEY E. (2007): A chromosome inversion near the KIT gene and the Tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenetic and Genome Research*, 119: 225-230.
- BUDOWLE B., GAROFANO P., HELLMAN A., KETCHUM M., KANTHASWAMY S., PARSON W., VAN HAERINGEN W., FAIN S., BROAD T. (2005): Recommendations for animal DNA forensic and identity testing. *International Journal of Legal Medicine*, 119: 295-302.
- BUSTIN S. A., BENES V., GARSON J. A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFI M. W., SHIPLEY G. L., VANDESOMPELE J., WITTEWICZ C. T. (2009): The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55: 611-622.

- BOWLING A. (2001): Historical development and application of molecular genetic test for horse identification and parentage control. *Livestock Production Science*, 72: 111-116.
- CANIGLIA R., FABBRI E., GRECO C., GALAVERNI M., RANDI E. (2010): Forensic DNA against wildlife poaching: Identification of a serial wolf killing in Italy. *Forensic Science International: Genetics*, 4: 334-338.
- COLE J. B., (2007): PyPedal: A computer program for pedigree analysis. *Computers and Electronics in Agriculture*. 57: 107–113.
- CYRANOSKI D. (2015): Super-muscly pigs created by small genetic tweak. *Nature*, 523: 13-14.
- CZERNEKOVÁ V., KOTT T., MAJZLÍK I., (2013): Mitochondrial D-loop sequence variation among Hucul horse. *Czech Journal of Animal Science*, 58: 437-442.
- DE LEON P. M. M., CAMPOS V. F., DELLAGOSTIN O. A., DESCHAMPS J. C., SEIXAS F. K., COLLARES T. (2012): Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). *Theriogenology*, 77: 694-698.
- DIMSOSKI P. (2003): Development of a 17-plex Microsatellite Polymerase Chain Reaction Kit for Genotyping Horses. *Croatian Medical Journal*, 44: 332-335.
- DOBOSZ M., BOCCI C., BONUGLIA M., GRASSO C., MERIGIOLI S., RUSSO A., DE IULIIS P. (2010): Probabilistic Expert Systems for Forensic Inference from DNA Markers in Horses: Applications to Confirm Genealogies with Lack of Genetic Data. *Journal of Heredity*, 101: 240-245.
- DOSTÁL D., KONVIČKA M., ČIŽEK L., ŠÁLEK M., ROBOVSKÝ J., HORČIČKOVÁ E., JIRKŮ M. Divoký kůň (*Equus ferus*) a pratur (*Bos primigenius*): klíčové druhy pro formování české krajiny. Česká krajina, Kutná hora, 2014, 125
- DVOŘÁK J. (2008). Analýza zemědělského výzkumu v ČR. IN: Sb. ref. *Konference REDEM*, s. 15-20.
- EATON D., ARAMYAN M. (2010): Mangement of agricultural genetic resources. An institutional analysis of trends in the Netherlands. *Animal Genetic Resources*, 46. 91s.
- EGGEN A. (2010): Chip technology for use in genomic evaluation and new developments. *ICAR - Interbull Joint Session (Use of molecular genomic tools in animal breeding)*, Riga, Lotyšsko.
- FAN B., DU Z.-G., GORBACH D. M., MAX F. (2010): Development and Application of High-density SNP Arrays in Genomic Studies of Domestic Animals. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23: 833-847.
- FELSENSTEIN J. (2005): PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.*
- FORNAL A., RADKO A., PIETRZYŃSKA-KAJTOCH A. (2013): Genetic polymorphism of Hucul horse population based on 17 microsatellite loci. *Acta Biochimica Polonica*, 60: 761-765.
- FUTAS J. L., VYCHODILOVA L., HOFMANOVA B., VRANOVA M., PUTNOVA L., MUŽÍK J. VYSKOČIL M., VRTKOVA I., DUŠEK L., MAJZLIK I., HORIN P. (2012): Genomic analysis of resistance/susceptibility to melanoma in Old Kladruber horses. *Tissue Antigens*, 79: 247-248.
- GEORGESCU S. E., MANEA M. A., COSTACHE M. (2008): The genetic structure of indigenous Romanian Hucul horse breed inferred from microsatellite data. *Romanian Biotechnological Letters*, 13: 4030-4036.

- GLOWATZKI-MULLIS M. L., GAILLARD C., WIGGER G., FRIES R. (1995): Microsatellite-based parentage control in cattle. *Animal Genetics*, 26: 7-12.
- GUICHOUX E., LAGACHE L., WAGNER S., CHAUMEIL P., LÉGER P., LEPAIS O., LEPOITTEVIN C., MALAUSA T., REVARDEL E., SALIN F., PETIT R. J. (2011): Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11: 591-611.
- HAASE B., BROOKS S.A., TOZAKI T., BURGER D. PONCET P. A., RIEDER S., HASEGAWA T., PENEDO C. LEEB T. (2009): Seven novel KIT mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Animal Genetics*, 40: 623-629.
- HASLER H., FLURY C., MENET S., HAASE B., LEEB T., SIMIANER H., PONCET P. A., RIEDER S. (2011): Genetic diversity in an indigenous horse breed: implications for mating strategies and the control of future inbreeding. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 128: 394-406.
- HAUSWIRTH R., JUDE R., HAASE B., BELLONE R. R., ARCHER S., HOLL H., BROOKS S. A., TOZAKI T., PENEDO M. C., RIEDER S., LEEB T. (2013): Novel variants in the KIT and PAX3 genes in horses with white-spotted chat colour phenotypes. *Animal Genetics*, 44: 763-795.
- HEATH E. M., SHUMAN R. M. (2010): *Eluting reagents, methods and kits for isolating dna*. US7790865 B1.
- HILL E. W., GU J., EIVERS S. S., FONSECA R. G., MCGIVNEY B. A., GOVINDARAJAN P., ORR N., KATZ L. M., MACHUGH D. (2010): A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS ONE*, 5: e8645.
- HOFMANOVÁ B., KOHOUTOVÁ P., MAJZLÍK I., VOSTRÝ L., VOSTRÁ VYDROVÁ H. (2015): Analysis of factors influencing coat color intensity in Old Kladruber black horses. *In Book of Abstracts of the 66st Annual Meeting of the EAAP*. 1. vyd. Varšava, Poland: Wageningen Academic Publishers, s. 439.
- HOLL H., BROOKS S., BAILEY E., (2010): De novo mutation of KIT discovered as a result of a non-hereditary white coat colour pattern. *Animal Genetics*, 41: 196-198.
- CHEN J.-W., UBOH C. E., SOMA L. R., LI X., GUAN F., YOU Y., LIU Y. (2010a), Determining the Source of Equine Bloodstains by Dinucleotide Repeats. *Journal of Forensic Sciences*, 55: 1610-1614.
- CHEN J.-W., UBOH C. E., SOMA L. R., LI X., GUAN F., YOU Y., LIU Y. (2010b): Identification of racehorse and sample contamination by novel 24-plex STR system. *Forensic Science International: Genetics*, 4: 158-167.
- IYENGAR A., (2014): Forensic DNA analysis for animal protection and biodiversity conservation: A review. *Journal for Nature Conservation*, 22: 195.
- Jelínek, J. (2015): Ročenka ASCHHK za rok 2014. Zpravodaj ASCHHK, 19.1:14s.
- KETCHUM M. S. (2011): *Compositions methods and systems for the simultaneous determinativ of parentage, identity, sex, genotype, and/or phenotype and breed determination in animals*. US20110129825 A1.
- KONÍČKOVÁ N., VAVŘÍNOVÁ L., VALENTA O. (2010): Využíváme potenciál Česka v mezinárodní spolupráci ve výzkumu v oblasti zemědělství, potravin a biotechnologie. *ERGO*, 5: 3-8.
- KUSZA S., PRISKIN K., IVANKOVIC A., JEDRZEJEWSKA B., PODGORSKI T., JÁVOR A., MIHÓK S. (2013): Genetic characterization and population bottleneck in the Hucul horse based on microsatellite and mitochondrial data. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109: 54-65.

- KOURKOVÁ L., VRTKOVÁ I., DVOŘÁK J., (2009a): Monitoring the genetic variability in different horse populations from the Czech republic and the Netherlands. *In Book of Abstracts of the 60th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*, Barcelona, Spain: Wageningen Academic Publishers, s.174.
- KOURKOVÁ L., VRTKOVÁ I., ŠRUBAŘOVÁ P. (2009b): Microsatellite DNA analysis of genetic diversity in selected horse population. *Journal of Agrobiology*, 26: 57-60.
- LEROY G., CALLÈDE L., VERRIER E., MÉRIAUX J.-C., RICARD A., DANCHIN-BURGE C., ROGNON X. (2009): Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism. *Genetics Selection Evolution*, 41: 5.
- LEROY G., DANCHIN-BURGE S., PALHIÈRE I., SanCristobal M., NÉDÉLEC Y., VERRIER E., ROGNON X. (2015): How do introgression events shape the partitioning of diversity among breeds: a case study in sheep. *Genetics Selection Evolution*, 47: 48.
- LINDGREN G., BACKSTRÖM N., SWINBURNE J., HELLBORG L., ELNARSSON A., SANDBERG K. (2004): Limited number of patrilineages in horse domestication. *Nature Genetics*. 2004, 36: 335-336.
- LIPPOLD S., KNAPP M., KUZNETSOVA T., et al. (2011): Discovery of lost diversity of paternal horse lineages using ancient DNA. *Nature Communications*, 2: 450, doi: 10.1038/ncomms1447
- MACKOWSKI M., MUCHA S., CHOLEWINSKI G., CIESLAK J. (2015): Genetic diversity in Hucul and Polish primitive horse breeds. *Archives Animal Breeding*, 58: 23-31.
- MACLEAN E. (2010): New method for Fast and Easy Collection of High Quality DNA from nasal samples. *ICAR - Special Workshop WS2 - Manufactures Showcase*, Riga, Lotyšsko.
- MAGEE D. A., BERKOWICZ E. W., SIKORA K. M., SWEENEY T., KENNY D. A., KELLY A. K., EVANS R. D., WICKHAM B. W., BRADLEY D. G., SPILLANE C., MACHUGH D. E. (2010): High Concordance of Bovine Single Nucleotide Polymorphism Genotypes Generated Using Two Independent Genotyping Strategies. *Animal Biotechnology*, 21: 257-262.
- MAKI-TANILA A., TVEDT, M., W., EKSTRÖM, H., FIMLAND, E.(2008): Management and exchange of animal genetic resources - Nordic perspective. *TemaNord 2008*, 81 s.
- MARKLUND S., MOLLER M. J., SANDBERG K., ANDERSSON L. (1996): A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome*, 7: 895-899.
- MARŠÁLEK, M., (2015): A co na to čeští hipologové a chovatelé koní? *Jezdectví*. 5, s. 78
- MAU C., PONCET P. A., BUCHER B., STRANZINGER G., RIEDER S. (2004): Genetic mapping of dominant white (W), a homozygous lethal condition in the horse (*Eguus caballus*). *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 121: 374-383.
- MELNYK O., DZITSIUK V. (2013): Microsatellites of DNA in the preservation of genetic diversity of horses. *Stock raising of Ukraine*, 12: 7-10.
- METALLINOS D. L., BOWLING A. T., RINE J. (1998): A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung Disease. *Mammalian Genome*, 9: 426-431.
- MOON W. CH., LEE J. Y., PARK K. Y., SHIN J. S. (2009): *New skin sampling kit which stores nucleic acids in stable status, genetic test methods by using the kit and their practical application*. WO2009123373 A1.
- NEGRO, S., IMSLAND F., VALERA M., MOLINA A., SOLÉ M., ANDERSSON L. (2015): Association analysis of mutations in KIT and MITF genes with white markings in two

- horse breeds. *In Book of Abstracts of the 66st Annual Meeting of the EAAP*. 1. vyd. Varšava, Poland: Wageningen Academic Publishers, s. 436
- ORLANDI P. A., LAMPEL K. A. (2000): Extraction-free, filter-based template preparation for rapid and sensitive PCR detection of pathogenic parasitic protozoa. *Journal of Clinical Microbiology*, 38: 2271-2277.
- PARK, S., (2001). Microsatellite Toolkit. <http://oscar.gen.tcd.ie/sdepark/ms-toolkit>
- PATERSON T., LAW A. (2011): Genotypechecker: an interactive tool for checking the inheritance consistency of genotyped pedigrees. *Animal Genetics*, 42: 560-562.
- PEAKALL R., SMOUSE P. E. (2006): GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- PEELMAN L. J., MORTIAUX F., VAN ZEVEREN A., DANSERCOER A., MOMMENS G., COOPMAN F., BOUQUET Y., BURNY A., RENAVILLE R., PORTETELLE D. (1998): Evaluation of the genetic variability of 23 bovine microsatellite markers in four Belgian cattle breeds. *Animal Genetics*, 29: 161-167.
- PEREZ-FIGUEROA A., SAURA M., FERNÁNDEZ J., TORO M. A., CABALLERO A. (2009): METAPOPOP - a software for the management of subdivided populations in conservation programs. *Conservation Genetics*, 10: 1097-1099.
- PETERSDORF E. W., GUO Z., HOOD L. (2010): *Methods for haplotyping genomic DNA*. US 2010/0167295A1.
- PETERSON, B. K., WEBER, J. N., KAY, E. H., FISHER, H. S., & HOEKSTRA, H. E. (2012): Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for *De Novo* SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. *PLoS ONE*, 7(5), e37135. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- POLAK G. M. FORMAL A. (2015): Genetic characteristics of Sokolski and Sztumski horses based on microsatellite polymorphism. *In Book of Abstracts of the 66st Annual Meeting of the EAAP*. 1. vyd. Varšava, Poland: Wageningen Academic Publishers, s.436
- PRITCHARD J. K., STEPHENS M., DONNELLY P. (2000): Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-59.
- PUTNOVÁ L., VRTKOVÁ I., ŘÍHA J., BURÓCZIOVÁ M., DVOŘÁK J. (2006): The genetic structure of different horse breeds in the Czech Republic inferred from microsatellite markers. In: *Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics, 2006, Porto Seguro, Brazil*. Belo Horizonte, Brazil: CBRA, 2006. Section A: Polymorphism and Biodiversity, A378, 3.
- RANKINA B. W. (2010): Workforce development for forensic practitioners — The challenges and benefits of collaborative partnerships between universities and employers. *Science & Justice*, 50: 26-27.
- RENDO F., IRIONDO M., MANZANO C., ESTONBA A. (2011): Microsatellite based ovine parentage testing to identify the source responsible for the killing of an endangered species. *Forensic Science International: Genetics*, 5: 333-335.
- RIEDER S., TAOURIT S., MARIAT D., LANGLOIS B., GUÉRIN G. (2001): Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome*, 12: 450-455.
- RODRIGUES J. B., PRAZERES J., PEQUITO M., BARTOLOMÉ E., SANTOS A. S. (2015): Animal (at)traction in the 21st century, *In Book of Abstracts of the 66st Annual Meeting of the EAAP*. 1. vyd. Varšava, Poland: Wageningen Academic Publishers, s. 188

- ROSENGREN P. G., GOLOVKO A., SUNDSTRÖM E., CURIK I., LENNARTSSON J., SELTENHAMMER M. H., DRUML T., BINNS M., FITZSIMMONS C., LINDGREN G., SANDBERG K., BAUMUNG R., VETTERLEIN M., STRÖMBERG S., GRABHERR M., WADE C., LINDBLAD-TOH K., PONTÉN F., HELDIN C. H., SÖLKNER J., ANDERSSON L. (2008): A cis-acting regulatory mutation is causing premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature Genetics*, 40: 1004-1009.
- ROUSSET F. (2008): GENEPOP 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS T.: Molecular cloning: a laboratory manual. 2. vydání, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, xxxviii, 1989, 1 626 s.
- SCHNEIDER P. M. (2007): Scientific standards for studies in forensic genetics. *Forensic Science International*, 165: 238-243.
- SCHNEIDER S., ROESSLI D., EXCOFFIER L. (2000): ARLEQUIN: A Software for Population Genetics Data Analysis. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, Ženevská univerzita. Švýcarsko.
- SILVINA D., MARIANA E. K., EGLE E. V.-C., PENA N. L., MANGANARE M. M., POSIK D. PERAL-GARCÍA P., GIOVAMBATTISTA G. (2008): Substitution of Human for Horse Urine Disproves an Accusation of Doping. *Journal of Forensic Sciences*, 53: 1145-1148.
- STACHURSKA A., JANSEN P. (2015): Crypto-tobiano horses in Hucul breed. *Czech Journal of Animal Science*, 60: 1-9.
- SUDHAKAR M., PROKHOROVA A., HETZEL S., CORK W. *Selective isolation and concentration of nucleic acids from komplex samples*. US2007154903 A1.
- SUEZ M., BEHDENNA A., BROUILLET S., GRAÇA P., HIGUET D., ACHAZ G. (2015): MicNeSs: genotyping microsatellite loci from a collection of (NGS) reads. *Molecular Ecology Resources*. doi: 10.1111/1755-0998.12467
- TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. (2013): MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- TERRY R. B., ARCHER S., BROOKS S., BERNOCO D., BAILEY E. (2004): Assignment of the appaloosa coat colour gene (LP) to equine chromosome 1. *Animal Genetics*, 35: 134-137.
- TERRY R. R., BAILEY E., BERNOCO D., COTHRAN E.G. (2001): Linked markers exclude KIT as the gene responsible for appaloosa coat colour spotting patterns in horses. *Animal Genetics*, 32: 98-101.
- TERRY R.B., BAILEY E., LEAR T., COTHRAN E.G. (2002): Rejection of MITF and MGF as the genes responsible for appaloosa coat colour patterns in horses. *Animal Genetics*, 33: 82-84.
- TERRY R.B., BAILEY E., LEAR T., COTHRAN E.G., AUDIO I. KOHL S., LEROY B. P., MUNIER F. L., GUILLONNEAU X., MOHAND-SAID S., BUJAKOWSKA K., NANDROT E. F., LORENZ B., PREISING M., KELLNER U., RENNER A. B., BERND A., ANTONIO A., MOSKOVA-DOUMA V., LANCELOT M.-E., POLOSCHKE CH. M., DRUMARE I., DEFOORT-DHELLEM S., WISSINGER B., LÉVEILLARD T., HAMEL CH. P., SCHORDERET D. F., DE BAERE E., BERGER W., JACOBSON S. G., ZRENNER E., SAHEL J.-A., BHATTACHARYA S. S., ZEITZ CH. (2009): TRPM1 Is Mutated in Patients with Autosomal-Recessive Complete Congenital Stationary Night Blindness. *The American Journal of Human Genetics*, 85: 720-729.
- TOZAKI T., MASHIMA S., HIROTA K., MIURA N., CHOI-MIURA N. H., TOMITA M. (2001): Characterization of Equine Microsatellites and Microsatellite-Linked Repetitive

- Elements (eMLREs) by Efficient Cloning and Genotyping Methods. *DNA Research*, 8: 33-45.
- TRANDŽÍK J., ŽÍDEK R., JAKABOVÁ D., Buleca J., MASSÁNYI P., HAŠKO M., KOZLÍK P. (2006): Genetic diversity of Hucul horse, based on microsatellite data in Slovak Republic. www.raumberg-gumpenstein.at/...dagene.../2344-genetic-diversity-of-hucul-
- VAN DE GOOR L. H., KOSKINEN M. T., VAN HAERINGEN W. A. (2011a) Population studies of 16 bovine STR loci for forensic purposes. *International Journal of Legal Medicine*, 125: 111-9.
- VAN DE GOOR L. H., VAN HAERINGEN W. A., LENSTRA J. A. (2011b): Population studies of 17 equine STR for forensic and phylogenetic analysis. *Animal Genetics*, 42: 627-633.
- VAN DE GOOR L. H., PANNEMAN H., VAN HAERINGEN W. A. (2009a): A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle-specific short tandem repeat loci. *Animal Genetics*, 40: 630-636.
- VAN DE GOOR L. H., PANNEMAN H., VAN HAERINGEN W. A. (2009b): A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature of 17 equine-specific STR loci. *Animal Genetics*, 41: 122-7.
- VAN DE GOOR L. H., PANNEMAN H., VAN HAERINGEN W. A. (2010): A proposal for standardization in forensic bovine DNA typing: allele nomenclature of 16 cattle-specific short tandem repeat loci. *Animal Genetics*, 41:122-127.
- VANRADEN P., O'CONNELL J., WIGGANS G., WEIGEL K. (2010): Combining Different Marker Densities in Genomic Evaluation. *Interbull meeting*, Riga, Lotyšsko.
- VRTKOVÁ I., DVOŘÁK J. (2004): Určování genetických typů a ověřování paternity u koní. Informace pro chovatele koní. 500 ks. st.4
- VRTKOVÁ I., STEHLÍK, L., PUTNOVÁ, L., BARTOŇOVÁ, P. (2011): Cattle breed discrimination based on microsatellites markers. *In Book of Abstracts of the 62st Annual Meeting of the EAAP*. 1. vyd. Norway: Wageningen Academic Publishers, s. 408.
- VRTKOVÁ I., STEHLÍK L., PUTNOVÁ L., FUTAS. J. (2011): Predikce zbarvení, validace parentit a prezentace EFABIS u populace koní Kinských v ČR s využitím polymorfismů genomické DNA. *Mendelova univerzita Brno, VFU Brno, 2011. Metodika*
- WELLER J. I., GLICK G., EZRA E., ZERON Y., SEROUSSI E., RON M. (2010), Paternity validation and estimation of genotyping error rate for the BovineSNP50 BeadChip. *Animal Genetics*, 41: 551–553.
- WU Y. N., VAN BEUNINGEN M. G.(2009) *Method for detection and quantification of target nucleic acid in a sample*. USA2009/0117552A1.
- ZABEK T., FORMAL A. (2009): Evaluation of the 17-plex STR kit for parentage testing of polish coldblood and hucul horses. *Annals of Animal Science*, 9: 363-372.
- <http://huculclub.eu/html/zachranny.html>
- <http://colorgenetics.info/blogs/daylene-alford>
- <http://www.uky.edu/Ag/Horsemap/hgphorses.html>
- <http://www.horsegroomingsupplies.com>
- <http://www.horsetesting.com/CCalculator1.asp>

9. SEZNAM ZKRATEK

ASCLD/LAB	American Society of Crime Laboratory Directors / Laboratory Accreditation Board
CSNB	Congenital Stationary Night Blindness
DADIS	Domestic Animal Diversity Information System
EAAP	European Federation of Animal Science
EFABIS	European Farm Animal Biodiversity Information System
ETL	Economic trait locus
GLOBALDIV	A global view of livestock biodiversity and conservation
ICAR	International Committee for Animal Recording
ISAG	International Society of Animal Genetics
IUCN	International Union for Conservation of Nature
LAG	Laboratoř agrogenomiky
LFS	Lavender Foal Syndrome
LINE	Long Interspersed Nuclear Elements
OLWS	Overo Letal White Syndrom
SINE	Short Interspersed Nuclear Elements
STR	Short Tandem Repeat
SWGILD	Society for Wildlife Forensic Science
VGLForensics	The Veterinary Genetics Laboratory Forensic Unit
QTL	Quantitative Trait Locus

10.PŘÍLOHY

- Příloha č. 1 Logistika biologických vzorků
- Příloha č. 2 Struktura v MS u vybraných plemen koní
- Příloha č. 3 Využití genotypů predikce zbarvení v plemenitbě u populace koní Kinských v ČR
- Příloha č. 4 Mutace v genu *KIT* podmiňující depigmentaci u koní
- Příloha č. 5 Listy plemen kůň Kinský a huculský kůň z databáze EFABIS
- Příloha č. 6 Referenční údaje genotypů 17 MS 27 plemen koní chovaných v ČR

Příloha č. 1 Logistika biologických vzorků

objednání, odběr, značení, doručení, archivace a evidence biologických vzorků koní.

