

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Rebeka PIPAN

LOKUS ZA BARVO DLAKE PRI LIPICANCIH

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

LOCUS FOR COAT COLOUR IN LIPIZZAN HORSES

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija kmetijstva – zootehnike. Naloga je bila opravljena v Laboratoriju za genetiko Oddelka za zootehniko Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. Podatke za analizo krvnih vzorcev smo dobili v Kobilarni Lipica.

Komisija za dodiplomski študij Oddelka za zootehniko je za mentorja diplomske naloge imenovala prof. dr. Petra Dovča.

Recenzent: prof. dr. Simon HORVAT

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Antonija HOLCMAN,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter DOVČ,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Simon HORVAT,
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Datum zagovora: 29. 12. 2009

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Rebeka Pipan

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 636.1:575(043.2)=163.6
KG	konji/pasme/lipicanec/dlaka/barva/molekularna genetika/lokusi/STX17
KK	AGRIS L10/5120
AV	PIPAN, Rebeka
SA	DOVČ, Peter (mentor)
KZ	SI-1230 Domžale, Groblje 3
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko
LI	2009
IN	LOKUS ZA BARVO DLAKE PRI LIPICANCIH
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	XIII, 34 str., 7 pregl., 21 sl., 23 pril., 20 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Že leta 1580, ko se je lipicanska pasma začela razvijati, je bil eden od pomembnejših ciljev ustvariti belega konja, ki bo lahko izpolnjeval protokolarne naloge na dunajskem dvoru. V diplomski nalogi je opisano molekularno ozadje dedovanja barve dlake in podana razлага zakaj, kljub strogi selekciji, ki jo izvajajo v Kobilarni Lipica, majhen odstotek živali ostane obarvan in ne sivi. V Rejskem programu Kobilarni Lipica je opisano, da se lahko pojavlja večina odtenkov barve dlake, najpogosteje pa se pojavljajo sivci. Sivci se žrebijo temni in z leti postanejo beli zaradi izgube pigmenta v melanocitih. Analizirali smo osemnajst vzorcev krvi konj iz Kobilarni Lipica. Pod drobnogled smo vzeli tiste, ki so kljub starosti še vedno temni in bodo temni tudi ostali ter njihove še živeče prednike. Povzročanje sivenja s starostjo je avtosomalno dominantna lastnost, ki jo povzroča delovanje lokusa <i>STX17</i> in v starosti med pet in sedem let povzroči postopno depigmentacijo konj. Z analizo mikrosatelitnih lokusov smo preverili starševstvo, z določanjem nukleotidnega zaporedja na delu lokusa <i>STX17</i> pa smo skušali pojasniti genetske razlike med sivimi in obarvanimi lipicanci.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN	Dn
DC	UDC 636.1:575(043.2)=163.6
CX	horses/breeds/Lipizzan horse/coat/colour/molecular genetics/locuses/STX17
CC	AGRIS L10/5120
AU	PIPAN, Rebeka
AA	DOVČ, Peter (supervisor)
PP	SI-1230 Domžale, Groblje 3
PB	University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Animal Science
PY	2009
TI	LOCUS FOR COAT COLOUR IN LIPIZZAN HORSES
DT	Graduation Thesis (University Studies)
NO	XIII, 34 p., 7 tab., 21 fig., 23 ann., 20 ref.
LA	sl
AL	sl/en
AB	Already in 1580, when the Lipizzan breed had just started to develop, one of the main goals was to create a white horse for parade purposes at Habsburg court in Vienna. This thesis describes the molecular background of coat colour inheritance and offers the explanation why dark coat pigmentation is still present to a very small extent, despite the strict selection performed at the Lipica Stud Farm. Breeding program of the Lipica Stud Farm allows a variety of coat colour shades, however, the most common being the grey colour. Grey horses are foaled dark and become white due to the loss of pigment in melanocytes. Eighteen blood samples of the horses at the Lipica Stud Farm were analysed, mostly horses that are still dark despite their old age, and will remain so, as well as their living ancestors, were examined using molecular tools. Turning to grey as the horses are getting older is an autosomal dominant trait controlled by the <i>STX17</i> locus which drives depigmentation process. Using the analysis of microsatellite loci we verified the parentage, and the process of greying was determined by partial DNA sequencing of the <i>STX17</i> locus, explaining genetic differences among coloured and grey Lipizzans.

KAZALO VSEBINE

	str.
Ključna dokumentacijska informacija (KDI)	III
Key words documentation (KWD)	IV
Kazalo vsebine	V
Kazalo preglednic	VII
Kazalo slik	VIII
Kazalo prilog	X
Okrajšave in simboli	XII
Slovarček	XIII
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 EVOLUCIJA KONJA	3
2.1.1 Lipicanski konj	3
2.1.1.1 Lipicanski konj v svetu	3
2.1.1.2 Lipicanski konj v Sloveniji	3
2.2 LOKUSI ZA BARVO DLAKE	5
2.2.1 E (črna barva dlake) in A (aguti) lokus	6
2.2.2 Lokus za belo obarvanost, W (white) lokus	8
2.2.3 Lokusi, ki redčijo barvo in različni vzorci barve dlake	9
2.2.4 Lokus za sivo obarvanost, G- lokus	10
3 MATERIAL IN METODE	12
3.1 VZORCI	12
3.2 IZOLACIJA DNA IZ KRVI	16
3.2.1 Preverjanje kakovosti izolacije DNA	16
3.3 PREVERJANJE POREKLA z MIKROSATELITNO ANALIZO	16
3.4 DOLOČANJE GENOTIPOV, POVEZANIH S SIVENJEM	17
3.4.1 Genotipizacija 4,6 kb dolge duplikacije v intronu 6 gena STX17	17
3.5 KARAKTERIZACIJA KRAJŠIH FRAGMENTOV V BLIŽINI LOKUSA G NA KROMOSOMU 25	19
3.5.1 Določanje nukleotidnega zaporedja	20
3.5.2 Sekvenčna rekcija	21
3.5.3 Precipitacija ali čiščenje produktov sekvenčne reakcije	21
3.5.4 Ureditev sekvenc s programom Chromas Lite	21
4 REZULTATI IN DISKUSIJA	22
4.1 PREVERJANJE IZOLACIJE DNA NA AGAROZNEM GELU	22
4.2 MIKROSATELITI	23
4.3 GENOTIPIZACIJA 4,6 kb DOLGE DUPLIKACIJE V INTRONU 6 GENA STX17	23
4.4 ANALIZA TOČKOVNIH MUTACIJ V OBMOČJU LOKUSA STX17	26
4.5 SEKVENCIRANJE	28

5	SKLEPI	31
6	POVZETEK	32
7	VIRI	33

ZAHVALA
PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

	str.
Preglednica 1: Podatki ZRLS (Združenje rejcev lipicanca Slovenije) in ZRLS – PRO (Združenje rejcev lipicanca Slovenije – Priznana rejska organizacija) (Interno gradivo ..., 1991-2008)	4
Preglednica 2: Stalež konj po kategorijah v Kobilarni Lipica v letu 2005, 2008 (Kobilarna Lipica, 2008) in 2009 (Kobilarna Lipica, 2009)	5
Preglednica 3: Opazovane živali	12
Preglednica 4: Nukleotidni polimorfizmi v bližini G-lokusa na kromosomu 25 (Rosengren Pielberg, 2008)	19
Preglednica 5: Rezultati mikrosatelitne analize pri konjih, vključenih v raziskavo	23
Preglednica 6: Polimorfna mesta pri opazovanih živalih, odsek 1	28
Preglednica 7: Polimorfna mesta pri opazovanih živalih, odsek 2	29

KAZALO SLIK

	str.
Slika 1: Vranec genotipa E ^E (Black horse, 2008)	6
Slika 2: Predstavnik edinega divjega tipa konja, Przewalskijevega konja (Przewalski horse, 2008)	7
Slika 3: Albino (Albino horse, 2008)	8
Slika 4: Tobiano vzorec (QTS Gallant ..., 2008)	9
Slika 5: Roan gen (Roan Hayes, 2005)	9
Slika 6: Lipicanska žrebica (foto Pipan, 2009)	10
Slika 7: Dominantno dedovanje sive barve pri sivcih (Čurik, 2008)	11
Slika 8: Primer depigmentacije pri 485 Conversano Wera XXII (foto Pipan, 2008)	13
Slika 9: Primer depigmentacije pri 532 Pluto Strana XI (foto Pipan, 2008)	13
Slika 10: Vranec 331 Conversano Bonadea XXVI (foto Pipan in Slavič, 2008)	14
Slika 11: Plemenska kobilka 129 Bonadea XXVI (foto Slavič, 2007)	14
Slika 12: Žrebica 402 Batosta XXXI (foto Slavič, 2007)	15
Slika 13: Plemenska kobilka 095 Batosta XII (foto Slavič, 2007)	15
Slika 15: Potek programa HEL2 za sekvenčne reakcije	21
Slika 16: Preverjanje uspešnosti izolacije DNK na agaroznem gelu	22
Slika 17: PCR podvojene regije gena <i>STX17</i> (sintaksin 17) z začetnimi oligonukleotidi DUP (1)	24
Slika 18: PCR podvojene regije gena <i>STX17</i> (sintaksin 17) z začetnimi oligonukleotidi DUP (2)	25
Slika 18: PCR produkti prvega odseka v okolici lokusa <i>STX17</i> (28,737,621 - 28,737,735)	26
Slika 19: PCR produkti drugega odseka v okolici lokusa <i>STX17</i> (28,822,669-28,823,362)	27
Slika 20: Sekvenca na območju 28,823,179 za konja 331 Conversano Bonadea XXVI	30

Slika 21: Sekvenca na območju 28,823,179 za konja 402 Batosta XXXI

30

KAZALO PRILOG

- Priloga A: Začetni oligonukleotid 1 za izvedbo PCR reakcije s STX17G-1F in STX17G-1R
- Priloga B: Začetni oligonukleotid 2 za izvedbo PCR reakcije STX17G-2F in STX17G-2R
- Priloga C: STX17 gen na lokaciji za sivenje na intronu 6
- Priloga D: STX17 gen za ne-siv haplotip na intronu 6
- Priloga E: Shema rodovnika konja 001 Conversano Capriola XIV z oznako fenotipov
- Priloga F: Shema rodovnika konja 6 Dubovina z oznako fenotipov
- Priloga G: Shema rodovnika konja 014 Capriola XXV z oznako fenotipov
- Priloga H: Shema rodovnika konja 082 Allegra XLVI z oznako fenotipov
- Priloga I: Shema rodovnika konja 095 Batosta XII z oznako fenotipov
- Priloga J: Shema rodovnika konja 129 Bonadea XXVI z oznako fenotipov
- Priloga K: Shema rodovnika konja 152 Wera XXII z oznako fenotipov
- Priloga L: Shema rodovnika konja 158 Strana XI z oznako fenotipov
- Priloga M: Shema rodovnika konja 235 Pluto Samira XVIII z oznako fenotipov
- Priloga N: Shema rodovnika konja 245 Allegra XLIX z oznako fenotipov
- Priloga O: Shema rodovnika konja 282 Siglavy Capriola XXV z oznako fenotipov
- Priloga P: Shema rodovnika konja 402 Betalka IX z oznako fenotipov
- Priloga R: Shema rodovnika konja 331 Conversano Bonadea XXVI z oznako fenotipov
- Priloga S: Shema rodovnika konja 345 Dubovina XXX z oznako fenotipov
- Priloga T: Shema rodovnika konja 355 Dubovina XXXI z oznako fenotipov
- Priloga U: Shema rodovnika konja 485 Conversano Wera XXII z oznako fenotipov
- Priloga V: Shema rodovnika konja 532 Pluto Strana XI z oznako fenotipov
- Priloga Z: Shema rodovnika konja 919 Siglavy Allegra XXVI z oznako fenotipov
- Priloga X: Shema rodovnika konja 931 Bonadea XVII z oznako fenotipov

Priloga Y: Shema rodovnika konja 934 Samira XVIII z oznako fenotipov

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ZRLS: Združenje rejcev lipicanca Slovenije

LIF: Lipizzan International Federation, Mednarodno združenje lipicancev

ZRLS-PRO: Združenje rejcev lipicanca Slovenije – Priznana rejska organizacija

DNA: Dezoksiribonukleinska kislina

PCR: Polymerase Chain Reaction

DUP: duplikacija

SNP: single nucleotide polymorphism

SLOVARČEK

PCR: verižna reakcija s polimerazo

SNP: zamenjava posameznih nukleotidov pri mutacijah

1 UVOD

Lipicanski konj je slovenska avtohtona pasma, ki se je oblikovala in razvijala že od leta 1580, ko je avstrijski nadvojvoda Karel II ustanovil dvorno kobilarno v kraškem predelu pri Trstu. (Rus, 2005). Tamkajšnjo pasmo težkih kraških konj so začeli oplemenjevati s španskimi žrebcji, ki so začetniki petih od šestih lipicanskih linij žrebcev: Conversano, Pluto, Maestoso, Favory in Neapolitano. Začetnik šestega rodu je arabski žrebec Siglavy (Werner, 1991).

Podobno kot linije žrebcev, so v kobilarni Lipica nastali tudi klasični rodovi kobil: Sardinia, Spadiglia, Argentina, Africa, Almerina, Presciana/Bradamanta, Englanderia, Europa, Stornella/Fistula, Ivanka/Famosa, Deflorata, Gidrana, Djerbin, Mercurio, Theodorosta (Dolenc, 1980). Po letu 1974 se je izoblikoval novi rod – Rebecca/Thais, edini slovenski rod. V teku so pogovori o tem, da bi bil rod priznan kot hrvaški rod kobil, glede na to, da je bila kobila Rebecca ožrebljena v kobilarni Višnjevac, v neposredni bližini Osijeka (Benić, 2009).

Lipicanski konji so v vihru visoki od 153 do 158 cm, najpogosteje različnih odtenkov sive barve. Posebne značilnosti so živahen temperament in dobrohoten karakter, učljivost, delavoljnost in kooperativnost. Značilna je dobra plodnost, pozna zrelost, čvrsta konstitucija, dolgoživost in dobro izkoriščanje krme (Rus, 2005).

Zaradi izredno prijaznega značaja, visoke inteligence in velike pripravljenosti za učenje, lipicanski konj dosega izjemne uspehe pri osvajanju vaj visoke šole jahanja na zemlji in nad njo. Zaradi svoje energije, izjemno lepih hodov in vzdržljivosti je dober vprežni in delovni konj (Werner, 1991). Pri lipicancih je dovoljena le reja čistopasemskih plemenskih živali. Populacija je zaprta in križanja niso dovoljena (Rus, 2005).

Po barvi dlake lipicanske konje uvrščamo med sivce. Sivci se vedno rodijo temni, oznaka rjavi, lisičji ali vranji sivec predstavlja barvo ob rojstvu. Pri sivcih je z vsako menjavo dlake bela barva jasnejša, pri približno desetih letih je bela barva popolnoma izražena. Po telesu se lahko kažejo večje ali manjše temne lise, v tem primeru govorimo o jabolčastih, postrvjih ali muhastih sivcih (Werner, 1991).

Lipicanska pasma je maloštevilna in razpršena ter velja za ogroženo v smislu ohranjanja zadostnega števila živali za zagotavljanje genetske pestrosti in ohranjanja pasemskih značilnosti. Zato so tudi raziskave s področja dedovanja barve pri Lipicanskih konjih izrednega pomena.

Študija, ki je potekala na 296 sivih lipicancih starejših od treh let je pokazala, da so lipicanci sivi zaradi mutacije v genu sintaksin-17 (STX17) na 25. kromosomu. Osivelostpovzroča 4,6 kb dolga duplikacija v 6. intronu gena *STX17*. Duplikacija deluje *cis*-regulatorno, je dominantna avtosomalna lastnost, povezana z visokim deležem pojavljanja melanomov in postopno depigmentacijo dlake, je dominantna avtosomalna lastnost, povezana z visokim deležem pojavljanja melanomov in postopno depigmentacijo dlake, ter vpliva na hitro izgubo pigmentacije v melanocitih. Ista mutacija je odgovorna tudi za večjo možnost pojava melanoma ozioroma kožnega raka (Rosengren Pielberg in

sod., 2008). V melanomih sivcev so zasledili povečano izražanje *STX17* v primerjavi z bližnjim genom *NR4A3*. Višji delež melanomov je bil ugotovljen pri sivcih, ki so nosilci mutacije, povezane z izgubo funkcije v genu *ASIP* (Rosengren Pielberg in sod., 2008).

Študija, ki je bila opravljena v kobilarnah Đakovo na Hrvaškem, Piber v Avstriji, Szilvásvárd na Madžarskem, Topol'čianky na Slovaškem in Lipici v Sloveniji je dokazala, da parjenje v sorodstvu ne vpliva na pogostnost melanoma pri lipicancih (Čurik in sod., 2000).

Nekateri lipicanci kljub starosti ostanejo temni, kar je v Kobilarni Lipica redek pojav. Čeprav so v Rejskem programu Kobilarne Lipica dovoljene vse barve dlake, naj bi bila prevladujoča barva, ki je značilna za lipicance siva (Rus, 2005).

S temeljitim analiziranjem osebkov lipicanske pasme, ki so tudi kot odrasli temni, njihovih prednikov in primerjalne skupine, bomo poskušali ugotoviti vzroke depigmentacije in po drugi strani tudi ohranitev temne barve pri lipicancih. Primerjalna skupina so konji, ki so postali sivci med petim in desetim letom starosti. Rezultati analiz takšnih osebkov lahko pripomore tudi k boljši selekciji lipicanskih kobilarov po svetu, saj bodo nekoliko bolje pojasnjene genetske razlike med sivimi in obarvanimi lipicanci.

2 PREGLED OBJAV

2.1 EVOLUCIJA KONJA

Žival lisičje velikosti, *Eohippus* je sicer izumrla, ohranili pa so se ostanki *Hyracotheriuma*, ki je pred 35-50 milijoni let živel na območju severne Amerike. Evolucija se je nadaljevala od *Mesohippusa* (pred 25-35 milijonov let), *Meryhippusa* (pred 10-25 milijoni let), *Pliohippusa* in *Hippariona* (pred 3-10 milijoni let) do *Plesippusa* (pred 10.000 do 3 milijoni let), ki je tudi prednik konj (*Equus caballus*), zeber (*Equus zebra*) in oslov (*Equus hemionus*). Domestikacija konja se je pričela pred približno 5000 leti ob Kaspijskem morju (Trapečar, 1999).

