

Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Husdjursgenetik

Associationsanalys av genetiska markörer i islandshästens genom och fenotypiska uttryck såsom exteriör, rörelser samt sjukdom

Lisbeth Wellbring

Uppsala

2011

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:12*

Associationsanalys av genetiska markörer i islandshästens genom och fenotypiska uttryck såsom exteriör, rörelser samt sjukdom

Lisbeth Wellbring

*Handledare: Gabriella Lindgren
Biträdande handledare: Lisa Andersson
Institutionen för husdjursgenetik*

*Examinator: Göran Andersson,
Institutionen för husdjursgenetik*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2011
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjursgenetik
Kurskod: EX0237, 25.5hp*

Nyckelord: SNPs, islandshäst, helgenomscan, associationsmappning, exteriör, sjukdom, rörelse

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2011:12*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Introduktion	3
Bakgrund	3
Association mellan fenotyp och genotyp	3
Felkällor och visualisering	3
Syfte	4
Material och metoder	4
Urval hästar	4
Enkät.....	4
GWA (Genome wide association analysis).....	5
Resultat	6
Svarsfrekvens enkät.....	6
Associationsanalys	6
Egenskaper med signifikanta associationer till markör	7
Diskussion	10
Konklusion	12
Litteraturförteckning	13
Appendix	15
Appendix 1	I
Appendix 2	XI

SAMMANFATTNING

Avsikten med detta arbete var att bidra till grundforskning om koppling mellan hästars fenotypiska egenskaper och gener med användande av genomisk associationsanalys. För detta ändamål har en enkät utformats och tillsänts ägare av drygt tvåhundra islandshästar. Enkäten innefattade olika frågeställningar gällande hästarnas fenotyp såsom, biometriska egenskaper, exteriör och sjukdom. Hos det i studien ingående hästmaterialet fanns genotypdata tillgänglig, eftersom dessa hästars arvs massa typats med ett Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) chip, Illumina SNP50.

Associationsanalys har utförts mellan genetiska markörer och via enkäten erhållen fenotypdata samt data för färgegenskaper hämtad ur stamboksdatan för islandshästar, World Fengur, som finns tillgänglig online. Eftersom kausativa gener för många färgegenskaper är kända användes dessa som *proof of principle* i aktuell studie. Associationsanalys avseende färgegenskaper knutna till A-lokus, E-lokus, Z-lokus och To-lokus genererade signifikanta associationer till markör i närheten av färgegenskapernas genetiska position. Chipet, Illumina SNP50, föreföll tillförlitligt tillsammans med den i studien ingående islandshästpopulationen och det i studien ingående materialet har visats kunna generera signifikanta associationer till markör.

Associationsanalys avseende blackanlaget (Dn) genererade multipla signifikanta associationer till markör, lokaliserade till kromosom 8. Associationsanalysen genererade även en signifikant association till markör på kromosom 23 för egenskaperna fyrgång versus femgång. Associationsanalys genererade två signifikanta associationer till markör för egenskaperna slö kontra framåt på kromosom X. Genomförande av ytterligare analys beaktande allelfördelning på könskromosomer krävs för verifiering av sanningsgrad i sist nämnda erhållna association. Associationsanalysen genererade även en borderline signifikant markör för den biometriska egenskapen kroppslängd.

Sammanfattningsvis erhöles signifikant association till markör för en kvalitativ och två kvantitativa egenskaper. Gener i närheten av erhållna markörer kan vara möjliga kandidatgener för aktuella egenskaper. Utökade tester i ett större populationsurval behöver utföras för verifiering av att association mellan kromosomregion och egenskap kvarstår.

SUMMARY

The aim of this study was to identify genetic association between phenotypic variation and genetic markers by usage of genome wide association analysis. To achieve the purpose a survey regarding different phenotypic measurements such as biometrical traits, conformation and disease has been made and sent to the owners of more than two hundred Icelandic horses. The horses included in this study had previously been genotyped with the single nucleotide polymorphisms (SNP) chip, Illumina SNP50.

Genome wide association analysis was performed by using allele frequencies obtained from the genetic markers and different phenotypic traits obtained via the survey. Phenotypic data for color traits were obtained from the online studbook database for Icelandic horses, World Fengur. The already known causative genes for horse color on A-, E-, Z- and To-locus were used as proof of principle. Genome wide significance was achieved for SNP markers positioned closely to the color causative genes. The chip, Illumina SNP50, was found to be reliable together with the Icelandic horse population used in this study and the horse material utilized in the study has been shown able of generating genome wide significance.

