

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra obecné zootechniky a etologie**



**Genomika ve šlechtění anglického plnokrevníka**

**Bakalářská práce**

**Autor práce:**

**Veronika Větvičková**

**Vedoucí práce:**

**doc. Mgr. Ing. Ivan Majzlík, CSc.**

**© 2016 ČZU v Praze**

### **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Genomika ve šlechtění anglického plnokrevníka" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 14.04.2016

---

Veronika Větvíčková

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala docentu Majzlíkovi, za vedení mé bakalářské práce a dále také všem odborným pracovníkům České zemědělské univerzity v Praze při získávání znalostí v průběhu studia.

# Genomika ve šlechtění anglického plnokrevníka

## Souhrn

Bakalářská práce popisuje přehled genomických metod ve šlechtění anglického plnokrevníka. Práce shrnuje charakteristiku plemene, k čemu se dříve využívalo a jaké je jeho optimální zařazení dnes. Díky metodám které se používají pro šlechtění a optimální zařazení v dostizích, získávají chovatelé velmi cenné informace o tom, zda li jejich koně mají tu možnost dosáhnout optimálních závodních vlastností. Chovatelé mají díky těmto metodám možnost přizpůsobit tomu svůj chov a poté i následný trénink.

**Klíčová slova:** anglický plnokrevník, MSTN, PCR, rychlostní gen, selekce

# **Genomics in Thoroughbred breeding**

## **Summary**

Bachelor work describes the overview of the genomics method in Thoroughbred breeding. This work is summarizes the characteristics of the breed, to what they had previously used and what is its optimum inclusion today. Its the methods, that are, used for breeding and optimal classification in the race, gaining the keepers of very valuable information about whether their horses have the opportunity to achieve optimal racing properties. Breeders have these methods, the ability to customize your breeding and subsequent training.

**Keywords:** thoroughbred, MSTN, PCR, fast gene, selection

## Obsah

1 Úvod.....	7
2 Cíl práce .....	8
3 Literární rešerše.....	9
3.1 Historie a vývoj anglického plnokrevníka .....	9
3.2 Dědivost znaků a vlastností Anglického plnokrevníka.....	11
3.2.1 Šlechtění anglického plnokrevníka.....	13
3.3 Genomické skenování pro pozitivní selekci anglického plnokrevníka.....	14
3.4 Myostatin.....	17
3.4.1 Celogenomová SNP asociační studie .....	18
3.4.2 Myostatinový gen u dostihových koní.....	19
3.5 Rychlostní gen.....	22
3.5.1 Další studie rychlostního genu.....	23
3.6 Integrace genomických informací do sportovního šlechtitelského programu koní pro optimalizaci přesnosti výběru.....	24
3.7 Ověření rodičovství anglického plnokrevníka pomocí mikrosatelitů .....	26
4 Závěr .....	29
5 Souhrn literatury.....	30

# 1 Úvod

Plnokrevní koně patří mezi nejcennější zvířata na světě, jejichž genetická rozmanitost byla rozsáhle studována. Především je v posledních letech velmi populární genetická studie atletických výkonů anglického plnokrevníka, proto je zde velká snaha identifikovat konkrétní geny, pro lepší zařazení koní dle náročnosti jednotlivých dostihových závodů.

Hlavním cílem této práce je zhodnotit používané metody, které jsou aplikovatelné pro chov, šlechtění a využití anglického plnokrevníka, zejména se jedná o závodní vlastnosti a jejich přenos z generace na generaci.

První část této práce se zabývá stručnou charakteristikou anglického plnokrevníka, jedná se především o vznik a využití tohoto plemene. Dále jsem se zde zaměřila na dědivost znaků a vlastností, především jaké faktory přímo nebo nepřímo tyto znaky ovlivňují a také jaké metody a analýzy se pro tato stanovení používají. Zaměřila jsem se také na konkrétní geny, které buď přímo či nepřímo ovlivňují funkční schopnosti, především se jedná o myostatinový gen, který přispívá ke svalové hypertrofii, a vědci se domnívají, že by tato svalová hypertrofie mohla určovat, do jaké optimální závodní vzdálenosti by mohl být kůň zařazen. Vědci také identifikovali oblast DNA na chromozomu 18, o kterém se domnívají, že by mohl být spojen se závodními výkony.

V závěru jsem se zaměřila na téma ověřování rodičovství pomocí mikrosatelitů. V této studii vědci především používají mikrosatelity, které byly vybrané vzhledem k jejich vysoké úrovni polymorfismu, používají se pro individuální identifikace, dále se také využívají pro řešení problémů nejistého mateřství či otcovství, při ověřování se také uplatňují DNA markery, kteří mají rozsáhlé schopnosti rozlišovat mezi jednotlivci.

## **2 Cíl práce**

Cílem této práce je vypracovat přehled genomických metod ve šlechtění anglického plnokrevníka.



## 3 Literární rešerše

### 3.1 Historie a vývoj anglického plnokrevníka

Anglický plnokrevník byl uznán jako plemeno v roce 1791, kdy byl vydán první svazek anglické plemenné knihy – General Stud Book. Uznání plemene ale předchází několik staletí chovatelské činnosti, kdy byli v Anglii chováni koně různého původu a vývoj chovu a jeho účel byl samozřejmě poplatný i každé době, která kladla nároky na to, jaké koně společnost právě potřebuje. Původním základem pro vznik plnokrevníka byli takzvaní „hobby“ koně, kteří byli v průběhu několika staletí ovlivňováni přílivem krve celé řady plemen koní chovaných ve světě. V 10. století to byli například koně starošpanělští, později normanští a od 12. století koně z Orientu. Z hřebců použitých v chovu se nejvíce uplatnili tři, kteří jsou uváděni jako zakladatelé plemene. Jsou to Byerley Turk, Darley Arabian a Godolphin Barb. Nežili ve stejné době a jejich osud byl velmi rozdílný. Na rozdíl od převážné většiny ostatních plemen koní není u anglického plnokrevníka kladen důraz na typovou vytrvalost a tělesný rámec. Jako plemeno je již několik staletí selektován pouze na výkonnost v rychlosti. Selekcí tlakem se vyšlechtily určité charakteristické exteriérové vlastnosti, z nichž je možno uvést štíhlost, ušlechtilost, harmonii tělesných tvarů, suchost vyjádřenou tenkou kůží a výraznými suchými klouby a šlachami. Důležitou exteriérovou vlastností u plnokrevníka je tvar a prostornost hrudníku, podmiňující kapacitu plic a srdce. Pro správný cvalový výkon je důležitá dlouhá a šikmo položená lopatka. Tělesný rámec je většinou obdélníkový, ale často se vyskytuje také čtvercový, což lze asi přičítat vlivu orientálních předků. Končetiny jsou u plnokrevníků relativně delší oproti jiným plemenům koní. Jedná se především o délku v holeni, která umožňuje dlouhý a plochý cvalový skok. Charakteristickým znakem plnokrevníka je často delší spěnka, která ale není vadou, pokud je správně postavená a pevná. Velmi důležitou vlastností pro výkonnost plnokrevníka je jeho osvalenost, zejména zádě. Mohutné svalstvo zádě je motorem pro posun vpřed. Plnokrevník je nejranějším plemenem koní, protože je zkoušen na výkonnost již ve dvou letech, kdy ještě zdaleka nedosahuje fyzické dospělosti. I díky tomuto předčasnému tělesnému zatěžování a následné selekci získal tvrdou konstituci, jinak řečeno vysoký stupeň odolnosti proti nepříznivým vlivům tělesné námahy. Je známo, že nejvyšší nárok na odolnost koně klade požadavek na rychlost. Exteriér plnokrevníka je pouze jednou složkou výkonnosti koně, a to hlavně z pohledu exteriérových vad, které negativně ovlivňují výkonnost. Rozhodujícími složkami výkonnosti jsou konstituce, charakter a temperament (Hlačík Z., 2010).



Darley Arabian. <Dostupné z: <http://www.tbheritage.com/Portraits/DarleyArabian.html>>  
[cit. 2016 – 30 – 03]



Godolphin Barb. <Dostupné z: <http://www.allbreedpedigree.com/alice13>>  
[cit. 2016 – 30 – 03]



Byerley Turk. <Dostupné z: <http://www.tbheritage.com/Portraits/ByerleyTurk.html>>  
[cit. 2016 – 30 – 03]

Téměř všech 500 000 tisíc světových plnokrevných dostihových koní pocházejí podle nové genetické studie z 28 předků, narozených v 18. a 19. století, a až přibližně 95 % plnokrevných hřebců lze dohledat k jedinému hřebci zakladateli. Anglické klisny byly připarované s arabskými a dalšími hřebci, čímž vznikl kůň, který se vyznačuje velkou výdrží v distančních dostizích. Pro posouzení genetické rozmanitosti dnešních dostihových koní, Cunningham (1991) zjistil, že ve srovnání s 13 mikrosatelitními DNA lokusy, které se v sekvencích DNA opakují a které se liší v délce, je většina dnešních potomků z pouhých 28 zakladatelů. Bylo známo, že jen hrstka hřebců, ale mnoho klisen, bylo použito, aby založili plnokrevné plemeno. Překvapivě nový výzkum prokázal, že u 95 % dnešních závodních koní může být Y – chromozóm vysledován k jedinému hřebci zakladateli – a to k Darley Arabian, který se narodil v roce 1700 (Bailey 1998).