2.1.1 Lipicanski konj

Pasma je nastala s križanjem kobil, ki so jih redili na Krasu in žrebcev, uvoženih iz Španije, Češke, Italije in Danske. Lipicanski konj naj bi bil po standardih srednjega okvira, eleganten, plemenit, primeren za potrebe dresurnega jahanja in vprege. Velikost kobil se giblje med 153 cm in 158 cm, žrebcev pa 155 cm in 160 cm. Telesni ustroj je določen po Rejskem programu Kobilarne Lipica za pasmo lipicanski konj (Rus, 2005). Pasma je tako pri nas, kot v svetu ogrožena, populacija je izredno majhna. Potrebna je previdnost pri ohranjanju pasemskih značilnosti in genetske pestrosti. Tako si kobilarne medsebojno izmenjujejo plemenske žrebce in kobile.

2.1.1.1 Lipicanski konj v svetu

Lipicanec je prisoten skoraj v vseh državah sveta. Nam najbližje kobilarne so v Avstriji, Italiji, na Hrvaškem, Slovaškem, Madžarskem in v mnogih drugih evropskih državah. Prav tako se je pasma razširila v Združenih državah Amerike, Avstraliji in Afriki (Rus, 2005). Rejci lipicanskih konj so povezani v združenja in rejske organizacije lipicanske pasme, kar je pomembno pri doseganju rejskih ciljev in medsebojnem sodelovanju.

Ocenjuje se, da je lipicanskih konj v svetu okrog 5000 (Lipicanske pasme ..., 2008).

2.1.1.2 Lipicanski konj v Sloveniji

V Sloveniji je matična kobilarna lipicanskih konj, Javni zavod Kobilarna Lipica, v katerem je okrog 400 konj. Rejci lipicanca so povezani v Združenje rejcev lipicanca Slovenije – priznana rejska organizacija, kjer je ocenjen podatek o staležu okrog 350 konj.

- Združenje rejcev lipicanca Slovenije

Leta 1991 se je v Sloveniji ustanovilo Združenje rejcev lipicanca Slovenije (ZRLS) ki je povezalo zasebne rejce lipicanca. Istega leta je LIF (Mednarodno združenje lipicancev) sprejelo ZRLS v polnopravno članstvo.

Preglednica 1: Podatki ZRLS (Združenje rejcev lipicanca Slovenije) in ZRLS – PRO (Združenje rejcev lipicanca Slovenije – Priznana rejska organizacija) (Interni gradivo ..., 1991-2008)

	Število rejcev	Plemenske kobile	Plemenski žrebci	Skupaj lipicancev
Ob ustanovitvi ZRLS	38	41		170
Članstvo ZRLS v letu 2008	197	133	2	350

Na samem začetku je bilo v ZRLS včlanjenih le 38 članov, imeli so 41 plemenskih kobil in skupaj 170 lipicancev. V letu 2008 se je v ZRLS – PRO populacija neprimerno povečala, tako je bilo v letu 2008 vseh rejcev 197, število plemenskih kobil narašča, velik problem pa predstavlja število plemenskih žrebcev (pregl.1), ki jih je glede na število plemenskih kobil znatno premalo.

Leta 2006 je ZRLS pridobilo status priznane rejske organizacije ZRLS - PRO.

- Kobilarna Lipica

Ob nakupu posestva Lipica leta 1580 so iz Španije pripeljali tri plemenske žrebce, leta 1581 se je število plemenskih žrebcev povečalo na 9, število plemenskih kobil pa na 24.

Skladno z Rejskim programom Kobilarno Lipica in Zakonom o Kobilarni Lipica je javni zavod Kobilarna Lipica dolžan zagotavljati zadovoljivo število linij žrebcev in rodov kobil (Rus, 2005). V letu 2008 je bilo tako v Kobilarni Lipica 42 plemenskih žrebcev, od tega vsaj po trije predstavniki vsake linije. Plemenskih kobil je bilo 73, od tega vsaj po dve predstavnici vsakega rodu. Leta 2008 se je žrebilo 30 žrebet, ostalih, delovnih konj je bilo 170. Skupno število konj je tako 366 (pregl. 2).

Preglednica 2: Stalež konj po kategorijah v Kobilarni Lipica v letu 2005, 2008 (Kobilarna Lipica, 2008) in 2009 (Kobilarna Lipica, 2009)

Kategorija	Leto 2005*	Leto 2008**	Leto 2009***
Plemenski žrebc	27	42	40
Plemenske kobile	84	73	77
Žrebeta tekočega leta	38	30	43
Naraščaj do 4.leta	96	51	70
Ostali konji	110	170	130
skupaj	355	366	360

*(Rus, 2005)

**(Kobilarna Lipica, 2008)

***(Kobilarna Lipica, 2009)

V Kobilarni Lipica se rejska politika jasno nagiba v korist konj, ki z leti posivijo - postanejo sivci, predvsem zaradi pristnosti ohranjanja zgodovinskega izgleda pasme v matični kobilarni. Vranci in rjavci so sicer dovoljeni, niso pa zaželjeni. Tako imamo v Kobilarni Lipica trenutno vranega plemenskega žrebcu 331 C. Bonadea XXVI (slika 3), plemenska kobia 6685 Boneta, ki je bila v KL pripeljana iz Slovaške pa je bila oddana v rejo.

2.2 LOKUSI ZA BARVO DLAKE

Barva dlake je imela že v zgodovini domestikacije živali pomembno vlogo. Kompleksne analize barve dlake pri konjih so omogočile spremeljanje konj tudi brez pregleda rodovnika in zmanjšanje pojava nekaterih bolezni, ki so povezane z barvo dlake (Rieder, 2009). Lokusi, ki vplivajo na barvo dlake pri konjih so:

- lokus za osnovno obarvanost E
- lokus za osnovno obarvanost A (aguti)
- lokus za belo obarvanost W
- lokusi, ki redčijo barvo: Cr, D, CH
- različni vzorci obarvanosti, ki se pojavljajo na konjih (roan, tobiano...)
- lokus za sivo obarvanost G

Osnovne barve dlake so rjava, kostanjeva in črna. Skupaj so kodirane s štirimi aleli na dveh lokusih in sicer: E^E in E^e , ter A^A in A^a . Rjava in črna barva nastaneta z recesivnim dedovanjem alelov E^e in A^a (Rieder, 2009). Rieder in sod. (2001) so ugotovili, da nastane črna barva dlake zaradi homozigotnosti za recesivni alel A^aA^a na aguti lokusu oziroma deleciji 11 baznih parov v eksonu 2 gena AF288358.

2.2.1 E (črna barva dlake) in A (aguti) lokus

Melanokortinski receptor 1 (MC1R) predstavlja lokus E, ki se nahaja na tretjem kromosomu (ECA3p12), njegov antagonist pa je, signalni protein ASIP, ki je kodiran z lokusom A (aguti) na 22. kromosomu (ECA22q15-16). Skupaj nadzorujeta količino melanina pri konjih. ASIP antagonistično deluje na MC1R z izničajočim učinkom α -melanocite-stimulirajočega hormona (α -MSH). Zaradi antagonističnega delovanja na MC1R se pojavijo osebki z rdeče-rumeno pigmentirano barvo dlake (feomelanin). Kljub temu pa lokus E deluje dominantno na produkcijo črnega pigmenta (eumelanina) (Rieder, 2001). Konji z visoko aktivnostjo lokusa E imajo črn pigment v koži in dlaki, barvilo je točkasto ali enakomerno porazdeljeno po celotnem telesu, kar prikazuje slika 1. Alel A^A na agouti lokusu je bil pri udomačenih konjih izločen s selekcijo, pojavlja se le pri nekaterih divjih prednikih, pri tarpanih in Przewalskijevih konjih (slika 2). Dominantno dedovanje alela A povzroči sivkasto ali rjavkasto barvo dlake, mogoči so tudi odseki rumene dlake brez pigmenta. V primeru dedovanja alela A^a imajo osebki svetel trebuh in temno obarvane ostale dele telesa. Agouti lokus uravnava razporeditev pigmenta (eumelanina) po telesu.



Slika 1: Vranec genotipa E^E (Black horse, 2008)



Slika 2: Predstavnik edinega divjega tipa konja, Przewalskijevega konja (Przewalski horse, 2008)

Pri genotipu E^E in E^e je temen pigment prisoten tako v koži, kot v dlaki. Pri genotipu e^e pa je temen pigment prisoten le v koži (Rieder, 2001).

2.2.2 Lokus za belo obarvanost, W (white) lokus

Domnevno je WW letalen genotip. Pravi albini imajo sicer normalno število in strukturo melanocit, vendar popolno depigmentacijo kože, dlake in oči (slika 3). Omenjena mutacija pri konjih ni pogosta in je dejansko pri udomačenih konjih izkoreninjena. Kljub temu pa jih lahko redko še srečamo. Marklund in sod. (1999) so opazovali mutacijo na receptorju za tirozinsko kinazo, ki je lociran na ECA3q21-22. Omenjena mutacija v eksonu19 naj bi bila povezana s fenotipom, ki mu rečemo srec. Srec je konj temno sive barve s črno glavo in repom.



Slika 3: Albino (Albino horse, 2008)

2.2.3 Lokusi, ki redčijo barvo in različni vzorci barve dlake

Gen D povzroča svetlenje osnovne barve kar povzroči nastanek fenotipov z razredčenim osnovnim barvnim vzorcem. Gen C nadzoruje tvorbo melanina, nianse barve dlake so lahko cremello in palomino. Gen TO ali tobiano (slika 4); osebki imajo lisast vzorec, noge so visoko nogavičaste, rep je dvobarven ali bel. Brooks in sod. (2002) so podrobnejše opisali mutacijo v intronu 13 gena C693G, ki povzroči nastajanje lis nepravilne oblike pri tobiano konjih.

Pri roan gen ali recessivnem RN^m in dominantnem RN^{RN} so osebki navidezno sive barve, kar je posledica mešanja belih in barvnih dlak (Hintz, 1979).



Slika 4: Tobiano vzorec (QTS Gallant ..., 2008)



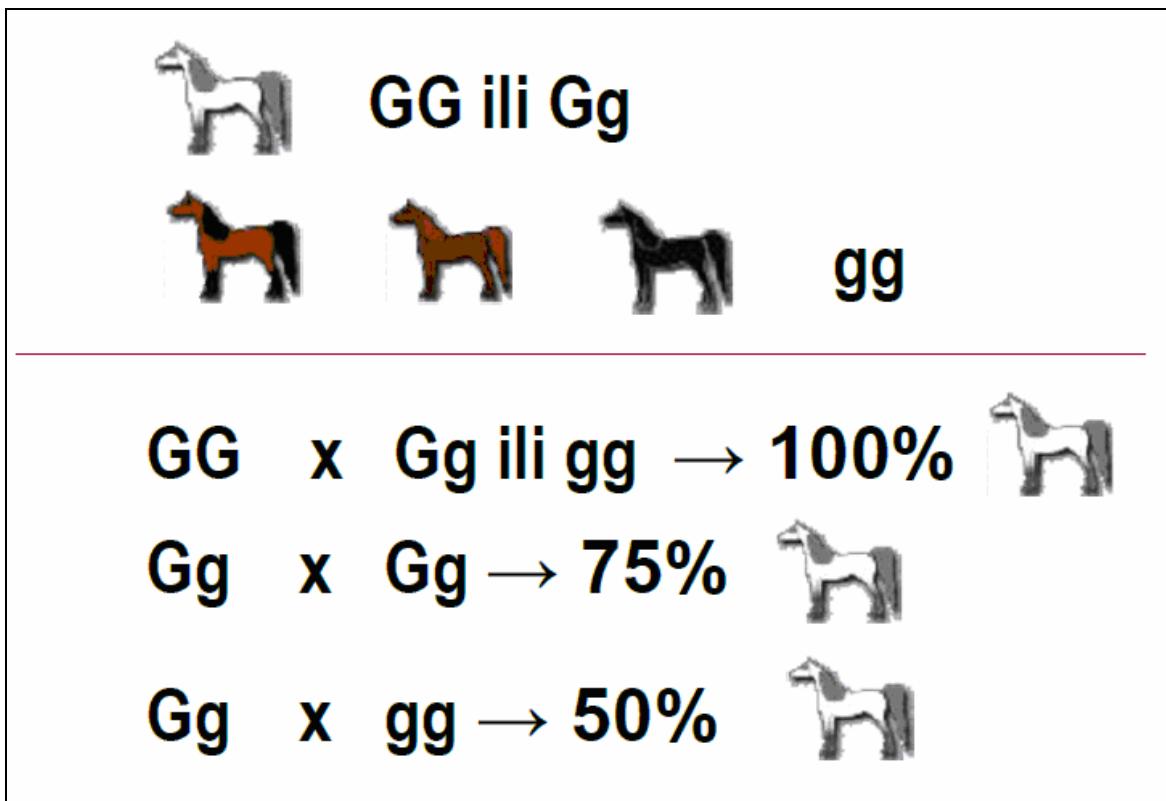
Slika 5: Roan gen (Roan Hayes, 2005)

2.2.4 Lokus za sivo obarvanost, G- lokus

Povzročanje sivenja s starostjo, ki ga povzroči 4,6 kb dolga duplikacija v šestem intronu gena *STX17*, ki deluje cis-regulatorno, je dominantna avtosomalna lastnost, povezana z visokim deležem pojavljanja melanomov in z depigmentacijo, ki jo opazimo pri takih osebkih. V melanomih sivcev so zasledili povečano izražanje *STX17* v primerjavi z bližnjim *NR4A3* genom. Višji delež melanomov je bil ugotovljen pri sivcih, ki so nosilci mutacije povezane z izgubo funkcije v genu *ASIP* (Rosengren Pielberg in sod., 2008).



Slika 6: Lipicanska žrebica (foto Pipan, 2009)



Slika 7: Dominantno dedovanje sive barve pri sivcih (Čurik, 2008)

Lokus za sivenje je pri sivcih predstavljan z dvema aleloma: z dominantnim aleлом G in recesivnim aleлом g. Konji, ki jih ne uvrščamo med sivce so homozigotno recesivni, torej gg. Sivci imajo vsaj en dominantni alel G (Greying, 2009). Potomci osebkov GG in Gg so vedno sivci, če pa je osebek gg, s starostjo ne pride do sivenja (Dovč, 2005-2008).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 VZORCI

Vzorci krvi so bili odvzeti lipicancem Kobilarni Lipica 04.10.2007. Ti konji so ali ostali rjavci, ali so imeli po telesu vidne spremembe v pigmentaciji kože. Kri je bila odvzeta tudi njihovim staršem ali njihovim potomcem. V raziskavo smo vključili tudi konje s sončnim ekcemom, ki so služili kot primerjalna skupina. Ti konji so fenotipsko sivci, v primerjalno skupino pa smo jih vključili z namenom, da potrdimo ali ovržemo spremembe na lokusih zaradi prisotnosti sončnega ekcema.

Nekaterim prednikom konj, ki so vneseni v preglednico 3, kri ni bila odvzeta (pregl. 3). Ti konji so ali pognili ali so bili na pripustnih postajah ali so to konji, ki so bili za potrebe osvežitve krvi posojeni v Kobilarno Lipica.

Preglednica 3: Opazovane živali

Opazovana žival	Oče	Mati
331 Conversano Bonadea XXVI	010 C. Monteaura XI*	129 Bonadea XXVI
282 Siglavy Capriola XXV	738 S. Steaka XI*	014 Capriola XXV
235 Pluto Samira XVIII	843 P. Gaetana XV*	934 Samira XVIII
919 Siglavy Allegra XXVI	324 S. V. Africa 7*	527 Allegra XXVI*
532 Pluto Strana XI	235 P. Samira XVIII	158 Strana XI
485 Conversano Wera XXII	001 C. Capriola XIV*	152 Wera XXII
129 Bonadea XXVI	596 M. Allegra XXII*	931 Bonadea XVII*
934 Samira XVIII	321 F. Dubovina IV*	730 Samira XVI*
014 Capriola XXV	662 C. Wera III*	49 Calcedona*
245 Allegra XLIX	738 S. Steaka XI*	082 Allegra XLVI
082 Allegra XLVI	733 M. Wera IV*	883 Allegra XLII*
158 Strana XI	001 C. Capriola XIV	724 Strana I*
402 Batosta XXXI	204 C. VI Gaetana*	095 Batosta XII
095 Batosta XII	859 N. Allegra XXVI*	914 Batosta VII*
345 Dubovina XXX	919 S. Allegra XXVI	6 Dubovina
6 Dubovina	706 P. Wera IV*	751 Dubovina XXII*
355 Dubovina XXXI	502 C. Mara VII-3*	969 Dubovina XXV*
152 Wera XXII	596 M. Allegra XXII*	766 Wera XII*

* konji, ki jim kri ni bila odvzeta



Slika 8: Primer depigmentacije pri 485 Conversano Wera XXII (foto Pipan, 2008)



Slika 9: Primer depigmentacije pri 532 Pluto Strana XI (foto Pipan, 2008)

Žrebček 485 Conversano Wera XXII je rojen leta 2005, potomec žrebeca 001 Conversano Capriola XIV in kobile 152 Wera XXII (slika 8). Isti žrebec je prednik kobile 158 Strana XI, ki je mati žrebčka rojenega leta 2006, 532 Pluto Strana XI (slika 9).

Pipan R. Lokus za barvo dlake pri lipicancih.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko, 2009



Slika 10: Vranec 331 Conversano Bonadea XXVI (foto Pipan in Slavič, 2008)

Plemenska kobila 129 Bonadea XXVI je po opisu barve dlake grahasta sivka, grahasti vzorec je izredno izrazit (slika 11), njen potomec 331 C. Bonadea XXVI je vranec (slika 10).



Slika 11: Plemenska kobila 129 Bonadea XXVI (foto Slavič, 2007)



Slika 12: Žrebica 402 Batosta XXXI (foto Slavič, 2007)



Slika 13: Plemenska kobila 095 Batosta XII (foto Slavič, 2007)

Plemenska kobila 095 Batosta XII (slika 13) je mati žrebice 402 Batosta XXXI letnika 2003 (slika 12), ki je ostala rjavka. Prav tako je 095 Batosta XII imela v letu 2008 vrano potomko 589 Batosta XXXIX.

