

Acta fytotechnica et zootechnica 1
Nitra, Slovaca Universitas Agriculturae Nitriae, 2010, s. 19–23

ANALÝZA MITOCHONDRIÁLNÍ DNA U GENOVÉ REZERVY STAROKLADRUBSKÉHO KONĚ

MITOCHONDRIAL DNA ANALYSIS OF THE GENE RESERVE OF THE OLD KLADRUBER HORSE

Olga KRACÍKOVÁ,¹ Vladimíra CZERNEKOVÁ,² Soňa MELČOVÁ,² Tomáš KOTT,² Ivan MAJZLÍK,¹
Zuzana ČAPKOVÁ,¹ Lea ANDREJSOVÁ¹

Česká zemědělská univerzita v Praze, Česká republika¹

Výzkumný ústav živočišné výroby, oddělení molekulární genetiky, Praha Uhřetěves, Česká republika²

The aim of this study was to verify the accuracy of the pedigree data of Old Kladruber dam lines using mtDNA analysis. The upstream part of the mtDNA D-loop hypervariable region (384 bp, nt15450 – nt15834) was sequenced. DNA was extracted from deep-frozen whole blood and fresh saliva samples of 170 Old Kladruber horses representing 23 dam lines from Kladruby n/L stud and some private farms. A sequencing analysis of a 293 bp long fragment of the upstream part of the D-loop region revealed 48 polymorphic sites created 16 distinct mitochondrial haplotypes, into which 23 maternal lines were grouped. The Old Kladruber sequences differ each other from one to twelve loci. Nine lines have their own distinct haplotypes. Eight lines are clustered in 3 haplotypes. Line Almerina according to pedigree data is splitted into 6 sublines, but mtDNA analysis showed in fact two distinct haplotypes only (subline Almerina-Aluta and the rest of the sublines), though differing only in one locus. A comparison of Old Kladruber haplotypes with 23 maternal lines (according to the pedigrees) showed a disagreement of biological parentage with pedigree data for 3 horses (i.e. 1,76 %) of the sample set.

Key words: d-loop, mitochondrial DNA, sequence, polymorphism, Old Kladruber horse

Analýza mitochondriální DNA se vzhledem k cytoplazmatické dědičnosti (Hutchison et al. 1974) osvědčila jako nástroj zkoumání příbuzenských vztahů po mateřské linii mezi jedinci, populacemi, plemeny i druhy (Mirol et al., 2002). Jako nejvhodnější se k těmto účelům jeví nekódující hypervariabilní úsek mtDNA zvaný D-loop (D-smyčka), který se nachází mezi geny tRNA-Pro a tRNA-Phe, tj. mezi 15469. a 16660. nukleotidem (Xu and Árnason, 1994).

Variabilita D-loop oblasti se široce využívá i při výzkumu původu u koní (Dovc et al., 1996; Bowling et al., 1998; Kavar et al., 1999).

Cílem práce bylo ověření rodokmenů starokladrubských koní z hlediska jejich příslušnosti k mateřským rodinám a prověření širších příbuzenských vztahů mezi těmito rodinami.

Materiál a metody

Analýza se prováděla u 170 starokladrubských běloušů i vraníků v majetku Národního hřebčína Kladruby nad Labem a v malé míře i z dalších chovů. Zkoumaný soubor tvořilo 166 koní z genových rezerv. Zvířata pocházela z 23 rodin (Nár. hřebčín IV-2010), viz tabulka 1.

Laboratorní analýza mitochondriální DNA se prováděla ve Výzkumném ústavu živočišné výroby v Praze – Uhřetěvesi. Zdrojem mtDNA byla celá zmrazená krev genových rezerv uchovávaná v genetické bance, vedené ve Výzkumném ústavu živočišné výroby, u ostatních koní sliny. Izolace a purifikace se prováděla jednak na přístroji Applied Biosystem AbiPrism 6100 Nucleic Acid PrepStation (vakuum) dle protokolu (160 vz.), jednak pomocí techniky magnetických partikulí (Magnetic Particle Technology) dle protokolu (celkem 10 vz., z toho 4 vz. slin a 6 vz. krve) za použití kitu MagMAX™-96 DNA Multi-Sample Kit (Applied Biosystems).

