

Mendelova univerzita v Brně
Agromická fakulta
Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat



**Genetická analýza zbarvení u huculských koní
zařazených do genetického zdroje**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Tomáš Urban, Ph.D.

Vypracovala:

Bc. Alžběta Karbusická

Brno 2017

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: **Genetická analýza zbarvení u huculských koní zařazených do genetického zdroje** vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:

.....
podpis

Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat za výborné a odborné vedení mé práce prof. Ing. Tomáši Urbanovi, Ph.D., Ing. Ireně Vrtkové, Ph.D. z laboratoře agrogenomiky MENDELU a Ing. Věře Mátlové z VUŽV Uhřetěves za spolupráci v rámci analýzy genu *TBX3*, Ing. Jaroslavu Jelínkovi, CSc. za materiály a vnuknutí myšlenky na téma této práce, Ing. Anně Schmidtové za konzultace a vedení v rámci laboratorní části práce, všem chovatelům za ochotnou a příjemnou spolupráci při sběru vzorků a pořizování fotografií, Farmě Hucul vz. Ing. Ivanem Karbusickým a Marií Karbusickou za financování cestovních nákladů a podporu.

ABSTRAKT

V rámci této práce jsme se věnovali genům *MC1R*, *ASIP* a *TBX3* na vzorku 118 klisen zařazených v genetických zdrojích České Republiky. Záměrem bylo určit genetickou strukturu klisen a analyzovat fenotypová data v porovnání s genotypem a určit případné odlišnosti. Genetická analýza prokázala rovnovážný stav u všech alel (HW pro *ASIP* $P = 0,0,9360$; pro *MC1R* $P = 0,1661$ a pro *TBX3* $P = 0,4434$). Frekvence alel byla následující, řazeno sestupně: *E* (0,6780), *A* (0,5254), *a* (0,4746), d^2 (0,4323), d^1 (0,3542), *e* (0,3220) a *D* (0,2135). Nejčastějším genotypem byl $AaEed^1d^2$ a $AaEEd^1d^2$. V populaci byly velmi málo, nebo zcela chyběly genotypy na základě recesivních homozygotů v základních genech, také jsme neidentifikovali žádného jedince s genotypem $AaEed^1d^1$. Prokázali jsme závislost genotypu v rámci genu *TBX3* s primitivními znaky, čímž jsme potvrdili předešlé práce jiných autorů. Alela *D* je vždy spojována s výskytem primitivních znaků, avšak primitivní znaky se vyskytují i bez alely *D* v souvislosti s alelou d^1 . Genotyp d^2d^2 je spojován s fenotypem bez primitivních znaků nebo u kterého nelze určit, zda jedinec tyto znaky nese nebo ne.

Klíčová slova: *ASIP*, *MC1R*, *TBX3*, hucul, primitivní znaky, zbarvení

ABSTRACT

In this work, *MC1R*, *ASIP* and *TBX3* gene were tested on a sample of 118 Hucul horse mares included in Genetic Resources of Animals in the Czech Republic. We want to determine the genetic structure of mares and to analyse phenotypic data compared to the genotype and to identify possible differences between it. Genetic analysis showed a solid state for all alleles (HW for *ASIP* $P = 0.9360$, for *MC1R* $P = 0.1661$ and for *TBX3* $P = 0.4444$). The frequency of the allele was as follows: *E* (0.6780), *A* (0.5254), and (0.4746), d^2 (0.4323), d^1 (0.3542), *e* (0.3220) *D* (0.2135). The most common genotype was *AaEed¹d²* and *AaEEed¹d²*. There were very few or no genotypes based on recessive homozygotes in the genes of basic coat colours in the population, we didn't identify any individual with genotype *AaEed¹d¹*. We have publicised genotype dependence within the *TBX3* gene with primitive markings, confirming the previous work of other. Allele *D* was always associated with the occurrence of primitive markings, but primitive markings occur even without allele *D* in coincidence with the d^1 allele. The d^2d^2 genotype is associated with a phenotype without primitive markings, or with phenotype where we can't say if the horse has primitive markings or not.

Keywords: *ASIP*, *MC1R*, *TBX3*, Hucul horse, primitive markings, coat colour

OBSAH

1	Úvod	9
2	Cíl práce	10
3	Literární přehled	11
3.1	Charakteristika huculského koně	11
3.2	Princip melanogeneze	12
3.3	Zbarvení u koní	14
3.3.1	Základní zbarvení	15
3.3.2	Ředěná zbarvení	17
3.3.3	Další modifikace zbarvení	20
3.4	Geny zbarvení a jejich variabilita u koní	21
3.4.1	Gen MC1R	23
3.4.2	Gen ASIP	25
3.4.3	Gen TYRP1 a TBX3	27
3.4.4	Dědičnost jednotlivých zbarvení	29
4	Metodika	32
4.1	Charakteristika zkoumaných jedinců	32
4.2	Odběr vzorků a vyhodnocení fenotypu	34
4.3	Izolace DNA	36
4.4	Reakce PCR v duplexu (MC1R, ASIP)	36
4.5	RFLP duplexu MC1R a ASIP	38
4.6	Analýza genu TBX3	39
4.7	Matematicko-statistické zpracování dat	40
5	Výsledky a diskuze	41
5.1	Výsledky izolace	41
5.2	Výsledky PCR reakce	41
5.3	Analýza RFLP	42
5.4	Zhodnocení fenotypů a genotypů	43
5.5	Frekvence alel a genotypů v populaci	46
5.6	Primitivní znaky, jejich výskyt a míra zbarvení končetin	51
5.7	Souvislost genotypu Dun a intenzity primitivních znaků	55

5.7.1	Primitivní znaky	55
5.7.2	Úhoří pruh	56
5.7.3	Zebrování končetin	56
5.7.4	Oslí kříž	57
5.7.5	Žihání hřívky a ocasu	57
5.7.6	Míra a intenzita zbarvení končetin	57
5.8	Souvislost genotypů MC1R, ASIP se zbarvením končetin	58
5.8.1	Míra zbarvení končetin	58
5.8.2	Intenzita zbarvení končetin	59
6	Závěr	60
7	Přehled použité literatury	62
8	Seznam tabulek	68
9	Seznam obrázků	69
10	Přílohy	70

1 ÚVOD

Zbarvení u koní je od počátků formování plemen velmi zajímavá a sledovaná charakteristika. O kterou je zájem zejména pro možnost identifikace jedinců a vhodnost jako ukazatele neodpovídající paternity (THIRUVENKADAN *et al.*, 2008). Znalostí přesného zbarvení rodičů a jeho dědičnosti můžeme zpochybnit původ daného jedince (PAWELEC *et al.*, 2014). Také je možné takto odlišit určitou skupinu koní nebo plemen, vyprofilovat chovná stáda různých chovatelů (jakási značka chovu). STACHURSKA *et al.* (2012) uvádí, že zbarvení je druh markeru pro nechtěné trendy u geneticky cenných plemen v rámci genetických zdrojů (GZ).

Barva je jednoznačný a charakteristický znak, převážně ovlivněný jednoduchou dědičností. Pro základní sledování výše zmíněných nechtěných trendů v populaci může být využit fenotypový popis prováděný komisaři. Molekulární analýza by pak mohla sloužit k detailnímu sledování změn. Informace o alelové frekvenci ovlivňující zbarvení jsou důležité pro posouzení, zda nedochází ke ztrátě některé ze sledovaných alel (STACHURSKA *et al.*, 2012).

Fenotypový popis zbarvení je však často náročný a předpokládá se, že dochází i k množství chyb, což přesnější analýzy stavu populace, paternitu a predikci zbarvení očekávaného hříběte značně ztěžuje. Jedná se zejména o identifikaci vraníka, černého hnědáka nebo tmavě černého plaváka, kdy by musela proběhnout genetická analýza, aby nedocházelo k nesprávnému určení (PAWELEC *et al.*, 2014). Dle mého názoru ani identifikace světlého hnědáka, hnědáka a plaváka není jednoduchá, zejména u plemen, která se vyznačují všeobecně přítomným úhořím pruhem.

Komplex této problematiky jsem se rozhodla studovat v rámci své diplomové práce na populaci huculských klisen, které jsou mi, jako chovatelce tohoto plemen, blízké.

2 CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce na téma „**Genetická analýza zbarvení u huculských koní zařazených do genetického zdroje**“ bylo zpracování těchto bodů:

- Výběr genů a jejich polymorfizmů pro testování.
- Sběr vzorků pro izolaci DNA a pořízení fotografie jedinců.
- Vlastní analýza odebraných vzorků v molekulárně genetické laboratoři, vyhodnocení genotypů a jejich porovnání se získanými daty fenotypovými.
- Výpočet frekvencí jednotlivých zbarvení a alel v populaci.
- Statistické vyhodnocení kompletních dat, zejména asociace genotypů a identifikovaných zbarvení pomocí kvalitativní analýzy. Na základě analýzy DNA a fenotypového projevu přesné pojmenování zbarvení u studovaného plemene.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 CHARAKTERISTIKA HUCULSKÉHO KONĚ

Huculský kůň je primitivní plemeno pocházející z jižních Karpat. Pravděpodobně vychází z mnoha typů koní a také z již vyhynulého Tarpana (HACKL, 1938; ACHHK, 2009). V roce 1979 bylo huculské plemeno zapsáno do genofondu původních a primitivních plemen hospodářských zvířat FAO. V České Republice pak v roce 1993 bylo toto plemeno zařazeno do genetických zdrojů (ACHHK, 2009).

Název plemene „Hucul“ má pravděpodobně původ v rumunském "hoc" ("loupežník") a "ul" ("ten") (RADVAN, 2002).

Hucul je silné, odolné, plodné a dlouhověké plemeno vhodné pro rodiny a volný čas. Vyznačuje se výborným charakterem, vyrovnanou psychikou a klidným temperamentem. Stále si však zachovává přirozené instinkty divokého předka. Je dobře krmitelný, skromný a nenáročný, jeho velká odolnost a konstituční tvrdost se projevuje při nepříznivých životních podmínkách, kdy snáší i velmi nízké teploty. Avšak například na nedostatek čerstvého vzduchu ve stájích je citlivý (BRZESKI a JACKOWSKI, 1998; ACHHK, 2009).

Hucula je možné využít pro turistické ježdění, rekreaci, výcvik dětí, hipoterapii i lehký záprah. Musí být zajištěno vhodné zacházení, které podpoří jeho učenlivost, pracovitost, vytrvalost a výkonnost, která je znatelná především v náročném terénu, kde je jistý a obratný (ACHHK, 2009). RADVAN (2001) zdůrazňuje mimořádnou výkonnost hucula v poměru k jeho velikosti.

Dospívá až v 5 nebo 6 letech. Dobrá péče zajistí plnou výkonnost až do pětadvaceti let, dožívá se třiceti, v mnoha případech i více let. Plodnost bývá velmi dobrá a porody převážně bez komplikací. I vývoj hříbat bývá bezproblémový (ACHHK, 2009).

3.2 PRINCIP MELANOGENEZE

Melanogeneze je proces biosyntézy pigmentu melaninu v melanocytech, specializovaných buňkách (SPONENBERG, 1997).

V průběhu embryogeneze vznikají z buněk neurální lišty **melanoblasty**, které se postupným dozráváním mění z malých oválných buněk na buňky dendritické, což jsou již zralé melanocyty (HORSTADIUS, 1950; THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

Melanocyty migrují na specifická místa a usazují se v cibulkách chlupových folikulů. Celý proces šíření melanocytů začíná na třech místech v horní části hlavy, šesti místech na každé straně těla (opět v horní části) a ve velkém množství v délce ocasu. V každém místě je několik melanocytů, ty následně proliferují a šíří se po těle směrem dolů až do končetin. Na místech, kde se usadí (pokožka, chlupové folikuly) syntetizují melanin, který je začleňován do rostoucích chlupů (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

Melanocyty se vyskytují ve dvou formách, jedna melanin obsahuje a druhá ne (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Pokud v buňce melanin vzniká, je ukládán v organelách melanosomech. **Melanosomy** jsou také dvou typů, eumelanosomy a feomelanosomy (obsahují eumelanin nebo feomelanin). Migrují do dendritických výběžků melanocytů a exocytózou přecházejí do epidermálních buněk, které jsou začleňovány do keratinocytů (SPONENBERG, 1997). Pokud je rovnoměrná akumulace eumelaninu v eumelanosomech, pak je feomelanin uchováván ve feomelanosomech diskrétně (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

Melanin se vyskytuje ve formě pigmentových zrn v chlupech, kůži, duhovce ale také i v některých vnitřních orgánech. Vyskytují se dvě varianty, velká oválná zrna eumelaninu a menší kulatá zrna feomelaninu (BOWLING, 1996). **Eumelanin** neobsahuje síru a způsobuje zbarvení od tmavě hnědé po černou. **Feomelanin** je bohatý na síru a způsobuje zbarvení od červené po žlutou (SEARLE, 1968).

Melanocyty mají na povrchu receptory MC1R (melanokortin-1 receptor) pro vazbu α -melanocyty stimulujícího hormonu (α -MSH). Pokud je hormon navázán vzniká kaskáda reakcí a výsledkem celého procesu je eumelanin. Pokud není receptor či

hormon funkční, daná reakční kaskáda se nespustí a vzniká feomelanin (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Feomelanin je také produkován, pokud se na receptory MC1R naváže místo α -MSH, Agouti signální protein (ASIP), který tak sníží hladinu tyrozinázy. Ta je pro vznik eumelaninu rozhodující, aby eumelanin vznikal musí být hladina vyšší. Avšak ASIP může množství tyrozinázy snížit až do takové míry, že nevzniká téměř žádný pigment (BARSH, 2001).

Vznik určitého pigmentu je tedy dán množstvím a funkčností MC1R receptorů a také mírou vazby ASIP. Melanocyty mají schopnost určitým způsobem přepínat mezi produkcí eumelaninu a feomelaninu právě vyvážením či vychýlením těchto faktorů. Vliv má také gen *POMC*, který kóduje α -MSH (IMSLAND, 2015). Přesná signální dráha zodpovědná za změnu druhu melaninu není zcela jasná. Na základě genetického pozadí tyto změny probíhají v rozdílném čase na specifických místech. U šelem je znám gen *Tabby*, který právě přepínání mezi pigmenty nebo pigmentem a oblastí bez pigmentu způsobuje (BARSH, 2001; THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Dokonce je možné, aby probíhalo přepnutí mezi pigmenty i v rámci jednoho chlupu (IMSLAND, 2015). Což dává za vznik velkému množství variant základního zbarvení. Například znaky typu pruhů, teček, kdy se jedná pravděpodobně o střídání eumelaninu a feomelaninu (tygři a leopardi) nebo střídání melaninu a oblastí bez pigmentu (zebry) (BARSH, 2001).

3.3 ZBARVENÍ U KONÍ

Zbarvení savců je celé ovlivněno přítomností či absencí melaninu v kůži a chlupech (SPONENBERG, 1997). Také kompozice granulí pigmentu, počet, jejich tvar a složení ovlivní výsledné zbarvení (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Kůže bez pigmentů je charakteristicky růžová díky krvi v periferních vlasečnicích (SPONENBERG, 1996).

Určení jednotlivých zbarvení je závislé na barvě těla a barvě zíní ocasu, hřívky, dolní části končetin a okraje uší, těmto černým oblastem se říká černé znaky. Základním rozdělením zbarvení je tedy skupina barev s černými znaky a bez nich (SPONENBERG, 1996). Další možné rozdělení je dle vyskytujícího se pigmentu. Hnědák, vraník, plavák a šedý plavák jsou zbarvení eumelanická. Také je u nich, vyjma vraníka, produkován feomelanin. Ryzák a červený plavák jsou čistě feomelanického typu (STACHURSKA *et. al.*, 2012).

Tmavá zbarvení jsou mezi i uvnitř plemen nejčastější. Zejména potom zbarvení hnědák, které se vyskytuje u všech plemen vyjma fríských, fjordských koní a také plemene percheron a hafling. U těchto plemen bylo hnědé zbarvení eliminováno selekcí (SPONENBERG, 1996).

Jednotlivá zbarvení mohou poskytovat nositelům určité výhody v daném prostředí. Například kravám v tropických oblastech poskytuje výbornou ochranu před solární radiací světlé zbarvení se silně pigmentovanou kůží. Což je znatelné u holštýnského plemene chovaného v teplejších oblastech, které lépe prosperuje, pokud mají jedinci více bílých ploch, díky čemuž je snížený tepelný stres. Naopak indické kozy využívají tmavé zbarvení jako adaptační mechanismus ekonomického využití energie z potravy v chladném období (ADEFENWA *et al.*, 2013). STACHURSKA *et al.* (2004) považuje světlé zbarvení za výhodné díky delší retenci tepla a tím pomáhá jeho nositelům déle udržet teplo například v zimních měsících. Autorka poukazuje na světlejší odstín polských koníků v zimních měsících a také u jedinců žijících více na severu. Zbarvení také umožňuje kamufláž a sociální interakce (ADEFENWA *et al.*, 2013).

