

# Filogenetska analiza međimurskog konja

Anamarija FRKONJA<sup>1</sup>, Antun KOSTELIĆ<sup>2</sup>, Ino ČURIK<sup>2</sup>, Arpad BOKOR<sup>3</sup>, Thomas DRUML<sup>1</sup>, Marijan BELČIĆ<sup>5</sup>, Nikica PRVANOVIĆ<sup>4</sup>, Maja FERENČAKOVIĆ<sup>2</sup>, Vlatka ČUBRIĆ-ČURIK<sup>2</sup>

<sup>1</sup>University of Natural Resources and Applied Life Sciences Vienna, Gregor Mendel Str. 33, 1180 Vienna, Austria, (e-mail: frkonjica@gmail.com)

<sup>2</sup>Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet, Svetošimunska cesta 25, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>3</sup>University of Kaposvár, Faculty of Animal Sciences, 7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40, Hungary

<sup>4</sup>Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Hrvatska

<sup>5</sup>Uzgojna organizacija 'Međimurac', 40000 Čakovec, Hrvatska

## Sažetak

U ovom radu napravljena je usporedba nukleotidnih sljedova duljine 314 pb i 1231 pb, te analizirana mtDNA informativnost s obzirom na duljinu nukleotidnih sljedova. Na slijedu mtDNA od 243 pb analizirana je srodnost međimurskog konja (mađarske i hrvatske populacije) s hrvatskim hladnokrvnjakom i hrvatskim posavcem iz literature. Analizom 73 nukleotidna slijeda duljine 314 pb, nađena su 33 polimorfna mjesta, a identičnom analizom na nukleotidnom slijedu dugom 1231 pb nađeno je 130 polimorfni mjesta. Raznolikost haplotipova iznosila je 0,96, analizom 314 pb, a 0,0994 analizom 1231 pb. U analiziranom nukleotidnom slijedu od 314 pb nađeno je 29 haplotipa, dok je 60 nađeno analizom 1231 pb.

Usporedbom međimurskih konja s međimurskim konjima iz literature, hrvatskim hladnokrvnjakom te posavskim konjem vidljiva su grupiranja koje međimurski konji stvaraju zasebno, ali i filogenetska srodnost s obzirom na blizinu grana u kojima se nalaze hrvatski hladnokrvnjaci kao i, nešto udaljenije, posavski konji. Na temelju analize 243 pb dugog nukleotidnog slijeda između posavskog konja, hrvatskog hladnokrvnjaka i međimurskog konja  $F_{st}$  je 0,05562. Rezultati istraživanja pokazali su da je dulji nukleotidni slijed informativniji. Istraživanje koje se temelji samo na uporabi mtDNA ukazuje na sličnost početnih populacija kobila na kojima se zasnivaju populacije hrvatskog hladnokrvnjaka, međimurskih i posavskih konja.

Ključne riječi: Međimurski konj, mtDNA, genetska varijabilnost

## Phylogenetic analysis of Međimurje horse

### Abstract

In this paper, we have made a comparison of nucleotide sequences of length 314 bp and 1231 bp, and analyzed mtDNA informativeness with respect to the length of nucleotide sequences. On the mtDNA sequence of 243 bp was analyzed relationship Međimurje horse (Hungarian and Croatian population) with the Croatian Coldblood and Posavina horse from literature. By the analysis of 73 nucleotide sequences of 314 bp length, we have found 33 polymorphic sites and on sequence of 1231 bp was found 130 polymorphic sites. Haplotype diversity was 0.96, given by analysis of 314 bp and 0.0994 on 1231 bp analysis. In the analysed nucleotide sequence of 314 bp 29 haplotypes was found, while 60 were found by analyzing 1231 bp. Comparing Međimurje horse with Međimurje horse from literature, Croatian Coldblood and Posavina horse, grouping of horses is visible, Međimurje horse created clusters separately, but with respect to the phylogenetic relationship among other horses. Based on analysis of 243 bp long sequence between the Posavina horse, Croatian Coldblood Međimurje horse  $F_{st}$  is 0.05562. The results

---

Proceedings. 46<sup>th</sup> Croatian and 6<sup>th</sup> International Symposium on Agriculture. Opatija. Croatia (846-849)

showed that the longer sequence is more informative. Research that is based solely on the use of mtDNA indicates the similarity of initial population of mares underlying population of the Croatian Coldblood, Međimurski horse and Posavina horse.