### **3.2 Dědivost znaků a vlastností Anglického plnokrevníka**

Šlechtitelský výběr koní se rozvíjel za použití kvantitativních genetických metod pro výpočet dědivých vlastností, jako je výkon při závodních a sportovních soutěžích. Genetické indexy jsou nyní vypočteny u různých plemen koní, protože je cílem vybrat ty nejlepší hřebce a klisny, u kterých je dobře definovatelný genetický cíl podle šlechtitelského plánu. Další využití variability a taktéž i charakteristiky onemocnění byly studovány stejnou kvantitativní genetickou metodou. S velkým rozvojem biotechnologie, začala molekulární genetika vycházet z určitého věku studovaných koní (Barrey 2010). V poslední době, se taktéž chovatelé obrátili na molekulární biologii a používání DNA markerů pro ověření rodičovství. Využívá se k tomu metoda polymerázové řetězové reakce (dále jen PCR), která je aplikovatelná na detekci krátkých opakovaných sekvencí, které se také označují jako mikrostelity. Markery mikrosatelitů jsou rovnoměrně rozložené napříč genomem a jsou vysoce polymorfni, mohou být také identifikovány ze vzorků DNA za použití PCR metody. Tato technologie se používá pro ověření rodičovství a pro individuální identifikaci koní. Může být také použita i pro kontrolu markerů spojených s výkonnostními vlastnostmi nebo s genetickou poruchou. Odhad dědivosti je chovatelská pomůcka, která může pomoci v rozhodování, kteří koně se budou pářit na základě zlepšení znaků a výkonu, rovněž lze takto předvídat jak tyto znaky u potomků zlepšit. Některé vlastnosti jsou totiž ovlivněny pouze geneticky anebo pouze prostředím, ale jsou zde i ty vlastnosti, které mohou být ovlivněny jak prostředím tak geneticky.

V experimentu bylo analyzováno 34 koní z 200 členného stáda anglických plnokrevných koní, ze kterých bylo sedm úplných rodin. Úspěšné rozšíření produkce alel vyvrcholily s přidruženou PCR skupinou v rámci maximálního dosahu osmi párů bází od vrcholu alel. Počet vrcholů alel závisí, zda testovaný jednatlivec je heterozygot nebo homozygot. Vztah mezi rodičem a potomkem je tedy padesát procent. Pro každou generaci je jednatlivec odebrán z jiné generace, a to proto, aby se genetický účinek snížil na polovinu (Georgescu et al, 2004). Faktory, včetně genetiky, životního prostředí a náhody, přispívají k variaci mezi jednatlivci a k jejich pozorovatelným vlastnostem. Na dědivost jednoho znaku je v populaci podíl pozorovatelných rozdílů v konkrétních znacích a to jak mezi jednatlivci tak i v rámci populace. Odlišnosti jsou způsobené geneticky. Vzhledem k tomu, že dědivost je podíl, bude se jeho hodnota pohybovat v rozmezí od 0,0 (jsou to geny, které nepřispívají k fenotypovým individuálním rozdílům) až do 1,0 (geny, které jsou jediným důvodem pro individuální rozdíl). Například někteří koně jsou rychlejší než ostatní. Vědci se proto snaží určit, jak moc je rychlejší část populace ovlivněna geneticky, životním prostředím anebo jinými faktory. Pokud jde o plnokrevníky, je možné, že dědivost rychlosti jako vlastnosti, lze zvýšit v případě, pokud se variabilita životního prostředí sníží, což znamená, že jednatlivec bude vykazovat menší fenotypovou variaci. Mezi znaky, které jsou vybrané především z výsledků závodních časů z každého dostihového závodu, je dané pouze přímé měřítko k určité rychlosti, a je zde vhodné použití kvantitativního měření, které lze také použít k vyhodnocení genetického výkonu dostihových koní. Hlášené odhady dědivosti z výsledků závodních časů jsou ale nízké (tj. <20%). Proto se většina současných studií zaměřila na výdělek nebo na postavení vlastností a různých transformací těchto vlastností s cílem vytvořit hodnotu, která má vysoký podíl dědivosti. Průměrné odhady dědivosti ukázaly, že výkony rychlosti budou zaznamenány z výdělku a z handicapu, což jsou hodnoty vysoce dědivé, nejlepší časy jsou nepatrně mírně dědivé a konečné časy a výnosy jsou málo dědivé. Cílem veškeré metodologie v odhadu plemenné hodnoty je genetické šlechtění populace. To znamená, že při vytváření generalizované populace, je třeba se zaměřit na přesné údaje, které se týkají zvířat, a hlavně na ta zvířata, která s největší pravděpodobností budou vybrána (plemeník / chovná klisna). Náhodný regresní model a Bayesovský postup, mohou nabídnout cenné informace pro hodnocení při řízení živočišných genetických zdrojů. (performancegenetics.com)

### 3.2.1 Šlechtění anglického plnokrevníka

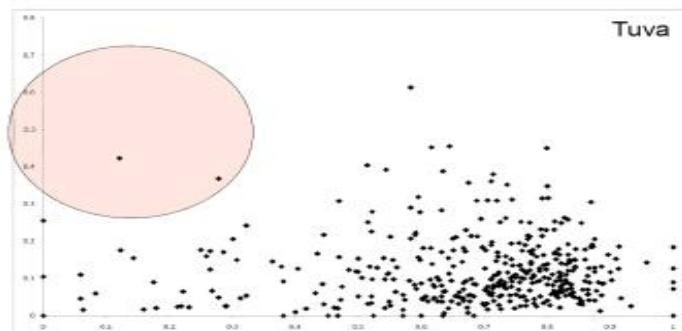
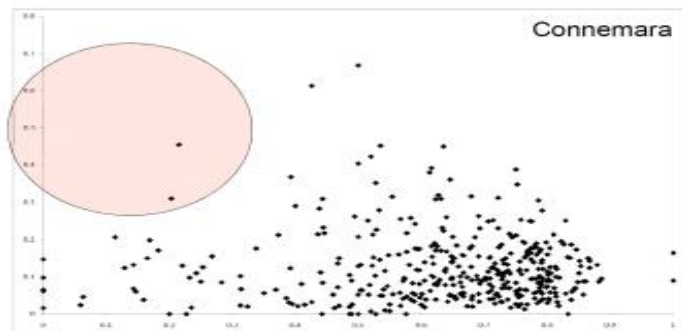
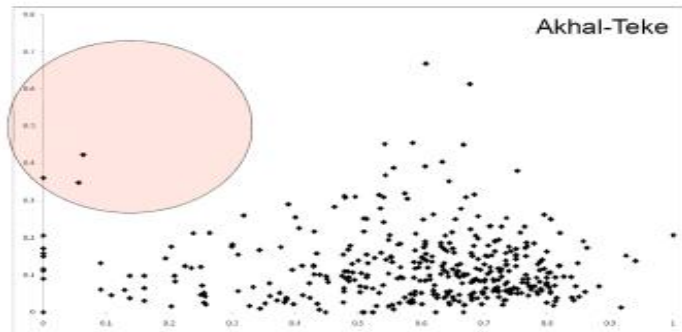
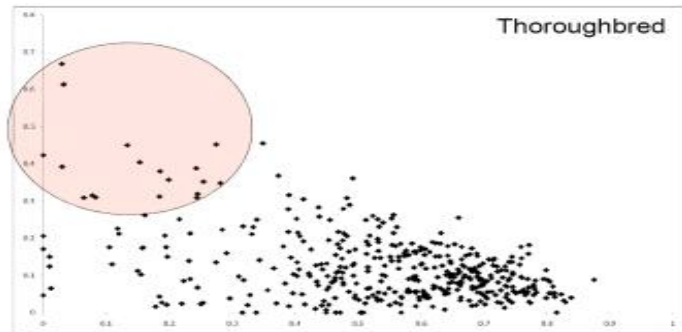
V současné době jsou moderní plány ve šlechtění zvířat uplatňovány u většiny populací koní po celém světě, zejména v Evropě. Genetická hodnocení jsou často používána na základě modelu nejlepšího objektivního lineárního odhadu – BLUP, ze kterého jsou využívány hluboké a poměrně kompletní rodokmenové struktury. Genetický pokrok určitých vlastností v chovném cíli je odhadován v ročním vzestupu o 3 – 6 % z fenotypové směrodatné odchylky, dále byl genetický pokrok popsán i v několika dalších populacích. Odhad a frekvence genetického pokroku dobře korespondují s očekáváním u daných pozorovatelných genetických variabilit, intenzivních výběrů, přesností výběrů a generačních intervalů. Obecně platí, že změny v jaderné DNA se zdají být v chovu koní zásadní. Stejným způsobem se využívá i výběr ostatních hospodářských zvířat. Proto se nemůžeme divit, že chovatelé plnokrevných koní spoléhají na variaci z mitochondriální DNA, a považují to jako zdroj pro zlepšení vlastností a závodních schopností (Arnason 2013). Harrison and Turrion – Gomez (2006) potvrdili, že různé mitochondriální DNA haplotypy se zdají být prospěšné pro různé řazení koní do určitých optimálních vzdáleností v dostizích, a proto jsou tedy spojené s výdrží. Pomocí mitochondriální sekvenční analýzy DNA Hill et al, (2002); Harrison and Turrion – Gomez (2006) našli rozsáhlé chyby v plemenné knize plnokrevníků General Stud Book, což by mohl být problém pro některé chovatele plnokrevníků, kteří spoléhají na mateřské linie, pomocí kterých z rodokmenů determinují informace. Naskytá se zde otázka: je mateřská linie a mitochondriální DNA opravdu tak důležitá v chovu plnokrevníků ve srovnání s jadernou DNA variací. Tradiční přesvědčení chovatelů plnokrevných koní je, že chovná klisna, spíše než plemenný hřebec, více přispívá k předávání závodních vlastností (zejména výdrž), a mohly by jim být také připsány environmentální mateřské účinky. Dále by také měla být analyzována s přímým versus mateřským (nebo jaderné versus mitochondriální) modelovým účinkem (Arnason 2013).