Pravděpodobné zbarvení starodávných koní bylo založeno na černé, která zajišťovala ochranu před predátory formou splynutí s okolím (BOWLING, 1996). LUDWIG *et al.* (2009) zmiňuje, že u evropských a sibiřských koní v období pleistocénu byla pravděpodobná barva hnědá či plavá. IMSLAND (2015) uvádí teorii o prapůvodním Dun zbarvení (plavé) u stepních koní, jakmile začali koně migrovat do travnatých a více zalesněných oblastí začalo mít výhodné postavení tmavé zbarvení, následně u koní pralesních pak strakaté zbarvení, kdy v hustém porostu dochází pouze k průsvitu slunečního záření, a tak je nerovnoměrné zbarvení výhodné.

3.3.1 ZÁKLADNÍ ZBARVENÍ

3.3.1.1 Zbarvení vraník

Vraník, je kůň s černým tělem a znaky bez jakékoliv světlejší oblasti (THIRUVENKADAN *et al.*, 2008). Pěkného zástupce zbarvení vraník můžeme vidět na obrázku č. 1. Nese pouze pigment eumelanin a jeho distribuce je v rámci celého těla rovnoměrná (STACHURSKA *et al.*, 2012). Vraník může být tedy genotypu $aaEe$ nebo $aaEE$ (RIEDER *et al.*, 2001).



Obrázek 1 Vranka genotypu $aaEE d^1$ (fotografie: archiv autorky)

3.3.1.2 Zbarvení hnědák

Hnědák je kůň s černými znaky, tělo je variabilního odstínu od žlutohnědé po hnědou (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Hnědáka můžeme vidět na obrázku č. 2, takový kůň nese oba pigmenty, avšak eumelanin nad feomelaninem převažuje (STACHURSKA *et. al.*, 2012). Distribuce pigmentů je nerovnoměrná, nejvíce pigmentované jsou končetiny, hřívá a ocas. Hnědák je genotypu *AaEE*, *AaEe*, *AAEE* nebo *AAEe* (RIEDER *et al.*, 2001).



Obrázek 2 Hnědka genotypu *AAEE d' d'* (fotografie: archiv autorky)

3.3.1.3 Zbarvení ryzák

Ryzáci (obrázek č. 3) mají různé odstíny červené bez černých znaků, tzn. jejich končetiny, hřívá a ocas jsou stejného zbarvení jako tělo. Je ale možné, že jedinec ponese gen flaxe, který zapříčiňuje světlejší zbarvení hřívky a ocasu, než je tělo. Ryzák nese genotyp *Aaee* nebo *AAee* (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).



Obrázek 3 Ryzka genotypu $Aaee'd^2$ (fotografie: archiv autorky)

3.3.2 ŘEDĚNÁ ZBARVENÍ

Zředěné barvy vznikají z barev základních. Výsledné zbarvení je dáno intenzitou působení ředících genů.

3.3.2.1 Zbarvení cream

Koně s alespoň jednou dominantní alelou C^{Cr} se vyznačují zlatě zbarveným tělem. Pokud je kůň v tomto genu heterozygot (CC^{Cr}), jedná se o jednu ředěnou základní zbarvení a mezi ně patří palomino (bílý ocas a hříva) a buckskin (černá hříva, ocas a končetiny). Palomino je modifikovaný ryzák, naopak buckskin je modifikovaný hnědák (má černé znaky). Dominantní homozygot ($C^{Cr}C^{Cr}$) má základní zbarvení zředěné dvakrát. Jeho zástupci jsou následující: cremello je zbarvení krémové, modré oči a růžová kůže, vychází z ryzáků. Perlino má oproti cremellu tmavší hřívu a ocas, jelikož vychází z hnědáků a vraníků.

Heterozygotnost nemá vliv na černé zbarvení, projevuje se nekompletní dominancí, kdy gen zředí více feomelanin a hnědý eumelanin než černý eumelanin (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.3.2.2 Zbarvení dun

Hnědáci s vlivem genu *Dun* jsou zředěni na světlého plaváka (plavák, žlutý plavák, divoký typ plaváka, zebra dun, klasický plavák) viz. obrázek č. 4 s více či méně žlutočerveným zbarvením a černými znaky. Zředění ryzáci (liščí plavák) mají velmi světlý odstín ryzé až růžové s tmavě ryzími znaky. Vraníci pak na tmavého plaváka (myšák, šedý plavák, tmavý plavák, modrý plavák), opět s černými znaky viz. obrázek č. 5. Dun zředění nenarušuje zbarvení končetin, a i hlava zvířete je tmavší než barva trupu (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008; IMSLAND, 2016).

Zbarvení dun s sebou nese i primitivní znaky (zebrování na končetinách, úhoří pruh a oslí kříž), které jsou tmavé (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Kontrast primitivních znaků a zředění barvy těla je značně individuální (IMSLAND, 2015). Tato autorka také zmiňuje další primitivní znaky. Tmavé žíhání na hlavě v krajině čela, uších, tmavé stíny na krku a lopatkách, náznak zebrování od úhořího pruhu do stran po hrudníku, mramorování na krku, lopatkách a bocích. Primitivní znaky se mohou vyskytovat najednou nebo v různých kombinacích. Nejčastěji nalezneme u dun koní úhoří pruh.



Obrázek 4 Plavák genotypu $AaEeDd^1$ (fotografie: archiv autorky)



Obrázek 5 Šedý plavák genotypu $aaEeDd^2$ (fotografie: archiv autorky)

V rámci šedých plaváků u polských koníků jsou rozlišovány i odstíny a detailně popsány. Můžeme se setkat se stříbrnou šedou, břidlicově šedou, tmavě šedou, plavákem s kouřovými černými oblastmi v zádové části a olivovým plavákem se žlutým nádechem. Jednoduše řečeno světlá, střední a tmavě šedá, dále odstíny mezi šedým plavákem a žlutým plavákem (STACHURSKA *et. al.*, 2004).

3.3.2.3 Zbarvení silver dapple

Třetí ředící gen, ovlivňující pouze černý pigment, červený nechává nezměněn. Zředění způsobuje dominantní alela *Z*. Černé zbarvení je zředěno na čokoládové nebo černo-čokoládové. Hříva a ocas je stříbrná, šedá až téměř bílá. Ryzáci mají ovlivněné pouze zbarvení ocasu a hřívy (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.3.2.4 Zbarvení champagne

Vzácné zředění způsobující velmi bledé odstíny, šedivou kůži a modré až jantarové oči. Koně jsou bez primitivních znaků. Zředění způsobuje dominantní alela *Ch*. Gen projevuje aditivní vztah s lokusem cream (SPONENBERG, 1996; BOWLING, 1996).

3.3.3 DALŠÍ MODIFIKACE ZBARVENÍ

Modifikace zbarvení může ovlivnit celé tělo jedince nebo je soustředěno do určitých oblastí, jedná se také o ovlivnění zbarvení znaků (končetin, hřívy, ocasu a okrajů uší). U těchto modifikací dosud nebyly zjištěny příslušné kauzální geny.

3.3.3.1 *Shade „odstín“*

Variace od světlých po tmavé odstíny základního zbarvení těla. Jedná se o komplex multifaktoriální genetické kontroly. Nejvíce je znatelný na hnědé (světlý hnědák až tmavý hnědák) a ryzé barvě (pískový ryzák až játrový ryzák). Na černé barvě není efekt viditelný, je ale možné že zbarvení „letní vraník“, kdy se jedná o zesvětlení černé barvy vlivem tepla a slunečního záření, může být právě také příčinou efektu shade (SPONENBERG, 1996).

3.3.3.2 *Sooty „od sazí“*

Modifikace základního zbarvení, kdy jsou přítomny, nebo naopak nejsou, ojedinělé černé chlupy po těle zvířete. Často u hnědáků. Vliv má také prostředí (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.3.3.3 *Mealy „moučný“*

Kůň má světle červené nebo nažloutlé oblasti na spodní části břicha, bocích, vnitřní straně končetin, za lokty a také okolo nozder a očí. Jedná se o znak ovlivněný jedním genem, který je dominantní. Ryzáka s mealy efektem nazýváme sorrel. U vraníků pak můžeme s tímto efektem pozorovat tzv. černého hnědáka (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.3.3.4 *Zbarvení znaků u ryzáků*

Ryzáci nemají znaky zbarvené černě, mohou je ale mít v různých odstínech barvy svého těla. Nejtmavší odstín je téměř černý a nejsvětlejší až bílý. Jedná se o nezávislý znak a objevuje se na jakémkoli odstínu ryzé, pravděpodobně je tento znak polygenetický (SPONENBERG, 1996).

3.3.3.5 Bílé odznaky

Další modifikací, resp. velmi individuálním znakem jsou bílé odznaky na hlavě a končetinách. Obvykle jsou podloženy růžovou nepigmentovanou kůží. Jedná se o selhání migrace a proliferace melanoblastů v dané oblasti. Bílé znaky jsou pravděpodobně způsobeny genetickými a negenetickými faktory. Negenetické faktory jsou viditelné u jednovaječných dvojčat, která mají jednotlivé znaky odlišně tvarované. Jedná se o větší množství genů, avšak odznaky na hlavě i končetinách jsou způsobeny těmi stejnými. Rozsáhlejší bílé odznaky se objevují více u samců než samic a u ryzáků více než u černých koní (THIRUVENKADAN *et al.*, 2008).

3.4 GENY ZBARVENÍ A JEJICH VARIABILITA U KONÍ

Ani jedna z barev není vázána pouze na jedno plemeno, což dokazuje, že mutace způsobující zbarvení vznikly již před domestikací nebo během jejího počátku, ještě před zformováním moderních plemen (BOWLING, 1996). Avšak variabilita ve zbarvení prudce stoupla během domestikace jako výsledek šlechtění (LUDWIG *et al.*, 2009). Hlavní geny pro zbarvení jsou vcelku konzervované v rámci rozdílných druhů živočichů, avšak jejich mutace jsou spojené s určitou barvou, mohou být různorodé. I přes shodné fenotypové projevy mohou být tedy genotypy rozdílné. (RIEDER *et al.*, 2001; CIESLAK, 2011). Nevybělující koně vykazují menší polygenetické efekty na variaci zbarvení (TOTH *et al.*, 2014).

Odstíny hnědáků, ryzáků, tmavého a světlého plaváka jsou pravděpodobně způsobeny modifikacemi, heterozygotností a homozygotností v základních lokusech *agouti*, *extension* a *dun*. Tyto lokusy jsou kontrolovány geny *Melanocortin-1 receptor (MC1R)* na lokusu *extension*, a gen *Agouti signální protein (ASIP)* na lokusu *agouti* a dříve pro lokus *dun* přiřazovaný gen prekurzoru 5,6-dihydroxyindole-2-karboxylové oxidázy (*TYRP1*) v posledních dvou letech však vychází jako lepší kandidát gen *T-box 3 (TBX3)* (MARKLUND *et al.*, 1996; STACHURSKA *et al.*, 2012; IMSLAND, 2015; ENSEMBLE.ORG, 2016c). Většina zbarvení je dále kontrolována dalšími 9 lokusy, tedy celkem 12 lokusů pro zbarvení u koní. Je předpokládáno velké množství mutací a strukturálních aberací zodpovědných za strakaté fenotypy a zředěné barvy

(THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008; RIEDER, 2009). Základní geny a jejich lokusy jsou shrnuty v tabulce č. 1.

Tabulka 1 Shrnutí fenotypů a genotypů zbarvení (NIČOVÁ, 2015; IMSLAND, 2016)

Český název zbarvení	Anglický název	Slovní popis fenotypu	Lokus	Genotyp
Hnědák	Bay	Srst je hnědá, hříva, ocas a spodní části končetin jsou tmavě hnědé až černé.	Agouti (A)	<i>EEAA</i> <i>EEAa</i> <i>EeAA</i> <i>EeAa</i>
Vraník	Black	Srst, hříva a ocas jsou černé, kůže je tmavošedá.	Agouti (A)	<i>EEaa</i> <i>Eeaa</i>
Ryzák	Chestnut	Jednotná červená barva srsti těla, končetin, hřívy a ocasu.	Extension (E)	<i>eeAA</i> <i>eeAa</i> <i>eeaa</i>
Plavák, šedý plavák	Dun	Zesvětluje základní barvu srsti a způsobuje atavistické znaky	Dun (D)	<i>DD</i> <i>Dd</i>

Zbarvení ale není ovlivněno pouze přímo souvisejícími geny. Výsledek závisí na úspěšné migraci melanocytů během embryonálního vývoje a jejich normálním vývoji, což ovlivňuje velké množství dalších genů i negenetických činitelů. Například geny ovlivňující melanoblasty během vývoje mohou způsobit bílé zbarvení nebo obecně zředění, díky omezení jejich diferenciaci. Dále také struktura chlupu může zabraňovat, ulehčovat či jinak abnormálně ovlivňovat průnik granulí pigmentu (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Také struktura proteinu, na který jsou vázány savčí granule pigmentu, může být změněna a tím i dojde i k odlišnému tvaru celé molekuly. Taková změna tvaru může vést k alternativnímu zbarvení (MOYER, 1960).

Efekty jednotlivých mutací mohou být limitovány pouze na zbarvení nebo mají pleiotropní účinek (BARSH, 2001; CHOWDHARY, 2013). Ovlivňují pak také více procesů různého embryonálního původu. Například delší čas krvácivosti (BARSH, 2001). Zároveň i zbarvení je ovlivňováno více faktory, a to i negenetickými. STACHURSKA *et. al.* (2004) prokázala vliv prostředí na odstín šedých plaváků, kdy na zbarvení mělo vliv

roční období i způsob chovu. Další vliv mělo i pohlaví a věk jedinců. Světlejší zbarvení v zimním období by mohlo být způsobeno rychlejším růstem chlupů, tedy méně intenzivnější zabudovávání pigmentu, nebo také nižší úrovní melanogeneze při nižších teplotách. Také tvar zimních chlupů na řezu je daleko okrouhlejší než letní, které jsou spíše elipsovité. Hříbata jsou po narození více ve žlutých odstínech než dospělci, barva je následně změněna na odstíny šedé po odrostu hříběcí srsti.

Genetika zbarvení je důkazem vhodného využití komparativní genetiky mezi savci, jelikož byla takto popsána většina mutací v těchto genech (RIEDER *et al.*, 2001).

3.4.1 GEN *MC1R*

Gen nacházející se u koní na 3. chromozomu v oblasti 36,259,276 - 36,260,354 přímého řetězce a obsahuje pouze jeden exon. Délka genu je 1 721 bp, kódující oblasti pak 954 bp (RIEDER *et al.*, 2001). Transkript genu je také jeden a to MC1R-201. Koňský gen *MC1R* je z 83,91 % shodný s genem skotu (na 18. chromozomu) z 82,33 % s genem prasat (na 6. chromozomu) a z 74,45 % u ovcí (na 14. chromozomu). U všech těchto zvířat má gen shodný fenotypový vliv (zbarvení). Lidská a myšičí varianta genu má ale přisouzeno více fenotypových projevů (melanomy, albinismus typu 2 apod.), pravděpodobně způsobeno vyšší mírou prozkoumání. U koní se vyskytuje také ještě paralelní gen *MC3R* na 22. chromozomu. (ENSEMBLE.ORG, 2016b) Jako první tento gen popsal MARKLUND *et al.*, (1996) a přiřadil k lokusu extension.

Receptory melanokortinu jsou kódovány celou rodinou pěti genů *MC1R* - *MC5R*, a tyto receptory váží čtyři ligandy α , β a γ -melanocyt stimulující hormon (α , β a γ -MSH) a adrenokortikotropní hormon (ACTH) (SWITONSKI, 2013). Melanokortin-1 receptor (MC1R) kontroluje množství enzymu tyrozinázy v melanocytech, pokud je na něj navázán melanocyt stimulující hormon (přednostně váže α -MSH) dochází k zvýšení množství enzymu. Tyrozináza limituje syntézu melaninu, velké množství tyrozinázy způsobuje produkci eumelaninu (černého nebo hnědého) naopak malé množství produkci feomelaninu (červený nebo žlutý) (MARKLUND *et al.*, 1996; SWITONSKI, 2013).

Wild-type alela E^+ je dominantní a její přítomnost způsobuje černé nebo hnědé zbarvení. Recesivní alela je výsledkem jedno nukleotidové bez smyslové mutace

201C > T X98012 nebo 901C > T AF288357, pokud se jedná o recesivního homozygota je výsledná barva ryzá. Mutace způsobuje záměnu serinu za fenylalanin (MARKLUND *et al.*, 1996; RIEDER *et al.*, 2001). Produkci eumelaninu na úkor feomelaninu podporuje dominantní alela E . Recesivní alela e má opačný efekt. Další alela způsobující ryzé zbarvení je e^a způsobená také jedno nukleotidovou mutací se ztrátou smyslu 903G > A (WAGNER a REISSMANN, 2000).

