

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra obecné zootechniky a etologie



Přehled využití genomiky v chovu koní

Bakalářská práce

Autor práce: Ondřej Plachý

Vedoucí práce: Ing. Barbora Hofmanová, Ph.D.

© 2017 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Přehled využití genomiky v chovu koní" jsem vypracoval 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 autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 25.3.2017

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval svým rodičům za podporu, vedoucí mé bakalářské práce Ing. Barboře Hofmanové, Ph.D. za vstřícnost a svému zaměstnavateli za trpělivost.

Přehled využití genomiky v chovu koní

Souhrn

V posledních letech dochází ke značnému rozvoji metod mapování genomu. Tyto metody jsou díky technologickému rozvoji dostupnější a méně finančně náročné pro využití samotnými chovateli. Cílem této bakalářské práce je sestavit souhrn možností konkrétního využití těchto metod v chovatelské praxi. Metodou analýzy SNP je v současné době běžně ověřována paternita hříbat. Analýza mtDNA je nástrojem pro dohledávání chyb v rodokmenech a je podkladem pro fylogenetické úvahy o tomto druhu. Podrobně jsou prostudovány genetické mechanismy související se zbarvením koní a pleiotropním působením těchto genů v souvislosti s dědičnými chorobami, jako jsou Overo Lethal White Syndrome, Lavender Foal Syndrome, souvislost Leopard spotting complex s kongenitální noční slepotou, či zvýšená incidence výskytu melanomů u běloušů. Je k dispozici řada dalších testů na zjištění mutace způsobující dědičné choroby, například HYPP, GBED, SCID a další. Výsledky těchto testů slouží chovatelům jako nástroj pro vhodný výběr rodičovských párů. V souvislosti s reprodukcí byly detekovány geny ovlivňující fertilitu, které mohou být využívány k určení predispozic u plemenných hřebců. Gen MSTN kódující syntézu myostatinu má zásadní vliv na vývoj svalové struktury. Tyto poznatky mohou být využity pro ranou selekci v dostihovém tréninku a pro určení distančního optima. Celý komplex editace genomu a sekvenování nabízí řadu možností využití v chovatelské praxi pro zlepšení ekonomiky produkce i welfare koní, může však být i zneužit.

Klíčová slova: Genomika, kůň, genetická testace, dědičné choroby, polymorfismus

Summary of the use of genomics in Horse breeding

Summary

Development of gene mapping have been extensively increased in recent years. Thanks to technological development , these genomic tools are now more available and less expensive for breeders use. The goal of this bachelor thesis is to present summary of specific possibilities of using these methods in breeding practice. SNP analysis are currently use for foal parentage verification. mtDNA analysis is tool for the finding a faults in pedigrees and for fylogenetic research of horses. Genetic mechanism and pleiotropic effect of the genes encoded coat colour related with inherited deseases, such as Overo Lethal White Syndrome, Lavender Foal Syndrome, Congenital Night Blindness (related with Leopard Spotting Complex) and higher incidence of grey horses melanomas, was detailed described. Other tests for responsible mutations, caused inherited diseases, such as for example HYPP, GBED, SCID etc. are also currently available. The results of these tests are useful tool for breeders for parentage pairs selection. It was found the genes related with fertility, these research can be use for good stallion predispositions designation. MSTN gene encoding myostatin synthese have a great influence on muscle development. These knowledges can be used for early selection in trainig and for distant optimum assessment. Whole complex of genome edit and sequencing provide many useful options for using in breeding practice. These knowledges can improve economical success of breeders and positive affect the horses welfare. On the other hand, these knowledges can be also misuse.

Keywords: Genomics, Equine, Genetic Tests, Inherited diseases, Polymorfism

Obsah

1. Úvod.....	1
2. Cíl práce	2
3. Literární rešerše	3
3.1 Obecný úvod	3
3.1.1 Základní pojmy	3
3.1.2 Historie	4
3.1.3 Funkční genomika a její nástroje	6
3.1.4 Genové mapy	6
3.1.5 Metody izolace DNA	7
3.1.6 PCR	7
3.1.7 Sekvenování	8
3.1.8 Laboratoře poskytující testaci	9
3.2 Ověřování původu koní	10
3.2.1 Význam analýzy původu	10
3.2.2 Ověření paternity	10
3.2.3 Analýza rodokmenů a fylogeneze pomocí mtDNA	11
3.2.4 Analýza otcovské linie pomocí NRY úseku Y chromozómu.....	13
3.3 Význam srsti koní a související choroby	14
3.3.1 Význam	14
3.3.2 Základní genotypy barev koní.....	14
3.3.3 Overo lethal white syndrome	16
3.3.4 Leopard spotting complex a noční slepota	17
3.3.5 Lavender foal syndrome.....	19
3.4 Dědičné choroby	20
3.4.1 Choroby kosterní svaloviny	20
3.4.2 Choroby spojené s imunitním systémem	22
3.4.3 Onemocnění kůže	23
3.4.4 Onemocnění krevního systému	24
3.4.5 Neurologická onemocnění	24
3.4.6 Respirační onemocnění	25
3.4.7 Metabolická onemocnění	25
3.5 Reprodukce a fertilita	26
3.5.1 Význam fertility v chovatelské praxi	26
3.5.2 Genetické založení reprodukce	26
3.5.3 Zvrat pohlaví (sex reversal syndrome).....	27
3.5.4 Vliv hormonů na reprodukci	27
3.5.5 Spermatogeneze	28

3.5.6	Prenatální diagnostika a sexování spermatu.....	29
3.6	Dostihová výkonost	29
3.6.1	Myostatin	29
3.6.2	Svalová adaptace a další genetické faktory ovlivňující výkonost.....	32
4.	Závěr.....	34
5.	Literatura.....	35
6.	Přílohy	42

1. Úvod

Nástrojem pro chovatele byla v minulém století, kromě zkoušek výkonosti koní, rovněž analýza jejich rodokmenu. I zde však neexistovala úplná jistota zaručující úspěch jejich odchovanců, ač byli tito chovatelé vynikajícími znalci původů. V té době také vznikaly spekulativní představy o návaznosti (speciální kombinovatelnosti) jednotlivých tradičních, zejména paternitních, linií, jako například populární Varolův systém, který ovšem postrádal oporu i v rámci tehdejších metod kvantitativní genetiky. Otázka, na kterou nám může genomika odpovědět, je jaké rozdíly existují mezi koňmi se stejným pedigree s nízkou a vysokou výkoností? Teprve metody molekulární genetiky, zvláště překotný vývoj sekvenačních metod v poslední dekádě, umožňují například přímé testování variant genů relevantních pro určité složky atletických dispozic u plnokrevníka.

Od roku 2006, kdy byla poprvé dokončena a zveřejněna kompletní sekvence genomu domestikovaného koně a sice klisny anglického plnokrevníka Twilight v Broad Institute, Boston, můžeme registrovat značný nárůst genomického výzkumu na poli především funkční genomiky a rozvoje nástrojů pro mapování genomu. Tato práce vedla k objevení variant genů zodpovědných za barvu srsti a odznaky koní, dědičná onemocnění a vady i faktory výrazně ovlivňující výkonost koní.

Technologický pokrok od té doby umožnil stanovení celé genomové sekvence snazším a méně finančně náročným, nabízí se tedy šance na využití těchto poznatků přímo v chovatelské praxi. Dalším úkolem tohoto oboru je tedy zpřístupnit chovatelské veřejnosti možnosti jeho využití a učinit dostupnými metody využívající mapování genomu v oblasti chovu koní, ať už z hlediska výkonosti, dědičných onemocnění či konstitučních nedostatků, které mohou být předpokladem pro různá zranění, tak i například pro řešení negativ souvisejících s dlouhodobou domestikací a inbreedingem některých plemen koní.

Další značnou výhodou genomiky je nesporně možnost rychlejšího poskytování poznatků potřebných k hlubšímu pochopení biologie zvířat, především u těch druhů, které mají delší generační interval, dospívají později a jsou uniparní, jako například koně.

2. Cíl práce

Cílem této bakalářské práce je sestavit z dostupných zdrojů formou literární rešerše přehled o možnostech využití sekvenování a editace genomu koně v chovatelské praxi, zejména v oblasti prevence dědičných chorob a jejich predispozicí, jako nástroje pro selekci, ale rovněž i jako nástroje pro fylogenetickou studii tohoto druhu.

3. Literární rešerše

3.1 Obecný úvod

3.1.1 Základní pojmy

Genomikou rozumíme podobor genetiky, který se zabývá sekvenováním genomu, jeho mapováním a hledáním konkrétních genů s určitou funkcí (Brosnahan et al., 2012).

Genom představuje základní sadu instrukcí pro regulaci vývoje a dalšího fungování organismu, uloženou v sekvencích DNA. Hlavní část, jaderný genom, je lokalizován v jádře buňky. Jaderný genom o velikosti 2,5 – 2,7 Gb leží v rozmezí typickém pro dosud sekvenované placentální savce. Více než 95 % sekvencí bylo stotožněno s jednotlivými chromozómy, kterých je u koně $2N = 64$. Predikovaný počet genů kódujících proteiny – 20.322 je také podobný jako u všech eutherií. Mezi repetitivními sekvencemi, které představují 46 % genomu převažují transpozony (sekvence schopné transpozice) typu LINE (long interspersed nuclear elements) a SINE (short interspersed nuclear elements), s řadou elementů pro koně specifických (Wade et al., 2009). Významnou samostatnou jednotkou je mitochondriální genom lokalizovaný v cytoplazmatických organelách - mitochondriích, zodpovědných za více než 90 % energetické produkce u savců. Tato mtDNA kóduje řadu genů důležitých pro tento energetický metabolismus buňky (Chowdhary, 2013). Mitochondriální DNA je důležitým vodičkem pro fylogenetické úvahy, neboť se předává výhradně po mateřské linii jako diskretní jednotka nerekombinující s ostatními geny (podobnou úlohu má také diferenciální úsek samčího Y chromozomu), tato problematika je podrobněji rozvedena v kapitole o ověřování původu.

Genetickým markerem rozumíme charakteristický identifikovatelný úsek DNA, například se změnou původní sekvence či s mutací. Tímto markerem mohou být například mikrosatelity či jednonukleotidový polymorfismus (SNP). Prvním požadavkem pro konstrukci vazebných map jsou právě tyto genové markery vykazující polymorfismus. Tradičně byly tyto mapy vytvářeny za použití mikrosatelitních markerů kvůli jednoduchosti identifikace variací v jejich velikosti či absence v genové sekvenci, na rozdíl od SNPs, kdy je pro identifikaci příslušného nukleotidu, odlišného od nukleotidu na stejné pozici v referenčním genomu, vyžadována vysoká kvalita a dostatečná hloubka sekvenování (Chowdhary, 2013).

Mikrosatelitem rozumíme mnohokrát opakující se úsek nekódující DNA zahrnující mnohonásobně opakující se kratší segmenty nukleotidů (tj. dvou-, tří-, či čtyřnukleotidové). Tyto genetické markery často ukazují délku polymorfismu založenou na počtu opakování jednotek. Stanovení variant mikrosatelitních lokusů je obecně používáno jako měřítko polymorfismu v populaci a k identifikaci blízko sebe ležících genů kódujících zkoumaný znak (Brosnahan et al., 2012).

Polymorfismy jsou genetické varianty, běžně se vyskytující v genech, ve kterých jsou dvě či více alel (mírně odlišné formy stejného genu) vyskytující se v populaci (Brosnahan et al., 2012).

3.1.2 Historie

Genetický výzkum během 20. století přispěl ve své rané fázi k prokázání Mendelových pravidel ve vztahu k barvám srsti u koní. Technologický pokrok umožnil výzkum krevních skupin, proteinů v krevním séru a dokonce všech variant DNA, které vykazují mendelistickou charakteristiku. Během 20. století vědci uvažují o smyslu na pozadí těchto variant a vztahů k výkonnosti či znakům spojeným se zdravím. Ovšem dvěma největšími příspěvky minulého století chovatelského průmyslu koní bylo objevení hemolytických onemocnění u novorozených hříbat a rozvoj ověřování paternity koní za pomoci krevních skupin, biochemických a DNA markerů. Během 20. století směřovalo nejvíce snah v tomto odvětví k potvrzení šlechtitelských záměrů chovatelů. Pokud měl znak jednoduchý (monogenetický) způsob dědičnosti, vykazovaly tyto znaky dominanci, kodominanci, či recesivitu (např. zbarvení srsti, krevní skupiny, biochemické markery a některé choroby). Pokud měl znak komplexní založení, matematickým vyjádřením byl na poli kvantitativní genetiky vytvořen prostor pro charakteristiku genových interakcí, zahrnujících více genů. Minulé století končí se začátkem rozsáhlého projektu sestavení genomové mapy a stanovení úplné genomové sekvence koně (Bailey, 2015).

V roce 2006 byla poprvé sekvenována celá DNA klisny anglického plnokrevníka Twilight (obr. č. 2) v Broad Institute v Bostonu a sekvence byla neprodleně zpřístupněna ostatním badatelům. Výsledky zahrnovaly identifikaci 20.322 domnělých genů a lokusů na chromozómech s odkazem na tehdy již existující genomovou mapu. Důležitým poznatkem z tohoto projektu byl rovněž fakt, že obdobně jako u lidského genomu pouze 3% DNA kódují nějaký protein. Vystala tedy otázka (která ovšem nevyplývala ze sekvenace koňského

genomu, ale byla nastolena již dříve, kromě jiného po sekvenování lidského genomu), jaká je funkce zbylých 97% DNA a jak je řízena exprese genů ve vztahu k načasování, její míře a rozličnosti tkání. Důležitou součástí projektu byl také fakt, že již existovala řada poznatků o kódování jednotlivých proteinů z lidského genomu a předpokládala se analogie s koňským (Bailey, 2015). Genom koně má poměrně velké množství repetitivních sekvencí, ale jenom málo duplikací větších segmentů. Zdá se, že chromozómy u koně prodělaly ve fylogenezi jen málo přestaveb, když 53% koňských chromozómů vykazuje konzervativní syntonii s jednotlivými lidskými chromozómy (např. u psa je to jen 29%) (Wade et al., 2009).



Obr. č. 2: A 1/1 klisna Twilight (Chowdhary et al., 2013)

V tradičním pojetí představoval genom více méně sadu genů – sekvencí DNA transkribovaných do mRNA, která slouží jako konečná předloha pro překlad (translaci) do funkčních proteinů. Teprve v poslední době začínáme rozumět funkci sekvencí DNA, které nekódují proteiny a přitom představují většinu eukaryotního genomu (zpravidla více než 95 %). Ukazuje se, že tyto oblasti nekódující DNA hrají rozhodující úlohu v časově a místně specifické regulaci exprese genů a jsou často přepisovány do různých tříd malých regulačních molekul RNA (Morris a Mattick, 2014). Samostatnou kapitolou by byly regulace pomocí epigenetických značek, zejména metylace cytosinu a histonových proteinů (Zentner a Henikoff, 2014). Významnou a dosud ne zcela objasněnou evoluční úlohu hrají různé třídy repetitivních sekvencí, včetně pozůstatků integrovaných retrovirových sekvencí (Kazazian, 2004).