3.2 IZOLACIJA DNA IZ KRVI

DNA smo izolirali iz vseh osemnajstih vzorcev krvi. 200 µl krvi smo dodali 800 µl TE pufra in centrifugirali pri 15000g dve minuti. Postopek smo ponovili šestkrat, vedno smo po končanem centrifugiranju previdno odlili supernatant. Resuspendirano usedlino, ki smo ji dodali 200 µl pufra za lizo in 4 µl proteinaze K smo nato pustili čez noč pri 42°C. Po inkubaciji smo vzorcem dodali 230 µl PCI (fenol:kloroform:izo-amil alkohol v razmerju 25:24:1), ter dobro premešali na Vortex mešalcu. Po centrifugiranju (11 minut na 14000g) smo zgornjo fazo odpipetirali in prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirke, kjer smo vzorcu dodali 500 µl 96% etanola ohlajenega na -20°C. Reagenčno posodico smo nato narahlo obračali. Le pri dveh od osemnajstih vzorcev je prišlo do nastanka oborine. Vzorce smo pustili za eno uro na 20°C. Vzorce smo nato centrifugirali 10 minut na 10000g in odlili etanol. Dodali smo 500 µl 70% etanola in ponovno centrifugirali 7 minut na 10000g. Po odlitju etanola smo pustili reagenčne posodice 30 minut odprte, da je izhlapel alkohol. Oborino smo nato ponovno centrifugirali 1 minuto na 10000 g, ter odpipetirali odvečne kapljice. Oborini smo nato dodali 20 µl bidestilirane vode in jo shranili za en dan na 4°C. Degradacijo in koncentracijo DNA smo naslednji dan preverili na 0,8% agaroznem gelu.

3.2.1 Preverjanje kakovosti izolacije DNA

Uspešnost izolacije smo preverili z elektroforezo na agaroznem gelu. S to metodo poteka ločevanje molekul DNA po velikosti. Barvilo SybrSafe interkalira med nukleotide DNA ter tako omogoči opazovanje DNA, saj fluorescira pri svetlobi okrog 300 nm.

Za pripravo gela smo potrebovali kalup za vlivanje gela, 0,8g agaroze (Seakem LE Agarose, Lonza) na 100 ml 0,5x TBE pufra (50mM Tris, 50mM borne kisline, 1mM EDTA). Raztopino agaroze smo raztopili s segrevanjem do vretja v mikrovalovni pečici. Po ohladitvi pod 60°C smo dodali 0,15 µl 10000x SybrSafe (Invitrogen) ter raztopino prelili v kalup.

Po dobre pol ure, ko se je gel ohladil smo nanesli 3 µl vzorca DNA, ki smo mu dodali še 2 µl aplikacijskega pufra, ki je vseboval 0,25 % bromfenol modrega, 0,25% ksilen cianola in 30% glicerola v vodi.

Pod napetostjo 100V pri sobni temperaturi je elektroforeza tekla v 0,5x TBE pufru približno dvajset minut. Elektroforetske frakcije smo po poteku dvajsetih minut pregledali pod transluminatorjem in fotografirali.

3.3 PREVERJANJE POREKLA Z MIKROSATELITNO ANALIZO

Za analizo smo izbrali pet polimorfnih mikrosatelitnih lokusov (HTG4, HMS3, HMS6, HMS7 in UDC437) iz seta mikrosatelitov, ki se običajno uporabljajo za preverjanje starševstva pri konjih; po priporočilih mednarodnega združenja za animalno genetiko ISAG. Izbrane mikrosatelitne lokuse smo najprej pomnožili s pomočjo PCR reakcije.

Eden od začetnih oligonukleotidov je bil označen s fluorescentnim barvilom, tako da smo mikrosatelitno analizo lahko izvedli na aparatu ABI PRISMTM, ki avtomatsko analizira fragmente nukleinskih kislin (Achmann, 2004). Okrog 1 µl PCR produktov smo raztopili v formamidu. Vsem vzorcem je bil dodan še velikostni standard Rox350. Vzorce smo denaturirali 2 minuti na 94°C in takoj ohladili na ledu. Sledila je kapilarna elektroforeza in laserska detekcija na aparatu ABI PRISMTM in tipizacija (Achmann in sod., 2004).

3.4 DOLOČANJE GENOTIPOV, POVEZANIH S SIVENJEM

3.4.1 Genotipizacija 4,6 kb dolge duplikacije v intronu 6 gena *STX17*

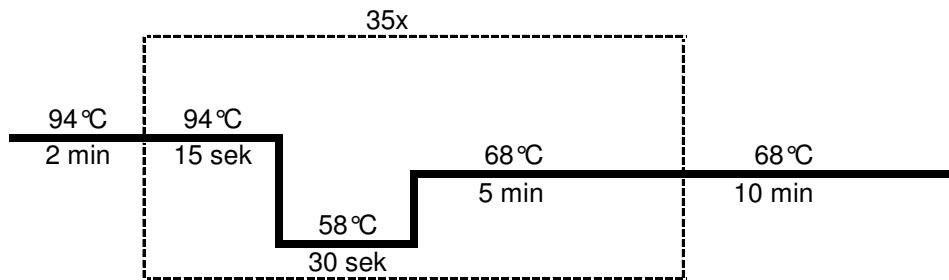
Analize osivelosti, ki so povezane s 4,6 kbp dolgo duplikacijo v intronu 6 nuklearnega receptorja *STX17* so Rosengren Pielberg (2008) izvedli s PCR analizo dolgih fragmentov s tremi začetnimi oligonukleotidi hkrati v PCR reakciji. Za analizo smo potrebovali *DUPForward*, ter *DUPReverseD*, za duplikacije in *DUPReverseN* za normalno odseke DNA brez duplikacije.

- *DUP Forward*: GGAACATAAAGTAGATTGGTGGAAAG
- *DUP ReverseD*: TTCCAATTCTGAGATTTGCATTTCTAA
- *DUP ReverseN*: TTCTGATAAAATGCATAAACCCACGTAAC

Za vsak vzorec smo potrebovali:

- 2,0 µl 10x PCR pufra s vključenim MgCl₂
- 4,0 µl dNTP (0,5mM)
- 0,375 pmol *DUPForward* (10 µM)
- 0,25 pmol *DUPReverseD* (10 µM)
- 0,50 pmol *DUPReverseN* (10 µM)
- 12,9 µl vode
- 1,0 µl vodne raztopine DNA (okrog 50 ng)
- 0,2 µl *Long PCR Polymerase* (Fermentas)

PCR smo izvedli v cikličnem termostatu PTC-100 (MJ Research) s programom kot je prikazan na sliki 14.



Slika 14: Potek PCR programa

3.5 KARAKTERIZACIJA KRAJŠIH FRAGMENTOV V BLIŽINI LOKUSA G NA KROMOSOMU 25

Rosenberg Pielberg (2008) so v svojem članku predstavili tudi tabelo z mutacijami, ki so značilne za siv haplotip in za ne-siv haplotip v bližini G- lokusa na kromosomu 25 (pregl. 4). Potrjeni enojni nukleotidni polimorfizmi ne- sivega haplotipa so opisani v drugem stolpcu preglednice 4, v prvem pa so predstavljeni polimorfizmi, značilni za sivce.

Preglednica 4: Nukleotidni polimorfizmi v bližini G-lokusa na kromosomu 25 (Rosengren Pielberg, 2008)

Pozicija nukleotida	Alel	
	sivi	ne-sivi
28,705,599	C	A
28,714,029	G	C
28,737,621	A	G
28,737,662	C	A
28,737,686	A	G
28,737,687	C	T
28,737,703	A	G
28,737,715	G	A
28,737,735	T	C
28,742,717	-	C
28,742,934	A	G
28,814,249	T	C
28,814,366	A	G
28,814,498	A	G
28,816,472	C	T
28,816,683	G	A
28,822,882	G	T
28,822,982	A	G
28,823,110	T	C
28,823,179	C	A
28,824,083	T	C
28,826,597	T	C
28,829,218	C	T
28,840,308	G	T
28,857,453	A	C
28,858,334	T	A
28,876,901	A	G
28,878,707	C	T

* obarvano s sivo (za G lokus kritično območje)

Na podlagi podatkov iz preglednice 4 smo izbrali dva odseka znotraj genomske DNA. Točkovne mutacije, ki jih odseka zajemata, so označene v preglednici 4 z modro (*STX17*-prvi odsek) oziroma z zeleno barvo (*STX17*-drugi odsek). Prvi odsek je sicer nekoliko izven kritičnega območja za G-lokus, medtem, ko je drugi odsek znotraj kritičnega območja, povezanega s sivenjem. Oba odseka sta bila prvenstveno izbrana zato, ker zajemata veliko mutacij na relativno kratkem odseku. Začetna oligonukleotida za prvi odsek smo torej konstruirali znotraj območja 28,737,208-28,737,775 nt na 25 kromosому (priloga A). Za drugi odsek smo izbrali odsek 28,822,669-28,823,362 nt, ki skupno obsega

693 bp (priloga B). V obeh primerih so označeni začetni oligonukleotidi, s katerimi lahko pomnožimo tarčne odseke. Začetne oligonukleotide smo konstruirali s pomočjo programa Primer3.

- STX17G-1F: 5'- AGT GCT GGT TGC TAGGCT TC- 3'
- STX 17G-1R: 5'- TTC CAG GAA TCA GGA AAT GC- 3'
- STX 17G-2F: 5'- CAA AGC TGA AGC CAA AAA GG- 3'
- STX 17G-2R: 5'- CGA TGC CCT AAA GCT TGA AC- 3'

Za vsak vzorec smo potrebovali:

- 2,5 µl 10x PCR
- 1,25 µl dNTP (10 µM)
- 0,125 µl STX 17G-1F (10 µM)
- 0,125 µl STX 17G-1R (10 µM)

oziroma

- 0,125 µl STX 17G-2F (10 µM)
- 0,125 µl STX17G-2R (10 µM)
- 1,5 µl MgCl₂ (25mM)
- 17,25 µl vode
- 1,0 µl DNA vzorca
- 0,15 µl *Taq* polimareze (Fermentas)

3.5.1 Določanje nukleotidnega zaporedja

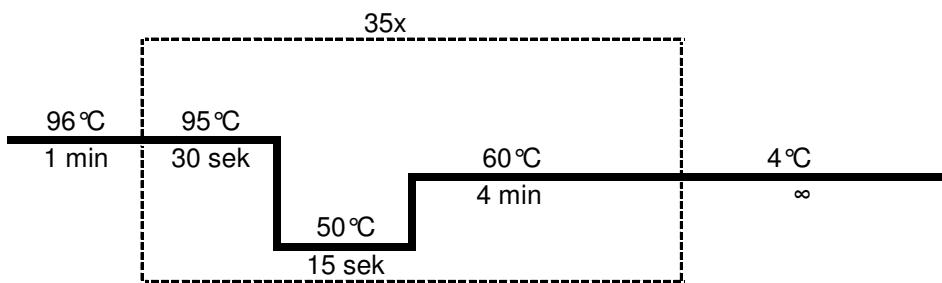
Čiščenje PCR produktov je potrebno za podrobnejšo analizo nukleotidnega zaporedja. Uporabili smo encima Exol in SAP (Fermentas). PCR produktom (4,5 µl) smo dodali 0,3 µl ExoI in 0,6 µl SAP ter 0,6 µl vode. Po 45. minutni inkubaciji na 37°C, ko so se primerji razgradili, smo inkubirali še 15 minut na 80°C za deaktivacijo encimov.

3.5.2 Sekvenčna reakcija

Za eno reakcijo potrebujemo:

- Začetni oligonukleotid (Forward ali Reverse) 0,5 µl
- Big Dye 1,5 µl
- 6 µl očiščenih PCR produktov
- vodo dodamo do 10 µl

Sekvenčno reakcijo smo izvedli v cikličnem termostatu (Perkin Elmer) s programom, ki je prikazan na sliki 15.



Slika 15: Potek programa HEL2 za sekvenčne reakcije

3.5.3 Precipitacija ali čiščenje produktov sekvenčne reakcije

V 1,5 ml reagenčno posodico smo dodali 25 µl 96% etanola in 1 µl 3M raztopine Na-acetata s pH 4,6. Dodamo 10 µl sekvenčne reakcije in vse skupaj vorteksiramo. Inkubiramo 15 minut v temi na sobni temperaturi, nato centrifugiramo 20 minut na 20500g in odpipetiramo supernatant. Peletu dodamo še 250 µl 70% etanola in centrifugiramo 5 minut na 20500g. Sledi še denaturacija na 94 °C za 2 minut. Vzorce po denaturaciji damo za nekaj minut na led. Tako pripravljene vzorce lahko vstavimo v aparat ABI Prism, kjer poteka avtomatsko sekvenciranje vzorcev.

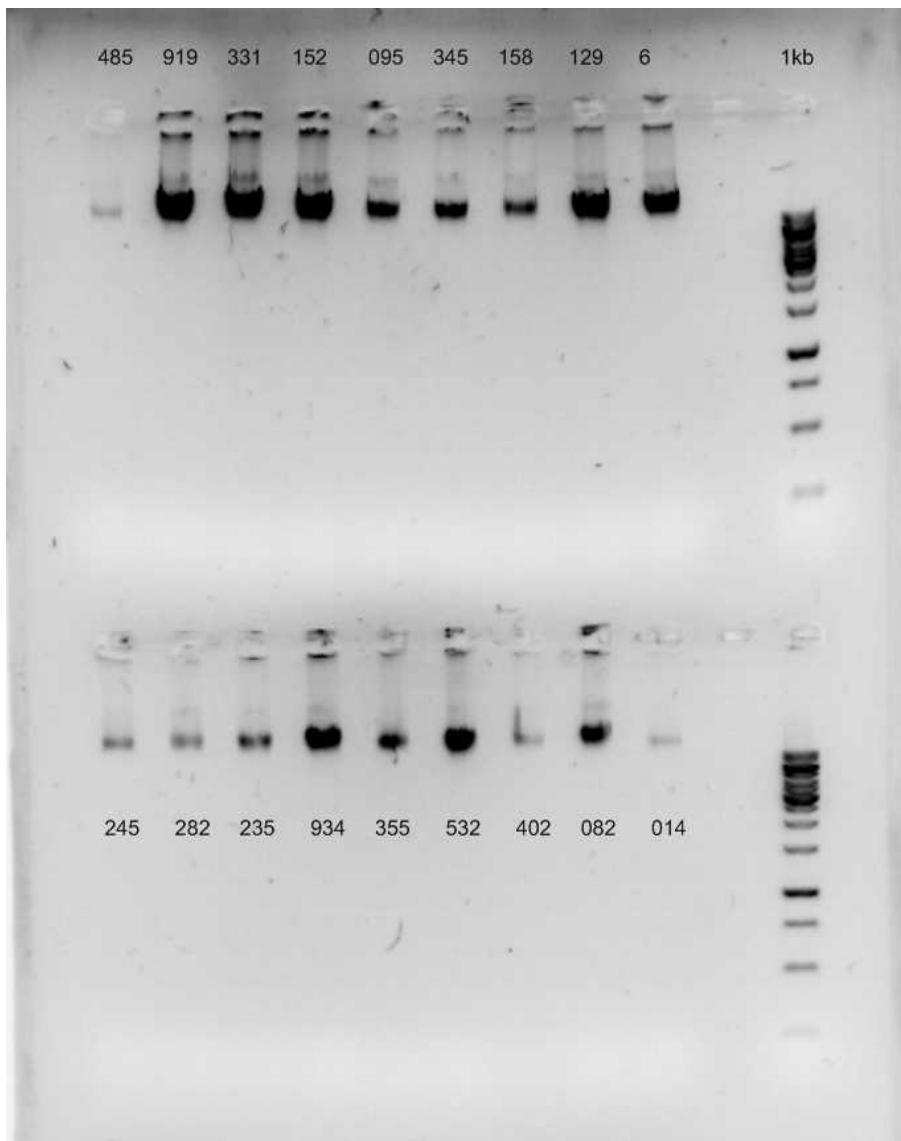
3.5.4 Ureditev sekvenc s programom Chromas Lite

Sekvence uredimo s programom Chromas Lite, ki omogoča pregled kromatogramov in ročno editiranje sekvenc.

4 REZULTATI IN DISKUSIJA

4.1 PREVERJANJE IZOLACIJE DNA NA AGAROZNEM GELU

Uspešnost izolacije DNA smo preverili na 0,8% agaroznem gelu. Prikaz poteka elektroforeze po 120 minutah delovanja je prikazan na sliki 16. Za nadaljnje raziskave smo pripravili delovne raztopine DNA tako da smo jih redčili s 40 µl – 60 µl vode.



*številka predstavlja žigosno številko opazovane živali iz preglednice 3. Dodan je še velikostni standard 1kb GeneRuler (Fermentas)

Slika 16: Preverjanje uspešnosti izolacije DNK na agaroznem gelu

4.2 MIKROSATELITI

Testirali smo poreklo vsakega od osemnajstih vzorcev s petimi mikrosateliti HMS7, HMS3, HTG4, UCD437 in HMS6 (pregl. 5). Aleli so poimenovani po priporočilih mednarodnega združenja ISAG s črkami abecede. Vsak potomec prejme en alel od očeta in enega od matere. V preglednici 5 predstavljamo rezultate analize mikrosatelitnih lokusov konj, ki smo jih vključili v raziskavo in ki so še prisotni v Kobilarni Lipica. Genetski laboratorij od leta 2000 analizira mikrosatelite za žrebata tekočega leta, tako smo lahko dobili podatke tudi za prednike (starše) konj, ki niso več živi. Ugotovili smo, da se mikrosateliti potomcev ujemajo z mikrosateliti njihovih prednikov. Pri konju 485 Conversano Wera XXII nismo dobili rezultatov vseh mikrosatelitov. Sklepamo, da je med postopkom prišlo do napake, kljub temu pa delni rezultati niso v opreki z rodovniškim porekлом te živali.