HUIRONG *et al.* (2010) ve své práci o zbarvení prasat se zaměřením na tibetské plemeno a jeho porovnání s evropskými plemeny, zmiňuje množství alel genu *MC1R*. Alela E^+ způsobující wild-type zbarvení, E^{D1} pro dominantní černou, E^{D2} asociovaná s černými oblastmi na červeném nebo bílém podkladu a e ovlivňující červené recesivní zbarvení u evropských plemen. Tibetské plemeno ale nevykazovalo inaktivační mutaci v tomto genu, a ani v genu *ASIP*, zodpovědnou za červené zbarvení, tak jak jsme zvyklí právě od evropských plemen. Naopak měla zvířata alelu pro dominantní černou. RIEDER *et al.* (2001) u koní dominantní černou alelu E^D neprokázal, oproti předpokladu autora SPONENBERG a WEISE (1997) že se opravdu dominantní alela E^D u koní nachází. Autoři vycházeli z údajů o plemenném černém hřebci (otec černý, matka téměř černá) po němž byla valná většina potomků, nezávisle na matce (hnědka, ryzka), černého nebo téměř černého zbarvení. Téměř černé zbarvení je popisované jako černé tělo až na světlé chlupy v oblasti nozder a boků nebo černé tělo se znatelným tmavším odstínem končetin. Dominantní alela E^D pak nezávisle na lokusu agouti způsobuje černé zbarvení (THIRUVENKADAN *et al.*, 2008). Dominantní alela E^D se také nachází u skotu (SWITONSKI, 2013).

Další alelu E^P u prasat identifikoval KIJAS *et al.* (2001), tato alela způsobuje černé fleky na červeném nebo bílém podkladu. U psů pak existují ještě alely E^M a E^G (SWITONSKI, 2013). U veverek byly objeveny dvě alely, wild-type alela E^+ a alela E^B , která obsahuje delecí 24 bp. Homozygot E^+E^+ se projevuje šedým zbarvením, homozygot E^BE^B pak pouze zbarvením černým a heterozygot E^+E^B hnědočerným zbarvením. Alela E^B je neúplně dominantní k alele wild-type E^+ . Chlupy veverek jsou v různých oblastech odlišně zbarvené, na jednom chlupu se mohou vyskytovat i

všechny barvy oddělené v pružích. Autor vyslovuje hypotézu o přepínacím vlivu genu *ASIP* (McROBIE *et al.*, 2009).

SUNG-SOO *et al.* (2009) zkoumali vztah mezi mírou exprese tří genů ovlivňujících syntézu melaninu (*Tyrosinase*, *Tyrosinase-related protein 1* a *Dopachrome tautomerase*) a genotypu v *MC1R* u krav plemene hanwoo, jeju black a holštýn. Hanwoo se žluto-hnědým fenotypem a genotypem *ee*, jeju black s černým wild type zbarvením a genotypem E^+E^+ a dominantní černá s genotypem E^DE^D u holštýna. Všechny tři studované geny prokazovaly vyšší expresi u holštýna než u jeju black ($P < 0,001$) a dále vyšší expresi u jeju black než u hanwoo opět $P < 0,001$. Což poukazuje na přímou korelaci fenotypu a genotypu v genu *MC1R* a míry exprese *TYR*, *TYRP1* a *DCT*.

3.4.2 GEN *ASIP*

U koní se tento gen nachází na 22. chromosomu v oblasti 25,167,080 - 25,171,074 přímého řetězce. RIEDER (2001) popsal tento gen jako první. Gen obsahuje tři exony a výsledný transkript je pouze jeden označen ASIP-201 o délce 402 bp. Podobný gen se nachází i u skotu se shodností 81,20 %, u ovcí pak se shodou 80,45 % a u prasat 78,95 %. U skotu a ovcí má i stejnou funkci, například ale u myší existuje spojení s embryonální a prenatální mortalitou, materiálním imprintingem a obezitou, která je ve spojitosti s genem *i* u kryš včetně diabetu mellitus typu 2. (ENSEMBLE.ORG, 2016a)

Délka celého genu je 4 994 bp. Obsahuje čtyři mutace, tři SNP a jednu 11 bp delecí. Jedno SNP bylo detekováno na 3'-UTR konci 50 bp za STOP kodonem. Pozice delece (2. exon) se může měnit v závislosti na předešlých repetičích v této části genu, jedná se ale pouze o rozdíl 4 bp. Vlivem delece je posunut čtecí rámec a vzniká modifikovaný agouti signální protein. Delece je kompletně asociovaná s černým recesivním zbarvením u všech typů koní (RIEDER *et al.*, 2001).

Delece 11 bp v genu *ASIP*, vede ke ztrátě funkčnosti agouti signálního proteinu. Výsledkem je recesivní černý fenotyp, značený alelou *a*. Avšak černé celoplášťové zbarvení je možné pouze pokud je jedinec homozygotní *aa* a zároveň není homozygotní *ee* v genu *MC1R*. Tedy na lokusu extension je alespoň jedna alela dominantní *E*

(RIEDER *et al.*, 2001). Wild-type alela způsobující pruhované zbarvení jednotlivých chlupů (část s feomelaninem a část s eumelaninem) není u koní zatím prokázána (THIRUVENKADAN *et al.*, 2008). Vliv genu *ASIP* na vznik pruhovaných chlupů byl prokázán například u veverek (MCROBIE *et al.*, 2009).

Gen *ASIP* je antagonistou *MC1R*, neboť zabraňuje působení α -melanocyt stimulující hormon (α -MSH). Ztrátou funkce receptoru *MC1R* je způsoben vznik feomelaninu (RIEDER *et al.*, 2001). Funkcí *ASIP* je také distribuce pigmentu do částí těla. Dominantní alela *A*, způsobuje distribuci černého pigmentu zejména do znaků (končetiny, hřívá, ocas a okraje uší), ty jsou následně černé, a recesivní alela *a* pak uniformní distribuci černé po celém těle (THIRUVENKADAN *et al.*, 2008).

Nepodařilo se nalézt asociaci mezi alelou *a* (rozdíl mezi genotypem *AA* a *Aa*) a tmavěji zbarvenými koňmi, tzn. mezi hnědákem a tmavým hnědákem, mezi ryzákem a tmavým ryzákem. Avšak statisticky průkazná asociace ($P < 0,01$) byla nalezena u světlejších odstínů hnědé a genotypu *Ee* a tmavších odstínů hnědé a genotypu *EE*. Bohužel tento výsledek může být také založen na dosud neznámých genetických variacích (RIEDER *et al.*, 2001).

Nová alela v genu *ASIP* u oslů, způsobená mutací se změnou smyslu 349 T > C, by dle návrhu měla být označena *a^{np}*. Označení je dáno spojitostí s absencí světlých (krémových až bílých) oblastí na jinak celoplašťovém zbarvení u oslů, zejména u amerického miniaturního plemene. Zmíněné světlé oblasti se nacházejí v krajině břicha a okolí nozder a očí. Tato recesivní alela způsobuje fenotyp „no lights points“ tedy NLP. Také fenotyp „light points“ je asociován s genem *ASIP*, a to alelou *a^{lp}* (ABITBOL, 2015). Podobné znaky popisuje i autor THIRUVENKADAN *et al.* (2008) jako modifikaci základního zbarvení nazvanou mealy. Tuto modifikaci popsal dominantní alelou *Pa⁺* a recesivní alelou *Pa^{np}*, která základní zbarvení nemění.

Existuje studie, která poukazuje na souvislost genotypu v genu *ASIP* s určitým druhem chování, JACOBS *et al.* (2016) v ní popisuje vrané klisny (*aa*), které byly více nezávislé než klisny hnědé (*A-*). Studie byla prováděna na 215 kusech koní plemene severoamerický tennessee walking horse. Obecně lze říci, že živočichové s nižší

aktivitou genu *ASIP* jsou klidnější a reagují s menším stresem a strachem (RIEDER *et al.*, 2001).

3.4.3 GEN *TYRP1* A *TBX3*

Dřívějším kandidátem na gen ovlivňující ředění základních barev, ve spojitosti s lokusem dun, byl gen *TYRP1* (RIEDER, 2001). Tedy prekurzor 5,6-dihydroxyindole-2-karboxylové oxidázy, nacházející se na 23. chromozomu v oblasti 33,025,969 - 33,067,513 přímého řetězce. Mimo fenotypový projev spojený se zbarvením byly popisovány i jiné, např. zvýšená krvácivost, snížená plodnost u samičího pohlaví, abnormální chování, prenatalní mortalita, samčí neplodnost (ENSEMBLE.ORG, 2016c).

XIAOQIAN *et al.* (2016) detekoval v genu *TYRP1* tři dominantní mutace, které jsou úzce spojeny se světlým (blond) fenotypem u liangshan prasat. Jedná se o podobný fenotyp jako u koní dun, avšak u prasat je stále asociován s genem *TYRP1*. U koní je již zbarvení dun asociováno s jiným genem a to *TBX3* (IMSLAND, 2015). S genem *TYRP1* je asociováno zbarvení u mongolských koní, kdy je polymorfismus v tomto genu asociován s tmavým zbarvením ($P = 0,00000023$). Expres *TYRP1* je nejvyšší u ryzáků a nejnižší u šedých koní (LI, 2014).

Nejnovější publikace autorky IMSLAND (2015) přisuzuje asymetrické rozložení pigmentu vlivu genu *TBX3* (T-BOX3 transkripční faktor), jehož exprese ve folikulech ředěných chlupů vede k rozdílné expresi ligandu KIT pro kódování signálního proteinu, ten pak má funkci při migraci a životnosti melanocytů. Expres *TBX3* je radiálně asymetrická a vede ke stejnému projevu asymetrie pigmentace. Koně bez dominantního působení genu *TBX3*, mají mnohem více uniformní pigmentaci jednotlivých chlupů (IMSLAND, 2015).

TBX3 gen byl nyní mapován v oblasti chromosomu 8 a způsobuje non-dun a dun fenotyp. Non-dun je způsoben dvěma alelami a to non-dun1 (d^1 , asociovaná s primitivními znaky) a non-dun2 (d^2 , bez výskytu primitivních znaků). Non-dun2 je asociován s delecí 1 617 bp oproti běžné sekvenci (1,6 kb in/del na chr8:18,227,267). Non-dun1 alela má slabší efekt než non-dun2 alela. Koně s alelou d^1 vykazují primitivní znaky zároveň bez zřetelného zředění zbarvení těla, čímž mohou být tyto znaky méně

zřetelné. Také u tmavých až černých hnědáků či vraníků nemusí být primitivní znaky viditelné. Alela D je dominantní vůči alele d^1 i d^2 , genotypy DD , Dd^1 a Dd^2 jsou tedy fenotypově identické. Genotypy d^1d^1 a d^1d^2 vykazují také určitou asymetrii v ukládání pigmentu, avšak ne tak výraznou jako je tomu u alely D . Alela d^1 je méně výrazná než alela d^2 . Primitivní znaky jsou tedy více viditelné u genotypu d^1d^1 než u d^1d^2 . Non-dun koně tedy mohou vykazovat primitivní znaky a být tak zaměněni s dun koňmi (IMSLAND *et al.*, 2016). Dominantní homozygotnost DD nezpůsobuje extrémní zředění základní barvy (THIRUVENKADAN *et al.*, 2008).

Non-dun2 je poměrně nedávno odvozená alela, tedy až po domestikaci. Oproti alele d^1 , která vykazuje výraznou diverzitu v průběhu celé oblasti a nejedná se tedy o nedávno odštěpenou alelu (IMSLAND *et al.*, 2016).

Většina domestikovaných koní je non-dun projevu, což je více pigmentovaný genotyp způsobený regulačními mutacemi poškozujícími expresi $TBX3$ v chlupových folikulech, tedy rovnoměrnější zastoupení melanocytů a pigmentových granulí v jednotlivých chlupcích. Dominantní zbarvení dun je způsobeno normální expresí $TBX3$ (IMSLAND *et al.*, 2016).

IMSLAND *et al.* (2016) identifikovala pro další možnosti analýz související SNP. SNP1 (G u alely D , T u alely d^1) je lokalizováno v oblasti delece u d^2 , tedy 1 067 bp po začátku jinak deletované části na chromozomu 8 (chr8:18,227,267 + 1,066 G > T). SNP2 (G u alely D , A u alely d^1 i d^2) je lokalizováno 362 bp nad deletovanou oblastí u d^2 opět na chromozomu 8 (chr8:18,226,905 A > G). Pro analýzu genotypu v rámci genu Dun můžeme použít SNP1 a identifikaci delece, SNP2 není k analýze a určení genotypu v genu Dun podstatné, což potvrdila i STEFANIUK-SZMUKIER *et al.* (2017).

Bioinformační analýzy predikují spojení deletované oblasti s $ALX4$ a $MSX2$, což jsou transkripční faktory hrající roli ve vývoji chlupového folikulu. SNP1 je pravděpodobně spojeno s ovlivněním vazby CCAT boxu s transkripčními faktory NF-Y a NF-I (IMSLAND *et al.*, 2016).

Zředění způsobené lokusem dun je založené na zcela odlišném principu, než je tomu u lokusu cream. Zbarvení cream způsobuje, že v melanocytech nemůže probíhat

melanogeneze nebo jen v omezené míře, čímž je způsobena nepřítomnost pigmentu. Naopak u lokusu dun probíhá melanogeneze v melanocytech bez omezení. Zředění barvy je zajištěno shlukování granulí pigmentu do neobvyklých skupin, které způsobí výrazné snížení absorpce světla. Je tedy produkováno normální množství běžného pigmentu, avšak jeho distribuce do vlasových vláken je omezená a zároveň pigment, který je transportován je asymetricky shlukován (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

Analýza transkriptů z pokožky úhořího pruhu u dun koní a korespondujícího místa u non-dun koní neukázala rozdílnou expresi melanocytů či melanocyt regulujících genů (IMSLAND *et al.*, 2016).

Primitivní znaky mají svůj lokus M, ten je ale distribuován ve velmi úzké souvislosti s lokusem dun (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Míra výskytu primitivních znaků je často závislá na plemeni daného koně. Může se tedy jednat o specifikum dané populace a tím i o objekt studia genetického driftu a přímé selekce (IMSLAND, 2015).

Krávy plemene galloway a highland mají také ředěná zbarvení, avšak u nich byla objevena mutantní alela genu *PMEL*, která projevuje neúplnou dominanci. Krávy fenotypu dun jsou heterozygoti v genu *PMEL* a více zředěný genotyp silver dun je pak dominantní homozygot. *PMEL* protein zasahuje do procesu přeměny melanosomu prvního stádia nebo pre-melanosomu na melanosom druhého stádia (SCHMUTZ a DREGER, 2012). Koně s mutací v proteinu *PMEL* vykazují stříbrné zbarvení silver dapple (BRUNBERG *et al.*, 2006). Což je u koní jiný druh ředění nežli dun.

3.4.4 DĚDIČNOST JEDNOTLIVÝCH ZBARVENÍ

Různá zbarvení a jejich genetické založení mají odlišné interakce a úroveň své exprese. Hnědé zbarvení je dominantní vůči černému a obě jsou epistatická k barvě ryzé (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.4.4.1 Dominantní a recesivní dědičnost

Dominantně se projevují geny způsobující strakaté zbarvení (roan, tobiano a overo) a také geny způsobující zředění barvy (dun, silver dapple a champagne), kromě cream lokusu (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.4.4.2 Neúplná dominance

Projevuje se u strakatého zbarvení leopard, ale také u zbarvení cream. Kdy je důležité, zda se jedná o heterozygota (částečné zředění nebo tečkovaný leopardí vzor) nebo dominantního homozygota (úplné zředění nebo pouze ojedinělé tečky u zbarvení leopard) (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.4.4.3 Epistáze – dominantní nebo recesivní

Recesivní epistáze se vyskytuje mezi základními lokusy (extension a agouti). Genotyp *ee* na lokusu extension kompletně zakrývá jakýkoliv projev lokusu agouti a vždy se jedná o ryzáka. Aby se tedy mohl genotyp na lokusu agouti (*Aa* a *AA* hnědák; *aa* vraník) projevit, musí být v lokusu extension alespoň jedna alela dominantní. Dominantní epistáze je mezi lokusem grey a lokusem white, kdy jsou oba dominantní vůči všem ostatním lokusům. Lokus white je ale zároveň dominantní vůči lokusu grey (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.4.4.4 Polygenní dědičnost

Polygenní dědičnost vykazuje modifikační zbarvení shade, také různé odstíny znaků u ryzáků a zejména bílé odznaky na hlavě a končetinách (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.4.4.5 Aditivní působení genů

Mezi lokusy cream a champagne pozorujeme aditivní vztah, ale také mezi silver dapple a lokusem grey, kdy dochází k rychlejšímu vybělení jedinců se stříbrným genem. Dalším aditivním vztahem je interakce mezi lokusem tobiano a overo (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.4.4.6 Modifikující geny

Jedinci se stejným genotypem (ve známých lokusech), odchovaní ve stejných podmínkách budou stále prokazovat určitou variabilitu ve sledovaném znaku. To by mohlo být vysvětleno dalšími modifikujícími geny, tzv. genetické pozadí. Příklad můžeme hledat v různé délce a intenzitě vybělování, různé strakaté vzory a bílé odznaky na hlavě a končetinách (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.4.4.7 Letální vztahy

Letální geny způsobují značné odchýlení od normálního projevu k projevu letálnímu. Doba této změny záleží na době, kdy daný letální gen působí (embryo, zygota, plod apod.). Letální je například dominantní bílá, tedy dominantní homozygot v lokusu white, dále dominantní homozygot v lokusu roan a overo (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008).