Důležitou součástí sestavení koňského genomu bylo stanovení genomických zdrojů umožňujícím lepší zkoumání fylogenetických vztahů. Součástí projektu bylo sekvenování částí DNA u dalších sedmi koní jiných plemen (achaltekinský kůň, andalúzský kůň, arabský kůň, islandský kůň, Quarter Horse, Standardbred, ještě jeden anglický plnokrevník) k poskytnutí dalších markerů. Byla vytvořena mapa jednonukleotidových polymorfismů s více než jedním milionem markerů, zahrnující více než 700 000 SNP objevených při porovnávání dvou chromozómů klisny Twilight a přibližně 400 000 SNP které byly získány ze 100.000, zjištěných u každého z dalších sedmi plemen (Wade, 2013). Výsledná SNP mapa vykazovala průměrnou hustotu polymorfismů na každých 2000 párů bází. 46% genů v DNA Twilight bylo shledáno homozygotními, což bylo očekáváno oproti jiným koním, vzhledem k inbrední povaze své plemenné příslušnosti, pro kterou byla pro projekt vybrána (Wade, 2013).

3.1.3 Funkční genomika a její nástroje

Termínem funkční genomika rozumíme podobor genomiky, který zkoumá kompletní působení genů a zjišťuje jejich konkrétní fyziologickou funkci. Většina výzkumu je směřována k porovnání přítomnosti, či nepřítomnosti konkrétní sekvence DNA a následně vztahem sekvence ke konkrétnímu znaku (Bailey, 2015). Samostatným pojmem je rovněž prenatální a preimplantační diagnostika (PGT), která je podrobněji rozvedena v kapitole věnované reprodukci.

3.1.4 Genové mapy

Chromozómy jsou děděny v nezměněné podobě z jedné generace na další s výjimkou vzácných událostí chromozómálních přestaveb, jako jsou inverze nebo translokace. Při formování gamet v průběhu meiotického dělení ale dochází pravidelně k rekombinaci, tj. k výměně materiálu v procesu crossing-over mezi homologními chromozómy. Čím jsou od sebe dva lokusy vzdálenější, tím spíše mezi nimi dojde k rekombinaci. Vazebné mapy poskytují znázornění těchto vzdáleností mezi lokusy na chromozómech, resp. větší frekvence rekombinací představuje větší vzdálenost na vazebné mapě. Genetická mapa tudíž ilustruje, které markery patří do stejné vazebné skupiny, jejich relativní pořadí a vzdálenost mezi nimi. Tato vzdálenost je měřena v jednotkách centiMorgan (cM), přičemž 1cM je definován jako 1% pravděpodobnost rekombinace dvou oddělených pozic v jedné generaci. Vazebné mapy proto ilustrují pravděpodobnost, se kterou budou markery zděděny společně, zatímco fyzické mapy poskytují informace o skutečné vzdálenosti, resp. počtu párů bází mezi nimi. Tyto mapy

jsou vzájemně komplementární. Pro sestavení vazebné mapy je zapotřebí dvou základních komponentů. Prvním je vysoký počet polymorfních markerů, obvykle je využito mikrosatelitů. Druhým je nezbytná znalost původu zvířete či kvalitně vedená plemenná kniha. Pro vypracování vazebné mapy je poté zapotřebí stanovení genotypu jedinců z tohoto pedigree a všech polymorfních markerů. Software pro vazebné mapy je poté použit k identifikaci skupin markerů, které pocházejí ze stejného chromozómu a proto vykazují výraznou vazbu – vazebné skupiny – výpočtem logaritmu pravděpodobnosti spojení (LOD skóre) pro každý pár. Je-li výsledek LOD skóre vyšší než 3, hovoříme o vazbě. Na každé vazebné skupině je poté provedena analýza identifikace nejpravděpodobnějšího pořadí markerů a vzdálenosti mezi nimi; na základě předpokladu maximální parsimonie, tj. že obecně za správné považujeme řešení s nejmenším počtem nutných změn, v tomto případě pořadí markerů, které vyžaduje nejméně crossingoverů. Nakonec je každá vazebná skupina přiřazena ke chromozómu, toho je tradičně dosahováno použitím metody FISH (fluorescenční in situ hybridizace) (Swinburne, Lindgren, 2013). Ukázka genové mapy koňského chromozómu ECA 18 je zobrazena v příloze č. 1.

3.1.5 Metody izolace DNA

Pro získání DNA ze vzorku tkáně je nezbytná její separace, přičemž existuje řada metodických modifikací. V současné době se používá řada komerčních kitů pro kolonovou chromatografii s vlastnostmi iontového výměníku. Základní princip purifikace DNA se dá shrnout do několika fází. Nejdříve dochází k lýze buněk tkáně, k tomu je použito detergentu SDS a proteinázy K, které rozštěpí proteiny. Následně je k vyvázání proteinů ze vzorku použito (opakovaně) fenol-chloroformu a oddělená vodná fáze obsahující DNA je následně vysrážena etanolem (Brown (Ed.), 1991a). Pro izolaci RNA se používá denaturačního pufru TRI Reagent. Pro následnou sekvenaci RNA je však nutný její převod do komplementární DNA reverzní transkriptázou (Brown (Ed.), 1991a).

3.1.6 PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je enzymatická metoda, díky které lze namnožit kratší úsek DNA s využitím páru primerů (forward a reverse), termostabilní DNA polymerázy (Taq polymeráza, získaná z termorezistentních organismů) a nukleotidů, které se účastní výstavby templátové DNA. Metoda probíhá v cyklických fázích zahřívání a ochlazování v termocykleru. Po denuraci fragmentů za vysoké teploty, kdy dochází k rozvolnění dvoušroubovice, dochází k ochlazení a v této fázi pak nasedají primery na určitá místa vlákna.

Na ně se pak váže DNA polymeráza a dochází k syntéze komplementárního vlákna a cyklus se poté několikrát opakuje. Například po dvaceti opakováních cyklu získáváme 2^{21} kopií požadované sekvence (Brown (Ed.), 1991b). Metoda PCR má dnes více modifikací, jednou z nich je Droplet digital PCR (ddPCR). Kromě detekce SNP, jedno z využití, pro které se ddPCR stala populární, je detekce zřídka se vyskytujících mutantních alel (Kang et al., 2016). Tato technika je založena na rozdělení vzorku na tisíce kapiček. Po průběhu PCR reakce každá kapička buď obsahuje požadovanou nukleovou kyselinu, či nikoliv, což umožňuje odhad počtu molekul v reakci statistickou metodou Poissonovy distribuce. Výsledky jsou vyjádřeny jako počet kopií na mikrolitr vzorku (Campomenosi et al., 2016).

3.1.7 Sekvenování

Metodické základy moderních sekvenačních metod byly položeny již koncem 70. let minulého století, především zásluhou dvojnásobného nositele Nobelovy ceny Frederika Sangera. Jeho terminační metoda s použitím dideoxynukleotidů nese jeho jméno a v principu se s určitými modifikacemi používá i v současných sekvenačních metodách. V původním uspořádání byla založena na procesu replikace DNA, kdy k jednořetězcové DNA nasedá radioaktivně označený primer a syntéza DNA (ve čtyřech oddělených zkumavkách) probíhá za účasti standardních deoxynukleotidů (dNTP) a jednoho ze čtyř dideoxynukleotidů, který se náhodně začlení do řetězce, čímž zastaví syntézu nového vlákna a v reakci tak vzniknou různé dlouhé fragmenty, jejichž délka je posléze elektroforeticky analyzována na polyakrylamidovém gelu a je sestaven výsledný sekvenogram (Sanger, Coulson, 1975). Výsledky se pak „ručně“ odečítaly na polyakrylamidových gelech. Tímto způsobem samozřejmě nebylo možné osekvenovat genomy vyšších organismů o velikosti v řádu 10^9 bp. Celý proces je dnes plně automatizován v přístrojích založených na kapilární elektroforéze, kde probíhá separace fragmentů s koncovými ddNTP označenými fluorescenčními barvami, které emitují světlo různé vlnové délky. To je zaznamenáváno laserovým čidlem a předáváno do počítače, kde se příslušná sekvence zobrazí jako sled různě barevných vrcholů odpovídajících jednotlivým nukleotidům. Samotná sekvenační reakce (elongace primerů a terminace vznikajícího řetězce) probíhá ve směsi, která obsahuje ve vhodném poměru naředěné všechny dNTP, fluorescenčně označené všechny ddNTP, DNA polymerázu, sekvenovanou DNA (DNA templát) a příslušné primery. V poslední dekádě jsme svědky bouřlivého rozvoje technologií tzv. „next generation sequencing“, které vedly k osekvenování prototypu lidského genomu (International Human Genome Sequencing Consortium, 2001), posléze genomů tisíců jedinců z různých populací (Exome Aggregation Consortium, 2016) a

dokonce genomu pravěkých lidí (Prüfer et al., 2014). Zároveň přibývaly a stále přibývají kompletní sekvence různých druhů zvířat, včetně genomu koně (Wade et al., 2009). Co se týká stáří sekvenované DNA, drží kůň dokonce rekord, když se podařilo získat sekvenci z kosti pleistocenního koně uložené v permafrostu s odhadovaným stářím 560-780 000 let před současností (Orlando et al., 2013). Tyto anotované sekvence jsou pak východiskem pro studie zaměřené na hledání specifických variant jednotlivých genů ovlivňujících významné vlastnosti a pro celogenomové asociační studie (známé pod zkratkou GWAS – genome wide association studies). Přehled o těchto technologiích založených na paralelním sekvenování miliónů krátkých úseků DNA podává přehledný článek Goodwin et al. (2016). Je nasnadě, že analýza výstupů z takové sekvenace s mnohonásobným prosekvenováním každého z přibližně 3 miliard bazí typického savčího genomu, by byla nemožná bez paralelního vývoje vysoce výkonných počítačů. Jednu z hojně používaných sekvenačních platform nabízí firma Illumina. Získané sekvence jsou k dispozici v genomových databázích. Nové metody, kromě navýšení množství rozličných sekvencí, rovněž učinily tento proces méně finančně náročným (Goodwin et al., 2016).

3.1.8 Laboratoře poskytující testaci

V současné době je nabídka specializovaných testů již značně široká, stejně tak se zvýšil počet laboratoří, které chovatelům tyto možnosti poskytují. Jednou z nejpestřejších nabídek se může pochlubit například Veterinary Genetics Laboratory University of California, Davis, která má v běžné nabídce jen pro koňovité kromě ověřování paternity také cca 15 testů na dědičné choroby, jejichž cena se většinou pohybuje okolo 40 USD (UC Davis, 2016). Středoevropskému chovateli geograficky blíže možnost různých testů na dědičné choroby nabízí např. německá Laboklin, inzerující cca 12 druhů testace pro koně (Laboklin, 2016). Z českých laboratoří jmenujme především laboratoř imunogenetiky ČMSCH a.s., Hradištko pod Medníkem, či Laboratoř Agrogenomiky Mendelovy Univerzity v Brně, jejich nabídka však zatím není tak široká a omezuje se především na ověřování původu, či zbarvení koní, i když ČMSCH nabízí například i testaci na SCID (viz níže) (ČMSCH, 2016). Vzorkem tkáně pro izolaci DNA bývala tradičně krev, dnes většina laboratoří doporučuje odběr žíní s cibulkami, výhodou je rovněž snadnost pořízení adekvátního vzorku bez asistence veterinárního lékaře.

3.2 Ověřování původu koní

3.2.1 Význam analýzy původu

Ověření paternity koní je již delší čas nezbytnou podmínkou pro zápis jedinců do některých plemenných knih, zvláště do těch uzavřených, jako například u plemen anglický plnokrevník, klusák či arabský plnokrevník. Kontrola původu a související požadavky jsou rovněž u řady hospodářských zvířat zakotveny v obecné zootechnické legislativě, například v tzv. plemenářském zákoně ČR. Ač plemenné knihy některých dalších plemen tuto podmínku nestanovují, ověření původu by mělo být chovatelům nástrojem pro jejich šlechtitelský záměr. Dřívější metodu testace na základě krevních skupin nahradil na konci minulého století systém využívající analýzu polymorfismu mikrosatelitů. Tato metoda, která bude podrobněji popsána níže, je dnes běžnou záležitostí a na našem území tuto službu poskytuje například laboratoř imunogenetiky ČMSCH a.s., Hradištko pod Medníkem, která je držitelem akreditace International Society for Animal Genetics (ISAG).

Další samostatnou kapitolou, související s ověřováním původu koní, je analýza rodokmenů pomocí studií mateřských linií na základě mitochondriální DNA (mtDNA), která přináší cenné poznatky o původu některých populací a rovněž je díky ní možno zpětně analyzovat chyby v evidenci plemenných knih.

3.2.2 Ověření paternity

Ověřování paternity metodou analýzy polymorfismu mikrosatelitů je dnes již běžnou a cenově chovatele příliš nezatěžující záležitostí, přičemž kvalita a standardizace tohoto procesu je na mezinárodní úrovni koordinována ISAGem. Tato instituce, pořádající pravidelné workshopy podporující výměnu poznatků na poli imunogenetiky a rovněž dohlížející na kvalitu testací paternity jednotlivými laboratořemi prostřednictvím akreditačních testů, vydává také seznam doporučených mikrosatelitních markerů, které jsou využívány při testaci paternity. Z tohoto důvodu se například usnadnila kontrola identity jednotlivých zvířat při jejich pohybu v mezinárodním prostoru. Pro příklad, u A 1/1 plemenných knih je tento standartní profil markerů součástí exportní dokumentace každého jedince, která kopíruje pohyb plnokrevníka mezi jednotlivými zeměmi po celý jeho život, tudíž je díky této standardizaci možno kdykoliv jednoduše porovnat vzorek odebraný konkrétnímu koni, u něhož existují pochybnosti o jeho identitě, s tímto profilem, který byl stanoven při ověření paternity.