### 3.3 Genomické skenování pro pozitivní selekci anglického plnokrevníka

Vzhledem k tomu, že výběr byl donedávna intenzivní pouze pro uzavřenou populaci, který vycházel z malého počtu zakladatelů, představují plnokrevníci unikátní populaci, ve které by se mohli identifikovat genomové příspěvky spojené se sportovními rysy. Použitím populační genetiky, založené na stopovacím mapování, bylo provedeno skenování genomu pomocí 394 autosomálních a X chromosomálních mikrosatelitních lokusů a byly pozitivně identifikované selekční lokusy, které se nacházejí na krajních koncích a které jsou založené na distribuci odchylek od očekávané heterozygotnosti (pomocí Ewens – Wattersonova testu) u plnokrevníků ( $n=112$ ) a globální diferenciaci mezi čtyřmi geograficky odlišnými populacemi koní ( $F_{ST}$ ), (Gu et al., 2009). Byly zjištěny pozitivní genomové oblasti u plnokrevníků, které jsou obohaceny o zprostředkovanou fosfoinositidovou signalizaci (3,2 – složeného obohacení;  $P < 0,01$ ), receptor signalizace inzulinu (5,0 – složeného obohacení;  $P < 0,01$ ) a transportu lipidních (2,2 – složeného obohacení;  $P < 0,05$ ) genů. Našlo se velké významné zastoupení sarkoglykanového komplexu (11,1 – složeného obohacení;  $P < 0,05$ ) a fokálních adhezních drah (1,9 – složeného obohacení;  $P < 0,01$ ) genů zdůrazňujících funkci pro posílení svaloviny a celistvosti atletického fenotypu u plnokrevníků (Gu et al., 2009). Plnokrevníci mají řadu extrémních fyziologických vlastností, které jim umožňují vysoké anaerobní a aerobní metabolické schopnosti. Ve srovnání s ostatními sportovními druhy podobné velikosti, aerobní kapacity nebo maximální příjem kyslíku jsou ( $VO_{2max}$ ) u plnokrevníků lepší ( $> 200$  ml  $O_2$ /kg/min), a je tedy dosaženo kyslíkové přenosové kapacity. Dodání kyslíku usnadňuje strukturální a funkční přizpůsobení zahrnující respirační a kardiovaskulární systém. Konkrétně některá tyto přizpůsobení zahrnují velký objem plic, vysoké maximální koncentrace hemoglobinu a srdečního výdeje, stejně tak i velký podíl svalové hmoty (přibližně 55 %), tělesné hmotnosti k poměru ke kosterní svalovině, mitochondriální hustoty, oxidační aktivity enzymů a velké intramaskulární výměny energetických substrátů (primárně se jedná o glykogen) ve kterých je ekvivalentní koncentrace dosažena pouze v lidských kosterních svalech po sacharidovém zatížení (Essen – Gustavsson et al., 1985., Hinchcliff et al., 2008., Hyyppa et al., 1997., Poso et al., 1993). Podobně jako lidé, je  $VO_{2max}$  u koní obvykle omezen přístupem kyslíku do mitochondrií, nikoli však mitochondriální oxidační kapacitou (Wagner 1995), a ani s pomocí dýchacího systému u koní nelze uspokojit metabolické požadavky výkonu svalů (Katz et al., 2005.,

Dempsey et al., 1999). Přestože fyzické a fyziologické adaptace přispívají k elitní fyzické zdatnosti a jsou u plnokrevníka dobře popsány, a to i přesto, že doposud nebyly určeny konkrétní geny, které přispívají ke sportovnímu fenotypu. Proto bylo použito stopovacího mapování pro lepší přístup k identifikačnímu popisu u pozitivního výběru genomu plnokrevných koní a na tomto základě byly lokalizované genomické oblasti obsahující geny, které ovlivňují fenotyp (Gu et al., 1999).

Za normálních okolností výběr sám o sobě nerozhoduje o mikrosatelitech jako takových, ale spíše o genech které jsou spojené v jejich těsné blízkosti. Proto nejbližší sousední lokus, který splňuje nevyhraněné předpoklady, bude použit k definování oblastí přechovávající předpokládané vybrané geny; i když se předpokládá, že vybrané geny se nacházejí blízko centrálního lokusu než kterýkoli jiný sousední lokus. U vazebné rovnováhy se očekává, že se bude u plnokrevníků pohybovat mezi 1-2 MB, nicméně silný účinek selekce by mohl porušit lokusy, které se nacházejí podstatně dále (Mickelson et al., 2009). Byla tedy provedena analýza sekvence koňského genomu, pro geny s vyšším hodnocením v oblastech, které se odchylojí od očekávané heterozygotnosti u plnokrevníka. Tato analýza zahrnovala odchylky  $F_{ST}$ , která potvrdila vybrané oblasti v Evens – Wattersonově testu, protože byli vybráni nejlepší kandidáti, kteří mají geny podle cíleného výběru. V seznamu 765 genů z 19 oblastí byly vybrané ontologické (dále jen GO) geny podle podmínek, které mohou být důležité pro výcvik, a které souvisí se sportovním fenotypem (Harris et al., 2008).



$F_{ST}$  (svislá osa) heterozygotní (vodorovné ose) plocha plnokrevníka, Achal – Teke, Connemara a Tuva na 394 celogenomových mikrosatelitních lokusech.

$F_{ST}$  statistika byla použita k identifikaci genomových oblastí, která odlišuje plnokrevníky od teplokrevníků. Protože  $F_{ST}$  může být ovlivněna nestejnou velikostí výběrového souboru a tím je i omezeno hledání genů se zájmem o devět vysokých  $F_{ST}$  oblastí, které také měly významné odchylky od očekávané heterozygotnosti u plnokrevníků.

Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2685479/> [cit 2016 – 05 – 02]



### 3.4 Myostatin

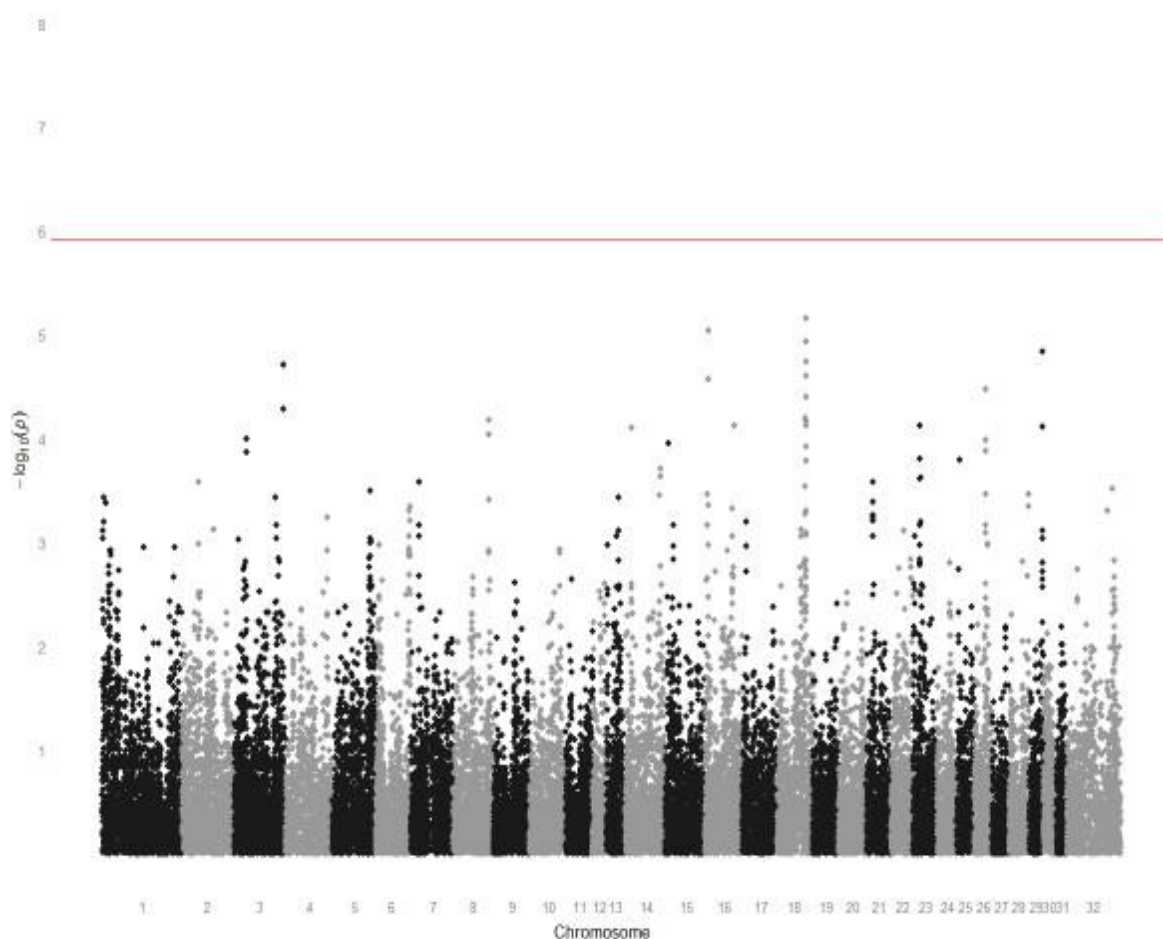
Myostatinový (dále jen MSTN) gen obsahuje pokyny pro přípravu proteinu též nazývaný myostatinový. Tento protein je součástí transformujícího růstového faktoru beta (TGF) superrodiny, což je skupina proteinů, které pomáhají kontrolovat růst a vývoj tkání v celém těle. MSTN se nalézá téměř výlučně ve svalech používaných pro pohyb (kosterní svalstvo), a které je aktivní před i po narození. Tento protein normálně zadržuje růst svalů a zajišťuje, že svaly nebudou příliš velké (grh.nlm.nih.gov).