3.4.4.8 Vazba genů

Byla zjištěna vazba mezi lokusy tobiano, extension, roan a s lokusy souvisejícími se sérovými proteiny (THIRUVENKADAN *et. al.*, 2008). Vazbovou skupinou se označují geny lokalizované na stejném chromozomu. V rámci vazbové skupiny jsou geny hodnoceny silou vazby, která vyjadřuje pravděpodobnost vzniku crossing-overu. Čím jsou geny více vzdáleny tím je mezi nimi menší vazebná síla a větší pravděpodobnost vzniku zlomu (URBAN, 2001).

4 METODIKA

4.1 CHARAKTERISTIKA ZKOUMANÝCH JEDINCŮ

Skupina testovaných jedinců vycházela z populace klisen v genetických zdrojích (GZ). Tyto klisny tedy prošly výkonnostními zkouškami a byly popsány inspektory chovu. Jejich zbarvení a tělesné znaky odpovídají standardu plemene. Klisny byly vybrány na základě dohody s majiteli. Bylo otestováno 96 huculských klisen pro geny *MC1R*, *ASIP* a *TBX3*, nakonec byla možnost otestovat ještě sadu dalších klisen (22 jedinců), avšak z časových důvodů již pouze pro *MC1R* a *ASIP*, celkem tedy 118 klisen. V rámci dalších analýz struktury bude udržován systém vycházející z celkového počtu klisen (118 ks) a zúžený výběr z klisen testovaných i na gen *TBX3* (96 ks).

Celková populace klisen (456 ks) v rámci PK ČR vykazuje koeficient příbuznosti $f_{(x)} = 2,857$. Klisen v genetických zdrojích je pouze 156 a jejich koeficient příbuznosti je $f_{(x)} = 3,247$, tato hodnota má v posledních letech mírně klesající trend. Avšak populace je velmi malá a její aktuální efektivní velikost pro klisny v GZ má hodnotu $N_e = 58,04$, což je dle mezinárodních norem hodnota pro kriticky ohroženou populaci vyžadující řízený režim *in situ*. Je tedy nutné udržovat a zvyšovat míru reprodukce s důrazem na tvoření co nejvíce nepříbuzných párů, tak aby byla zachována diverzita plemene (JELÍNEK, 2017). Linie klisen v celé populaci jsou zastoupeny 30,73 % gurgul, 30,5 % goral, 19,95 % oušor, 13,53 % hroby, 2,06 % prislop, 1,38 % dychov a 1,83 % ostatní linie (ZPRAVODAJ HUCUL, 2017).

Struktura klisen je vyjádřena pomocí linie a zbarvení uvedeného v průkazu původu (PP), tedy určené komisařem při zápisu klisny do plemenné knihy. Klisny byly zejména zastoupeny liniemi goral, gurgul a oušor s počty jedinců 40, 36 a 27 po řadě. První dvě jmenované linie patří obecně mezi nejzastoupenější v rámci České Republiky. Kompletní výčet linií objevujících se v analýze naleznete v tabulce č. 2. Linie prislop a pietrosu jsou velmi málo zastoupené zejména z důvodů, že se jedná o poměrně nedávno dovezené linie ze zahraničí. Jelikož mohou být do GZ zapsány pouze klisny narozené na území ČR, trvá déle, než se v rámci mateřské populace tyto linie rozšíří. Zároveň se

také jedná o méně typické linie (v rámci českého chovu hucula), které nejsou ve větší míře chovateli vyhledávány.

Tabulka 2 Struktura klisen dle linie

Linie	Základní výběr [počet jedinců]	%	Zúžený výběr [počet jedinců]	%
Goral	40	33,9	34	35,4
Gurgul	36	30,5	29	30,2
Oušor	27	22,9	24	25
Hroby	11	9,3	6	6,3
Prislop	3	2,5	5	3,1
Pietrosu	1	0,9		
Σ	118	100	96	100

Klisy byly komisaři popsány odstíny hnědé, plavé, ryzé a také zde bylo několik vráných. Podrobněji popsané varianty jednotlivých zbarvení byly pro potřeby stručné charakterizace výběru shrnuty pod pojmy základní (hnědka, ryzka, vranka a šedá plavka). Černá hnědka, hnědka, světlá hnědka a tmavá hnědka byla uvedena pod zbarvení hnědka. Černá plavka, šedá plavka, tmavá plavka a tmavě šedá plavka pod označení šedá plavka. Černá ryzka, ryzka a tmavá ryzka pod pojmem ryzka.

Tabulka 3 Struktura klisen dle barvy zapsané v PP

Barva	Základní výběr [počet jedinců]	%	Zúžený výběr [počet jedinců]	%
Hnědka	75	63,6	68	70,8
Šedá plavka	19	16,1	11	11,5
Plavka	10	8,5	8	8,3
Ryzka	10	8,5	7	7,3
Vranka	4	3,4	2	2,1
Σ	118	100	96	100

V tabulce č. 3 tedy můžeme vidět výrazně převyšující počet hnědáků nad ostatními barvami celkově, a to jak u základního výběru (63,6 %), tak i u zúženého (70,8 %). Rozložení zbarvení mezi výběry je poměrně stabilní. U obou je výrazně nižší

počet vranek s 3,4 % a 2,1 %. Také zastoupení plavek (8,5 % a 8,3 %) a ryzek (8,5 % a 7,3 %) není velké.

4.2 ODBĚR VZORKŮ A VYHODNOCENÍ FENOTYPU

Část vzorků byla odebírána v období červenec až září 2016 a některé byly poskytnuty z archivu agrogenomické laboratoře MENDELU, kam je zasílali samotní chovatelé. Vzorky byly odebírány z hřívky, ocasu a ukládány do samostatných označených obálek (jméno a číslo klisny). Vycházelo se tedy ze vzorku žíní v počtu cca 20-40 ks, které obsahovaly chlupové cibulky. Zároveň se vzorky byly pořizovány fotografie jako podklad pro určení fenotypu a intenzity primitivních znaků. Každý jedinec byl vyfocen v zootechnickém postoji tzn. z levé strany zvířete, levá přední nakročena a levá zadní zakročena, tak aby se končetiny nepřekrývaly. Druhá fotografie zachycovala zádovou oblast i s kořenem ocasu z pohledu za koněm, důvodem bylo zaznamenání míry výskytu úhořího pruhu.

V rámci fenotypu byl hodnocen výskyt a intenzita primitivních znaků na základě získaných fotografií. Kategorie znaků byly vytvořeny na základě pořízených fotografií jednotlivých klisen a jejich znaků, tedy na základě potřeb dané populace. Metodicky byly rozděleny na kategorie „znak není přítomen“, „znak je přítomen“ a následné rozdělení dle intenzity na světlý x tmavý projev a dle velikosti malý x střední x velký znak. V případě končetin byl znak popsán místopisně dle zbarvené oblasti končetin. V rámci každého ze znaků byla vložena kategorie „nelze vidět/identifikovat“, pro popis u velmi tmavě zbarvených klisen.

Celkový projev **primitivních znaků** byl hodnocený z pohledu na levý bok, tedy bez hodnocení úhořího pruhu, který je natolik rozšířený, že byl hodnocen samostatně. Jednotlivé kategorie byly tyto: primitivní znaky nejsou přítomny (1), jsou slabé (2), středně výrazné (3), výrazné (4) a nelze je vidět (5).

Úhoří pruh, charakteristický znak huculského plemene. Předpokládá se, že by měl být přítomný u všech jedinců, alespoň v minimální míře. Kategorie tohoto znaku byly následující: znak není přítomný (1), úhoří pruh je světlý a úzký (2), světlý a středně

široký (3), světlý a široký (4) úhoří pruh je tmavý a úzký (5), tmavý a středně široký (6), tmavý a široký (7), není vidět (8), v místě úhořího pruhu je pouze tmavá oblast (9) a málo znatelný úhoří pruh (10).

Zebrování končetin není příliš časté, nachází se zejména u koní se zředěnou barvou. V některých případech je možné pozorovat pouze jakousi tmavou oblast (odlišnou od vysoko vybarvených končetin a zároveň se nejedná o klasicky vybarvené zebrování). Kategorie tohoto znaku byly rozděleny následovně: není přítomno (1), je slabé (2), středně výrazné (3), výrazné (4) a není vidět (5).

Oslí kříž se ukázal jako velmi variabilní znak vyskytující se v mnoha podobách, jeho kategorie jsou tedy četnější, než tomu bylo u jiných znaků. Jsou rozděleny na: oslí kříž není přítomný (1), oslí kříž je světlý-neohraničený a malý (2), je světlý-neohraničený a střední velikosti (3), světlý-neohraničený a velký (4), světlý-ohraničený a malý (5), světlý-ohraničený a středně velký (6), světlý-ohraničený a velký (7), je tmavý-neohraničený a malý (8), tmavý-neohraničený a středně velký (9), tmavý-neohraničený a velký (10), tmavý-ohraničený a malý (11), tmavý-ohraničený a středně velký (12), tmavý-ohraničený a velký (13) a oslí kříž není vidět (14).

Žíhaná hříva a ocas má zřejmě dvě podoby. První, kdy se jedná o kontrastní výskyt výrazně světlejších žíní a druhá, kdy jsou v hřívě či ocasu přítomny světlejší žíně než okolní, avšak nejsou výrazné, pouze o odstín dva světlejší. Často se však tyto dvě podoby prolínají. V této práci jsme hodnotili pouze výskyt, ne intenzitu, která by byla vzhledem k povaze znaku náročná a vyžadovala by spíše určení spektrofotometrické než subjektivní posouzení. Kategorie byly následující: žíhání není přítomno na ocase ani v hřívě (1), výrazně hříva i ocas (2), žíhaná hříva i ocas (3), pouze hříva (4) a pouze ocas (5).

Míra zbarvení končetin vyjadřuje, kam zasahovala pigmentace končetin. Kategorie: končetiny nejsou zbarveny-jsou v barvě těla (1), jsou velmi málo zbarveny-pouze spěnky, spěnky + karpální klouby, spěnky + karpální kl. + hlezenní klouby (2), málo zbarveny-spěnky + karpální a hlezenní kl. + část holení (3), středně zbarveny-nad karpální a hlezenní klouby (4), zbarveny ve velké míře-nad kaštánky předních

končetin + bérce, až k přechodu s tělem (5) a míra zbarvení nelze určit-není vidět přechod barev (6).

Intenzita zbarvení končetin doplňuje míru zbarvení. Kategorie: končetiny světlejší než barva těla (1), končetiny v barvě těla (2), tmavší než barva těla (3) a výrazně tmavší (4).

4.3 IZOLACE DNA

Izolace DNA se prováděla kolonkovou metodou pomocí tkáňového komerčně dostupného kitu QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). V rámci tohoto kitu je dodáván protokol, kterým jsme se bez úprav řídili.

Množství a zda vůbec došlo k izolaci DNA bylo ověřeno pomocí horizontální agarózové gelové elektroforézy (ELFO). Byl použit 1% agarózový gel s pufrům TBE (Sigma-Aldrich) o objemu 60 ml. Agarose SERVA for DNA electrophoresis (SERVA Electrophoresis GmbH) byl typ používané agarózy. Pro vizualizaci byly využívány látky Etidium bromid, GelStar (LONZA) nebo GoodView dle aktuální dostupnosti. Pro nanášení byl použit nanášecí pufr o složení 40 % sacharózy, voda, bromfenolová modř a TE pufr (Sigma-Aldrich). Zároveň s 5 μ l izolátu od každého vzorku byl na gel nanesen marker o velikosti 1 kb (Thermo Fisher Scientific Inc.). Proces byl nastaven na 100 V a přibližně 10 min.

4.4 REAKCE PCR V DUPLEXU (*MC1R*, *ASIP*)

Pro další analýzy bylo nutné z izolované DNA namnožit studované úseky genů. Pro tento účel posloužila metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) optimalizovaná pro oba geny (*MC1R* a *ASIP*) současně v tzv. duplexu. Postup a množství reagensů v rámci celé analýzy (komplex PCR-RFLP) byl převzat z práce HORECKÁ (2013), která se zabývala z části stejnými geny a tento proces optimalizovala pro prostředí genomické laboratoře MENDELU.

Primery:

Využívané primery byly opět čerpány z práce HORECKÁ (2013) a jejich výčet naleznete v tabulce č. 4, kde jsou rozděleny na přímé a zpětné.

Tabulka 4 Primery pro geny *MC1R* a *ASIP* (Horecká, 2013)

	Primery	Struktura
Přímé	MC1R-F	5' ATT CCT GAT GGG CTC TTC CT 3'
	ASIP-F	5' TAA GCG ATG AAG AGG GTG CT 3'
Zpětné	MC1R-R	5' CTT TTG TCT CTC TTT GAA GCA TTG 3'
	ASIP-R	5' GAG AAG TCC AAG GCC TAC CTT G 3'

PCR MasterMix:

Jednotlivé reagensie byly připraveny do PCR MasterMixu (MM). MM obsahoval PPP MasterMix + Mg²⁺, PCR Ultra H₂O (Qiagen) a veškeré výše vypsané primery (IDT Inc.) v množstvích pro namíchání jedné reakce uvedených v tabulce č. 5. Následně byla směs pipetována po 12 µl a bylo přidáno 0,5 µl izolované DNA.

Tabulka 5 Složení PCR MasterMixu v množství na jeden vzorek

Složky PCR MasterMixu	µl
PPP MasterMix + Mg ²⁺	6,25
PCR Ultra H ₂ O	3,75
Primer MC1R-F	0,5
Primer ASIP-F	0,5
Primer MC1R-R	0,5
Primer ASIP-R	0,5

Teplotní profil a samotná amplifikace:

Amplifikace určených úseků byla prováděna na termálním cykleru PTC-200 (MJ Research Inc.) za podmínek uvedených v tabulce č. 6.

Tabulka 6 Teplotní profil PCR reakce (HORECKÁ, 2013)

Fáze cyklu	Teplota [°C]	Čas [min]	Opakování
Počáteční denaturace	95	15	
Denaturace	95	0,5] 35 x
Annealing	59	0,5	
Extenze	72	0,5	
Závěrečná extenze	72	10	
Ukončení reakce	4	∞	

Kontrolu reakce byla provedena opět pomocí ELFO. Byl použit 3% agarózový gel s pufrem TBE (Sigma-Aldrich) o objemu 60 ml. Agaróza byla použita stejná viz. ELFO po izolaci. Pro vizualizaci byla využita látka GelStar. Vzorky byly nanášeny bez nanášecího pufru. Zároveň s 5 μ l každého amplifikovaného vzorku byl na gel nanesen marker o velikosti 50 a 100 bp (Thermo Fisher Scientific Inc.). Proces probíhal za těchto podmínek: 120 V po dobu přibližně 40 min.

PCR produkt genu *MC1R* je o velikosti 428 bp, genu *ASIP* o velikosti 102 a 91 bp.

4.5 RFLP DUPLEXU *MC1R* A *ASIP*

Metoda RFLP (analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů) je založena na štěpení molekuly DNA ve specifických restrikčních místech pomocí endonukleázy. Pro určení polymorfismů v genu *MC1R* je nutné namnožený úsek štěpit právě v bodu restrikce. Oproti genu *ASIP*, kde jsou již alely viditelné po metodě PCR.

Tabulka 7 Složení RFLP MasterMixu v množství na jeden vzorek

Složky RFLP MasterMix	μ l
Ultra H ₂ O	10,4
Pufř R	1,5
RE <i>TaqI</i> (5'T / CGA3')	0,1

Reakční směs o množství viz tabulka č. 7 a obsahu Ultra čistá H₂O (Qiagen), Pufř R (Thermo Fisher Scientific Inc.) a restrikční enzym (RE) *TaqI* (Thermo Fisher Scientific Inc.), byla namíchána pro potřebné množství vzorků. Do připraveného a napipetovaného MM byly přidány 3 μ l PCR produktu.

Inkubace namíchané směsi, o výsledném objemu 15 μ l, probíhala v inkubátoru Memmert BE 500 při teplotě 65 °C, což je daná teplota výrobcem pro použitý restrikční enzym, přes noc.

Vyhodnocení genotypů proběhlo pomocí ELFO. Byl použit 3% agarózový gel s pufrem TBE (Sigma-Aldrich) o objemu 60 ml. Pro vizualizaci byla použita látka

GoodView. Vzorky byly nanášeny s nanášecím pufrem založeným na sacharóze. Na gel byl nanášen veškerý RFLP produkt a zároveň také marker o velikosti 50 bp (Thermo Fisher Scientific Inc.). Podmínky opět podobné jako u ELFO pro PCR a to 120 V a přibližně 60 min.

Vyhodnocení probíhalo dle určených délek vzniklých fragmentů. Délka jednotlivých fragmentů a jejich přiřazení k alelám je uvedena v tabulce č. 8. Pokud tedy vzorek obsahoval pouze fragmenty délky 428 bp jednalo se o dominantního homozygota, vzorek s fragmenty 297 a 131 bp byl recesivní homozygot a s fragmenty 428, 297 a 131 bp se jednalo o heterozygota v genu *MC1R*. Pro gen *ASIP* byly genotypy následující, 102 bp dominantní homozygot, 102 a 91 bp heterozygot a 91 bp recesivní homozygot.