Preglednica 5: Rezultati mikrosatelitne analize pri konjih, vključenih v raziskavo

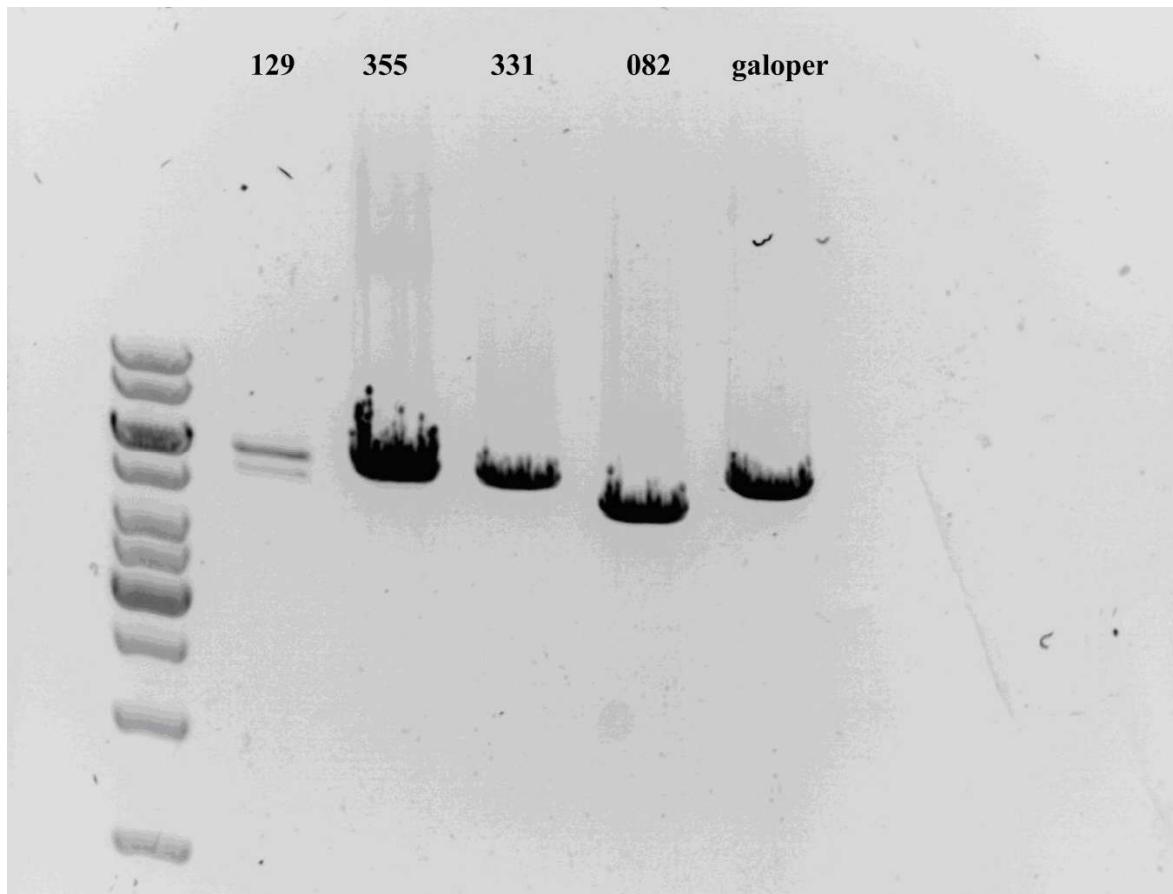
Mikrosatелит Konj*	HMS7	HMS3	HTG4	UCD437	HMS6
014	-	N	KM	M	KP
082	JN	MN	K	M	LP
095	LN	PR	KM	M	LP
129	L	NP	MN	M	L
152	L	P	NP	MP	LP
158	LO	M	K	MP	L
235	LN	N	K	KM	L
245	N	MR	K	M	L
282	KN	LR	KM	M	LP
331	L	MN	KM	M	L
345	JN	NP	K	M	LP
355	L	IM	KM	KP	MP
402	NQ	PR	M	M	LP
485	LQ	NP	-	-	-
532	L	M	K	MP	L
6	N	NR	K	MP	LP
919	J	NP	KM	M	P
934	LN	M	K	MP	LM

*številka predstavlja žigosno številko opazovane živali iz preglednice 3

4.3 GENOTIPIZACIJA 4,6 KB DOLGE DUPLIKACIJE V INTRONU 6 GENA *STX17*

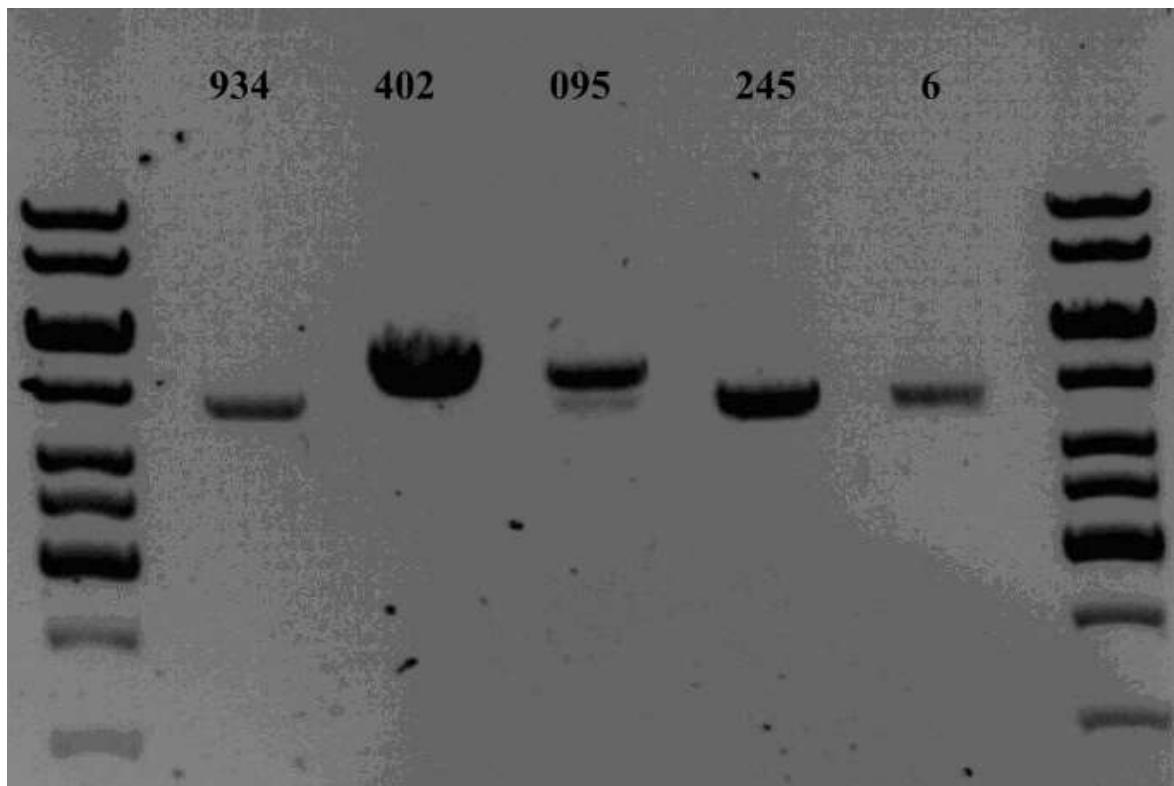
Genotipizacijo 4,6 kbp dolge duplikacije v intronu 6 gena *STX17* smo izvedli s PCR analizo dolgih fragmentov s tremi začetnimi oligonukleotidi hkrati v PCR reakciji. Enako kot je opisano v članku Rosenberg Pielberg (2008). Lokacija začetnih oligonukleotidov znotraj introna 6 je prikazana v prilogi C za siv haplotip in v prilogi D za ne-siv haplotip.

Pri ne-sivih konjih smo tako pričakovali samo 5414 bp dolg fragment, pri homozigotnih sivih konjih pa dva fragmenta (4866 bp in 9964 bp). Rezultati ločevanja fragmentov na agaroznem gelu (slika 17 in 18) so potrdili amplifikacijo 5415 bp fragmenta pri vrancih in rjavih lipicancih ter pri galoperju (naši pozitivni kontroli za ne-siv haplotip). Omenjeni konji so brez duplikacije na opazovanem lokusu. Pri vseh sivih lipicancih smo dobili samo fragment 4866 kar kaže na to, da kljub večim poskusom in optimizaciji PCR reakcij nismo uspeli pomnožiti fragmenta v dolžini 9964. Kar pa v bistvu ne vpliva na samo genotipizacijo. S fragmenti, ki smo jih uspeli pomnožiti lahko določimo ali je osebek siv ali ne-siv. Potrdili smo lahko tudi naša pričakovanja glede obeh plemenskih kobili, ki sta fenotipsko grahasti sivki. Pri obeh smo našli tako 4866 in 5414 bp dolg fragmenta (vzorec 129 na sliki 17 in vzorec 095 na sliki 18). Fenotipsko se torej heterozigoti izražajo kot grahasti sivci (slika 17).



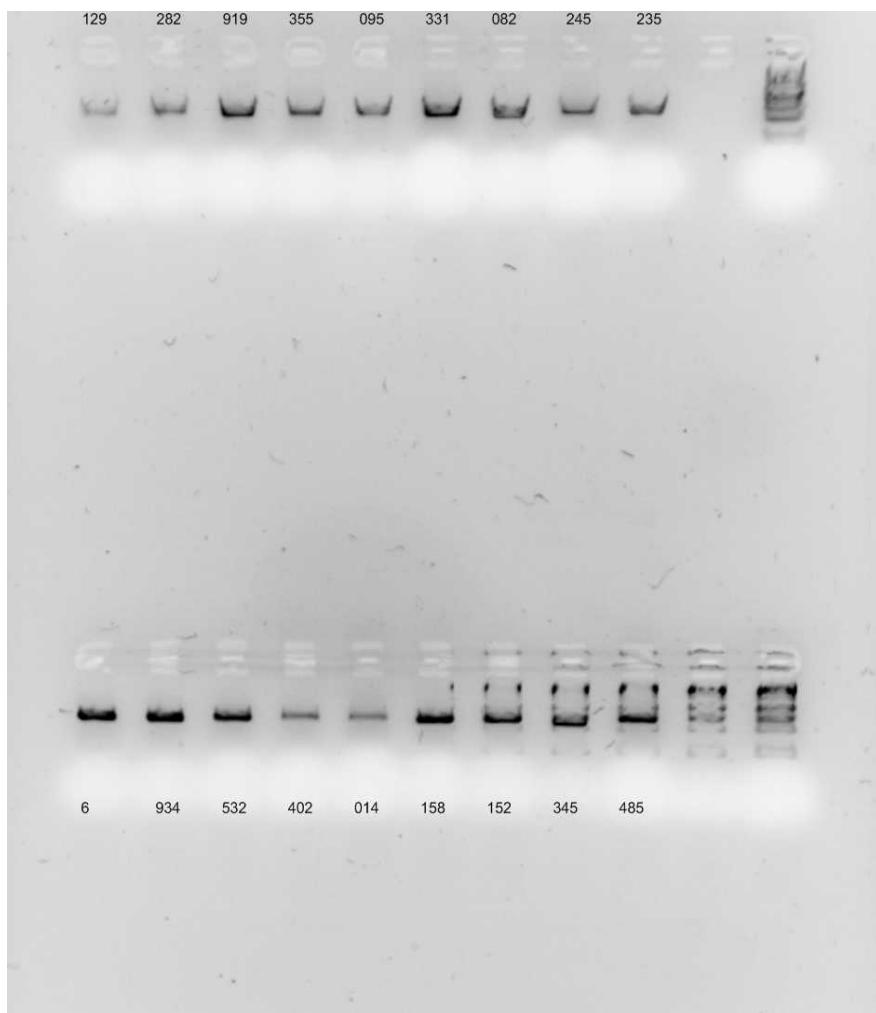
*številka predstavlja žigosno številko opazovane živali iz preglednice 3

Slika 17: PCR podvojene regije gena *STX17* (sintaksin 17) z začetnimi oligonukleotidi DUP (1)



Slika 18: PCR podvojene regije gena *STX17* (sintaksin 17) z začetnimi oligonukleotidi DUP (2)

4.4 ANALIZA TOČKOVNIH MUTACIJ V OBMOČJU LOKUSA *STX17*

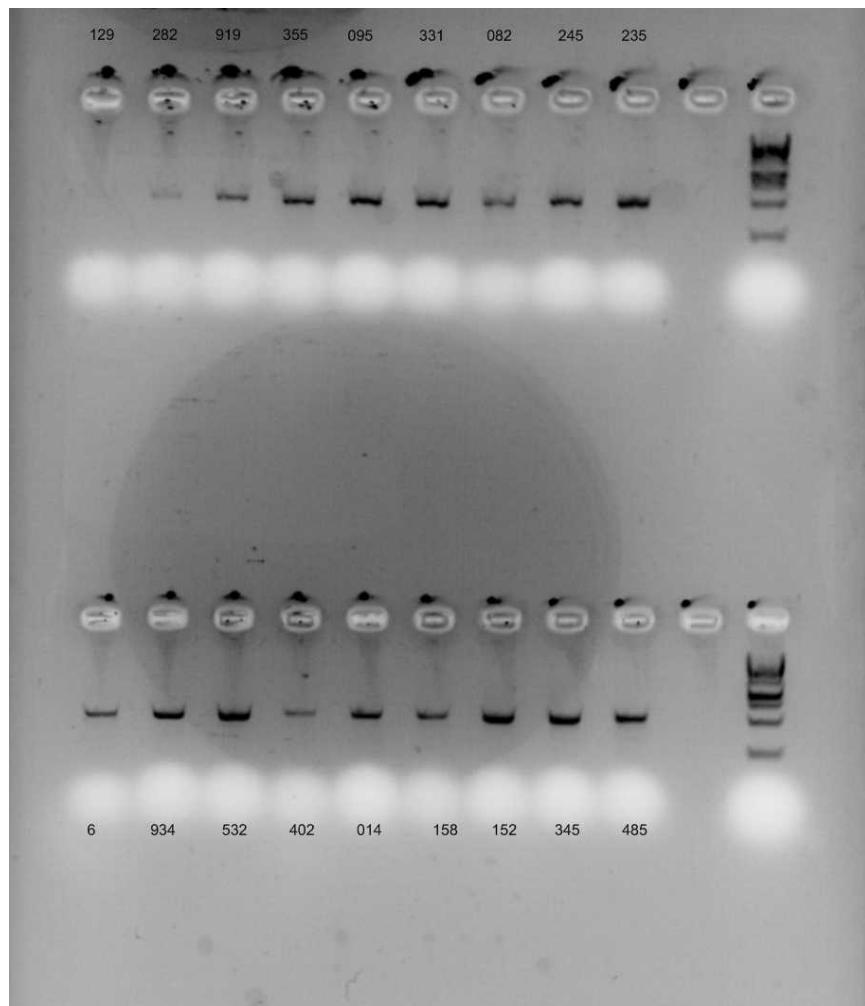


*številka predstavlja žigosno številko opazovane živali iz preglednice 3

Slika 18: PCR produkti prvega odseka v okolini lokusa *STX17* (28,737,621 - 28,737,735)

Odseka sekvenc za izbiro začetnih oligonukleotidov sta bila izbrana na podlagi rezultata, da je na izredno kratkem odseku pri okrog 500 bp največje število mutacij. Analiziranje krajših odsekov pa je relativno lažje od analiziranja daljših odsekov.

Za začetni prvi odsek smo izbrali odsek 28,737,208-28,737,775. Skupno območje obsega opazovanega odseka primerja je 568 bp. Po poteku PCR reakcije smo uspešnost reakcije preverili na agaroznem gelu (slika 18).



*številka predstavlja žigosno številko opazovane živali iz preglednice 3

Slika 19: PCR produkti drugega odseka v okolini lokusa *STX17* (28,822,669-28,823,362)

Za drugi odsek smo izbrali odsek 28,822,669-28,823,362, skupno območje obsega opazovanega primerja je 693 bp. S pomočjo agaroznega gela smo preverili potek uspešnosti PCR reakcije (slika 19).

4.5 SEKVENCIRANJE

Preglednica 6: Polimorfna mesta pri opazovanih živalih, odsek 1

polimorfna mesta	28,737,621	28,737,626	28,737,630	28,737,669	28,737,670
žival					
129	a	t	a in g	c	a
282	a	c	g	c	a
919	a	c in t	a in g	a in c	a in c
355	a in g	c	g	a	a
95	a in g	c in t	a in g	a	a in c
331	a in g	c in t	g	a in c	a
82	a	c in t	a in g	a in c	a in c
245	a	c	g	c	a
235	a	c		c	a
6	a	c in t	a in g	a in c	a in c
934	a	c	g	c	a
532	a	c	g	c	a
402	a in g	c in t	g	a in c	a
14	a	c	g	c	a
158	a	c in t	a in g	a in c	a in c
152	a	c in t	a in g	a in c	a in c
345	a	c in t	a in g	a in c	a in c
485	a	t	a	a	c
galoper	a in g	c	g	c	a

Začetni oligonukleotidi so bili določeni glede na podatke v preglednici 4.

Odsek 1 obsega območje med 28,737,621 in 28,737,670, ki je nekoliko oddaljeno od lokacije, ki je povezana s sivenjem. Rezultati tako potrjujejo, da je lokacija preveč oddaljena in zato ni tesne povezave med sivenjem in alelno varianto, ki je določena za to območje. Za primerjavo smo dodali konja, ki ni lipicanec, je pa rjave barve.

Fenotipsko so omenjeni lipicanci, ki so prikazani v preglednici 6:

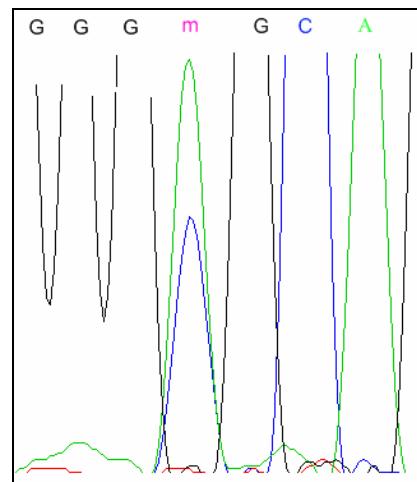
- 919 Siglavy Allegra XXVI sivec
- 355 Dubovina XXXI rjavka
- 095 Batosta XII grahasta sivka
- 331 Conversano Bonadea XXVI vranec
- 158 Strana XI sivka
- 152 Wera XXII sivka
- 345 Dubovina XXX vrana sivka

➤ 485 Conversano Wera XXII sivec

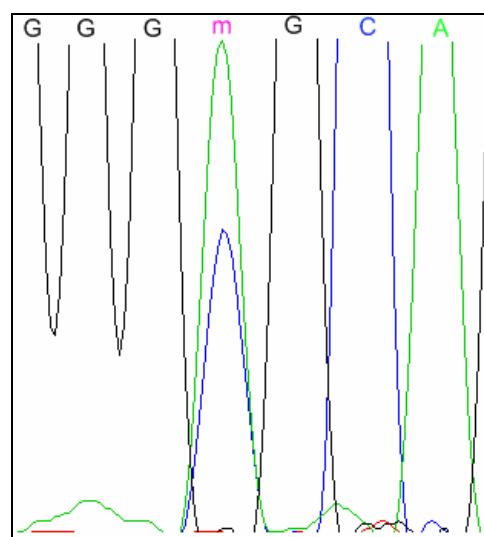
Preglednica 7: Polimorfna mesta pri opazovanih živalih, odsek 2

polimorfna mesta	28,822,882	28,822,982	28,823,110	28,823,179
žival				
129	g	a	t	c
282	t in g	a in g	c in t	c in a
919	g	a	t	c
355	g	a	t	c
95	t in g	a in g	c in t	c in a
331	g	a	t	c
82	t in g	a in g	c in t	c in a
245	g	a	t	c
235	g	a	t	c
6	g	a	t	c
934	g	a	t	c
532	g	a	t	c
402	g	a	t	c
14	t in g	a in g	c in t	c in a
158	g	a	t	c
152	g	a	t	c
345	g	a	t	c
485	g	a	t	c
galoper	g	a	t	c

Odsek 2 je na območju lokacije sivenja in sicer med 28,822,669 in 28,823,362, skupno 693 bp. Rezultati v preglednici 7 potrjujejo, da je odsek 2 tesno povezan s sivenjem, saj se rezultati v veliki meri ujemajo z fenotipskim stanjem živali. Na podlagi podatkov lahko ugotovimo, da je odsek 2 dokaj dober genetski označevalec za sivenje, ni pa popolnoma zanesljiv. Opazovani lipicanci, ki imajo na določenem območju dve različni zaporedji (so heterozigoti) so ali sami temni ali imajo temne potomce. Sekvence za konja 331 Conversano Bonadea XXVI (slika 20) in 402 Batosta XXXI (slika 21) na odseku 28823179 so predstavljene na slikah. Na mestu 28822882 je pri sivih konjih vedno nukleotid G, na 28,822,982 A, na 28,823,110 T in na 29923179 C. Medtem ko pri nesivih konjih zasledimo tako varianto značilno za sive, kot varianto T na 28,822,882, G na 28,822,982, C na 28,823,110 in T na 29,923,179. Pri grahastih sivkah smo tako pri eni (095 Batosta XII) našli samo varianto značilno za sivce, pri drugi (129 Bonadea XXVI) pa obe varianti. Varianto, ki je značilna za sive, smo našli tudi pri galoperju (vzetemu za kontrolo za nesiv haplotip). Značilna je tudi za referenčno zaporedje (kobila Twilight pasme Thoroughbred).