Dříve již byly prokázány varianty MSTN genu, které přispívají ke svalové hypertrofii u řady savců. U koní, zejména potom u plnokrevníků, kteří mají více svalové hmoty k poměru tělesné hmotnosti (55%) ve srovnání s jinými druhy savců (30 – 40%), je zřejmé, že genom u plnokrevníků obsahuje tyto fenotypové důkazy MSTN genů (Hill et al., 2010).

MSTN je členem transformujícího růstového druhu faktoru  $\beta$  (beta), který je vytvářen v kosterním svalu a působí jako negativní regulátor svalové hmoty. Několik přírodních mutací v MSTN bylo identifikováno u skotu, ovcí, myší, a v neposlední řadě i u lidí, což vedlo až k dvojnásobnému osvalení. Tato studie se snaží zjistit, zda v genomu koní existuje nějaký specifický lokus, který je spojený se vzdáleným zaměřením na dostihové koně, za pomoci přístupu celého genomického sdružení (Binns 2010). Doposud nebyly zkoumány účinky dalších jaderných genových variant, které by mohly přispět k takovému fenotypu u koní, který by souvisel s výkonem. Proto byla provedena asociační studie SNP celého genomu pomocí (EquineSNP50) korálkového čipu, genotypizací celé řady skupin koní, kteří zvítězili v elitních dostihových závodech. Zvířata poté byla rozdělena do dvou fenotypových skupin zahrnující krátkou vzdálenost v dostihu ( $> 8$  f) a středně dlouhou vzdálenost v dostihu ( $< 8$  f), a toto genetické sdružení bylo vyhodnoceno za pomoci nejlepších závodních výkonů koní, jako kvantitativní fenotyp (Binns 2010).

### 3.4.1 Celogenomová SNP asociační studie

Ve skupině založené na genotypu a fenotypu bylo provedeno srovnání ve dvou skupinách: na krátké ( $\leq 8$  f) a středně dlouhé ( $> 8$  f) vzdálenosti elitních závodních vítězů v dostizích. Pomocí GWAS jsou výsledky seřazeny podle chromozomů. Nejvýznamnější SNPs byl na chromozomu 18 (BIEC2 – 417495,  $P = 6,96 \times 10^{-6}$ ) a pět z dalších deseti nejlepších SNPs byli společně umístěny v intervalu 2,4 Mb v oblasti nacházející se na chromozomu 18 (chr18:64725066 - 67186093). Nicméně žádný SNPs v této analýze nedosáhl celogenomového významu následujících korelací pro vícenásobné testování (Hill et al., 2010).

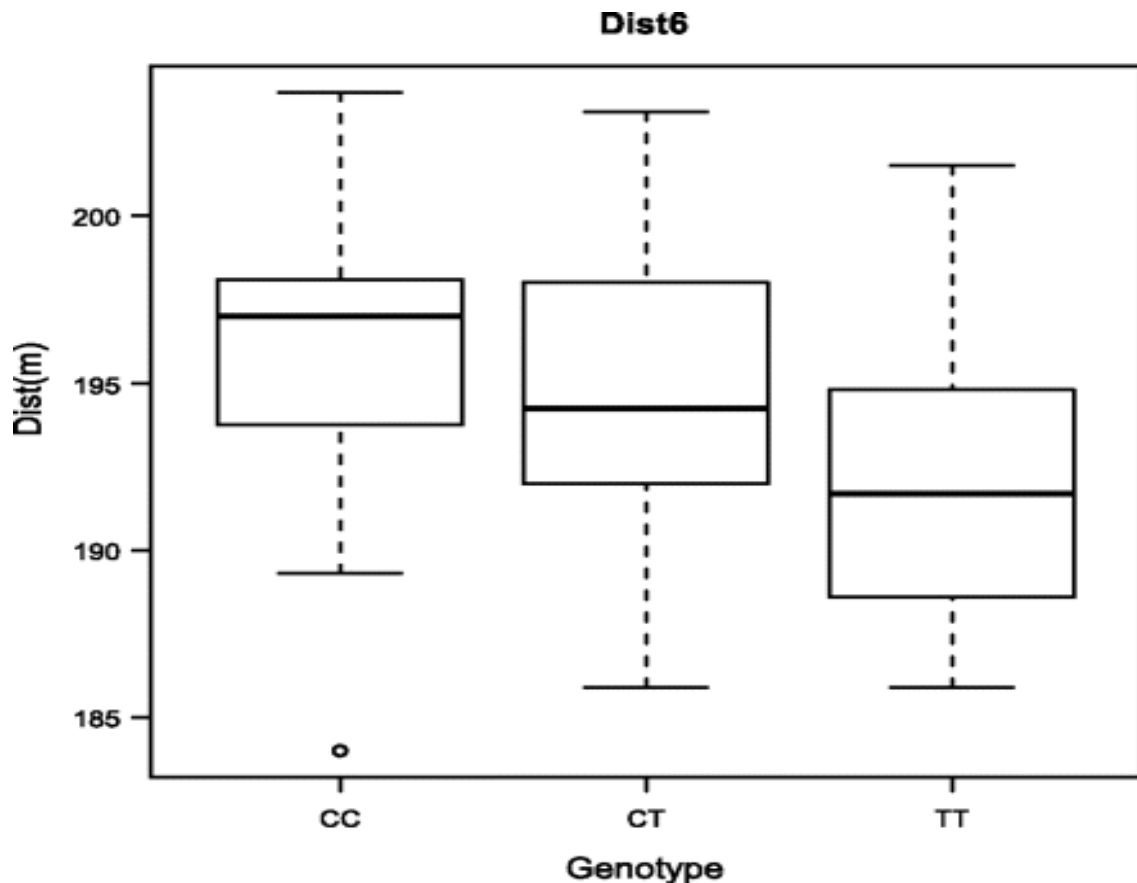


Osa y –  $\log_{10}(P)$  - hodnot) a osa x jsou fyzické pozice SNPs seřazené podle chromozomu a chromozomových pozicí. Nejvýznamnější SNP byl na chromozomu 18 (BIEC2 - 417495). Žádný z SNP nezůstal statisticky nevýznamný pro následné vícenásobné korelační testování. <Dostupné z: <http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-11-552>> [cit 2016 – 04 – 04]

### 3.4.2 Myostatinový gen u dostihových koní

Sportovní fenotypy koní jsou výrazně ovlivněny prostředím, managementem a výcvikem. Nicméně bylo dlouho uznáváno, že existují skryté genetické faktory, které ovlivňují funkční schopnosti sportovních koní. Ve skutečnosti je výběr a chov dostihových koní založen na přesvědčení, že závodní výkony zdědily. I když fyziologická adaptace velmi dobré fyzické zdatnosti a výkon jsou pro plnokrevníky dobře popsány, je jen málo genů, které byly identifikované, aby byly schopny vysvětlit tyto vlastnosti. U lidí bylo hlášeno více než 200 genů, které mají být spojené s kondičním zdravím a vlastnostmi získané tréninkem a je pravděpodobné, že závodní výkony u plnokrevníků jsou polygenní a ovlivňované geny, které se podílejí na široké škále anatomických, metabolických a fyziologických přizpůsobení, které jim umožňují kvalitní závodní výkony. Sportovní potenciál dostihového koně bude proto záviset na příznivém životním prostředí, stejně tak jako na zdědění optimálních kombinací DNA variant na lokusech, které významně ovlivňují jejich výkon. V sekvenční variaci MSTN lokusu u koní, již dříve bylo prokázáno, že má jedinečný genomický vliv na optimální závodní vzdálenosti u plnokrevných koní. Požadovaný charakteristický výkon pro dostihové koně závodících v rovinových dostizích zahrnují zejména - zrychlení, rychlost, a schopnost udržet maximální rychlost v určitých vzdálenostech. I když již dříve bylo řečeno, že není žádná souvislost mezi různými parametry rychlostí, které byly měřené v průběhu tréninku a závodním výkonem ve skupině koní v rovinových dostizích, byla zde spíše pozorována spojitost mezi zrychlením a sprinterskou schopností (Fonseca et al, 2010). S ohledem na přínos kosterní svaloviny má spíše vliv generace a rychlost. V této studii se předpokládalo, že rychlostní parametry, měřené ve skupině koní pomocí technologie jako je GPS, kteří jsou v tréninku, mohou být ovlivněny g. 66493737 C/T genotypy na myostatinových lokusech (Hill et al, 2011). Byl zkoumán vliv g. 66493737 C/T genotypu pro rychlostní index ve skupině plnokrevných koní, trénovaných stejným trenérem a chováni ve stejném prostředí. Zatímco rozsah vzorků genů je malý ve srovnání se studií v lidské populaci a jsou zde také relativně nízké genomové a fenotypové změny pozorované u plnokrevníků, v důsledku společných předků a intenzivnímu výběru zaměřeného na sportovní rysy neznámá, že i přes tento malý počet vzorků se nemohou zjistit užitečné údaje. Navíc stejnorodost populace je rozšířená a díky chovu ve stejném prostředí se minimalizuje ovlivnění negenetickými faktory, které mají vliv na změnu výkonu. Tyto statistické analýzy byly dále vypracované jako proměnné parametry, u kterých už již dříve

bylo prokázáno ovlivnění změny rychlosti ve stejné skupině trénovaných koní (Fonseca et al, 2010). Podle očekávání z naměřených rychlostních hodnot se zjistilo, že byly propojeny a to i vzhledem k silné korelaci mezi fenotypy. Nejvýznamnější pozorování je Dist6, které popisuje celkové rozdíly v rychlostech (Hill et al, 2011).