Tabulka 8 Délka fragmentů a příslušnost k alelám a genům (HORECKÁ, 2013)

Gen	Alela	Počet bp
<i>MC1R</i>	<i>E</i>	428
	<i>e</i>	297 + 131
<i>ASIP</i>	<i>A</i>	102
	<i>a</i>	91

4.6 ANALÝZA GENU *TBX3*

Analýzu genu *TBX3* provedla laboratoř agrogenomiky MENDELU ve spolupráci s VÚŽV Praha, Uhřetěves, s jejichž souhlasem data ve své diplomové práci používám.

Polymorfismy v genu *TBX3* byly mimo jiné analyzovány pomocí agarózové ELFO pro detekci délky amplifikovaných úseků vlivem přítomnosti nebo absence 1,6 kb delece. Další metodou byla metoda Real-Time PCR s použitím sondy TaqMan v souvislosti se SNP1, dle protokolu od výrobce. Použité primery jsou uvedeny v tabulce č. 9 (VRTKOVÁ, 2017). SNP2 nebylo analyzováno, jelikož IMSLAND *et al.* (2016) i STEFANIUK-SZMUKIER *et al.* (2017) nepovažují tento SNP podstatný pro určení genotypu v genu *TBX3*.

Tabulka 9 Sekvence primerů pro analýzu SNP v genu *TBX3* (VRTKOVÁ, 2017)

Region	Typ primeru	Primery 5'-3'
SNP1 chr8: 18,227,267+1,066	SNP1-Fw	GGCATCAACTTAGCCAAATGATTTTGA
	SNP1-Rw	CCTGCCAGAGCGAGTGG
	SNP1-G-Hex	HEX-CCCTAGCAACAGGATAT-BHQ1
	SNP-T-Fam	FAM-CCCTAGCAAAAGGATAT-BHQ1
IN/DEL chr8: 18,227,267	InDel-Rew	CTTCTCCGGGGTCCTATTTT
	Del-Fw	ATAAAGTCAGGAGGCCTTTGC
	Ins-Fw	TGGAAGGCAGAGGTTAGATCA

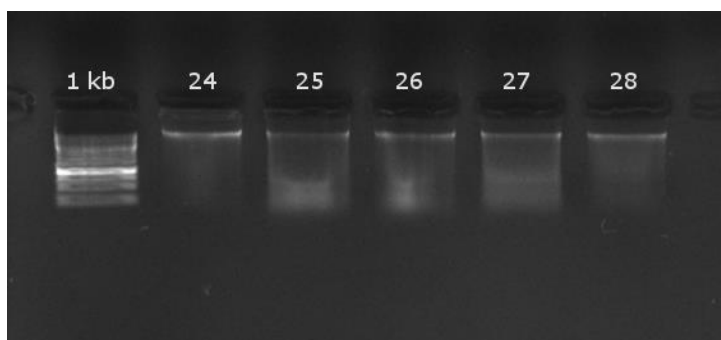
4.7 MATEMATICKO-STATISTICKÉ ZPRACOVÁNÍ DAT

Nasbíraná data byla zpracována ve statistickém programu SAS verze 9.4 (SAS Institute, 2013) Byly také vypočítány frekvence genotypů a alel a porovnány fenotypy popsané v průkazu původu (PP) a fenotypy odvozené od určených genotypů. Průkaznosti byly stanovené pomocí χ^2 testu a Fisherova exaktního testu. Testovaná nulová hypotéza byla stanovena: Dvě určité proměnné jsou nezávislé. Alternativní hypotéza: Dvě určité proměnné jsou závislé. Nulovou hypotézu jsme zamítli při průkaznosti či vysoké průkaznosti. Pro určení síly závislosti mezi danými proměnnými byl použit Cramerův koeficient (V), který nám určil, zda se jedná o slabou, střední nebo silnou závislost nebo jsou data zcela nezávislá. Pro každý gen byla testována Hardy-Weinbergova (HW) genetická rovnováha pomocí χ^2 testu.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 VÝSLEDKY IZOLACE

Ukázku výsledků izolace můžeme vidět na obrázku č. 6, všech pět vzorků vykazuje přítomnost DNA, nejsilněji se projevuje vzorek č. 24. Smír je způsoben průběhem izolace, kdy se dostává do reakce i zbylá část žíní mimo cibulek.

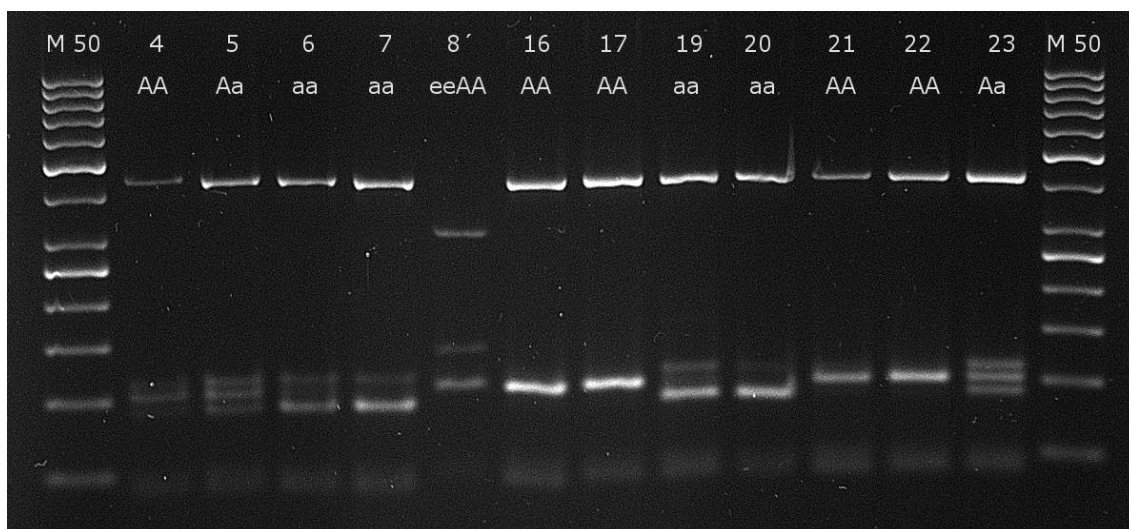


Obrázek 6 Kontrola izolace DNA z koňských žíní

5.2 VÝSLEDKY PCR REAKCE

Po reakci PCR (viz. obrázek č. 7) již můžeme odečíst genotyp v genu *ASIP*, avšak výsledek pro gen *MC1R* uvidíme až po reakci RFLP.

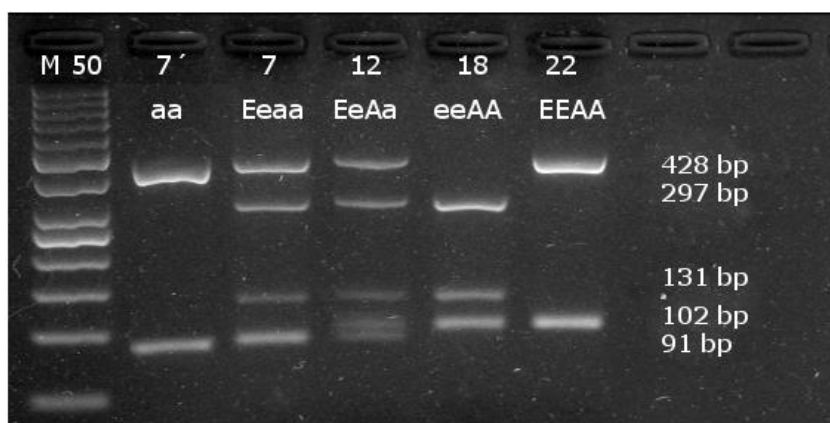
Vzorek č. 8' je nanesen právě již po štěpení a můžeme tedy odečíst genotyp i pro gen *MC1R* (recesivní homozygot *ee*, kdy vidíme bandy o velikosti 297 a 131 bp, a zároveň dominantní homozygot *AA*, s bandem o velikosti 102 bp). Vzorky č. 4 a 21 jsou slabší, zejména č. 4 je hůře čitelný. Oproti tomu vzorky č. 16, 17, 19, 20, 22 a 23 jsou silné a dobře čitelné.



Obrázek 7 Kontrola produktu po PCR (vzorek č. 8' je kontrola po RFLP)

5.3 ANALÝZA RFLP

Kompletní genotyp obou genů lze odečíst až po reakci RFLP viz. obrázek č. 8. Ale zejména alely pro gen *ASIP* se hůře odlišují. Vzorek č. 7' je pro kontrolu po amplifikaci (PCR), můžeme tedy zhodnotit pouze gen *ASIP*, ale již ne gen *MC1R*. Jak je patrné v porovnání se vzorkem č. 7, který je již po štěpení a jedná se o stejného jedince. Všechny vzorky na gelu jsou silné a dobře čitelné.



Obrázek 8 Výsledek štěpení genů *MC1R* a *ASIP* (vzorek č. 7' je kontrola po PCR)

5.4 ZHODNOCENÍ FENOTYPŮ A GENOTYPŮ

Zbarvení uvedená v průkazech původu (PP) jsem sjednotila do základních pojmenování, prozatím není možné testovat i podrobnější odchylky v jednotlivých zbarveních.

Testovali jsme závislost linií klisen a jejich zbarvení, avšak mezi jednotlivými liniemi nebyl průkazný rozdíl ($P = 0,0887$) ve frekvenci zbarvení.

Již v základní tabulce (č. 10) je možné vidět výrazné odlišnosti v zastoupení zejména u zbarvení hnědka (70,8 % → 42,7 %), plavka (8,3 % → 29,2 %), a vranka (2,1 % → 12,5 %). Je jasné, že dochází v procesu popisování klisen k poměrně velké chybovosti, kdy je velké množství plavek popsáno jako jiné zbarvení, vzhledem k rapidnímu snížení hnědek se jedná právě o ně. Z výsledků můžeme vidět, že se v populaci nachází daleko více plavek a vranek, než jsme se doposud domnívali.

Tabulka 10 Struktura zbarvení dle genotypu v porovnání se strukturou dle PP

Barva	Počet jedinců dle genotypu	%	Počet jedinců dle PP	%
Hnědka	41	42,7	68	70,8
Plavka	28	29,2	8	8,3
Vranka	12	12,5	2	2,1
Šedá plavka	9	9,4	11	11,5
Ryzka	6	6,2	7	7,3

STACHURSKA *et al.* (2012)¹ uvádí, že u huculů v Polsku jsou převážně hnědáci 51 %, dále zbarvení tobiano 21,5 % a šedí plaváci z 14,8 %. V průběhu generací dochází k poklesu množství hnědáků.

Podrobnější porovnání odchylek jednotlivých popsanych barev a genotypů můžeme vidět v tabulce č. 11. Data globálně odpovídají (Fisherův exaktní test; $P < 0,0001$), variabilitu barvy dle PP lze vysvětlit variabilitou barvy na základě genotypu. Podrobnější prozkoumání, však ukazuje určitou chybovost v určení.

¹ Pozn.: Autorka vychází z fenotypových dat uvedených v centrální evidenci koní. Lze tedy předpokládat velkou chybovost viz. naše zjištění odlišnosti popsané a skutečné barvy dle genotypu. Není tedy možné naše a její výsledky bez problémů porovnávat.

Tabulka 11 Vztah genotypu a fenotypu

Genotyp Fenotyp	Hnědka	Plavka	Vranka	Šedá plavka	Ryzka	Σ
Hnědka	28	15				43
Tmavá hnědka	11	2	2			15
Černá hnědka			5	1		6
Světlá hnědka	1	3				4
Šedá plavka				6		6
Tmavá plavka	1		2	2		5
Plavka		8				8
Vranka			2			2
Ryzka					6	6
Černá ryzka			1			1
Σ	41	28	12	9	6	96

Můžeme vidět, že opravdu 15 plavých klisen bylo popsáno jako hnědky, společně s chybným popisem tmavá a světlá hnědka se jedná o více než dvojnásobný počet, než je správně popsanych. Určení zbarvení, zda se jedná o hnědku s primitivními znaky, nebo plavku je poměrně náročné a v mnoha případech se zřejmě nedá bez genetické analýzy chyba vyloučit.

Ještě vyšší chybovost je u klisen vranek, které byly v celkovém počtu deseti klisen popsány jako tmavá hnědka, černá hnědka, tmavě šedá plavka a černá ryzka. Správně určené byly pouze dvě klisny, což je 5× méně než chybných. U vranek se může jednat o všeobecně známé tvrzení, že hucul nebývá černý a pokud vezmeme v úvahu ještě fakt, že jsou tito koně chováni převážně celoročně venku na pastvinách dochází k zesvětlení barvy vlivem slunečních paprsků. Následně se zcela logicky nabízí popis takové vranky jako tmavě šedá plavka nebo černá hnědka apod.

Z tabulky ale můžeme usoudit, že pokud vidíme velmi tmavou klisnu, kterou bychom popsali spíše jako černou hnědku než vranku (přece jen se na ní vyskytují určitá zesvětlení), máme volit popis vranka a počítat se zesvětlením vlivem slunečního záření. Dále musíme brát v potaz vliv modifikujících genů. Například u oslů byla popsána alela a^{lp} způsobující světlé oblasti okolo nozder, očí a světlou krajinu břicha

viz. ABITBOL, (2015). Stále se ale jedná o vraníka pouze s modifikací. Světlé hnědky, popisovat spíše jako plavky, jelikož případně vznikne daleko menší chyba než při popisu takového koně jako světlé hnědky. V rámci popsaných hnědek je větší počet světlejších klisen, které byly genetickou analýzou určeny jako plavky.

V rámci testování chybovosti v popisu zbarvení klisen, jsme vyřadili dva případy (tabulka č. 12), kdy se jednalo pravděpodobně o chybu nikoliv v rámci popisu ale v rámci administrace a o chybu jedinečnou, která by pro statistické vyhodnocení byla nedostatečná. V rámci vyhodnocení jsme tedy uvažovali dva druhy chyby, chybně určeného vraníka (12,8% výskyt) a chybně určeného plaváka (21,3% výskyt).

Tabulka 12 Chybná určení zbarvení odstraněná ze souboru pro statistické zpracování

Zbarvení dle PP	Zbarvení dle genotypu	Genotyp
Tmavá plavka	Hnědka	$AaEed^2d^2$
Černá hnědka	Šedá plavka	$aaEEDd^2$

Průkazný rozdíl mezi chybnými zařazeními nebyl u žihání hřívky a ocasu ($P = 0,3703$) a u intenzity zbarvení končetin ($P = 0,3011$). Naopak vysoce průkazný rozdíl byl u všech dalších znacků ($P = 0,0001$). Cramerovi koeficienty byly následující, 0,5361 (primitivní znaky), 0,5656 (úhoří pruh), 0,4315 (zebrování končetin), 0,5410 (oslí kříž) a 0,4399 (míra zbarvení končetin), všechny znaky jsou tedy středně závislé.

Chybně popsaný vraník vykazoval neidentifikovatelnost jednotlivých znaků z důvodů tmavého zbarvení a také vysoko zbarvené končetiny. Pokud budeme tedy popisovat výrazně tmavého koně bez viditelných primitivních znaků, jedná se pravděpodobně právě o vraníka i když barva nebude až tak charakteristická, jak tomu většinou bývá.

Chybně popsaný plavák ve velké většině případů vykazoval primitivní znaky a málo až vysoko zbarvené končetiny. Zejména u chybně popsaných plaváků by bylo vhodné provést spektrofotometrické analýzy a detailnější průzkum světlých hnědáků, hnědáků a plaváků v populaci, aby bylo možné jednotlivé hraniční odstíny lépe

identifikovat. Je nutné tato data podložit také genotypovými informacemi. Jedince se špatně popsaným fenotypem podrobněji uvádím v příloze č. 1.

5.5 FREKVENCE ALELA GENOTYPŮ V POPULACI

Frekvence genotypů a alel pro geny *ASIP* a *MC1R* byly počítány ze souboru všech 118 klisen, kdy 96 z nich bylo testováno nejen pro tyto základní geny, ale také i pro gen *TBX3*. Pro výpočet frekvencí alel a genotypů pro gen *TBX3* byl použit pouze soubor 96 klisen.

Rozložení genotypů pro gen *ASIP* uvádím v tabulce č. 13, kdy nejvyšší zastoupení s 50-ti jedinci a frekvencí 0,4237 má heterozygot *Aa*. Dále je pak dominantní homozygot *AA* a recesivní homozygot *aa* s frekvencemi 0,3136 a 0,2627 po řadě. Vyšší zastoupení má dominantní alela *A* s frekvencí 0,5254 oproti recesivní alele *a* s frekvencí 0,4746, avšak rozdíl není markantní, což jsme mohli předpokládat již z poměrně vyrovnaného počtu dominantních a recesivních homozygotů. Populace všech 118 klisen byla v genu *ASIP* v HW genetické rovnováze ($P = 0,9360$). STACHURSKA *et al.* (2012)² uvádí klesající tendenci frekvence recesivní alely *a* (0,4710). Frekvence recesivní alely *a* u populace potomků byla nižší než u rodičovské populace, frekvence u matek byla vyšší než u otců ($P < 0,01$).