Genome wide association analysis regarding the trait dun color (Dn) reached genome wide significance for multiple genetic markers, localized on chromosome 8. Genome wide significance was also reached for one genetic marker on chromosome 23 for the traits four gated versus five gaited. Genome wide significance was reached for the traits lazy versus forward on chromosome X. Implementation of additional analyses considering allelic distribution on sex chromosomes are required for verifying the significance in the last mentioned association. Borderline genome wide significance was obtained for the biometric trait body length.

In conclusion, genome wide significance was reached for one qualitative and two quantitative traits. Genes closely localized to markers that reached genome wide significance are possible candidate genes for actual traits. Extended tests need to be performed in a greater population sample to verify that obtained associations between chromosomal region and traits remains.

INTRODUKTION

Bakgrund

Studium av olika rasstamböcker visar att hästuppfödare genom århundradena försökt selektera avelsindivider genom bedömning av exteriör, rörelse, sundhet och prestation. Selektion har grundats på hästens yttre egenskaper, fenotypen, och att det är troligt att en god individ nedärver sin arvs massa, genotypen, till en eventuell avkomma. I och med att hästens arvs massa blev sekvenserad i början av år 2007 (UCSC Genome Bioinformatics, 2010) utvanns utökad information om arvs massans struktur och var i arvs massan olika gener fanns lokaliserade. Den erhållna genetiska kartan innebar utökade möjligheter att finna koppling mellan fenotyp och genotyp. För att finna sådana samband kan genomisk associationsanalys användas. Ett exempel på resultat av associationsanalys med klinisk relevans kan ses hos den Egyptiska arabhästen, där man funnit en mutation (Brooks *et al.*, 2010) som kan hållas för trolig orsak till sjukdomen Lavender Foal Syndrome. Sjukdomen är dödlig och fölen uppvisar neurologiska anomalier och täckhåren har en blek lavendelliknande färg. Identifieringen av mutationen har medfört att ett gentest för anlaget har utvecklats (Cornell University, 2010) och därmed kan avelskombination av hästar bärande anlaget undvikas.

Association mellan fenotyp och genotyp

För att finna samband mellan en viss fenotypegenskap och gener i arvs massan krävs genotypdata från hästmateriel där eftersökt egenskap antas förekomma. Typning kan göras med ett Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) chip. SNPs är variationer i arvs massan med känd position som berör endast en nukleotid (Long *et al.*, 2007). En eventuell variation i allelfrekvens mellan hästar i aktuella SNPs kan testas med hjälp av Genome Wide Association analys (GWA). Analysen används för att testa om ett statistiskt samband mellan en genetisk markör och fenotyp föreligger. Associationsanalys kan utföras med hjälp av olika datorprogram (Pei *et al.*, 2010), i denna studie har programmet PLINK använts (Purcell *et al.*, 2007). Vid associationsanalys genomförs multipla tester, mängden tester är avhängigt antalet ingående SNPs. Korrigering av ”mass-signifikans” beroende på mängden tester är nödvändig för erhållande av sanna associationer. Vid signifikansnivå 0.05 kan slumpen förväntas medföra att fem SNPs av hundra resulterar i signifikant association. Vid genomförande av fyrtiotusen tester kan frekvensen av slumpgenererade associationer antas bli hög och påverka analysresultatet. Justering för slumpgenererade signifikanta associationer till följd av multipla tester utförs i samband med associationsanalys och kan bl. a. utföras genom användande av permutationer (Purcell, 2010). Vid permutation bryts relationen mellan fenotyp och genotyp i det ingående testmaterialet och ett nytt dataset genereras med slumpmässigt utsatt fenotyp. Det slumpmässiga datasetet testas avseende antalet erhållna lika utfall eller bättre i förhållande till det första utfallet med intakta relationer. Antalet positiva utfall divideras med totala antalet tester och relevant p-värde erhålls.