Key words: Medjimurje horse, mtDNA, genetic variability

### Uvod

Mitohondrijska DNA konja veličine je 16 660 pb i njen nukleotidni slijed prvi su identificirali Xu i Arnanson (1994) koji su ujedno i dokazali varijabilnost D-loop regije te otkrili ponavljajući slijed od osam baznih parova u velikom konzerviranom nukleotidnom slijedu kontrolne regije. Broj ponavljanja varira između dvije i 29 kopija, iako ih je najviše u rasponu od 22 do 27. Ponavljajući motiv mtDNA konja je GTGCACCT (Xu i Arnanson, 1994), a duljina D-loop regije iznosi prosječno 1125 pb. Kako je najčešće prosječna duljina istraživanog nukleotidnog slijeda mtDNA oko 314 pb, u ovom radu napravljena je usporedba nukleotidnih slijedova duljine 314 pb i 1231 pb, te analizirana mtDNA informativnost s obzirom na duljinu nukleotidnih slijedova. Na slijedu mtDNA od 243 pb analizirana je i srodnost međimurskog konja (mađarske i hrvatske populacije) s hrvatskim hladnokrvnjakom i hrvatskim posavcem iz literature. Za usporedbu su uzeti nukleotidni slijedovi međimurskog konja, noričkog konja, hrvatskog hladnokrvnjaka te hrvatskog posavca.

Prema literaturnim navodima, međimurski konj je nastao križanjem domaćih kobila sa pastusima noričke pasmine, belgijskim hladnokrvnjacima (peršeronskim hladnokrvnjakom, ardenskim hladnokrvnjakom i brabantom) i drugim pasminama. U prošlosti se međimurski konj uzgajao i u Mađarskoj gdje se i danas nalazi određeni broj grla ove pasmine (Frkonja i sur., 2010). Usporedba je izvršena prema objavljenim nukleotidnim slijedovima iz rada Ivanković i sur., (2009) te s nukleotidnim slijedovima dobivenima u istraživanju. Uspoređena je D-loop, tj. najvarijabilnija regija mtDNA međimurskih konja iz Republike Hrvatske s međimurskim konjima iz Mađarske (mađ. muraközi lo) te hrvatskim hladnokrvnjakom i hrvatskim posavcem.