Tabulka 13 Frekvence genotypů genu *ASIP*

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence	Alela	Relativní frekvence
<i>AA</i>	37	0,3136	<i>A</i>	0,5254
<i>Aa</i>	50	0,4237	<i>a</i>	0,4746
<i>aa</i>	31	0,2627		
Σ	118	1		1

Frekvence genotypů (viz tabulka č. 14) pro gen *MC1R* je také nejvyšší u heterozygota *Ee*, a to s frekvencí 0,5085, následuje opět dominantní homozygot *EE* s frekvencí 0,4237. Nejmenší zastoupení s frekvencí 0,0678 má recesivní homozygot *ee*,

² Pozn.: Jedná se o výsledek dle fenotypových dat viz. poznámka č. 1

což je logické vzhledem k tomu, že ryzáci nejsou v populaci huculských koní považováni za původní zbarvení. Dochází k jejich částečnému vyřazování, nebo alespoň upozadění, a tím i minimalizaci s nimi spojeného recesivního genotypu *ee*. Dominantní alela *E* měla frekvenci výrazně vyšší 0,6780 oproti recesivní alele *e* s frekvencí 0,3220. Což je opět důsledek nízkého počtu ryzek. Populace byla v genu *MC1R* v HW genetické rovnováze s hodnotou $P = 0,1661$. STACHURSKA *et al.* (2012)³ zmiňuje mírně rostoucí trend recesivní alely *e*, momentálně je hodnota frekvence 0,1820. Rozdělení recesivní alely *e* a dominantní *E* v populaci potomků i rodičů bylo stejné, opět byla ale frekvence recesivní alely *e* vyšší u klisen než hřebců ($P < 0,01$).

Mérenští a fríští koně jsou typickým příkladem, kdy plemeno charakterizuje pouze jedno zbarvení. Všichni jedinci jsou černí až na malou frekvenci recesivní alely *e* (RIEDER *et al.*, 2001).

Tabulka 14 Frekvence genotypů genu *MC1R*

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence	Alela	Relativní frekvence
<i>EE</i>	50	0,4237	<i>E</i>	0,6780
<i>Ee</i>	60	0,5085	<i>e</i>	0,3220
<i>ee</i>	8	0,0678		
Σ	118	1		1

Zajímavé rozložení genotypů je u genu *TBX3* viz. tabulka č. 15, který je spojen s lokusem dun. Velmi málo zastoupený je dominantní homozygot *DD*, který je řekněme až výjimečný s frekvencí 0,0208 a zastoupením pouze dvou klisen. Také recesivní homozygot *d¹d¹* je málo zastoupen s frekvencí 0,0833. Poměrně shodně jsou zastoupeny genotypy *d²d²*, *Dd¹*, *Dd²* s frekvencemi 0,1563; 0,1875 a 0,1979 po řadě. Nejvyšší zastoupení má genotyp *d¹d²* s frekvencí 0,3542. Součet frekvencí genotypů obsahující dominantní alelu *D*, tedy charakterizující zastoupení jedinců s projevem zesvětlení, je 0,4062. Zesvětlených jedinců je tedy méně než jedinců s projevem non-dun, tedy základním zbarvením. Nejvíce zastoupená alela byla *d²* s frekvencí 0,4323, dále alela *d¹*

³ Pozn.: Výsledky na základě fenotypových dat.

s frekvencí 0,3542 a jen o něco méně alela D s hodnotou 0,2135. Celá zkoumaná populace byla v genu $TBX3$ také v HW genetické rovnováze ($P = 0,4434$).

Tabulka 15 Frekvence genotypů genu $TBX3$

Genotyp	Absolutní frekvence	Relativní frekvence	Alela	Relativní frekvence
d^1d^1	8	0,0833	d^1	0,3542
d^1d^2	34	0,3542	d^2	0,4323
d^2d^2	15	0,1563	D	0,2135
Dd^1	18	0,1875		
Dd^2	19	0,1979		
DD	2	0,0208		
Σ	96	1		1

STACHURSKA *et al.* (2012)⁴ a její vypočítaná frekvence 0,933 recesivní alely d . Frekvenci autorka počítala z fenotypových dat a vycházela pouze z informací o dominantní alele D a recesivní alele d , neboť ještě v té době nebyla známa existence dvou non-dun alel a jejich interakce. Musíme tedy případně porovnávat součet našich frekvencí d^1 a d^2 s autorčinou alelou d .

IMSLAND *et al.* (2016) analyzovala 366 jedinců 19 plemen včetně przewalského koně. Výsledkem bylo 96 jedinců genotypu DD (26,23 %), 111 jedinců Dd (30,33 %) a 159 jedinců dd (43,44 %). Naše data také prokazují tendenci většího zastoupení non-dun koní (bez ohledu na typ recesivní alely).

Fjordští koně jsou z 9,8 % zbarvení šedý plavák. Polští konici jsou až na výjimky, které jsou z chovu vyřazovány (žlutý plavák a vraník), vždy šedí plaváci různých odstínů. Jednotlivé zastoupení je 75,4 % středně šedých, 14,6 % světle šedých, 9,7 % tmavě šedých a 0,3 % šedých se žlutým odstínem (STACHURSKA *et al.*, 2004)⁵. Vysoké zastoupení koní fenotypu dun je dáno povahou studované populace.

⁴ Pozn.: Výsledky na základě fenotypových dat.

⁵ Pozn.: Opět jsou základem fenotypová data. U Polských koníků, ale lze očekávat opravdu velkou část jedinců dun genotypu.

U polských koníků nebyla nalezena mutace 18,227,267+1,066 G > T v genu *Dun*, nacházející se v oblasti dalece v souvislosti s alelou d^l . Naopak byl nalezen vzácný genotyp *WTWT GG AA*, dříve objevený pouze u původních estonských koní. Dále autorka uvádí velice zajímavé dva nově identifikované genotypy *WTWT GG AG* a *WTdel Gdel GG* (STEFANIUK-SZMUKIER *et.al.*, 2017). V této práci bylo testováno SNP2, nemohu tedy porovnat kompletní genotypy.

V kontingenční tabulce (č. 16) vztahů genotypů genů *MC1R* a *ASIP*, opět vycházíme z celkového souboru 118 klisen. Nejvíce zastoupeným genotypem je kombinace heterozygotů *AaEe* (0,2119), dále kombinace heterozygota a dominantního homozygota *AAEe* (0,1864) a *AaEE* (0,1695). Také kombinace recesivního a dominantního homozygota je více zastoupená, ale pouze v kombinaci *aaEE* (0,1525). Recesivní homozygot v obou znacích *aaee* se ve zkoumané populaci nevyskytuje.

Tabulka 16 Kontingenční tabulka vztahu genotypů pro geny *ASIP* a *MC1R*

		<i>MC1R</i>			Σ
		<i>EE</i>	<i>Ee</i>	<i>ee</i>	
<i>ASIP</i>	<i>AA</i>	12 0,1017	22 0,1864	3 0,0254	37 0,3135
	<i>Aa</i>	20 0,1695	25 0,2119	5 0,0424	50 0,4238
	<i>aa</i>	18 0,1525	13 0,1102		31 0,2627
Σ		50 0,4237	60 0,5085	8 0,0678	118 1

Kompletní genotypy včetně genu *TBX3* a jejich interakce nalezneme v tabulce č. 17, 18 a 19. Mezi nejzastoupenější genotypy patří se sedmi zástupci *AaEed^ld²* a *AaEE d^ld²*, s šesti zástupci *AaEeDd^l*, *AaEeDd²* a *AAEed1d2* a s pěti zástupci *AaEed²d²*. Kombinace s recesivními homozygoty v genech *ASIP* a *MC1R* jsou obecně velmi málo zastoupené a často ani neexistují. V našem studovaném vzorku klisen jsem také nenalezla genotyp *AaEed^ld^l*. Genotypy s dominantním homozygotem *DD* jsou pouze dva.

Tabulka 17 Kontingenční tabulka vztahu genotypů v *MC1R* a *TBX3* ke genotypu *AA*

		<i>TBX3</i>					Σ	
		d^1d^1	d^1d^2	d^2d^2	Dd^1	Dd^2		DD
<i>MC1R</i>	<i>EE</i>	2 0,0690	4 0,1379	2 0,0690	1 0,0345	1 0,0345	1 0,0345	11 0,3793
	<i>Ee</i>	2 0,0690	6 0,2069	2 0,0690	3 0,1034	4 0,1379		17 0,5862
	<i>ee</i>		1 0,0345					1 0,0345
Σ		4 0,1379	11 0,3793	4 0,1379	4 0,1379	5 0,1724	1 0,0345	29 1

Tabulka 18 Kontingenční tabulka vztahu genotypů v *MC1R* a *TBX3* ke genotypu *Aa*

		<i>TBX3</i>					Σ	
		d^1d^1	d^1d^2	d^2d^2	Dd^1	Dd^2		DD
<i>MC1R</i>	<i>EE</i>	2 0,0435	7 0,1522	2 0,0435	4 0,0870	1 0,0217	1 0,0217	17 0,3696
	<i>Ee</i>		7 0,1522	5 0,1087	6 0,1304	6 0,1304		24 0,5217
	<i>ee</i>		2 0,0435	1 0,0217	1 0,0217	1 0,0217		5 0,1087
Σ		2 0,0435	16 0,3478	8 0,1739	11 0,2391	8 0,1739	1 0,0217	46 1

Tabulka 19 Kontingenční tabulka vztahu genotypů v *MC1R* a *TBX3* ke genotypu *aa*

		<i>TBX3</i>					Σ	
		d^1d^1	d^1d^2	d^2d^2	Dd^1	Dd^2		DD
<i>MC1R</i>	<i>EE</i>	1 0,0476	3 0,1429	3 0,1429	1 0,0476	4 0,1905		12 0,5714
	<i>Ee</i>	1 0,0476	4 0,1905		2 0,0952	2 0,0952		9 0,4286
	<i>ee</i>							
Σ		2 0,0952	7 0,3333	3 0,1429	3 0,1429	6 0,2857		21 1

5.6 PRIMITIVNÍ ZNAKY, JEJICH VÝSKYT A MÍRA ZBARVENÍ KONČETIN

Znaky byly hodnoceny na souboru klisen testovaných i na gen *TBX3*, tak abychom mohli provést analýzu vztahů mezi těmito proměnnými.

V tabulce č. 20 můžeme vidět absolutní i relativní zastoupení jednotlivých hladin projevu primitivních znaků. Poměrně velké množství klisen (25 %) nevykazovalo primitivní znaky, což je poněkud zarážející, jelikož se jedná o plemeno, které by primitivní znaky mělo nést. Část těchto klisen alespoň nesla úhoří pruh, který není v tomto kritériu hodnocen, avšak některé neměly ani ten. Bylo by vhodné rozvést tuto problematiku, zda se jedná o případnou hrozbu pro chov a udržení huculů v původním rázu či nikoli. Dle mých zkušeností má výskyt klisen bez primitivních znaků bohužel vzrůstající tendenci. Stále ale 53,1 % klisen alespoň nějaké či výrazné znaky, které jsme schopni pozorovat, nese. U 21,9 % klisen jsme nebyli schopni určit, zda primitivní znaky nesou či nikoli, vzhledem k velmi tmavému zbarvení, problematiku špatně viditelných primitivních znaků zmiňuje IMSLAND *et al.* (2016). Zde by mohla pomoci genetická analýza, analýza souvislostí jednotlivých alel Dun a výskytu primitivních znaků a případně spektrofotometrie, která by mohla určité odstíny odhalit, na základě výsledků bychom mohli být schopni predikovat, zda jedinec opravdu primitivní znaky nese a nejsou pouze vidět nebo zda je nenese.

Tabulka 20 Výskyt primitivních znaků při pohledu z boku koně

Primitivní znaky	Počet jedinců	%
Nejsou přítomny	24	25
Slabé	32	33,3
Středně výrazné	12	12,5
Výrazné	7	7,3
Nelze vidět	21	21,9
Σ	96	100

Nejvýraznějším primitivním znakem bývá úhoří pruh, který by se měl nacházet u každého jedince huculského plemene. Z našeho šetření (viz. tabulka č. 21), ale vychází poměrně znepokojivá statistika, kdy 6,3 % jedinců úhoří znak nemá, u 15,6 %

je velmi málo znatelný a 4,2 % klisen mají pouze tmavší zbarvení v oblasti úhořího pruhu. V 6,2 % se vyskytuje pouze světlý úhoří pruh, který byl zejména u ryzek, jejichž znaky jsou v barvě těla a nikoli černé, avšak světlý úhoří pruh jsem identifikovala i u klisny genotypu plavka. Plavky by ale neměly mít barvu znaků ovlivněnou zředěním, jak uvádí IMSLAND *et al.* (2016) a THIRUVENKADAN *et al.* (2008).

Tabulka 21 Výskyt a intenzita úhořího pruhu

Úhoří pruh	Počet jedinců	%
Není přítomný	6	6,3
Světlý a úzký	3	3,1
Světlý a středně široký	2	2,1
Světlý a široký	1	1
Tmavý a úzký	17	17,7
Tmavý a středně široký	26	27,1
Tmavý a široký	4	4,2
Nelze vidět	18	18,8
Pouze tmavá oblast	4	4,2
Málo znatelný	15	15,6
Σ	96	100

Zebrování končetin není v populaci huculských klisen významně zastoupeno, jak můžeme vidět i v tabulce č. 22, kdy pouze 31,5 % klisen nese alespoň nějaký projev. 42,1 % klisen tento znak dokonce nemá a u 26,3 % není možné určit vzhledem k celkovému tmavému zbarvení či vysoko černě zbarveným končetinám.

Tabulka 22 Výskyt a intenzita zebrování končetin

Zebrování končetin	Počet jedinců	%
Není přítomno	40	42,1
Slabé	16	16,8
Středně výrazné	8	8,4
Výrazné	6	6,3
Nelze vidět	25	26,3
Σ	96	100

Problematice oslího kříže se věnuje tabulka č. 23 a je vidět, že se jedná opět o méně zastoupený znak. Kdy téměř 20 % klisen není možné určit vzhledem k tmavé barvě a 27,1 % oslí kříž nemá. Klisny, které oslí kříž mají, vykazují spíše vyšší frekvenci menších a neohraničených variant (13,5 % světlých a malých, 14,6 % tmavých a středních úhořích pruhů). Některé nadefinované varianty se neobjevily vůbec.

Tabulka 23 Výskyt a intenzita oslího kříže

Oslí kříž	Počet jedinců	%
Není přítomný	26	27,1
Světlý, neohraničený, malý	13	13,5
Světlý, neohraničený, střední velikosti	7	7,3
Světlý, neohraničený, velký		
Světlý, ohraničený, malý	2	2,1
Světlý, ohraničený, střední velikosti		
Světlý, ohraničený, velký		
Tmavý, neohraničený, malý	7	7,3
Tmavý, neohraničený, střední velikosti	14	14,6
Tmavý, neohraničený, velký	4	4,2
Tmavý, ohraničený, malý	2	2,1
Tmavý, ohraničený, střední velikosti	2	2,1
Tmavý, ohraničený, velký		
Nelze vidět	19	19,8
Σ	96	100

Žihání hřívý a ocasu je také uváděno jako primitivní znak, podle výsledků (tabulka č. 24) se ale jedná o velmi málo zastoupený s celkovým výskytem na hřívě i ocasu v 32,3 % případů. Více než polovina klisen (54,2 %) nevykazovala žihání hřívý ani ocasu. Výrazné žihání hřívý i ocasu bylo zejména u plaváků.

Tabulka 24 Výskyt a intenzita žihání hřívý a ocasu

Žihání hřívý a ocasu	Počet jedinců	%
Není přítomno	52	54,2
Pouze hřívá	9	9,4
Pouze ocas	4	4,2
Hřívá i ocas	25	26
Výrazně hřívá i ocas	6	6,3
Σ	96	100

Míra zbarvení končetin není popisována jako znak primitivní, avšak je zajímavá z důvodů možné souvislosti se zbarvením základním. Předpokládá se, že by se tedy mohlo jednat o vhodného kandidáta k upřesnění identifikace zbarvení při zápisu klisen do plemenné knihy. V tabulce č. 25 vidíme poměrně velké (40,6 %) zastoupení klisen s větší částí končetin zbarvených. Klisny, u kterých nebylo možné pozorovat přechod zbarvení u končetin a těla jsou pouze dvě a předpokládá se, že vzhledem k výrazně tmavému zbarvení těla již není rozdíl v těchto barvách. Střední zbarvení končetin bylo pozorováno ve 33,3 % případů a zbarvení menší zastoupené v 10,4 % případů.

Tabulka 25 Míra zbarvení končetin

Míra zbarvení končetin	Počet jedinců	%
Ne	5	5,2
Velmi málo	8	8,3
Málo	10	10,4
Středně	32	33,3
Velmi	39	40,6
Nelze vidět	2	2,1
Σ	96	100

Intenzita zbarvení končetin je uvedena v tabulce č. 26. V barvě těla a světlejší byly, ve většině případů, končetiny ryzek. Velké množství klisen (68,8 %) mělo končetiny výrazně zbarvené a dalších 19,8 % tmavěji zbarvené než tělo.