Amplifikována byla upstream část kontrolní oblasti D smyčky o 384 pb (nt 15450 – nt 15834) pomocí primerů dle T. Kavar et al. (2002):

HDF: 5'-AGTCTCACCATCAACACCCCAAAGC-3',
HF: 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3'

Reakční směs o objemu 20 µl obsahovala 3 µl templátové DNA o c = 10 pmol/l, 0,5 µl každého primeru, 6 µl vody a 10 µl dvakrát koncentrovaného roztoku PPP Master Mix, který představuje vyváženou směs jednotlivých komponentů (polymeráza, nukleotidy, pufr, MgCl₂ aj.).

Amplifikace se prováděla v termocykléru Biometra T Gradient. 1. cyklus probíhal 5 min za teploty 95 °C, následovalo 40 cyklů s průběhem teplot 95 °C – 10 s, 62 °C – 20 s, 72 °C – 30 s. Poslední cyklus trval 5 min. při 72 °C. Následovalo chlazení na 4 °C.

Přítomnost DNA v jednotlivých vzorcích se zjišťovala pomocí gelové elektroforézy na 3% agarosovém gelu. Vzorky obsahující amplifikovaný úsek DNA v dostatečném množství pak byly purifikovány pomocí sady Min-Elute dle protokolu (na 5 µl PCR produktu: 1,67 µl SAP – Shrimp Alkaline Phosphatase o c = 1 U/µl a 0,33 µl exonukleázy EXO I o c = 20 U/µl), obojí od firmy FERMENTAS. Směs se odstředila při 2 000 ot/min za laboratorní teploty, poté se promíchala. Následovala inkubace 60 min při 37 °C a denaturace enzymů při 75 °C pomocí exonukleázy po dobu 15 min.

Sekvence se prováděla v sekvenátoru Applied Biosystems (Hitachi) 3100-A. Používal se BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Reakční směs obsahovala 1 µl premixu, 0,5 µl sekvenačního pufru, který je součástí kitu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, 0,08 µl primeru (pro každý primer byla provedena sekvenační PCR zvlášť) a 1 µl přečištěného produktu z předchozí PCR. Reakční směs byla doplněna destilovanou vodou do 5 µl. Prů-

Tabulka 1 Seznam sledovaných rodin a používané zkratky

Rodina (1)	Zkratka (2)	Barva (3)	Počet zvířat (4)	Poznámka (5)
Africa – Maestosa „E“ (1740)	AFM	vr-běl	7	reg
Almerina – Albona (1769)	ALA	B	15	
Almerina – Aluta „P“ (1769)	ALU	B	4	
Almerina – Campanella (1769)	ALC	vr-běl	8	reg
Almerina – Egloga (1769)	ALE	běl*	12	
Almerina – Formosa (1769)	ALF	vr	6	reg
Almerina – Maja (1769)	ALM	vr-běl	7	reg
Bárta (1953)	B	vr-běl	9	reg
Cariera (1894)	C	běl*	12	
Dana „G“ (1969)	DA	běl	4	
Deflorata – Plutona (1767)	DEP	vr	2	reg
Favora (1963)	F	běl	9	
Madar VI – Káča „F“ (1782)	M	běl	3	
Narcis „I“ (1939)	N	vr-běl	7	reg
Ragusa (1888)	RS	běl	13	
Ragusa-Raguza (1888)	RSR	vr-běl	5	reg
Rava – Maga (1755)	RVM	vr-běl	4	reg
Rava – Ravana (1755)	RVR	běl	5	
Ritorna (1974)	RIT	vr	5	
Sardinia – Magura (1970)	SAM	vr	10	reg
Sardinia – Neapolitana „C“ (1770)	SAN	vr-běl	7	reg
Sardinia – Septimia (1770)	SAS	vr-běl	7	reg
Xandra (1938)	X	vr-běl	9	reg

* – ve zkoumaném vzorku zvířat z této rodiny se vyskytla 1 hnědká, reg – rodiny které byly založeny v rámci regeneračního procesu kladrubského vraníka

* – one bay-horse was in the analysed population of this dam line, reg – dam lines founded in the process of the regeneration of Old Kladruher Black-horses

Table 1

The list of monitored dam lines

(1) dam line, (2) abbreviation, (3) colour, (4) number of horses, (5) note

běh byl následující: první cyklus 95 °C – 1 min, dále 40 cyklů 95 °C – 10 s, 55 °C – 10 s, 60 °C – 4 min. Poté byla směs zchlazena na 4 °C.