### Materijali i metode

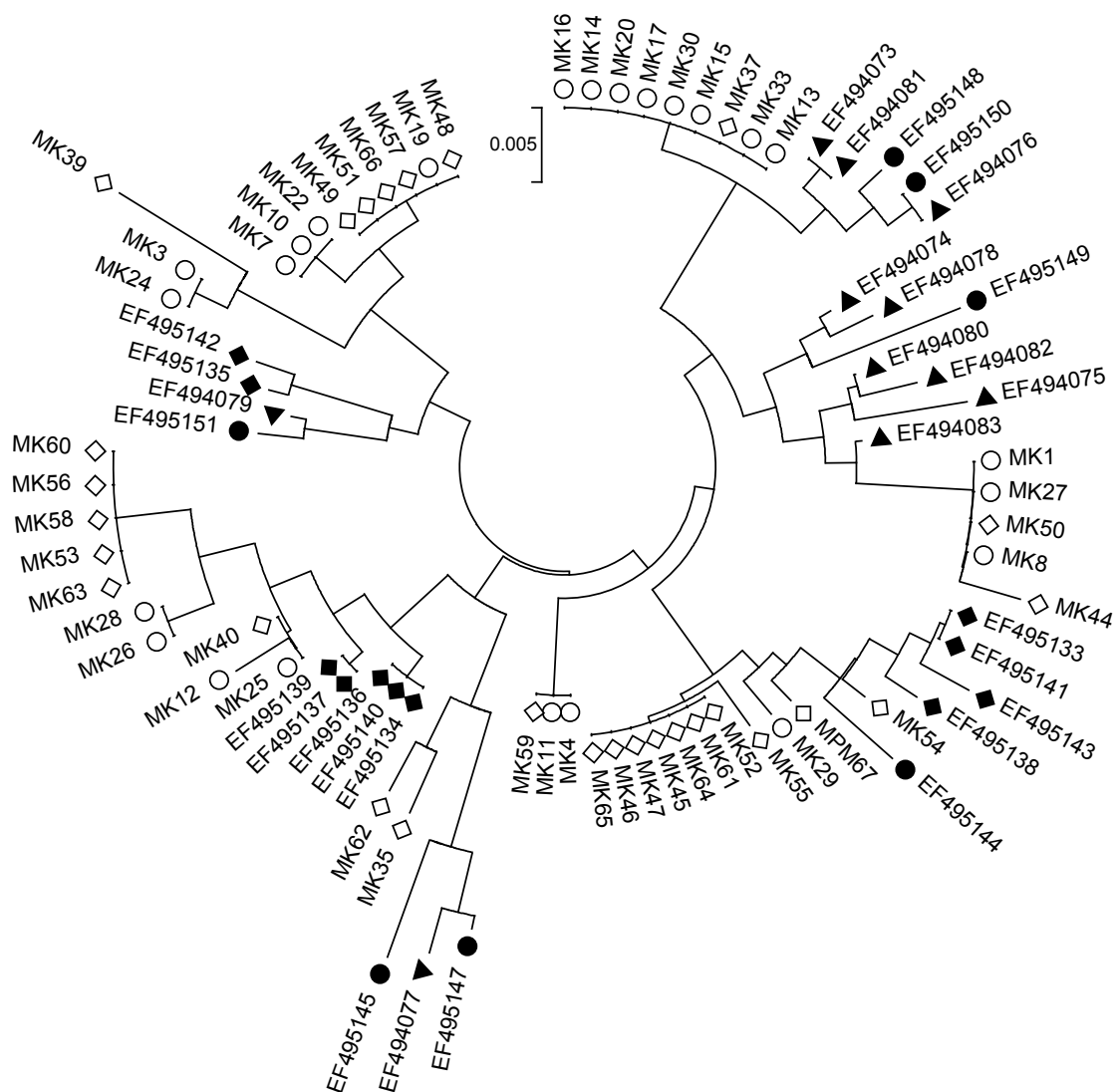
Za ovo istraživanje korišteni su uzorci krvi 23 norička konja iz pokrajine Karintija, devet noričkih konja iz pokrajine Salzburg, tri uzorka dlake hrvatskih hladnokrvnjaka, jedan hrvatskog posavca, 19 uzoraka krvi međimurskog konja iz Hrvatske i 14 uzoraka međimurskih konja iz Mađarske. Ukupna genomski DNA iz pune krvi izdvojena je koristeći komplet reagensija Sigma Gen Elute™ Blood Genomic DNA Kit po uputama proizvođača (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Germany). DNA iz dlake izdvojena je pomoću "Qiagen" DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) protokola za izdvajanje DNA iz dlake, nohtiju i perja. Početnice za umnožavanje željenog nukleotidnog slijeda su preuzete iz rada Aberle i sur., (2007). Statistička obrada haplotipova mtDNA je napravljena pomoću programskog paketa MEGA 4.0, a zatim DNAsp 5.10.00 (Rozas, <http://www.ub.edu/dnasp/>, 2009). Analiza varijance provedena je programskim paketom Arlequin 3.0 (Excoffier, 2005).

### Rezultati i rasprava

Analizom 73 nukleotidna slijeda duljine 314 pb, nađena su 33 polimorfna mjesta, od čega je pet bilo prisutno samo jednom ("singelton polimorfna mjesta"), a 28 "parsimono" informativnih nukleotida. Raznolikost haplotipova iznosila je 0,96, a nađeno je 29 haplotipova. Varijanca raznolikosti haplotipova iznosi 0,008. Nukleotidna raznolikost iznosi 0,02083. Prosječni broj nukleotidnih razlika je 6,521. Identična analiza napravljena je pomoću nukleotidnih slijedova istih jedinki no korišten je nukleotidni slijed od 1231 pb. Nađeno je 130 polimorfni mjesta, 58 od njih se pojavljivalo samo jednom. Raznolikost haplotipova iznosi u ovom slučaju 0,994. Usporedbom međimurskih konja s međimurskim konjima iz literature, hrvatskim hladnokrvnjakom te posavskim konjem (pristupni kodovi: hrvatski hladnokrvnjak: EF494073-83, posavski konj: EF495133-42, međimurski konj: EF495144-51) vidljiva su grupiranja ("klasteri") koje međimurski konji stvaraju zasebno, ali i filogenetska srodnost s obzirom na blizinu grana u kojima se nalaze hrvatski hladnokrvnjaci kao i, nešto udaljenije, posavski konji (Slika 1). Usporedba je napravljena na temelju 243 pb dugog nukleotidnog slijeda. Na temelju nukleotidnog slijeda duljine 314 pb dobiven je fiksacijski indeks ( $F_{st}$ ) od 0,04360 ( $P < 0,001$ ). Analizom koja je obuhvaćala 1231 pb dobiven je fiksacijski indeks od 0,02424

( $P < 0,001$ ). Između mađarske i hrvatske populacije  $F_{st}$  je 0,04642 ( $P < 0,001$ ). Na temelju analize 243 pb dugog nukleotidnog slijeda između posavskog konja, hrvatskog hladnokrvnjaka i međimurskog konja  $F_{st}$  je 0,05562 ( $P < 0,001$ ).