ISAG doporučuje při této testaci využití základní sady devíti mikrosatelitů - AHT4, AHT5, HMS6, HMS7, HTG4, VHL20, ASB2, HMS3 a HTG10. Dále je pak doporučeno několik dalších mikrosatelitů (ASB17, ASB23, LEX33, HMS2, HTG6 a HTG7) pro zvýšení pravděpodobnosti správného výsledku (ISAG, 2016). Biologickým vzorkem pro izolaci DNA bývají nejčastěji vytrhlé žíně s cibulkami, případně krev. Nejčastěji užívanou metodou analýzy je PCR (viz. 3.6) a následné vyhodnocení polymorfismů fragmentační analýzou v automatickém sekvenátoru. Pro výsledek je použito matematických a statistických vzorců pro výpočet pravděpodobnosti vyloučení nesprávného rodiče. Například Choi et al. (2012) ve své studii, která zahrnovala ověření paternity u 1308 zástupců anglického plnokrevníka a Korean Native Horse touto metodou za použití čtrnácti mikrosatelitů, dospěli k pravděpodobnosti 0.9998 – 0.9999 (což je vyšší pravděpodobnost, než jaká je stanovena jako minimum pro mezinárodní standart), přičemž 1003 ze sledovaných 1005 hříbat bylo kompatibilních s uvedenými rodiči (tj. 99.80 %). Tato čísla potvrzují, že je metoda analýzy polymorfismu mikrosatelitů velmi spolehlivým nástrojem pro identifikaci jedince a ověření paternity.

3.2.3 Analýza rodokmenů a fylogeneze pomocí mtDNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) je cyklická molekula, představující mimojadernou součást genetické informace, vyznačující se výhradně maternální dědičností. Mitochondriální DNA se nerekombinuje a přenáší se v podobě několika variant, je však obecně náchylnější k mutacím. mtDNA obsahuje geny kódující enzymy významné v dýchacím řetězci, z tohoto důvodu byly vybrány jako kandidátní geny pro demonstrování vztahu mezi genotypem a atletickou výkonností u savců (Harrison, Gomez, 2006). Tradičně mnoho chovatelů koní věřilo, že na výkonost potomka má větší vliv matka než otec. Toto tvrzení dosud nelze podložit, nicméně studiem mateřských linií na základě mtDNA se zabývá řada vědeckých skupin. Tyto analýzy ve spojení s analýzou rodokmenu přinášejí významné poznatky o vzdálených populacích zakladatelů plemene a rovněž je díky nim možné odhalit chyby ve vedených záznamech plemenných knih. S nejpečlivějšími a nejdéle vedenými záznamy, které sahají až k úzké skupině zakladatelů zahrnutých do první plemenné knihy, se setkáváme u anglického plnokrevníka. První plemennou knihu (General Stud Book, vol. 1.) vydal James Weatherby již v roce 1791, přičemž takto dalekosáhlá evidence rodokmenů nemá obdobu u žádných jiných hospodářských zvířat (Bower et al., 2013). Je ovšem pochopitelné, že na stoprocentní pravdivost těchto záznamů v průběhu století se lze těžko spolehnout, přestože byly vedeny v dobré víře a s nesmírnou pečlivostí, která svědčí o úsilí chovatelů udržet

unikátní vlastnosti plnokrevníka. Po dlouhou dobu vlastně neexistovala žádná možnost genetické kontroly (ověření původu).

V roce 2012 byla publikována analýza 83 mitochondriálních genomů, která zahrnovala široké spektrum plemen (Achilli et al., 2012). Bylo definováno 18 hlavních haplotypových skupin (A-R), které diverzifikovaly od neolitu do pozdějších dob. Fylogenetický kořen odpovídající pramáti současných koní byl odhadnut na 130–160 kya. U všech studovaných plemen koně domácího (*E. caballus*) byly detekovány všechny popsání mt haplotypové skupiny, s výjimkou F, která se vyskytuje jen u *E. Przewalskii*. To dále potvrzuje, že tento poslední žijící divoký kůň není předkem koní domácích. Naproti tomu velká diverzita ostatních mt skupin u moderních plemen ukazuje, že na domestikaci se podílela velká skupina mateřských linií vyhynulého *E. ferus*. Řada nově definovaných diagnostických mutací v haplotypech v rámci jednotlivých skupin může mít další široké uplatnění v různých genetických studiích, včetně objasnění vlivu mt genů na výkonnost u plnokrevníka (Achilli et al., 2012).

Zatímco orientální původ malé skupiny legendárních hřebců – zakladatelů plnokrevníka (přičemž nejvýznamějšími byli Darley Arabien, Godolphin Arabian a Byerley Turk) je jednoznačně popsán v General Stud Book (GSB), původ plnokrevných matek je znám méně a byl rovněž předmětem mnoha diskuzí. V nejstarší historii byly totiž detaily o původu klisen – zakladatelek často opomíjeny (Bower et al., 2011). Bower et al. (2011) svojí rozsáhlou studií významně přispěli k objasnění původu klisen zakladatelské populace, často souhrnně označovaných jako „Royal Mares“. Tato studie mtDNA u mnoha plemen koní rozdělených do různých geografických oblastí ukázala, že historické záznamy odkazující na výlučný arabský původ klisen – zakladatelek (Royal Mares) se neslučuje s distribucí etablovaných mt. haplotypů. Naopak se ukázalo, že vysoký podíl měly také klisny evropského původu – tedy British a Irish native mares.

Navzdory faktu, že dle pokynů mezinárodní komise pro plnokrevné plemenné knihy (ISBC) jsou zpětné opravy původů koní v plemenných knihách již zapsaných nežádoucí, další významnou studií, kterou provedli Bower et al. (2012b), byl zpochybněn původ významného hřebce Bend Or(GB) (1877), jehož vliv v populaci anglického plnokrevníka je zásadní. Na druhou stranu potvrdila původ legendárního Eclipse(GB) (1764), předka přibližně 95% současných zástupců plemene anglický plnokrevník (Bower et al., 2012b). Z koster obou

hřebců, vystavených v Royal Veterinary College a v Natural History Museum v Londýně, byly odebrány vzorky pro extrakci DNA a byly porovnány se vzorky 296 současných plnokrevníků. Tato analýza byla provedena za účelem stanovení největší pravděpodobnosti vztahů mezi současnými a historickými maternálními liniemi a rozčlenění variant mtDNA do příslušných rodin. Výsledek analýzy dal za pravdu původu Eclipse v souladu s rodokmenem uváděným v GSB a zároveň potvrdil autentičnost kosterní expozice. Zpochybnil však pedigree hřebce Bend Or a nastolil otázku jeho možné záměny s hřebcem Tadcaster(GB) (1877), Bend Orova polobratra po stejném otci (Doncaster(GB) (1870)), avšak z jiné matky. Tato studie názorně ilustruje, jakým způsobem může soudobá genetická analýza odhalit nesoulad v historických záznamech.

3.2.4 Analýza otcovské linie pomocí NRY úseku Y chromozómu

Zatímco mtDNA se dědí po mateřské linii, pro sledování výhradně otcovské linie lze využít NRY úsek Y chromozómu, který v průběhu dělení nerekombinuje. Výsledky práce Wallner et al. (2013) ukazují na velmi nízkou nukleotidovou variabilitu Y chromozómu u moderních koní s pouhými šesti haplotypy (HT), které jsou opět jasně odlišné od *E. Przewalskii*. Na rozdíl od poměrně široké základny mateřských linií, definovaných pomocí mtDNA, můžeme na základě malé diverzity NRY usuzovat na velmi malou velikost efektivní populace hřebců v průběhu domestikace. Variabilita Y chromozómu mohla být dále zmenšena v důsledku chovatelských programů, umožňujících široké využití plemenů z významných hřebčínů. Tato studie rovněž ukázala, že u současného plnokrevníka je téměř fixován haplotyp HT3, který pravděpodobně vznikl mutací ancestrálního haplotypu HT2 v linii Eclipse(GB) (1784) a vyskytuje se pak již u všech hřebců této linie, počínaje Eclipsovým potomkem ve třetí generaci Whalebone(GB) (1807). Tento závěr byl učiněn na základě kombinované molekulárně genetické a rodokmenové analýzy ukazující na výlučnou přítomnost haplotypu HT2 u různých teplokrevných plemen směřujících k jednomu ze zakladatelů anglického plnokrevníka – Darley Arabianovi (asi 1700), přímého předka Eclipse (Wallner et al., 2013).

3.3 Význam srsti koní a související choroby

3.3.1 Význam

Mnoho lidí věří, že barva srsti koně má co do činění rovněž s jejich výkonností. Například studie Stachurské et al. (2007) zkoumá, zda je dostihová výkonnost ovlivněna barvou srsti, zejména u základních barev a u běloušů. Nebyl však nalezen žádný vztah mezi výkonností a barvou koně, konkrétně dostihová výkonnost není spojena s gray lokusem. Nicméně barvy koní hrají samozřejmě nadále roli při identifikaci koně i jako nástroj použitelný při pochybnosti v otázkách původu koní. A především, jelikož řada existujících barev srsti a rovněž souvisejících faktorů, které mají negativní dopad na ekonomickou produkci chovatele, jsou podmíněny geneticky, znalost genetického pozadí barev koní je pro chovatele užitečným nástrojem (Adrian, 2013).

3.3.2 Základní genotypy barev koní

Základní barvy koní jsou nejčastěji popisovány jako vraník, ryzák a hnědá, či tmavě hnědá. Základní zbarvení je určeno dvěma vzájemně na sebe působícími lokusy (extension (E) a aguti (A)), které působí na funkci melanocytů. Tyto lokusy určují, zda bude v odpovídajícím melanozómu, organele, ve které vzniká pigment, produkován eumelanin (černý a hnědý pigment), nebo phaeomelanin (červený a žlutý pigment). Čtyři další geny, které jsou odpovědné za nařazení základní barvy u koní byly popsány jako SLC45A2, SLC36A1, PMEL17 a MYO5A. Tyto geny mají princip dědičnosti dominantní, či s neúplnou dominancí a redukuje množství vytvářeného pigmentu přímo inhibicí produkce pigmentu, či nepřímo inhibicí jeho distribuce z melanozomů. Tyto geny mohou působit buď na eumelanin, na phaeomelanin, nebo na oba (Brooks, Bellone, 2013).

Zatímco tyto geny (ASIP a MC1R) modifikují základní zbarvení, gen pro bílou barvu (W) určuje, zda bude srst plně pigmentovaná, či nepigmentovaná, a grey gen (G), zda bude postupem času kůň postupně vybělovat. Oproti tomu bílé odznaky, jako například hvězda, lysina na hlavě, či odznaky na nohou, jsou výsledkem spolupůsobení genetických a negenetických faktorů. Za bílé odznaky je však rovněž odpovědné další značné množství genů (Adrian, 2013).

Bílá strakatost se vyskytuje ve dvou typech. Nepravidelné, asymetrické odznaky bílé skvrnitosti na těle. Tyto zahrnují dva typy zbarvení – Tobiano a Overo. Dále pak odznaky s

pravidelnou skvrnitostí – Leopard complex (či) Appaloosa complex. Letální geny působí značné odchýlení od normálu s následkem smrti. Tyto geny se značně liší v čase jejich letálního projevu. Některé působí smrt zygoty, či embrya, zatímco jiné působí v pozdějších fázích vývoje. Letální předpoklady jsou zastoupeny těmito genotypy:

- Gen pro bílé zbarvení - dominantní homozygot (WW) způsobí smrt plodu v uteru.
- Dominantní homozygot v genu pro grošování (RnRn) je letální a působí smrt plodu v uteru.
- Dominantní homozygot v genu na lokusu pro zbarvení overo, nesoucí overo lethal white syndrome, působí smrt hříbat po narození (Thiruvankadan et al., 2008).

Přehled fenotypových projevů z hlediska barev srsti koní podle exprese jednotlivých genů je uveden v příloze v tabulce č.2. Z této tabulky můžeme rovněž vyčíst, že určitá spojení dominantních alel jsou předpokladem pro vznik dědičných chorob, často letálního charakteru. Vztah mezi zbarvením koní a dědičnou chorobou je často vysvětlován pleiotropním působením některých genů. Tyto geny se podílejí na dvou, či více nesouvisejících biochemických procesech, tudíž mutace v jednotlivém genu vytváří nezávislý efekt u několika orgánů, či tkání. Selektce na jeden žádoucí znak s sebou tedy může přinášet nepředvídané a nežádoucí znaky ovlivněním funkce genů v těchto nesouvisejících procesech (Brosnahan et al., 2012).

Během posledních let bylo použito genomiky a zmapování celého genomu k vypracování DNA testů pro různé varianty barev koní. Genové mapy a srovnávací postupy byly použity k přiřazení několika znaků barev srsti k dědičným chorobám na konkrétních chromozómech. Současné molekulárně genetické studie barev koní pomáhají identifikovat přímo geny a mutace zodpovědné za varianty těchto zbarvení. Navíc byly identifikovány mikrosatelitní markery spojené s těmito znaky (Thiruvankadan et al., 2008). Přehled jednotlivých genotypů a jejich projevu je uveden v příloze v tabulce č. 3.

Ačkoliv zbarvení koní může být jednoduše určeno fyzickým vzhledem, genetické testování umožňuje identifikaci zbarvení v případě, že není vizuálně zcela jasné. Možné genetické kombinace zbarvení mohou být určeny studiem DNA obou rodičů. Studie molekulární genetiky může poskytnout identifikaci genů a mutací zodpovědných za rozdílnost zbarvení. Laboratoře identifikující geny pro zbarvení navíc mohou rovněž provést zároveň test na dědičnou chorobu (Adrian, 2013). Laboratoře jsou dnes běžně schopné poskytnout

genetický test specifické mutace pro následující zbarvení: Red Factor (Extension), Agouti, Appaloosa Spotting, Appaloosa Pattern-1, Camarillo, Cream, Dominantní Bílá, Dun, Pearl, Champagne, Silver, Bělouš, Sabino 1, Splash White, Tobiano a Lethal White Overo.

Některá zbarvení koní mohou být navázána, či přímo determinovat související chorobu. Příkladem pleiotropního vztahu mezi zbarvením a chorobou je zvýšený výskyt melanomů u vybělujících běloušů (Brosnahan et al., 2012). Koně s tímto zbarvením se rodí zbarvení, ale postupně s přibývajícím věkem ztrácí pigment a okolo šestého až osmého roku se stávají bílými. Bělouši rovněž vykazují vysokou incidenci kožních melanomů (u 70–80 % běloušů starších patnácti let se vyskytují) a kratší délku života. Tento fenotyp je způsoben 4.6-kb duplikací v intronu 6 genu STX 17 (syntaxin 17). Gen STX17 a jemu v blízkosti se nacházející gen NR4A3 jsou oba nadexprimované v melanomech běloušů. Bělouši, kteří jsou přenašeči mutace v genu ASIP (agouti signaling protein) způsobující ztrátu jeho funkce, vykazují vyšší incidenci melanomů, což ukazuje, že zvýšení přenosu signálu z melanocortinového receptoru 1 podporuje rozvoj melanomů u běloušů. Ztráta pigmentu srsti je u běloušů plně dominantní. Pro porovnání rychlost vybělování, míra grošování, incidence melanomů a výskyt vitiliga (nepigmentované plochy kůže) vykazují mezi bělouši vysokou variabilitu. Homozygotní jedinci s touto mutací vykazují vyšší vnímavost vůči vzniku melanomů (Pielberg et al., 2008).

