

# GENETIC DIVERSITY BETWEEN ICELANDIC HORSE AND CZECH WARMBLOODED HORSE

## GENETICKÁ DIVERZITA MEZI PLEMENY ISLANDSKÝ KŮŇ A ČESKÝ TEPLOKREVNÍK

**Déduchová V., Urban T., Dvořák J.**

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: caraya@seznam.cz, urban@mendelu.cz ,dvorakJ@mendelu.cz

---

### ABSTRACT

The aim of this work is to evaluate genetic diversity of two horse breeds-Islandic horse and Czech warmblooded horse. These two breeds were compared with use of 17 microsatellites used for routine parentage testing (AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, VHL20, HTG6, HMS2, HTG7, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, LEX3). Data material covered 224 animals, 87 individuals of Icelandic horse and 137 individuals of Czech warmblooded horse. For dendrogram we used another 6 breeds of horses. Data were analyzed using POPGENE version 1.31.

**Key words:** microsatellites, diversity, horses

### ABSTRAKT

Cílem práce je zhodnotit genetickou diverzitu mezi dvěma plemeny koní- Islandský kůň a Český teplokrevník. Byl použit panel 17 mikrosatelitů běžně využívaných pro ověření parentity u koní (AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, VHL20, HTG6, HMS2, HTG7, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, LEX3). Bylo analyzováno 87 Islandských koní a 137 Českých teplokrevníků. Pro dendrogram jsme použili dalších 6 plemen koní. Pro analýzu dat byl použit program POPGENE verze 1.31.

**Klíčová slova:** mikrosatelity, diverzita, koně

### ÚVOD

Islandský Kůň (IK) je jeden z nejvíce známých symbolů Islandu, byl sem dovezen asi před tisíci lety Vikingy. Toto starobylé plemeno se vyvíjelo v izolaci, bez křížení s dalšími plemeny a je tedy velmi vzdálené od ostatních evropských plemen. Naproti tomu Český teplokrevník(ČT) je stále se vyvíjející plemeno s otevřenou plemennou knihou, kde se uplatňuje

celá řada teplokrevných plemen a anglický plnokrevník. Je tedy předpoklad vysoké variability. Pro analýzu dat byl použit panel 17 mikrosatelitů pro určování parentity u koní (AHT4, AHT5, ASB2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG10, VHL20, HTG6, HMS2, HTG7, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, LEX3).

## **MATERIÁL A METODIKA**

Materiál byl získán z krve (88 vzorků Ika 58 vzorků ČT) a chlupových cibulek (80 vzorků ČT) žíní koní. Z krve byla genomová DNA izolována pomocí kitu JETQUICK® Blood&Cell culture DNA Spin Kit a pro izolaci z žíní byl použit JETQUICK® Tissue DNA Spin Kit.

### **Multiplex PCR**

Multiplexová PCR pomocí, které byla uskutečněna amplifikací všech MS sekvencí najednou, probíhala za použití termálního cykléru GeneAmp™ PCR.. Reakční mix o celkovém objemu 14 µl obsahoval 2,5 µl StockMarks PCR pufru, 4,0 µl dNTP mixu, 0,5 µl AmpliTaq Gold DNA polymerázy, 4,0 µl mixu primerů, 3,0 µl deionizované vody a 1 µl templátové DNA.

Podmínky cyklování: iniciační denaturace 95°C/10min; 30 cyklů (denaturace 95°C/30s, annealing 60°C/30s, elongace 72°C/60s); závěrečná elongace 72°C/60min.

### **Fragmentační analýza**

Vyhodnocení jednotlivých polymorfizmů bylo provedeno prostřednictvím fragmentační analýzy DNA v automatickém sekvenátoru ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer. 1 µl PCR produktu, 0,5 µl velikostního standardu bylo smícháno s 20 µl formamidu. Vzorky byly denaturovány při 95°C po dobu 2 min. a vloženy na led. Postupně docházelo k separaci PCR fragmentů kapilární elektroforézou v polyakrylamidovém gelu a laserovému skenování fluorescenčně značených DNA fragmentů. Určení genotypů v konkrétních MS proběhlo vyhodnocením velikostí DNA fragmentů softwarovými programy GeneScan® 3.7 NT a Genotyper® 3.7 NT

Byly vypočítány následující parametry diverzity: pozorovaná homozygotnost (P\_Hom); pozorovaná heterozygotnost (P\_Het); očekávaná homozygotnost (O\_Hom) a očekávaná heterozygotnost (O\_Het) podle Levene (1949); a očekávaná heterozygotnost (Nei) podle Nei (1973). Také byly stanoveny míry genetické vzdálenosti a identity Nei (1972) a sestaven dendrogram, Nei (1972). Byl použit program POPGENE version 1.31.