Felkällor och visualisering

Analysresultatet kan påverkas av stratifiering, innebärande att falska positiva associationer genereras exempelvis pga. skiftande populationstillhörighet. Falska samband kan erhållas om fall hämtas från en population och kontroller hämtas ur en annan population. Granskning av stratifiering i en associationsstudie kan göras

genom att erhållna p-värden visualiseras genom en qq-plot (Purcell, 2010). Erhållna p-värden plottas gentemot förväntad fördelning utan stratifiering, värdena representeras av linjer i diagram. Lutningen på linjen för förväntade värden är 1. Inflationsfaktor är ett mått på stratifiering och denna faktor bör ligga relativt nära 1 vid antagande om att stratifiering ej påverkat resultatet. Data genererade via associationsanalys kan även visualiseras via en sk. Manhattan-plot (Broad Institute, 2010). Grafen visar erhållna p-värdens fördelning per kromosom. Skalan är logaritmisk och signifikant association till markör visualiseras genom att p-värdena grafiskt bildar en topp på aktuell kromosom.

Syfte

Avsikten med detta arbete är att bidra till grundforskning om koppling mellan hästars fenotypiska egenskaper och gener, eftersom detta i nuläget inte är känt för de allra flesta egenskaper. För detta ändamål har en enkät utformats och tillsänts ägare av 201 islandshästar. Enkäten innefattade olika frågeställningar gällande exteriör och sjukdom samt olika måttfrågor avseende biometriska egenskaper såsom exempelvis mankhöjd och halsens omkrets. Enkätens olika frågor återfinns i sin helhet i Appendix 1. Genom insamlande av fenotypdata och användande av associationsanalys via genetiska markörer, är målsättningen att kunna identifiera genetiska markörer och gener förknippade med någon fenotypisk egenskap hos det i studien ingående hästmaterialet, exempelvis prestation, exteriör eller sjukdom. Förhoppningsvis kommer utökad kunskap inom området att ha en positiv inverkan vid avelsarbete och kunna bespara djur framtida lidande i sjukdom.

MATERIAL OCH METODER

Urval hästar

För att genomföra denna studie har 209 hästar ingående i en aktuell studie vid Sveriges Lantbruksuniversitet gällande eksem på islandshästar använts. Hos detta hästmateriale fanns genotypdata tillgänglig, eftersom dessa hästars arvs massa redan typats med ett Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) chip, Illumina SNP50. Urvalskriterierna för hästmaterialet baserades därmed på vad som kan anses mest lämpligt avseende eksemstatus. De 209 islandshästarna bestod av hästar som visat eksemsymptom under minst två somrar samt friska kontroller, dvs. hästar som inte visat eksemsymptom. Urvalet av friska kontroller baserades på att de skulle ha samma fader som hästar med symptom men ej vara besläktade på mödernesisidan. Således är flera av de i studien ingående hästarna härstammingsmässigt halvsyskon via fadersidan och varje häst med eksemsymptom motsvaras av en frisk kontrollhäst med samma fader.

Enkät

I denna studie har en enkät utformats och sänts via brev till de genotypade islandshästarnas ägare under perioden juli-september år 2010. Känd adress gick att lokalisera för 201 stycken hästars ägare, vilket utgjorde utskicksstorlek. Enkäten bestod av totalt 28 st. huvudfrågor och vissa huvudfrågor hade följdfrågor, enkäten återfinns i sin helhet i Appendix 1. Av de 28 huvudfrågorna gällde 15 frågor temperament, hull, exteriör, hälsa och bettyp. Frågorna avseende temperament och hull var av mer allmän karaktär och exteriörfrågorna inriktades i huvudsak på hästens benställningar samt hovar. Arvbarheten för dessa egenskaper

har visats vara låg i en studie hos den finska travaren, (Suontama *et al.*, 2009) där arvbarheten vid okulär exteriör bedömning av benställning och hovar beräknades till $0,13 \pm 0,01$ respektive $0,17 \pm 0,01$. Även om arvbarheten kan vara begränsad, valdes att inkludera frågor om benställning och hovar. Information om dessa egenskaper kunde dessutom vara relevant med avseende på enkätens hälsorelaterade frågor, vilka avsåg sjukdomar såsom fång och spatt. Fång är en benämning på inflammation i hästens hovar och spatt är benämning för en ledsjukdom som drabbar hasleden. Sjukdomen spatt valdes för att den konstaterats vara den vanligaste orsaken till utslagning av isländska ridhästar mellan 7-17 år (Björnsdóttir *et al.*, 2003).