3.3.3 Overo lethal white syndrome

„Střevní aganglionóza, či „overo lethal white foal syndrome“ (OLWS) je autozomálně recesivní choroba postihující hříbata plemen American Paint Horse, Quarter Horse a vzácně i Anglického plnokrevníka. Výsledkem chovu jedinců, přenašečů OLWS může být hříbě, které je téměř, či úplně bílé barvy a umírá na koliku krátce po narození kvůli funkčním střevním obstrukcím (způsobeným naprostou absencí nervových ganglií ve střevních pletencích). V naprosté většině případů (více, jak 94%) jsou heterozygoti s OLWS zbarvení Frame Overo, mnohdy White Calico Overo a Frame Blend Overo (Finno et al., 2009). (Pozn.: Někteří autoři uvádějí OLWS jako autozomálně dominantní chorobu.)

Pro OLWS je typické bílé zbarvení hříbat a abnormality střevního traktu, které způsobují koliku a související příznaky do 12 hodin od narození. Na koliku nezabírají analgetika a postupné roztažení břicha je pozorováno spolu s absencí odchodu fekálií. Některá hříbata mohou být hluchá, s modrýma očima. Všechna celá bíle narozená hříbata však nemusí

mít OLWS. Dominantní homozygot či heterozygot s OLWS bude mít bílou barvu srsti a nebude trpět agangliózou (Finno et al., 2009).

Proti následkům syndromu neexistuje léčba a prognóza je bezvýhradně fatální. Genetická příčina zodpovědná za OLWS je jednoduchá záměna páru bází (mutace missense – substituční bodová mutace) způsobující náhradu isoleucinu za lysin v kodónu 118 genu endothelin receptor B (EDNRB) lokalizovaném na chromozómu 17. Postižená hříbata jsou homozygoti v tomto genu (Lys118/Lys118) a heterozygoti (Ile118/Lys118) jsou přenašeči (Finno et al., 2009).

Pokud budeme křížit dva heterozygotní jedince se zbarvením overo, předpokládáme 50% narozených potomků rovněž heterozygotních, 25% potomků se zbarvením solid a 25% potomků homozygotních s OLWS. Výsledkem křížení jedinců se zbarvením overo a solid jsou takto zbarvená hříbata bez OLWS. Chovatelé by samozřejmě měli být schopni rozeznat koně, u kterých je riziko vzniku OLWS u hříbat vysoké. Diagnostické testy k identifikaci chovných jedinců, u kterých je riziko vysoké, jsou dnes běžnou záležitostí (metoda PCR). Extrakce DNA se provádí ze vzorků odebraným potenciálním rodičům (krevní vzorek či žíně s cibulkami). Diagnostika určí, zda jsou tito jedinci nositeli mutace Ile118Lys EDNRB (Metalinos et al., 1998).

Využití tohoto testu tedy dává chovateli do rukou jasný nástroj, jak zavést především preventivní opatření vzniku tohoto syndromu u hříbat a to diagnózou rodičů a tedy i patřičnou volbu jedinců určených k reprodukci. Využívání této diagnózy je velmi důležité, aby bylo omezováno šíření této choroby.

3.3.4 Leopard spotting complex a noční slepota

Leopard spotting complex (LP) je soubor souvisejících znaků nacházený u několika plemen jako komplex dědičných znaků, obdobný polygenním. Přítomnost alespoň jedné dominantní alely způsobuje expresi řady nepigmentovaných znaků, včetně proměnlivých symetrických bílých znaků soustředěných na zádi, pruhovaná kopyta, bílá sclera (bělima), skvrnitou kůži a postupnou depigmentaci srsti, známou jako „varnish roaning“. Heterozygoti mají obvykle oválné pigmentové skvrny v místech bílého zbarvení, zatímco homozygoti mají pouze několik takových skvrn, či žádné. Leopard spotting complex je výsledek mutace v genu TRPM1 (Holl et al., 2015). TRPM1, rovněž známý jako Melastatin1 (MLSN1), patří do rodiny genů kódujících proteiny kationtových kanálů, je zodpovědný za vnitrobuněčnou koncentraci Ca⁺⁺ (Bellone et al., 2008). Homozygoti s alelou LP jsou postiženi kongenitální stacionární noční slepotou (CSNB), která je výsledkem náhodného působení mutace TRPM1,

ačkoliv ta ještě nemusí determinovat molekulární mechanismus zodpovědný za depigmentovaný fenotyp (Holl et al., 2015). Poslední studie sekvencí RNA vykazují 1378 bp inserce v intronu 1, která je potenciální příčinou. Tato inserce (long terminal repeat) endogenního retroviru byla kompletně spojena s alelou LP. Identifikace této inserce u tří starověkých vzorků DNA naznačuje, že se udržuje v genomu koní nejméně 17 000 let (Bellone et al., 2013).

Kongenitální stacionární noční slepota (CSNB) je neprogresivně dědičně podmíněná choroba vyskytující se nejčastěji u Appaloos. Toto podmínění je rovněž popsáno u koní Paso Fino i u anglického plnokrevníka (Brosnahan et al., 2012). CSNB je charakterizována narušením vidění ve tmě a je přítomno již od narození. Stupeň poruchy může být různý, u některých závažněji postižených koní se objevují náznaky poruchy i za denního světla. Je možné, že k míře postižení CSNB přispívá i krátkozrakost. Diagnostika této choroby se provádí elektroretinografií (ERG) (Sandmeyer et al., 2007). Tato metoda dnes může být nahrazena DNA testem na přítomnost dominantní sestavy v lokusu LP.

Dominantní homozygotní sestava LP/LP tedy determinuje přímo oba znaky, zbarvení leopard spotting complex a vznik CSNB, což bylo prokázáno zjištěnou expresí TRPM1 v pigmentované kůži heterozygotů (obdobnou jako u jiných plemen, než Appaloosa) a mnohonásobně vyšší expresí v sítnici. Předpokládá se, že příčinou CSNB je defektní neurální přenos v dráze sítnice (Bellone et al., 2008).

DNA test nám může poskytnout nejen diagnostiku choroby, ale především může být použit k otestování chovných jedinců a chovatel dostává do ruky nástroj pro vhodný výběr. Výsledkem tohoto testu je:

N/N	Potomci jsou bez Leopard Complex (Appaloosa) spotting.
N/LP	Heterozygot, 50% potomků zdědí LP gen*.
LP/LP	2 kopie mutace pro Leopard Complex, všichni potomci zdědí LP gen* a budou postiženi CSNB.

* Expresie zbarvení Leopard complex je proměnlivá a bílé odznaky se nemusí vyskytovat u všech koní, kteří zdědili tento gen (UC DAVIS.edu, 2016).

3.3.5 Lavender foal syndrome

Jedním z posledních objasněných efektů pleiotropního působení je v současné době Lavender Foal Syndrome (LFS), neboli syndrom levandulového hříběte, rovněž uváděn jako „Letální naředění barvy srsti“. Je popsán u plnokrevných i polokrevných Arabských koní, většinou egyptského původu a jedná se o letální autozomálně recesivní dědičnou chorobu. Srst takto postižených narozených hříbat je popisována jako levandulová či světle šedá až světle ryšavá. Choroba se projevuje několika neurologickými příznaky, zahrnujícími tetanické bezděčné svalové křeče, hyperextenzi hlavy a krku, nystagmus a nekoordinovaný pohyb končetin (Bellone, 2010). Takováto hříbata mají potíže s koordinací pohybu a vstát po narození, tudíž nemohou sát mateřské mléko. Léčba dosud neexistuje a tato hříbata, neuhynouli sama, bývají většinou utracena do prvního týdne života.

Kandidátním genem pro odhalení mutace, způsobující tuto chorobu, byl myosin VA (MYO5A), zmapovaný na lokusu 10,5 Mb chromozómu ECA1 a související protein RAB27A, který způsobuje obdobné neurologické poruchy u myši a lidí. Jelikož však tento protein nebyl zjištěn v souvislosti s LFS, byl vybrán MYO5A za kandidátní gen pro další výzkum, který určil za příčinu syndromu delecí jedné báze v exonu 30 (ECA1 g.138235715del). Tato delece dává vzniku předčasného stop kodónu při translaci exonu 30 a změně následujících dvanácti aminokyselin. Následkem je narušení migrace melanocytů v nervových buňkách, dochází k nesprávnému transportu glutamátových receptorů a sekrečních granulí, což vysvětluje přítomné neurologické poruchy LFS (Brooks et al., 2010). V současné době je již metoda testace na LFS dostupná a k dispozici chovatelům pro výběr chovného páru. Tento test je nabízen například německou laboratoří v Bad Kissingen.

3.4 Dědičné choroby

Následující přehled dědičných chorob, ke kterým je aktuálně k dispozici testace v laboratořích, je shrnut v tabulce č. 4. Obecně lze říci, že tyto testy slouží většinou ke stanovení homo-heterozygotnosti v požadovaném lokusu a do rukou chovatelů se tak dostává nástroj pro vhodnou volbu reprodukčního páru.

3.4.1 Choroby kosterní svaloviny

Hyperkalemická periodická paralýza (HYPP)

Hyperkalemická periodická paralýza (HYPP) je choroba s autozomálně dominantní dědičností, která byla popsána u plemen koní Appaloosa, Paint Horse, u Quarter Horse a jejich hybridů. Tato choroba je spojována s Quarter Horse plemenným hřebcem Impressive a odhaduje se, že až 4% populace tohoto plemene mohou být postižena (Bowling et al., 1996). Choroba se projevuje od asymptomatických projevů až po pravidelné svalové křeče a slabost končící ulehnutím zvířete. Charakteristickými příznaky HYPP je myotonie, výhřez očního víčka, třes svalstva a ztížené dýchání, po ulehnutí může nastat i smrt. Příčinou je missense mutace (záměna C za G) v genu SCN4A lokalizovaném na chromozómu ECA 11, který produkuje protein účastnící se procesů v sodíkových kanálech kosterní svaloviny a ovlivňující membránový potenciál, resp. jeho snížení. Nepřetržitá depolarizace myocytů se klinicky projevuje paralýzou (Brosnahan et al., 2012). Epizody slabosti, či paralýzy se projevují stejně u homozygotů i heterozygotů, pokud je přítomna dominantní alela s touto mutací, i když dominantní homozygoti vykazují větší frekvenci záchvatů, silnější dýchací obtíže a klinické příznaky se u hříbat projevují již do několika dní po narození. Heterozygoti bývají postiženi méně a příznaky se zpravidla neobjevují před odstavem (Finno et al., 2009).

Test na přítomnost mutantní alely již dnes poskytuje řada laboratoří, principem je odlišit postiženého homo i heterozygota od koně nepostiženého. Jelikož se jedná o dominantní chorobu, chovatel musí počítat s tím, že i křížení nepostiženého koně s heterozygotem dává 50% šanci na hříbě postižené HYPP, u homozygota tak bude pravděpodobnost 100%. Z tohoto důvodu je dnes například tento test jednou z podmínek zápisu do plemenné knihy American Quarter Horses (AQHA), homozygoti nejsou pro zápis způsobilí vůbec, heterozygoti a koně HYPP nepostižení jsou patřičně označeni a evidováni (Finno et al., 2009).

Polysaccharide storage myopathy (PSSM)

Polysaccharide storage myopathy (PSSM) je choroba s autozomálně dominantní dědičností vyskytující se především u Quarter Horses, ale i u dalších plemen. Její prevalence je u QH přibližně 11%, i když u některých linií je to až 28% (Tryon et al., 2009). Její klinické projevy jsou různě závažné, od ztuhlosti svalů, svalové bolesti, neochotě k pohybu, slabosti, abnormality v pohybu až po ulehnutí zvířete. Choroba je způsobena mutací v genu Glykogen syntáza 1 (GYS1) na chromozómu ECA 10, způsobující vypnutí regulace syntézy glykogenu, který se poté kumuluje ve svalech. Touto mutací je jednoduchá záměna páru bází v lokusu 10 Mb, s následnou produkcí histidinu místo argininu (McCue et al., 2009). Při zkoumání některých druhů myopatie byla kromě této mutace nalezena i mutace v genu RYR1, která je spojena i s maligní hypertermií. PSSM je rovněž spojeno s řadou dalších neuromuskulárních obtíží (Brosnahan et al., 2012). Dnes je dostupný test, který určí, zda se jedná o postiženého homozygota, heterozygota, či koně bez postižení.

Maligní hypertermie

Maligní hypertermie je choroba kosterní svaloviny s autozomálně dominantní dědičností, způsobená záměnou C za G v exonu 46 genu pro ryanodinový receptor (RYR1) na chromozómu ECA 10. Výsledná záměna glycinu za arginin vytváří poruchu ve vápníkovém kanále sarkoplazmatického retikula (Aleman et al., 2009). Tato choroba může být vyvolána i inhalačními anestetiky a projevuje se zvýšenou tělesnou teplotou nad 40°C, metabolickou acidózou, tachykardií, někdy i s následkem smrti. Mutace způsobující toto onemocnění byla zatím popsána u dvou zástupců Quarter Horses. Testace na přítomnost mutace na bázi metody PCR je dnes již k dispozici (Finno et al., 2009).

Rekurentní zátěžová rbdomyolýza (RER)

Recurrent exertional rhabdomyolysis, též známá jako „tying up“, neboli rekurentní zátěžová rbdomyolýza je další myopatií koní projevující se bolestivou ztuhlostí, kontrakcemi svalů a nekrózami svalových vláken. Nejčastěji se toto onemocnění vyskytuje u anglického plnokrevníka, u kterého je popsáno jako choroba s autozomálně dominantní dědičností s možným vlivem vnějšího prostředí (Brosnahan et al., 2012). Uváděná prevalence dosahuje až 10% populace. Studie Fritz et al. (2012), provedená na vzorcích 217 A 1/1 v Severní Americe označila za kandidátní gen lokalizovaný na lokus 13Mb na chromozómu ECA 16, avšak přesná lokalizace vykazovala mezi jednotlivými populacemi značnou variabilitu.

Upřesnění příčiny této choroby je předmětem aktuálního výzkumu a laboratoře tudíž dosud neposkytují testaci na RER.