Vztah mezi zaběhnutou vzdáleností během 6 sekund před a po Vmax (Dist6). V průměru koně C/C uběhli větší vzdálenost než je 3,8 metrů, oproti koním T/T, koně C/T se v zaběhnutém čase pohybovali mezi homozygoty a heterozygoty.

Dostupné z: <http://jap.physiology.org/content/112/1/86.short> [cit. 2016 – 27 – 03 ]

Bylo prokázáno, že genotypy na MSTN g. 6493737 C/T lokusu mohou mít významný vliv na stanovení individuálních rozdílů v rychlostech plnokrevných koní. V poslední době, byla zjištěna změna na MSTN lokusech, a to, že se dají předvídat na základě pozorování genetického potenciálu pro závodní schopnosti plnokrevníka. MSTN lokus je spojen s fenotypovou svalovou hypertofií v řadě savčích živočišných druhů a s jednonukleotidovým polymorfismem (SNP, g. 66493737C/T), nacházejícím se na prvním intronu MSTN genu, který ovlivňuje rychlost u plnokrevníků. Pro optimální zařazení koní

do závodů bylo zjištěno, že homozygotní plnokrevní C/C koně se nejlépe hodí k rychlým, krátkým a ke sprinterským závodům (délka tratě: 1000 – 1600 m); heterozygotní C/T koně se účastní středně vzdálených závodů (délka tratě: 1400 – 2400 m); a homozygotní T/T koně se hodí na vytrvalostní závody (délka tratě > 2000 m). Vyhodnocení retrospektivního dostihového závodního výkonu, fyzického růstu a výkonu potomstva hřebců prokázalo, že C/C a C/T koně mají větší pravděpodobnost, že budou fyzicky vyspělejší a budou mít větší úspěch v závodech 2 – letých dostihových koní než T/T koně. Tato zjištění byla následně ověřena ve třech nezávislých studiích, v celogenomové asociaci (GWA) a také v populaci plnokrevníků pocházejících z Irska, Velké Británie, Nového Zélandu, USA a Japonska. Jednotný genomický vliv na optimální závodní vzdálenosti jsou u plnokrevníka nalezeny na MSTN lokusu, který má vysokou dědivost, a je významný v určování závodních vzdáleností ( $h^2=0,94$ ). Další důkazy pro roli chromozomů obsahujících C – alelu, u které bylo zjištěno, že ovlivňuje rychlost, pochází z asociačních testů, které využívají praktický měřitelný koeficient rychlostí z předchozích analýz genotypu g.66493737C/T u Quarter Horse, pro které je vysoká frekvence C/C homozygotů (0,83). Quarter Horse je severoamerické plemeno, které vyniká ve sprintech na vzdálenosti čtvrt míle (400 m) nebo méně. Vzhledem ke specifičnosti jeho postavení při závodě na krátkou vzdálenost, prošlo toto plemeno intenzivním výběrem zaměřeným na rychlost již od svého založení v polovině 18. století (Hsu 2013).

Dříve již byla popsána souvislost mezi optimální závodní vzdáleností a SNP (g. 66493737 C > T) v MSTN genu u plnokrevníků, kteří běhají rovinové dostihy (Hill et al., 2010). Koncepce kandidátních genů jsou konstruovány s ohledem na předchozí hypotézy a tudíž ani nemohou neposkytnout podmínky pro vyhodnocení účinku genu v rámci celého genomu, a ani jim neumožňují identifikaci dalších genů, které přispívají k fenotypu (Jorgensen et al, 2009; Tabor et al, 2002). Proto se pro přístup využívá volných hypotéz, které zkoumají celogenomové vlivy na optimální závodní vzdálenosti, byla tedy provedena asociační SNP studie celého genomu u skupiny elitních plnokrevných závodních koní. Genomová oblast na chromozomu 18 obsahuje MSTN gen, který byl nejvíce hodnocenou oblastí v celogenomové asociační studii (dále jen GWAS), která se týká určení nejlepších závodních vzdáleností a také mimo jiné dosahuje významu celého genomu pro soubor sedmi oblastí SNP. Nejlepší SNP (BIEC2 - 417495) a druhý nejlepší SNP (BIEC2 - 417372) byly 692 kb a 28 kb z MSTN genu, v daném pořadí. Dále se hledala oblast pro další pravděpodobné kandidátní geny a byl identifikován NGFI gen – což je vazebný proteinový 1

(EGR1 vazebný protein 1) gen (NAB1) umístěný na ~ 170 kb z BIEC2 – 417495, a zjistilo se, že produkt genu NAB1 je vysoce exprimován v srdečním svalu.

### 3.5 Rychlostní gen

Plnokrevní závodní koně patří mezi nejcennější zvířata na světě. Genetická rozmanitost byla rozsáhle studována u koní v souvislosti s vývojem krevních testů určených při používání analýzy pro ověření rodičovství. Ačkoli plnokrevná plemena projevují menší genetickou různorodost než ostatní plemena, tak i přesto je tento rozdíl mezi nimi nepatrný. Během let 1970 až 1980 několik studií uvádí dědivost, která souvisí se závodními časy, závodní výkonností, handicapem a penězi vydělaných při dostizích. Závodní čas se ukázal být dosti problematicky studován, protože je z dostihových závodů zaznamenáván pouze vítězný čas (Bailey 1998).

Průzkum dědivosti je tedy realizován z odhadovaného času ( $h^2 < 0,20$ ), rozsahu vyhraných peněz, výkonnosti a odhadu handicapu v dostihu, kde se dědivost pohybuje mezi hodnotami 0,30 až 0,40. Problém genetického pokroku je poté zkoumán, protože růst rekordních časů je malý anebo žádný, což bylo rozpoznáno až za několik let, že má populace plošně dosaženo svého výběru. Hypotézy vysvětlující tento jev byly následně přezkoumány. Mohou tedy být rozdělené do dvou skupin: první zahrnuje ty hypotézy, které předpokládají, že zjištěné dědivé hodnoty odpovídají skutečné genetické variabilitě, ta druhá, že tyto hypotézy jsou zahrnované nadhodnoceným způsobem. V první analýze dochází ke snižování rozptylu paralelně a ke zvyšování střední hodnoty, podle kterých by dědivost mohla být vysvětlena bez sledování pokroku při důležitých závodech, což zatím není potvrzené. Je třeba si povšimnout, že neexistuje žádný rozpor mezi pomalým pokrokem získaným z rekordních časů a nízkou dědivou hodnotou z těchto získaných časů, zejména pokud volba není provedena přímo na časové hodnoty, ale na výkonnostní kritéria závodu, se kterými silně nekorelují (korelace je pouze -0,50). Ve druhé analýze je mnoho nadhodnocených zdrojů dědivosti, které mohou být i cílené. Jedná se zejména o cílené páření, vysokou homogenitu ve stádě a rozložením účinků na životní prostředí v závislosti na kvalitě rodičů. Tyto úvahy vedou k otázkám ohledně genotypové korelace prostředí, která by se v tomto případě neměla vyskytovat u úmyslně nebo cíleně vyřazených plnokrevníků. Identifikace rychlostního genu je první známá charakterizace genu přispívajícího ke konkrétní sportovní vlastnosti plnokrevných koní a má potenciál změnit rozhodovací proces v globálním šlechtitelském oboru. Tento výzkum byl první akademický program na světě, který se vztahuje k nové

genomické technologii, který je zaměřen na identifikaci genetických příspěvků ohledně závodních výkonů plnokrevných koní. Závody dostihových koní a s tím spojené chovatelské činnosti jsou mezinárodní podnikáním za miliardy eur. Equinome Speed Gene je test, který je určen pro majitele a trenéry po celém světě, díky kterému budou schopni určit, zda je kůň vhodný pro závodění na krátké, střední nebo středně dlouze vzdálené tratě. S touto informací mohou optimalizovat své nákupy a odborné přípravy, které se týkají rozhodování o vhodném začlenění koní do závodů. Chovatelé, chovatelé hřebců a šlechtitelé budou rovněž moci používat tento test pro přesnější výběr jednotlivých koní a budou mít díky tomuto testu zjednodušené rozhodování, ohledně maximalizace genetického potenciálu u svých koní (Langois 1980).