De återstående 13 enkätfrågorna gällde olika typer av biometriska egenskaper såsom: mankhöjd, bröstomfång, hästens längd, bogbladets längd, korsets höjd, halsens längd och omkrets, framknäets omkrets, skenbensomfång, örats längd och avstånd mellan nedre ögonvinklarna. Vid utformande av mätfrågorna valdes en del biometriska egenskaper baserat på tidigare studier där viss arvbarhet påvisats. Mankhöjd och hästlängd är exempel på sådana mått och hos brasilianska Pantaneiro hästar (Miserani *et al.*, 2002) beräknades arvbarheten till 0,61 för mankhöjd och till 0,72 för hästens längd. Vissa av de biometriska måtten valdes pga. att de bedömdes vara förhållandevis enkla för djurägaren att mäta eller att aktuellt mått inte undersökts i större omfattning i andra studier. Andra mått, såsom halsens längd och omkrets, var av intresse eftersom dessa mått visats vara relaterade till insulinresistens hos hästar med sjukdomen EMS, Equine Metabolic Syndrome (Franke *et al.*, 2006).

Enkäten kompletterades med viss data ifrån databasen World Fengur, vilken är en onlinekälla representerande stambok för islandshästar (International Federation of Icelandic Horse, 2010). Kompletterande uppgifter som hämtats ur databasen var hästens härstamning och färg och dessa uppgifter inkluderades för alla 209 i studien ingående hästarna. I de fåtal fall måttangivelser för exempelvis mankhöjd fanns tillgängliga inkluderades dessa för hästar vars ägare ej besvarat enkäten.

GWA (Genome wide association analysis)

Associationsanalys mellan fenotypiska egenskaper och genetiska markörer utfördes med hjälp av datorprogrammet PLINK (Purcell *et al.*, 2007).

Genotypdata bestod av totalt 54 602 SNPs typade hos 209 islandshästar. Vid samtliga tester inkluderades endast SNPs med en minsta allelfrekvens större än 5% (MAF=0.05). Kvalitetsparametrar vid alla tester var missingness rate = 0.1 (om data ifrån mer än 10% i en SNP saknades, exkluderades den SNPn), missing genotype rate = 0.1 (om data från mer än 10% av SNPs hos en individ saknades, exkluderas alla individens SNP data), HWE test = $p < 0.000001$ (avvikelse ifrån Hardy-Weinberg jämvikt accepteras tom $p = 0.000001$ hos kontroller, vid extremare p-värden exkluderas SNPn).

Fenotypdata bestod av såväl kvalitativa som kvantitativa egenskaper, se tabell 1 och 2. De kvalitativa egenskaperna analyserades genom att undersöka om allelfrekvensen av en markör skilde sig mellan fall och kontroller och som testfunktion användes chitvå test. De kvantitativa egenskaperna analyserades med linjär regression och t-test. För de kvantitativa egenskaperna där gruppering och ej

kontinuerliga värden erhållits, utfördes fall-kontroll allelisk test mellan de två mest kontrasterande grupperna inom en egenskap och som testfunktion användes chitvå test.