Rezultati istraživanja pokazali su da je dulji nukleotidni slijed informativniji. Istraživanje koje se temelji samo na uporabi mtDNA ukazuje na sličnost početnih populacija kobila na kojima se zasnivaju populacije hrvatskog hladnokrvnjaka, međimurskih i posavskih konja. U radu Čubrić-Čurik i sur., (2010) analizirano je 153 nukleotidna slijeda duljine 276 pb. Na temelju ove analize devet haplotipova je bilo jedinstveno za međimurskog konja (šest njih za konje iz hrvatske populacije i tri za konje iz mađarske populacije). Zanimljivo je da među tim jedinstvenim haplotipovima jedan je bio prisutan kod devet konja iz hrvatske populacije, a jedan za pet konja iz mađarske populacije. Ivanković i sur., (2009) analizirajući mtDNA hrvatskog hladnokrvnjaka te međimurskog i posavskog konja pronašli su 26 polimorfni mjesta na nukleotidnom slijedu duljine 323 pb. Raznolikost haplotipova je 0,31% 5,26. Amova analiza pokazuje podjelu između pasmina,  $F_{ST}$  iznosi 0,2004 ( $P < 0,001$ ). Premda je populacija međimurskog konja mala (37 jedinki) haplotipovi dobiveni u ovoj analizi, iako bliski, nisu se u potpunosti poklapali s analiziranim haplotipovima međimurskog konja u istraživanju Ivanković i sur. (2009).



Slika 1. Dendrogram međimurskih konja iz Mađarske, Hrvatske, hrvatskog hladnokrvnjaka i hrvatskog posavca

Legenda: ◊ međimurski konj iz Mađarske; ○ međimurski konj iz Hrvatske; ◆ posavski konj; ▼ hrvatski hladnokrvnjak; ● međimurski konj iz literature

Analiza mtDNA pokazuje nam genetske odnose između populacija koji se odnose na njihovo podrijetlo i to isključivo preko rodova tj. majke. Tako, iako istraživana populacija “hrvatskog” i “mađarskog” međimurskog konja imaju zajedničke haplotipove, a za razliku od ostalih populacija hladnokrvnih hrvatskih konja, ne može se sa sigurnošću utvrditi koja je genetska srodnost analiziranih populacija. Zato je, pored navedene analize, nužno usporediti ove populacije i na temelju nukleotidne DNA i to koristeći mikrosatelitne markere ili upotrebom SNP-sa (engl. single nucleotide polymorphism).

### Zaključci

Na temelju analize 243 pb dugog nukleotidnog slijeda između posavskog konja, hrvatskog hladnokrvnjaka i međimurskog konja  $F_{st}$  je 0,05562. Rezultati istraživanja pokazali su da je dulji nukleotidni slijed informativniji. Istraživanje koje se temelji samo na uporabi mtDNA ukazuje na sličnost početnih populacija kobila na kojima se zasnivaju populacije hrvatskog hladnokrvnjaka, međimurskih i posavskih konja.

### Literatura

- Aberle, S., K., S., Hamann, H., Drogmuller C. (2007). Phylogenetic relationships of German heavy draught horse breeds inferred from mitochondrial DNA D-loop variation. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124: 94-100.
- Čubrić-Čurik, V., Frkonja, A., Kostelić, A., Belčić, M., Bokor, A., Druml, T., Čurik, I. (2010). Maternal origin of Medjimurje horse, *Animal science days, Kaposvar 2010*.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Frkonja, A. (2010). Mitohondrijska DNA međimurskog konja, *Diplomski rad, Zagreb*.
- Ivanković, A., Ramljak, J., Konjačić, M., Kelava, N., Dovč, P., Mijić, P. (2009). Mitochondrial D-loop sequence variation among autochthonous horse breeds in Croatia. *Czech Journal of Animal Science*, 54: 101-111.
- Rozas J., Librado, P., Sánchez-DelBarrio J. C., Messeguer, X., Rozas R. (2009). DnaSP 5.10.00. *Universitat de Barcelona*.
- Tamura K., Nei, J. D. M., Kumar S. (2008). MEGA, <http://www.megasoftware.net/>.
- Xu, X., Arnason, U. (1994). The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region. *Gene*, 148: 357-362.

sa2011\_0706