System získávání vzorků od chovatelů

Byla vytvořena objednávka pro odběr biologických vzorků na DNA analýzy, objednávka DNA testů pro určení genetického typu (DNA profilu) a ověřování původu, a objednávka genetické determinace zbarvení koní. Objednávka DNA analýz/DNA testů obsahuje kolonky k vyplnění informací o testovaném zvířeti, které je nutné uvádět na protokolech o výsledcích analýz z hlediska plemenářského zákona a podmínek akreditace laboratoře Českým akreditačním institutem. Dále obsahuje kolonky pro vyplnění informací potřebných k provedení ověření paternity a nabídku prováděných analýz, kde chovatel zaškrtně požadovaný test.

Tiskopisy objednávek:

Laboratoř agrogenomiky Mendelu v Brně Zemědělská 1 613 00 BRNO tel: Vrtková – 545 133 187 mobil: 607 753 219 e-mail: irenav@mendelu.cz	Objednávka DNA testů koní pro 1) ověření původu - určení genetického typu hříběte a matky 2) určení genetického typu hřebce zařazovaného do plemenitby Adresa chovatele: IČO: Telefonní číslo:.....
--	---

Laboratoř agrogenomiky Mendelu v Brně Zemědělská 1 613 00 BRNO Vrtková tel.: 545 133 187 mobil: 607 753 219 irenav@mendelu.cz	Objednávka DNA testů pro zbarvení koní Adresa chovatele: IČO: Telefonní číslo:.....
---	---

OZNAČTE POŽADOVANÝ TEST:

- | | |
|---------------------------|-----------------|
| 1. Extension – Red Factor | 6. Sabino |
| 2. Agouti | 7. Tobiano |
| 3. Cream | 8. Overo – OLWS |
| 4. Champagne | 9. Grey |
| 5. Silver | |

	Testovaný jedinec	Otec / Hřebec	Matka / Klisna
Číslo sáčku	Hříbě, klisna		
	jméno		
	číslo		
	datum narození		
	pohlaví		
	plemeno		
	barva		

Podpisem potvrzují správnost uvedených údajů.

Datum:
podpis

	Testovaný jedinec	Otec / Hřebec	Matka / Klisna
Číslo sáčku	Hříbě, klisna		
	jméno		
	číslo		
	datum narození		
	pohlaví		
	plemeno		

Podpisem potvrzují správnost uvedených údajů.

Datum:
podpis

Poznámky:

Způsob odběru vzorků

Jako nejvhodnější, neinvazivní a pro chovatele přátelský byl vyhodnocen odběr chlupových cibulek žíní z hřivy a/nebo ocasu koní.

V Laboratoři agrogenomiky byla v rámci disertace jako první v ČR zavedena analýza DNA z chlupových cibulek žíní. Tato forma biologického vzorku tak doplnila a postupně nahrazuje používané vzorky krve. Způsob odběru vzorků procházel vývojem. Byla zpracována první forma postupu/návodu pro odběr chlupových cibulek. Chovatelům byla posílána objednávka DNA testů a informace k odběru:

INFORMACE K ODBĚRU VZORKŮ CHLUPOVÝCH CIBULEK U KONÍ

Pro izolaci DNA a určení genetického typu jsou třeba chlupové cibulky.

Způsob jejich odběru:

Žíně nestříhejte, ale trhejte. DNA je obsažena v chlupových cibulkách.

Trhejte – nestříhejte – žíně z hřivy nebo ocasu koně.

Vytrhněte 15-20 žíní a vlepíte na níže označené místo.

Po vytržení žíně zkontrolujte, obsahují-li neporušené cibulky.

Číslo vzorku:

VLEPTE VZOREK

Zde přelepte lepicí páskou



Chlupové cibulky

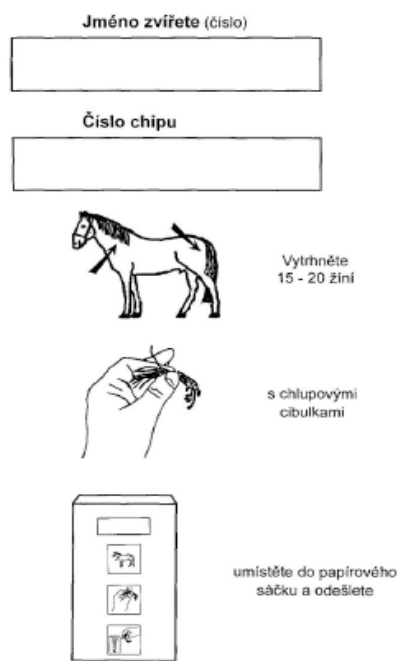


Přilíší dlouhé žíně přeložte

- papír přeložte a vložte do obálky
- přiložte vyplněnou objednávku na DNA test

Pro snadnější a příjemnější způsob odběru a archivaci chlupových cibulek byla vytvořena “odběrová sada”. Sada se skládá z obálky, na které je graficky znázorněn odběr vzorků a kolonek pro zapsání jména a čísla koně. Sada tak usnadňuje manipulaci se vzorky při jejich odběru a eliminuje záměnu vzorků.

Titulní list odběrového sáčku:



System evidence vzorků

Veškerá evidence vzorků doručených do laboratoře a výsledků analýz stanovených v laboratoři se dříve prováděla ručně, což bylo časově i fyzicky náročné. Začla práce na vytvoření databáze, která by evidenci automatizovala, zrychlila a minimalizovala chyby způsobené “lidským faktorem”. Při přípravě databáze bylo velmi důležité, jaké údaje budou do databáze vloženy – obsahová konstrukce databáze.

Ukázka databázového pole s údaji zadávanými při příjmu vzorku

Ukázka databázového pole pro zadávání analyzovaných genotypů

The screenshot shows a software window titled "editace satelitu". The main area contains a grid of 17 numbered input fields, each with a label: 1 ATH4, 2 ATH5, 3 HMS1, 4 HMS2, 5 HMS3, 6 HMS6, 7 HMS7, 8 HTG4, 9 HTG6, 10 HTG7, 11 THG10, 12 VHL20, 13 ASB2, 14 ASB17, 15 ASB23, 16 CA425, 17 LEX3. To the right is a panel titled "Genotypy zbarveni" with input fields for Extension, Agouti, Cream, Tobiano, Overo, and Grey. At the bottom center is an "OK" button, and at the bottom left is a text area labeled "poznámka".

Vytvořená funkční databáze pro efektivní práci s daty koní

Pro práci se získanými daty koní bylo vytvořeno databázové rozhraní.

K funkci programu je nutné mít na lokálním PC nainstalován a spuštěn SQL server Firebird v.

1.5.0.4306 nebo vyšší.

Software je distribuován ve dvou verzích – lokální a síťové. Lokální verze umožňuje práci s genotypovými daty koní pouze na lokální stanici. Síťová verze umožňuje vyhradit jeden počítač v lokální síti jako server a delegovat přístup pro ostatní stanice pracoviště. Pro toto řešení je vždy nutná úprava zdrojového kódu a překompilování uživatelských rozhraní s IP adresou serveru. V aktuálních verzích program vždy hledá předkompilovaný server, pokud jej nenajde, přepíná se do práce s lokální databází, což oznámí hlášením „připojen lokálně“ v záhlaví programového okna.

Funkce databázového rozhraní – sledování parentit, vyhledávání jednogenračních příbuzenských vztahů

Databázové rozhraní umožňuje efektivní práci s genotypovými daty koní. Následující výčet obsahuje základní funkce software a stručný návod k jejich provedení.

1. zadávání (tlačítko *New*) a editaci (tlačítko *Editace*) laboratorních identifikačních údajů a údajů poskytnutých chovateli,
2. zadávání a editaci laboratorně určených genotypů (tlačítko *Editace satelitů*),
3. tvorbu podvýběrů podle zadaných kritérií (vyplnění polí *jmeno*, *plemeno*, *narozeni*, *chovatel*, *otec_jmeno*, *pohlavi*, *lab_cislo* a zvolení tlačítka *Hledej*; podvýběr zrušíme tlačítkem *Obnoveni*; textové položky se vyhledávají jako neúplné řetězce (SQL like)),
4. spočítání základních charakteristik panelu MS markerů pro daný podvýběr/ celou databázi (aktualizuje se p o provedení podvýběru, tlačítkem *Kombinovane pravdepodob.* lze provést výpočet kombinovaných pravděpodobností pro vyloučení z rodičovství),
5. ověření paternity a jeho vizualizace na základě:
 - rodičů uvedených v příslušných kolonkách pro testovaného jedince (tlačítkem *Overeni* se spustí samotný test s vizuálním vyhodnocením lokusů, ve kterých nesouhlasí genotyp potomka s rodiči zapsanými u něj v kolonkách *OTEC_JMENO* a *MATKA_JMENO*, vypíše se výsledek testu),
 - testování pro potenciální skupiny rodičů vybraných z databáze (tlačítkem *smazat rodice* uvolníme aktuální set potenciálních matek a otců, tlačítka *otec+* a *matka+* přidáváme do setu potenciální rodiče tak, že se přidává vždy položka která je aktuálně zvolena v datové části programu (na obrázku hřelec BEEFEATER); po vyplnění možných rodičů je třeba jako aktuální položku zvolit testovaného jedince a zvolit tlačítko *overeni z vybranych*. Program se přepne do testovacího rozhraní, kde volíme možné rodičovské páry a k nim testujeme zvoleného potomka. Vždy se vypíše vizuální hodnocení testu. Pokud je test úspěšný, umožní software tisk protokolu o ověření paternity s úspěšně testovanými rodiči pro zvoleného potomka.),
6. tisk protokolů pro stanovení genetického typu (pro aktuálního jedince zvolíme tlačítko *Protokol*).
7. tisk protokolů pro ověření paternity (viz výše),
8. logování operací a bezpečný přístup na server (v databázi na serveru/lokální

stanici se veškeré operace výběrů a tisku protokolů logují pomocí IP adres hostů, databáze na serveru je delegovaná jen pro určité IP adresy).

The screenshot shows a web-based database interface for horses. The main window displays a table of horse records with columns: CÍLO, CÍLO_VRAB, KRABICA, Jméno, Pohlaví, Plemeno, Narození, and Chovatel. A 'výběr podskupiny' (subgroup selection) window is open, showing a list of horses with a red background. A 'uživatelská editace' (user edit) window is also open, displaying a pedigree chart. On the right, there are statistics for the selected group, including 'SAT', 'COUNT', and 'F-1' values. A 'tisk protokolů' (print protocols) button is visible. The interface is annotated with red arrows pointing to various features.

Grafický vzhled a obsah protokolů o analýze DNA (genetických typů) a osvědčení o ověření původu, certifikáty zbarvení

Podmínky pro obsah protokolů genetických typů a osvědčení o ověření původu jsou dány

vyhláškou č.448/2006 o provedení některých ustanovení plemenářského zákona 154/2000 Sb. (paragraf 21- podrobnosti o údajích na osvědčení o ověření původu a stanovení genetického typu) a normou ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 (kapitoly 5.10.2 - Protokoly o zkouškách, 5.10.5 - Odborná stanoviska a interpretace). Certifikáty genetické determinace zbarvení koní nepodléhají žádnému zákonu, ani vyhlášce, jejich design byl vytvořen na základě informací a diskuzí s chovateli koní. Certifikát zbarvení obsahuje také interpretaci stanoveného genotypu zbarvení.

Všechny protokoly o analýzách DNA byly vytvořeny i v anglickém jazyce, pro možnost jejich použití/využití v zahraničních laboratořích a při exportu koní.

Protokoly o analýze DNA/Stanovení genetického typu



Mendelova univerzita v Brně
 Laboratoř agrogenomiky
 Zkušební laboratoř č. L 1030 3 akreditovaná ČIA dle normy ČSN EN ISO/IEC 17025
 Zemědělská 1, 613 00 Brno, web: <http://www.lmgen.cz>
 Lab. code: CS/E



L 1030.3

PROTOKOL O ANALÝZE Osvědčení o stanovení genetického typu koně

Zákazník - majitel výsledků:

Číslo protokolu: K

Identifikace zvířete:

Jméno:

Ident. číslo:

Narození:

Plemeno:

Pohlaví:

Laboratorní číslo: K

Typ DNA:

Dotyčná příloha vzorku:

Zkušební metoda: SOP č. 1 Určení genotypů polymorfních lokusů DNA

Provedena dne:

Výsledek analýzy:

Genetický typ = DNA typ = genotypy mikrosatelitů

Identifikace rodičů:

Otec:

Matka:

AHT4		
AHT5		
HML1		
HML2		
HML3		
HML6		
HML7		
HTG4		
HTG6		

HTG7		
HTG10		
VEL20		
ABE1		
ABE17		
ABE23		
CA425		
LE3		


Interpretace stanoveného genetického typu: "základní testace", dle zákona č. 154/2000 Sb., v úplném znění (č. 344/2006 Sb.) a vyhlášky č. 448/2006 Sb.

Výsledky analýzy se vztahují ke zkoušenému vzorku. Protokol o analýze nesmí být bez písemného souhlasu laboratoře reprodukován jinak, než jako celek.

V Brně dne 19. 03. 2012

.....
 vedoucí Laboratoře
 agrogenomiky

Osvědčení o ověření původu

	Mendelova univerzita v Brně Laboratoř agrogenomiky Zemědělská 1, 613 00 Brno Lab. code: CS/B
LAG Mendelovy univerzity v Brně na základě zákona č. 154/2000 Sb. v úpřední změně (č. 344/2006 Sb.), vyhlášky č. 448/2006 S. a rozhodnutí MZe ČR čj.: 161815/01-7010 vydává	
Osvědčení o ověření původu koně	
<u>Potomek</u>	
jméno:	
číslo:	
datum narození:	
pohlaví:	
plemeno:	
lab. číslo: K	
zdroj DNA:	
<u>Otec</u>	<u>Matka</u>
jméno:	jméno:
číslo:	číslo:
plemeno:	plemeno:
lab. číslo: K	lab. číslo: K
Výsledky ověření původu:	
„Původ souhlasí s uvedenými rodiči“	
V Brně dne 19.3.2012	
1/1	vedoucí Laboratoře agrogenomiky

Certifikát zbarvení

Certifikát

ZBARVENÍ KONĚ No: 49 , 340/11

jméno koně : GENTLE DUN IT ANGEL

číslo :
plemeno : Paint Horse

pohlaví : klisna
dat.naroz. : 05.05.2011

majitel /chovatel: Jiří Orság , Karolinka

Laboratoř aplikované molekulární genetiky - LAMGen
tvrdí určené DNA alely a stanovený genotyp pro TOBIANO

TOBIANO : HOMOZYGOT -- genotyp: TO/TO

datum : 21.06.2011

autorizovaný podpis- LAMGen s.r.o.



Příloha č.2 Struktura v MS u vybraných plemen koní

Vnitropopulační diverzita u plemene achaltekinský kůň

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
179	<i>AHT4</i>	6	2,528	0,630	0,604	-0,042	0,559	ns
	<i>AHT5</i>	5	3,352	0,723	0,702	-0,030	0,647	ns
	<i>HMS1</i>	4	2,376	0,598	0,579	-0,032	0,527	ns
	<i>HMS2</i>	8	4,912	0,761	0,796	0,045	0,769	ns
	<i>HMS3</i>	6	3,817	0,755	0,738	-0,023	0,702	ns
	<i>HMS6</i>	6	3,141	0,690	0,682	-0,013	0,628	ns
	<i>HMS7</i>	7	3,999	0,724	0,750	0,035	0,719	ns
	<i>HTG4</i>	5	1,491	0,341	0,329	-0,036	0,314	ns
	<i>HTG6</i>	5	2,797	0,687	0,642	-0,069	0,584	***
	<i>HTG7</i>	3	1,721	0,423	0,419	-0,010	0,359	**
	<i>HTG10</i>	7	3,154	0,699	0,683	-0,023	0,640	ns
	<i>VHL20</i>	9	5,265	0,839	0,810	-0,036	0,785	ns
	<i>ASB2</i>	9	5,872	0,824	0,830	0,007	0,808	ns
	<i>ASB17</i>	9	4,779	0,844	0,791	-0,068	0,762	ns
	<i>ASB23</i>	7	3,611	0,824	0,723	-0,140	0,682	ns
	<i>CA425</i>	4	3,359	0,724	0,702	-0,031	0,647	ns
	<i>LEX3</i>	8	5,665	0,477	0,823	0,421	0,802	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfní informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene paint horse

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
327	<i>AHT4</i>	9	3,804	0,714	0,737	0,031	0,690	ns
	<i>AHT5</i>	7	3,512	0,716	0,715	-0,001	0,672	ns
	<i>HMS1</i>	7	2,695	0,639	0,629	-0,016	0,574	ns
	<i>HMS2</i>	9	4,228	0,797	0,763	-0,043	0,733	ns
	<i>HMS3</i>	7	5,264	0,880	0,810	-0,086	0,783	**
	<i>HMS6</i>	7	2,796	0,640	0,642	0,004	0,597	***
	<i>HMS7</i>	8	5,073	0,788	0,803	0,018	0,773	ns
	<i>HTG4</i>	7	3,194	0,701	0,687	-0,021	0,636	ns
	<i>HTG6</i>	8	2,985	0,659	0,665	0,009	0,608	ns
	<i>HTG7</i>	5	2,803	0,623	0,643	0,032	0,587	ns
	<i>HTG10</i>	10	5,126	0,870	0,805	-0,081	0,777	**
	<i>VHL20</i>	9	6,209	0,860	0,839	-0,025	0,819	ns
	<i>ASB2</i>	12	6,115	0,825	0,836	0,014	0,816	ns
	<i>ASB17</i>	15	5,211	0,799	0,808	0,012	0,784	ns
	<i>ASB23</i>	10	5,319	0,922	0,812	-0,136	0,785	ns
	<i>CA425</i>	11	2,752	0,645	0,637	-0,012	0,600	***
	<i>LEX3</i>	9	7,021	0,457	0,858	0,467	0,842	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfní informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene appaloosa

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
145	<i>AHT4</i>	9	3,831	0,781	0,739	-0,057	0,698	ns
	<i>AHT5</i>	8	3,683	0,749	0,729	-0,028	0,688	ns
	<i>HMS1</i>	7	2,474	0,603	0,596	-0,012	0,534	***
	<i>HMS2</i>	9	4,144	0,774	0,759	-0,021	0,724	ns
	<i>HMS3</i>	7	4,629	0,861	0,784	-0,098	0,751	**
	<i>HMS6</i>	6	3,366	0,784	0,703	-0,116	0,661	ns
	<i>HMS7</i>	7	4,516	0,809	0,779	-0,039	0,746	***
	<i>HTG4</i>	7	2,833	0,689	0,647	-0,065	0,605	ns
	<i>HTG6</i>	7	3,156	0,682	0,683	0,002	0,622	***
	<i>HTG7</i>	5	3,326	0,681	0,699	0,026	0,649	ns
	<i>HTG10</i>	10	5,859	0,878	0,829	-0,058	0,807	ns
	<i>VHL20</i>	10	4,971	0,841	0,799	-0,053	0,770	ns
	<i>ASB2</i>	11	5,845	0,878	0,829	-0,059	0,808	ns
	<i>ASB17</i>	13	4,480	0,775	0,777	0,003	0,752	ns
	<i>ASB23</i>	8	5,473	0,964	0,817	-0,18	0,792	ns
	<i>CA425</i>	7	2,944	0,675	0,66	-0,023	0,625	ns
	<i>LEX3</i>	10	7,293	0,511	0,863	0,408	0,848	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfní informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene quarter horse

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
418	<i>AHT4</i>	9	3,885	0,772	0,743	-0,04	0,703	ns
	<i>AHT5</i>	7	4,536	0,746	0,78	0,042	0,748	ns
	<i>HMS1</i>	7	2,467	0,547	0,595	0,079	0,543	ns
	<i>HMS2</i>	8	4,423	0,784	0,774	-0,013	0,742	ns
	<i>HMS3</i>	7	5,737	0,902	0,826	-0,092	0,802	***
	<i>HMS6</i>	7	3,161	0,710	0,684	-0,039	0,634	***
	<i>HMS7</i>	8	3,899	0,738	0,744	0,008	0,710	ns
	<i>HTG4</i>	6	2,892	0,655	0,654	-0,002	0,621	*
	<i>HTG6</i>	8	3,409	0,715	0,707	-0,012	0,653	ns
	<i>HTG7</i>	5	3,057	0,585	0,673	0,131	0,619	ns
	<i>HTG10</i>	10	5,824	0,835	0,828	-0,008	0,807	*
	<i>VHL20</i>	9	5,427	0,785	0,816	0,038	0,790	ns
	<i>ASB2</i>	10	4,868	0,821	0,795	-0,033	0,767	ns
	<i>ASB17</i>	13	5,505	0,789	0,818	0,036	0,797	ns
	<i>ASB23</i>	8	5,270	0,922	0,81	-0,138	0,784	***
	<i>CA425</i>	10	3,341	0,705	0,701	-0,007	0,676	ns
	<i>LEX3</i>	8	5,222	0,354	0,809	0,562	0,786	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfní informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene slovenský teplokrevník