## **VÝSLEDKY**

Hodnoty heterozygotnosti a homozygotnosti byly spočítány pro všechny MS používané v panelu na určování rodičovství u obou plemen koní. V tabulce č. 1 jsou popsány hodnoty ukazatelů diverzity u plemene Islandský kůň. V ukazateli P\_Hom byly v rozmezí od 0,0986(ASB23) do 0,7284(LEX3). Nejnižší hodnoty pozorované homozygotnosti a zároveň

nejvyšší heterozygotnosti se vyskytovaly v lokusu ASB23, naopak nejvyšší hodnoty homozygotnosti a nejnižší heterozygotnosti se vyskytovaly v lokusu LEX3. Průměrná homozygotnost a heterozygotnost za všechny MS byla 0,3076 a 0,6924. Očekávané hodnoty sledovaných ukazatelů diverzity měly obdobnou výši. Pouze lokus LEX3 Vykazoval v očekávané homozygotnosti hodnoty podstatně nižší (O\_Hom =0.1553) a v očekávané heterozygotnosti podstatně vyšší (O\_Het =0,8447).

**Tab. 1 Míry genetické diverzity u Islandského koně.**

Lokus	n	P_Hom	P_Het	O_Hom*	O_Het*	Nei**
ATH4	164	0.2439	0.7561	0.2027	0.7973	0.7925
ATH5	172	0.3023	0.6977	0.2732	0.7268	0.7226
HMS1	158	0.3924	0.6076	0.3322	0.6678	0.6636
HMS2	156	0.3205	0.6795	0.3493	0.6507	0.6465
HMS3	102	0.1373	0.8627	0.2252	0.7748	0.7672
HMS6	164	0.3415	0.6585	0.3248	0.6752	0.6711
HMS7	166	0.3614	0.6386	0.4025	0.5975	0.5939
HTG4	170	0.2588	0.7412	0.2906	0.7094	0.7053
HTG6	174	0.5632	0.4368	0.5642	0.4358	0.4333
HTG7	158	0.5949	0.4051	0.5476	0.4524	0.4495
HTG10	146	0.1370	0.8630	0.2083	0.7917	0.7863
VHL20	174	0.1724	0.8276	0.1902	0.8098	0.8051
ASB2	158	0.1139	0.8861	0.1175	0.8825	0.8769
ASB17	170	0.2118	0.7882	0.2411	0.7589	0.7544
ASB23	142	0.0986	0.9014	0.1870	0.8130	0.8073
CA425	160	0.2500	0.7500	0.2257	0.7743	0.7695
LEX3	162	0.7284	0.2716	0.1553	0.8447	0.8395
průměr	159	0.3076	0.6924	0.2846	0.7154	0.7108
směrodat.odch.		0.1790	0.1790	0.1260	0.1260	0.1251

pozn: n: počet alel; P\_Hom: Pozorovaná homozygotnost; P\_Het: Pozorovaná heterozygotnost; O\_Hom: Očekávaná homozygotnost; O\_Het: Očekávaná heterozygotnost; \* Očekávaná homozygotnost a heterozygotnost byla vypočtena pomocí Levene(1949); \*\* Neiova (1973) očekávaná heterozygotnost

U Českého teplokrevníka (viz Tab. 2) byla nejnižší pozorovaná homozygotnost a nejvyšší pozorovaná heterozygotnost u MS HMS3 (0,1078 a 0,8922) a nejvyšší homozygotnost a nejnižší heterozygotnost u HMS1 (0,4889 a 0,5111). Průměrné hodnoty pozorované homozygotnosti byly 0,2598 a u heterozygotnosti 0,7402. Hodnoty očekávané homozygotnosti byly nejrozdílnější u MS LEX3, hodnoty se lišily o 0,1334.