Slika 20: Sekvenca na območju 28,823,179 za konja 331 Conversano Bonadea XXVI



Slika 21: Sekvenca na območju 28,823,179 za konja 402 Batosta XXXI

5 SKLEPI

V naši raziskavi smo analizirali 18 vzorcev krvi lipicanskih konj Kobilarne Lipica. Na podlagi opravljenih analiz smo prišli do naslednjih sklepov:

- ❖ povzročanje sivenja s starostjo je dominantna avtosomalna lastnost, povezana z visokim deležem pojavljanja melanomov in z depigmentacijo sivih osebkov
- ❖ potrdili smo ugotovitve, Rosengren Pielberg in sod., da osivelost povzroči 4,6 kbp dolga duplikacija v intronu 6 nuklearnega receptorja *STX17*, ki deluje kot cis-regulatorna mutacija
- ❖ pred analizo nukleotidnega zaporedja je priporočljivo analizirati mikrosatelite in potrditi starševstvo
- ❖ veliko točkastih mutacij je na dveh kratkih odsekih v okolini sintaksinskega lokusa, od katerih je en odsek v dolžini 500 bp tesno povezan s fenotipom sivenja
- ❖ z genotipizacijo z začetnimi oligonukleotidi *DUP* smo potrdili, da so grahasti sivci tudi heterozigoti
- ❖ pri rjavcih in vrancih, ter pri grahastih sivcih smo potrdili, da imajo intron 6 brez duplikacij, sivci imajo samo intron 6 z duplikacijo
- ❖ SNP-ji v bližini lokusa za sivenje na drugem odseku so zelo povezani s sivenjem, ne pa popolnoma; pri sivcih najdemo vedno enako sekvenco, pri rjavcih in vrancih po eno kopijo značilno za rjavce ali vrance, po eno kopijo značilno za sivce, pri grahastih sivcih pa se ponekod pojavljajo sekvene sivih, ponekod pa po ena kopija značilna za rjavce ali vrance, ter po ena kopija značilna za sivce
- ❖ genotipizacija z začetnimi oligonukleotidi DUP je zanesljivejša od metode sekvenciranja, saj natančno pokaže genetski vzrok za sivo barvo dlake
- ❖ rezultati diplomske naloge lahko pripomorejo k lažji izvedbi vsakoletnih pripustnih planov v lipicanskih kobilarnah in pomoč pri uvozu novih živali za osvežitev reje z genetskega stališča

6 POVZETEK

Namen diplomske naloge je bil podrobneje analizirati G-lokus za barvo dlake pri lipicancih v Kobilarni Lipica. Analizirali smo 18 osebkov, od tega sta dva osebka rjavca, en vranec, trije sivci in dva sivca z očitnimi depigmentacijami po telesu, drugi osebki so njihovi predniki. Predniki omenjenih konj so fenotipsko večinoma sivci ali grahasti sivci, kljub temu pa v delu analiz kažejo heterozigoten genotip.

Lipicanski konj je slovenska avtohtona pasma, ki se je oblikovala in razvijala že od leta 1580, ko je Karel Avstrijski ustanovil dvorno kobilarno v kraškem predelu pri Trstu (Rus, 2005). Dandanes je dovoljena le reja čistopasemskeih plemenskeih živali. Populacija je zaprta in križanja niso dovoljena (Rus, 2005). Lipicanska pasma je maloštevilna in razpršena ter velja za ogroženo v smislu ohranjanja zadostnega števila živali za zagotavljanje genetske raznovrstnosti in ohranjanja pasemskeih značilnosti. Zato so tudi raziskave s področja dedovanja barve pri Lipicanskih konjih izrednega pomena.

Po barvi dlake lipicanske konje uvrščamo med sivce. Sivci se vedno rodijo temni, oznaka rjavi, lisičji ali vranji sivec predstavlja barvo ob rojstvu. Pri sivcih je z vsako menjavo dlake bela barva jasnejša, pri približno desetih letih je bela barva popolnoma izražena. Po telesu se lahko kažejo večje ali manjše temne lise, v tem primeru govorimo o jabolčastih, postrvjih ali muhastih sivcih (Werner, 1991).

Sivenje je povzročeno s starostjo, povzroči ga 4,6 kb dolga duplikacija v 6 intronu gena *STX17*, ki deluje cis-regulatorno in je dominantna autosomalno kodirana lastnost povezana z visokim deležem pojavljanja melanomov in depigmentacijo, ki jo taki osebki imajo. Mutacija vpliva tudi na izrazito poudarjenost melanomov pri sivcih. V melanomih sivcev so zasledili povečano izražanje *STX17* v primerjavi z bližnjim genom *NR4A3*.

Analize osivelosti, ki so povezane s 4,6 kbp dolgo duplikacijo v intronu 6 nuklearnega receptorja *STX17* so Rosengren Pielberg (2008) izvedli s PCR analizo dolgih fragmentov s tremi začetnimi oligonukleotidi hkrati v PCR reakciji. Za analizo smo potrebovali DUPForward, ter DUPReverseD, za duplikacije in DUPReverseN za normalne odseke DNK.

Rosenberg Pielberg (2008) so v svojem članku predstavili tudi tabelo z mutacijami značilnimi za siv haplotip in za ne-siv haplotip v bližini G- lokusa na kromosomu 25 (pregl. 4). 4,6 kbp dolga duplikacija v intronu 6 nuklearnega receptorja *STX17* je povezana s sivenjem in smo jo določili z analizo PCR dolgih fragmentov s tremi začetnimi oligonukleotidi hkrati v PCR reakciji. Pri duplikacijah se del kromosoma podvoji. Pri tem sta bila odseka sekvenc za izbiro začetnih oligonukleotidov izbrana na podlagi rezultata, da je na izredno kratkem odseku pri okrog 500 bp največje število mutacij. Rjavci in vranci, pa tudi grahasti sivci imajo intron brez duplikacije, sivci pa imajo samo intron z duplikacijo.

Z genotipizacijo DUP začetnih oligonukleotidov smo potrdili, da so poleg vrancev in rjavcev heterozigoti tudi konji, ki so fenotipsko označeni kot grahasti sivci.

7 VIRI

Albino horse. 2008. Magnificent Albino Horse Grazing.

http://farm4.static.flickr.com/3148/3087319450_16b4c5a2b1_o.jpg (13. dec. 2009)

Achmann R., Curik I., Dovc P., Kavar T., Bodo I., Habe F., Marti E., Sölkner J., Brem G. 2004. Microsatellite diversity, population subdivision and gene flow in the Lipizzan horse. *Animal Genetics*, 35, 4: 285-292

Benić A. 2009. Udvostručen broj konjskih pasmina. *Vijesnik*, 3129: 16

Black horse. 2008. The Equinest.

<http://www.theequinest.com/images/black-horse.jpg> (17. dec. 2009)

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

Čurik I., Seltenhammer M., Sölkner J., Zechner P., Bodo I., Habe F., Marti E., Brem G. 2000. Inbreeding and Melanoma in Lipizzan Horses. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 65, 4: 181-186

Čurik I. 2008. Zašto konji sijede? Interno gradivo. Zagreb, Zavod za opće stočarstvo, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.

Dolenc M. 1980. Lipica. Ljubljana, Mladinska knjiga: 96 str.

Dovč P. 2005-2008. Genetika barve pri konjih. Interno gradivo. Domžale, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko.

Greying. 2009. The Horse Colors Site (8. jul. 2009).

http://www.horsecolor.com/white_mixed/grey.htm (18. jul. 2009)

Interno gradivo Kobilarne Lipica. 1991-2008. Lipica, Kobilarna Lipica.

Lipicanske pasme po svetu. 2008. EFABIS.

http://efabis_si.bfro.uni-lj.si/cgi-bin/EfabisWeb.cgi?sid=1e21abd1e2dad565d87b32f971c4ba0f,reportsreport8 (15. mar. 2008)

Hintz H.F., Van Vleck L.D. 1979. Lethal dominant roan in horses. *Journal of Heredity*, 70: 145-146

Kobilarne Lipica. 2008. Popis konj za letni pregled Kobilarne Lipica 2008. Lipica, Kobilarne Lipica: 17 str.

Kobilarne Lipica. 2009. Popis konj za letni pregled Kobilarne Lipica 2009. Lipica, Kobilarne Lipica: 39 str.

Pipan R. Lokus za barvo dlake pri lipicancih.

Dipl. delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Odd. za zootehniko, 2009

Marklund S., Moller M.J., Sandberg K., Andersson L. 1999. Close association between sequence polymorphism in the KIT gene and the roan coat color in horse. *Mammalian Genome*, 10: 283-288

QTS Gallant Ghost. 2008. Legends of Montana.

<http://www.spottedfawnpaints.com/Images/mandolinleft11.jpg> (15.dec. 2009)

Przewalski horse. 2008. It's nature.

<http://www.itsnature.org/wp-content/uploads/2008/03/przewalski1.jpg> (17. dec. 2009)

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 colour phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome*, 12: 450-455

Rieder S. 2009. Molecular tests for coat colours in horses. *Animal Breed Genetics*. 126: 415-424

Roan Hayes. 2005. Blue Roan Quarter Horse Stallion.

http://www.blueroans.com/catalog/images/1181564858_roan_hayes0h.jpg (15.dec. 2009)

Rosengren Pielberg G., Golovko A., Sundström E., Curik I., Lennartsson J., H Seltenhammer M., Druml T., Binns M., Fitzsimmons C., Lindgren G., Sandberg K., Baumung R., Vetterlein M., Strömberg S., Grabherr M., Wade C., Lindblad-Toh K., Pontén F., Hedin C-H., Sölkner J., Andersson L. 2008. A *cis*-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature Genetics*, 40, 8:1004-1009

Rus J. 2005. Rejski program Kobilarne Lipica za pasmo lipicanski konj. Lipica, Kobilarna Lipica: 49 str.

Trapečar B. 1991. Katalog vprašanj za jahalno šolo. Maribor, Konjeniška zveza Slovenije: 104 str.

Werner H. 1991. Pferde. Niedernhausen/Ts, Falken-Verlag GmbH: 160 str.

ZAHVALA

Moji zlati Mamici, ker itak ne bi bilo nič brez nje,
Miku, ki je stal vedno ob strani, predvsem zadnja dva tedna pred zagovorom,
Rwži, s katero sva prebrodile ogromno težav, na koncu pa diplomirale ena za drugo, kar
sem si vedno želeta.

Iskrena hvala tudi:

Sabini Knehtl, ker bi brez nje vsekakor mnogi, tudi jaz, izgubili voljo pred zaključkom,
Tatjani Kavar, ki je v poteku izvedbe diplomske naloge sicer prišla med zadnjimi, vendar
prispevala največ,
mentorju prof. dr. Petru Dovču, ki si je med drugim delom vzel čas in mi pomagal v
laboratoriju, ko nisem vedela kako naprej,
Petru Slaviču, ki me je spodbujal še mnogo pred zagovorom diplomske naloge in mi
pomagal pri mnogih vprašanjih,
dr.Ireni Marc, ki je najboljši človek na svetu,
ReGi, že ve ona zakaj.

Hvala tudi vsem ostalim, ki so mi, kakorkoli, v vseh pogledih, pomagali!

PRILOGE

Priloga A:

Začetni oligonukleotid 1 za izvedbo PCR reakcije s STX17G-1F in STX17G-1R

TAGGTGAAGCTACTTTAGACCTTATGAAGTTCTTCCTTCCCTAGTGGGATACTCTTT
TCCTTTGGTGTATGTAAGACAGTTGAATAAGGTCAGTGCTAGGTAACAGGATGCGTGTTC
ATTCTGTTCTGGCTAGTTCTGTATATGATCACTAGGGCTCAAGAATGCTTGAATGTT
TAAGCCTGGGACAGTGCTGGTGTAGGCTTCCTGGAACCCCTTAAATAGCAGGAGCAGCTAA
TTCTTCACTGAATTGCTTATTAGCTCTGATGAAACCCGGTCTTAAAGGACATTTCACTTGGG
TTATGGGTTTAATCAGAACACCCGTGTTCTGAAAAGGACATTTCACTTGGGAAAGTGTGG
AAAGGCACCTTCCCCCTGTGTGTGGCTCACTGATGCATTCTGTCTCTTATTCTAGGG
ACAAGCTCTGGGGGTCTGTGTCCGCTGGCTCTGCCTGAGTCCTCAGGTTGATGCTG
CACAGCCTGCGGGTGAACAGAGCTGGGCTGAGGAGCTCCCTGTTGAGGCTGCTTCGCC
TGCTGCTTCAGCACGACCCCTCAGGACTCACATGTTGACCAACGCCCTGGCAGCAGGT
CATCAAGAATATCATGGTAAGACGCATGGACGAGGCTCTACACTGTCAGTACTAGAGAGGATT
CATGGATAAGGCATGGGGGTCTCGGGGAGCCAGGCTTCTGTCATTTCCCTGATTCCCTGGA
ATTAAGCTCAGTATGGTACCTCCCAG

Priloga B:

Začetni oligonukleotid 2 za izvedbo PCR reakcije STX17G-2F in STX17G-2R

ACTGTCCCCGAACTGCATCTAAAGTGTATACAAACTAAGCCAGCTTAAGTTGGAAGGAAGTT
GAATGTGCAAGGGCACTGTGTGAGGAGAATGAGGGTGAGGAAGAGGTGACCAGAATAAAAGC
TTTAAATAGTAAGGCTGAGGATAGAGTAGAAAGGGACACACAAGCTGAAGCCAAAAAGGT
AAGCAGGACTAGATGACGAAAGGTGCCAGACTAAGGAGCCTGGACTTTCCCTGGGCTTCT
GAAGGACTACTGAAAGATTAAGCAAGCGGTGACACGAGAGAGGTCTGGCCAGATCACCT
CACACCGAAGGCAAAGCATGGAATTCTCCAGCCTCAGTTCCATATGACAAGTGAGG
AGGTTGGATTATGATCCAAAGGATCATCCAGCTTAATGTTCTTGACTCTATGATTCTAAGAAGC
AGAAGACCCACACTTACAGCTACTTCAAACACTAAGTATTCTAGCTGTCTCAACA
TAATTCTAATAATTCTATTCTTAAGCACAGGATGATAGTTTGAAATCTATTCTTCT
CTGACACAAAAATTCTATTCTGGGGCTGGGCCATGGTACGTTCGCGCGCTGG
GCTGCGCGGCCAGGGTTCACTGGTCAATCCTGGCGCAGACATGGCACCGCTTGTCA
CCATGCTGAGGTGGCACCCACATGCCACAAGTAGAAGGACCCACAGCTAAAATACACA
ATGTAAGGGGGCTTGGAGAAAAGGAAAATAAAATCTTAAAAAAATTCTTTCTA
GCATATTGAAGTCAAGCTTGGCATCGAGAAATGCTACCCATGGGAGGCAGCATGGT
GAATTGAGTGAGAATGTATTGGAACCAAGTCAGACTGGGTACTCACTGGCTGTATTACCA
TGAGTGTGTTACTCTCAAAGCCTGAGATTCTCACTGGTAA

Priloga C:

STX17 gen na lokaciji za sivenje na intronu 6

TGAGTATATACTGTTTGGCTCAGAGACGTTAGATTAATAGGATAAGAGGCTTTATAAATC
ACTAGGCTTTGATTAGGATTTAAATAGAAGTTACAATTGTAAGACTGGTATTGAACCATGG
TAGAAGTCTAACTGCTCTCAAATTCCAGATCAATTCAATAAACATTATAAGCACTTGTATAT
AAAAGGCAGTGTCTAGGTGCTTGCATTGGGATCTGACAAGGTTGGATAAAAGAAAGAAAGG
AAGCATGCTGCTGCCTTCAGGGTTACAGTGGTGGAGATATGCTTGGACCCCCAAAATGA
AATTCAAGTGTGATTGTTAAATGCAAAGACAAGGTATGAAGAGAAGTATTATCCGCTCCAAGG
GAAGGAGGCAGGGATTGTGAGGTGGAAGCGTCAAGGGTAGCTCACAAGATAGGTAGTTG
CTTAAGCCTGAAAAGTGAAGTAAAGTTCCGCAGGTGGAGAGAGAGGGAGTGCATTGAAGAAC
GCTGAACAAAGCCTGGAGTAGTGAAGTGTATGGCCTCCAGGAATGACAAGTCTGCAGTGT
ACCAAAGCACAAAGGTACCATGGGCAAGCAAAGCAGAGTGGCTGAGGGCCAGGTTAGATGG
CTGAAGGCCATACCAAGAATTGCACTTGTAGGCATTAAGGAGCCAATACAGGTTTGAGC
AGGTTAGAGTGATGTGATCCGTGTTCACTGTTAGGAGTCACTGTTAGCGGTATGAGTAATGG
CCTTAAGAGAGGAGGAGGTTAGGCAGGACAGCTAGTTAGGAGTCATTGCAAGAGTTGCACC