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
1659	<i>AHT4</i>	10	3,861	0,745	0,741	-0,006	0,696	ns
	<i>AHT5</i>	7	4,777	0,798	0,791	-0,009	0,759	ns
	<i>HMS1</i>	7	2,656	0,617	0,623	0,010	0,554	ns
	<i>HMS2</i>	9	4,153	0,757	0,759	0,003	0,724	ns
	<i>HMS3</i>	9	5,266	0,894	0,810	-0,103	0,784	***
	<i>HMS6</i>	7	3,193	0,699	0,687	-0,018	0,646	***
	<i>HMS7</i>	7	5,036	0,768	0,801	0,041	0,773	ns
	<i>HTG4</i>	9	2,503	0,596	0,600	0,007	0,520	***
	<i>HTG6</i>	8	3,940	0,75	0,746	-0,005	0,703	ns
	<i>HTG7</i>	6	3,220	0,709	0,689	-0,029	0,630	***
	<i>HTG10</i>	11	5,497	0,852	0,818	-0,042	0,795	***
	<i>VHL20</i>	9	5,118	0,820	0,805	-0,020	0,778	***
	<i>ASB2</i>	11	5,586	0,839	0,821	-0,022	0,798	***
	<i>ASB17</i>	15	5,077	0,823	0,803	-0,025	0,777	***
	<i>ASB23</i>	8	5,248	0,885	0,809	-0,093	0,782	***
	<i>CA425</i>	10	3,087	0,674	0,676	0,003	0,640	ns
	<i>LEX3</i>	10	6,265	0,505	0,840	0,399	0,821	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfní informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene český teplokrevník

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
3489	<i>AHT4</i>	10	3,800	0,738	0,737	-0.001	0,690	ns
	<i>AHT5</i>	8	4,784	0,800	0,791	-0.011	0,758	ns
	<i>HMS1</i>	7	2,580	0,615	0,612	-0.005	0,539	ns
	<i>HMS2</i>	11	4,003	0,749	0,750	0.001	0,715	***
	<i>HMS3</i>	9	5,344	0,889	0,813	-0.094	0,788	***
	<i>HMS6</i>	7	3,155	0,676	0,683	0.010	0,640	***
	<i>HMS7</i>	8	4,912	0,784	0,796	0.016	0,768	ns
	<i>HTG4</i>	8	2,696	0,623	0,629	0.010	0,559	ns
	<i>HTG6</i>	11	3,973	0,737	0,748	0.015	0,707	***
	<i>HTG7</i>	7	2,911	0,664	0,656	-0.012	0,602	***
	<i>HTG10</i>	12	6,188	0,858	0,838	-0.023	0,819	ns
	<i>VHL20</i>	10	5,407	0,818	0,815	-0.004	0,791	***
	<i>ASB2</i>	13	5,765	0,812	0,827	0.017	0,805	***
	<i>ASB17</i>	15	5,057	0,786	0,802	0.020	0,779	ns
	<i>ASB23</i>	13	5,835	0,865	0,829	-0.044	0,806	***
	<i>CA425</i>	11	3,214	0,687	0,689	0.003	0,652	ns
	<i>LEX3</i>	11	6,118	0,526	0,837	0.371	0,816	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfní informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene českomoravský belgický kůň

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
111	<i>AHT4</i>	8	4,97	0,829	0,799	-0,038	0,771	ns
	<i>AHT5</i>	7	3,809	0,741	0,737	-0,004	0,697	**
	<i>HMS1</i>	4	1,749	0,486	0,428	-0,136	0,380	ns
	<i>HMS2</i>	8	3,302	0,734	0,697	-0,053	0,662	ns
	<i>HMS3</i>	7	3,78	0,839	0,735	-0,141	0,702	ns
	<i>HMS6</i>	5	3,25	0,739	0,692	-0,067	0,642	ns
	<i>HMS7</i>	5	3,62	0,636	0,724	0,121	0,676	ns
	<i>HTG4</i>	5	3,927	0,755	0,745	-0,012	0,699	ns
	<i>HTG6</i>	4	1,454	0,333	0,312	-0,068	0,291	ns
	<i>HTG7</i>	4	3,247	0,776	0,692	-0,121	0,643	ns
	<i>HTG10</i>	10	5,713	0,892	0,825	-0,081	0,805	ns
	<i>VHL20</i>	9	4,716	0,793	0,788	-0,006	0,763	**
	<i>ASB2</i>	9	2,725	0,640	0,633	-0,010	0,590	***
	<i>ASB17</i>	11	8,069	0,923	0,876	-0,054	0,864	ns
	<i>ASB23</i>	5	3,567	0,771	0,720	-0,071	0,671	ns
	<i>CA425</i>	8	3,549	0,731	0,718	-0,018	0,683	ns
	<i>LEX3</i>	9	6,629	0,404	0,849	0,524	0,831	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfní informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene fjord

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
193	<i>AHT4</i>	7	4,263	0,764	0,765	0,001	0,734	ns
	<i>AHT5</i>	6	2,852	0,695	0,649	-0,07	0,584	ns
	<i>HMS1</i>	6	4,545	0,751	0,780	0,037	0,745	ns
	<i>HMS2</i>	5	3,068	0,624	0,674	0,074	0,623	ns
	<i>HMS3</i>	6	3,565	0,818	0,720	-0,137	0,684	**
	<i>HMS6</i>	6	4,161	0,784	0,760	-0,032	0,724	ns
	<i>HMS7</i>	6	2,287	0,511	0,563	0,092	0,504	ns
	<i>HTG4</i>	5	3,201	0,788	0,688	-0,147	0,634	***
	<i>HTG6</i>	6	1,114	0,095	0,102	0,067	0,100	***
	<i>HTG7</i>	4	2,340	0,624	0,573	-0,090	0,507	ns
	<i>HTG10</i>	9	4,300	0,807	0,767	-0,052	0,730	**
	<i>VHL20</i>	8	3,088	0,702	0,676	-0,037	0,635	***
	<i>ASB2</i>	10	5,048	0,810	0,802	-0,009	0,779	*
	<i>ASB17</i>	11	5,123	0,828	0,805	-0,029	0,780	***
	<i>ASB23</i>	9	4,378	0,901	0,772	-0,167	0,736	***
	<i>CA425</i>	6	2,956	0,742	0,662	-0,121	0,595	ns
	<i>LEX3</i>	8	5,53	0,551	0,819	0,327	0,795	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfní informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene huculský kůň

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
473	<i>AHT4</i>	11	6,399	0,838	0,844	0,007	0,825	ns
	<i>AHT5</i>	7	5,000	0,774	0,800	0,033	0,772	ns
	<i>HMS1</i>	7	2,742	0,599	0,635	0,058	0,599	ns
	<i>HMS2</i>	9	4,618	0,787	0,783	-0,004	0,748	ns
	<i>HMS3</i>	8	5,174	0,870	0,807	-0,079	0,779	***
	<i>HMS6</i>	6	3,147	0,710	0,682	-0,040	0,646	ns
	<i>HMS7</i>	7	2,762	0,608	0,638	0,047	0,579	ns
	<i>HTG4</i>	6	3,986	0,788	0,749	-0,051	0,706	ns
	<i>HTG6</i>	8	2,241	0,539	0,554	0,027	0,518	ns
	<i>HTG7</i>	5	2,554	0,588	0,608	0,034	0,530	***
	<i>HTG10</i>	10	3,808	0,782	0,737	-0,061	0,713	*
	<i>VHL20</i>	10	6,945	0,844	0,856	0,014	0,840	*
	<i>ASB2</i>	10	4,651	0,803	0,785	-0,022	0,758	**
	<i>ASB17</i>	14	5,802	0,764	0,828	0,077	0,808	***
	<i>ASB23</i>	10	5,593	0,911	0,821	-0,110	0,798	**
	<i>CA425</i>	11	5,086	0,822	0,803	-0,023	0,777	***
	<i>LEX3</i>	9	4,528	0,521	0,779	0,332	0,756	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfni informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene kůň Kinský

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
95	<i>AHT4</i>	6	3,547	0,71	0,718	0,012	0,667	ns
	<i>AHT5</i>	5	4,61	0,791	0,783	-0,01	0,748	ns
	<i>HMS1</i>	5	2,457	0,634	0,593	-0,07	0,516	ns
	<i>HMS2</i>	6	3,301	0,753	0,697	-0,08	0,653	ns
	<i>HMS3</i>	7	4,808	0,762	0,792	0,038	0,761	ns
	<i>HMS6</i>	5	2,628	0,606	0,619	0,021	0,578	ns
	<i>HMS7</i>	7	4,62	0,755	0,784	0,036	0,750	ns
	<i>HTG4</i>	5	2,59	0,617	0,614	-0,005	0,538	ns
	<i>HTG6</i>	7	3,205	0,66	0,688	0,041	0,645	ns
	<i>HTG7</i>	4	2,588	0,631	0,614	-0,028	0,565	ns
	<i>HTG10</i>	9	4,75	0,815	0,789	-0,033	0,760	ns
	<i>VHL20</i>	9	4,09	0,851	0,755	-0,127	0,714	***
	<i>ASB2</i>	9	3,804	0,72	0,737	0,023	0,703	ns
	<i>ASB17</i>	10	6,357	0,899	0,843	-0,067	0,824	ns
	<i>ASB23</i>	6	4,45	0,809	0,775	-0,043	0,741	ns
	<i>CA425</i>	7	2,253	0,589	0,556	-0,059	0,532	ns
	<i>LEX3</i>	9	4,57	0,489	0,781	0,374	0,751	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfni informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene shetlandský pony

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
136	<i>AHT4</i>	7	3,462	0,721	0,711	-0,013	0,667	ns
	<i>AHT5</i>	7	3,777	0,756	0,735	-0,028	0,706	ns
	<i>HMS1</i>	6	3,571	0,677	0,720	0,060	0,674	***
	<i>HMS2</i>	8	3,668	0,700	0,727	0,038	0,684	ns
	<i>HMS3</i>	4	3,011	0,789	0,668	-0,181	0,613	ns
	<i>HMS6</i>	7	3,439	0,721	0,709	-0,016	0,661	ns
	<i>HMS7</i>	8	3,267	0,615	0,694	0,114	0,652	***
	<i>HTG4</i>	6	1,853	0,452	0,46	0,019	0,436	ns
	<i>HTG6</i>	6	2,532	0,603	0,605	0,003	0,551	ns
	<i>HTG7</i>	4	2,093	0,504	0,522	0,035	0,488	ns
	<i>HTG10</i>	10	4,466	0,805	0,776	-0,037	0,745	*
	<i>VHL20</i>	10	4,043	0,743	0,753	0,013	0,713	ns
	<i>ASB2</i>	7	4,500	0,806	0,778	-0,037	0,743	ns
	<i>ASB17</i>	13	3,324	0,659	0,699	0,058	0,653	ns
	<i>ASB23</i>	6	5,109	0,853	0,804	-0,061	0,777	ns
	<i>CA425</i>	10	5,76	0,813	0,826	0,016	0,809	ns
	<i>LEX3</i>	9	3,526	0,344	0,716	0,520	0,692	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfni informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene slezský norik

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
177	<i>AHT4</i>	8	4,880	0,800	0,795	-0,006	0,766	ns
	<i>AHT5</i>	8	3,903	0,747	0,744	-0,004	0,711	ns
	<i>HMS1</i>	7	2,831	0,653	0,647	-0,01	0,581	ns
	<i>HMS2</i>	8	3,634	0,756	0,725	-0,043	0,685	ns
	<i>HMS3</i>	7	3,362	0,885	0,703	-0,259	0,668	**
	<i>HMS6</i>	6	3,160	0,688	0,684	-0,006	0,625	ns
	<i>HMS7</i>	6	4,825	0,741	0,793	0,065	0,763	*
	<i>HTG4</i>	6	2,879	0,642	0,653	0,016	0,588	ns
	<i>HTG6</i>	5	1,859	0,443	0,462	0,041	0,416	ns
	<i>HTG7</i>	4	3,303	0,738	0,697	-0,059	0,644	ns
	<i>HTG10</i>	9	2,869	0,682	0,651	-0,046	0,618	ns
	<i>VHL20</i>	9	4,835	0,818	0,793	-0,032	0,770	ns
	<i>ASB2</i>	8	4,135	0,868	0,758	-0,145	0,727	ns
	<i>ASB17</i>	14	6,748	0,89	0,852	-0,044	0,835	ns
	<i>ASB23</i>	6	4,297	0,848	0,767	-0,105	0,731	ns
	<i>CA425</i>	6	3,143	0,717	0,682	-0,052	0,629	ns
	<i>LEX3</i>	12	7,462	0,608	0,866	0,298	0,853	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfni informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Vnitropopulační diverzita u plemene starokladrubský kůň

n	MS	Na	Ne	Ho	He	F	PIC	ChiSq HW
280	AHT4	7	4,879	0,793	0,795	0,003	0,768	***
	AHT5	6	3,742	0,702	0,733	0,042	0,692	ns
	HMS1	4	2,153	0,539	0,535	-0,007	0,459	ns
	HMS2	6	3,511	0,751	0,715	-0,050	0,666	ns
	HMS3	7	3,629	0,780	0,724	-0,077	0,692	ns
	HMS6	6	3,189	0,693	0,686	-0,009	0,629	ns
	HMS7	6	3,592	0,704	0,722	0,025	0,684	**
	HTG4	5	4,349	0,707	0,770	0,082	0,734	*
	HTG6	5	2,036	0,518	0,509	-0,018	0,480	ns
	HTG7	4	1,873	0,408	0,466	0,125	0,423	***
	HTG10	9	2,922	0,702	0,658	-0,068	0,626	ns
	VHL20	7	6,261	0,810	0,840	0,036	0,821	***
	ASB2	6	5,064	0,795	0,803	0,009	0,773	ns
	ASB17	10	4,126	0,746	0,758	0,015	0,730	***
	ASB23	8	4,296	0,780	0,767	-0,017	0,731	ns
	CA425	5	2,425	0,616	0,588	-0,049	0,541	**
	LEX3	6	2,646	0,471	0,622	0,243	0,574	***

n= počet zvířat, Na = počet alel, Ne = počet efektivních alel, Ho = skutečná heterozygotnost, He = očekávaná heterozygotnost, F = fixační index, PIC = polymorfni informační obsah, ns=not significant, * P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001

Příloha č. 3 Využití genotypů predikce zbarvení v plemenitbě u populace koní Kinských v ČR

Jedním z cílů šlechtitelského programu koní Kinských je dosáhnout převažujícího zbarvení isabela a plavák. Koně zapsaní do hlavní plemenné knihy a plemenné knihy barvy isabela a plavák mohou používat přídomek Kinský.

Zbarvení koní isabela a plavák ovlivňují geny *ASIP*, *MC1R* a *MATP*:

***ASIP* (lokus Agouti)** – alela *A* omezuje ukládání černého pigmentu, eumelaninu, do okrajových částí těla. Alela *a*, způsobuje rovnoměrné rozložení eumelaninu po těle.

***MC1R* (lokus Extension)** – alela *E* řídí tvorbu černého pigmentu, eumelaninu, a jeho ukládání do chlupů. Alela *e* způsobuje, že chlupy obsahují pouze červený pigment, pheomelanin.

***MATP* (lokus Cream)** – alela *C* se podílí na tvorbě pigmentů. Alela *Cr* způsobuje, že chlupy i kůže obsahují méně pigmentů – tzv. zředění barvy.

V rámci disertace byla vypracována metodika predikce zbarvení u populace koní Kinských v ČR. Je zaměřena na využití plemenných hřebců KK pro získání potomků s genotypy *CCr* v genu *MATP* (loku Cream). Tento genotyp je podmínkou pro zbarvení isabela (*A-/aa, ee, CCr*) a plavák (*A-, E-, CCr*).

Kombinace genotypů v genech *ASIP*, *MC1R* a *MATP* pro výsledný fenotyp zbarvení koně

Fenotyp zbarvení	Genotyp zbarvení		
	<i>MC1R</i>	<i>ASIP</i>	<i>MATP</i>
Vraník	<i>EE</i> nebo <i>Ee</i>	<i>aa</i>	<i>CC</i>
Hnědáček	<i>EE</i> nebo <i>Ee</i>	<i>AA</i> nebo <i>Aa</i>	<i>CC</i>
Ryzák	<i>ee</i>	<i>AA, Aa</i> nebo <i>aa</i>	<i>CC</i>
Smoky black	<i>EE</i> nebo <i>Ee</i>	<i>aa</i>	<i>CCr</i>
Plavák	<i>EE</i> nebo <i>Ee</i>	<i>AA</i> nebo <i>Aa</i>	<i>CCr</i>
Isabela/Palomino	<i>ee</i>	<i>AA, Aa</i> nebo <i>aa</i>	<i>CCr</i>
Smoky cream	<i>EE</i> nebo <i>Ee</i>	<i>aa</i>	<i>CrCr</i>
Perlino	<i>EE</i> nebo <i>Ee</i>	<i>AA</i> nebo <i>Aa</i>	<i>CrCr</i>
Cremello	<i>ee</i>	<i>AA, Aa</i> nebo <i>aa</i>	<i>CrCr</i>

Příloha č. 4 Mutace v genu *KIT* podmiňující depigmentaci u koní

Chromozom	Referenční alela	Mutovaná alela	Pozice v genu	Plemeno
3	A	C	5'-UTR	QH,AP,IS,TR
3	T	A	intron 1	IS
3	A	C	exon 2	QH,AP
3	A	C	exon 2	QH
3	C	G	intron 2	white TB
3	TCTGC	-	exon 3	white TB
3	G	T	intron 3	QH
3	G	A	intron 3	AP,QH
3	T	A	exon 4	white TB
3	C	T	exon 5	white TB
3	G	A	intron 5	QH, AV, LW, QH145
3	-	ATGAATGAA	intron 5	všechna plemena
3	G	C	intron 5	ALH, AV
3	A	C	intron 6	AV, IS, LW, TB
3	GTTC	-	exon 7	white/spotted QH
3	T	C	exon 7	AV,ALH
3	C	T	intron 7	QH
3	T	C	exon 8	AV
3	C	T	intron 8	SW023
3	A	G	exon 10	AV
3	C	T	exon 12	HS
3	G	A	exon 12	CW
3	G	A	intron 12	AP,QH,TR
3	G	A	exon 13	QH
3	C	T	exon 13	white TB
3	T	C	intron 13	IS,LW,TB
3	A	C	intron 13	QH
3	T	C	intron 13	AV, DR
3	C	-	intron 13	AV, IS, LW, TB
3	T	A	exon 14	JD
3	A	G	exon 14	JD
3	C	T	exon 14	L,WP,QH, AP, ALH, NO, OT, GV, MG, CD, FM, IM, SI
3	T	G	exon 14	AP,IS,QH
3	G	C	exon 15	white FM
3	G	A	exon 15	DR018, TB
3	C	-	exon 15	TB
3	C	G	intron 15	ALH,
3	C	T	intron 15	AP,IS,QH
3	12 bp	-	intron 15	QH
3	C	T	intron 15	AP,QH,TR,TB,OL,HN
3	C	T	intron 15	IS
3	C	T	exon 16	AP,QH,TR
3	T	C	intron 16	AP,QH,TR
3	T	A	intron 16	IS,QH
3	C	A	intron 16	AP,QH
3	A	T	intron 16	AP,QH
3	G	-	exon 17	IS074
3	54 bp	-	exon 17	TB
3	C	G	intron 17	QH (QHxPP)
3	T	C	intron 17	AP,QH,TR

Chromozom	Referenční alela	Mutovaná alela	Pozice v genu	Plemeno
3	<i>T</i>	<i>C</i>	intron 17	AP,QH,TR
3	<i>T</i>	<i>C</i>	intron 17	AP,QH,TR
3	<i>T</i>	<i>A</i>	exon 18	OL
3	<i>G</i>	<i>A</i>	exon 19	
3	<i>C</i>	<i>T</i>	intron 19	SD
3	<i>T</i>	<i>C</i>	intron 19	IS,QH
3	<i>G</i>	<i>A</i>	exon 20	AP,IS,QH,TR
3	<i>T</i>	<i>C</i>	exon 20	AV,IS,LW,TR
3	<i>G</i>	<i>C</i>	intron 20	AP,IS,QH,TR
3	<i>C</i>	<i>T</i>	exon 21	AP,IS,QH
3	<i>C</i>	<i>T</i>	3'-flanking	IS,QH
3	<i>G</i>	<i>A</i>	3'-flanking	ALH,AV,DR,IS,QH,WMP
3	<i>C</i>	<i>T</i>	3'-flanking	AV, WMP
3	<i>G</i>	<i>A</i>	3'-flanking	AP,IS,QH,TR

ALH: Appaloosa		
AP: American Painthorse, double registrations with QH		
AS: American Standardbred		
AV: Arabian Horse		
CD: Clydesdale		
CR: various European Warmbloods		
CW: Camarillo White Horse		
DR: German Riding Pony		
DW: German Warmblood		
FM: Franches-Montagnes		
GV: Gipsy Vanner		
HF: Haflinger		
HN: Hanoverian		
IM: Indian Marwari		
IS: Icelandic Horse		
JD: Japanese Draft		
KS: Knabstrupper		
LW: Lewitzer		
MG: Morgan Horse		

Hauswirth et al. (2013)

Fenotypy zbarvení zapsané v plemenné knize hřebců koní Kinských a stanovené genotypy zbarvení plemenných hřebců KK licentovaných pro připouštěcí sezónu 2011 (2012)

HŘEBEC	GENOTYP ZBARVENÍ	FENOTYP podle stanoveného genotypu	ZBARVENÍ – FENOTYP zapsaný v PK
718 MINERAL	<i>AA, ee, CCr</i>	isabela	žluťák
2810 MISTRÁL	<i>AA, ee, CCr</i>	isabela	žluťák
1465 DRAK	<i>AA, ee, CCr</i>	isabela	nenalezen
1159 SINUHET-K	<i>AA, ee, CCr</i>	isabela	isabela
1244 ČESARION KINSKÝ	<i>AA, ee, CCr</i>	isabela	isabela
1464 MILAN	<i>Aa, ee, CCr</i>	isabela	isabela
1245 SARKON KINSKÝ	<i>Aa, Ee, CCr</i>	plavák	plavák
918 ALOIS	<i>Aa, Ee, CCr</i>	plavák	zlatý plavák
1602 ASIO ZDELOVSKÝ	<i>Aa, Ee, CCr</i>	plavák	plavák
296 ALMHIRT CHLUMECKÝ	<i>aa, Ee, CCr</i>	smoky black	černý ryzák, dle potomků černý plavák
1463 DUBEL	<i>Aa, Ee, CrCr</i>	perlino	pseudoalbín
1603 PRZEDSWIT CHAMÍR	<i>AA, ee, CC</i>	ryzák	nenalezen
1615 GIN FIZZ	<i>AA, ee, CC</i>	ryzák	ryzák
2712 TAARLO KUBIŠTA-2	<i>AA, ee, CC</i>	ryzák	ryzák
556 DAF ONDRÁŠ	<i>Aa, Ee, CC</i>	hnědák	hnědák

VYUŽITÍ JEDNOTLIVÝCH HŘEBců PRO PREDIKCI BAREV POTOMKŮ NA ZÁKLADĚ STANOVENÝCH GENOTYPŮ ZBARVENÍ

Skupina hřebců s genotypem zbarvení – *AA, ee, CCr*

HŘEBCI	718 MINERAL
	1465 DRAK
	2810 MISTRÁL
	1159 SINUHET-K
	1244 ČESARION KINSKÝ
GENOTYP ZBARVENÍ	<i>AA, ee, CCr</i> v lokusu Agouti homozygoti, v lokusu Extension homozygoti, v lokusu Cream heterozygoti
FENOTYP podle určeného genotypu	<i>isabela</i>

Využití této skupiny hřebců pro získání potomků zbarvení *isabela (A-/aa, ee, CCr)* a *plavák (A-, E-, CCr)*

Největší pravděpodobnost narození “žlutého” potomka (50%) je připuštěním výše uvedených hřebců na klisny zbarvení ryzák (*A-/aa, ee, CC*), hnědák (*A-, E-, CC*) a vraník (*aa, E-, CC*) nebo *isabela (A-/aa, ee, CCr)*, *plavák (A-, E-, CCr)* a *smoky black (aa, E-, CCr)*. Potomci budou z 50% “žlutí” (*CCr*).