Produkt sekvenční PCR byl přečištěn pomocí BigDye Exterminator purifikačního kitu (Applied Biosystem). Použito se 25 µl PCR produktu, 20 µl roztoku SAM a 5 µl exterminatoru (suspense). Reakční směs byla protřepávána po dobu 30 min a odstředěna při 1000 otáčkách za minutu. K vlastní sekvenaci bylo použito 10 µl supernatantu.

Ke grafickému zobrazení výstupu ze sekvenátoru a jeho převedení do textového souboru ve formátu FASTA byl použit program SeqSkape. Mnohočetné přiřazení (multiply alignment) bylo provedeno manuální metodou pomocí volně distribuovaného programového balíčku BioEdit (Hall, 1999) s navazující fylogenetickou analýzou programem ClustalW, včleněným do programu BioEdit. Pro srovnání byla provedena fylogenetická analýza včetně mnohočetného přiřazení pomocí freewarových balíčků, resp. webové služby Phylogeny.fr (Deereper A. et al. 2008), která nabízí různé postupy, skládající se z řetězce vložených programů pro jednotlivé kroky plně automatické fylogenetické analýzy. Byly vybrány programové řetězce „One Click“ Mode, kde jsou vložené programy pro jednotlivé kroky analýzy předvoleny, a „A la Carte“ Mode, kde si uživatel tyto programy pro každý krok volí sám z uvedené nabídky.

Výsledky a diskuse

Byla provedena fylogenetická analýza 293 nukleotidového úseku D smyčky mtDNA.

Do souboru byly zahrnuty též příslušné části mtDNA dvou jedinců osla domácího (*Equus asinus* accession DQ368596, verze DQ368596.1, GI:86559260; *Equus asinus* accession NC_001788, verze NC_001788.1, GI:5835345) a andaluského koně (Pura Raza Española – PRE; accession EU256622, verze EU256622.1, GI: 165911376) z nukleotidové databáze GenBank. Jako referenční (outgroup) sekvence byla použita sekvence GI:86559260 (GenBank).

V souboru bylo identifikováno 16 (tabulka 2), resp. 17 (při zahrnutí sekvence PRE do souboru) různých haplotypů. Oproti referenční sekvenci bylo nalezeno 48 (resp. 49 včetně PRE) polymorfních lokusů. Průměrný počet polymorfismů na jeden polymorfní lokus je 33,29, včetně PRE pak 33,39. Nejvyšší počet rozdílů oproti referenční sekvenci byl 31, nejvíce 38 (bez PRE i vč. PRE). Počet polymorfních lokusů pouze v souboru kladrubských koní (t. j. bez outgroup sekvence i bez sekvence PRE) činil 20, při zahrnutí sekvence PRE do souboru pak 21 (tabulka 2). Jednotlivé kladrubské sekvence se od sebe navzájem lišily v rozmezí od 1 po 12 rozdílů lokusů.

Tabulka 2 Polymorfni lokusy kladrubských rodin

Polymorfismus č. (1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Počet polymorfismů (3)
Haplotyp / nt č. (2)	11	13	51	55	59	81	102	114	117	119	120	121	152	166	167	183	184	218	220	226	237	288	
Bárta	T	A	C	A	C	T	A	G	G	T	T	A	T	A	A	G	G	A	T	C	A	C	
PRE	C	G	T			G	A	A			C	G	C	G		A	G						11
A7405C	C	G	T			C	G	A			C	G	C	G		A							11
C-X ost.	C	G	T			G	A	A			C	G	C	G		A							10
AFM-RS-RSR							A	A			G	C	C		G	A							5
ALA					T		A	A			G	G		G	A	A							6
Almerina ost.					T		A	A			G	G		G	A	A		C					7
DANA							A	A			G	C	C		A	A							4
RVM				G			A	A			G	C	C		A				T				7
RVR							A	A			G	C	C		G			C					6
SAN							A	A			G	C	C		G	A							6
SAN A2605, DEP, F, N							A	A		C	G	C	C		G	A							7
SAM	C	G	T		T		A	A			C	G	C	G		A							10
M							G				G	C	C		A	A		C		G			6
RIT							G	A		C	G	C	C		A					G			7
SAS A2575							G	A			G	C	C					C			T		6
SAS A2601							G	T				C	C					C			T		5
SAS ost.							G					C	C					C					3