AAGAGCAATGGCAATACAAGTGTGAAGGTAAGGAGAGCTGAGAGGCATTCTGGGTGCACT
TATTAGGAATTGGAGGAAGATGAAAGAGTCAAAGATAAGAACATTAAAGGCTTATCGGCAT
AATCGGGTAGACAGTGATACTGTTAACATAGATTAG **GGAACATAAAGTAGATTGGTGGAAA**
GATAGATTTCTGTTATTTTAAATTATTCTTATTTCCTCCAGGAATTATGGGAAGG
TTGGATATGTGGATGTGTGTATATGTATGTACATAACAGGCTCGAGCCTGTTCTGCTTATGC
TTCTCTAGGTTAATTCTTGTGATCAGACTGTGATTGAGGGTTCGCGATCTTGAGTTA
GGGTTCCCTGACATCTGGCTTAAATTATAAGAAGTCCCAGATCACACAATCTCAGAATTGG
AATTGAACCTAAAGGACAACTAGCTAACCTCTGCTCTGCCAACCTCTCAAATAGATGGT
TTTGCCTCTTTGAACAATTACTGCAAGGATGCTTCTGCTTCAACCATTCCGTTTGAGGCTC
TAACTCCAGAAGTATTCTGTACACAGTAAGCTCTGCCCTGTGATAACTCCCTCTGGCACTT
TGGCCCTCTGGAGCCGTACTGAACAAATTGTGCTTCCCATATAAAATGTCTACTTTG
AGACCAACATTTCCCTCACCCACCCACTGATTTCTCTTAAGAACCCCTGA
CTGTCTAATGTGTTCTCTAGAATGTGATTCTAGTCTTTAGTACTGCCCTTACTCTGCTT
GTTTCTAGTTGTGGATTCTGAAATGTAATGCAAAAATTGAATGCAGTAAATTGTTAA
AGCGTTTCTTTGATGGCTTAAGTCAGAAAAAGCAAAATGTTGAAGTTATGGAGTAGA
TATCTGTACAATATATTAAATATTACGTATAAAAGGAATGATACAAGAACCTAAACTATT
TTTGTCTAGAATCAAGATTATTCAATTCTAACATCTGATCTAATGTAGTTTT
AAAATCTGTAATGTATGATTACACAAATATACATTGTCAAAAGTCATCAATATGTACACAT
TACAATGTGTGAGTTACAATGTATGTGATTATACCAATAAAATTGATTTAAAAACAAACTA
AACATGTATAAAGTTCTCTCATTCAAGACAAGTACGTTCCCTAGTGGGATAGACACATG
AAAGGAAAGTTAGGGTTGTGGCATGTAACAGTTACATATCCGATTAGTTACGTAAAGCAGC
TCCTAACCCCTAACATCTAAGGAGGTTCGTACAGGAAGACTTGGCCATAGCCATAGCTATACA
AATGTCCCTTTATAATAATCTGTAAGGACATGAGACGGAAATGCTATTAGGCAAAAGCTCAAAG
GAGAACCTCTGATTACTATCCCCAGGGTGACTIONGAGTTCTCGTGAACATGGTCAAGGATTAC
AGAACGCTCATTAGGCACCAATGACTTGGGAACATAACCAGAGTGACCACACATCCTCTCGT
TATCATCACATGGTACATGGTAGTATCTGGCCAATTAAACCGTGTGTTCTGGAGCACTTCTATG
CGCATAGTACTGTGCTAACGCTCCGTAAAAACAGAGAATGTTAAAAAGAACCTATAGGATG
GTCGCGTAGCTGCACAGCATGTTGATGCGTTAATGTTACTGAACTGTATATTAAAAGTGT
AAAAGTTCAAGTTTATGTTGCGTATTTTACCAATCAAAAAGAACCTTCAAGGCCCTG
GGAGATCCAGGTGTTCCAGTAGATGTGAAATAATTCTATCTACTAACGACCCCTGCATCGTC
TTCTCTGCCATTATTGCTCAAGTGCCTCTCTCTGTGACTGTGAAGCCAGCCTTATTTC
TAGTCAAGGGATGTAAGAACTGTGGCCAGTCGCTTAATAGCATGGCACCCCTGGTGTGGT
CCAGTTTGTCTCTCTTGCCTTATTCTTATGGCTTTATAATCTATTACTCTGGATGCATA
AAAATGGGTTGTGATGGATTAGATCAGATTCCCTATTATTACCTATGTGACCTTCGGGTAT
TGTGTTGACAGCAATGAGCTTGTAAAATTAAATCAGAAGACTCAATGAGATAGTGCCTTAACT
TCCCACCCCTCTCTACTGACCCCAACTGCATTCTGCTTTGTCCCTCTCATTTGATT
CCTCTGTGGCTCTTGCTTAGAATTCTGCTTTGCCACCATCATTATGTTAAACATTAGTACG
TAGTTCTGACTCCCTCTTATTGCTGGATCTTGCTGTCAACATTACTACCTACTCTGTT
TACCGCCTACTCTAGGCCAATATAATTCTACTGTGCTGTATGTGATAGTTGTAAGCTTGT
TTCTGGCTTCTGTATATAAGTCATGTGATTAAGGAGTATAGATTACTTACCTTGGAGT
TCAGAACCGAGATGCTCAGTGTATCTGGATGGTCAAGCTGTAAGACTAGAGCTGCTATTGA
AAGTAGCCTGGAAGTTAGAGAGTCAGAAATAAGGAAACACCTAGAGTCTGATGTTAGCT
CTTCAAAGAAACCTGTAGCTTCCAAGCACATTAAATAAAACTACACAGCCACTAGCAAGACTCT
CCGTGGAGAGCATGTATTATGGCTCCAGAAGGATTGGGGTGGTTGTTGAATGCATTATT
GTTGCTGATGCAAGAGAATGCTGGGCTACAAGTGTCCACCACAAGCTTCAAGGGAAAACCT
CTTCATTAGTTGACTTCAGATGCCAAACTGCATTATAATTGAAACAAGTATTAACTAGTAAAG
TCAAATTCTCAAATCTAGGTGCTCTATAACTGCTCATTAAAGATTCACTTATTCTTAC
GCAGGTAAGGGGACCTAACCTCAGTGTCTTAAAGGATGCTGAGAACATATGAGGTGCCAAAG
TTAAAATGTCAGGAAGGGAGTTGAAGGTTGTCATGTTGGAGGCCAGGGAGGTGAAAGC
AAACATAAGCACATCGGAAGCAAAAAGGGAGGTTGGGATAGAGGTGAGAACGGCTGCTGA
GCCACCATTGCTGTCAGCTGGTTCTATACTGGGTAAAGTTGTGATGTGTTGGCTTGGCCA
GCATAAGAGCCAAAGACATAGCGGACAAGTGGTGAACAGATTGAGCTCTGAATGGATTCTAG
TTTGGCAATCTGGGGAGTGATTAACAACATTGACACCAGTTGCTGCCAACAGTAATTGCTG
TGTCAATTGAGTCCTTACTCAAGAAGCAGAATTGAAAGATATGGCAAAGTTGGATTCAA
ACCAAGCAAATAGGGAAGGAGCAGGCAGATCTGTACAATGAGGGACGACTTTGATCCCAGG

GTAGAGGCTGGCTTCCCTGCCTGTCAGGCCGTTTAAGCAAGGCCGTGAGTCAG
TGAATGAATCCTACAGGTGGCTACTCCCCATGGTGAGACAGGCCATCAGGTTCTGG
TTGCGGTGATGGGAGCATGCAAGTCATAACCACAGGCTCAGGCTCATTTGCCCTGTG
ATCCTTCTCCAATTATTCTAAAGGATCTTATGAAAAAATAAAAGTAAAATTAAATTTC
ACTTAAAAAAACTCATAGAGCTGCAATATGCAACCTTTAGGAAGGAGCATTAAAAAATT
CCCTGAGGCCTCGAGATTACACTGGGTACAGAAATGGCAATAATTATGGCAGATTCCACCAT
CTTGACGGAACAATTGGGCTGAGAGAAAGACAGGCTATTTCCCTACGCCCTCAACT
TGTCAAGATAACGGAGGTTGATGATCGAGTTACATCTGTGATTATCTGGTAGCATAGACTG
ATGCAAGAACAGAAAGTGTGGGATGTCCTAAATAGAAACAAGGATAGGTATCAGAACATCC
TGACAAGTGGCACTTATGCTCTGTGGGTTGGAAAGGAGAGCTAACATTAAGAACAGTTATT
GTCTGAGGAAAATAAAACTGAGTACATGAATGCTAGGAGAGATCTAATGTTAGTGCCTAG
AATTTCAGCATTAGGAAAAAGTTAATATTGATAGCAAAGAATGAGAGTTAA
GCTTCTTGGAGATCAGCATGACTTTCTATTTCCTCATATTCTACAGACACTATCTCA
TTTATCCTCACTCAACTCTGTGAGGTATGAGTATCATTATCCTCACTGGCAGACGAGAGTAC
TGACATATAGGGAGCTTGAGTAGTTATCCAAGGGCACACAGTGCTCGTGGGATCTGAACA
CAGGACATCCAACCAAGGTGTGCCCTAACCTATCATATATATACTTGTGGTTGTTT
TTCTTGTCTAGGAAGATTGCCCTGAGCTAACCTCTGTGAGTAAAGTTGAGAAT
AAGATTGCCCTGAGCTAACATCTGTGCCAGTCTCCTTGTGTTGATGTGGGTCACCACACA
GTATGGCTGCCAAAGAGTGGTAGGTCTGCACCCAGGAACCAAACCAGGGCCGCCAAAGCGG
AGCATGCCAACACCATGAGGCCATGAGGCTGCCCTGCTAGTGGCTTAAAGTTGAGAAT
CATGGACTGTAGTATCAGCACCACCTGGAACTCATAGAACATTCTCAGAACATTGGAA
TTGAACCTAAAAGGACAACACTGCTAATCCTCTGCTCTGCCAACTCTCAAATAGATGGTT
TTGCCCTTTGAAACAATTACTGCAAGGATGCTTCTGCTCAACCATTCCGTTGAGGCTCTA
ACTCCAGAAGTTATTCTGTACACAGTAAGCTGCTGATAACTCCCTCTGGCACTTG
GCCCTCTGGAGCGTATACTGAACAAATTGCTCTTCCATATAAATGCTCTACTTTGA
GACCAACATTTCCTCCTCACCCCTACCCACCTCACTGTATTCTCTCTTAAGAACCCCTGAC
TGTCTAATGTGTCTCTAGAATGTGATTCTAGTCTTGTACTGCCCTTACTCTGCTTG
TTTCTAGTTGTGGATTCTTGTAAATGCAAAAATTGAATGCAGTAAATTGTTAAA
GCGTTTCTTTGATGGCTTAAGTCAGAAAAGCAAATGTTGAAGTTATGGAGTAGAT
ATCTGTACAATATTAATATTTACGTATAAAAGGAATGATAAGAACATCCAAACTATT
TTGTTCTAGAATCAAGATTATTCAATTATTCTAACTCATAATCTGATCTAATGTTAGTTAA
AAATCTGTAATGTATGATTACACAAATATACATTGTCAAAGTCATCAATATGTACACATT
ACAATGTGTGAGTTACAATGTATGTGATTACACAAATTGATTAAAAACAAACTAA
ACATGTATAAAGTTCTCTCATTCAAGACAAGTACGTTCCCTCTAGTGGGATAGACACATGA
AAGGAAAGTTAGGGTTGTGGCATGTAACAGTTACATATCCGATTAGGTTACGTAAGCAGCT
CCTAACCCCTAACCTAACAGGAGGTTCTGACAGGAAGACTTGGCCATAGCCATAGCTCTACAA
ATGTCCTTTATAATACTGTAAAGGACATGAGACGGAATGCTATTAGGCAAAGCTCAAAGG
AGAACCTCTGATTACTATCCCAGGGTACTGAGTCTCGTACCCACATGGTCAAGGATTACA
GAAGCTCCATTAGGCACCAATGACTTGGGAACATAACCAGAGTACCCACATCCTCTCGTT
ATCATCACATGGCATGGTAGTATCTGGCCAATTACCGTGTGTTCTGGAGCCTTCTATGC
GCATAGTACTGTGCTAACGCTCCGTAAAAACAGAGAATCGTATAAAAGAACCTATAGGATGG
TCGCGGTAGCTGCACAGCATCGTGGATGCGTTAATGTAAGTACTGTAAGTATATTAAAAGTITA
AAAGTTCAAGTTATGTTGTGCGTATTCTTACACAAATCAAAGAACCTCAAGGCCCTGG
AGATCCAGGTGTGGCCAGTAGATGTGAATAAAATTCTATCTACTAACGACCCCTGCATCGTCTT
CCTCTGCCATTATTGCTCAAGTGCCCTCTCTCTGACTGTGAAGGCCAGCCTTATTCTAG
TCAAGGGGATGTAAGAACACTGTGGGCCAGTCGCTTAATAGCATGGCACCCCTGGCTGGTCCA
GTTTGTCTCCCTTGCCTTATTCTTATGGCTTTATAATCTATTACTCTGGATGCATAAA
AACTGGGTTGTGATGGATTAGATCAGATTCCCTCATTACCTATGTGACCTCGGGTATTG
TGTTGACAGCAATGAGCTTGTAAAATTAAATCAGAACACTCAATGAGATAGTGCCTATTACTC
CCACCCCTCTCTACTGACCCCAACTGCATTCTGCTTTGCTCCCTCTCATTTGATTCCC
TCTGTGGCTCTGCTTAGAATTCTGCTTGCACCATCATTATGTTAAACATTAGTACGTA
GTTCTGACTCCCTCTTATTGCTGGATCTCTGCTGTCACATTACTACCTACTCTGTTTA
CCGCCTACTCTAGGCCAATATAATTCTACTGTCGCTGTATGTCATAGTGTGAAAGCTGTT
CTGGGCTTCTGTGTATATAAGTGCATGTGATTAAGGAGTATAGATTACTACCTTGGAGGTT
AGAACCCAGGATAGCTCAGTGTATCTGGGATGGTCAAGCTGTAAGACTAGAGCTGCTATTGAAA
GTAGCCTGGAAGTTAGAGAGTCAGAAATAAGGAAAATACCTAGAGTTCTGATGTTAGCTTCTT
CAAAGAAAACCTGTAGCTTCCAAGCACATTAATAAAACTACACAGCCACTAGCAAGACTCTCCG

TGGGAGAGCATGTATTATGGCTCCAGAAGGATTGGGGGTGGGTTGTTGAATGCATTATTGTT
GCTTGATGCAGAGAACATGCTGGCCTACAAGTGTCCACCACAAGCTTCAGGGAAAAACTTCTT
CATTAGTTTGACTTCAGATGCCAAACTGCATTATAATTGAACAAGTATTAACTTAGTAAGTC
AATTTCTCAAAATCTTAGGTGCTCCTATAACTGCTCATTAAGATTCACTTATTTTTCACGCA
GGTAAGGGGACCTAATTCAAGTGTCTAAAATGAAATTCAAGACATATTCTAGAGTCTTG
AAAATTCTTTCTTAAAAGGAAAGTTTATAGTACTCTAGTTGAGAACACTACGGTGTC
CCTCATAAATGGTTAGTCATTGTTAAAGGGATGCTGAGAACATATATGAGGTGCCAAAGTAT
AAAATGTCAGGAAGGGAGTTGAAGGTTGTCAAATGTTGGAGGCCAGGGAGGTGAAAGCAAA
CATAACGACATCGGAAGCAAAAGGGAGGTTGGATAGAGGTGAGAACAGCTGCTGAGCC
ACCATTGCTGTCAGCTGGTTCTATACTGGGTAAGTTGTCATGTTGGTTGGCCCAGCA
TAAAGAGCCAAGACATAGCGGACAAGTGGTGACCAAGATTCAAGCTCTGAATGGATTCTAGTT
GGCAATCTCTGGGAGTGATTAACAACCTTGACACCAAGTTGCTGCCTAACAGTAATTGCTGTG
TCATTGAGTCCTCTTACTCAAGAACAGAATTGAAGATATGGCAAAGTTGGGATTCAAAC
CAAGCAAAATAGGGAAAGGAGCAGGCAGATCTGACAATGAGGGACGACTTTGATCCCAGGGT
AGAGGCTGGTCTCCCTCTGCCCTGTCCTCCAGGCCGTGTTAAGCAAGGCCCTGATGTCAGTG
AATGAATCCTACAGGTGTCAGTCCACTCCCCATGGTGAGACAGGCCCTCATCAGGTTCTGGGATT
GCGGTGATGGGAGCATTGCAAGAACCAACTGAGCTCAGGCTTCACTTGGCCCTGTGAT
CCTTCTCCAATTATTCTAAAGGATCTTATGAAAAAATAAAAGTAAAATTAAATTTCAC
TTAAAAAAACTCATAGAGCTGCAATATGCAACCTTTAGGAAGGGAGCATTAAAAAAATTTC
CTGAGGCCCTGAGATTACACTGGGGTACAGAAATGCAATAATTATGGCAGATTCCACCATCT
TGACGGAACAATTGGGGCTGAGAGAAAGACAGTTGGCTATTTCCTCTACGCCTCAACTTG
TCAAGATACTGGAGGTGATGATCGAGTTACATCTGATTTATCTGGTAGCATAGACTGAT
GCAAGAACAGAAAGTGTGGGATGTCCTAAATAGAAACAAGGATAGGGTATCAGAAATCCTG
ACAAGTGGCACTTATGCTCTGTGGGTTGGAAAGGAGAGCTAACATTAAAGAAGTTTATTGT
CTGAGGAAAATAAAACTGAGTACATGAATGCTAGGAGAGATCTAACATTGTTAGTGCCTAGA
ATTTCAGCATTAGGAAAAAGTTAATATTGTTAGCAAAGAATGATGAGAGTTAAG
CTTCTTGGAAAGATCAGCATGACTTTCTATTTCCTCATATTCTACAGACACTATCTCAT
TTTATCCTCACTCAACTCTGTGAGGTATGAGTATCATTACCTCACTTGGCAGACGGAGACT
GACATATAGGGAGCTGAGTAGTTATCCAAGGGCACACAGTCTGCTGGGATCTGAACAC
AGGACATCCAACCAAGGTTGCCCCCTAACCTATCATATATATACTTGTGGTTGTTTT
TCTTGCTTAGGAAGAGATTGCCCTGAGCTAACCTCTGTTGCCAACCTCCCTTTGCTGAGG
AAGATTGCCCTGAGCTAACATCTGTGCCAGTCTCCCTTGTGTTGATGTGGGTACCCACCA
GTATGGCTGCCAAAGAGTGGTAGGTCTGCAACCAGGAACCAACCAGGGCCCAAAGCGG
AGCATGCCAACACCAGTGGCTGAGCTAACCTGGGAACTCATTAGAAATGCAAAATTCTCAGGCCCTAC
CCAAGCCCCCTGAATCAGAAACTCTGGATGAAGTTCTCCAGGTGATTCTGGCACACTCCAGT
GTGGAAACCACTGTTGATTGGTCTCTGACGACGTTAGAAGAACACTTATAGAGGACTTTTA
GGGATTGTTAGAGATGTCAGATGGGAGAATATAGCAATGAAGGGATACCATGAAAGGT
CTAACGGTGAAGAGGTACATACCTGGCGTCTGAGAAGGGAGGAATGTCATAATGTGATAGG
AAGCAACTGTGAGGAAACAATTAGCTGTGTTGGGTGCTCTCGGATGAAATGATGA
TTGGAATTAGAACAGTGTGGTCACATACGCTTCACTATAAGTGAATGACTAGGTCA
ACAATCAAATACCTCAGGGTTCAAAATTGAATTATTCACAGTCAGAACAGTGGCATTAG
CTAGGATCAAAGAGGGATTCTCTTCTGTGAAATTAAAAGACTAGTCTGTATATTGAT
GTGATGGTGTACGTGGTTATGCATTACAGAAATCATCATACTATACCTTAAAGGGT
GCATATTATTATGAAATTCTGCTAAATAAAAGTTGATTAAAATGGGAAATGTGGGGCTG
GCCCTGTGTCGCCAGCGGTTAACCTCGCGCCCTCCGCTGCAGCGGCCAGTGTGTTGCTG
CGAACATCTGGCACGGACATGACACTGCTCATCAAACCAACGCTGAGGCAGCATCCCACATGCC
ACAACATAGAACGGACCCACAACAAAGAACATACAACATATGTACCGGGGTGTTGGGAGAAAA
AGGAAAAAAATAAAACTTAAAAAAAAAAATAGGGTATAGTGTACTCGTGGCCAGTTAAT
GAGTTCTGTCAGTGGAGGTTGAGCAGAGGTTCAAGTGAAGCGCTTGTCAAGATATGCGTAGT
GGGCTCCACATCTGAGGGAGAACATGCACTCAGCAACCTAACATTCTTCAACCCAGAGGT
TCCATGAGTCACAATTCTGTTGTCAGCCGAGGTGTCAGGTTGCCATTGTTGAGAATGCTTGGT
AATATATTGATCTGAAACATTTAACCTGTCATGATTAAAATGTATTAAAGTGTCCACGTGT
GAAACACAGGACAGTGAATTCACTACCAACTCCACTGCATATCACAAGTAGAAAGATTCT
GGCAGATCAAACCATATTGTATTCTATTCCAAAACAGTAATTGTATTATCGTGGCATTCAAG
GGTGTGTTACTCTTAAGGCAAATTGCTGTTAAACTGAATCTCAAAGAAGATAAGTTAGG
GAGGATTGCTTGTACCTGTTGTTTCCATCAAACCCAACATGACATGAAATACTT