Tabulka 26 Intenzita zbarvení končetin

Intenzita zbarvení končetin	Počet jedinců	%
Světlejší než tělo	1	1
Barva těla	10	10,4
Tmavší než tělo	19	19,8
Výrazně tmavší než tělo	66	68,8
Σ	96	100

5.7 SOUVISLOST GENOTYPU *DUN* A INTENZITY PRIMITIVNÍCH ZNAKŮ

Všechny kategorie primitivních znaků byly hodnoceny na souboru 96 klisen otestovaných také pro gen *TBX3*.

5.7.1 PRIMITIVNÍ ZNAKY

Z analýzy těchto dat vychází vysoká průkaznost ($P = 0,0001$) a zároveň Cramerův koeficient udává středně silnou závislost mezi daty ($V = 0,3674$).

Nevyskytující se primitivní znaky byly nejčastější u genotypu d^1d^2 (11,5 %) a d^2d^2 (6,25 %) z celkového počtu 24 % klisen. Případy, které nebylo možné identifikovat byly zastoupeny z 21 % a z toho 12,5 % ve spojitosti s genotypem d^1d^2 a 7,3 % s genotypem d^2d^2 . Slabý projev znaků byl korelován ke genotypu d^1d^2 (11,5 %), Dd^1 (8,3 %) a Dd^2 (7,3 %) z 33,3 % klisen s tímto projevem. Středně silný projev byl u 12,5 % klisen zejména o genotypu Dd^2 (5,2 %). Vztah mezi silnými znaky a genotypem Dd^1 (3,1 %) a Dd^2 (3,1 %) ze 7,3 % případů. V souvislosti s alelou D byly primitivní znaky vždy vidět, naopak zejména genotyp d^2d^2 je často spojován s neidentifikovanými a nevyskytujícími se znaky.

5.7.2 ÚHOŘÍ PRUH

Hladina průkaznosti byla u tohoto znaku opět vysoká spolu v kombinaci s koeficientem $V = 0,4503$ se jednalo o středně silnou závislost zkoumaných veličin.

Z kontingenční tabulky vyšly tyto vztahy. Pokud se v genotypu vyskytovala alespoň jedna alela D byl v závažné většině případů spojen s výskytem tmavého úhořího pruhu Dd^1 (15,6 %) a Dd^2 (14,6 %). Genotyp d^2d^2 je zejména spojen s fenotypem bez úhořího pruhu (4,2 %) a kde není úhoří pruh vidět (6,25 %). U genotypu d^1d^2 je opět případ, kdy není úhoří pruh vidět (10,4 %), kdy je jen málo znatelný (11,5 %) a pouze tmavší zbarvení v oblasti úhořího pruhu (4,2 %). Tmavý úhoří pruh se vyskytoval v 5,2 % u genotypu d^1d^1 . Z toho můžeme vyvodit určitou závislost mezi alelou d^1 a výskytem primitivních znaků i bez přítomnosti alely D . Zároveň alela d^2 neprojevuje vyšší míru vztahu s primitivními znaky. Tento závěr uvádí také IMSLAND *et al.* (2016), která ale alelu d^2 nepropojuje s primitivními znaky vůbec. Uvádí popis koně, který je genotypově $E-aad^1d^1$ jako vraníka s primitivními znaky, koně $E-aad^2d^2$ jako vraníka bez primitivních znaků a koně $E-aaD$ - šedého plaváka.

5.7.3 ZEBROVÁNÍ KONČETIN

Tento znak byl vysoce průkazný ($P < 0,0001$) s hodnotou Cramerova koeficientu $V = 0,3721$, což značí středně silnou závislost mezi daty.

Genotyp d^1d^1 s celkovým výskytem 8,4 % byl nejčastěji spojován s variantou bez výskytu zebrování (4,2 %). Častý genotyp d^1d^2 (35,8 %) byl v 17,9 % spojován s nepřítomností a v 15,6 % s případem, kdy tento znak nebylo možné určit vzhledem k tmavé barvě klisny. Genotypy obsahující dominantní alelu D byly častěji spojovány s výskytem tohoto znaku. Genotyp Dd^1 celkově 19 %, a nejčastěji v 6,3 % se slabým a ve stejném procentu případů s nevyskytující se zebrováním. Genotyp Dd^2 celkově 20 % případů a z toho 6,3 % se středně silným, 5,3 % slabým a 5,3 % bez přítomnosti zebrování končetin. Zebrování se vyskytuje převážně v souvislosti s dominantní alelou D .

5.7.4 OSLÍ KRÍŽ

Data tohoto znaku byla průkazná ($P = 0,0379$) s hodnotou $V = 0,3629$, tedy opět střední závislost mezi daty proměnnými.

U tohoto znaku je také vidět určitá souvislost mezi alelami a intenzitou projevu znaku. Obecně lze říci, že dominantní alela D je spojována s výskytem oslího kříže, alela d^1 a d^2 se vyskytuje spíše v souvislosti s nepřítomností oslího kříže, nebo případem, kdy nelze identifikovat, zda ho kuň nese či ne. Genotyp d^2d^2 je spojen v 7,3 % případů s fenotypem bez oslího kříže a v 6,3 % s neidentifikovaným fenotypem. Genotyp d^1d^2 v 11,5 % případů je spojován s neidentifikovaným fenotypem, v 10,4 % s nevyskytujícím se znakem a shodně po 4,2 % menší a střední světlý oslí kříž. Genotyp d^1d^1 s 4,2 % u tmavého středně velkého oslího kříže. Nakonec genotyp Dd^1 s 11,4 % výskytem s tmavým znakem, v 5,2 % případů bez znaku a genotyp Dd^2 většinou se znakem a v 4,2 % případů bez znaku.

5.7.5 ŽÍHÁNÍ HŘÍVY A OCASU

Žíhání hřívky a ocasu není tak často popisovaný primitivní znak. U některých plaváků ho ale můžeme pozorovat v dobré intenzitě. Analýza vyhodnotila vysokou průkaznost ($P = 0,0014$) a Cramerův koeficient ($V = 0,3390$), středně silná závislost.

Znak vykazuje určitou souvislost mezi genotypem v genu *Dun* a intenzitou a mírou žíhání. Zejména genotypy s dominantní alelou D jsou spojovány s výskytem žíhání v hřívě a ocasu. Genotyp Dd^1 má v 10,4 % žíhaný ocas i hřívku, genotyp Dd^2 bez žíhání (8,3 %) a s žíháním ocasu i hřívky (5,2 %). Genotyp d^1d^1 byl v 7,3 % případů bez žíhání. Genotypy d^1d^2 a d^2d^2 jsou spojeny zejména s fenotypem bez žíhání 25 % a 10,4 % po řadě.

5.7.6 MÍRA A INTENZITA ZBARVENÍ KONČETIN

Tyto znaky byly neprůkazné, a to s hodnotami $P = 0,4460$ pro míru zbarvení a $P = 0,9406$ pro intenzitu zbarvení. Hodnoty poukazují na to, že velká část variability není statistikou vysvětlena. Míra a intenzita zbarvení končetin tedy pravděpodobně nemá s genotypem v genu *Dun* žádnou souvislost.

5.8 SOUVISLOST GENOTYPŮ *MC1R*, *ASIP* SE ZBARVENÍM KONČETIN

Na základě předešlých negativních testů, zda je v souvislosti míra a intenzita zbarvení končetin s genotypem v genu *Dun*. Což se dalo očekávat, jelikož tyto proměnné nepatří do skupiny primitivních znaků. Jsme dále otestovali vazbu toho znaku ke genotypům v genech *MC1R* a *ASIP*. Bylo vycházeno z RIEDER *et al.* (2001), který spojil varianty genotypu s odstíny hnědé. Genotyp *Ee* byl spojován se světleji zbarvenými a genotyp *EE* s tmavěji zbarvenými koňmi ($P < 0,01$). U genu *ASIP* tento trend v rámci porovnání genotypů *AA* a *Aa* neprokázal.

5.8.1 MÍRA ZBARVENÍ KONČETIN

Souvislost s genem *Dun* nebyla prokázána, avšak ve spojitosti s geny *MC1R* a *ASIP* již vychází vysoce statistická průkaznost ($P < 0,0001$) a Cramerův koeficient s hodnotou 0,5285, což je středně silná závislost pozorovaných dat.

Genotypy založené na heterozygotovi *Aa*, vyjma kombinace s recesivním homozygotem *ee*, vykazují vyšší míru zbarvení končetin, a to ve variantě středně a hodně zbarvených končetin. Genotyp *AaEE* je v souvislosti s 12,5 % hodně zbarvenými a 4,2 % středně zbarvenými končetinami. Genotyp *AaEe* pak s 10,4 % hodně a s 8,3 % středně zbarvenými končetinami. Genotypy s dominantním homozygotem *AA* mají tendenci spíše ke středně, velmi málo a částečně i hodně zbarveným končetinám. Genotyp *AAEE* je v souvislosti s 5,2 % středně a s 4,2 % hodně zbarvenými končetinami a genotyp *AAEe* odpovídá s 8,3 % středně a s 5,2 % velmi málo zbarvenými končetinami. Ryzky, tedy genotyp *Aaee* a *AAee*, měly ve všech případech končetiny tmavě nezbarvené. Vranky prokazovaly středně a hodně zbarvené končetiny a ty s genotypem *Ee* navíc častěji neměly identifikovatelnou míru zbarvení vzhledem k tmavé barvě těla. Genotyp *aaEE* je ve spojitosti s 8,3 % hodně a s 4,2 % středně zbarvenými končetinami.

5.8.2 INTENZITA ZBARVENÍ KONČETIN

Intenzita zbarvení byla také testována a vyhodnocena jako vysoce průkazná ($P < 0,0001$) s koeficientem $V = 0,5163$.

Intenzita zbarvení byla nejvíce zastoupena variantou výrazných a tmavěji zbarvených končetin. Kromě ryzek, které měly končetiny barvy těla nebo světlejší.

6 ZÁVĚR

Vzorek 118 testovaných klisen je, jednoduše řečeno, čtvrtina celkové populace v ČR a v rámci GZ, se jedná o výraznou většinu jedinců. Výsledky jsou tedy poměrně dobře a s vyšší jistotou aplikovatelné na celou populaci. Klisny byly testovány pro geny *MC1R* a *ASIP* a v rámci tohoto výběru pak 96 klisen i pro gen *TBX3*.

Genetická analýza prokázala rovnovážný stav u všech alel (HW pro *ASIP* $P = 0,0,9360$; pro *MC1R* $P = 0,1661$ a pro *TBX3* $P = 0,4434$). Frekvence alel byla následující, řazeno sestupně: *E* (0,6780), *A* (0,5254), *a* (0,4746), d^2 (0,4323), d^1 (0,3542), *e* (0,3220) a *D* (0,2135). Nejčastějším genotypem byl *AaEed¹d²* a *AaEE¹d²*. V populaci byly velmi málo, nebo zcela chyběly genotypy na základě recesivních homozygotů v základních genech, také jsme neidentifikovali žádného *AaEed¹d¹*.

Analýza závislostí mezi genem *dun* a primitivními znaky potvrdila tvrzení jiných autorů, že alela *D* je vždy spojována s výskytem primitivních znaků, avšak primitivní znaky se vyskytují i bez alely *D* v souvislosti s alelou d^1 . Genotyp d^2d^2 je pro změnu často spojován s fenotypem bez primitivních znaků nebo u kterého nelze určit, zda jedinec tyto znaky nese nebo ne. 25 % klisen bylo bez primitivních znaků (vyjma úhořího pruhu, ten se neobjevil v 6,3 % případů). Tento fenomén nevyskytujících se primitivních znaků by se měl dála analyzovat, aby bylo jisté, zda nedochází ke ztrátě těchto charakteristických znaků. Zatím však stále 53,1 % klisen znaky nese a ve 21,9 % případů jsme nebyli schopni identifikovat, zda jsou primitivní znaky přítomny či ne.

V rámci analyzované populace není průkazný rozdíl v barevné frekvenci mezi liniemi, lze tedy s určitou nadsázkou říci, že je zde uniformita v rámci tradičních českých linií (goral, gurgul a oušor).

Porovnáním určených zbarvení v PP a zbarvení detekované v rámci genetické analýzy jsme zjistili, že ačkoli data globálně odpovídají a není mezi nimi průkazný rozdíl, při detailnější analýze nalezneme výrazné pochybení v určení zejména plavek a vranek. Plavky jsou ve velké míře popisovány jako hnědky a vranky jako tmavé hnědky, černé hnědky a tmavě šedé plavky. Tento rozdíl je až do takové míry, že dle původových dat byl náš vzorek ze 70,8 % složen z hnědých klisen a z genotypu

určených zbarvení pak již jen z 42,7 %. Podobná situace je i u vranek, kdy dle PP jich je 2,1 % a dle genotypu 12,5 %.

V rámci prevence bych doporučovala brát na vědomí, že vranky a plavky jsou v populaci poměrně běžné a je tak velká pravděpodobnost, že popisovaný jedinec, u kterého si nejsme jistí zbarvením, bude právě tento případ. Obecně lze říci, že jakmile u popisovaného jedince nejsme schopni rozeznat primitivní znaky, zejména úhoří pruh, končetiny jsou také výrazně zbarvené, a přesto vykazuje světlejší odstín černé, než jsme zvyklí u jiných plemen, bude to pravděpodobně vraník.

Výsledky genetické analýzy a odvození správného zbarvení bude nabídnuto ACHHK z.s. jako možnost upřesnění zbarvení u chybně popsanych klisen. Při dalším postupu bych doporučovala zaměřit se na problematiku zbarvení a například pomocí spektrofotometrie provést měření a pokusit se detailněji určit hraniční odstíny a omezit tak chybovost při popisu huculů. Samozřejmě by problematiku také ulehčily genetické analýzy, nejsem si však jistá, zda by to bylo finančně reálné, stejnou obavu vyslovil i PAWELEC *et al.*, (2014). Plošné genotypování by také mohlo mít za následek snahu chovatelů vybírat jimi preferované plemeníky v rámci zbarvení a genotypu, tak aby zvýšili šanci na hříbě chtěného zbarvení. Tím by se zvyšovala hrozba nerespektování příbuznosti a diverzity populace.

Doporučuji frekvenci zbarvení a alel dále sledovat a mít tak k dispozici další faktor určující změny v populaci. Případně na základě dalších dat zkompletovat metodiku určování zbarvení speciálně pro huculské plemeno.

7 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

- 1 ABITBOL M., LEGRAND R., TIRET L. (2015): *A missense mutation in the agouti signaling protein gene (ASIP) is associated with the no light points coat phenotype in donkeys*. Genetics Selection Evolution. BioMed Central, 47(28). DOI: 10.1186/s12711-015-0112-x.
- 2 ADEFENWA M.A., PETERS S.O., AGAVIEZOR B.O. et al. (2013): *Identification of single nucleotide polymorphisms in the agouti signaling protein (ASIP) gene in some goat breeds in tropical and temperate climates*. Mol Biol Rep. Springer Science, (40), 4447-4457. DOI: 10.1007/s11033-013-2535-1.
- 3 BARSH G.S. (2001): *Coat Color Mutations, Animals*. Academic Press. Stanford: School of Medicine, Beckman Center. DOI: 10.1006/rwgn.2001.0234.
- 4 BOWLING Ann T. (1996): *Horse Genetics*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 200 s, ISBN: 9780851991016-0851991017.
- 5 BOWLING Ann T., RUVINSKY A. (2000): *The Genetics of the Horse*. CAB International, Wallingford, United Kingdom, 512 s., ISBN: 9780851999258.
- 6 BROOKS S.A., TERRY R.B., BAILEY E. (2002): *A PCR-RFLP for KIT associated with tobiano spotting pattern in horses*. Animal Genetics, 33, 301-303, ISSN: 2078-6344.
- 7 BRUNBERG E., ANDERSSON L., COTHRAN G., SANDBERG K., MIKKO S., LINDGREN G. (2006): *A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse*. BMC Genetics, 10 str., DOI: 10.1186/1471-2156-7-46.
- 8 BRZESKI E., JACKOWSKI M. (1998): *A model of the Hucul Horse*. In: STACHURSKA A., BRODACKI A., GRABOWSKA J. (2012): *Allele frequency in loci which control coat colours in Hucul horse population*. Czech Journal of Animal Science, 57, 178-186, ISSN: 1212-1819.
- 9 CIESLAK, M., REISSMANN, M., HOFREITER, M., LUDWIG, A. (2011): *Colours of domestication*. Biological Reviews, 86 (4), 885-899. DOI: 10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x

- 10 ENSEMBLE.ORG (2016a): *Gene ASIP* [online]. EMBL-EBI, 2016 [cit. 2017-03-19].
Dostupné z: http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Gene/Summary?db=core;g=ENSECAG00000004241;r=22:25167080-25171074;t=ENSECAT00000004772
- 11 ENSEMBLE.ORG (2016b): *Gene MC1R* [online]. EMBL-EBI, 2016 [cit. 2017-03-19].
Dostupné z: http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Gene/Summary?db=core;g=ENSECAG00000000900;r=3:36259276-36260354;t=ENSECAT00000000742
- 12 ENSEMBLE.ORG (2016c): *Gene TYRP1* [online]. EMBL-EBI, 2016 [cit. 2017-03-19].
Dostupné z: http://www.ensembl.org/Equus_caballus/Gene/Summary?db=core;g=ENSECAG00000009440;r=23:33025969-33067513;t=ENSECAT00000010239
- 13 HAASE B., JUDE R., BROOKS S.A., LEEB T. (2008): *An equine chromosome 3 inversion is associated with the tobiano spotting pattern in German horse breeds*. *Animal Genetics*, 39, 306–309, ISSN: 2078-6344.
- 14 HACKL E. (1938): *The Mountain-Tarpan of the Waldkarpaten Called Hucul*. In: STACHURSKA A., BRODACKI A., GRABOWSKA J. (2012): *Allele frequency in loci which control coat colours in Hucul horse population*. *Czech Journal of Animal Science*, 57, 178-186, ISSN: 1212-1819.
- 15 HAUSWIRTH R., HAASE B., BATTER M., BROOKS S.A., BURGER D., DROGEMULLER C., GERBER V., HENKE D., JANDA J., JUDE R., MAGDESIAN K.G., MATTHEWS J.M., PONCET P.A., SVANSSON V., TOZAKI T., WILKINSON-WHITE L., PENEDO M.C., RIEDER S., LEEB T. (2012): *Mutations in MITF and PAX3 cause „splashed white“ and other white spotting phenotypes in horses*. *PLoS Genetics*, 8, e1002653.
- 16 HORECKÁ E. (2013): *Polymorfismus genu MATP ve vztahu ke zbarvení u koní*. Brno, Diplomová práce. Mendelova univerzita v Brně. Vedoucí práce: prof. RNDr. Aleš Knoll, Ph.D.
- 17 HORSTADIUS S. (1950): *The Neural Crest: Its Properties and Derivatives in the Light of Experimental Research*. In: THIRUVENKADAN A.K., KANDASAMY N., PANNEERSELVAM S. (2008): *Coat colour inheritance in horses*. *Livestock Science*, 117, 109-129, DOI: 10.1016/j.livsci.2008.05.008.