Podle Hill (2010) zůstala chovná technika plnokrevných koní po staletí relativně beze změny. Chovatelé v současné době spoléhají na úspěšnou kombinaci pokrevní příbuznosti, a žijí v naději, že výsledné hříbě bude obsahovat požadovanou kombinaci genů. Až do teď se mohli pouze domnívat, jestli jsou tyto požadované geny dědivé nebo ne, daly se pouze sledovat závodní a chovatelské úspěchy od narození koně. Došla tedy k závěru, že použití testu Equinome Speed Gene, který je u koní první na světě a zároveň i v genetice, bude nyní možné s konečnou platností zjistit genetický typ koně během několika týdnů, čímž se sníží hodně nejistoty, která obvykle chovatele doprovázela při výběru, výcviku a šlechtitelském rozhodování.

### **3.5.1 Další studie rychlostního genu**

Genetická studie atletických výkonů plnokrevných závodních koní byla v posledních letech populární oblastí. Byla také provedena i rozsáhlejší studie v Japonsku a jejich výsledky se shodovaly s výsledky z předchozích studií: Identifikace konkrétních „výkonnostních genů“ na chromozomu 18, na kterém byly identifikovány konkrétní geny, které jsou vhodné pro individuální zařazování koní do optimálních vzdáleností jednotlivých dostihů. Výzkumní pracovníci ve čtyřech odlišných studiích již dříve identifikovali oblast DNA na chromozomu 18 (dále jen ECA18) o kterém se domnívají, že by mohl být spojen se závodními výkony. Jeden z výzkumných týmů našel specifickou mutaci v myostatinovém genu umístěném na ECA18. Výzkumní pracovníci, kteří již dříve hodnotili myostatinové mutace zjistili, že přispívají ke svalové hypertrofii (tedy k růstu tkáně), což může být užitečné při předpovídání, zdali je kůň vhodný do krátkých, středně dlouhých nebo vytrvalostních závodů. Další zhodnocení ECA18 genů ohledně sportovních výkonností provedl Teruaki Tozaki, který nedávno analyzoval genetický materiál z krevních vzorků odebraných plnokrevným koním

registrovaných v Japonské dostihové asociaci a kteří se v Japonsku narodili v letech 1993 – 2000. Tozakiho tým identifikoval čtyři specifické genetické mutace (jednalo se o jednotlivé odchylky v DNA) s názvem jednonukleotidové polymorfismy (dále jen SNPs), uvnitř ECA18 nebo v blízkosti MSTN genu pomocí standardní polymerázové řetězové reakce a genetické sekvenční metody. Výsledky těchto genetických sekvencí SNPs srovnávali u 1 710 koní, kteří mají zaznamenány výkony a to i včetně neúspěšnějších závodů, vítězných závodů, výkonnostních hodnot a celoživotních výdělků. Tozaki poznamenal, že „SNPs na ECA18 u hřebců i klisen plnokrevných dostihových koní byly jasně spojené s výkonem, zejména u těch, kteří byly úspěšně zařazeni do odpovídající optimální závodní vzdálenosti“. Podle Tozakiho výsledky ukazují, že existuje alespoň jeden gen, kombinace genů nebo SNPs v této oblasti, které ECA18 pravděpodobně u plnokrevných koní ovlivňuje zařazování do optimální dostihových vzdáleností. „Regulace MSTN genu vypovídá o tom, že ovlivňuje závodní výkon a ... a tyto SNPs mohou být geneticky stanovené markery spojené se závodní výkonností, jak již bylo původně prokázáno“. V současné době se Tozakiho tým zaměřuje na fyziologické charakteristiky plnokrevníků s MSTN mutacemi a tím jak souvisejí se závodní výkonností. Například se hledají rozdíly v osvalení u mladých koní, kteří nejsou zařazeni v tréninku, poté také u těch kteří jsou zařazeni v tréninku a u koní kteří již závodí (Oke, 2011).

### **3.6 Integrace genomických informací do sportovního šlechtitelského programu koní pro optimalizaci přesnosti výběru**

Spolehlivá výběrová kritéria jsou vyžadována pro mladé koně, u kterých se směřuje ke zvýšení přesnosti výběru a snížením generačního intervalu. Byly hodnoceny strategie, které obsahují výběr genomických plemenných hodnot (dále jen GEBVs). Příslušné fáze výběru v šlechtitelských programech sportovních koní, byly analyzovány za pomoci použití teorie výběrového indexu. Výsledky přesnosti z indexů ( $r$  (TI)) a z relativních výběrových reakcí ukázaly, že informace o genotypovém jednonukleotidovém polymorfismu výrazně zvyšuje přesnost odhadované plemenné hodnoty pro mladé koně bez vlastního výkonu nebo bez výkonnosti potomstva. V prvním případě je vztah mezi plemennou hodnotou, která je odvozena z SNP genotypu a skutečnou plemennou hodnotou (= přesnost GEBV) je stanovená relativně nízká hodnota  $r$  (mg) = 0,5. Za nízkou dědivostí znaku ( $h^2 = 0,15$ ) a indexem pro mladé koně, který vychází pouze ze základních informací od obou rodičů



se tímto dodatečné genomické informace zdvojnásobují  $r$  (TI) z 0,27 na 0,54. Včetně běžného informačního zdroje „vlastního výkonu“ do výše uvedeného indexu, se s dalšími informacemi z SNP indexy zvyšují  $r$  (TI) o 40 %, a to zejména ty znaky, které mají nízkou dědivost. Genetická informace tak může poskytnout dobrý nástroj opodstatněný o velmi brzkém selekčním výběru (Haberland et al., 2012).

Dostupnost genomických informací vyžaduje správné posouzení jeho dopadu na uskutečnitelný program ve šlechtění koní. Přesnost běžných šlechtitelských hodnot není výrazně vyšší až do doby, kdy se věk hřebce pohybuje od 8 do 12 let a zároveň jeho potomstvo začne soutěžit. Ukázalo se, že další informace z genomu výrazně zvyšují přesnost odhadované plemenné hodnoty pro hříbata, mladé koně bez vlastního výkonu a pro koně bez výkonnosti potomstva. Proto díky selekci genomu (dále jen GS) bude možný výběr již v dřívější fázi, budou zkráceny generační intervaly, a tudíž se bude moci otevřít prostor pro zvýšení genetického pokroku. Výsledky naznačují, že organizace pro šlechtění koní by pravděpodobně mohly mít prospěch z použití GS. Šlechtitelské programy sportovních koní se vyznačují dlouhými generačními intervaly a nerovnoměrnou intenzitou výběru (Philipsson et al., 1990; Niemann, 2009) a z tohoto důvodu také nedostatkem efektivních časných výběrových kritérií. Odhad plemenné hodnoty (dále jen EBVs) včetně informací o vlastním výkonu a o výkonu potomstva, obecně nejsou k dispozici, dokud koním není od 8 do 12 let (German Equestrian Federation, 2008). Genomická selekce má proto potenciál výrazně zlepšit stávající šlechtitelské strategie. Podstatné zvýšení genetického zisku, byly nalezeny v šlechtitelských programech, které se vyznačují dlouhými generačními intervaly, a u těch kteří se zaměřují na znaky s nízkou dědivostí a nebo na funkční vlastnosti (König et al., 2009). Odhad SNP účinků během kalibrace skupin a přenosem těchto odhadů pro zvířata v celé populaci, je základem GS metodiky. Dostupnost 50 – K SNP technologických čipů je stejné jako nedávné zveřejnění sekvence genomu koní (Wade et al., 2009). Rozsah vazbové nerovnováhy (dále jen LD) byl analyzován pro plnokrevníky (Corbin et al., 2010). Vzhledem k vysoké LD, došli autoři k závěru, že GS by mohla být použita v pozorované populaci. Nicméně síla LD jako funkce efektivní velikosti populace ( $N_e$ ), může být například nižší u Evropských sportovních koní ve srovnání s plnokrevníky ( $N_e = 100$ ). Wade et al (2009) našel vysoké LD u plnokrevníků ve srovnání s jinými šlechtěnými koňmi. Nicméně, GS by mělo být realizovatelné, protože síla LD u několika plemen koní (Wade et al., 2009) je srovnatelná jako například LD u Holštýnského skotu (Qanbari et al., 2010), kde GS byla úspěšně provedena (Hasler et al., 2011).

Zjištění tedy podporují požadavky na vyhodnocení GS potenciálu pro šlechtitelské programy (Haberland et al., 2012).

### **3.7 Ověření rodičovství anglického plnokrevníka pomocí mikrosatelitů**

Plnokrevník je plemeno lehčího typu koně šlechtěné za účelem účasti v dostizích ve Spojeném království. Vznikl křížením orientálních koní (Godolphin Barb, Darley Arabian a Byerley Turk) s původními anglickými klisnami, poté byl umělým výběrem od počátku 17. století šlechtěn na závodního koně určeného do dostihů. Plemenná kniha anglického plnokrevníka má ověřené záznamy a vyřešené otázky ohledně používání prepisované DNA pomocí mikrosatelitů ohledně ověřování rodičovství. Jedním ze spolehlivých a účinných metod pro ověření původu v rodokmenu je analýza genotypizace DNA. V současné době se DNA genotypizace stala nejúčinnější metodou pro udržení čistokrevné plemenitby u velkých populací zvířat (Dimsoski 2003). Termín mikrosatelity, neboli také krátké tandemové repetice (dále jen STRs) se zařazují ke kodominantním DNA markerům, které jsou děděné podle klasické Mendelovské dědičnosti. Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní a bohaté sekvence, které jsou rozptýlené po celé většině genomů jaderných eukaryot (Litt et al., 1989., Weber et al., 1989).