Připouštění s klisnami zbarvení hnědák a vraník:

S hnědými (*A-, E-, CC*) a vranými (*aa, E-, CC*) klisnami dají z 50% hnědé nebo ryzé potomky a z 50% “žluté”.

Pro přesnější určení zbarvení potomka (bude-li hnědák, ryzák, *isabela* nebo *plavák*) je potřeba znát genotyp zbarvení klisny.

Připouštění s klisnami zbarvení ryzák:

S klisnami zbarvení ryzák (*A-/aa, ee, CC*) dají z 50% ryzé (*A-/aa, ee, CC*) potomky a z 50% potomky zbarvení *isabela (A-/aa, ee, CCr)*

Připouštění s klisnami zbarvení plavák a smoky black:

S těmito klisnami dají potomky z 50% “žluté”, dále z 25% *cremello (A-, ee, CrCr)* nebo *perlino (A-, E-, CrCr)* a z 25% hnědé (*A-, E-, CC*) nebo ryzé (*A-/aa, ee, CC*). Pro přesnější určení (odhad) zbarvení potomka je potřeba znát genotyp zbarvení klisny.

Připouštění s klisnami zbarvení isabela:

S klisnami zbarvení *isabela (A-/aa, ee, CCr)* dají tito hřebci z 50% potomka zbarvení *isabela (A-/aa, ee, CCr)*, z 25% *cremello (A-, ee, CrCr)* a z 25% ryzého (*A-/aa, ee, CC*) potomka.

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ UVEDENÝCH TYPŮ PŘIPOUŠTĚNÍ

Připouštění s klisnami zbarvení hnědák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	AA,EE,CC	AA,Ee,NCr	50	plavák	50
		AA,Ee,NN	50	hnědák	50

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	AA,Ee,CC	AA, ee, NCr	25	isabela	25
		AA,Ee,NCr	25	plavák	25
		AA, ee, NN	25	ryzák	25
		AA,Ee,NN	25	hnědák	25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	Aa,Ee,CC	AA, ee, NCr	12,5	isabela	25
		Aa, ee, NCr	12,5		
		AA,Ee,NCr	12,5	plavák	25
		Aa, Ee, NCr	12,5		
		AA, ee, NN	12,5	ryzák	25
		Aa, ee, NN	12,5		
		AA,Ee,NN	12,5	hnědák	25
Aa, Ee, NN	12,5				

Připouštění s klisnami zbarvení vraník

HŘEBEC s genotypem	KLISNA VRANÍK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	aa,EE,CC	Aa,Ee,CCr	50	plavák	50
		Aa,Ee,CC	50	hnědák	50

HŘEBEC s genotypem	KLISNA VRANÍK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	aa,Ee,CC	Aa, ee, CCr	25	isabela	25
		Aa,Ee,CCr	25	plavák	25
		Aa,Ee,CC	25	hnědák	25
		Aa, ee, CC	25	ryzák	25

Připouštění s klisnami zbarvení ryzák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	AA, ee, CC	AA, ee, CCr	50	isabela	50
		AA, ee, CCr	50	ryzák	50

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	Aa, ee, CC	AA, ee, CCr	25	isabela	50
		Aa, ee, CCr	25		
		AA, ee, CC	25	ryzák	50
		Aa, ee, CCr	25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	aa, ee, CC	Aa, ee, CCr	50	isabela	50
		Aa, ee, CCr	50	ryzák	50

Připouštění s klisnami zbarvení plavák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	AA, EE, CCr	AA, Ee, CCr	50	plavák	50
		AA, Ee, CrCr	25	perlino	25
		AA, Ee, CC	25	hnědák	25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	Aa, EE, CCr	AA, Ee, CCr	25	plavák	50
		Aa, Ee, CCr	25		
		AA, Ee, CrCr	12,5	perlino	25
		Aa, Ee, CrCr	12,5		
		AA, Ee, CC	12,5	hnědák	25
		Aa, Ee, CCr	12,5		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	AA, Ee, CCr	AA, ee, CCr	25	isabela	25
		AA, Ee, CCr	25	plavák	25
		AA, ee, CrCr	12,5	cremello	12,5
		AA, Ee, CrCr	12,5	perlino	12,5
		AA, ee, CC	12,5	ryzák	12,5
		AA, Ee, CCr	12,5	hnědák	12,5

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	Aa, Ee, CCr	AA, ee, CCr	12,5	isabela	25
		Aa, ee, CCr	12,5		
		AA, Ee, CCr	12,5	plavák	25
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, ee, CrCr	6,25	cremello	12,5
		Aa, ee, CrCr	6,25		
		AA, Ee, CrCr	6,25	perlino	12,5
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		AA, Ee, CC	6,25	hnědák	12,5
		Aa, Ee, CC	6,25		
		AA, ee, CC	6,25	ryzák	12,5
		Aa, ee, CC	6,25		

Připouštění s klisnami zbarvení smoky black

HŘEBEC s genotypem	KLISNA SMOKY BLACK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	aa, EE, CCr	Aa, Ee, CCr	50	plavák	50
		Aa, Ee, CrCr	25	perlino	25
		Aa, Ee, CC	25	hnědák	25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA SMOKY BLACK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	aa, Ee, CCr	Aa, ee, CCr	25	isabela	25
		Aa, Ee, CCr	25	plavák	25
		Aa, ee, CrCr	12,5	cremello	12,5
		Aa, Ee, CrCr	12,5	perlino	12,5
		Aa, Ee, CC	12,5	hnědák	12,5
		Aa, ee, CC	12,5	ryzák	12,5

Připouštění s klisnami zbarvení isabela

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	AA, ee, CCr	AA, ee, CCr	50	isabela	50
		AA, ee, CrCr	25	cremello	25
		AA, ee, CC	25	ryzák	25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CCr	aa, ee, CCr	Aa, ee, CCr	50	isabela	50
		Aa, ee, CrCr	25	cremello	25
		Aa, ee, CC	25	ryzák	25

Skupina hřebců s genotypem zbarvení – Aa, Ee, CCr

HŘEBCI	1245 SARKON KINSKÝ
	918 ALOIS
	1602 ASIO ZDELOVSKÝ
GENOTYP ZBARVENÍ	Aa, Ee, CCr v lokusu Agouti heterozygoti , v lokusu Extension heterozygoti, v lokusu Cream heterozygoti
FENOTYP podle určeného genotypu	plavák

Využití této skupiny hřebců pro získání potomků zbarvení isabela (A-/aa, ee,CCr) a plavák (A-, E-, CCr)

V potomstvu možný výskyt genotypů zbarvení označené smoky black a smoky cream, který není v ČR v popisu zbarvení koně doposud používán. Příkladem zbarvení smoky black (aa, E-, CCr) dle genotypu zbarvení je Almhirt Chlumecký. V PK je označen jako tmavý ryzák nebo tmavý plavák.

Pro nejvyšší počet narozených potomků se zbarvením isabela (A-/aa, ee, CCr) a plavák (A-, E-, CCr) doporučujeme připouštět tyto hřebce s klisnami se zbarvením ryzák (A-/aa, E-, CC), hnědák (A-, E-, CC) a isabela (A-/aa, ee, CCr) nebo plavák (A-, E-, CCr). Pro přesnější predikci zbarvení potomka je potřeba znát genotyp nejen hřebce, ale i klisny.

Připouštění s klisnami zbarvení ryzák:

S klisnami zbarvení ryzák (A-/aa, ee,CC) mohou dát potomky ryzé (A,-/aa, ee, CC), hnědé (A-,E-,CC), vrané (aa, E-,CC), isabela (A-/aa, ee,CCr), plavák (A-, E-, CCr) a smoky black (aa, E-, CCr). Genotyp zbarvení klisny upřesní počet možných variant zbarvení u potomků.

Připouštění s klisnami zbarvení hnědák:

S klisnami zbarvení hnědák ($A-, E-, CC$) mohou dát také potomky šesti barevných variant: ryzé ($A-, ee, CC$), hnědé ($A-, E-, CC$), vrané ($aa, E-, CC$), isabela ($A-/aa, ee, CCr$), plavák ($A-, E-, CCr$) a smoky black ($aa, E-, CCr$). Pro přesnější predikci zbarvení potomka je opět potřeba znát genotyp zbarvení klisny.

Připouštění s klisnami zbarvení plavák:

S určitými genotypy klisen zbarvení plavák ($A-, E-, CCr$) mohou dát až devět variant zbarvení potomků: ryzák ($A-/aa, ee, CC$), hnědák ($A-, E-, CC$), vraník ($aa, E-, CC$), isabela ($A-/aa, ee, CCr$), plavák ($A-, E-, CCr$), smoky black ($aa, E-, CCr$), perlino ($A-, E-, CrCr$), cremello ($A-/aa, ee, CrCr$) a smoky cream ($aa, E-, CrCr$). Budou-li přicházet v úvahu u potomků všechny tyto fenotypy zbarvení je závislé na genotypu klisny. Např. při genotypu klisny AA, EE, CCr budou u potomků možné pouze tři varianty zbarvení: hnědák ($A-, E-, CC$), plavák ($A-, E-, CCr$) a perlino ($A-, E-, CrCr$).

Připouštění s klisnami zbarvení isabela:

S klisnami zbarvení isabela ($A-/aa, ee, CCr$) mohou dát u potomků také až devět zbarvení: ryzák ($A-/aa, E-, CC$), hnědák ($A-, E-, CC$), vraník ($aa, E-, CC$), isabela ($A-/aa, ee, CCr$), plavák ($A-, E-, CCr$), smoky black ($aa, E-, CCr$), perlino ($A-, E-, CrCr$), cremello ($A-/aa, ee, CrCr$) a smoky cream ($aa, E-, CrCr$). Budou-li přicházet v úvahu u potomků všechny tyto fenotypy zbarvení je závislé na genotypu klisny. Např. při genotypu klisny AA, ee, CCr bude u potomků možných šest variant zbarvení: hnědák ($A-, E-, CC$), ryzák ($A-/aa, ee, CCr$), plavák ($A-, E-, CCr$), isabela ($A-/aa, ee, CCr$), cremello ($A-/aa, ee, CrCr$) a perlino ($A-, E-, CrCr$).

Četnost zbarvení potomků hřebce 918 Alois vedených v ÚEK:

Celkem 48 potomků, z toho:

13x plavák, 11x isabela, 10x hnědák, 8x ryzák, 1x tm. hnědák, 1x č. hnědák, 1x sv. ryzák, 1x č. plavák, 1x sv. Isabela, 1x albín

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ UVEDENÝCH TYPŮ PŘIPOUŠTĚNÍ

Připouštění s klisnami zbarvení ryzák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	AA, ee, CC	AA, ee, CCr	12,5	isabela	25
		Aa, ee, CCr	12,5		
		AA, Ee, CCr	12,5	plavák	25
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, ee, CC	12,5	ryzák	25
		Aa, ee, CC	12,5		
		AA, Ee, CC	12,5	hnědák	25
		Aa, Ee, CC	12,5		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa,Ee, CCr</i>	<i>Aa, ee, CC</i>	<i>AA, ee, CCr</i>	6,25	isabela	25
		<i>Aa, ee, CCr</i>	12,5		
		<i>aa,ee,CCr</i>	6,25		
		<i>AA,Ee,CCr</i>	6,25	plavák	18,75
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	12,5		
		<i>AA, ee, CC</i>	6,25	ryzák	25
		<i>Aa, ee, CC</i>	12,5		
		<i>aa, ee, CC</i>	6,25		
		<i>AA,Ee,CC</i>	6,25	hnědák	18,75
		<i>Aa, Ee, CC</i>	12,5		
		<i>aa,Ee,CC</i>	6,25	vraník	
		<i>aa,Ee, CCr</i>	6,25	smoky black	

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa,Ee, CCr</i>	<i>aa, ee, CC</i>	<i>Aa, ee, CCr</i>	12,5	isabela	25
		<i>aa, ee, CCr</i>	12,5		
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	12,5	plavák	12,5
		<i>Aa, ee, CC</i>	12,5	ryzák	25
		<i>aa, ee, CC</i>	12,5		
		<i>Aa, Ee, CC</i>	12,5	hnědák	12,5
		<i>aa, Ee, CC</i>	12,5	vraník	12,5
		<i>aa, Ee, CCr</i>	12,5	smoky black	12,5

Připouštění s klisnami zbarvení hnědák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CCr</i>	<i>AA,Ee,CC</i>	<i>AA,ee,CCr</i>	6,25	isabela	12,5
		<i>Aa,ee,CCr</i>	6,25		
		<i>AA,EE,CCr</i>	6,25	plavák	37,5
		<i>AA, Ee, CCr</i>	12,5		
		<i>Aa,EE,CCr</i>	6,25		
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	12,5		
		<i>AA,EE,CC</i>	6,25	hnědák	37,5
		<i>AA, Ee, CC</i>	12,5		
		<i>Aa,EE,CC</i>	6,25		
		<i>Aa, Ee, CC</i>	12,5		
		<i>AA,ee,CC</i>	6,25	ryzák	12,5
		<i>Aa,ee,CC</i>	6,25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	Aa,EE,CC	AA,EE,CCr	6,25	plavák	37,5
		AA, Ee, CCr	6,25		
		Aa,EE,CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA,EE,CC	6,25	hnědák	37,5
		AA, Ee, CC	6,25		
		Aa,EE,CC	12,5		
		Aa, Ee, CC	12,5		
		aa,EE,CC	6,25	vraník	12,5
		aa,Ee,CC	6,25		
		aa,EE,CCr	6,25	smoky black	12,5
		aa,Ee,CCr	6,25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	Aa,Ee,CC	AA, ee, CCr	3,125	isabela	12,5
		Aa, ee, CCr	6,25		
		aa,ee,CCr	3,125		
		AA,EE,CCr	3,125	plavák	28,13
		AA, Ee, CCr	6,25		
		Aa,EE,CCr	6,25		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA,EE,CC	3,125	hnědák	28,13
		AA, Ee, CC	6,25		
		Aa,EE,CC	6,25		
		Aa, Ee, CC	12,5		
		AA, ee, CC	3,125	ryzák	12,5
		Aa, ee, CC	6,25		
		aa,ee,CC	3,125		
		aa,Ee,CC	6,25	vraník	9,38
		aa,EE,CC	3,125		
		aa,EE,CCr	3,125	smoky black	9,38
		aa,Ee,CCr	6,25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	AA,EE,CC	AA,EE,CCr	12,5	plavák	50
		AA, Ee, CCr	12,5		
		Aa,EE,CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA,EE,CC	12,5	hnědák	50
		AA, Ee, CC	12,5		
		Aa,EE,CC	12,5		
		Aa, Ee, CC	12,5		

Připouštění s klisnami zbarvení plavák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	AA, EE, CCr	AA, Ee, CCr	12,5	plavák	50
		AA, EE, CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		Aa, EE, CCr	12,5		
		AA, Ee, CrCr	6,25	perlino	25
		AA, EE, CrCr	6,25		
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		Aa, EE, CrCr	6,25		
		AA, Ee, CC	6,25	hnědák	25
		AA, EE, CC	6,25		
		Aa, Ee, CC	6,25		
		Aa, EE, CC	6,25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	Aa, Ee, CCr	AA, ee, CCr	3,125	isabela	12,5
		Aa, ee, CCr	6,25		
		aa, ee, CCr	3,125		
		AA, Ee, CCr	6,25	plavák	28,13
		AA, EE, CCr	3,125		
		Aa, Ee, CCr	125		
		Aa, EE, CCr	6,25		
		AA, ee, CrCr	1,562	cremello	6,25
		Aa, ee, CrCr	3,125		
		aa, ee, CrCr	1,562		
		AA, Ee, CrCr	3,125	perlino	14,06
		AA, EE, CrCr	1,562		
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		Aa, EE, CrCr	3,125		
		AA, Ee, CC	3,125	hnědák	14,06
		AA, EE, CC	1,562		
		Aa, Ee, CC	6,25		
		Aa, EE, CC	3,125		
		AA, ee, CC	1,562	ryzák	6,25
		Aa, ee, CC	3,125		
		aa, ee, CC	1,562		
		aa, Ee, CC	3,125	vraník	4,69
		aa, EE, CC	1,562		
		aa, Ee, CCr	6,25	smoky black	9,38
aa, EE, CCr	3,125				
aa, Ee, CrCr	3,125	smoky cream	4,69		
aa, EE, CrCr	1,562				

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	AA, Ee, CCr	AA, ee, CCr	6,25	isabela	12,5
		Aa, ee, CCr	6,25		
		AA, Ee, CCr	12,5	plavák	37,5
		AA, EE, CCr	6,25		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		Aa, EE, CCr	6,25		
		AA, ee, CrCr	3,125	cremello	6,25
		Aa, ee, CrCr	3,125		
		AA, Ee, CrCr	6,25	perlino	18,75
		AA, EE, CrCr	3,125		
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		Aa, EE, CrCr	3,125	hnědák	18,75
		AA, Ee, CC	6,25		
		AA, EE, CC	3,125		
		Aa, Ee, CC	6,25		
		Aa, EE, CC	3,125	ryzák	6,25
		AA, ee, CC	3,125		
		Aa, ee, CC	3,125		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	Aa, EE, CCr	AA, Ee, CCr	6,25	plavák	37,5
		AA, EE, CCr	6,25		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		Aa, EE, CCr	12,5		
		AA, Ee, CrCr	3,125	perlino	18,75
		AA, EE, CrCr	3,125		
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		Aa, EE, CrCr	6,25	hnědák	18,75
		AA, Ee, CC	3,125		
		AA, EE, CC	3,125		
		Aa, Ee, CC	6,25		
		Aa, EE, CC	6,25	vraník	6,25
		aa, Ee, CC	3,125		
		aa, EE, CC	3,125	smoky black	12,5
		aa, Ee, CCr	6,25		
		aa, EE, CCr	6,25	smoky cream	6,25
		aa, Ee, CrCr	3,125		
		aa, EE, CrCr	3,125		

Připouštění s klisnami zbarvení isabela

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	AA, ee, CCr	AA, ee, CCr	12,5	isabela	25
		Aa, ee, CCr	12,5		
		AA, Ee, CCr	12,5	plavák	25
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, ee, CrCr	6,25	cremello	12,5
		Aa, ee, CrCr	6,25		
		AA, Ee, CrCr	6,25	perlino	12,5
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		AA, ee, CC	6,25	ryzák	12,5
		Aa, ee, CC	6,25		
		AA, Ee, CC	6,25	hnědák	12,5
		Aa, Ee, CC	6,25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	aa, ee, CCr	aa, ee, CCr	12,5	isabela	25
		Aa, ee, CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	12,5	plavák	12,5
		aa, ee, CrCr	6,25	cremello	12,5
		Aa, ee, CrCr	6,25		
		Aa, Ee, CrCr	6,25	perlino	6,25
		aa, ee, CC	6,25	ryzák	12,5
		Aa, ee, CC	6,25		
		Aa, Ee, CC	6,25	hnědák	6,25
		aa, Ee, CC	6,25	vraník	6,25
		aa, Ee, CCr	12,5	smoky black	12,5
		aa, Ee, CrCr	6,25	smoky cream	6,25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CCr	Aa, ee, CCr	AA, ee, CCr	6,25	isabela	25
		Aa, ee, CCr	12,5		
		aa, ee, CCr	6,25		
		AA, Ee, CCr	6,25	plavák	18,75
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, ee, CrCr	3,125	cremello	12,5
		Aa, ee, CrCr	6,25		
		aa, ee, CrCr	3,125		
		AA, Ee, CrCr	3,125	perlino	9,38
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		AA, ee, CC	3,125	ryzák	12,5
		Aa, ee, CC	6,25		
		aa, ee, CC	3,125		
		AA, Ee, CC	3,125	hnědák	9,38
		Aa, Ee, CC	6,25		
		aa, Ee, CC	3,13	vraník	3,13
aa, Ee, CCr	6,25	smoky black	6,25		
aa, Ee, CrCr	3,13	smoky cream	3,13		

Skupina hřebců s genotypem zbarvení– AA, ee, CC

HŘEBCI	1603 PRZEDSWIT CHAMÍR
	1615 GIN FIZZ
	2712 TAARLO KUBIŠTA-2
GENOTYP ZBARVENÍ	AA, ee, CC v lokusu Agouti homozygoti, v lokusu Extension homozygoti, v lokusu Cream homozygoti
FENOTYP podle určeného genotypu	ryzák

Využití této skupiny hřebců pro získání potmků zbarvení isabela ($A-/aa, ee, CCr$) a plavák ($A-, E-, CCr$)

Po těchto hřebcích je možné očekávat “žluté” potomky (50%) z přípuštění s klisnami zbarvení isabela ($A-/aa, ee, CCr$), plavák ($A-, E-, CCr$), cremello ($A-/aa, ee, CrCr$) perlino ($A-, E-, CrCr$) a smoky cream ($aa, E-, CrCr$). Pro potomky zbarvení isabela doporučujeme připouštět s isabelami ($A-/aa, ee, CCr$).