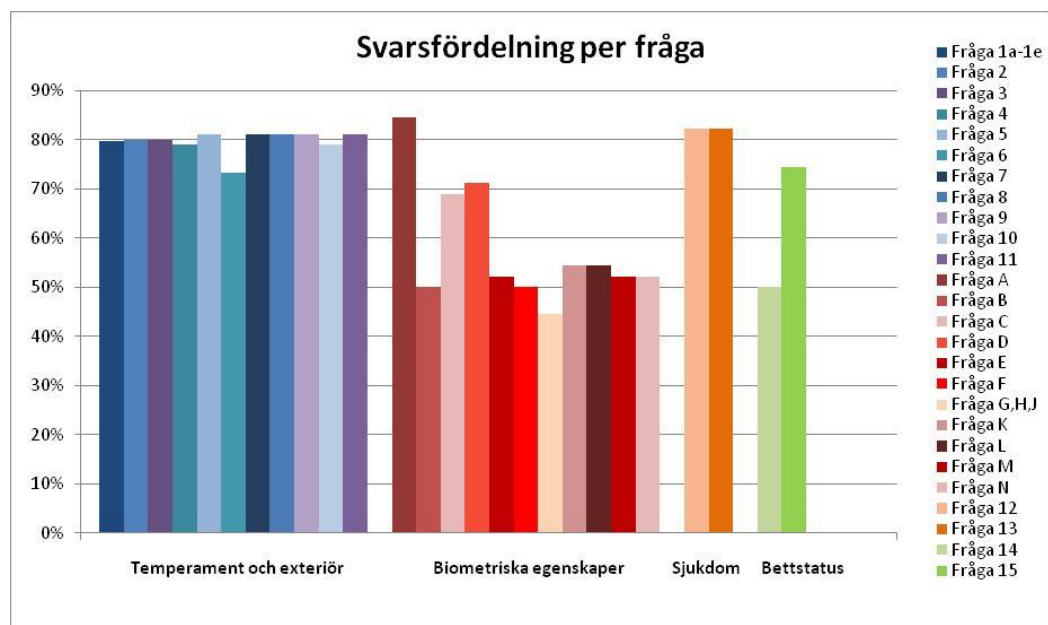
I samtliga analystester valdes att använda permutationer för att korrigera rå p-värdet för multipla tester. Antalet använda permutationer per testad egenskap startade vid 1000 och höjdes vid behov till 100 000. Vid signifikanta resultat där risk för stratifikation förelåg genererades en qq-plot och inflationsfaktorn beräknades. En Manhattan-plot producerades för samtliga egenskaper med hjälp av programmet Haploview 4.2.

UCSC Genome browser användes för lokalisering och bestämning av positioner och gener i hästens genom.

RESULTAT

Svarsfrekvens enkät

Det visade sig att många hästar bytt ägare över tiden och att intresse inte förelåg hos en del ägare att delta i studien samt att en del hästar blivit avlivade pga. olika medicinska orsaker. Totalt inkom 104 svar på enkätutskicket och den totala svarsfrekvensen blev 45 %. Variation förelåg avseende mängden besvarade frågor i de inkomna enkätsvaren, se figur 1. Generellt var svarsfrekvensen lägre för de frågor som krävde en insats ifrån hästägaren genom mätande av hästen.



Figur 1. Svarsfördelning enkät.

Associationsanalys

Antalet individer med fenotypdata ingående i testad egenskap varierade beroende på svarsfrekvens per egenskap. Antal individer med fenotypdata per testad egenskap framgår i tabell 1 och 2.

Kvalitetskorrigering av genotypdata resulterade i exklusion av varierande mängd SNPs beroende på vilken egenskap som testkördes. Exempelvis, vid analys av E-lokus exkluderades 593 SNPs pga. dålig genotypningsfrekvens och 125 SNPs pga. att de avvek signifikant från HWE. Filtret för MAF resulterade alltid i flest exkluderade SNPs, c:a 15 000 st., innebärande att ungefär 38 000 SNPs användes vid associationsanalys av de flesta egenskaper. Total genotypningsfrekvens hos kvarstående individer översteg alltid 0.99. Ingen individ exkluderades på grund av låg genotypningsfrekvens.

Totalt analyserades 31 st. fenotypgenskaper, 9 st.egenskaper exkluderades på grund av låg svarsfrekvens alternativt en för låg variation i fenotypdata. Associationsanalyser resulterande i signifikanta p-värden, $p < 0.05$, återfinns i tabell 1 och presenteras närmare nedan. Kompletterande underlag för dessa, såsom p-värdenas fördelning över kromosomerna åskådliggjorda via Manhattan-plot samt qq-plot, återfinns i Appendix 2. Analyser ej resulterande i signifikanta associationer återfinns i tabell 2.

Tabell 1. Egenskaper som genererade signifikanta p-värden

Egenskap	Fenotyp#		P-värde		Kromosom	A ₁	Frekvens A ₁		
	Fall	Kontr		EMP2			Pos (Kb)	Fall	Kontroll
Kvalitativ									
E-lokus	204	151/53	5.4E-28	1.0E-5	3	35408	T	0.32	0.94
A-lokus	141	84/57	1.1E-11	4.0E-5	22	24601	A	0.05	0.36
Blackanlag	204	31/173	9.4E-25	4.0E-5	8	18176	C	0.39	0.02
Silveranlag	152	12/140	5.6E-11	0.006	6	73950	G	0.71	0.15
Skäckanlag	204	17/187	3.3E-30	1.0E-5	3	64389	C	0.50	0.02
Tecken huvud	192	56/136	5.2E-7	0.036	3	35408	T	0.68	0.40
Kvantitativ									
Fyra/Fem gång	70	30/40	2.2E-8	0.002	23	22968	C	0.37	0.01
Slö/Framåt	57	8/49	6.2E-10	0.018	X	2015	C	0.81	0.12
Kroppslängd*	64	LR	6.60E-7	0.054	1	184233	G	LR	LR