**Tab. 2 Míry genetické diverzity u Českého teplokrevníka.**

Lokus	n	P_Hom	P_Het	O_Hom*	O_Het*	Nei**
ATH4	272	0.2721	0.7279	0.2677	0.7323	0.7296
ATH5	264	0.2500	0.7500	0.2189	0.7811	0.7782
HMS1	270	0.4889	0.5111	0.4174	0.5826	0.5804
HMS2	268	0.2761	0.7239	0.2505	0.7495	0.7467
HMS3	204	0.1078	0.8922	0.1965	0.8035	0.7995
HMS6	272	0.2206	0.7794	0.2626	0.7374	0.7347
HMS7	270	0.2000	0.8000	0.2092	0.7908	0.7879
HTG4	272	0.3603	0.6397	0.3420	0.6580	0.6556
HTG6	272	0.2574	0.7426	0.2462	0.7538	0.7511
HTG7	270	0.4444	0.5556	0.3704	0.6296	0.6273
HTG10	252	0.1429	0.8571	0.1527	0.8473	0.8439
VHL20	272	0.1985	0.8015	0.2059	0.7941	0.7912
ASB2	266	0.1579	0.8421	0.1653	0.8347	0.8316
ASB17	238	0.2269	0.7731	0.2262	0.7738	0.7705
ASB23	220	0.1545	0.8455	0.1770	0.8230	0.8193
CA425	236	0.3729	0.6271	0.3693	0.6307	0.6280
LEX3	238	0.2857	0.7143	0.1523	0.8477	0.8442
průměr	256	0.2598	0.7402	0.2488	0.7512	0.7482
směrodat.odch.		0.1057	0.1057	0.0811	0.0811	0.0807

pozn: n: počet alel; P\_Hom: Pozorovaná homozygotnost; P\_Het: Pozorovaná heterozygotnost; O\_Hom: Očekávaná homozygotnost; O\_Het: Očekávaná heterozygotnost; \* Očekávaná homozygotnost a heterozygotnost byla vypočtena pomocí Levene(1949); \*\* Neiova (1973) očekávaná heterozygotnost

**Tab. 3 Počet alel v lokusu u IK**

Lokus	počet alel	na*
ATH4	164	8.0000
ATH5	172	6.0000
HMS1	158	5.0000
HMS2	156	7.0000
HMS3	102	6.0000
HMS6	164	6.0000
HMS7	166	7.0000
HTG4	170	6.0000
HTG6	174	5.0000
HTG7	158	4.0000
HTG10	146	9.0000
VHL20	174	10.0000
ASB2	158	10.0000
ASB17	170	12.0000
ASB23	142	6.0000
CA425	160	7.0000
LEX3	162	9.0000
průměr	159	7.2353
směrodat. odch.		2.1369

**Tab. 4 Počet alel v lokusu u ČT**

Lokus	počet alel	na*
ATH4	272	9.0000
ATH5	264	7.0000
HMS1	270	5.0000
HMS2	268	10.0000
HMS3	204	7.0000
HMS6	272	5.0000
HMS7	270	7.0000
HTG4	272	7.0000
HTG6	272	7.0000
HTG7	270	4.0000
HTG10	252	11.0000
VHL20	272	9.0000
ASB2	266	10.0000
ASB17	238	11.0000
ASB23	220	8.0000
CA425	236	8.0000
LEX3	238	9.0000
průměr	256	7.8824
směrodat. dch.		2.0580

\* na = pozorovaný počet alel v lokusu

Počet alel v lokusu (Tab.č.4) a tím pádem větší variabilita je u ČT, pouze u ASB17 a HMS6 vykazuje větší variabilitu Islandský kůň(Tab.č.5).