Maximální – 100% – počet “žlutých” potomků bude z přípuštění výše jmenovaných hřebců s klisnami zbarvení cremello ($A-/aa, ee, CrCr$), perlino ($A-, E-, CrCr$) a smoky cream ($aa, E-, CrCr$). U přípuštění s klisnami cremello ($A-/aa, ee, CrCr$) budou všichni potomci zbarvení isabela ($A-/aa, ee, CCr$).

Připouštění s klisnami zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$):

S klisnami zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$) dají hřebci potomky se zbarvením isabela ($A-,ee,CCr$) (50%) a ryzák ($A-,ee,CC$) (50%).

Připouštění s klisnami zbarvení plavák ($A-,E-,CCr$):

S těmito klisnami dají potomky z 50% “žluté”, z 50% hnědé ($A-,E-,CC$) nebo ryzé ($A-/aa,ee,CC$). Pro konkrétnější určení (odhad) zbarvení potomka (bude-li isabela, plavák) je potřeba znát genotyp zbarvení klisny.

Připouštění s klisnami zbarvení cremello ($A-/aa,ee,CrCr$):

S těmito klisnami dají hřebci vždy potomka zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$).

Připouštění s klisnami zbarvení perlino ($A-,E-,CrCr$) a smoky cream ($aa,E-,CrCr$):

S klisnami se zbarvením perlino ($A-,E-,CrCr$) a smoky cream ($aa,E-,CrCr$) dají hřebci vždy “žlutého” potomka. Pro odhad, zda je možné očekávat isabelu nebo plaváka je nutný genotyp klisny.

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ UVEDENÝCH TYPŮ PŘIPOUŠTĚNÍ**Připouštění s klisnami zbarvení isabela**

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	AA, ee, CCr	AA, ee, CCr	50	isabela	50
		AA, ee, CC	50	ryzák	50

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa, ee, CCr	AA, ee, CCr	25	isabela	50
		Aa, ee, CCr	25	isabela	
		AA, ee, CC	25	ryzák	50
		Aa, ee, CC	25	ryzák	

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	aa, ee, CCr	Aa, ee, CCr	50	isabela	50
		Aa, ee, CC	50	ryzák	50

Připouštění s klisnami zbarvení plavák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	AA, Ee, CCr	AA, ee, CCr	25	isabela	25
		AA, Ee, CCr	25	plavák	25
		AA, Ee, CC	25	hnědák	25
		AA, ee, CC	25	ryzák	25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa, EE, CCr	AA, Ee, CCr	25	plavák	50
		Aa, Ee, CCr	25		
		AA, Ee, CC	25	hnědák	50
		Aa, Ee, CC	25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa, Ee, CCr	AA, ee, CCr	12,5	isabela	25
		Aa, ee, CCr	12,5		
		AA, Ee, CCr	12,5	plavák	25
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, Ee, CC	12,5	hnědák	25
		Aa, Ee, CC	12,5		
		AA, ee, CC	12,5	ryzák	25
		Aa, ee, CC	12,5		

Připouštění s klisnami zbarvení cremello

HŘEBEC s genotypem	KLISNA CREMELLO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	AA, ee, CrCr	AA, ee, CCr	100	isabela	100

HŘEBEC s genotypem	KLISNA CREMELLO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa, ee, CrCr	AA, ee, CCr	50	isabela	100
		Aa, ee, CCr	50		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA CREMELLO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	aa, ee, CrCr	Aa, ee, CCr	100	isabela	100

Připouštění s klisnami zbarvení perlino

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PERLINO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	AA, EE, CrCr	AA, Ee, CCr	100	plavák	100

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PERLINO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	AA, Ee, CrCr	AA, ee, CCr	50	isabela	50
		AA, Ee, CCr	50	plavák	50

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PERLINO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa, EE, CrCr	AA, Ee, CCr	50	plavák	100
		Aa, Ee, CCr	50		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PERLINO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa, Ee, CrCr	AA, ee, CCr	25	isabela	50
		Aa, ee, CCr	25		
		AA, Ee, CCr	25	plavák	50
		Aa, Ee, CCr	25		

Připouštění s klisnami zbarvení smoky black

HŘEBEC s genotypem	KLISNA SMOKEY CREAM s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	aa, EE, CrCr	Aa, Ee, CCr	100	plavák	100

HŘEBEC s genotypem	KLISNA SMOKEY CREAM s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, NN	aa, Ee, CrCr	Aa, ee, CCr	50	isabela	50
		Aa, Ee, CCr	50	plavák	50

Hřebec s genotypem zbarvení – Aa, Ee, CC

HŘEBEC	556 DAF ONDRÁŠ
GENOTYP ZBARVENÍ	Aa, Ee, CC v lokusu Agouti heterozygot, v lokusu Extension heterozygot, v lokusu Cream homozygot
FENOTYP podle určeného genotypu	hnědák

Využití hřebce 556 DAF ONDRÁŠ pro získání potomků zbarvení isabela (A-/aa, ee, CCr) a plavák (A-, E-, CCr)

Pro potomky “žlutého” zbarvení je vhodné připouštění s klisnami se zbarvením isabela (A-/aa, ee, CCr), plavák (A-, E-, CCr), cremello (A-/aa, ee, CrCr) a perlino (A-, E-, CrCr). Pro určení, jakého konkrétního zbarvení potomek může být je nutné znát genotyp klisny. Klisny s genotypem (A-/aa, E-, Cr-) mohou dát s tímto hřebcem i potomky zbarvení označované smoky black (aa, E-, CCr).

Nejvyšší počet potomků zbarvených “žlutě” bude z připuštění hřebce Daf Ondráš s klisnami zbarvení cremello ($A-/aa,ee,CrCr$).

Připouštění s klisnami zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$):

S klisnami zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$) dá hřebec Daf Ondráš (Aa,Ee,CC) potomky z 50% se zbarvením isabela ($A-/aa,ee,CCr$), plavák ($A-,E-,CCr$) nebo smoky black ($aa,E-,CCr$) a z 50% potomky se zbarvením ryzák ($A-/aa,ee,CC$), hnědák ($A-,E-,CC$) nebo vraník ($aa,E-,CC$). S určitým genotypem zbarvení klisny isabela (AA,ee,CCr) dá pouze isabely ($A-,ee,CCr$) nebo plaváky ($A-,E-,CCr$) (50%) a hnědáky ($A-,E-,CC$) nebo ryzáky ($A-,ee,CC$) (50%).

Připouštění s klisnami zbarvení plavák ($A-,E-,CCr$):

S těmito klisnami může dát potomky isabely ($A-/aa,ee,CCr$), plaváky ($A-,E-,CCr$), smoky black ($aa,E-,CCr$), hnědé ($A-,E-,CC$), vrané ($aa,E-,CC$) i ryzé ($A-/aa,ee,CC$). Pro konkrétnější určení zbarvení potomka je potřeba znát genotyp zbarvení klisny.

Genotyp klisny ovlivní, kolik barevných variant bude možné očekávat v potomstvu. S klisnou genotypu Aa, Ee, CCr může být u potomků šest barevných variant: hnědák ($A-,E-,CC$), ryzák ($A-/aa,ee,CC$), vraník ($aa,E-,CC$), plavák ($A-,E-,CCr$), isabela ($A-/aa,ee,CCr$), smoky black ($aa,E-,CCr$). S klisnou genotypu AA, EE, CCr jsou u potomků možné pouze 2 varianty: hnědák ($A-,E-,CC$), plavák ($A-,E-,CCr$).

Připouštění s klisnami zbarvení cremello ($A-/aa,ee,CrCr$):

S těmito klisnami může Daf Ondráš dát potomky zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$), plavák ($A-,E-,CCr$) a smoky black ($aa,E-,CCr$). Bude-li se v potomstvu vyskytovat pouze isabela nebo plavák a nebo i zbarvení smoky black je závislé na genotypu klisny.

Připouštění s klisnami zbarvení perlino ($A-,E-,CrCr$):

Připouštěním hřebce ($A-,E-,CC$) s klisnami perlino ($A-,E-,CrCr$) se budou v potomstvu vyskytovat zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$), plavák ($A-,E-,CCr$) a smoky black ($aa,E-,CCr$). Na genotypu klisny závisí, zda se bude v potomstvu objevovat pouze plavák, nebo isabela a plavák, nebo isabela, plavák a smoky black.

Skutečný poměr zbarvení potomstva 556 Daf Ondráš v populaci klisen ČT a ČT-KK zapsaných v PK:

hnědky	46,6%
ryzky	26,6%
isabely	13,3%
plavák a vraník	6,6%

Četnost zbarvení potomků hřebce 556 Daf Ondráš vedených v ÚEK:

Celkem 88 potomků, z toho:

28x hnědák, 21x ryzák, 21x isabela, 8x tm. hnědák, 6x plavák, 2x č. hnědák, 2x tm. isabela, 2x vraník, 1x sv. hnědák, 1x tm. plavák, 1x smíš. běl., 1x črv. běl.

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ UVEDENÝCH TYPŮ PŘIPOUŠTĚNÍ

Připouštění s klisnami zbarvení isabela

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CC</i>	<i>AA, ee, CCr</i>	<i>AA, ee, CCr</i>	12,5	isabela	25
		<i>Aa, ee, CCr</i>	12,5		
		<i>AA, Ee, CCr</i>	12,5	plavák	25
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	12,5		
		<i>AA, ee, CC</i>	12,5	ryzák	25
		<i>Aa, ee, CC</i>	12,5		
		<i>AA, Ee, CC</i>	12,5	hnědák	25
		<i>Aa, Ee, CC</i>	12,5		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CC</i>	<i>aa, ee, CCr</i>	<i>Aa, ee, CCr</i>	12,5	isabela	25
		<i>aa, ee, CCr</i>	12,5		
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	12,5	plavák	12,5
		<i>Aa, ee, CC</i>	12,5	ryzák	25
		<i>aa, ee, CC</i>	12,5		
		<i>Aa, Ee, CC</i>	12,5	hnědák	12,5
		<i>aa, Ee, CC</i>	12,5	vraník	12,5
		<i>aa, Ee, CCr</i>	12,5	smoky black	12,5

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CC</i>	<i>Aa, ee, CCr</i>	<i>AA, ee, CCr</i>	6,25	isabela	25
		<i>Aa, ee, CCr</i>	12,5		
		<i>aa, ee, CCr</i>	6,25		
		<i>AA, Ee, CCr</i>	6,25	plavák	18,75
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	12,5		
		<i>AA, ee, CC</i>	6,25	ryzák	25
		<i>Aa, ee, CC</i>	12,5		
		<i>aa, ee, CC</i>	6,25		
		<i>AA, Ee, CC</i>	6,25	hnědák	18,75
		<i>Aa, Ee, CC</i>	12,5		
		<i>aa, Ee, CC</i>	6,25	vraník	6,25
		<i>aa, Ee, CCr</i>	6,25	smoky black	6,25

Připouštění s klisnami zbarvení plavák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	AA, EE, CCr	AA, EE, CCr	12,5	plavák	50
		Aa, EE, CCr	12,5		
		AA, Ee, CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, EE, CC	12,5	hnědák	50
		Aa, EE, CC	12,5		
		AA, Ee, CC	12,5		
		Aa, Ee, CC	12,5		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	Aa, EE, CCr	AA, EE, CCr	6,25	plavák	37,5
		Aa, EE, CCr	12,5		
		AA, Ee, CCr	6,25		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, EE, CC	6,25	hnědák	37,5
		Aa, EE, CC	12,5		
		AA, Ee, CC	6,25		
		Aa, Ee, CC	12,5		
		aa, EE, CC	6,25	vraník	12,5
		aa, Ee, CC	6,25		
		aa, EE, CCr	6,25	smoky black	12,5
		aa, Ee, CCr	6,25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	AA, Ee, CCr	AA, ee, CCr	6,25	isabela	12,5
		Aa, ee, CCr	6,25		
		AA, EE, CCr	6,25	plavák	37,5
		Aa, EE, CCr	6,25		
		AA, Ee, CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, EE, CC	6,25	hnědák	37,5
		Aa, EE, CC	6,25		
		AA, Ee, CC	12,5		
		Aa, Ee, CC	12,5		
		AA, ee, CC	6,25	ryzák	12,5
		Aa, ee, CC	6,25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	Aa, Ee, CCr	AA, ee, CCr	3,125	isabela	12,5
		Aa, ee, CCr	6,25		
		aa, ee, CCr	3,125		
		AA, EE, CCr	3,125	plavák	28,13
		Aa, EE, CCr	6,25		
		AA, Ee, CCr	6,25		
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		AA, EE, CC	3,125	hnědák	28,13
		Aa, EE, CC	6,25		
		AA, Ee, CC	6,25		
		Aa, Ee, CC	12,5	ryzák	12,5
		AA, ee, CC	3,125		
		Aa, ee, CC	6,25		
		aa, ee, CC	3,125	vraník	9,38
		aa, EE, CC	3,125		
		aa, Ee, CC	6,25	smoky black	9,38
aa, EE, CCr	3,125				
aa, Ee, CCr	6,25				

Připouštění s klisnami zbarvení cremello

HŘEBEC s genotypem	KLISNA CREMELLO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	AA, ee, CrCr	AA, ee, CCr	25	isabela	50
		Aa, ee, CCr	25		
		AA, Ee, CCr	25	plavák	50
		Aa, Ee, CCr	25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA CREMELLO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	Aa, ee, CrCr	AA, ee, CCr	12,5	isabela	50
		Aa, ee, CCr	25		
		aa, ee, CCr	12,5		
		AA, Ee, CCr	12,5	plavák	37,5
		Aa, Ee, CCr	25		
		aa, Ee, CCr	12,5		
				smoky black	12,5

HŘEBEC s genotypem	KLISNA CREMELLO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	aa, ee, CrCr	Aa, ee, CCr	25	isabela	50
		aa, ee, CCr	25		
		Aa, Ee, CCr	25	plavák	25
		aa, Ee, CCr	25	smoky black	25

Připouštění s klisnami zbarvení perlino

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PERLINO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	AA, EE, CrCr	AA, Ee, CCr	25	plavák	100
		Aa, Ee, CCr	25		
		AA, EE, CCr	25		
		Aa, EE, CCr	25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PERLINO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	AA, Ee, CrCr	AA, EE, CCr	12,5	plavák	75
		AA, Ee, CCr	25		
		Aa, EE, CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	25		
		AA, ee, CCr	12,5	isabela	25
		Aa, ee, CCr	12,5		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PERLINO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	Aa, EE, CrCr	AA, EE, CCr	12,5	plavák	75
		AA, Ee, CCr	12,5		
		Aa, EE, CCr	25		
		Aa, Ee, CCr	25		
		aa, EE, CCr	12,5	smoky black	25
		aa, Ee, CCr	12,5		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PERLINO s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
Aa, Ee, CC	Aa, Ee, CrCr	AA, EE, CCr	6,25	plavák	56,25
		AA, Ee, CCr	12,5		
		Aa, EE, CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	25		
		AA, ee, CCr	6,25	isabela	25
		Aa, ee, CCr	12,5		
		aa, ee, CCr	6,25		
		aa, EE, CCr	6,25	smoky black	18,75
		aa, Ee, CCr	12,5		

Hřebec s genotypem zbarvení – *aa, Ee, CCr*

HŘEBEC	296 ALMHIRT CHLUMECKÝ
GENOTYP ZBARVENÍ	<i>aa, Ee, CCr</i> v lokusu Agouti homozygot, v lokusu Extension heterozygot, v lokusu Cream heterozygot
FENOTYP podle určeného genotypu	smoky black

Využití hřebce 296 ALMHIRT CHLUMECKÝ pro získání potomků zbarvení – isabela (*A-/aa, ee, CCr*) a plavák (*A-, E-, CCr*)

Pro narození “žlutého” potomka doporučujeme připouštět Almhirta Chlumeckého s klisnami se zbarvením ryzák (*A-/aa, ee, CC*), hnědák (*A-, E-, CC*), isabela (*A-/aa, ee, CCr*) a plavák (*A-, E-, CCr*). Potomci budou z 50% “žlutí” (*CCr*). Opět se po tomto hřebci bude v potomstvu při připouštění s klisnami určitého genotypu objevovat zbarvení smoky black (*aa, E-, CCr*) a smoky cream (*aa, E-, CrCr*).

Při připouštění s klisnami isabela (*A-/aa, ee, CCr*) a plavák (*A-, E-, CCr*) se bude v potomstvu z 25% objevovat zbarvení perlino (*A-, E-, CrCr*), cremello (*A-/aa, ee, CrCr*) nebo smoky cream (*aa, E-, CrCr*).

Připouštění s klisnami zbarvení hnědák (*A-, E-, CC*):

S těmito klisnami může dát hřebec potomstvo zbarvení: hnědák (*Aa, E-, CC*), ryzák (*Aa, ee, CC*), vraník (*aa, E-, CC*), plavák (*Aa, E-, CCr*), isabela (*Aa, ee, CCr*) a smoky black (*aa, E-, CCr*). Konkrétnější predikce zbarvení potomka je závislá na genotypu klisny. Například s klisnou genotypu *AA, EE, CC* dá hřebec pouze hnědáka (*Aa, E-, CC*) nebo plaváka (*Aa, E-, CCr*) v poměru 1:1.

Připouštění s klisnami zbarvení ryzák (*A-/aa, ee, CC*):

S klisnami zbarvení ryzák (*A-/aa, ee, CC*) se budou v potomstvu vyskytovat zbarvení: ryzák (*A-/aa, ee, CC*), hnědák (*Aa, E-, CC*), vraník (*aa, E-, CC*), isabela (*A-/aa, ee, CCr*), plavák (*Aa, E-, CCr*) a smoky black (*aa, E-, CCr*). Přesnější určení zbarvení potomka je ovlivněno genotypem klisny. Klisna genotypu *AA, ee, CC* dá s Almhirtem Chlumeckým potomky zbarvení isabela (*Aa, ee, CCr*), plavák (*Aa, Ee, CCr*) (50%) a ryzák (*Aa, ee, CC*), hnědák (*Aa, Ee, CC*) (50%).

Připouštění s klisnami zbarvení plavák (*A-, E-, CCr*):

Po připouštění s klisnami plavák (*A-, E-, CCr*) se budou v potomstvu vyskytovat tyto genotypy v genu MATP (lokus Cream) 25% *CC*, 50% *CCr* a 25% *CrCr*. Budou-li se v potomstvu objevovat zbarvení smoky black (*aa, E-, CCr*) a smoky cream (*aa, E-, CrCr*) je závislé na konkrétním genotypu klisny.

Připouštění s klisnami zbarvení isabela (*A-/aa, ee, CCr*):

Po připouštění s klisnami isabela (*A-/aa, ee, CCr*) se budou v potomstvu vyskytovat genotypy v genu MATP (lokus Cream) 25% *CC*, 50% *CCr* a 25% *CrCr*. Zbarvení smoky black (*aa, E-, CCr*) a smoky cream (*aa, E-, CrCr*) se budou v potomstvu objevovat

s menší pravděpodobností než při připouštění klisnami zbarvení plavák ($A-,E-,CCr$). U některých genotypů klisen isabela (AA,ee,CCr) se v potomstvu zbarvení smoky black ($aa,E-,CCr$) a smoky cream ($aa,E-,CrCr$) vyskytovat nebude.