Afr-Rag = Africa – Maestosa „E“ – Ragusa – Ragusa-Raguza, SDFN = Deflorata-Plutona – Favora. – Narcis „I“ a 390 Caprida (č. genobanky A2605), SAS A2575 = 962 Santana (č. genobanky A2575), SAS A2606 = 405 Sorga (č. genobanky A2606); nt – nukleotid

Afr-Rag = Africa – Maestosa „E“ – Ragusa - Ragusa-Raguza, SDFN = Deflorata-Plutona – Favora. – Narcis „I“ a 390 Caprida (No of the Bank of Genetic Resources = A2605), SAS A2606 = 405 Sorga (No of the Bank of Genetic Resources = A2606), nt – nucleotide

Polymorphic sites of Kladruber dam lines

(1) polymorphism no., (2) haplotyp nt no., (3) total polymorphisms

Table 2

Fylogenetickou analýzou byly potvrzeny tyto rodiny: Bárta (B), Dana „G“ (DA), Madar VI-Káča „F“ (M), Rava-Maga (RVM), Rava-Ravana (RVR), Ritorna (RIT), Sardinia-Magura (SAM), Sardinia-Neapolitana „C“ (SAN), Sardinia-Septimia (SAS.ost.), které tvoří samostatné clustery.

Z rodiny SAS se vyčleňují 2 zvířata: 962 Santana (číslo genobanky A2575, rodina SAS), a 405 Sorga (A2606SAS), jejichž haplotypy se od haplotypu ostatních příslušníků rodiny i od sebe navzájem liší ve 2 lokusech.

Dále byly identifikovány tři clustery tvořené třemi skupinami rodin, které sdílejí identické haplotypy. Jde o tyto skupiny:

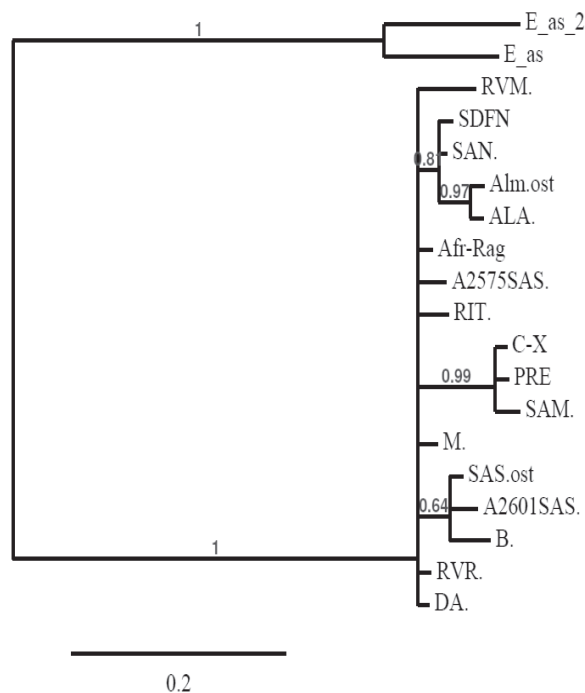
- *Deflorata-Plutona, Favora, Narcis „I“* (SDFN) s identickými haplotypy, kterým odpovídá i haplotyp klisny 390 Caprida (číslo vzorku A2605SAN) z rodiny Sardinia-Neapolitana. Celý tento cluster včetně klisny 390 Caprida se od rodiny Sardinia-Neapolitana „C“ liší pouze na jednom lokusu, kde na pozici 119 je u SAN thymin, zatímco u výše jmenovaného clusteru včetně 309 Capridy cytosin.
- *Cariera a Xandra* (C-X), jejichž haplotypu je velmi blízká sekvence PRE, která se od této skupiny odlišuje pouze jedním nukleotidem na pozici 218, kde u clusteru C-X je adenin a u PRE guanin.
- Skupina *Africa-Maestosa „E“, Ragusa a Ragusa-Raguza* (Afr-Rag).

Naproti tomu rodina *Almerina* se rozpadá na dva clustery, a to na cluster tvořený podrodinou *Almerina-Albona* (ALA), který má na 220 lokusu thymin, a na cluster tvořený ostatními podrodinami (Alm.ost.), který má na tomto lokusu cytosin.

Výše uvedené clustery jsou sdruženy do několika nadřazených větví. Rozložení i skladba těchto větví se u jednotlivých programů mírně liší.