3.4.2 Choroby spojené s imunitním systémem

Severe combined immunodeficiency (SCID)

Severe combined immunodeficiency (disorder) (SCID) je choroba převážně arabských koní s autozomálně recesivním způsobem dědičnosti. Příčinou mutací je delece pěti párů bazí v genu kódujícím DNA protein kinase katalytickou podjednotku (DNA-PKcs) na chromozómu ECA 9. Tato delece způsobuje poruchu dozrávání T i B lymfocytů. Postižená hříbata proto nejsou schopna vytvářet specifickou buněčnou či humorální odpověď na patogeny (Brosnahan et al., 2012). Rodiče přenašející tuto mutaci nevykazují žádné znatelné vnější postižení. Hříbata s homozygotní sestavou této mutace zpravidla hynou do tří měsíců. Dříve byl odhadován výskyt této mutace na 8% v populaci čistokrevných arabských koní, v současné době však například laboratoř VetGen University of Texas uvádí výskyt až 17% v populaci těchto koní v USA (VetGen, 2016). Test na tuto mutaci je dnes běžně k dispozici, nabízí jej za vstřícných podmínek například i laboratoř imunogenetiky ČMSCH Hradištko pod Medníkem. V některých zemích je tento test povinnou podmínkou při licentování plemenných hřebců, jinde je pouze doporučen. Pokud tedy budeme křížit přenašeče s jedincem negativním na tuto mutaci, bude 50% procent potomků negativních a 50% přenašečů. Při křížení dvou přenašečů tedy máme pravděpodobnost 25%, že se narodí hříbě postižené SCID a 50% potomků budou přenašeči, tato kombinace se proto nedoporučuje. Obecným cílem tohoto testu je rovněž eliminovat tuto chorobu v populaci arabských koní, aniž by byli přenašeči striktně z chovu selektováni, což by mohlo vést u těchto plemen ke značnému snížení genové základny, která je poměrně úzká (ACHPAK, 2016).

Fell Pony Immunodeficiency Syndrome

Jedná se o fatální chorobu, charakterizovanou mnoha hematopoetickými abnormalitami včetně anémie a imunodeficiency u hříbat Fell pony. Předpokládá se autozomálně recesivní dědičnost a odhaduje se, že více než 50% populace Fell pony může být heterozygotními přenašeči (Brosnahan et al., 2012). Mutace způsobující tento syndrom byla detekována na chromozómu ECA26 v genu SLC5A3 (Fox-Clipsham et al, 2011). Testace Fell pony provádí například Animal Health Trust ve Velké Británii, výsledek je opět informací pro chovatele, zda u dotyčného jedince není přítomna mutace způsobující syndrom či je

heterozygot (přenašeč), homozygot je postižen chorobou a nepřežije (ATH, 2016). Tato informace opět slouží pro výběr patřičných reprodukčních párů.

3.4.3 Onemocnění kůže

Junctional epidermolysis bullosa (JEB)

Junctional epidermolysis bullosa (JEB) je autozomálně recesivní kožní chorobou, vyskytující se nejvíce u koní American Saddlebreds a velmi často i u belgiků (Baird et al., 2003). U postižených hříbat se vyskytují oblasti, kde sliznice a kůže postrádá epitel a vznikají vředy, občas jsou přítomny i oční a dentální abnormality. Hříbata trpí opakovanými kožními infekcemi, účinná léčba není dostupná a prognóza je většinou fatální. Příčinou je porucha produkce lamininu – 5, proteinu nezbytného pro adhezi mezi pokožkou a škárkou. Mutace způsobující chorobu se nachází na chromozómu ECA5, jedná se o inzerci cytosinu v genu LAMC2. Mutace vytvoří předčasný stop kodón a funkční proteinový řetězec nemůže být syntetizován. Tato mutace je zodpovědná za vznik choroby u ostatních plemen, než u American Saddlebreds, u těch byla příčina nalezena v delecii v genu LAMA3 na chromozómu ECA8 (Brosnahan et al., 2012). Diagnostické testy jsou dnes běžně dostupné.

HERDA

Hereditární equinní regionální dermální astenie (HERDA) je autozomálně recesivní dermatologická choroba vyskytující se především u plemene quarter horses a příbuzných plemen, přičemž frekvence přenašečů v této populaci je okolo 3.5% (Tryon et al., 2009). Jejimi projevy jsou hyperextenzibilita a křehkost kůže, kožní léze, hematomy, seromy a abscesy přítomné především na hřbetě a na hlavě, s možnou sekundární infekcí. Choroba se obvykle začíná projevovat ve stáří jednoho až jednoho a půl roku, není dostupná účinná léčba a prognóza je většinou fatální, na druhou stranu postižené klisny jsou schopny projít celou březostí a poskytnout nepostižené hříbě. Histologická diagnóza prostřednictvím kožní biopsie je nespolehlivá, i proto je dnes upřednostňována genetická testace (Brosnahan et al., 2012). Příčinou je missense mutace v exonu 1 genu PPIB na chromozómu ECA1, způsobující substituci argininu za glycin. Mechanismus, kterým tato mutace působí příčiny choroby je dosud neobjasněn, nicméně testace je dnes běžnou záležitostí (Brosnahan et al., 2012).

3.4.4 Onemocnění krevního systému

Glanzmannova trombastenie

Glanzmannova trombastenie je dědičný defekt funkce krevních destiček, respektive jejich snížená funkčnost při zástavě krvácení. Byly identifikovány dvě různé mutace v souvislosti s glykoproteinovým komplexem krevních destiček u koní s tímto onemocněním. Ačkoliv je toto onemocnění u koní vzácné, mělo by být zahrnuto do diferenciální diagnózy koní u jedinců, kteří vykazují vyšší krvácivost (Brosnahan et al., 2012).

Chronic Progressive Lyphoedema (CPL)

Chronic Progressive Lyphoedema (CPL) je vyčerpávající choroba mnoha plemen charakterizovaná zhuštěnou lymfou, otoky, fibrózou tkání a cév, degenerací elastinu, neovaskularizací a arteriosklerózou. Předpokládá se, že mechanismus onemocnění je způsoben degradací elastinu a tím i následné dysfunkce lymfatického systému. Byly zkoumány polymorfismy genu FOXC2, které jsou příčinou obdobné choroby u lidí, avšak asociace mezi těmito polymorfismy a chorobou u koní nebyla nalezena, tudíž tato choroba stále čeká na odhalení svého genetického pozadí (Brosnahan et al., 2012).

3.4.5 Neurologická onemocnění

Cerebelární abiotropie

Cerebelární abiotropie je degenerativní stav u hříbat Arabských koní, typicky se projevující již od narození jako progresivní neurologická dysfunkce. Klinickými příznaky této mozkové choroby jsou ataxie a s ní spojená snížená schopnost koordinace, třes hlavy a hypermetrie. Hříbata mohou chorobu přežít, nicméně nejsou poté vhodná pro pracovní zátěž. Již byl prozkoumán princip autozomálně recesivní dědičnosti, avšak příčinná mutace nebyla dosud detekována (Brosnahan et al., 2012).

MCOA

Mnohočetná kongenitální oční anomálie (MCOA) je charakterizována nahloučením různých defektů v oční bulvě. Dědičnost choroby je kodominantní, heterozygoti mívají cysty na řasnatém tělísku, v sítnici či v duhovce, homozygoti navíc šedý zákal, hypoplastickou duhovku, vyčnívající rohovku a občas odchlípenou sítnici. Lokus pro MCOA byl detekován na 4.9.Mb region na chromozómu ECA6 a je v úzké vazbě s působením genu PMEL17, který

determinuje štříbrné zbarvení srsti a u takto zbarvených koní je například prevalence MCOA v USA a Kanadě okolo 50%. Dalším výzkumem by mělo být určeno, zda je PMEL17 skutečně spojen se vznikem MCOA (jelikož je tomu tak u ostatních druhů savců), či s některým jiným genem (Brosnahan et al., 2012).

3.4.6 Respirační onemocnění

Recurrent Airway Obstruction (RAO)

Recurrent Airway Obstruction (RAO), chronická bronchitida koní, se projevuje kašlem a namáhavým dýcháním už při slabé zátěži. Projevy se zhoršují, pokud je kůň v kontaktu s plesnivým senem. Právě takové vnější faktory mají vliv na míru projevu onemocnění. Kandidátní geny a genetické pozadí predispozice pro projev RAO jsou předmětem současného výzkumu (Brosnahan et al., 2012).

3.4.7 Metabolická onemocnění

Glykogen Branching Enzyme Deficiency (GBED)

Glykogen Branching Enzyme Deficiency (GBED), překládáno též jako „Deficience enzymu pro ukládání glykogenu“, je choroba s autozomálně recesivním způsobem dědičnosti. Nejčastěji se vyskytuje u plemen Quarter Horse a Paint Horse. Například Wagner et al (2006) uvádí prevalenci této choroby 8,3% u QH a 7,1% u Paint Horses. Podle stejné studie je v průměru 2,5% abortů u těchto plemen způsobeno právě GBED. Mutace zodpovědná za vznik této choroby je záměna báze C za A, působící vznik předčasného stop kodónu v exonu 1 genu kódujícího enzym GBE1, který katalyzuje polymeraci glukozových zbytků a jejich větvení při tvorbě glykogenu. Tento gen je lokalizován na chromozómu ECA 26. Postižená hříbata nejsou schopna vytvářet, ukládat a využívat glykogen, což vede k poruchám růstu, zhoršení srdeční činnosti, svalového a nervového systému. Klinicky se GBED projevuje aborty slabých hříbat, u živých pak deformitami končetin, záchvaty, slabostí při vstávání, dýchacími obtížemi a náhlou smrtí hříběte (Brosnahan et al., 2012). Jelikož příčinná mutace již byla detekována, testace na GBED je dnes v nabídce komerčních laboratoří.

Equinní metabolický syndrom

Equinní metabolický syndrom je endokrinním onemocněním, které se projevuje obezitou a rezistencí vůči inzulínu. Rovněž se o něm spekuluje jako o predispozičním faktoru pro vznik laminitidy, nicméně analýza genetických mechanismů s laminitidou souvisejících, kterou provedl Belknap (2013), tuto souvislost nepotvrdila. Mechanismus působení je v současné době teprve předmětem výzkumu a není jasné, zda je syndrom spojen jen s jedním genem, či s více. Předpokládá se, že výsledky výzkumu equinního metabolického syndromu budou použity jako model pro lidský metabolický syndrom (Brosnahan et al., 2012)

3.5 Reprodukce a fertilita

3.5.1 Význam fertility v chovatelské praxi

Vysoká fertilita je v praxi z ekonomického hlediska významnou složkou chovatelského průmyslu, ať se již jedná o majitele plemenných hřebců (o kolik méně klisen zabřezne, o to méně bude vybráno připouštěcích poplatků), či chovných klisen (nezabřezne-li klisna, je nutno čekat téměř rok na další připouštěcí sezonu, aniž by poskytla hříbě). Hodnoty celkové fertility se mohou značně lišit mezi populacemi jednotlivých plemen, podle užití reprodukční metody (přirozená plemenitba, či umělá inseminace) i podle vyspělosti regionů ve vztahu k technologii reprodukce. Obecně lze například u anglického plnokrevníka říci, že je celkově dosahováno (pouze) 67% úspěšnosti (Mahon a Cunnigham, 1982). Fertilita chovných jedinců je samozřejmě ovlivňována i dalšími faktory, věkem, datem zapaštění během připouštěcí sezony, typem a stářím semene, nebo počtem zapaštění během říje (Sieme a Distl, 2012).

3.5.2 Genetické založení reprodukce

Popsat jednoduše genetickou regulaci související s reprodukční „výkonností“ savčích druhů obecně je značně problematické a celkový mechanismus navíc není dosud plně popsán, neboť se jedná o rozsáhlý komplex zahrnující několik tisíc genů, které působí v různých fázích vývoje jedince a který řídí celou kaskádu dějů od determinace pohlaví po fertilizaci (Raudsepp, Chowdhary, 2013). Už jen vývoj samčích a samičích pohlavních orgánů v období od oplození po pohlavní dospělost řídí u savců samo o sobě okolo tisíce genů. Další tisíc genů reguluje správnou funkčnost dospělých gonád. U savců obecně je s reprodukcí spojeno

asi 10% z celkové genetické výbavy. Mutace v těchto genech mohou způsobit abnormality ve vývoji reprodukčního systému a tím nepříznivě ovlivnit fertilitu (Chowdhary et al., 2008).

Současné studie lidského genomu i genomu myši jasně ukazují, že geny ovlivňující mechanismus vývoje samčích pohlavních orgánů, spermatogenezi, motilitu spermií a další důležité funkce spojené se samčí reprodukcí, jsou lokalizovány na Y chromozómu. Jeho rozhodující role u samčí fertility je podtržena dalším faktem, a sice že přibližně 10 až 15% idiopatické neplodnosti u mužů je způsobeno mutací na Y chromozómu. Dostupné diagnostické testy pro neplodnost mužů jsou rovněž založeny výhradně na detekci Y chromozómových markerů. Tyto studie mohou posloužit k identifikaci genetických indikátorů, které mohou být použity ke sledování a zlepšování fertility u plemenných hřebců (Chowdhary et al., 2008). Tyto výsledky tudíž mohou posloužit jako nástroj pro sledování kvalitativních predispozic u plemenných hřebců. Oproti hřebcům však u klisen tyto molekulární nástroje např. pro diagnózu fertility, či hodnocení kvality oocytů ještě před jejich samotným užitím v reprodukční technologii dosud chybí (Raudsepp et al., 2013).

3.5.3 Zvrat pohlaví (sex reversal syndrome)

Zvrat pohlaví (sex reversal syndrome) je jev, kdy genetické založení pohlaví nesouhlasí s příslušným fenotypovým projevem. To znamená, že hřebci budou vybaveni dvojicí gonozomů XX a naopak klisny XY. Tento jev s sebou nese, kromě abnormalit v přirozeném chování, rovněž sterilitu, tudíž je z hlediska fertility fatální. Konstrukce genové mapy Y chromozómu je tudíž užitečným nástrojem pro studium příčin tohoto syndromu. Zdá se, že klisny s výbavou XY mohou být SRY (Sex-determining region Y) negativní a SRY pozitivní. Molekulární analýza SRY negativních klisen naznačuje, že zde dochází k delecí na jejich Y chromozómu, která nezahrnuje pouze SRY lokus, ale nejméně šest dalších sekvencí. Následná sekvenace BAC klonů (bacterial artificial chromosome) zahrnující tento úsek by měla vymezit hranice delecí a odhalit, které další geny podléhají delecí. Analýza SRY pozitivních klisen však dosud neprokázala jasnou příčinu vzniku syndromu, tou by mohla být pravděpodobně mutace v jiných genech ovlivňujících pohlavní determinaci (Chowdhary et al., 2008).