- 18 HUIRONG M., REN J., DING N., XIAO S. a HUANG L. (2010): *Genetic variation within coat color genes of MC1R and ASIP in Chinese brownish red Tibetan pigs*. *Animal Science Journal*, (81), 630-634. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2010.00789.x.
- 19 CHOWDHARY B.P. (2013): *Equine genomics*. New Delhi, India: Aptara Inc., 324 s., ISBN 978-0-8138-1563-3.
- 20 IMSLAND F. (2015): *Monogenic traits associated with structural variants in chicken and horse: allelic and phenotypic diversity of visually appealing traits*. Uppsala, Dizertační práce. Uppsala Universitet, Faculty of Medicine.
- 21 IMSLAND F., MCGOWAN K., RUBIN C., HENEGAR C., SUNDSTRÖM E., BERGLUND J., SCHWOCHOW D., GUSTAFSON U., IMSLAND P., LINDBLAD-TOH K., LINDGREN G., MIKKO S., MILLON L., WADE C., SCHUBERT M., ORLANDO L., PENEDO M.C.T., BARSH G.S., ANDERSSON L. (2016): *Regulatory mutations in TBX3 disrupt asymmetric hair pigmentation that underlies Dun camouflage color in horses*. *Nature Genetics*, 48(2), 152-158. DOI: 10.1038/ng.3475.
- 22 JACOBS L.N., STAIGER E.A., ALBRIGHT J.D., BROOKS S.A. (2016): *The MC1R and ASIP Coat Color Loci May Impact Behavior in the Horse*. *Journal of Heredity*, 214-219, DOI: 10.1093/jhered/esw007.
- 23 KIJAS J.M., MOLLER M., PLASTOW G., ANDERSSON L. (2001): *A frameshift mutation in MC1R and a high frequency of somatic reversions cause black spotting in pigs*. *Genetics*, (158) 2, 779-785, ISSN: 1943-2631.
- 24 LI, B., HE, X.-L., ZHAO, Y.-P., ZHAO, Q.-N., UNIERHU, BAI, D.-Y., MANGLAI, D. (2014): *Tyrosinase-related protein 1 (TYRP1) gene polymorphism and skin differential expression related to coat color in Mongolian horse*. *Livestock Science*, 167 (1), 58-64. DOI: 10.1016/j.livsci.2014.06.003
- 25 LUDWIG A., PRUVOST M., REISSMANN M., BENECKE N., BROCKMANN G.A., CASTAÑOS P., CIESLAK M., LIPPOLD S., LLORENTE L., MALASPINAS A., SLATKIN M. a HOFREITER M. (2009): *Coat Color Variation at the Beginning of Horse Domestication*. *Science*, (324), DOI:10.1126/science.1172750

- 26 MARKLUND L., MOLLER M.J., SANDBERG K., ANDERSSON L. (1996): *A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses*. *Mammalian Genome*, 7, 895–899, ISSN: 1432-1777.
- 27 MCROBIE H., THOMAS A., KELLY J. (2009): *The Genetic Basis of Melanism in the Gray Squirrel (Sciurus carolinensis)*. *Journal of Heredity*, 100(6), 709-714. DOI: 10.1093/jhered/esp059.
- 28 JELÍNEK J. (2017): *Metodika uchovávání a konzervace GZ na léta 2017 až 2021 HUCULSKÝ KŮŇ*. In: Zpravodaj HUCUL, 21(2), ACHHK z.s., Pardubice.
- 29 MOYER F.H. (1960): *Some effects of pigment mutations on the fine structure of mouse melanin granules*. In: THIRUVENKADAN A.K., KANDASAMY N., PANNEERSELVAM S. (2008): *Coat colour inheritance in horses*. *Livestock Science*, 117, 109-129, DOI: 10.1016/j.livsci.2008.05.008.
- 30 NIČOVÁ K. (2015): *Vývoj a vliv zbarvení srsti a chlupových vírů na chování koní*. Praha, Bakalářská práce. Česká zemědělská univerzita v Praze. Vedoucí práce: Ing. Jitka Bartošová, Ph.D.
- 31 PAWELEC A., JASTRZEBSKA E., MYER D. (2014): *Errors in identifying coat colours in horses: the scale of the problem*. *Polish journal of nat. Sciences*, 29(2), 129-135.
- 32 RADVAN J.: *Historie chovu huculského koně v českých zemích*. [online]. 2001 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.hucul.net/knihy/>
- 33 RADVAN J.: *Podmínky chovu huculského koně v Karpatech*. [online]. 2002 [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://www.hucul.net/knihy/>
- 34 RIEDER S., TAOURIT S., MARIAT D., LANGLOIS B., GUERIN G. (2001): *Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (Equus caballus)*. *Mammalian Genome*, 12, 450–455, DOI: 10.1007/s003350020017.
- 35 RIEDER S. 2009: *Molecular tests for coat colours in horses*. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126, 415–424, ISSN: 1439- 0388.
- 36 SEARLE A.G. (1968): *Comparative Genetics of Coat Colour in Mammals*. In: THIRUVENKADAN A.K., KANDASAMY N., PANNEERSELVAM S. (2008): *Coat colour*

- inheritance in horses*. *Livestock Science*, 117, 109-129, DOI: 10.1016/j.livsci.2008.05.008.
- 37 SCHMUTZ S.M., DREGER D.L. (2012): *Interaction of MC1R and PMEL alleles on solid coat colors in Highland cattle*. *Animal Genetics*, 44, 9-13. DOI: 10.1111/j.1365-2052.2012.02361.x.
- 38 SPONENBERG D.P. (1996): *Equine Coat Color Genetics*. In: THIRUVENKADAN A.K., KANDASAMY N., PANNEERSELVAM S. (2008): *Coat colour inheritance in horses*. *Livestock Science*, 117, 109-129, DOI: 10.1016/j.livsci.2008.05.008.
- 39 SPONENBERG D.P. (1997): *Genetics of colour and hair texture*. In: THIRUVENKADAN A.K., KANDASAMY N., PANNEERSELVAM S. (2008): *Coat colour inheritance in horses*. *Livestock Science*, 117, 109-129, DOI: 10.1016/j.livsci.2008.05.008.
- 40 SPONENBERG D.P., WEISE M.C. (1997): *Dominant black in horses*. *Genetics Selection Evolution*, (29), 403-408, DOI: 10.1051/gse:19970308.
- 41 SPONENBERG D.P. (2009): *Equine Color Genetics*. Wiley-Black-well, Ames, USA, 296 s., ISBN: 978-0-8138-1364-6.
- 42 STACHURSKA A., PIETA M., JAWORSKI Z., USSING A.P., BRUŚNIAK A., FLOREK M. (2004): *Colour variation in blue dun Polish Konik and Bilgoraj horses*. *Livestock Production Science*, 90, 201-209, DOI: 10.1016/j.livprodsci.2004.04.002.
- 43 STACHURSKA A., BRODACKI A., GRABOWSKA J. (2012): *Allele frequency in loci which control coat colours in Hucul horse population*. *Czech Journal of Animal Science*, 57, 178-186, ISSN: 1212-1819.
- 44 STACHURSKA A., JANSEN P. (2015): *Crypto-tobiano horses in Hucul breed*. *Czech Journal of Animal Science*, 60, 1-9, DOI: 10.17221/7905-CJAS.
- 45 STEFANIUK-SZMUKIER M., ROPKA-MOLIK K., PIÓRKOWSKA K., SZMATOLA T., DŁUGOSZ B., PISARCZYK W., BUGNO-PONIEWIERSKA M. (2017): *Variation in TBX3 Gene Region in Dun Coat Color Polish Konik Horses*. *Journal of Equine Veterinary Science*, 49, 60-62. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.10.003>.
- 46 SUNG-SOO L., YOUNG-HOON Y., IN-CHEOL Ch., NAM-YOUNG K., MOON-SUCK K., HA-YEON J., SANG-HYUN H. (2009): *Relation of expression levels of melanin*

- synthesis genes according to the MC1R genotypes with the coat color patterns in Hanwoo, Jeju black cattle and Holstein.* Journal of Life Science, 19(3), 384-389. ISSN 1225-9918.
- 47 SWITONSKI M., MANKOWSKA M., SALAMON S. (2013): *Family of melanocortin receptor (MCR) genes in mammals-mutations, polymorphisms and phenotypic effects.* Journal of Apply Genetics, (54), 461-472, DOI 10.1007/s13353-013-0163-z.
- 48 *Šlechtitelský program* (2009) [online]. Asociace chovatelů huculského koně (ACHHK), Pardubice, [cit. 2017-03-19]. Dostupné z: <http://hucul-achhk.cz/program.html>
- 49 THIRUVENKADAN A.K., KANDASAMY N., PANNEERSELVAM S. (2008): *Coat colour inheritance in horses.* Livestock Science, 117, 109-129, DOI: 10.1016/j.livsci.2008.05.008.
- 50 TOTH Z., KAPS M., SÖLKNER J., BODO I., CURIK I. (2014): *Quantitative genetic aspects of coat color in horses.* Journal of Animal Science, 2623-2628. DOI: 10.2527/jas.2005-704.
- 51 URBAN T. (2001): *Vazba genů a rekombinace.* In: Virtuální svět genetiky 1 [online]. Brno, [cit. 2017-04-15]. Dostupné z: http://user.mendelu.cz/urban/vsg1/mendel/klas_vazba1.html#
- 52 VRTKOVÁ I. (2017): *Metodika analýzy genu TBX3.* Laboratoř agrogenomiky MENDELU, Brno.
- 53 WAGNER H.J., REISSMANN M. (2000): *New polymorphism detected in the horse MC1R gene.* Animal Genetics, 31, 289–290, ISSN: 2078-6344.
- 54 XIAOQIAN W., YI Z., LINYUAN S., JINGJING D., JIA L., CHENDONG L., QIANG P., RUNLIN Y., XUEWEI L., LIN B., GUONQING T., SHUNHUA Z., LI Z. (2016): *A 6-bp deletion in exon 8 and two mutations in introns of TYRP1 are associated with blond coat color in Liangshan pigs.* Gene, 578, 132-136. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.011>.
- 55 *Zpravodaj HUCUL, Ročenka 2016* (2017): Asociace chovatelů huculských koní z.s., 21(1), Pardubice.

8 SEZNAM TABULEK

!Tabulka 1	Shrnutí fenotypů a genotypů zbarvení (Ničová, 2015; Imsland, 2016).....	22
Tabulka 2	Struktura klisen dle linie.....	33
Tabulka 3	Struktura klisen dle barvy zapsané v PP.....	33
Tabulka 4	Primery pro geny MC1R a ASIP (Horecká, 2013)	37
Tabulka 5	Složení PCR MasterMixu v množství na jeden vzorek	37
Tabulka 6	Teplotní profil PCR reakce (Horecká, 2013).....	37
Tabulka 7	Složení RFLP MasterMixu v množství na jeden vzorek	38
Tabulka 8	Délka fragmentů a příslušnost k alelám a genům (Horecká, 2013).....	39
Tabulka 9	Sekvence primerů pro analýzu SNP v genu TBX3 (Vrtková, 2017).....	40
Tabulka 10	Struktura zbarvení dle genotypu v porovnání se strukturou dle PP	43
Tabulka 11	Vztah genotypu a fenotypu	44
Tabulka 12	Chybná určení zbarvení odstraněná ze souboru pro statistické zpracování	45
Tabulka 13	Frekvence genotypů genu ASIP	46
Tabulka 14	Frekvence genotypů genu MC1R.....	47
Tabulka 15	Frekvence genotypů genu TBX3.....	48
Tabulka 16	Kontingenční tabulka vztahu genotypů pro geny ASIP a MC1R	49
Tabulka 17	Kontingenční tabulka vztahu genotypů v MC1R a TBX3 ke genotypu AA.....	50
Tabulka 18	Kontingenční tabulka vztahu genotypů v MC1R a TBX3 ke genotypu Aa.....	50
Tabulka 19	Kontingenční tabulka vztahu genotypů v MC1R a TBX3 ke genotypu aa.....	50
Tabulka 20	Výskyt primitivních znaků při pohledu z boku koně	51
Tabulka 21	Výskyt a intenzita úhořího pruhu	52
Tabulka 22	Výskyt a intenzita zebrování končetin.....	52
Tabulka 23	Výskyt a intenzita oslího kříže.....	53
Tabulka 24	Výskyt a intenzita žihání hřívky a ocasu	54
Tabulka 25	Míra zbarvení končetin.....	54
Tabulka 26	Intenzita zbarvení končetin.....	55

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1	Vranka genotypu aaEEd ¹ d ¹ (fotografie: archiv autorky)	15
Obrázek 2	Hnědka genotypu AAEE d ¹ d ¹ (fotografie: archiv autorky)	16
Obrázek 3	Ryzka genotypu Aaeed ¹ d ² (fotografie: archiv autorky).....	17
Obrázek 4	Plavák genotypu AaEeDd ¹ (fotografie: archiv autorky).....	18
Obrázek 5	Šedý plavák genotypu aaEeDd ² (fotografie: archiv autorky)	19
Obrázek 6	Kontrola izolace DNA z koňských žíní.....	41
Obrázek 7	Kontrola produktu po PCR (vzorek č. 8' je kontrola po RFLP)	42
Obrázek 8	Výsledek štěpení genů MC1R a ASIP (vzorek č. 7' je kontrola po PCR).....	42

10 PŘÍLOHY

Příloha 1 Chybně určené klisny a jejich genotypy

Barva dle PP	Barva dle genotypu	genotyp
tmavá plavka	vranka	$aaEed^1d^1$
tmavě šedá plavka	vranka	$aaEed^1d^2$
černá hnědka	vranka	$aaEEd^1d^1$
černá hnědka	vranka	$aaEed^1d^2$
černá hnědka	vranka	$aaEEd^1d^2$
černá hnědka	vranka	$aaEEd^2d^2$
černá hnědka	vranka	$aaEEd^2d^2$
tmavá hnědka	vranka	$aaEed^1d^2$
tmavá hnědka	vranka	$aaEEd^1d^2$
černá ryzka	vranka	$aaEed^1d^2$
tmavá plavka	hnědka	$AaEed^2d^2$
světlá hnědka	plavka	$AAEEDD$
světlá hnědka	plavka	$AAEEdD^2$
světlá hnědka	plavka	$AAEEdD^2$
hnědka	plavka	$AaEeDd^1$
hnědka	plavka	$AAEeDd^1$
hnědka	plavka	$AaEeDd^1$
hnědka	plavka	$AAEeDd^1$
hnědka	plavka	$AaEeDd^1$
hnědka	plavka	$AAEeDd^1$
hnědka	plavka	$AaEEDd^1$
hnědka	plavka	$AaEeDd^1$
hnědka	plavka	$AAEEDd^2$
hnědka	plavka	$AaEEDd^2$
hnědka	plavka	$AAEeDd^2$
hnědka	plavka	$AaEeDd^2$
hnědka	plavka	$AaEeDd^2$
hnědka	plavka	$AaEeDd^2$
hnědka	plavka	$AaEeDd^2$
tmavá hnědka	plavka	$AaEEDd^1$
tmavá hnědka	plavka	$AaEeDd^2$
černá hnědka	šedá plavka	$aaEEDd^2$
Σ	32	