Jako příklad je zde uveden fylogram v modu „A la Carte“ (obr. 1).

Z fylogenetické analýzy mtDNA vyplývá, že rozčlenění populace starokladrubského koně do rodin má u zkoumaného souboru své genetické opodstatnění a že rodiny vedené v plemenářských záznamech vesměs nejsou v rozporu s rozdělením mitochondriálních haplotypů. Z 16 identifikovaných haplotypů 9 odpovídá rodinám uváděným v rodokmenech (*Bárta* /B/, *Dana „G“* /DA/, *Madar VI-Káča „F“* /M/, *Rava-Maga* /RVM/, *Rava-Ravana* /RVR/, *Ritorna* /RIT/, *Sardinia-Magura* /SAM/, *Sardinia-Neapolitana „C“* /SAN/, *Sardinia-Septimia* /SAS.ost./) a 3 haplotypy jsou společné vždy několika rodinám sdruženým do skupiny (*Africa-Maestosa „E“* – *Ragusa-Ragusa-Raguza* /Afr-Rag/, *Cariera-Xandra* /C-X/ a *Deflorata-Plutona – Favora.-Narcis „I“* /SDFN/). Příčinou toho může být společný původ rodin v dané skupině, tj. ze stejné zakladatelky. Rodina *Almerina*, dle rodokmenových záznamů rozčleněná na 6 podrodin, se rozpadá pouze na dvě genetické podrodiny tvořené dvěma různými haplotypy, t. j. *Almerina-Albona* /ALA/ a „ostatní“ (/Alm.ost./: Alm.-Aluta „P“, Alm.-Campanella, Alm.-Egloga, Alm.-Formosa, Alm.-Maja). Je však málo pravděpodobné, že jde o chybu v plemenářské dokumentaci. Vzhledem k tomu, že se tyto haplotypy liší pouze na jednom lokusu, příčinou je spíše mutace na větví vedoucí k podrodině *Almerina-Albona*. Tři klisny, t. j. 1,76 % z celkového počtu sledovaných zvířat, mají haplotypy odlišné od haplotypů svých rodin. Aby se prověřilo, zda se jedná o chybu ve zpracování vzorků, nebo v plemenářských záznamech, je žádoucí provést doplňkovou analýzu mtDNA těchto zvířat a případně jejich potomků či nejbližších příbuzných po mateřské linii. Ovšem i v případě, že je tato nesrovnalost způsobena nesprávnými plemenářskými záznamy, dokládají tyto výsledky mimořádnou



Obrázek 1 Fylogram v modu „A la Carte“
E_as = outgroup *Equus asinus* (GenBank accession DQ368596), E_as_2 = *Equus asinus* (accession NC001788), Afr-Rag = *Africa-Maestosa „E“* + *Ragusa* + *Ragusa-Raguza*, ALA = *Almerina-Aluta*, Alm.ost. = ostatní podrodiny rodiny *Almerina*, B = Bárta, DA = Dana „G“, C-X = *Cariera* + *Xandra*, M = *Madar VI-Káča „F“*, PRE = *Pura Raza Española* (accession EU256622), RIT = *Ritorna*, RVM = *Rava-Maga*, RVR = *Rava-Ravana*, SAM = *Sardinia-Magura*, SAN = *Sardinia-Neapolitana „C“*, A2575SAS = klisna 96 Santana; A2601SAS = klisna 405 Sorga; SAS.ost = *Sardinia-Septimia*, SDFN = *Deflorata-Plutona* + *Favora* + *Narcis „I“* + 390 Caprida (č. genobanky A2605)
Číslo udávající hodnotu bootstrapu

Figure 1 Phylogram in „A la Carte“ mode
E_as = outgroup *Equus asinus* (GenBank accession DQ368596), E_as_2 = *Equus asinus* (accession NC001788), Afr-Rag = *Africa-Maestosa „E“* + *Ragusa* + *Ragusa-Raguza*, ALA = *Almerina-Aluta*, Alm.ost. = ostatní podrodiny rodiny *Almerina*, B = Bárta, DA = Dana „G“, C-X = *Cariera* + *Xandra*, M = *Madar VI-Káča „F“*, PRE = *Pura Raza Española* (accession EU256622), RIT = *Ritorna*, RVM = *Rava-Maga*, RVR = *Rava-Ravana*, SAM = *Sardinia-Magura*, SAN = *Sardinia-Neapolitana „C“*, A2575SAS = mare 96 Santana; A2601SAS = mare 405 Sorga; SAS.ost = = the rest of the line *Sardinia-Septimia*, SDFN = *Deflorata-Plutona* + *Favora* + *Narcis „I“* + 390 Caprida (No of the Bank of Genetic Resources = A2605)
Numbers represent a bootstrap value