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ UVEDENÝCH TYPŮ PŘIPOUŠTĚNÍ

Připouštění s klisnami zbarvení hnědák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	AA, EE, CC	Aa, EE, CCr	25	plavák	50
		Aa, Ee, CCr	25		
		Aa, EE, CC	25	hnědák	50
		Aa, Ee, CC	25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	Aa, EE, CC	Aa, EE, CCr	12,5	plavák	25
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		Aa, EE, CC	12,5	hnědák	25
		Aa, Ee, CC	12,5		
		aa, EE, CC	12,5	vraník	25
		aa, Ee, CC	12,5		
		aa, EE, CCr	12,5	smoky black	25
		aa, Ee, CCr	12,5		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	AA, Ee, CC	Aa, ee, CCr	12,5	isabela	12,5
		Aa, EE, CCr	12,5	plavák	37,5
		Aa, Ee, CCr	25		
		Aa, EE, CC	12,5	hnědák	37,5
		Aa, Ee, CC	25		
		Aa, ee, CC	12,5	ryzák	12,5

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	Aa, Ee, CC	Aa, ee, CCr	6,25	isabela	12,5
		aa, ee, CCr	6,25		
		Aa, EE, CCr	6,25	plavák	18,75
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		Aa, EE, CC	6,25	hnědák	18,75
		Aa, Ee, CC	12,5		
		Aa, ee, CC	6,25	ryzák	12,5
		aa, ee, CC	6,25		
		aa, EE, CC	6,25	vraník	18,75
		aa, Ee, CC	12,5		
		aa, EE, CCr	6,25	smoky black	18,75
		aa, Ee, CCr	12,5		

Připouštění s klisnami zbarvení ryzák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	AA, ee, CC	Aa, ee, CCr	25	isabela	25
		Aa, Ee, CCr	25	plavák	25
		Aa, ee, CC	25	ryzák	25
		Aa, Ee, CC	25	hnědák	25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	aa, ee, CC	aa, ee, CCr	25	isabela	25
		aa, ee, CC	25	ryzák	25
		aa, Ee, CC	25	vraník	25
		aa, Ee, CCr	25	smoky black	25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	Aa, ee, CC	Aa, ee, CCr	12,5	isabela	25
		aa, ee, CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	12,5	plavák	12,5
		Aa, ee, CC	12,5	ryzák	25
		aa, ee, CC	12,5		
		Aa, Ee, CC	12,5	hnědák	12,5
		aa, Ee, CC	12,5	vraník	12,5
		aa, Ee, CCr	12,5	smoky black	12,5

Připouštění s klisnami zbarvení plavák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	AA, EE, CCr	Aa, EE, CCr	25	plavák	50
		Aa, Ee, CCr	25		
		Aa, EE, CrCr	12,5	perlino	25
		Aa, Ee, CrCr	12,5		
		Aa, EE, CC	12,5	hnědák	25
		Aa, Ee, CC	12,5		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	Aa, EE, CCr	Aa, EE, CCr	12,5	plavák	25
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		Aa, EE, CrCr	6,25	perlino	12,5
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		Aa, EE, CC	6,25	hnědák	12,5
		Aa, Ee, CC	6,25		
		aa, EE, CC	6,25	vraník	12,5
		aa, Ee, CC	6,25		
		aa, EE, CCr	12,5	smoky black	25
		aa, Ee, CCr	12,5		
		aa, EE, CrCr	6,25	smoky cream	12,5
		aa, Ee, CrCr	6,25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	AA, Ee, CCr	Aa, ee, CCr	12,5	isabela	12,5
		Aa, EE, CCr	12,5	plavák	37,5
		Aa, Ee, CCr	25		
		Aa, EE, CrCr	6,25	perlino	18,75
		Aa, Ee, CrCr	12,5		
		Aa, ee, CrCr	6,25	cremello	6,25
		Aa, EE, CC	6,25		
		Aa, Ee, CC	12,5	hnědák	18,75
		Aa, ee, CC	6,25		
				ryzák	6,25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA PLAVÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	Aa, Ee, CCr	Aa, ee, CCr	6,25	isabela	12,5
		aa, ee, CCr	6,25		
		Aa, EE, CCr	6,25	plavák	18,75
		Aa, Ee, CCr	12,5		
		Aa, ee, CrCr	3,125	cremello	6,25
		aa, ee, CrCr	3,125		
		Aa, EE, CrCr	3,125	perlino	9,38
		Aa, Ee, CrCr	6,25		
		Aa, EE, CC	3,125	hnědák	9,38
		Aa, Ee, CC	6,25		
		Aa, ee, CC	3,125	ryzák	6,25
		aa, ee, CC	3,125		
		aa, EE, CC	3,125	vraník	9,38
		aa, Ee, CC	6,25		
		aa, EE, CCr	6,25	smoky black	18,75
		aa, Ee, CCr	12,5		
aa, EE, CrCr	3,125	smoky cream	9,38		
aa, Ee, CrCr	6,25				

Připouštění s klisnami zbarvení isabela

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	AA, ee, CCr	Aa, ee, CCr	25	isabela	25
		Aa, Ee, CCr	25	plavák	25
		Aa, ee, CrCr	12,5	cremello	12,5
		Aa, Ee, CrCr	12,5	perlino	12,5
		Aa, Ee, CC	12,5	hnědák	12,5
		Aa, ee, CC	12,5	ryzák	12,5

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	Aa, ee, CCr	Aa, ee, CCr	12,5	isabela	25
		aa, ee, CCr	12,5		
		Aa, Ee, CCr	12,5	plavák	12,5
		Aa, Ee, CC	6,25	hnědák	6,25
		Aa, ee, CrCr	6,25	cremello	12,5
		aa, ee, CrCr	6,25		
		Aa, Ee, CrCr	6,25	perlino	6,25
		Aa, ee, CC	6,25	ryzák	12,5
		aa, ee, CC	6,25		
		aa, Ee, CC	6,25	vraník	6,25
		aa, Ee, CCr	12,5	smoky black	12,5
		aa, Ee, CrCr	6,25	smoky cream	6,25

HŘEBEC s genotypem	KLISNA ISABELA s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
aa, Ee, CCr	aa, ee, CCr	aa, ee, CCr	25	isabela	25
		aa, ee, CrCr	12,5	cremello	12,5
		aa, Ee, CC	12,5	vraník	12,5
		aa, Ee, CCr	25	smoky black	25
		aa, Ee, CrCr	12,5	smoky cream	12,5
		aa, ee, CC	12,5	ryzák	12,5

Hřebec s genotypem zbarvení – Aa, Ee, CrCr

HŘEBEC	1463 DUBEL
GENOTYP ZBARVENÍ	Aa, Ee, CrCr v lokusu Agouti heterozygot, v lokusu Extension heterozygot, v lokusu Cream homozygot
FENOTYP podle určeného genotypu	perlino

Využití hřebce 1463 DUBEL pro získání potomků zbarvení isabela (A-/aa, ee, CCr) a plaváků (A-, E-, CCr)

Až 100% potomků isabel (A-/aa, ee, CCr) a plaváků (A-, E-, CCr) lze očekávat z přípuštění hřebce Dubela s klisnami zbarvení ryzák (A-/aa, ee, CC) a hnědák (A-, E-, CCr).

Bude-li se v potomstvu objevovat pouze isabela (A-/aa, ee, CCr) nebo plavák (A-, E-, CCr) je závislé na genotypu zbarvení klisny. U klisen s určitým genotypem zbarvení (A-, /aa, E-, CC) se u potomků může vyskytnout i zbarvení smoky black (aa, E-, CCr).

Přípuštění s klisnami zbarvení ryzák (A-/aa, ee, CC):

S klisnami zbarvení ryzák genotypu AA, ee, CC budou všichni potomci zbarvení isabela (A-, ee, CCr) a plavák (A-, Ee, CCr) v poměru 1:1. Klisna genotypu Aa, ee, CC může mít v potomstvu zbarvení smoky black (aa, Ee, CCr).

Přípuštění s klisnami zbarvení hnědák (A-, E-, CC):

S klisnami zbarvení hnědák genotypu AA, EE, CC bude 100% potomků zbarvení plavák (A-, E-, CCr). S klisnami genotypu AA, Ee, CC bude 100% “žlutých” (CCr) – 50% plaváků (A-, E-, CCr) a 50% isabel (A-, ee, CCr).

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ UVEDENÝCH TYPŮ PŘIPOUŠTĚNÍ

Připouštění s klisnami zbarvení ryzák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CrCr</i>	<i>AA, ee, CC</i>	<i>Aa, ee, CCr</i>	25	isabela	50
		<i>AA, ee, CCr</i>	25		
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	25	plavák	50
		<i>AA, Ee, CCr</i>	25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CrCr</i>	<i>Aa, ee, CC</i>	<i>Aa, ee, CCr</i>	25	isabela	50
		<i>AA, ee, CCr</i>	12,5		
		<i>aa, ee, CCr</i>	12,5		
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	25	plavák	37,5
		<i>AA, Ee, CCr</i>	12,5		
		<i>aa, Ee, CCr</i>	12,5		
				smoky black	12,5

HŘEBEC s genotypem	KLISNA RYZÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CrCr</i>	<i>aa, ee, CC</i>	<i>Aa, ee, CCr</i>	25	isabela	50
		<i>aa, ee, CCr</i>	25		
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	25	plavák	25
		<i>aa, Ee, CCr</i>	25	smoky black	25

Připouštění s klisnami zbarvení hnědák

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CrCr</i>	<i>AA, EE, CC</i>	<i>AA, EE, CCr</i>	25	plavák	100
		<i>AA, Ee, CCr</i>	25		
		<i>Aa, EE, CCr</i>	25		
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	25		

HŘEBEC s genotypem	KLISNA HNĚDÁK s genotypem	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
<i>Aa, Ee, CrCr</i>	<i>Aa, Ee, CC</i>	<i>Aa, ee, CCr</i>	12,5	isabela	25
		<i>aa, ee, CCr</i>	6,25		
		<i>AA, ee, CCr</i>	6,25		
		<i>AA, EE, CCr</i>	6,25	plavák	56,25
		<i>AA, Ee, CCr</i>	12,5		
		<i>Aa, EE, CCr</i>	12,5		
		<i>Aa, Ee, CCr</i>	25		
				<i>aa, EE, CCr</i>	6,25
		<i>aa, Ee, CCr</i>	12,5		

V plemenných knihách klisen koní Kinských jsou nejvíce zastoupeny klisny se zbarvením isabela ($A-/aa,ee,CCr$). Dále ryzák ($A-/aa,ee,CC$), hnědák ($A-,E-,CC$) a plavák ($A-,E-,CCr$). Jaké potomky a s jakou pravděpodobností dají s plemennými hřebci KK je uvedeno výše.

Jsou zde pouze dvě klisny s fenotypem zbarvení vraník ($aa,E-,CC$) – v PK klisna Lea, v PPK klisna Happy. Pro “žluté” (CCr) potomky z těchto dvou klisen doporučujeme je připouštět s hřebci:

718 Mineral, 2810 Mistrál, 1465 Drak, 1159 Sinuhet-K a 1245 Česarion Kinský. Všichni tito hřebci mají stanovený genotyp zbarvení AA,ee,CCr .

Známe-li pouze fenotyp klisen Lea a Happy, jsou v jejich potomstvu předpokládána zbarvení:

33% plavák (Aa,Ee,CCr)

17% isabela (Aa,ee,CCr)

33% hnědák (Aa,Ee,CC)

17% ryzák (Aa,ee,CC)

Připouštěním klisen Lea a Happy s plemennými hřebci 1245 Sarkon Kinský, 918 Alois a 1602 Asio Zdelovský (všichni mají stanovený genotyp Aa,Ee,CCr – plavák) se v potomstvu budou vyskytovat tato zbarvení: 22% Smoky black ($aa,E-,CCr$), 22% Plavák ($Aa,E-,CCr$), 22% Vraník ($aa,E-,CC$), 22% Hnědák ($Aa,E-,CC$), 6% Isabela ($A-/aa,ee,CCr$), 6% Ryzák ($A-/aa,ee,CC$). Bude-li se u potomků objevovat i zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$) a ryzák ($A-/aa,ee,CC$) je závislé na genotypu zbarvení klisen.

S hřebcem 1463 Dubel (genotyp $Aa,Ee,CrCr$) dají klisny potomky: 44% Smoky black ($aa,E-,CCr$), 44% Plavák ($A-,E-,CCr$), 12% isabela ($A-/aa,ee,CCr$). Objeví-li se v potomstvu i zbarvení isabela ($A-/aa,ee,CCr$) je závislé na genotypu zbarvení klisen.

VYUŽITÍ GENOTYPŮ $CrCr$

Genotypy $CrCr$ (perlina a cremella) doporučujeme využít pro získání potomků s genotypem CCr – isabel ($A-/aa,ee,CCr$) a plaváků ($A-,E-,CCr$) – “žlutých”.

KLISNY S GENOTYPEM $CrCr$

V Plemenné knize klisen KK je vedena klisna Miládka s označeným fenotypem “albín”. Podle označení zbarvení předpokládáme, že klisna je genotypu $CrCr$. Pro potomky isabely ($A-/aa,ee,CCr$) nebo plaváky ($A-,E-,CCr$) z klisny Miládky doporučujeme připustit těmito hřebci:

1603 Przedswit Chamír (AA,ee,CC) – ryzák

1615 Gin Fizz (AA,ee,CC) – ryzák

2712 Taarlo Kubišta (AA,ee,CC) – ryzák

Po těchto hřebcích bude hříbě vždy isabela ($A-,ee,CCr$) nebo plavák ($A-,E-,CCr$). Pro přesnější určení, zda lze očekávat hříbě pouze isabela nebo pouze plavák nebo isabela a plavák je potřeba otestovat genotyp zbarvení klisny Miládky.

MOLEKULÁRNĚ GENETICKÉ ZDŮVODNĚNÍ UVEDENÝCH TYPŮ PŘIPOUŠTĚNÍ

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 1.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	AA,ee,CrCr	AA,ee,CCr	100	isabela	100

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 2.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa,ee,CrCr	AA,ee,CCr	50	isabela	100
		Aa,ee,CCr	50		

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 3.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	aa,ee,CrCr	Aa,ee,CCr	100	isabela	100

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 4.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	AA,Ee,CrCr	AA,ee,CCr	50	isabela	50
		AA,Ee,CCr	50	plavák	50

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 5.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa,Ee,CrCr	AA,ee,CCr	25	isabela	50
		Aa,ee,CCr	25		
		AA,Ee,CCr	25	plavák	50
		Aa, Ee,CCr	25		

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 6.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	aa,Ee,CrCr	Aa,ee,CCr	50	isabela	50
		Aa,Ee,CCr	50	plavák	50

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 7.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	AA,EE,CrCr	AA,Ee,CCr	100	plavák	100

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 8.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	Aa,EE,CrCr	AA,Ee,CCr	50	plavák	100
		Aa,Ee,CCr	50		

HŘEBCI genotyp	KLISNA MILÁDKA 9.možný genotyp	POTOMEK možné genotypy	% genotypu	FENOTYP	% fenotypu
AA, ee, CC	aa,EE,CrCr	Aa,Ee,CCr	100	plavák	100

HŘEBCI S GENOTYPEM CrCr

Plemenný hřebec 1463 Dubel – v plemenné knize uvedeno zbarvení pseudoalbín. Stanovený genotyp zbarvení je *Aa, Ee, CrCr*, což je zbarvení perlino. Pro žlutá hříbata (*CCr*) doporučujeme připouštět na klisny zbarvení ryzák (*A-/aa,ee,CC*), hnědák (*A-,E-,CC*). S klisnami zbarvení ryzák genotypu *AA,ee,CC* budou všichni potomci zbarvení isabela (*A-,ee,CCr*) a plavák (*A-,E-,CCr*) v poměru 1:1. Klisna genotypu *Aa,ee,CC* zbarvení isabela může mít v potomstvu zbarvení smoky black (*aa,Ee,CCr*). S klisnami zbarvení hnědák genotypu *AA,EE,CC* bude 100% potomků zbarvení plavák (*A-,E-,CCr*) S klisnami genotypu *AA,Ee,CC* bude 100% “žlutých” potomků – 50% plaváků (*A-,E-,CCr*) a 50% isabel (*A-,ee,CCr*).

ZBARVENÍ ISABELA A PLAVÁK V POTOMSTVU

Podmínkou pro přídomek jména koně “Kinský” je zbarvení isabela (*A-/aa,ee,CCr*) nebo plavák (*A-,E-,CCr*). Chovatele koní Kinských zajímá, z připouštění jakých rodičů se v potomstvu vyskytnou hříbata pouze se zbarvením isabela a plavák. Na základě stanovených genotypů zbarvení plemenných hřebců KK lze určit, po kterých z nich budou s klisnami vhodného genotypu v potomstvu pouze isabely a plaváci.

Hřebci 1603 Przedswit Chamír (*AA,ee,CC*), 1615 Gin Fizz (*AA,ee,CC*) a 2712 Taarlo Kubišta-2 (*AA,ee,CC*) dají s klisnami genotypu *AA/ee/CrCr*, *Aa/ee/CrCr* a *aa/ee/CrCr* 100% potomků zbarvení isabela (*A-,ee,CCr*).

Hřebci 1603 Przedswit Chamír (*AA,ee,CC*), 1615 Gin Fizz (*AA,ee,CC*) a 2712 Taarlo Kubišta-2 (*AA,ee,CC*) dají s klisnami genotypu *AA/EE/CrCr*, *Aa/EE/CrCr* a *aa/EE/CrCr* 100% potomků zbarvení plavák (*A-,Ee,CCr*).

S klisnami genotypu *AA/Ee/CrCr*, *Aa/Ee/CrCr* a *aa/Ee/CrCr* budou po těchto hřebcích potomci isabely (*A-,ee,CCr*) z 50% a plaváci (*A-,Ee,CCr*) z 50%.

Hřebec 556 Daf Ondráš (*Aa,Ee,CC*) bude mít s klisnami genotypu *AA/EE/CrCr* 100% potomků zbarvení plavák (*A-,E-,CCr*). S klisnami s genotypy *AA/Ee, CrCr* bude mít potomky ze 75% plaváky (*A-,E-,CCr*) a z 25% isabely (*A-,ee,CCr*). S klisnami genotypu *AA/ee/CrCr* to bude 50% isabel (*A-,ee,CCr*) a 50% plaváků (*A-,Ee,CCr*).

Hřebec 1463 Dubel (*Aa,Ee,CrCr*) bude dávat s klisnami genotypu *AA/EE/CC* pouze plaváky (*A-,E-,CCr*) – 100%. S klisnami *AA/Ee/CC* to bude ze 75% plavák (*A-,E-,CCr*) a z 25% isabela (*A-,ee,CCr*). S klisnami *AA/ee/CC* budou potomci z 50% isabely (*A-,ee,CCr*) a z 50% plaváci (*A-,Ee,CCr*).

Příloha č. 4 Mutace v genu *KIT* podmiňující depigmentaci u koní

Chromozom	Referenční alela	Mutovaná alela	Pozice v genu	Plemeno
3	A	C	5'-UTR	QH,AP,IS,TR
3	T	A	intron 1	IS
3	A	C	exon 2	QH,AP
3	A	C	exon 2	QH
3	C	G	intron 2	white TB
3	TCTGC	-	exon 3	white TB
3	G	T	intron 3	QH
3	G	A	intron 3	AP,QH
3	T	A	exon 4	white TB
3	C	T	exon 5	white TB
3	G	A	intron 5	QH, AV, LW, QH145
3	-	ATGAATGAA	intron 5	všechna plemena
3	G	C	intron 5	ALH, AV
3	A	C	intron 6	AV, IS, LW, TB
3	GTTC	-	exon 7	white/spotted QH
3	T	C	exon 7	AV,ALH
3	C	T	intron 7	QH
3	T	C	exon 8	AV
3	C	T	intron 8	SW023
3	A	G	exon 10	AV
3	C	T	exon 12	HS
3	G	A	exon 12	CW
3	G	A	intron 12	AP,QH,TR
3	G	A	exon 13	QH
3	C	T	exon 13	white TB
3	T	C	intron 13	IS,LW,TB
3	A	C	intron 13	QH
3	T	C	intron 13	AV, DR
3	C	-	intron 13	AV, IS, LW, TB
3	T	A	exon 14	JD
3	A	G	exon 14	JD
3	C	T	exon 14	L,WP,QH, AP, ALH, NO, OT, GV, MG, CD, FM, IM, SI
3	T	G	exon 14	AP,IS,QH
3	G	C	exon 15	white FM
3	G	A	exon 15	DR018, TB
3	C	-	exon 15	TB
3	C	G	intron 15	ALH,
3	C	T	intron 15	AP,IS,QH
3	12 bp	-	intron 15	QH
3	C	T	intron 15	AP,QH,TR,TB,OL,HN
3	C	T	intron 15	IS
3	C	T	exon 16	AP,QH,TR
3	T	C	intron 16	AP,QH,TR
3	T	A	intron 16	IS,QH
3	C	A	intron 16	AP,QH
3	A	T	intron 16	AP,QH
3	G	-	exon 17	IS074
3	54 bp	-	exon 17	TB
3	C	G	intron 17	QH (QHxPP)
3	T	C	intron 17	AP,QH,TR

Chromozom	Referenční alela	Mutovaná alela	Pozice v genu	Plemeno
3	<i>T</i>	<i>C</i>	intron 17	AP,QH,TR
3	<i>T</i>	<i>C</i>	intron 17	AP,QH,TR
3	<i>T</i>	<i>A</i>	exon 18	OL
3	<i>G</i>	<i>A</i>	exon 19	
3	<i>C</i>	<i>T</i>	intron 19	SD
3	<i>T</i>	<i>C</i>	intron 19	IS,QH
3	<i>G</i>	<i>A</i>	exon 20	AP,IS,QH,TR
3	<i>T</i>	<i>C</i>	exon 20	AV,IS,LW,TR
3	<i>G</i>	<i>C</i>	intron 20	AP,IS,QH,TR
3	<i>C</i>	<i>T</i>	exon 21	AP,IS,QH
3	<i>C</i>	<i>T</i>	3'-flanking	IS,QH
3	<i>G</i>	<i>A</i>	3'-flanking	ALH,AV,DR,IS,QH,WMP
3	<i>C</i>	<i>T</i>	3'-flanking	AV, WMP
3	<i>G</i>	<i>A</i>	3'-flanking	AP,IS,QH,TR

ALH: Appaloosa		
AP: American Painthorse, double registrations with QH		
AS: American Standardbred		
AV: Arabian Horse		
CD: Clydesdale		
CR: various European Warmbloods		
CW: Camarillo White Horse		
DR: German Riding Pony		
DW: German Warmblood		
FM: Franches-Montagnes		
GV: Gipsy Vanner		
HF: Haflinger		
HN: Hanoverian		
IM: Indian Marwari		
IS: Icelandic Horse		
JD: Japanese Draft		
KS: Knabstrupper		
LW: Lewitzer		
MG: Morgan Horse		

Hauswirth et al. (2013)

Příloha č. 5 Listy plemen kůň Kinsky a huculský kůň z databáze EFABIS

List plemene kůň Kinsky z databáze EFABIS

Breed Data Sheets

Kun Kinsky/Horse/Czech Republic

Breed names

Most common name ?

Kun Kinsky

Language ?

czech

Breed local names

Origin and development

Herdbook ?

Yes

Herdbook established in ?

2005

Adaptedness classification ?

Native

Description of origin ?

CROSSBREEDING OF DIFFERENT BREEDS AND SELECTION

Uses ?

Breed morphology information

males
females

Wither height (avg, cm) ? ?

Weight (avg, kg) ? ?

Breed colours

Breed qualities information

Breed performance information

Parturition interval (day, avg) ?

Age at first parturition (month) ?

Seasonality (no, avg) ?

List plemene huculský kůň z databáze EFABIS

Breed Data Sheets

Huculsky kun/Horse/Czech Republic
Breed names

Most common name ?

Huculsky kun

Language ?

czech

Transboundary or brand name ?

Hutsul

Breed local names

Zutculsky

Hucul

Images

Origin and development

Herdbook ?

Yes

Herdbook established in ?

1922

Adaptedness classification ?

Locally adapted

Description of origin ?

primitive and developed, local Carpatian type of Tarpan: composite of Tarpan, Kertak and Arab, established in 17th and 18th century

Import ?

since 1950 from Hucul (Romania, Poland and Ukraine) and from Fjord (Poland)

Location within country ?

Found in mountain logging

Uses ?

sport

1

Description of specific uses ?

The Hucul is a riding and draught horse.

Breed morphology information

Wither height (avg, cm) ? ?

140

138

Weight (avg, kg) ? ?