*gränsfall till signifikant

#antal individer EMP2= Permuterat p-värde Kb= kilobaser A₁= minor allele LR= Linjär regression

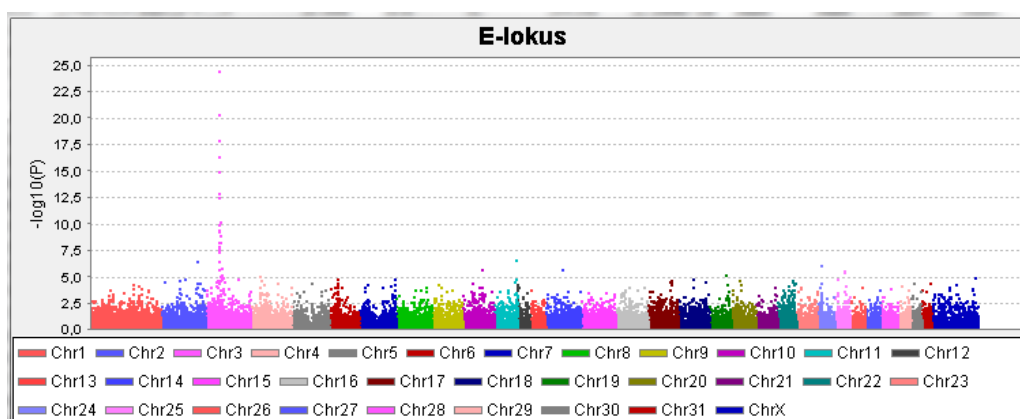
Egenskaper med signifikanta associationer till markör

E-lokus

Fenotypdata som testades var hästar med brun och svart grundfärg kontra fuxar eller liknande färger som karakteriserades av avsaknad av eumelanin. Multipla signifikanta träffar erhöles, varav 34 st. lokaliserade till kromosom 3. P-värdenas fördelning över kromosomerna är åskådliggjorda via Manhattan-plot i figur 2. Den markör som skiljde sig mest signifikant (EMP2=1.0 E-5) i allelfrekvens mellan fall och kontroller återfinns i tabell 1. Markören är placerad ~851 Kb från början av receptorgenet MC1R (alpha melanocyte stimulating hormone receptor).

A-lokus

Testad fenotypdata var svarta hästar kontra hästar med brun grundfärg, feomelanin producerande hästar användes ej som kontroller. Flera signifikanta associationer till markör erhöles, fem av dessa var lokaliserade till kromosom 22. Den markör som skiljde sig mest signifikant ($EMP2=4.0 \text{ E-5}$) i allelfrekvens mellan fall och kontroller återfinns i tabell 1. Markören är positionerad ~566 Kb från början av genen ASIP (agouti signaling protein).



Figur 2. Manhattan-plot.

Blackanlag (Dn)

Analys av allelfrekvensen hos blacka hästar vs icke-blacka resulterade i multipla signifikanta träffar, varav 21 st. lokaliserade till kromosom 8. Den markör som skiljde sig mest signifikant ($EMP2=4.0 \text{ E-5}$) i allelfrekvens mellan fall och kontroller återfinns i tabell 1 och markören är placerad ~34 Kb från början av närmaste gen, TBX3 (T-box transcription factor).

Silveranlag (Z)

Fenotypdata bestod av hästar bärande silveranlaget kontra hästar med grundfärgerna svart och brunt. Grundfärgen fux användes inte i kontroller eftersom silveranlaget anges ha störst effekt på eumelanin och fenotypen fux därmed kan maskera anlaget (Bowling A., 2000). Tre signifikanta träffar erhöles varav en markör återfanns på kromosom 6, se tabell 1. Markörens position var ~277 Kb från början av silvergenen (PMEL17).