preciznost v evidenci rodokmenů, neboť obvykle se v podobných studiích odhalí kolem 10 % rodokmenů neodpovídajících genetickým datům (Bowling et al., 2000; Dovc et al., 1996 et 2006; Hill et al., 2002; Ivankovic et al., 2002; Kavar et al., 1999 et 2002).

U nadřazených větví, které objasňují širší příbuzenské vztahy mezi clustery, je situace méně jednoznačná. Avšak i když se dendrogramy zkonstruované jednotlivými programy do jisté míry liší, můžeme u nich nalézt shodu nebo alespoň velkou podobnost některých větví. Analýza pomocí všech tří programových balíčků potvrdila tyto větve:

- RVM; Alm.ost., ALA; SDFN, SAN; Afr-Rag (bootstrapová podpora 0,83 u „One Click“ modu; u „A la Carte“, bootstrap této větve není uveden, ale větev nižšího řádu sdružující haplotypy ALA, Alm.ost., SDFN a SAN má bootstrapovou podporu 0,81.
 - C-X, PRE; SAM (bootstrap „One Click“ 0,98, „A la Carte“ 0,99).
- Clustery SDFN - SAN a podrodiny ALA - Alm.ost. jsou vždy na jedné větví, ať už na samostatné („A la Carte“ Mode), nebo

alespoň jako součást nadřazené větve jako v případě programu ClustalW a „One Click“. Uskupení 962 Santana, 405 Sorga a SAS.ost. je u programů ClustalW a „One Click“ velmi podobné, i když jejich začlenění do větví vyššího řádu je mírně odlišné. U „A I Carte“ modu je 962 Santana na jiné, poměrně vzdálené větvi. Bootstrapová podpora 0,8 větve příslušející clusterům SDFN – SAN – ALA – Alm.ost. a větve C-X – PRE – SAM, stejně jako jejich poměrně stabilní uskupení, ukazuje na značnou robustnost této větve. Bootstrapové hodnoty ostatních větví jsou příliš nízké, takže příbuzenské vztahy mezi clusteru na nich ležícími nelze spolehlivě posoudit.

Závěr

Mitochondriální rodiny zjištěné v této práci nejsou v zásadním rozporu s rodokmeny. Deklarované příbuzenské vztahy mezi jednotlivými zvířaty odpovídají jejich zařazení do rodin, pouze členění rodin podle rodokmenových záznamů je v některých případech podrobnější. Je možné, že rozdíly mezi těmito rodinami se nacházejí v jiném než ve zde zkoumaném úseku mtDNA, případně že skupiny rodin se stejnými haplotypy ve skutečnosti pocházejí z jedné matky zakladatelky a tedy že jejich rodokmenové členění je pouze formální. Podrobnější studium historických pramenů a další analýza mtDNA a její srovnání s dostupnými sekvencemi z mezinárodních databází DNA umožní detailní analýzu příbuzenských vztahů.

Genetická data neodpovídají rodokmenům pouze ve 3 případech ze 170, t. j. v 1,76 %, což znamená, že plemenářské záznamy jsou velmi spolehlivé.

Získané údaje lze použít ke zmapování matrilineární genetické rozmanitosti u kladrubských koní a k ověření správnosti jejich zařazení do rodin. Tyto informace pak mohou posloužit při sestavování vhodných, geneticky co nejméně příbuzných rodičovských párů, k ověřování totožnosti a původu jednotlivých koní, k výzkumu původu a k rekonstrukci výstavby plemene jako takového zejména v těch obdobích, z nichž chybějí chovatelské záznamy.