ATTGGACTTTCTCGAAAGCAGATTGAGAACATATGCTGTATGTTGAA
TGAAGTTAGAGTAAGATGCTTTCTATAAAGGTGCCACTCTTATTACTGAATAATTAAAGT
CACCTTTTATACAAGTGAATTGCTTCGACGTGGTTGTCAGATGCTGTTAAATGAAC
GCTGTTAGACTCCAAGGCTGCCACACAGGCCCTGATTACAGGAGTAAATAGTGTGCATTG
GCTGACTGCTGCCAGCAGGAGCGCTCACTCATATTCCCTGCATCTAG

* zelena: DUP Forward

** modra: DUP ReverseN

*** rumena: DUP ReverseD

Priloga D:
STX17 gen za ne- siv haplotip na intronu 6

TGAGTATATAACTGTTTGGCTCAGAGAYGTTAGATAATAGGATAAGAGGCCTTATAAATC
ACTAGGCTTTGATTAGGATTTAATAGAAGTACAATTGTAAGACTGGTATTGAACCATGG
TAGAAGTCTAAGTGTCTCAAATTCCAGATCAATTCAATAAACATTATAAGCACTGTTATAT
AAAAGGCAGTGCTTAGGTGCTTGGCATTGGGATCTGACAAGGTTGGATAAGAAAAGAAAAG
AAGCATGCTGTCTGCCCTCAGGGTTACAGTGGGTGGAGATATGCTGGACCCCCAAAAGTGA
AATTCAAGTGTGATTGTTAAATGCAAAGACAAGGTATGAAGAGAAGTATTATCCGCTCCAAGG
GAAGGAGGCAGGGATTGTGAGGTGGAAGCGTYAAGGGYAGCTTCACAASATAGGTAGTATTG
CTTAAGCCTGAAAAYTGAGTAAAGTKTCCGCAGGTGGAGAGAGGGAGTGCATTGAAGAAC
GCTGAACAAAGCCTGGAGTAGTGAAGTGTATGGCCTCCCAGGAATGACAAGTCTGCAGTGT
ACCAAAGCACAAGGTACCAAGGCAAGCAAAGCAGAGYGGCTGAGGGCCAGGTTAGATGGT
ACTGAAGGCCATACCAAGAATTGCACTTGTAGGCATTAAGGAGCCAATACAGGTTTTGAG
CAGGTTAGAGTGATGTGATCCTGTCGTGTTAGGAAGATCACTGTTAGCGGTRRRTAATG
GCCTTAAGAGAGGGAGGTTATAGGCAGGACAGCTAGTTAGGAGTCATTGCAAGAGTTGCAC
CAAGAGCAATGCAATACAAGTGTGAGGTTAAAGGAGAGCTGAGAGGCAATTCTGGGTGCAC
TTATTAGGAATTGGAGGAAGATGAAAGAGTCAAAGATAAGAACATTAAGGCTTATTGGCA
TAATCGGGTAGACAGTGTAACTGTTAACATAGATTAGGAACATAAAGTAGATTGGGAA
AGATAGATTCTGTTATTAAATTATTCTTATTCTCCAGGAATTATGGGAAG
GTTGGATATGTGGATGTGTGTATATGTATGTACATAACAGGCTCGAGCCTGTTCTGCTTATG
CTTCTCTAGGTTAATTCTTGTGATCAGACTGTGATTGAGGGTTGCGCATCTTGAGTT
AGGGTTCCCTGACATCTGGCTTTAAATTATAAGAAGTCCCAGATCACACAATCTCAGAATTG
GAATTGAACTAAAAGGACAACTAGTCTAACCTCTGCTCTGCCAACCTCTCAAATAGATG
GTTTTGCCTCTTTGAACAATTACTGCAAGGATGCTTCTGCTTCAACCATTCCGTTTGGAGGC
TCTAACTCCAGAAGTTATTCTTGACACAGTAAGCTCTGCCCTGTGATAACTCCCTCTGGCAC
TTTGGCCCTCTGGAGCCGTAACTGAACAAATTGCTTTCCATATAATGCTCTACTTT
TGAGACCAACATTCTCCTTCACCCACCTCACTGTATTCTCTTAAGAACCCCT
GAETGTCTAATGTGTTCTCTAGAATGTGATTCTAGTCTTTAGTACTGCCCTTACTCTGC
TTGTTCTAGTTGTGGATTCTGAAATGTAATGCAAAAAATTGAATGCAAGTAAATTGTT
AAAGCGTTTCTTTGATGGCTTAAGTCAGAAAAGCAAAATGTTGAAGTTATGGAGTA
GATATCYGTACAATATATTAAATATTTACGTATAAAGGGAATGATAACAAGAACCCAACTA
TTTTGTTCTAGRATCAAGATTATTCAATTATTCAACTCATAATCTGATCTAATGTAGTT
TTAAAATCTGTAATGTATGATTACACAAATATACATTGTCATAAGTCATCAATATGTACAC
ATTACAATGTGTGAGTTACAATGTATGTGAATTATAACCAATAAAATTGATTAAAAACAAAC
TAAACATGTATAAAGTCTCTCATTCAAGACAAGTACGTTCCCTCCTAGGGATAGACACA
TGAAAGGAAAGTTAGGGGTTGTGGCATGTAACAGTTACATATCCGATTAGGTTACGTAAGCA
GCTCTAACCCCTAATCTAAGGAGGTCGTACAGGAAGACTTGGCCATAGCCATAGCTCTA
CAAATGTCCTTTATAATAATCTGTAAGGACATGAGACGGAATGCTATTAGGCAAAAGCTAA
AGGAGAACCTCTGATTACTATCCCAGGGTGAETGAGTTCTCGTGAACCATGGTCAGGATTC
ACAGAAGCTCATTAGGCACCAATGACTGGGAACATAACCAAGAGTGAACACACATCCTCTC
GTTATCATCACATGGTAGTATCTGGCCAATTACCGTGTGTTCTGGAGCACTTCTA
TGCCTAGTACTGTGCTAACGCTCCGTGAARAACAGAGAACRATAAAAAGAACCTATAGGA
TGGTCGGTAGCTGCACAGCATCGTGGATCGTTAATGTAAGTACTGACTGTATATTAAAAGT
TTAAAAGTTCAAGTTATGTTGCGTATTCTTACACAAATCAAAAGAACCTCAAGGCCCT
GGGAGATCCAGGTGTGGTCAGTAGATGTGAATAAATTCTATCTACTAAGCACCCCTGCRCTCG
CTTCCTCTGCCRTTATTGCTCAAGTGCCTCTCTGACTGTGAAGGCCAGCCTTATT
CTAGTCAGGGATGTAAGAACTGTGGGCCAGTCGCTTAATAGCATGGCACCCCTGGTGTGG

TCCAGTTTGTCTCCTTTGCCTTATTCCYTATGGCTTTATAATCTATTTACTCTGGATGCAT
AAAAACTGGGTTGTGATGGATTAGATCAGATTCCCTCATTATACCTATGTGACCTTCGGGGTA
TTGTGTTGACAGCAATGAGCTTGTAAAATTAAATCAGAAGACTCAATGAGATAGTGYCTATTAC
TTCCCACCCCCCTCTCTTACTGACCCCAACTGCATTCTGCTTTGCCACCATTATGTTAACATTAGTAC
CCCTCTGTGGCTCCTGCTTAGAATTCTGCTTTGCCACCATTATGTTAACATTAGTAC
GTAGTTCTGACTCCCTCTTTATTGCTGGATCTTGCTGTCAACATTACCTACTCTGT
TTACCGCTACTCTAGGCCAATATAATYCTTACTGTGCCGTATGTCATAGTGTGTTGAAGCTTG
TTCTGGGCTTTCTGTATATAAGTGCATGTGATTAAGGAGTATRGATTACTTACCTTGGAG
TTCAGAACCAGGATAGCTCAGTGTATCTGGGATGGTCAAGCTGTAAGACTAGAGCTGCTATTG
AAAGTAGCCTGGAAGTTAGAGAGTCAGAAATAAGGAAATAACCTAGAGTCTGATGTTAGCT
TCTCAAAGAAACCTGTAGCTTCCAAGCACATTAAATAAAACTACACAGCCACTAGCAAGACTC
TCCGTGGGAGAGCATGTATTATGGCTCCAGAAGGATTGGGGTGGGTTGTTGAATGCATTAT
TGTTGCTGATGCAGAGAATGCTGGGCTACAAGTGTCCACCACAAGCTTCAAGGGAAAAACT
TCTTCATTAGTTGACTTCAGATGCCAACTGCATTATAATTGAACAAGTATTAACCTAGTAA
GTCAAATTCTCAAATCTTAGGTGCTCCTATAACTGCTCATTAAGATTCACITATTTC
CGCAGGTAAGGGGACCTAATTCACTGTTCTAAAATGAAATTCAAGACATATTCTAGAGTC
TTTGAAGGAAATTCTTTCTTAAAAGGAAAGTTTATAGTACTCTAGTTGAGAAACACTACGG
TGTCCCTATAAATGGTTAGYTCAATTGTTAAAGGGATGCTGAGAACATATATGAGGTGCCAA
GTATAAAATGTCAGGAAGGGAGTTGAAGGTTGTCAAATGTTGGAGGCCAGGGAGGTGAAAG
CAAACATAAGCACATCGGAAGCAAAAGGGGAGGTTGGATAGAGGTGAGAACAGGCTGCTG
AGCCACCATTGCTGTAGCTGGTTCTACTGGGTAAGTTGTTGATGTGTTGGGTTGCC
AGCATAAAGAGCCAAGAACATAGCGGACAAGTGGTACCGAGATTAGCTGAATGGATTCTA
GTTGGCAATCTGGGAGTGAACAACATTGACACCAGTTGCTGCCTAACAGTAATTGCT
GTGTCATTGAGTCCTTCTACTCAAGAACAGAATTGAAGATATGGCAAAGTTGGGATTC
AACCAAGCAAAATAGGGAGGAGCAGGCAGATCTGTACAATGAGGGACGACTTGTGATCCYAG
GGTAGAGGCTGGTCTCCCTCTGCCCTGTCTCCAGGCCGTGTTAAGCAAGCGCCCTGATGTCA
GTGAATGAATCCTTACAGGTGTTGACTCCCCATGGTGAGACAGGCCCTCATCAGGTTCTGG
ATTGCGGTGATGGGAGCATTGCAAGTCAAATAACCCTGAGCTCAGGCTTCATTGGCCCTGT
GATCCTTCTCCAATTATTCTAAAGGATCTTATGAAAAAAATAAAAGTAAAATTAAATT
CACTKAAAAAAACTCATAGAGCTCAATATGCAACCTTTAGGAAGGAGCATTAAAAAATT
TCCCTGAGGCCTCGAGATTACACTGGGATCAGAAATGGCAATAATTATGGCAGATTCCACCA
TCTTGACGGAACAATTGGGCTGAGAGAAAGACAGTTGGCTATTTCCTCTACGCCSAACT
YGTCAAGATA CGGAGGTTGATGATCGAGTTTACATCTGTGATTATCTGGTAGCATAGACTG
ATGCAAGAACRGAAGTGTGGGATGTCCAAATAGAAACAAGGATAGGGATCAGAAATCC
TGACAAGTGGCACTTATGCTCTGTGG
GTTGGGAAAGGAGAGCTAACATTAAAGAAKTTTATTGCTGAGGAAATAAAACTGAGTRC
ATGAATGCTAGGAGAGATCTAATGTTTAGTGCCTAGAATTTCAGCWTTATAGGAAAAAGT
TTAATATTTTTGATAGCAAAGAAATGATGAGAGTTAAGCTTCTTGGAAAGATCAGCMTGACT
TTTCTATTCTCCCTCATATTCTACAGACACTATCTCATTTATCCTCACTCTGTGAG
GTATGAGTATCATTCTCACTGGCAGACGAGAGTACTGACATATAGRAGCTGAGTAGTT
TATCCAAGGGCACACAGTGTCTGTGGATCTGAACACAGGACATCCAACCAAGGTTGTG
CCCTTAATCCTATCATATATATACTYGTGGTTGTTTCTTGTAGGAAGATTGCCCTGAGCTAACATCT
GAGCTAACTCTGTGCAACCTCCTCTTGTAGGAAGATTGCCCTGAGCTAACATCT
GTGCCAGTCTCTYTGTGTTGATGTGGTCACCACAGTATGGCTGCCAAAGAGTGGYGT
AGGTCTGCACCCAGGAACCAACCAGGCCAACAGRGAGCATGCCAACACCATRAGGC
CATGAGGCTGCCCTGCTAGTGGCTTTAAAGTKTGAAGATCATGGACTGTAGTATCAGCACC
ACCTGGAACTCATTAGAAATGCAAATTCTCAGGCCTCAYCCCAAGCCCCCTGAATCAGAAACT
CTGGATGAAGTTCTCCAGGTGATTCTGGTGCACACTCCAGTGTGGAAACCCTGTTGATTGGT
CTCTGACGACGTTAGAAGAAGACTATAGAGGACTTTAGGGATTGTGTTAGAGATGTCAAG
ATGGTGGAGAATATAGCAATGAAGGGATACCATGAAAGGTCTAACGGTGAAGAGGTACATACC
TGGCGTCTGAGAAGGGAGGAATGTCAATAATGTGATAGGAAGCAACTGTGAGGAAACAATTA
GCTGTGTTGGGTGTCCTGTTCTCGGATGAAATGATGATTGAAATTAGAAGAGTGTGGTC
ACATACGCTCACTATAAGTGAATAGGTCAAGTATATAAGGACAATCAAATCTCAGGGTCA
AATTGAATTATTTCACAGTCATCGAAGAAGTTGGCATTAGCTAGGATCAAAGAGGGATTCT
TCTTTTTCTGTGAATTAAAAGACTAGTCTGTATATTGATGTGATGGTGTACGGTTA
TGCATTATCAGAAATCATCATACTATACCCCTAAATGGGTGCATATTATTATATGTAAATTCT
GTCTAAATAAGTTGATTAAAAATGGGAATGTGGGGCTGCCCYGTGTGCCGAGCGGTTA

```

AGTCGCGCSCTCGCTGCAGGCAGGCCACTGTTCTGGTTCRAATCCTGGGCACGGACATG
ACACTGCTCATCAAACCACGCTGAGGCAGCATTCCCACATGCCACAACATAGAAGGACCCACAAC
AAAGAATATACTACMACTATGTACCGGGGTGCTTGGGGAGAAAAAGGAAAAATAAAATCTTAAA
AAAAAAAAAAATAGGGTATAGTGTACTCGTGGCCAGTTAATGAGTTCTGTCACTGAGGTGTT
TGAGCAGAGGTTCAGTAAGCGCTTGTCAAGATATGTCGTTAGTGGGGCTTCCCACATCTGAGGGAG
AAATCGCACTCAGAACCTAAACATTCTACCCAGAGGTTCCATGAGTCACAATTCTGTTG
TGTCAGCCGCAGGTGTTGCCATTTGTGTTAGATGCTTGGTTAATATATTGATCTGAAACATTT
AACTTGTGATGATTTAAAATGTATTAAAGTGTCCACGTGTGAAACACAGGACAGYGAATTCAT
TCACCRCTCCCTACTGCATATCACAAGTAGAAAGATTGATGGCAGATCAAACCATATTGTATT
CTTATTCTAAACAGTAATTGTATTATCGTGGCATCAAGGGTGTACTCCTAAGGAAAT
TTGCCTGTTAAACTGAATCTCAAAGAAGATAAGTTAGGGAGGATTTGCTTGATCCTGTT
TTTGTGACTTCCATCAAACCCAAACATGACATGTAATACCTTATTGGACTTTCTTCTCGA
AAGCAGATTATTGGAGAACAAATATGCTTGATGTTGAAGTTAGAGTAAGATGCTT
TTCCTATAAGGTGCCACTTTATTACTGAATAATTAAAGTCACCTTTTATACAAGTGAAT
TTGTGCTTGCACGTGGTTGTCAGATGCTGTTAAATGAAGTGTAGACTCCAAGGCTGCGG
CACACAGGCCCTGATTRCAGGAGTTAAATAGTTGCATTGGCTGACTGCTGCTCCGAGCAGGA
GCGCTCACTCATAATTCTTGCATCTAG