3.5.4 Vliv hormonů na reprodukci

Jako kandidátní pro vliv na fertilitu plemeníků byly vybrány geny kódující produkci hormonů zodpovědných za vývoj varlat, pohlavní dospívání a ovlivňující chování přímo

spojené s reprodukcí, tj. gonadotropin-releasing hormonu, luteotropního hormonu, folikulostimulačního hormonu (FSH), testosteronu, estrogeneru a inhibinu. Koncentrace inhibinu ve varlatech se zdá být dobrým faktorem pro ranou detekci potíží s fertilitou u mladých hřebců. Inhibin přímo reguluje růst varlat skrze jeho dopad na sekreci FSH a ovlivňuje funkci Leydigových buněk, produkujících testosteron. Sieme a Distl (2012) detekovali pět intronových mutací v rámci genu INHBA, které byly jasně asociovány s vlivem plemeníka na procento případů březosti za říji u zkoumané skupiny Hanoverských koní. Tyto polymorfismy v genu INHBA mohou ovlivňovat produkci semene a jeho kvalitu u plemenných hřebců. Stejní autoři rovněž detekovali čtyři SNP v genu FSHB kódujícím produkci FSH, který má zásadní roli pro růst a proliferaci Sertolihových buněk. Tyto polymorfismy naznačují, že intronové mutace v rámci FSHB jsou v nerovnováze ve vztahu k fertilitě hřebců a mají na ni tudíž značný vliv. Analýza polymorfismů v sekvencích genu PRLR sice neprokázala jejich vliv na produkci prolaktinu, nicméně tato data ukazují, že intragenní SNP jsou přímo ve vztahu s fertilitou hřebců skrze vliv prolaktinu na spermatogenezi a sexuální stimulaci způsobené rozdíly v úrovni transkripce genu PRLR (Sieme a Distl, 2012).

3.5.5 Spermatogeneze

Spermatogenesis-associated protein 1 (SPATA1) je považován za zásadní pro spermatogenezi a spermiogenezi, nicméně detaily jeho působení nejsou dosud přesně známy. Rovněž nebyly detekovány mutace, které by způsobovaly změny v kódování sekvence SPATA1. Přesto vykazují tyto intragenní polymorfismy silný vztah k fertilitě hřebců, jelikož pravděpodobně ovlivňují regulaci exprese samotného genu (Sieme a Distl, 2012).

Equine cysteine-rich secretory protein 3 (CRISP3) je jedním z hlavních proteinů přítomných v samotném spermatu, jeho funkcí je mimo jiné ochrana spermií při transportu reprodukčním traktem klisny. S fertilitou hřebců byla asociována missense mutace E208K v tomto genu. Podíl březích klisen za říji u zkoumané skupiny byl v průměru o 7% nižší u CRISP3 heterozygotních hřebců, než u homozygotních (Sieme a Distl, 2012).

Dalšími intragenními SNP, u kterých Sieme a Distl (2012) nacházejí vztah k fertilitě plemenných hřebců, jsou polymorfismy spermatozoa-specific phospholipase C (PLCz), proteinu ovlivňujícího růst oocytů. Koncentrace PLCz byla snížena u hřebců se sníženou plodností, což naznačuje, že by mohla být exprese PLCz použita jako indikátor neplodnosti.

3.5.6 Prenatální diagnostika a sexování spermatu

Značný nárůst v posledních letech zaznamenala prenatální diagnostika, respektive preimplantační genetické testy, kdy vzorky jsou odebírány z embryí a testovány na známé syndromy, choroby (např. HYPP) a jiné genetické abnormality. U koní kromě jiných znaků také může být detekováno pohlaví či barva srsti, což může být u některých plemen předmětem selekčního zájmu. Výsledek takové analýzy poté slouží k rozhodnutí, zda dané embryo použít k transferu, či nikoliv (Herrera, 2016). Další související metodou může být „sexování spermatu“, tj. třídění spermií podle determinujícího pohlaví již v inseminační dávce, nicméně nutno říci, že tato metoda dosud nevykazuje vysokou úspěšnost, je nákladná a pro plemena koní, která akceptují jako reprodukční metodu pouze přirozenou plemenitbu (například anglický plnokrevník) je logicky nepoužitelná.

3.6 Dostihová výkonost

3.6.1 Myostatin

U anglického plnokrevníka tvoří masa kosterní svaloviny okolo 55% z jeho celkové tělesné hmotnosti a aerobní kapacita ($VO_{2max} > 200 \text{ ml O}_2/\text{kg}/\text{min}$) je vyšší, než u ostatních „atletických druhů“ podobné velikosti (Tozaki et al., 2011). Pokud budeme výkonost koní spojovat především se svalovou soustavou, resp. s vývojem svaloviny jedince, je nezbytné věnovat samostatnou kapitolu proteinu myostatin, který je pro růst svaloviny zásadní. Myostatin, rovněž nazýván GDF – 8, patří do super-rodiny TGF – β růstových a diferenciacních faktorů. Bílkovina myostatin je silným inhibitorem utváření svalové tkáně, respektive je jedním z faktorů bránících nekontrolovanému růstu (Stefaniuk et al., 2016). Gen MSTN kodující produkci myostatinu byl lokalizován na chromozóm ECA18. Bylo popsáno několik variant genu MSTN, které jsou asociovány se svalovou hypertrofií různého stupně u několika druhů savců, typicky u skotu, psů, myši i u člověka (Stinckens et al., 2011). Hill et al. (2010a) se proto zaměřili na studium polymorfismu MSTN genu u plnokrevníka. Studovaná populace zahrnovala elitní skupinu vítězů grupových dostihů, kde byl největší předpoklad maximálního výkonu na dané distanci dostihu. Koně pak byli rozděleni do jednotlivých kohort podle optimální vítězné distance. Jeden z popsaných SNP v prvním intronu MSTN (g.6649373C>T) byl signifikantně asociován s optimální dostihovou distancí, takže koně s genotypem C/C vítězili na sprintérských tratích, genotyp C/T byl nejvhodnější pro středotraťáře a T/T pro vytrvalce. Zjednodušený model tedy uvádí tratě v průměru okolo

6.2. furlongů (do 1300 metrů) jako distanční optimum (mimo jiné Williamson a Beilharz (1998) ve své práci například uvádějí koeficient dědivosti distančního optima u australských dostihových koní 0.94 ± 0.03) pro homozygota C/C, pro heterozygota C/T s větším rozpětím okolo 9.1. furlongů (1300 až 1900 metrů) a pro homozygota T/T vzdálenost okolo 10.5 furlongů (2100 metrů) a více. Tato studie prokazuje, že některá z variant genu MSTN vykazuje vliv na výkonnostní fenotyp u plnokrevníka a na raný vývoj svalového aparátu (Hill et al., 2012). Vzhledem k tomu, že tato studie byla zaměřena primárně na MSTN gen, v následující práci stejní autoři použili metodiku celogenomové asociace (GWAS) (Hill et al., 2010b). Tato analýza potvrdila jako významnou pouze oblast 1,7 Mb se 7 SNP v okolí MSTN genu na chromozómu 18. Jako další kandidátní gen se zde nachází také NAB1, který interaguje s transkripčním aktivátorem EGR1 (early growth response 1), který patří mezi významně nadexprimované geny po tréninkové zátěži, s pravděpodobným vlivem na svalovou hypertrofii (McGivney et al., 2009). Nicméně, asociace tohoto genu se sledovaným fenotypem distančního optima nebyla významná. Naopak bylo potvrzeno, že i v rámci celogenomové analýzy má polymorfismus MSTN v lokusu g66493737C>T největší signifikantní predikční hodnotu pro odhad distančního optima u plnokrevníka (Hill et al., 2010b). S tím korespondují i výsledky další analýzy transkriptomu po tréninkové zátěži, kde byla exprese MSTN genu nejvíce snížena ve srovnání s dalšími 58 geny s poklesem exprese (McGivney et al., 2009). Při dalším studiu zaměřeném na variabilitu MSTN genu byly definovány 4 další SNP v oblasti 3'UTR a hlavně inserce 227bp, původem retrovirové sekvence ze skupiny SINE (short interspersed elements), do oblasti 5'UTR promotoru, 146 bp před transkripční start MSTN. Tato vmezeřená sekvence by mohla ovlivňovat, vzhledem ke své lokalizaci expresi MSTN genu. Při porovnání asociací Ins227bp a g.66493737C>T SNP s fenotypovým projevem distančního optima byl opět potvrzen jako nejsilnější vliv C/T genotypu. Mechanismus působení C/T variací MSTN není plně objasněn, možným vodítkem je lokalizace g.66493737C>T SNP v místě předpokládaného vazebného místa pro E2F transkripční faktor v intronu 1 MSTN. E2F se významně podílí na kontrole proliferace myoblastů (Hill et al., 2010b).

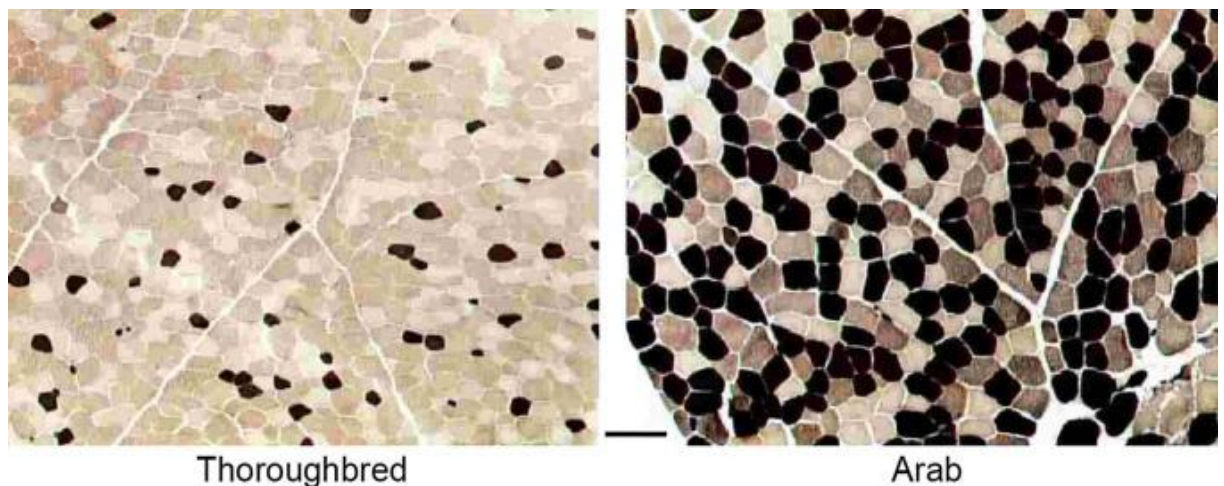
Velmi zajímavé výsledky přinesl přehled frekvencí C alely MSTN g.66493737C/T lokusu u plemen koní z různých geografických oblastí, včetně těch s předpokládaným podílem v zakladatelské populaci plnokrevníka v 18. století (Bower et al., 2012a). Relativně vysoká frekvence C alely (0,33) byla zjištěna u plemene Fulani z oblasti původních berberských koní v Kamerunu, kteří patří mezi dobře doložené předky plnokrevníka. Na

druhou stranu má C alela téměř nulovou frekvenci u dalších středoasijských a severoafrických plemen. Např. u plemene Akhal-Teke, známého extrémní vytrvalostí, je frekvence C alely 0,06, přičemž homozygoti C/C se vůbec nevyskytují, frekvence heterozygotů C/T je 0,11 a homozygotů T/T je plných 89 %. Vysoký výskyt C alely (0,32) byl dále zjištěn u místních plemen z Britských ostrovů. Nápadná je vysoká frekvence C alely (50 %) u shetlandských koní z oblasti, kde bylo chováno plemeno Galloway. Tito koně byli používáni v Británii pro dostihy v éře před etablováním plnokrevníka. Předpokládaným zdrojem C alely u plnokrevníka byla tedy pravděpodobně místní britská populace. Introdukce C alely se navíc odehrála přes mateřskou linii, svědčí pro to analýza DNA z muzejních vzorků kostí významných plemeníků 17. a 18. století, která ukázala, že všichni byli homozygoti T/T (Bower et al., 2012a). Jak se zkracovaly distance hlavních výkonnostních zkoušek, byla selekce v chovu plnokrevníka, prakticky již od počátku minulého století, zaměřena na ranost a vystupňovanou rychlost. To postupně vedlo ke zvýšení frekvence MSTN-C alely, zvláště prostřednictvím nových generací významných plemeníků s četným potomstvem. Pomocí matematického modelu koalescence se zdá, že k rozhodujícímu nárůstu C alely dochází v 50. a 60. letech prostřednictvím plemeníka Nearctic a jeho syna Northern Dancer, který je sám o sobě pojmem v chovatelské praxi (Bower et al., 2012a). Velký počet velmi úspěšných plemeníků, pokračovatelů této linie (např. Danehill, či Galileo), jistě povede k dalšímu šíření MSTN-C alely v populaci. Zvláště, když je dnes nemyslitelné, aby se na vrcholné úrovni (dostihy Group1 -3) uplatnil třeba i třídivový tempař bez závěrečného speedu. Ten ovšem musí být podložen i dostatečnou mírou speciální rychlostní vytrvalosti, což je jistě záležitost kombinací alel dalších genů podmiňujících fyziologické vlastnosti důležité pro atletickou výkonnost plnokrevníka. Genetická analýza tedy do jisté míry potvrzuje empirickou zkušenost chovatelů, kteří při sestavování rodokmenů budoucího potomstva využívají předpokládané návaznosti jednotlivých linií, včetně vzdáleného nebo i blízkého inbreedingu.

Praktické využití těchto poznatků tkví tedy například v možnostech rané selekce u plnokrevníka, respektive k predikci jeho distančního optima. Testace na tzv. „speed gene“ je dnes ve státech s vyspělejším dostihovým provozem již využívána. Příklad využití v praxi uvádí australský dostihový trenér David Hayes, majitel Lindsay Park Racing v Creightons Creek. Tato testace je prevencí ke zbytečnému vyřazení z tréninku například dvouleté klisny, která dosud nezvítězila, či neuspěla v dostizích do 1200 metrů. Tato testace může předpovědět její lepší výkony na delších vzdálenostech v pozdějším věku (Gibbons, 2014).

3.6.2 Svalová adaptace a další genetické faktory ovlivňující výkonnost

Jednoznačné rozdíly mezi jedinci mohou být určeny podílem svalových vláken. Například poměr v zastoupení jednoho druhu vláken, zkoumaný ze středního hýžd'ového svalu (*gluteus medius*) u široké kohorty populace koní stejného plemene, se pohybuje v rozmezí 10–85% (Rivero a Barrey, 2001). Svalová biopsie atletických typů koní rovněž vykazuje variabilitu zastoupení druhů svalových vláken podle jejich výkonnostního profilu, s jasně vyšším zastoupením bílých svalových vláken u sprinterů. V současné době existuje hojná evidence vlivu genetických faktorů na kompozici podílu svalových vláken ve svalech koní. Úspěch šlechtění koní na znaky spojené s atletickou výkonností po období několika staletí je zřejmý z obr. č.3, kde můžeme vidět jasný rozdíl v podílu bílých a červených svalových vláken u anglického plnokrevníka (sprinter) a araba (vytrvalce) ve svalové biopsii *gluteus medius* (Rivero a Hill, 2016).