Other specific visible traits ?

harmonic body frame, short limbs, exuberant mane, robust neck, wide and deep chest

Genetic features ?

marker/major genes: -Microsatellite AHT4 H=0.839; -Microsatellite AHT5 H=0.788; -Microsatellite HMS1 H=0.597; -Microsatellite HMS2 H=0.781; -Microsatellite HMS3 H=0.884; -Microsatellite HMS6 H=0.701; -Microsatellite HMS7 H=0.607; -Microsatellite HTG4 H=0.797; -Microsatellite HTG6 H=0.539; -Microsatellite HTG7 H=0.582; -Microsatellite HTG10 H=0.798; -Microsatellite VHL20 H=0.848; -Microsatellite ASB2 H=0.794; -Microsatellite ASB17 H=0.767; -Microsatellite ASB23 H=0.917; -Microsatellite CA425 H=0.828; -Microsatellite LEX3 H=0.522; (2011)

Breed reference ?

FAO Breed Survey (1995) Data transferred by EAAP in 9/99 www.hucul-achhk.cz

Breed colours

Colour Comment ?

uni coloured: usually dun or bay, sometimes chestnut or piebald

11. ŘEŠENÉ PROJEKTY

Autorka je odpovědnou řešitelkou projektů

QJ1210253 Využití metod molekulární genetiky jako nástroje pro efektivní plemenářskou práci v malé populaci prasat. MZe, 2012-2016

QJ1210301 Výzkum, nové produkty a služby pro vytvoření centra prevence, detekce a podpory léčby mastitid. MZe, 2012-2016

2B08037 Biotechnologické metody pro inovaci hodnocení zpracovatelské a spotřebitelské kvality hovězího masa jako potravinového zdroje živočišných proteinů. MŠMT, 2008-2011

Jako další řešitel se podílela na projektech

QH92277 Genetická diverzita a její uchování ve vybraných populacích koní v ČR. MZe, 2009-2011

QG60045 Zlepšování produkčních znaků u prasat s využitím metod molekulární genetiky. MZe, 2006-2009

1G58073 Výzkum a validace genomických metod využitelných v selekci na kvalitu a tržní uplatnění hospodářských zvířat a jejich produktů. MZe, 2005-2009

15/2004 Vývoj etické a ekonomicky efektivní metody získávání a archivace vzorků DNA pro kontrolu bezpečnosti potravinových zdrojů, IGA, 2004

QF3218 Výzkum intenzifikačních prvků ke zvýšení produkce selat na prasnici. MZe, 2003-2007

QD1039 Tvorba a šlechtění superplodných linií a stád prasat s využitím genetických markerů. MZe, 2001-2005

QD0100 Vliv definovaných genetických, nutričních, etologických a techno-logických faktorů na reprodukční užitkovost a welfare prasnic. MZe, 2000-2004

MSM 432100001 Regulace biologických a technologických procesů pro konkurenceschopné zemědělství. MŠMT, 1999-2004

EP9282 Rozvoj metod molekulárního genotypování v perspektivních lokusech pro užitkovost prasat a jejich využití v selekci na zlepšení plodnosti a kvality masa. MZe, 1999-2002

12. VLASTNÍ PUBLIKACE

Metodiky recenzované a certifikované autorizačním orgánem MZe ČR

VRTKOVÁ, I. (2014): Postupy k využívání DNA testů při určování mastitidních patogenů v mléce dojnic. *Mendelu Brno*

VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L., PUTNOVÁ, L., FUTAS, J. (2011): Predikce zbarvení, validace parentit a prezentace EFABIS u populace koní Kinských v ČR s využitím polymorfismů genomické DNA. *Mendelu Brno*

VRTKOVÁ, I., PUTNOVÁ, L., STEHLÍK, L., BARTOŇOVÁ, P. (2010): Zpřesnění genetické identifikace, ověřování původů a dohledatelnosti masného skotu novým setem 18ti DNA mikrosatelitů. *Mendelu Brno*

KOURKOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., MATOUŠEK, V., KERNEROVÁ, N. (2008): Spolehlivější genetická metodika určování parentity prasat v ČR s využitím tetranukleotidových mikrosatelitových sekvencí DNA. *Mendelu Brno*

PUTNOVÁ L., VRTKOVÁ I., (2008): Metodika testace 10 mikrosatelitů pro genetický typ a ověřování původu prasat (MS panel prase-set 10)., *MZLU Brno*

Publikace v časopisech s IF

VRTKOVÁ, I. (2015): Genetic admixture analysis in Prestice Black-Pied pigs. *Archiv fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding*. sv. 58, s. 115-121.

LEVÝ, E., PUTNOVÁ, L., ŠTOHL, R., SVOBODOVÁ, K., MATOUŠKOVÁ, J., ROBOVSKÝ, J., LAMKA, J., VRTKOVÁ, I., ERNST, M. (2015): Utility of several microsatellite markers for the genetic characterisation of three ex situ populations of threatened caprine taxa (*Capra aegagrus*, *C. cylindricornis* and *C. falconeri*). *Archiv fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding*. sv. 58, s. 365-372.

KAPLANOVÁ, K., DUFEK, A., DRAČKOVÁ, E., SIMEONOVÁ, J., ŠUBRT, J., VRTKOVÁ, I. (2013): Effect of bovine DNAJA1 gene polymorphisms on beef tenderness in a commercial crossbred population. *Indian Journal of Animal Sciences*. sv. 83, č. 8, s. 859-861.

JÁNOVÁ, E., FUTAS, J., KLUMPLEROVÁ, M., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., VYSKOČIL, M., FROLKOVÁ, P., HOŘÍN, P. (2013): Genetic diversity and conservation in a small endangered horse population. *Journal of Applied Genetics*. sv. 54, č. 3, s. 285-292.

ČERVINKOVÁ, D., VLKOVÁ, H., BORODACOVÁ, I., MAKOVCOVÁ, J., BABAK, V., LORENCOVÁ, A., VRTKOVÁ, I., MAROSEVIC, D., JAGLIC, Z. (2013): Prevalence of mastitis pathogens in milk from clinically healthy cows. *Veterinární medicína*. sv. 58, č. 11, s. 567-575.

RUSEK, J., KLUMPLEROVÁ, M., MOLINKOVÁ, M., SEDLINSKÁ, M., DUŠEK, L., MUŽÍK, J., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., CELER, V., HOŘÍN, P. (2013): Genetics of anti-EHV antibody responses in a horse population. *Research in Veterinary Science*. sv. 95, č. 1, s. 137-142. KLUMPLEROVÁ, M., VYCHODILOVÁ, L., BOBROVÁ, O., CVANOVÁ, M., FUTAS, J., JÁNOVÁ, E., VYSKOČIL, M., VRTKOVÁ, I., PUTNOVÁ, L., DUŠEK, L., MARTI, E., HOŘÍN, P. (2013): Major histocompatibility complex and other allergy-related candidate genes associated with insect bite hypersensitivity in Icelandic horses. *Molecular Biology Reports*. sv. 40, č. 4, s. 3333-3340.

KAPLANOVÁ, K., DUFEK, A., DRAČKOVÁ, E., SIMEONOVÁ, J., ŠUBRT, J., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2013): The association of CAPN1, CAST, SCD, and FASN polymorphisms with beef quality traits in commercial crossbred cattle in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. sv. 58, č. 11, s. 489-496.

KAPLANOVÁ, K., PUTNOVÁ, L., BRYNDOVÁ, M., BARTOŇOVÁ, P., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2012): Microsatellite variability in nutria (*Myocastor coypus*) genetic resource in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. sv. 57, č. 4, s. 171-177.

BARTOŇOVÁ, P., VRTKOVÁ, I., KAPLANOVÁ, K., URBAN, T. (2012): Association between CSN3 and BCO2 gene polymorphisms and milk performance traits in the Czech Fleckvieh cattle breed. *Genetics and Molecular Research*. sv. 11, č. 2, s. 1058-1063.

FUTAS, J., VYCHODILOVÁ, L., HOFMANOVÁ, B., VRÁNOVÁ, M., PUTNOVÁ, L., MUŽÍK, J., VYSKOČIL, M., VRTKOVÁ, I., DUŠEK, L., MAJZLÍK, I., HOŘÍN, P. (2012): Genomic analysis of resistance/susceptibility to melanoma in Old Kladruber greying horses. *Tissue Antigens: immune response genetics*. sv. 79, č. 4, s. 247-248.

VRÁNOVÁ, M., ALLOGGIO, I., QABLAN, M., VYSKOČIL, M., BAUMEISTEROVA, A., SLOBODA, M., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., MODRÝ, D., HOŘÍN, P. (2011): Genetic

diversity of the class II major histocompatibility DRA locus in European, Asiatic and African domestic donkeys. *Infection, Genetics and Evolution*. sv. 11, č. 5, s. 1136-1141.

SVOBODA, M., HOLLA, L.I., SEFR, R., VRTKOVÁ, I., KOCAKOVA, I., TICHY, B., DVORAK, J. (2008): Micro-RNAs miR125b and miR137 are frequently upregulated in response to capecitabine chemoradiotherapy of rectal cancer. *International Journal of Oncology*. 33 (3): 541-547.

MATOUŠEK V., KERNEROVÁ N., KOLAŘÍKOVÁ O., KŘÍŽOVÁ H., URBAN T., VRTKOVÁ I. (2003): Effect of RYR1 and SER genotypes on the fertility of sows of Large White breed in elite herds. *Czech J. Anim. Sci.*, 48 (3): 129-133.

KMIEC, M., DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2002): Study on relation between estrogen receptor (ESR) gene polymorphism and some pig reproduction performance characters in Polish landrace breed. *Czech Journal of Animal Science*. sv. 47, č. 5, s. 189-193.

VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2001): Genetic variability in the ESR locus in pigs of the Landrace and Large White breeds kept in the Czech republic. *Czech Journal of Animal Science*, 46, 184-186.

VRTKOVÁ, I., FILISTOWICZ, A., DVOŘÁK, A., WIERZBICKI H., CZULC T. (2001): Frequencies of alleles and genotypes of the PRNP gene in Polish Red, Czech Pied and Czech Black-and-white cattle. *J. Appl. Genet.*, 42 (2): 503-507.

PUTNOVÁ, L., KŘENKOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK J., Pietruszka A., Czarnecki R. (2001) : Association of the Ddel growth hormone gene polymorphism with some performance traits in Polish Large White and Czech Large White x Polish Large White pigs. *Journal of Applied Genetics*, 42: 317-324.

Publikace v recenzovaných časopisech

FALKOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., KRATOCHVÍLOVÁ, L. (2014): Boar SNP variability in genetic resource Přeštice Black Pied pig. *Research in Pig Breeding*. sv. 8, č. 2, s. 4-7.

VRTKOVÁ, I., (2013): Pilotní výzkum detekce mastitidních patogenů real time PCR v chovech v ČR. *Mlékařské listy-Zpravodaj*. sv. 23, č. 141, s. 1-5.

VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L., PUTNOVÁ, L. (2013): Research of variability in Přeštice Black Pied pig using dinucleotide and tetranucleotide microsatellite markers. *Research in Pig Breeding*. sv. 7, č. 1, s. 9-14.

VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L., PUTNOVÁ, L., KRATOCHVÍLOVÁ, L., FALKOVÁ, L. (2012): Genetic structure in three breeds of pigs populations using microsatellite markers in the Czech Republic. *Research in Pig Breeding*. sv. 6, č. 2, s. 83-87.

MATOUŠEK, V., KERNEROVÁ, N., VRTKOVÁ, I. (2011): The variability of chosen genes and their associations with performance traits in sows of Přeštice Black-Pied breed. *Research in Pig Breeding*. sv. 5, č. 2, s. 13-20.

PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., ŠRUBAŘOVÁ, P., STEHLÍK, L. (2011): Utilization of a 17 microsatellites set for bovine traceability in Czech cattle populations. *Iranian Journal of Applied Animal Science*. 1 (1), 31-37.

HANUSOVÁ, E., HUBA, J., ORAVCOVÁ, M., POLÁK, P., VRTKOVÁ, I. (2010): Genetic variations of beta-casein in holstein dairy cattle in Slovakia. *Slovak Journal of Animal Science*. sv. 43, č. 2, s. 63-66.

KAPLANOVÁ, K., ŘÍHA, J., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2010): Association of 5 candidate genes potentially affected beef quality with carcass traits and cutting parts in cross-breed cattle. *Výzkum v chovu skotu*. sv. LII, č. 1, s. 26-34.

KOURKOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., ŠRUBAŘOVÁ, P. (2009): Microsatellite DNA analysis of genetic diversity in selected horse population. *J. Agrobiol.* 26, 57-60.

MAKOVICKÝ, P., MAKOVICKÝ, P., LEVKUT, M., LEVKUT, M., VRTKOVÁ, I. (2009): Histological and morphometrical parameters of the skeletal muscle development in pigs. *Scientia Agriculturae Bohemica*. sv. 40, č. 3, s. 121-129.

MANGA, I., ŘÍHA, J., VRTKOVÁ, I. (2008): Polymorphism of CSN3, PIT-1, LGB and its impact on milk performance trait at the Czech Spotted and the Czech Holstein breed. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun.*, sv. 2., č.1, 6s.

VRTKOVÁ, I., METODIEV, S., DRBOHLAV, V. (2006): Gena i genotypna čestota na lokusa FUT1 pri svine ot Dunavska bjala poroda. *Životnovidni nauky*. sv. XLIII, č. 4, s. 33-35.

DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2005): Genotypy a alely markeru odolnosti vůči průjmům selat. *Náš chov*. č. 4, s. 48-49.

KUČEROVÁ, J., NĚMCOVÁ, E., ŠTÍPKOVÁ, M., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., FRELICH, J., BOUŠKA, J., MARŠÁLEK, M. (2004): Vliv markerů CSN3 a ETH10 na parametry mléčné užitkovosti u Českého strakatého skotu. *Journal of Central European Agriculture*. sv. 5, č. 4, s.

- 303-308. VRTKOVÁ, I., MATOUŠEK, V., KERNEROVÁ, N., KRÁLOVÁ, P. (2002): The influence of RYR1 and ESR genotypes on fertility. *Annals of Animal Science*, 2, s. 57-61.
- DVOŘÁK, J., FILISTIWITZ, A., HRUŠKA, D., HORÁK, P., VRTKOVÁ, I., KÚBEK, A., SZULC, T., POMICHAL, Š. (2002): The polymorphism of MSTN, PRNP and CSN3 genes in Charolais cattle. *Animal Science Papers and Reports Institute of genetics and animal Breeding, Jastrzebiec, Poland*. vol.20, 19-23.
- KOLAŘIKOVÁ, O., VRTKOVÁ, I., URBAN, T., ADÁMEK, J., DVOŘÁK, J. (2002): Influence of polymorphism of myogenin gene on growth and meat efficiency in pigs. *Acta univ. agric. et silvic. Mendel. Brun. (Brno)*, L, 5: 15-19.
- VRTKOVÁ, I., KÚBEK, A., FILISTOWICZ, A., ŘEHOUT, V., DVOŘÁK, A. (2001): The polymorphism of PRNP gene in cattle. *Acta fytotechnica et zootechnica*, Vol. 4, s. 159-162.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2001): Polymorfismus v genu prionového proteinu. *Collection of scientific papers, Faculty of agriculture in České Budějovice : Series for animal sciences*. sv. 18, č. 1, s. 5-7.
- PUTNOVÁ, L., BOBROVÁ, O., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2001): Polymorphism of OPN, ESR2, PRLR, MYF4 genes of the pig in the Czech Republic. *Zeszyty naukowe Akademii rolniczej we Wrocławiu*. č. 405, s. 225-233.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, A., ŘEHOUT, V. (2001): The polymorphism of prion protein gene. *Collection of Scientific Papers, Faculty of Agriculture in České Budějovice, Series for Animal Sciences*, 18, (1), 5-7.
- BOBROVÁ, O., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I. (2000): Analysing the efficiency of the Genesis gametocide in triticale (X Triticosecale Wittmack). *Folia Universitatis Agriculturae Stetinesis. Agricultura*. sv. 206, č. 82, s. 293.
- KMIEĆ, M., DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2000): Relation between the polymorphism in the ryanodine receptor gene (RYR1) and certain reproductive traits of sows in a herd of Polish Landrace pigs. *Animal Science Papers and Reports*, 18: 277-283.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., JASEK, S., CZARNECKI, R. (1999): Zmienność markerów genetycznych u trzodochlewnej w republice Czeskiej i w Polsce. *Przegląd Hodowlany-Zeszyty naukowe*. 40, 17 – 28.

Publikace původních prací ve sbornících

- SURÝNEK, J., KNOLL, A., VRTKOVÁ, I. (2014): Construction of multiplex quantitative PCR for detection of streptococcal mastitis. In POLÁK, O., CERKAL, R., ŠKARPA, P. *MendelNet 2014 - Proceedings of International PhD Students Conference*. 1. vyd. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, s. 512-515.
- PYATOV, V., VRTKOVÁ, I., KNOLL, A. (2014): Detection of Aminoglycoside, Sulfonamide and Tetracycline resistance genes in Escherichia coli isolated from bovine milk samples. In POLÁK, O., CERKAL, R., ŠKARPA, P. *MendelNet 2014 - Proceedings of International PhD Students Conference*. 1. vyd. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, s. 504-506.
- VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L., PUTNOVÁ, L., KRATOCHVÍLOVÁ, L., FALKOVÁ, L. (2012): Validace biomarkerů pro monitoring vývoje genetické diverzity Přestického černostrakatého prasete. In ŠUBRT, J., FILIPČÍK, R. *Šlechtění na masnou užitkovost a aktuální otázky produkce jatečných zvířat*. 1. vyd. Brno: Mendelova univerzita v Brně, s. 182-185.
- ŘÍHA, J., VRTKOVÁ, I. (2008): Markery ve šlechtění skotu na maso. In BJELKA, M. *Šetrné čerpání přírodních zdrojů a údržba krajiny pomocí chovu krav bez tržní produkce mléka*. 1. vyd. Šumperk: VÚCHS Rapotín, s. 18-25.
- KERNEROVÁ, N., MATOUŠEK, V., VRTKOVÁ, I., KOURKOVÁ, L. a kol. (2008): Associations between RYR1 and MC4R genes and carcass value traits in hybrid pigs. In *XXIII Genetic Days*. 1. vyd. České Budějovice: Scientific Pedagogical Publishing, s. 203--206.
- BURÓCZIOVÁ, M., ŘÍHA, J., VRTKOVÁ, I. (2006): Molekulárno-genetická charakteristika plemien český teplokrevník a slovenský teplokrevník. *CD Rom: Biotechnology 2006, Scientific Pedagogical Publishing*, Č. Budějovice, Czech Republic, s165-168.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2005): Genotypy a alely markeru odolnosti k průjmům selat u plemen bílé ušlechtilé, landrase a přestické černostrakaté. In *Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*. České Budějovice 2005: Scientific Pedagogical Publishing, České Budějovice, s. 81-84.
- DVOŘÁK, J., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., KOMOSNÝ, M. (2005): Analýza výsledků využívání nového panelu MS k identifikaci a ověřování parentity prasat. In: *14. mezinárodní konference Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*. České Budějovice, 9. - 10. 2. 2005, s. 33-36.

- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2005): Genotypy a alely markeru odolnosti k průjmům selat u plemen bílé ušlechtilé, landrase a přeštické černostrakaté. In: *14. mezinárodní konference Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*. České Budějovice, 9.-10.2.2005, s. 81-84.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., CIVÁŇOVÁ, K. (2005): Dvojí osvalení u prasat plemene bílé ušlechtilé. In: *14. mezinárodní konference Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*. České Budějovice, 9.-10.2.2005, s. 85-88.
- KUČEROVÁ, J., FRELICH, J., VOŘÍŠKOVÁ, J., NĚMCOVÁ, E., ŠTÍPKOVÁ, M., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., ZAPLETAL, P. (2004): Improvement of milk and meat production parameters in Czech Pied Cattle using genetic markers. *Roczniki naukowe zootechniky*, Supl., 19: 19-23.
- KUČEROVÁ, J., NĚMCOVÁ, E., ŠTÍPKOVÁ, M., DVOŘÁK, J., FRELICH, J., BOUŠKA, J., VRTKOVÁ, I. (2004): Association between paternal microsatellite ETH10, heterozygous level of paternal microsatellites and milk production parameters in cattle. *Animal Science Papers and Reports*, Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzebiec, Poland, 22 (2):65-69.
- DVOŘÁK, J., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., VYKOUKALOVÁ, Z. (2004): Genomic and histological research of porcine embryos. In *Abstracts of the XXI Genetic Day*. Wrocław: Agriculture University of Wrocław, s. 1-2.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., PŘÍVĚTIVÁ, L. (2004): Genomika pro produkci, kvalitu a bezpečnost hovězího masa. In *Genetické základy šlechtění na kvalitu jatečných těl a hovězího masa*. Rapotín: Asociace chovatelů masného skotu s. 4-16.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2003): Molekulární genetika masného skotu (Molecular genetics of beef cattle), *12. mezinárodní konference „Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce skotu“*, České Budějovice 18.–19. 2. 2003: 29-30.
- VRTKOVÁ, I., KÚBEK, A., STEHLÍK, L. (2002): Variabilita repetitivní mutace PRNP genu skotu. In *XX. Genetické dny*. 10. vyd. Brno, s. 106-108
- GAZDOVÁ, V., DVOŘÁK, J., STEHLÍK, L., VRTKOVÁ, I., FILISTOWICZ, A. (2002): Variabilita PRNP genu u Polské červinky. In *Študentská vedecká konferencia: Zborník abstraktov prác diplomantov a doktorandov*. Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislave, s. 15-18.
- VYKOUKALOVÁ, Z., VRTKOVÁ, I. (2002): Frekvence genotypů a haplotypů genů ESR a FSHB u prasat v ČR. In *III. vedecká konferencia doktorandov*. Nitra: UKF v Nitre, s. 227-230.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2002): Variabilita dvou kandidátních genů v nukleových chovech vybraných pro tvorbu superplodných linií prasat. In *XVIII. Medzinárodná konferencia o reprodukci hospodárskych zvierat*. 1. vyd. AZ print, s.r.o. v spolupráci so Slovenskou poľnohospodárskou a potravinárskou komorou: Informa Nitra, s. 118-125.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., MATOUŠEK, V., KERNEROVÁ N. (2002): Variabilita dvou kandidátních genů v nukleových chovech vybraných pro tvorbu superplodných linií. *Zborník referátov z XVIII. Medzinárodná konferencia o reprodukci hospodárskych zvierat*, Liptovský Ján, Slovenská republika, 30. – 31. 5. 2002: 118–125.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2002): Konkrétní možnosti využití molekulární genetiky v odhadu plemenné hodnoty metodou BLUP. *Sborník referátů ze VII. odborného semináře na téma „Zoohygiena nedílná součást úspěšné produkce v chovech prasat“*. 24. dubna 2002 Práche: 22-30.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2002): МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ПЛОДОВИТОСТИ СВИНЕЙ В ЧЕШСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ. *Sborník referátů z konference v Moskvě*, 26. – 27. února 2002: 85 – 88.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., PUTNOVÁ, L. (2002): Методы, применяемые в Лаборатории прикладной молекулярной генетики Сельскохозяйственного и лесного университета им. Менделя в г. Брно, ЧР. *Sborník referátů z konference v Moskvě*, 26. – 27. února 2002: 88 – 92.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., FILISTOWICZ, A., KÚBEK, A. (2002): Полиморфизм гена PRNP у скота в чешской республике. *Sborník referátů z konference v Moskvě*, 26. – 27. února 2002: 60 – 63.
- MATOUŠEK, V., KERNEROVÁ, N., VRTKOVÁ, I., KRÁLOVÁ, P. (2002): The influence of RYR1 and ESR genotypes on fertility, *Annals of Animal Science*, Supplement No. 2, 57-61.
- VRTKOVÁ, I. (2001): Variabilita lokusu estrogenového receptoru u kanců BU a L v České republice. In *Genetika a šlechtění zvířat*, 14.9.2001 Přerov. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, 2001, s. 50-51.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2001): Impakt poznatků molekulární genetiky v hybridizačních programech prasat. In *Chov ošípaných v 21. století*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, s. 38300.

- VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L. (2001): Prionové genotypy u Českého strakatého skotu. *In IV odborná konference doktorandů a studentů Genetika a šlechtění zvířat*. 4. vyd. Přerov, s. 82-84.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2001): QTL na X chromozomu asociované s hřbetním tukem. *In Chov ošípaných v 21. století*. Nitra: Slovenská poľnohospodárska univerzita, s. 19-22.
- KMIEC, M., DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2001): Proba ustalenia zalezności pomiedzy wariantami genu receptora estrogenowego (ESR) a niektórymi cechami užitkowosci rozplodowej swiń rasy PBZ. *XIV. Zjazd – Polskiego Towarzystwa Genetycznego* Poznań 11-13. 6. 2001: 56-57.
- DVOŘÁK J., VRTKOVÁ I., MLYNEK, J. (2001): Impact of molecular genetics on breeding programmes in pigs. *Medzinárodná konferencia „Chov ošípaných v 21.storočí“* 12-13.9. 2001: 9-12.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2001): QTL on X chromosome associated with back fat. *Medzinárodná konferencia „Chov ošípaných v 21. století“* 12-13.9.2001: 19-22.
- HORÁK, P., VRTKOVÁ, I. (2001): Variabilita v lokusu estrogenového receptoru u kanců BU a L v České republice. *IV. odborný seminář doktorandů a studentů "Genetika a šlechtění zvířat"*, 14.září 2001, Přerov: 50-51.
- PUTNOVÁ, L., KOLAŘÍKOVÁ, O., NATOLOČZNA-KOTARA, A., KANIAK-POLOK, M., VRTKOVÁ I., DVOŘÁK J. (2001): Polymorphism of *OPN*, *ESR2*, *PRLR*, *MYF4* genes of the pig in the Czech Republic *In: Sb. Medzynarodowa konferencja naukowa*, Wroclaw 5. – 6. 4. 2001: 225 - 233. ISSN 0867-7964.
- KOLAŘÍKOVÁ, O., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2000): Genetics and molecular markers of porcine reproduction. *In: Sb. XVIIth The international Conference on Reproduction of Farm Animals*, 1. - 2. 6. 2000 Liptovský Ján, 149 -153.
- COUFALOVÁ, M., VRTKOVÁ, I. (1999): Diference frekvencí genotypů estrogenového receptoru (ESR) u prasat v České a Slovenské republice. *In: III. Mezinárodní konference doktorandů a pregraduálních studentů „Genetika a šlechtění zvířat“*, 14. 5. 1999, Přerov, str. 71-73.
- DVOŘÁK, J., MLYNEK, J., KOVÁČ, L., VRTKOVÁ, I., CZARNECKI, R., PIETRUSZKA, A. (1999): Variabilita markerového genu myogeninu u jatčných prasat. *In: Sb. Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*, České Budějovice 1999, str. 59-60.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (1999): Perspektivní genetické markery pro šlechtění prasat. *In: Sb. Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*, České Budějovice 1999, str. 33-35.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., HRUŠKA, D., COUFALOVÁ, M. (1999): Genetické markery pro masnou užitkovost prasat. *In: Sb. Aktuální problémy chovu prasat*, Praha, 10.3.1999, str. 11-20.
- HORÁK, P., VRTKOVÁ, I. (1999): Polymorfismus genu transferinu (Tf) u přeštického černostrakatého prasete. *In: III. Mezinárodní konference doktorandů a pregraduálních studentů „Genetika a šlechtění zvířat“*, 14. 5. 1999, Přerov, str. 45-47.
- KANIAK, M., KOTARA, A., JASEK, S., DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (1999): Zależność pomiedzy polimorfizmem (MspI) w genie myogenin a ocena Belgijska Landrace przyzyciowa u swin rasy Polska Biala Zwisloucha. *In: Sb. Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*, České Budějovice 1999, str. 72-75.
- KANIAK, M., KOTARA, A., JASEK, S., TWOREK, M., DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., KRZYKAWSKI, P. (1999): Zależność pomiedzy polimorfizmem (MspI) w genie receptora ryanodiny (RYR1) a ocena przyzyciowa u swin rasy Polska Biala Zwisloucha i Belgijska Landrace. *In: Sb. Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat*, České Budějovice 1999, str. 69-71.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., JASEK, S., NATOKOCZNA-KOTARA, A., KANIAK, M. (1999) : Výsledky DNA testů genu estrogenového receptoru (ESR) u prasat v ČR a v Polsku. *In: Sb. Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat* České Budějovice 1999, str.56-58.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., MLYNEK, J., JASEK, S., KMIEC, M. (1999): Frequencies of the estrogen receptor genotypes in Large White and Landrace pigs. *In: Sb. Ako smerovat' chov ošípaných do 21. storočia*, Nitra, 13.-14.9.1999, str. 206-209.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., MLYNEK, J., PIETRUSZKA, A. (1999): Frequencies of the MYF4 genotypes and alleles in pigs. *In: Sb. Ako smerovat' chov ošípaných do 21. storočia*, Nitra, 13.-14.9.1999, str. 202-205.
- KOLAŘÍKOVÁ, O., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I. (1999): Frekvence genotypů a alel genů estrogenového receptoru (ESR) a ostopontinu (OPN) u různých plemen prasat. *In: Sb. příspěvků*

Publikace anotací ve sbornících z konferencí

- FALKOVÁ, L., VRTKOVÁ, I. (2015): Comparison of SNP variability between two over time clusters of Prestice Black Pied pig boars. *In Research in pig breeding - workshop proceeding book*. 1. vyd. Kostelec nad Orlicí: Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., s. 14.
- SURÝNEK, J., KNOLL, A., VRTKOVÁ, I. (2014): Development of rapid and sensitive quantitative PCR based method for major bovine mastitis pathogens identification. *In Book of abstract International scientific genetic conference "XXVI. GENETIC DAYS"*. 1. vyd. Praha, Česká Republika: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2014, s. 210-212.
- PYATOV, V., VRTKOVÁ, I., KNOLL, A. (2014): Frequency of TetA and TetB genes among Escherichia coli isolated from cows with mastitis. *In Book of abstract International scientific genetic conference "XXVI. GENETIC DAYS"*. 1. vyd. Praha, Česká Republika: Česká zemědělská univerzita v Praze, 2014, s. 207-209.
- VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L., PUTNOVÁ, L., KRATOCHVÍLOVÁ, L., FALKOVÁ, L. (2013): Genetic structure in four selected pig populations of Czech Republic using microsatellite markers. *In Book of Abstracts of the 64th Annual Meeting of the EAAP*. 1. vyd. France: Wageningen Academic Publishers, s. 336.
- VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L., PUTNOVÁ, L., KRATOCHVÍLOVÁ, L., FALKOVÁ, L. (2012): Genetic structure of Czech pig populations for traceability usage. *In Research in pig breeding - workshop proceeding book*. 1. vyd. Kostelec nad Orlicí: Výzkumný ústav živočišné výroby, v. v. i., s. 31.
- KAPLANOVÁ, K., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2011): Využití multiplex PCR-RFLP pro testování polymorfismů kvality hovězího masa. *In Genetická konference GSGM 2011*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, s. 79.
- VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L., PUTNOVÁ, L., BARTOŇOVÁ, P. (2011): Cattle breed discrimination based on microsatellites markers. *In Book of Abstracts of the 62th Annual Meeting of the EAAP*. 1. vyd. Norway: Wageningen Academic Publishers, s. 408.
- KOURKOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., ŠRUBAŘOVÁ, P., (2010): Genetic structure of two pony horse breeds based on microsatellite DNA analysis. *Proceedings of the 32th International Conference on Animal Genetics*, Edinburgh, Scotland. P 3047, s. 77.
- FUTAS, J., VYCHODILOVÁ, L., HOFMANOVÁ, B., VRÁNOVÁ, M., PUTNOVÁ, L., VYSKOČIL, M., VRTKOVÁ, I., MAJZLÍK, I., HOŘÍN, P. (2010): Genes for resistance to melanoma: Can we reveal them in Old Kladruber horses. *Proceedings of the 32th International Conference on Animal Genetics*, Edinburgh, Scotland. P5066, s.136.
- ŠRUBAŘOVÁ, P., VRTKOVÁ, I. (2010): Detection of bovine mastitis pathogens using real-time polymerase chain reaction assay. *In URBAN, T., KNOLL, A., REINÖHL, V., BRZOBOHATÝ, B. Book of Abstracts of XXIVth Genetic Days 2010*. 1. vyd. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, s. 10.
- ŘÍHA, J., KAPLANOVÁ, K., VRTKOVÁ, I. (2010): Interaction of LEP and SCD genes influencing basic carcass traits in crossbred bulls. *In Book of Abstracts of the 61st Annual Meeting of the EAAP*. 1. vyd. Netherlands: Wageningen Academic Publishers, s. 211.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., STEHLÍK, L. (2010): Genomic markers as a modern tool for innovation in animal production. *In Polsi kongres genetyki*. 1. vyd. Lublin: s. 15.
- KAPLANOVÁ, K., ŠRUBAŘOVÁ, P., KOURKOVÁ, L., VRTKOVÁ, I. (2010): The development of microsatellite panel for genetic resource nutria (*Myocastor coypus*) in the Czech Republic. *In URBAN, T., KNOLL, A., REINÖHL, V., BRZOBOHATÝ, B. Book of Abstracts of XXIVth Genetic Days 2010*. 1. vyd. Brno, Czech Republic: Mendel University in Brno, s. 37.
- ŘÍHA, J., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., (2009): Effect of TG5 gene polymorphism on basic chemical composition of beef. *In Book of Abstracts of the 60th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Barcelona, Spain, August 24th-27th 2009, session 14, poster 32, str.147, ISBN 978-90-8686-121-7*.
- KOURKOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., (2009): Monitoring the genetic variability in different horse populations from the Czech republic and the Netherlands. *In Book of Abstracts of the 60th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Barcelona, Spain, August 24th-27th 2009, session 14, poster 87, str.174*.
- HORIN, P., VYCHODILOVA, L., PUTNOVA, L., VRTKOVA, I., VYSKOCIL, M., SEDLINSKA, M., OSICKOVA, J., HANAK, J. (2007): Molecular and association analysis in

an endangered breed: summer dermatitis in Old Kladruber horses. *In Sb. Book of Abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Dublin, Ireland, August 26th-29th 2007, session 29, theatre 5, str. 307.*

PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., HORIN, P., ŘÍHA, J., DVORÁK, J. (2007): Genetic diversity in the genetic resource of Old Kladruber Horse using microsatellite DNA markers. *In Sb. Book of Abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Dublin, Ireland, August 26th-29th 2007, session 10, poster 97, str. 99. ISBN 978-90-8686-045-6.*

VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., MATOUŠEK, V., KERNEROVÁ, N., (2007): MC4R and FUT1 genes in sows of Large White in the Czech republic. *In Sb. Book of Abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production, Dublin, Ireland, August 26th-29th 2007, s.95.*

PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., ŘÍHA, J., BURÓCZIOVÁ, M., DVOŘÁK, J. (2006): THE genetic structure of different horse breeds in the Czech Republic inferred from microsatellite markers. *In: Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics, 2006, Porto Seguro, Brazil. Belo Horizonte, Brazil: CBRA. Section A: Polymorphism and Biodiversity, A378, 3.*

MANGA, I., PUTNOVÁ, L., ŘÍHA, J., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., (2006): Genetic characterization of the Czech Spotted cattle breed using panel of 10 microsatellite markers. *In Book of Abstracts of the 58th Annual Meeting of the European Association for Animal Production. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, 2007, s. 95.*

VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2006): Allele frequency of markers of tolerance to diarrhoea (FUT1, MUC4) and virus disease (Mx1) in pigs in the Czech Republic. *In Proceedings of the 30th International Conference on Animal Genetics, Porto Seguro, Brazil. August 20-25, 2006,.*

PRÍVĚTIVÁ, L., BRATRŠOVSKÁ, P., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2005): Genomic laboratory for student's education and creative activity. *In VI. mezinárodní konference doktorandů a pregrad. studentů "Genetika a šlechtění zvířat"; CD-ROM. 1. vyd. Brno: MZLU v Brně, 2005, s. 159.*

KUČEROVÁ, J., NĚMCOVÁ, E., VRTKOVÁ, I., ŠTÍPKOVÁ, M., DVOŘÁK, J., FRELICH, J., MARŠÁLEK, M. (2004): Relationship between the CSN3 marker and milk production parameters in Czech Pied cattle. *Proceedings of XXXIXth Croatian Symposium on Agriculture with International Participation, 17.-20.2.2004, Opatija, s.725-726.*

PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I., PRÍVĚTIVÁ, L., HURTA, A., BOŘILOVÁ, G., DVOŘÁK, J. (2004): Genetic polymorphisms of the acylCoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) gene and the kappa - casein (CSN3) gene in Czech cattle. *XXI Genetic Days, 1.-3.9. 2004, Wrocław, Poland.*

DVOŘÁK, J., PUTNOVÁ, L., VRTKOVÁ, I. (2003): Genetické markery a spongiformní encefalopatie u skotu (Genetics Markers and Spongiform Encephalopathy in Cattle), *12. mezinárodní sympóziium „Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce skotu“, České Budějovice 2003: 50.*

DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., MATOUŠEK, V., PUTNOVÁ, L. (2002): Polymorfismus tří genů u vytváření superplodné linie prasat. *Genetická konference „Perspektivy genetiky – genomy a genová exprese“ pořádaná Genetickou společností Gregora Mendela ve spolupráci s Katedrou genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty MU v Brně 5. – 6. února 2002*

DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., FILISTOWICZ, A., KÚBEK, A., SZULC, T., ŘEHOUT, V. (2002): Frekvence a asociace genotypů PRNP u skotu. *Genetická konference „Perspektivy genetiky–genomy a genová exprese“ pořádaná Genetickou společností Gregora Mendela ve spolupráci s Katedrou genetiky a molekulární biologie Přírodovědecké fakulty MU v Brně 5. - 6. února 2002 v Brně: 8*

DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2002): Implementace poznatků strukturní a funkční genomiky v programech produkce prasat. *Celostátní seminář „Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat“ 2002: 43.*

HORÁK, P., MIKOVÁ, G., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2002): The significance of black pied prestige pigs as the gene resource the Czech republic. *Sborník přednášek z 11. mezinárodního sympózia „Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat“ 2002, 19. – 20. února 2002: 31.*

STEHLÍK, L., DVOŘÁK, J., ŠRUBAŘOVÁ, P., VRTKOVÁ, I. (2002): Geny resistance na antibiotika z chovů prasat. *Celostátní seminář „Aktuální problémy šlechtění, chovu, zdraví a produkce prasat“ 2002: 42.*

- VRTKOVÁ, I., KÚBEK, A., DVOŘÁK, J., ŘEHOUT, V., TRAKOVICKÁ, A., BULLA, J. (2001): Evaluation of occurrence the prion gene frequencies in cattle. *Proceeding of the 10th International Symposium Biotechnology 2001*, České Budějovice 25-26th September 2001: s. 90.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., MILOTA, J., (2001): The trends of genetic improvement in slaughter pigs production programs. *Proceeding of the 10th International Symposium Biotechnology 2001*, České Budějovice 25-26th September 2001: s. 3.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J., PUTNOVÁ, L. (2001): Genotyping methods of the laboratory of applied molecular genetics. *Proceeding of the 10th International Symposium Biotechnology 2001*, České Budějovice 25-26th September 2001: s. 143.
- VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, A., STEHLÍK, L. (2001): Genotypes of the prion gene and breeding values in bulls of the Czech pied breed. *Proceeding of the 10th International Symposium Biotechnology 2001*, České Budějovice 25-26th September 2001: s. 92.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I., MLYNEK, J. (2001): Molecular genetics in pig breeding. Conference: *Pig breeding in 21. Century, plenary session*, September 2001, Nitra.
- DVOŘÁK, J., VRTKOVÁ, I. (2001): Impact of molecular genetics on breeding in pigs. *Medzynarodowa konferencja naukowa: Trzoda chlewna w gospodarce narodowej*, Wroclaw 5 - 6.4. 2001.
- HORÁK, P., MIKOVÁ, G., VRTKOVÁ, I., DVOŘÁK, J. (2001): Black Pied Prestice-gene reserve of pigs in the Czech Republic. *III konferencja Naukowa "Praca genetyczno-hodowlane nad swiniami ras rodzimych"*, AR im. A.Cieszkowskiego w Poznaniu, 28.-29.11. 2001.
- PUTNOVÁ, L., KOLAŘÍKOVÁ, O., VRTKOVÁ, I. (2000): The influence of estrogen receptor and osteopontin genes on litter size in pigs. In: *Sb. V. Miedzynarodowa konferencja studenckich kól naukowych, XVII. Sejmik SKN*, Wroclaw 17. - 18. 5. 2000, s. 32.
- KOLAŘÍKOVÁ, O., VRTKOVÁ, I. (2000): Is the estrogen receptor gene (ESR) associated with litter size in breed Large White? In: *Sb. Acta fytotechnica et zootechnica, XIX. Dni genetiky*, s. 57.
- DVOŘÁK, J., NEUBAUEROVÁ, V., VRTKOVÁ, I., FRELICH, J., ŘEHOUT, J., KNOLL, A., PUTNOVÁ, L. (1999): Characteristics of polymorphism in the prospective QTLs in cattle and pigs in the Czech republic. In: *Acta fytotechnica et zootechnica „Trendy v agropotravinářstve“*, 1. - 4. 11. 1999, SPU v Nitře, str 101.

Výběr informačních materiálů pro chovatele koní

- Vrtková, I. (2012): Klus-cval-genomika. *Připraveno pro seminář chovatelů koní*. 2.11.2012. 4str.
- Vrtková, I. (2012): DNA genomika zbarvení koní. *Připraveno pro svod fjordských koní*. 4str.
- Vrtková, I., Stehlík, L. (2010): DNA testy pro základní zbarvení koní. 4str. [online]. 2010. URL: <http://www.lamgen.cz>.
- Vrtková, I., Stehlík, L. (2010): DNA testy pro skvrnitá zbarvení koní. *Připraveno pro Paint Horse Club v ČR*. 4str. [online]. 2010. URL: <http://www.lamgen.cz>.
- Vrtková, I., Stehlík, L. (2010): Lokusy ovlivňující zbarvení koní. 4str. [online]. 2010. URL: <http://www.lamgen.cz>.
- Vrtková, I., Stehlík, L. (2010): Zlatý kůň Kinský. *Připraveno pro Národní přehlídku koní Kinských*, 23.10.2010, Hradištko u Sadské. 4str.
- Dvořák, J., Vrtková, I. (2008): Varianty odběru vzorků pro DNA testy u koní. *Připraveno pro chovatele koní*. 4str.
- Vrtková I., Dvořák J. (2004): Určování genetických typů a ověřování paternity u koní. *Informační materiály pro chovatele koní*. 4str.
- Dvořák J., Knoll A., Putnová L., Vrtková I., (2002): LAMGen určuje „genetický typ“ a ověřuje „původy“ prasat, skotu a koní. *Informační materiály pro odbornou veřejnost*. 4str.

Přednášky a texty pro studenty

- Šrubařová P., Vrtková I., Dvořák J., Divácká L., Kourková L., (2009): IZOLACE DNA, *Seminář molekulární biologie a genetiky vedený RNDr. Pavlem Vařejkou, Gymnázium Brno tř. Kpt. Jaroše*

Šrubařová P., Vrtková I., Dvořák J., Divácká L., Kourková L., (2009): IDENTIFIKACE DRUHOVĚ SPECIFICKÉ DNA POMOCÍ PCR, *Seminář molekulární biologie a genetiky vedený RNDr. Pavlem Vařejkou, Gymnázium Brno tř. Kpt. Jaroše*

Šrubařová P., Vrtková I., Dvořák J., Divácká L., Kourková L., (2009): PCR - POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE, *Seminář molekulární biologie a genetiky vedený RNDr. Pavlem Vařejkou, Gymnázium Brno tř. Kpt. Jaroše*

Dvořák J., Putnová L., Vrtková I., (2002): OVĚŘOVÁNÍ PARENTITY U PRASAT, SKOTU A KONÍ, *Studijní text pro studenty specializace "Genetika a šlechtění zvířat" MZLU Brno*

Vrtková I., Dvořák J., (2006): LAMGEN PRO CHOVATELSKOU PRAXI, *Seminář a tvůrčí práce žáků a pedagogů SŠ na MZLU v Brně, Iniciale a podpora zájmu talentovaných žáků z oborů molekulární genetiky a modelování dopadů využívání obnovitelných zdrojů na životní prostředí, prezentace*