Mikrosatelity mají jednoduchou a stabilní dědivost a také jsou pouze podle dědivosti řízeny, když jsou přenášeny z generace na generaci. Vzhledem k jejich malé velikosti, jsou účinně zesíleny používáním PCR technologií. Proto jsou mikrosatelity používány k ověřování rodičovství. Mnoho mikrosatelitů je jen informativních vzhledem k jejich vysoké mnohotvárnosti a mimo jiné jsou také užitečné při testování otcovství (Bowling et al., 1997). V běžném modelu DNA byla provedena analýza čtrnácti mikrosatelitních markerů a to včetně minimálně devíti mezinárodních standardních mikrosatelitních markerů, které slouží pro ověření rodičovství a mimo jiné tímto byla provedena také individuální identifikace plnokrevných koní. Dále byl vypočten počet alel, heterozygotnost, polymorfní informační obsah (dále jen PIC) a vyloučení pravděpodobnosti (dále jen PE), (Sun and Gil 2006). Alelická frekvence, kde počet alel na lokusu byl odhadnut přímým počítáním pozorovaného genotypu. Heterozygotnost, PIC a PE byly vypočteny pomocí softwaru CERVEX (Marshall et al., 1998). Počet alel se pohyboval v rozsahu od 3 (HMS1) do 9 (ASB17), a průměrný počet alel v této studii byl 6,36. Pozorovaná heterozygotnost a očekávaná heterozygotnost se pohybovala v daném pořadí v rozmezí od 0,553 do 0,852 (průměr byl 0,663), a u očekávané heterozygotnosti od 0,548 do 0,831 (průměr byl 0,699). PIC hodnota

se pohybovala v rozmezí od 0,451 do 0,809 s průměrem 0,652. Celková hodnota PE čtrnácti mikrosatelitních markerů u plnokrevného koně byla 0,9998. Jedná se o vyšší hodnotu než je uvedena v International Stud Book Committee která byla 0,9995. Toto tvrzení a systém čtrnácti mikrosatelitních markerů je teoreticky považováno za velmi užitečný při ověřování rodičovství u plnokrevného koně (Sun and Gil 2006).

#### Alelická frekvence DNA polymorfních mikrosatelitů u plnokrevného koně

Locus	No. of allele	Allele* (frequency)					
AHT4	5	H(0.2105)	J(0.2241)	K(0.1732)	L(0.0004)	O(0.3918)	
AHT5	5	J(0.1393)	K(0.4911)	M(0.2136)	N(0.1233)	O(0.0327)	
ASB2	8	B(0.0307)	K(0.1304)	M(0.1331)	N(0.1366)	O(0.1163)	P(0.0117)
		Q(0.2634)	R(0.1778)				
ASB17	9	G(0.3261)	H(0.0016)	M(0.0315)	N(0.2533)	O(0.2171)	P(0.0008)
		Q(0.0008)	R(0.1685)	S(0.0004)			
ASB23	6	I(0.0704)	J(0.2817)	K(0.2424)	L(0.1782)	S(0.2058)	U(0.0214)
CA425	7	I(0.0323)	J(0.1786)	K(0.0019)	L(0.0132)	M(0.0268)	N(0.6342)
		O(0.1128)					
HMS1	3	I(0.1739)	J(0.4553)	M(0.3708)			
HMS3	7	I(0.5475)	K(0.0004)	M(0.1451)	N(0.0393)	O(0.1089)	P(0.1467)
		R(0.0121)					
HMS6	6	K(0.1323)	L(0.0276)	M(0.2926)	O(0.0140)	P(0.5319)	R(0.0016)
HMS7	6	J(0.0864)	K(0.0012)	L(0.1412)	M(0.2385)	N(0.2023)	O(0.3304)
HTG4	5	K(0.5350)	L(0.0012)	M(0.4058)	N(0.0249)	P(0.0331)	
HTG10	8	I(0.2782)	K(0.1245)	L(0.1669)	M(0.1833)	O(0.0934)	Q(0.0008)
		R(0.1518)	S(0.0012)				
LEX3	8	F(0.0039)	H(0.2665)	J(0.0004)	L(0.0198)	M(0.1362)	N(0.1171)
		O(0.0529)	P(0.4031)				
VHL20	5	I(0.2805)	L(0.2307)	M(0.3463)	N(0.1374)	O(0.0051)	

<Dostupné z: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2006.7.1.63>>

[cit. 2016 – 28 – 03]

Heterozygotnost, PCI a PE hodnoty mikrosatelitních markerů u plnokrevného koně

Locus	No. of allele	OHet	EHet	PIC	PE*
AHT4	5	0.781	0.722	0.674	0.474
AHT5	5	0.685	0.678	0.634	0.443
ASB2	8	0.852	0.831	0.809	0.663
ASB17	9	0.762	0.753	0.710	0.520
ASB23	6	0.779	0.783	0.748	0.571
CA425	7	0.553	0.551	0.513	0.332
HMS1	3	0.626	0.625	0.547	0.334
HMS3	7	0.645	0.644	0.608	0.424
HMS6	6	0.618	0.613	0.551	0.352
HMS7	6	0.767	0.766	0.728	0.545
HTG4	5	0.559	0.548	0.451	0.257
HTG10	8	0.804	0.814	0.788	0.630
LEX3	8	0.756	0.731	0.691	0.505
VHL20	5	0.736	0.730	0.680	0.479
Mean	6.36	0.663	0.699	0.652	0.9998**

<Dostupné z: <http://synapse.koreamed.org/DOIx.php?id=10.4142/jvs.2006.7.1.63>>  
[cit. 2016 – 28 – 03]

Typováním mikrosatelitů pro individuální identifikaci k ověření rodičovství a řešení problémů nejistého mateřství či otcovství je běžným postupem ve šlechtění koní v několika zemích (Siegal 1996). Také díky uplatnění DNA markerů mohli být odhaleny rozsáhlé schopnosti rozlišovat mezi jednotlivci a tato schopnost byla poté využita v analýzách pro reprodukci, příbuznosti a rodičovství. Cílem této studie bylo správně sestavit rodokmen anglického plnokrevníka. Po genotypizaci, bylo testování rodičovství provedeno podle Mendelistické a ISAG metody (Lee and Cho 2006). Mikrosatelity byly vybrány jako ukazatelé výběru vzhledem k jejich vysoké úrovni polymorfismu, které mohou být snadno počítačově upraveny. To znamená, že typování DNA může být analyzováno poloautomaticky (Tozaki 2001).

## 4 Závěr

V posledních letech došlo k velkému rozvoji genomických technologií a dalších mnoho nových aplikací bude brzy k dispozici pro optimální chov a šlechtění anglického plnokrevníka. V některých oblastech se, ale stále ještě určují geny, které by mohly objasnit některé nejasnosti. Stále se proto vyhodnocuje, které vlastnosti jsou ovlivňovány prostředím a které geneticky a jak to poté má vliv na výkonnost a další faktory s tím spojené. Velký důraz se poté klade na výzkum myostatinového a rychlostního genu, kteří mají velký podíl na optimální zařazení a výkonnost plnokrevného koně.

Chov plnokrevníků je multimiliardový podnik, který se snaží vydělávat co nejvíce, a proto je zde stále snaha, efektivně pomocí analýz určit vlastnost, která má nejvyšší dědivost a podle toho také vybírat koně kteří se budou spolu pářit, velmi často zde dochází k inbreedingu, což v menším měřítku může být i přínosné a to i z toho hlediska, že anglický plnokrevník je vyšlechtěn z malého čítajícího genofondu. Téměř všech 500 000 tisíc plnokrevných koní je pouze z 28 předků. Snahou je tedy vyšlechtit koně, kteří budou mít zdravé srdce, optimální metabolické schopnosti, správné osvalení a ty u kterých bude na první pohled vidět, do které disciplíny patří.

Závěrem celého šlechtění a zařazování koní do určitých optimálních závodních vzdáleností v dostihu za pomoci PCR metody, stopovacího mapování a dalších analýz povede k tomu, že jakmile se stanoví konkrétní geny, které přispívají k určitým vlastnostem, které jsou žádoucí, povede to k tomu, že se zde budou rodit jen samí špičkoví koně, protože cílem každého majitele, chovatele, trenéra a dalších lidí, kteří se pohybují okolo dostihového provozu, je vydělávat co nejvíce peněz. Je zde, ale otázka zda to nepovede k různým generativním onemocněním či různým poruchám např. pohybového aparátu..., k častějšímu inbreedingu anebo ke klonování, což je zatím povolené jen a pouze pro vědecké účely.