Obr.č.3, (Rivero a Hill, 2016)

Zatímco mechanismus působení myostatínu na celkovou výstavbu svaloviny je již plně znám, komplex působení ostatních vlivů na molekulární úrovni je předmětem dalšího výzkumu, jehož pokrok by měl identifikovat jednotlivé polymorfismy, či varianty genů zodpovědné za konkrétní atletický fenotyp (Rivero a Hill, 2016). Tomuto tématu se široce věnuje například práce McGivney et al., (2010), která uvádí celou řadu kandidátních skupin genů, souvisejících s metabolismem, oxidativními ději a se svalovou strukturou, jejichž exprese byla zvýšená při vyšší zátěži sledovaných jedinců.

Dalším nadexprimovaným genem v kosterní svalovině je α -actinin-3 (ACTN3), který ovlivňuje svalovou kontrakci vytvářením spojení mezi tenkými filenty Z – disku. ACTN3 hraje nejvýznamnější roli pro vytváření silných kontrakcí filament při vysoké rychlosti. Tento

gen byl již sekvenován a porovnán s dalšími plemeny koní, samostatně podle jejich „atletického využití“. Absence homozygotů s genotypem AA u plnokrevníka a převažující genotyp GG u většiny ostatních plemen naznačuje, že alela A bude působit negativně na sprinterskou výkonnost a alela G naopak negativně na silové dispozice (Rivero a Hill, 2016).

Současné studie rovněž identifikovaly dočasně změněné geny související s metabolismem ve svalovině koní po pracovní zátěži a tréninku. Například exprese genů zodpovědných za oxidativní metabolismus a fungování mitochondrií byla navýšena, zatímco exprese genů zodpovídajících za glykolýzu zůstala nezměněna. Nástroje molekulární genetiky nám rovněž umožňují sledovat vztah mezi variantami specifických genů, souvisejících s metabolickými procesy a atletickou výkonností. Například Gu et al. (2010) při studiu osmnácti kandidátních genů pro výkonnost u plnokrevníka uvádějí jednoznačný, i když slabý vztah mezi výkonností a specifickým polymorfismem v CKM (creatine kinase, muscle) a COX4I2 (cytochrom c oxidáza, podj. 4, isoforma 2). Nicméně, polymorfismus v genu PDK4 (pyruvát dehydrogenáza kináza, isoenzym 4) je silně asociován s elitní dostihovou výkonností a nabízí se jeho využití pro systém selekce dostihových koní s kvalitnějšími předpoklady. PDK4 se uplatňuje při klesání oxidace glukózy a nárůstu oxidace mastných kyselin během submaximální zátěže. Jelikož se tyto geny podílejí na celkové výkonnosti s malým efektem, je velmi pravděpodobné, že na celkovém fenotypovém projevu ve vztahu k výkonnosti se podílí velký počet dalších genů. (Rivero a Hill, 2016).

4. Závěr

Mohutný rozvoj molekulárně biologických metod jako je vlastní sekvenování a editace genomu při současném snižování nákladů jistě povede v blízké budoucnosti k širokému využití těchto metod v chovatelské praxi. Další metodou, která aktuálně zaznamenala ohromný rozkvět je CRISPR Cas9, díky které lze úspěšně a s přesností měnit genetickou informaci. Jako obvykle zásadní vědecké poznatky mohou být využity k všeobecnému prospěchu, ale mohou být rovněž zneužity. Možnosti editace genomu vyšších obratlovců otevírají například možnosti genového dopingu. Dalším negativním faktorem může být potenciální prohloubení kvalitativních rozdílů v produkci zvířat mezi zeměmi a chovy, kterým je, či není možnost využití testace dostupná, ať už z důvodů ekonomických, či geografických, tj. že se mohou více rozevřít nůžky mezi chovateli bohatými a chudšími. Vzhledem ke komplexnosti biologických systému ale můžeme věřit, že se například neztratí pověstná nevyzpytatelnost turfu. Důležité ovšem je, že se otevírá možnost pozitivně ovlivňovat welfare koní, například prostřednictvím vyselektování některých dědičných chorob, či kompenzovat konstituční nedostatky, které s sebou nese proces domestikace. Tento fakt má svou rovnu etickou, ovšem souvisí úzce i s ekonomickou produkcí chovatelů. Jakým způsobem tyto možnosti v praxi uchopí samotní chovatelé koní nám ukáže čas.

5. Literatura

Achilli, A., Olivieri, A., Soares, P., Lancioni, H., Kashani, B. H., Perego, U. A., Nergadze, S.G., Carossa, V., Santagostino, M., Capomaccio, S., Felicetti, M., Al-Achkar, W., Penedo, M.C.T., Verini-Supplizi, A., Houshmand, M., Woodward, S.R., Semino, O., Silvestrelli, M., Giulotto, E., Pereira, L., Bandelt, H.J., Torroni, A. (2012). Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(7), 2449-2454. (2012).

Adrian, J.A.L. DVM (2013). *Equine Color Genetics and Deoxyribonucleic Acid Teting*. *Veterinary Science & Technology* 4:134

Aleman, M., Nieto, J. E., & Magdesian, K. G. (2009). Malignant hyperthermia associated with ryanodine receptor 1 (C7360G) mutation in Quarter Horses. *Journal of veterinary internal medicine*, 23(2), 329-334.

Bailey, E. (2015). Genetics After Twilight. *Journal of Equine Veterinary Science* 35, 361 – 366

Baird, J. D., Millon, L. V., Dileanis, S., Penedo, M. C. T., Charlesworth, A., Spirito, F., & Meneguzzi, G. (2003). Junctional epidermolysis bullosa in Belgian draft horses. *Proc Am Assoc Equine Practit*, 49, 122-126.

Belknap, J. K. (2013). Genomics of Laminitis. *Equine Genomics*, 255-264.

Bellone, R. R. (2010). Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses. *Animal genetics*, 41(s2), 100-110.

Bellone, R.R., Brooks, S. A., Sandmeyer, L., Murphy, B. A., Forsyth, G., Archer, S., Bailey, E., Grahn, B. (2008). Differential gene expression of TRPM1, the potential cause of congenital stationary night blindness and coat spotting patterns (LP) in the Appaloosa horse (*Equus caballus*). *Genetics* 179, 1861 – 1870

Bellone, R.R., Holl, H., Setaluri, V., Devi, S., Maddodi, N., Archer, S., Sandmeyer, L., Ludwig, A., Foerster, D., Pruvost, M., Reissmann, M., Bortfeldt, R., Adelson, D.L., Lim, S.L., Nelson, J., Haase, B., Engensteiner, M., Leeb, T., Forsyth, G., Mienaltowski, M.J., Mahadevan, P., Hofreiter, M., Paijmans, J.L.A., Gonzalez-Fortes, G., Grahn, B., Brooks, S.A., (2013). Evidence for a Retroviral Insertion in TRPM1 as the Cause of Congenital Stationary Night Blindness and Leopard Complex Spotting in the Horse. *Plos One* 8(10): e 78280

Bower, M. A., Campana, M. G., Whitten, M., Edwards, C. J., Jones, H., Barrett, E., Cassidy, R., Nisbet, R.E.R., Hill, E.W., Howe, C.J., Binns, M. (2011). The cosmopolitan maternal heritage of the Thoroughbred racehorse breed shows a significant contribution from British and Irish native mares. *Biology letters*, 7(2), 316-320.

- Bower, M. A., McGivney, B. A., Campana, M. G., Gu, J., Andersson, L. S., Barrett, E., Davis, C.R., Mikko, S., Stock, F., Voronkova, V., Bradley, D. G., Fahey, A.G., Lindgren, G., MacHugh, D.E., Sulimova, G., Hill, E.W. (2012a). The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse. *Nature communications*, 3, 643.
- Bower, M. A., Campana, M. G., Nisbet, R. E. R., Weller, R., Whitten, M., Edwards, C. J., Stock, F., O'Connell, T.C., Hill, E.W., Wilson, A. M., Howe, C.J., Barker, G., Binns, M. (2012b). Truth in the bones: resolving the identity of the founding elite thoroughbred racehorses. *Archaeometry*, 54(5), 916-925.
- Bower, M. A., Whitten, M., Nisbet, R. E. R., Spencer, M., Dominy, K. M., Murphy, A. M., Cassidy, R., Barret, E., Hill, E.W., & Binns, M. (2013). Thoroughbred racehorse mitochondrial DNA demonstrates closer than expected links between maternal genetic history and pedigree records. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 130(3), 227-235.
- Bowling, A. T., Byrns, G., & Spier, S. (1996). Evidence for a single pedigree source of the hyperkalemic periodic paralysis susceptibility gene in quarter horses. *Animal genetics*, 27(4), 279-281.
- 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 Genet*, 6(4), e1000909.
- Brooks, S. A., & Bellone, R. R. (2013). Coat color genomics. *Equine Genomics*, 143-153.
- Brosnahan, M.M., Brooks, S.A., Antczak, D.F. (2012). Equine Clinical Genomics: A Clinician's Primer. *Equine Veterinary Journal* 42 (7): 658-670
- Brown, T. A. (1991a). *Essential molecular biology: volume I a practical approach*. Oxford University Press.
- Brown, T. A. (1991b). *Essential molecular biology: volume II a practical approach*. Oxford University Press.
- Campomenosi, P., Gini, E., Noonan, D. M., Poli, A., D'Antona, P., Rotolo, N., Dominioni, L., Imperatori, A. (2016). A comparison between quantitative PCR and droplet digital PCR technologies for circulating microRNA quantification in human lung cancer. *BMC biotechnology*, 16(1), 60.
- Chowdhary, B. P., Paria, N., & Raudsepp, T. (2008). Potential applications of equine genomics in dissecting diseases and fertility. *Animal reproduction science*, 107(3), 208-218.
- Chowdhary, B. P. (2013). 1 Defining the equine genome: The nuclear genome and the mitochondrial genome. *Equine Genomics*, 1-9.
- Exome Aggregation Consortium (2016). Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *BioRxiv*, 030338.

- Finno, C.J., Bannasch, D.L. (2014). Applied equine genetics. *Equine Veterinary Journal* 46, 538 – 544
- Finno, C.J., Spier, S.J., Valberg, S.J. (2009). Equine diseases caused by known genetic mutations. *The Veterinary Journal* 179, 336 – 347
- Fox-Clipsham, L. Y., Carter, S. D., Goodhead, I., Hall, N., Knottenbelt, D. C., May, P. D., Ollier, W.E. & Swinburne, J. E. (2011). Identification of a mutation associated with fatal Foal Immunodeficiency Syndrome in the Fell and Dales pony. *PLoS Genet*, 7(7), e1002133.
- Fritz, K. L., McCue, M. E., Valberg, S. J., Rendahl, A. K., & Mickelson, J. R. (2012). Genetic mapping of recurrent exertional rhabdomyolysis in a population of North American Thoroughbreds. *Animal genetics*, 43(6), 730-738.
- Gibbons, A. (2014). Racing for disaster?. *Science*, 344(6189), 1213-1214.
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333-351.
- Gu, J., MacHugh, D. E., McGivney, B. A., Park, S. D. E., Katz, L. M., & Hill, E. W. (2010). Association of sequence variants in CKM (creatine kinase, muscle) and COX4I2 (cytochrome c oxidase, subunit 4, isoform 2) genes with racing performance in Thoroughbred horses. *Equine Veterinary Journal*, 42(s38), 569-575.
- Harrison, S. P., & Turrion-Gomez, J. L. (2006). Mitochondrial DNA: an important female contribution to thoroughbred racehorse performance. *Mitochondrion*, 6(2), 53-66.
- Herrera, C. (2016). Clinical Applications of Preimplantation Genetic Testing in Equine, Bovine, and Human Embryos. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 29-34.
- Hill, E. W., McGivney, B. A., Gu, J., Whiston, R., MacHugh, D. E. (2010b). 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 racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC genomics*, 11(1), 1.
- Hill, E. W., Gu, J., Eivers, S. S., Fonseca, R. G., McGivney, B. A., Govindarajan, P., Orr, N., Katz, L.M., MacHugh, D. (2010a). A sequence polymorphism in MSTN predicts sprinting ability and racing stamina in thoroughbred horses. *PLoS One*, 5(1), e8645.
- Hill, E.W., Ryan, P.D., MacHugh, D.E., (2012). Horses for courses: a DNA-based test for race distance aptitude in thoroughbred racehorses. *Recent patents on DNA & gene sequences*, 6(3), 203-208.
- Holl, H.M., Brooks, S. A., Archer, S., Brown, K., Malvick, J., Penedo, M. C. T., Bellone, R. R.(2015). Variant in the RFW3 gene associated with PATN1, a modifier of leopard complex spotting. *Stichting International Foundation for Animal Genetics* 47, 91 -101
- Choi, S. K., Lee, S. Y., & Cho, G. J. (2012). Individual identification and parentage verification of Thoroughbred horses and the Korean native horses based on microsatellite loci in Korea. *J. Anim. Vet. Adv*, 11(15), 2647-2651.

International Human Genome Sequencing Consortium (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409(6822), 860-921.

Kang, Q., Parkin, B., Giraldez, M.D., Tewari, M. (2016). Mutant DNA quantification by digital PCR can be confounded by heating during DNA fragmentation. *BioTechniques* 60, 175-185

Kazazian, H. H. (2004). Mobile elements: drivers of genome evolution. *science*, 303(5664), 1626-1632.

Mahon, G. A. T., & Cunningham, E. P. (1982). Inbreeding and the inheritance of fertility in the thoroughbred mare. *Livestock Production Science*, 9(6), 743-754.

McCue, M. E., Valberg, S. J., Jackson, M., Borgia, L., Lucio, M., & Mickelson, J. R. (2009). Polysaccharide storage myopathy phenotype in quarter horse-related breeds is modified by the presence of an RYR1 mutation. *Neuromuscular Disorders*, 19(1), 37-43.

McGivney, B. A., McGettigan, P. A., Browne, J. A., Evans, A. C., Fonseca, R. G., Loftus, B. J., Lohan, A., MacHugh, D.E., Murphy, B.A., Katz, L.M., Hill, E. W. (2010). Characterization of the equine skeletal muscle transcriptome identifies novel functional responses to exercise training. *BMC genomics*, 11(1), 1.

Metalinos, D.L., Bowling, A.T., Rine, J. (1998). A missense mutation in the endotheline-B receptor gene is associate with Lethal White Foal Syndrome. *Mammalian Genome* 9, 426-431

Morris, K. V., Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature reviews. Genetics*, 15(6), 423.