```

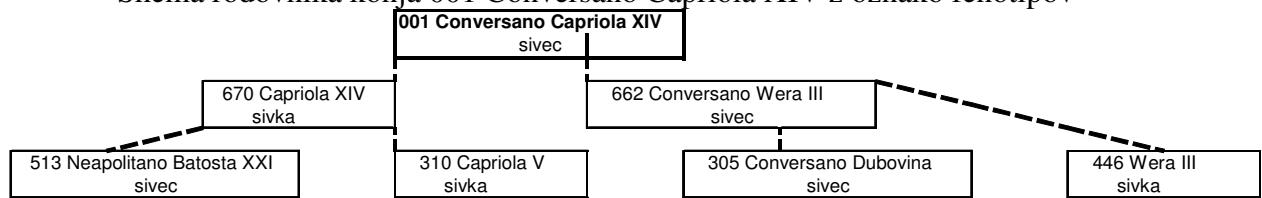
* zelena: *DUP* Forward

** modra: *DUP* ReverseN

*** rumena: *DUP* ReverseD

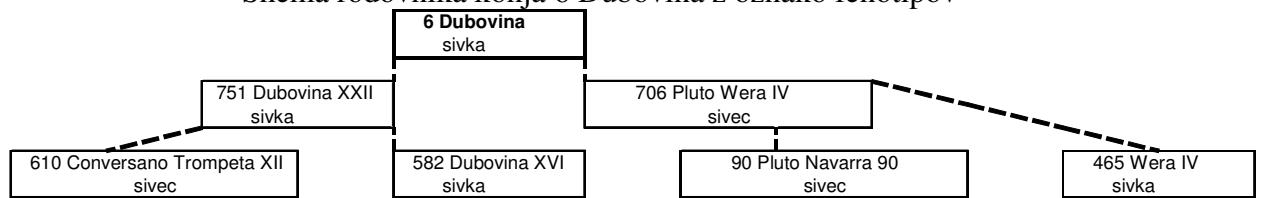
Priloga E:

Shema rodovnika konja 001 Conversano Capriola XIV z oznako fenotypov



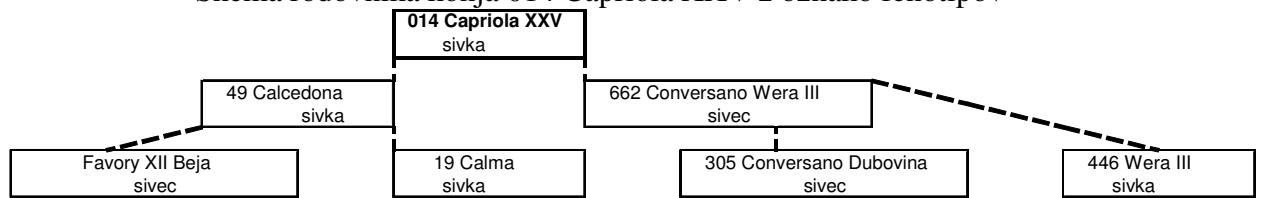
Priloga F:

Shema rodovnika konja 6 Dubovina z oznako fenotypov

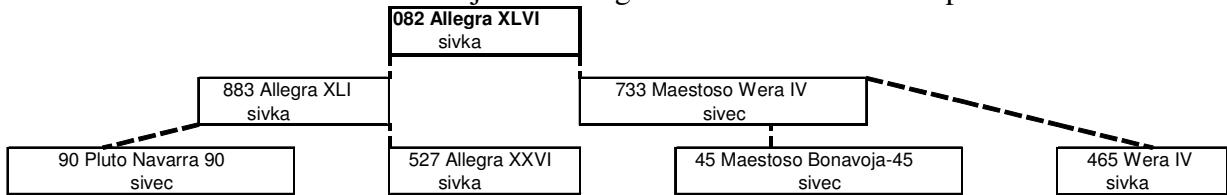


Priloga G:

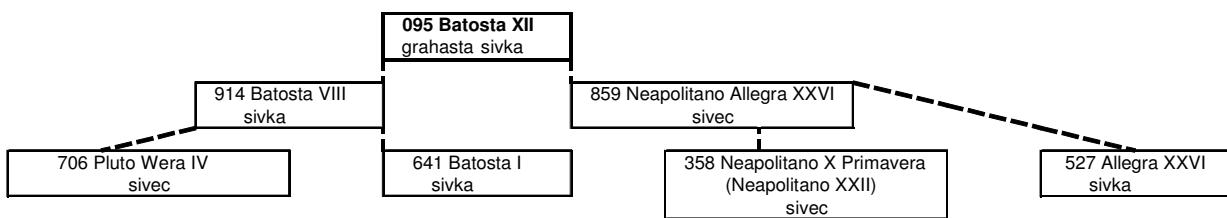
Shema rodovnika konja 014 Capriola XXV z oznako fenotypov



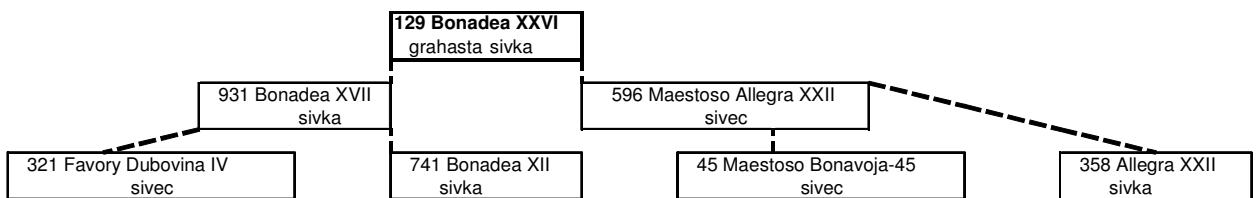
Priloga H:
Shema rodovnika konja 082 Allegra XLVI z oznako fenotipov



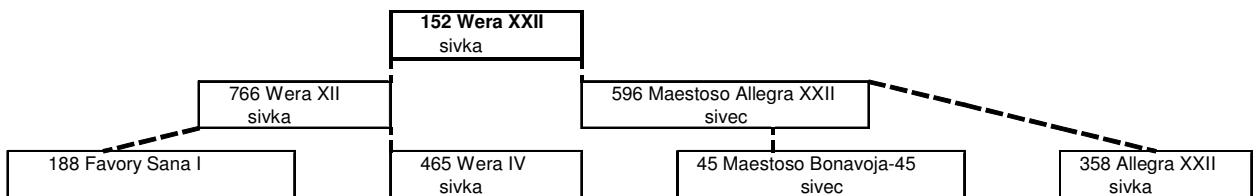
Priloga I:
Shema rodovnika konja 095 Batosta XII z oznako fenotipov



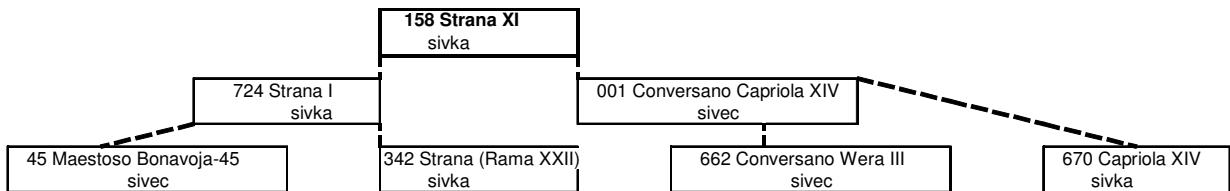
Priloga J:
Shema rodovnika konja 129 Bonadea XXVI z oznako fenotipov



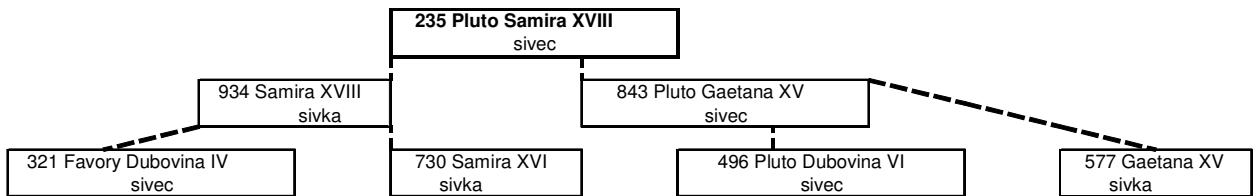
Priloga K:
Shema rodovnika konja 152 Wera XXII z oznako fenotipov



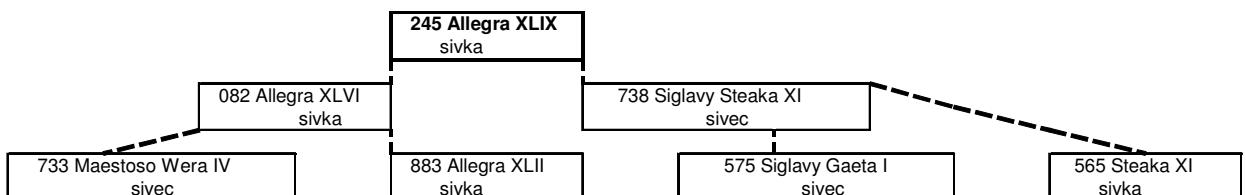
Priloga L:
Shema rodovnika konja 158 Strana XI z oznako fenotipov



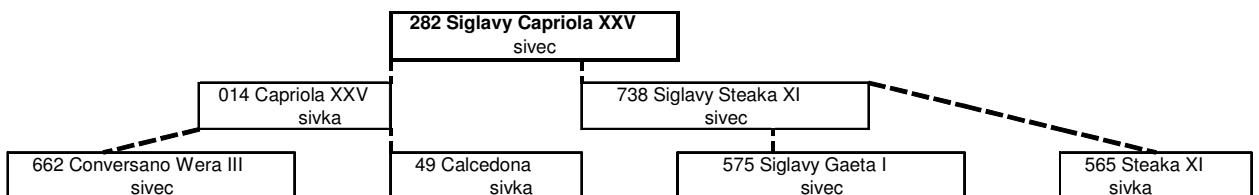
Priloga M:
Shema rodovnika konja 235 Pluto Samira XVIII z oznako fenotipov



Priloga N:
Shema rodovnika konja 245 Allegra XLIX z oznako fenotipov

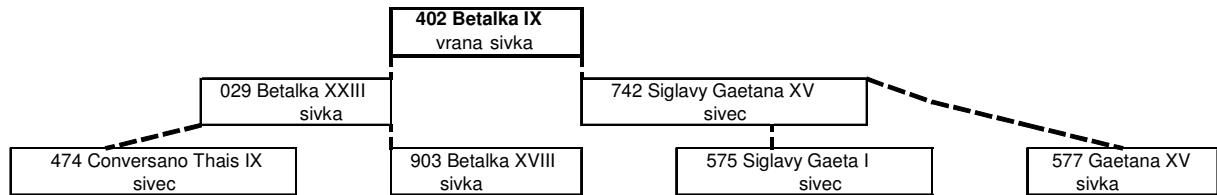


Priloga O:
Shema rodovnika konja 282 Siglavy Capriola XXV z oznako fenotipov



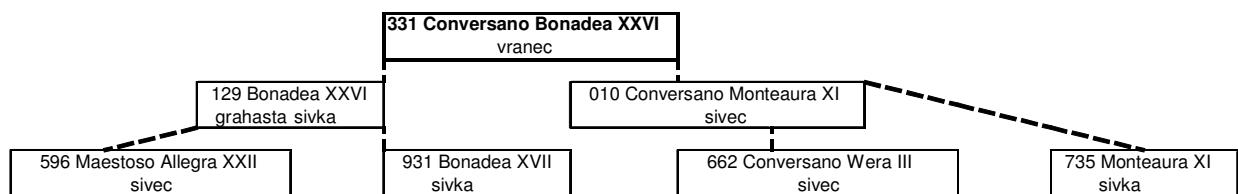
Priloga P:

Shema rodovnika konja 402 Betalka IX z oznako fenotipov



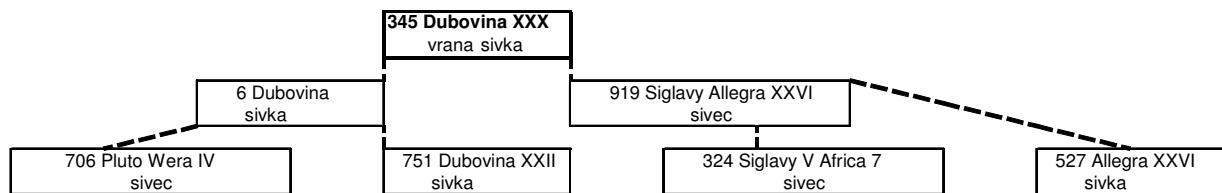
Priloga R:

Shema rodovnika konja 331 Conversano Bonadea XXVI z oznako fenotipov



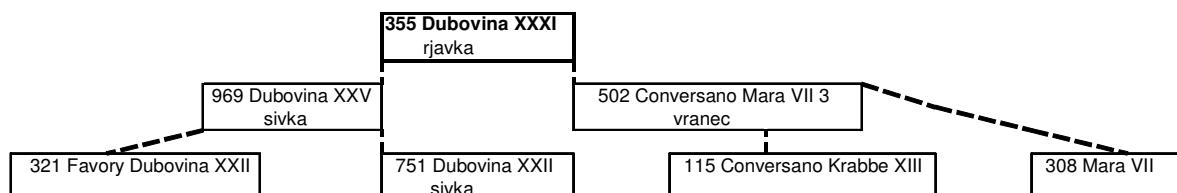
Priloga S:

Shema rodovnika konja 345 Dubovina XXX z oznako fenotipov

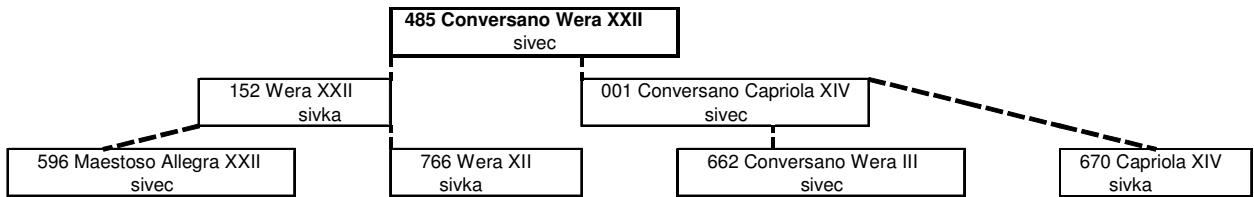


Priloga T:

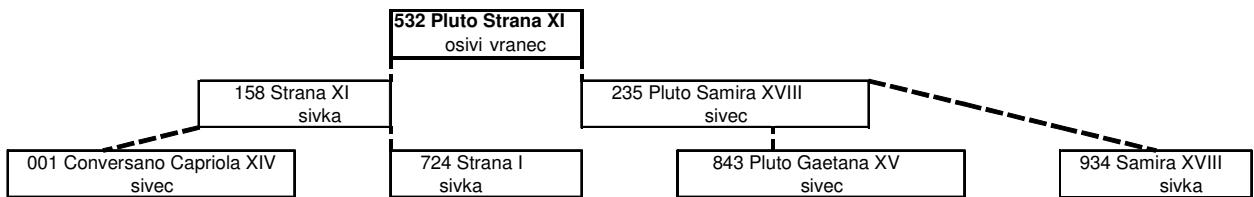
Shema rodovnika konja 355 Dubovina XXXI z oznako fenotipov



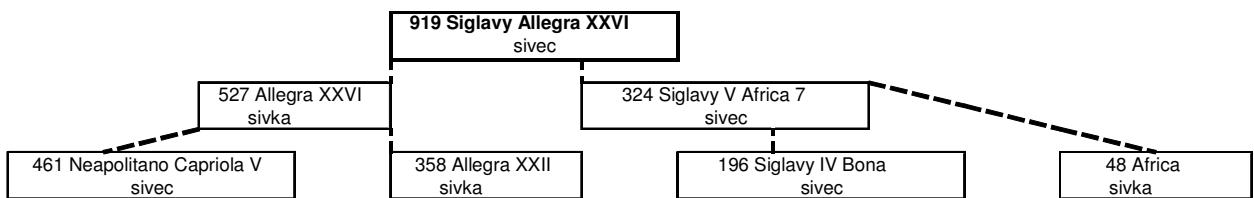
Priloga U:
Shema rodovnika konja 485 Conversano Wera XXII z oznako fenotipov



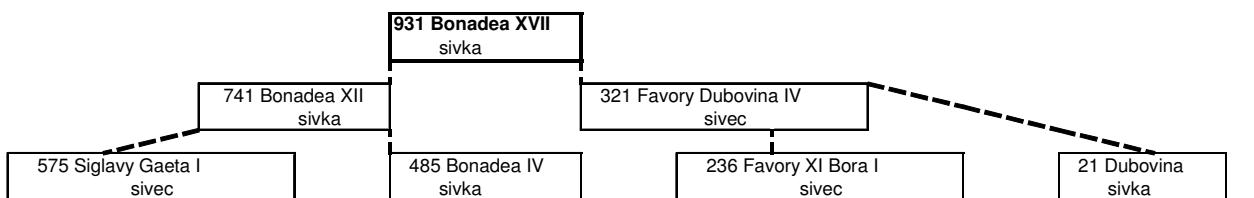
Priloga V:
Shema rodovnika konja 532 Pluto Strana XI z oznako fenotipov



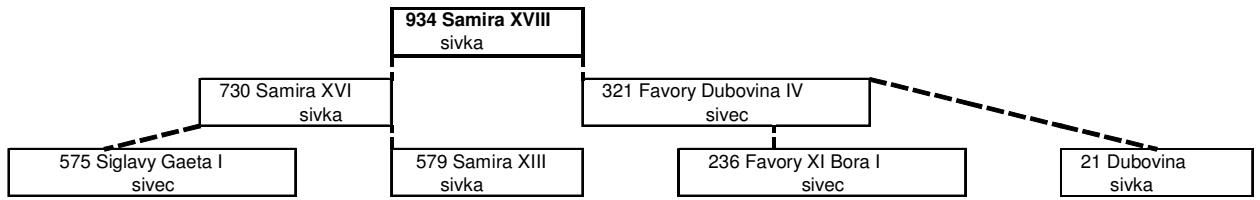
Priloga Z:
Shema rodovnika konja 919 Siglavy Allegra XXVI z oznako fenotipov



Priloga X:
Shema rodovnika konja 931 Bonadea XVII z oznako fenotipov



Priloga Y:
Shema rodovnika konja 934 Samira XVIII z oznako fenotipov



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ZOOTEHNIKO

Rebeka PIPAN

LOKUS ZA BARVO DLAKE PRI LIPICANCIH

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2009