## 5 Souhrn literatury

1. Arnason, T. (2013). Bright future for research in horse breeding!. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 130(3), 167-169.
2. Anon. MSTN [online]. 28. prosince 2015 [cit. 2015 – 30 – 12]. Dostupné z <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/MSTN>.
3. Anon. The speed gene [online]. 2013 [cit. 2016 – 02 – 01]. Dostupné z <http://performancegenetics.com/the-speed-gene/>.
4. Bailey, E. (1998). Odds on the FAST gene. *Genome research*, 8(6), 569-571.
5. Barrey, E. (2010). Reviewe: Genetics and genomics in equine exercise physiology: an overview of the new applications of molecular biology as positive and negative markers of performance and health. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 561-568.
6. Binns, M. M., Boehler, D. A., & Lambert, D. H. (2010). Identification of the myostatin locus (MSTN) as having a major effect on optimum racing distance in the Thoroughbred horse in the USA. *Animal Genetics*, 41(s2), 154-158.
7. Cunningham P. (1991). The genetics of thoroughbred horses. *Sci. Am.* 265:92–98
8. Corbin, L. J., Blott, S. C., Swinburne, J. E., Vaudin, M., Bishop, S. C., & Woolliams, J. A. (2010). Linkage disequilibrium and historical effective population size in the Thoroughbred horse. *Animal genetics*, 41(s2), 8-15.
9. Dempsey, J. A., & Wagner, P. D. (1999). Exercise-induced arterial hypoxemia. *Journal of Applied Physiology*, 87(6), 1997-2006.
10. Dimsoski, P. (2003). Development of a 17- plex microsatellite polymerase chain reaction kit for genotyping horses. *Croatian medical journal*, 44(3), 332-335.
11. Essén – Gustavsson, Birgitta., & Lindholm, A. (1985). Muscle fibre characteristics of active and inactive Standardbred horses. *Equine veterinary journal*, 17(6), 434-438.
12. Gu, J., Orr, N., Park, S. D., Katz, L. M., Sulimova, G., MacHugh, D. E., & Hill, E. W. (2009). A genome scan for positive selection in thoroughbred horses. *PLoS one*, 4(6), e5767.
13. German Equestrian Federation (FN) 2008. Breeding program of the German Riding Horse. In *Jahrbuch Sport und Zucht 2008*, Deutsche Reiterliche Vereinigung, 84pp. FN-Verlag, Warendorf, Germany.

14. Georgescu, S. E., REBEDEA, M., CONDAC, E., IONICA, E., DINISCHIOTU, A., COSTACHE, M. Horse genotyping [online]. 10. března. 2015 [cit. 2015 – 29 – 11]. Dostupné z [https://www.researchgate.net/publication/272096064\\_HORSE\\_GENOTYPING](https://www.researchgate.net/publication/272096064_HORSE_GENOTYPING)
15. Fonseca, R. G., Kenny, D. A., Hill, E. W., & Katz, L. M. (2010). The association of various speed indices to training responses in Thoroughbred flat racehorses measured with a global positioning and heart rate monitoring system. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 51-57.
16. Haberland, A. M., König von Borstel, U., Simianer, H., & König, S. (2012). Integration of genomic information into sport horse breeding programs for optimization of accuracy of selection. *animal*, 6(09), 1369-1376.
17. Hasler, H., Flury, C., Menet, S., Haase, B., Leeb, T., Simianer, H., ...& 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(5), 394-406.
18. Harris, M. A., Deegan, J. I., Lomax, J., Ashburner, M., Tweedie, S., Carbon, S.,... & Blake, J. A. (2008). The gene ontology project in 2008. *Nucleic Acids Res*, 36, D440-D444.
19. Harrison, S. P., & Turrion-Gomez, J. L. (2006). Mitochondrial DNA: an important female contribution to thoroughbred racehorse performance. *Mitochondrion*, 6(2), 53-66.
20. Hlačík, Z., Gregor, D (2010). Anglický plnokrevník. Foto&nakladatelství. Opava. 149 s. ISBN: 978 – 80 – 904692 – 0 – 4.
21. Hill, E. W., Fonseca, R. G., McGivney, B. A., Gu, J., MacHugh, D. E., & Katz, L. M. (2012). MSTN genotype (g. 66493737C/T) association with speed indices in Thoroughbred racehorses. *Journal of Applied Physiology*, 112(1), 86-90.
22. Hill, E. W., Bradley, D. G., Al-Barody, M., Ertugrul, O., Splan, R. K., Zakharov, I., & Cunningham, E. P. (2002). History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Animal genetics*, 33(4), 287-294.
23. Hill, E. W., Gu, J., Eivers, S. S., Fonseca, R. G., McGivney, B. A., Govindarajan, P., ...& MacHugh, D. (2010). A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS One*, 5(1), e8645.

24. Hill, E. W., Gu, J., Eivers, S. S., Fonseca, R. G., McGivney, B. A., Govindarajan, P., and MacHugh, D. E. (2010). A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS One*, 5(1), e8645.
25. Hill, E. W., McGivney, B. A., Gu, J., Whiston, R., & MacHugh, D. E. (2010). A genome-wide SNP-association study confirms a sequence variant (g. 66493737C> T) in the equine myostatin (MSTN) gene as the most powerful predictor of optimum Cracing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC genomics*, 11(1), 552.
26. Hill, E. W., Bradley, D. G., Al-Barody, M., Ertugrul, O., Splan, R. K., Zakharov, I., & Cunningham, E. P. (2002). History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. *Animal genetics*, 33(4), 287-294.
27. Hinchcliff, K. W., Kaneps, A. J., & Geor, R. J. (2008). *Equine exercise physiology: The science of exercise in the athletic horse*. Elsevier Health Sciences.
28. Hsu S., It's all in the gene: myostatin and racehorses [online]. 8. Května 2013 [cit. 2016 – 02 – 01]. Dostupné z <http://infoproc.blogspot.cz/2013/03/its-all-in-gene-myostatin-and-racehorses.html>
29. Hyypä, S., Räsänen, L. A., & Pösö, A. R. (1997). Resynthesis of glycogen in skeletal muscle from standardbred trotters after repeated bouts of exercise. *American journal of veterinary research*, 58(2), 162-166.
30. Cho, G. J., & Lee, S. Y. (2006). Parentage testing of Thoroughbred horse in Korea using microsatellite DNA typing. *Journal of veterinary science*, 7(1), 63-67.
31. Jorgensen, T. J., Ruczinski, I., Kessing, B., Smith, M. W., Shugart, Y. Y., & Alberg, A. J. (2009). Hypothesis-driven candidate gene association studies: practical design and analytical considerations. *American journal of epidemiology*, 170(8), 986-993.
32. Katz, L. M., Bayly, W. M., Hines, M. T., & Sides, R. H. (2005). Ventilatory responses of ponies and horses to exercise. *Equine and Comparative Exercise Physiology*, 2(04), 229-240.
33. König, S., & Swalve, H. H. (2009). Application of selection index calculations to determine selection strategies in genomic breeding programs. *Journal of Dairy Science*, 92(10), 5292-5303.
34. Langlois, B. (1980). Heritability of racing ability in Thoroughbreds-a review. *Livestock Production Science*, 7(6), 591-605.
35. Litt, M., & Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397.



36. Marshall, T. C., Slate, J. B. K. E., Kruuk, L. E. B., & Pemberton, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular ecology*, 7(5), 639-655.
37. McCue, M. E., Bannasch, D. L., Petersen, J. L., Gurr, J., Bailey, E., Binns, M. M., ... & Leeb, T. (2012). A high density SNP array for the domestic horse and extant *Perissodactyla*: utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies. *PLoS Genet*, 8(1), e1002451.
38. Niemann, B. (2009). *Untersuchungen zu Veränderungen im Zuchtgeschehen und deren Auswirkungen auf die Hannoveraner Pferdezucht*. Cuvillier.
39. NovaUCD - The Innovation and Technology Transfer Centre at University College Dublin. Genetic test for 'speed gene' in thoroughbred horses [online]. 3. ledna 2010 [cit. 2015 – 21 – 11]. Dostupné z [www.sciencedaily.com/releases/2010/02/100202144204.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2010/02/100202144204.htm)
40. Oke, S., Myostatin Gene in Thoroughbreds: Further Research Completed [online]. 19. září. 2011 [cit. 2015 – 23 – 10]. Dostupné z <http://www.thehorse.com/articles/27813/myostatin-gene-in-thoroughbreds-further-research-completed>
41. Pösö, A. R., Essén – Gustavsson, B., & Persson, S. G. B. (1993). Metabolic response to standardised exercise test in standardbred trotters with red cell hypervolaemia. *Equine veterinary journal*, 25(6), 527-531.
42. Philipsson, J., Arnason, T., & Bergsten, K. (1990). Alternative selection strategies for performance of the Swedish Warmblood Horse. *Livestock production science*, 24(3), 273-285.
43. Qanbari, S., Pimentel, E. C. G., Tetens, J., Thaller, G., Lichtner, P., Sharifi, A. R., & Simianer, H. (2010). The pattern of linkage disequilibrium in German Holstein cattle. *Animal genetics*, 41(4), 346-356.
44. Siegal, M., & Barlough, J. E. (1996). *UC Davis book of horses: a complete medical reference guide for horses and foals*.
45. Tabor, H. K., Risch, N. J., & Myers, R. M. (2002). Candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 391-397.
46. Tozaki T. In (2001). Characterization of equine microsatellites and repetitive elements, and validation of paternity testing for Thoroughbreds. Japan: Showa University; Ph.D. Dissertation.

47. Wade, C. M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Immsland, F., ... & Blöcker, H. (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326(5954), 865-867.
48. Wagner, P. D. (1995). Determinants of: Man VS. Horse. *Journal of Equine Veterinary Science*, 15(9), 398-404.
49. Weber, J. L., & May, P. E. (1989). Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American journal of human genetics*, 44(3), 388.