Orlando, L., Ginolhac, A., Zhang, G., Froese, D., Albrechtsen, A., Stiller, M., Schubert, M., Cappellini, E., Petersen, B., Moltke, I., Johnson, P.L., Fumagalli, M., Vilstrup, J.T., Raghavan, M., Korneliussen, T., Malaspina, A.S., Vogt, J., Szklarczyk, D., Kelstrup, C.D., Vinther, J., Dolocan, A., Stenderup, J., Velazquez, A.M., Cahill, J., Rasmussen, M., Wang, X., Min, J., Zazula, G.D., Seguin-Orlando, A., Mortensen, C., Magnussen, K., Thompson, J.F., Weinstock, J., Gregersen, K., Røed, K.H., Eisenmann, V., Rubin, C.J., Miller, D.C., Antczak, D.F., Bertelsen, M.F., Brunak, S., Al-Rasheid, K.A., Ryder, O., Andersson, L., Mundy, J., Krogh, A., Gilbert, M.T., Kjær, K., Sicheritz-Ponten, T., Jensen, L.J., Olsen, J.V., Hofreiter, M., Nielsen, R., Shapiro, B., Wang, J., Willerslev, E. (2013). Recalibrating Equus evolution using the genome sequence of an early Middle Pleistocene horse. *Nature*, 499(7456), 74-78.

Pielberg, G.R., Golovko, A., Sundström, E., Curik, I., Lennartsson, J., Seltenhammer, M.H., Druml, T., Binns, M., Fitzimmons, C., Lindrgen, G., Sandberg, K., Baumung, R., Vetterlein, M., Strömberg, S., Grabbher, M., Wade, C., Lindblad-Toh, K., Pontén, F., Heldin, C.H., Sölkner, J., Andersson, L. (2008). A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature genetics* 40. 1004 – 1009.
Dostupné z <<http://www.nature.com/naturegenetics>>

- Prüfer, K., Racimo, F., Patterson, N., Jay, F., Sankararaman, S., Sawyer, S., Heinze, A., Renaud, G., Sudmant, P.H., de Filippo, C., Li, H., Mallick, S., Dannemann, M., Fu, Q., Kircher, M., Kuhlwilm, M., Lachmann, M., Meyer, M., Ongyerth, M., Siebauer, M., Theunert, C., Tandon, A., Moorjani, P., Pickrell, J., Mullikin, J.C., Vohr, S.H., Green, R.E., Hellmann, I., Johnson, P.L., Blanche, H., Cann, H., Kitzman, J.O, Shendure, J., Eichler, E.E., Lein, E.S., Bakken, T.E., Golovanova, L.V., Doronichev, V.B., Shunkov, M.V., Derevianko, A.P., Viola, B., Slatkin, M, Reich, D., Kelso, J., Pääbo, S.. (2014). The complete genome sequence of a Neanderthal from the Altai Mountains. *Nature*, 505(7481), 43-49.
- Raudsepp, T., Das, P. J., & Chowdhary, B. P. (2013). Genomics of reproduction and fertility. *Equine Genomics*, 199-215.
- Rivero, J. L. L., & Barrey, E. (2001). Heritabilities and genetic and phenotypic parameters for gluteus medius muscle fibre type composition, fibre size and capillaries in purebred Spanish horses. *Livestock Production Science*, 72(3), 233-241.
- Rivero, J. L. L., & Hill, E. W. (2016). Skeletal muscle adaptations and muscle genomics of performance horses. *The Veterinary Journal*, 209, 5-13.
- Sandmeyer, L.S., Breaux, C.B., Archer, S., Grahn, B.H. (2007). Clinical and electroretinographic characteristics of congenital stationary night blindness in the Appaloosa and the association with the leopard complex. *Veterinary Ophthalmology* 10, 6, 368 – 375
- Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*, 94(3), 441-448.
- Sieme, H., & Distl, O. (2012). Genomics and fertility in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, 32(8), 467-470.
- Stachurska, A., Pięta, M., Łojek, J., & Szulowska, J. (2007). Performance in racehorses of various colours. *Livestock Science*, 106(2), 282-286.
- Stefaniuk, M., Ropka-Molik, K., Piórkowska, K., Kulisa, M., & Podstawski, Z. (2016). Analysis of polymorphisms in the equine MSTN gene in Polish populations of horse-234 breeds. *Livestock Science*, 187, 151-157.
- Stinckens, A., Georges, M., & Buys, N. (2011). Mutations in the myostatin gene leading to hypermuscularity in mammals: indications for a similar mechanism in fish?. *Animal genetics*, 42(3), 229
- Swinburne, J., & Lindgren, G. (2013). Genetic linkage maps. *Equine Genomics*, 11-47.
- Thiruvankadan, A.K., Kandasamy, N., Panneerselvam, S. (2008). Coat colour inheritance in horses. *Livestock Science* 117, 109 – 129
- Tozaki, T., Hill, E. W., Hirota, K., Kakoi, H., Gawahara, H., Miyake, T., Sugita, S., Hasegawa, T., Ishida, N., Nakano, Y., Kurosawa, M. (2012). A cohort study of racing performance in Japanese Thoroughbred racehorses using genome information on ECA18. *Animal genetics*, 43(1), 42-52.

Tryon, R. C., Penedo, M. C. T., McCue, M. E., Valberg, S. J., Mickelson, J. R., Famula, T. R., Wagner, M. L., Jackson, M., Hamilton, M. J., Nooteboom, S., Bannasch, D. L. (2009). Evaluation of allele frequencies of inherited disease genes in subgroups of American Quarter Horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 234(1), 120-125.

Wade, C. M., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Inslan, F., Lear, T.L., Adelson, D.L., Bailey, E., Bellone, R., Blöcker, H., Distl, O., Edgar, R.C., Garber, M., Leeb, T., Mauceli, E., MacLeod, J.N., Penedo, M.C.T., Raison, J.M., Sharpe, T., Vogel, J., Andersson, L., Antczak, D.F., Biagi, T.Binns, M.M., Chowdhary, B.P., Coleman, S.J., Della Valle, G., Fryc, S., Guérin, G., Hasegawa, T., Hill, E.W., Jurka, J., Kiialainen, A., Lindgren, G., Liu, J., Magnani, E., Mickelson, J.R., Murray, J., Nergadze, S.G., Onofrio, R., Pedroni, S., Piras, M.F., Raudsepp, T., Rocchi, M., Røed, K.H., Ryder, O.A., Searle, S., Skow, L., Swinburne, J.E., Syvänen, A.C., Tozaki, T., Valberg, S.J., Vaudin, M., White, J.R., Zody, M.C., Lander, E.S., Lindblad-Toh, K., Blöcker, H. (2009). Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*, 326(5954), 865-867.

Wade, C. M. (2013). Assembly and Analysis of the Equine Genome Sequence. *Equine Genomics*, 103-111.

Wagner, M. L., Valberg, S. J., Ames, E. G., Bauer, M. M., Wiseman, J. A., Penedo, M. C. T., Kinde, H., Abbitt, B., Mickelson, J. R. (2006). Allele frequency and likely impact of the glycogen branching enzyme deficiency gene in Quarter Horse and Paint Horse populations. *Journal of veterinary internal medicine*, 20(5), 1207-1211.

Wallner, B., Vogl, C., Shukla, P., Burgstaller, J. P., Druml, T., & Brem, G. (2013). Identification of genetic variation on the horse y chromosome and the tracing of male founder lineages in modern breeds. *PLoS One*, 8(4), e60015.

Williamson, S. A., & Beilharz, R. G. (1998). The inheritance of speed, stamina and other racing performance characters in the Australian Thoroughbred. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 115(1-6), 1-16.

Zentner, G. E., Henikoff, S. (2014). High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nature Reviews Genetics*, 15(12), 814-827.

Zdroje:

ACHPAK (2016). Genetické choroby plnokrevných arabských koní. [cit. 2016, 10-09] Dostupné z < <http://www.achpak.cz/uploaded/files/admin/1267737174.pdf> >

ATH (2016). Equine DNA testing. [cit. 2016, 12-07] Dostupné z < http://www.aht.org.uk/cms-display/genetics_fis.html >

ČMSCH (2016). [cit. 2016, 10-05] Dostupné z < <http://www.cmsch.cz/ke-stazeni/> >

ISAG (2016). Recommended ISAG panels of markers for parentage verification. [cit. 2016, 10-29] Dostupné z < http://www.isag.us/Docs/consignmentforms/02_PVpanels_LPCGH.doc >

Laboklin (2016). Dědičné choroby. [cit. 2016, 10-05] Dostupné z < http://www.laboklin.com/pages/html/cz/Genetic/main_races.html >

UC Davis (2013). Introduction to Coat Color Genetics. [cit. 2016, 07-05] Dostupné z < <https://www.vgl.ucdavis.edu/services/coatcolor.php> >

UC DAVIS (2016). Leopard Complex & Congenital Stationary Night Blindness. [cit. 2016, 07-10] Dostupné z < <https://www.vgl.ucdavis.edu/services/horse/AppaloosaWhiteSpotting.php> >

UC DAVIS (2016). Equine tests. [cit. 2016, 10-5] Dostupné z < <https://www.vgl.ucdavis.edu/services/horse.php> >

VetGen (2016). Severe Combined immunodeficiency (SCID). [cit. 2016, 10-09] Dostupné z < <http://www.vetgen.com/equine-scid-service.html> >

Alely a jejich projev v genech pro barvu srsti koní		
Lokus	Alela	Pozorovaný výsledek působení alel u Homozygotních a heterozygotních jedinců
W	W w	WW: Letální. Ww: Kůň s typickým nedostatkem pigmentu v kůži, zíně a oči jsou bílé. ww: Kůň je plně pigmentovaný.
G	G g	GG: Vybělující bělouš, narozený bez šedé barvy. Kůže i oči jsou stále pigmentované ve všech fázích. Gg: Stejně jako GG. gg: Kůň s postupujícím věkem nevykazuje vybělování.
E	E e	EE: Kůň má pigmentovanou kůži i zíně. Tmavý pigment v zíních může být distribuován i do okolních oblastí. Ee: Stejně jako EE. ee: Kůň má tmavě pigmentovanou kůži, ale zíně se jeví červené.
A	A a	AA: Pokud má kůň černé zíně (E), není takto zbarven na zbytku těla. Nemá účinek na červený pigment (ee). Aa: Stejně jako AA. aa: Pokud má kůň černé zíně (E), pak je stejně zbarvený po celém těle. Nemá účinek na červený pigment (ee).
C	C Ccr	CC: Kůň je plně pigmentován. CCcr: Červený pigment je naředěn do žluta; černý pigment zůstává beze změny. CcrCcr: Červený i černý pigment jsou naředěny na bledě krémovou. Zbarvení kůže i očí je rovněž naředěno.
D	D d	DD: Kůň vykazuje naředěné zbarvení těla do růžova, žluto-červena, žluté, či myšák a má černé skvrny včetně úhořího pruhu a dalších primitivních znaků. Dd: Stejně jako DD. dd: Zbarvení není naředěno
TO	TO to	TOTO: Charakteristické bílé znaky, známé jako zbarvení Tobiano. Nohy jsou obvykle bílé. ToTo: Stejně jako TOTO. toto: Zbarvení Tobiano se neprojeví.

Tab. č. 2. (UC Davis, 2013)

Genotyp	Zbarvení
W	Albín
G	Bělouš
E-, A-, CC, dd, gg, ww, toto	Hnědáček
E-, aa, CC, dd, gg, ww, toto	Vraník
ee, aa, CC, dd, gg, ww, toto	Ryzák
E-, A-, CC ^{cr} , dd, gg, ww, toto	Plavák
ee, CC ^{cr} , dd, gg, ww, toto	Palomino
C ^{cr} C ^{cr}	Cremello
E-, A-, CC, D-, gg, ww, toto	Dun
E-, aa, CC, D-, gg, ww, toto	Mouse dun
ee, CC, D-, gg, ww, toto	Červený plavák
E-, A-, CC, dd, gg, ww, TO-	Bay tobiano
ee, CC, D-, gg, ww, TO-	Red dun tobiano

Tab. č. 3. (UC Davis, 2013)

Choroba	Hlavní postižená plemena	Chromozóm	GEN	Mutace	Dědičnost
Hyperkalemická periodická paralýza (HYPP) (Cannon et al. 1995 ; Naylor et al. 1999 ; Rudolph et al. 1992a ; Rudolph et al. 1992b)	Quarter Horse Paint Horse Appaloosa a jejich kříženci	11	SCN4A	Záměna C za G záměna Phe za Leu	Autozomálně kodominantní
Polysaccharide Storage Myopathy (PSSM) (McCue et al. 2009 ; McCue et al. 2008a ; McCue et al. 2008b)	především Quarter Horse ale i další plemena	10	GSY1, +/- další	záměna G za A záměna Arg za His	Autozomálně dominantní
Maligní Hypertermie (Aleman et al. 2005 ; Aleman et al. 2009)	Quarter Horse	10	RYR1	záměna C za G záměna Arg za Gly	Autozomálně dominantní
Glycogen Branching Enzyme Deficiency (GBED) (Valberg et al. 2001 ; Ward et al. 2004 ; Ward et al. 2003)	Quarter Horse Paint Horses	26	GBE1	záměna C za A Předčasný stop kodón	Autozomálně Recesivní
Severe Combined Immunodeficiency (SCID) (Bailey et al. 1997 ; Shin et al. 1997 ; Wiler et al. 1995)	Arab	9	DNA-PK _{cs}	5 bp delece nestabilní protein	Autozomálně Recesivní
Junctional Epidermolysis Bullosa (JEB) (Graves et al. 2008 ; Lieto and Cothran 2003)	American Saddlebred	8	LAMA3	6589 bp delece dysfunkční protein	Autozomálně Recesivní
Junctional Epidermolysis Bullosa (JEB) (Milenkovic et al. 2003 ; Spirito et al. 2002)	Belgian French Drafts	5	LAMC2	C inzerce předčasný stop kodón	Autozomálně Recesivní
Hereditary Equine Regional Dermal Asthenia (HERDA) (Tryon et al. 2007 ; Tryon et al. 2005 ; White et al. 2004 ; White et al. 2007)	Quarter Horse	1	PPIB	Missense mutace substituce Gly za Arg	Autozomálně Recesivní
Overo Lethal White Syndrome (OLWS) (Metallinos et al. 1998 ; Santschi et al. 2001 ; Yang et al. 1998)	Paint Horses	17	EDNRB	záměna TC za AG tzn. záměna Ile za Lys	Autozomálně Recesivní
Gray Horse Melanoma (Pielberg et al. 2008)	většina plemen	25	STX17	Duplikace v intronu 6	Autozomálně dominantní
Lavender Foal Syndrome (Brooks et al. 2010)	Arabský kůň	1	MYO5A	G138235715del Bodová delece v exonu 30	Autozomálně recesivní

Tab. č. 4 (Brosnahan et al., 2012).