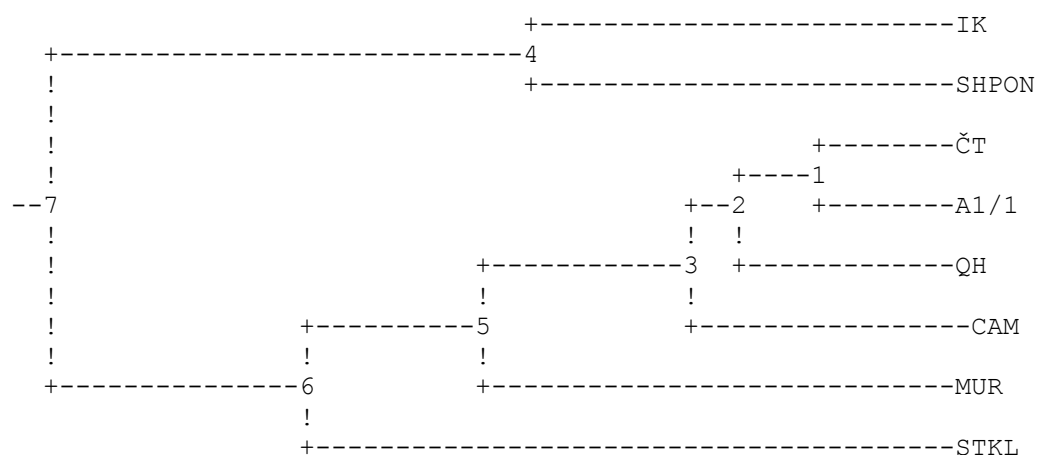
**Tab. 5 Míry genetické identity a vzdálenosti.**

pop ID	1	2
1	****	0.6619
2	0.4127	****

Pozn. Nei (1972)

Genetická identita mezi plemeny je 0,4057. Vzdálenost je 0,6665 (Tab.č.5.).

Pro dendrogram bylo použito dalších 6 plemen koní: Shetlandský pony(SHPON), Anglický plnokrevník(A1/1), Quarter horse(QH), Camarský kůň(CAM), Murgeský kůň (MUR).



*Dendrogram Based Nei's (1972) Genetic distance: Method = UPGMA modified from NEIGHBOR procedure of PHYLIP Version 3.5*

## ZÁVĚR

Navzdory dlouhé izolaci a předpokládanému vysokému stupni inbreedingu, vykazuje Islandský kůň pozoruhodně vysoký stupeň variability. Toto plemeno má nejvyšší homozygotnost v lokusu LEX3, je podstatně vyšší než u Českého teplokrevníka, pravděpodobně to znamená, že se v blízkosti tohoto lokusu nachází jiný mnohem významnější lokus, na který je vyvíjen silný selekční tlak. Předpokládalo se, že toto plemeno bude mít nízkou genetickou variabilitu, díky stovky let trvající izolaci od ostatních plemen, nicméně nic nenaznačuje inbrední depresi. Z dendrogramu lze vyčíst genetickou vzdálenost plemen. Nejblíže jsou si Islandský kůň a Shetlandský pony. Tato dvě plemena se fylogeneticky oddělila mnohem dříve než ostatní. Českému teplokrevníkovi je nejblíže Anglický plnokrevník, lze to zdůvodnit tím, že Anglický plnokrevník je hojně používaný jako tzv. korektor, jak exteriéru, tak i výkonnosti v populaci Českého teplokrevníka.

## **LITERATURA**

Bjornstad G, Nilsen NO, Roed KH, 2003. Genetic relationship between Mongolian and Norwegian horses? *AnimGenet* 34: 55–58.

Dove P, Kavar T, Sölkner H, Achmann R, 2006. Development of the Lipizzan Horse Breed. *Repris Dom Anim* 41: 280-285.

Luís C, Gus Cothran E, Oom M. M, 2002. Microsatellites in Portuguese autochthonous horse breeds: usefulness for parentage trstiny. *Genet Molec Biol* 25(2)131-134.

Vinocur M. E, Brass K. E, Rubin M. I. B, Silva C. A. M, 2003. Genetic variability in the brazilian criollo horse breed. *Ciência Rural, Santa Maria* 33(1): 137-142.

Zabek T, Nogaj A, Radko A, Nogaj J, Slota E, 2005. Genetic Variation of Polish endangered Bilgoraj horses and two common horse in microsatellite loci. *J Appl Genet* 46(3): 299-305.