Souhrn

Cílem práce bylo ověřit pomocí analýzy mtDNA správnost rodokmenu starokladrubských koní z hlediska jejich zařazení do mateřských rodin. Byl sekvenován 384 nt dlouhý úsek (nt15450 – nt15834) upstream části hypervariabilní oblasti D-smyčky (D-loop). DNA byla získána z hluboce zmrazené celé krve a čerstvých slin 170 starokladrubských koní z 23 rodin, pocházejících z hřebčína Kladruby n/L a z některých soukromých chovů. Sekvenční analýza fragmentu upstream části D-smyčky o délce 293 nt prokázala 48 polymorfních lokusů, tvořících 16 různých mitochondriálních haplotypů, do nichž bylo seskupeno 23 mateřských rodin. Sekvence starokladrubských koní se od sebe navzájem lišily v jednom až dvanácti lokusech. Devíti rodinám příslušejí specifické haplotypy. Osm rodin je sdruženo do 3 haplotypů. Rodina Almerina, podle rodokmenu rozdělená na šest podrodin, se ve skutečnosti skládá jenom ze dvou podrodin (podrodina Almerina-Aluta a zbývající podrodiny), které se ovšem od sebe liší pouze jedním lokusem. Ro-

dokmenové záznamy se s biologickými daty neshodovaly u 3 koní, t. j. v 1,76 % ze zkoumaného souboru vzorku.

Klíčová slova: D-loop (D-smyčka), mitochondriální DNA, sekvence, polymorfismus, starokladrubský kon

Literatura

- BOWLING, A. T. – DE VALLE, A. – BOWLING, M. 2000. A pedigree-based study of mitochondrial D-loop DNA sequence variation among Arabian horses. In: Anim. Genet. 31, p. 1–7
- DEREEPER, A. – GUIGNON, V. – BLANC, G. – AUDIC, S. – BUF-FET, S. – CHEVENET, F. – DUFAYARD, J. F. – GUINDON, S. – LEFORT, V. – LESCOT, M. – CLAVERIE, J. M. – GASCUEL, O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. In: Nucleic Acids Res. Jul 1; 36, 465-9 (Web Server issue): W465-9. Epub 2008 Apr 19. Dostupné na <http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/index.cgi>
- DOVC, P. – KAVAR, T. – HABE, F. 1996. Mitochondrial D-loop variation in Lipizzan horses. In: Anim. Genet. 27 (Suppl. 2), 33–44.
- DOVC, P. – KAVAR, T. – SÖLMNER, H. – ACHMANN, R. 2006. Development of the Lipizzan Horse Breed. In: Reprod. Dom. Anim. 41, p. 280–285
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly Biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: Nucl. Acids Symp. Ser. 41, p. 95–98
- HILL, E., W. – BRADLEY, D., G. – AL-BARODY, M. – ERTUGRUL, O. – SPLAN, R. K. – ZAKHAROV, I. – CUNNINGHAM, E. P. 2002. History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation. In: Animal Genetics 33, p. 287–294.
- HUTCHISON, C. A. – NEWBOLD, J. E. – POTTER, S. S. – HALL EDGELL, M. 1974. Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. Nature 251: p. 536–8.
- IVANKOVIC, A. – KAVAR, T. – CAPUT, P. – MIOC, B. – PAVIC, V. – DOVC, P. 2002. Genetic diversity of three donory populations in the Croatian coastal region In: Animal Genetics 33, p. 169–77
- KAVAR, T. – HABE, F. – BREM, G. – DOVC, P. 1999. Mitochondrial D-loop sequence variation among the 16 maternal lines of the Lipizzan horse breed. In: Animal Genetics 30, p. 423–430
- KAVAR, T. – BREM, G. – HABE, F. – SÖLKNER, J. – DOVC, P. 2002. History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis. In: Genetics Selection Evolution 34, p. 635–648
- MIROL, P. M. – GARCÍA, P. P. – DULOUT, F. N. 2002. Mitochondrial variability in the D-loop of four equine breeds shown by PCR-SSCP analysis. In: Genet. Mol. Biol., 25 no. 1
- XU, X. – ÁRNASON, Ú. 1994. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, Equus caballus: extensive heteroplasm of the control region. In: Gene 148, p. 357–362
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> – GenBank (staženo X-2009)
- <http://www.nhkladruby.cz> – Národní hřebčín Kladruby nad Labem, s. p. – oficiální webové stránky (staženo V-2010)

Kontaktní adresa:

Ing. Olga Kracíková, Česká zemědělská univerzita v Praze, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, Katedra obecné zootechniky a etologie, Kamýcká129, 165 21 Praha 6, Česká republika, tel. 420-224 38-26 65, e-mail kraciko-va@af.czu.cz