Skäckanlag (To)

Fenotypdata som testades var skäckar med olika grundfärg kontra helfärgade hästar. Multipla signifikanta träffar erhöles, varav 52 st. lokaliserade till kromosom 3. Markör med bästa p-värde ($EMP2=1.0 \text{ E-5}$) återfinns i tabell 1, markören var positionerad ~13341 Kb från slutet av genen KIT. Närmaste markör med signifikant association ($EMP2=8.3 \text{ E-4}$) var lokaliserad ~1603 Kb från slutet av KIT genen. Tobianoanlaget har associerats med sekvensinversion ~100 Kb nedströms KIT genen (Brooks *et al.*, 2007).

Vita tecken på huvudet

Fenotypdata som testades var hästar med vita tecken på huvudet kontra hästar utan vita tecken på huvudet. En signifikant association till markör erhöles, se tabell 1, emellertid var markören densamma som erhöles på E-lokus. Då det sedan tidigare är känt att fuxar får fler och större vita tecken, valdes att analysera fuxar med och utan tecken separat samt icke-fuxar med och utan tecken separat. Detta resulterade inte i någon signifikant association.

Fyrgång versus femgång

Fenotypdata bestod av hästar som enligt enkätuppgift var fyrgångare (behärskade de tre grundgångarterna samt tölt) kontra hästar som enligt enkätuppgift var femgångare (behärskade de tre grundgångarterna samt tölt och pass). En signifikant association till markör erhöles på kromosom 23, tabell 1. För fyrgångare var frekvensen av allelen C=0.37 och hos femgångare C=0.01 med ett EMP2 värde på 0.002. Inflationsfaktorn var 1.066, vilket inte tyder på att resultatet orsakats av stratifiering. Eftersom associerad markör föreföll ha betydande effekt på fenotypen (OR=45.7) analyserades även egenskapen som dominant/recessiv. Detta resulterade i en mer signifikant skillnad i genotypfrekvens, EMP2=0.0002. Genotypfrekvensen var hos fyrgångare (CC, CT)= 0.70 och hos femgångare (CC, CT)=0.025. Den associerade markören på kromosom 23 var positionerad en bit nedströms från mittpunkten på motsvarande gen i det humana genomet, DMRT1 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1).

Slö versus framåt

Fenotypdata för hästar i gruppen slö bestod av hästar som enligt enkätuppgift angivits till 1 eller 2 på en femgradig skala för temperamentegenskaperna slö/framåt. Fenotypdata för gruppen framåt bestod av hästar som enligt enkätuppgift angivits till 4 eller 5 på en femgradig skala för egenskaperna slö/framåt. Gruppen slö analyserades kontra gruppen framåt. Två signifikanta associationer till markör erhöles på kromosom X, markör med bästa p-värde ses i tabell 1. Närmaste gen framför markören var NLGN1 (neuroligin 1), placerad ~800 Kb från markören och närmaste gen bakom markören var PRKX, placerad ~1021 Kb från markören. Emellertid krävs utökad kontroll av erhöles signifikanta associationer eftersom markörerna är lokaliserade till en könskromosom. För att kunna verifiera att erhöles association är sann, krävs genomförande av analys som tar hänsyn till allelfördelning på könskromosomer. Någon sådan analys är ännu ej utförd. Inflationsfaktorn var 1.275.

Kroppslängd

Fenotypdata för egenskapen kroppslängd bestod av kontinuerlig data i centimeter mätt från hästens bogbladsspets till sittbensknöl. En borderline markör erhöles på kromosom 1. Ej avrundat EMP2 värde var 0.05455 och inflationsfaktorn var 1.102.

Tabell 2. Egenskaper som genererade icke signifikanta p-värden

Egenskap	Fenotyp#	Fall/Kontroll#	P-värde	EMP2
Kvantitativ				
Omkrets carpus	48	LR	6.26E-7	0.08
Halsomkrets	40	LR	1.40E-5	0.30
Ögonvinkelavstånd	47	LR	2.80E-7	0.35
Skenbensomfång	49	LR	1.50E-5	0.38
Öronlängd	47	LR	1.93E-5	0.40
Mankhöjd	76	LR	2.73E-5	0.50
Bröstomfång	45	LR	3.29E-5	0.58
Korshöjd	62	LR	3.68E-5	0.61
Bogbladslängd	46	LR	4.97E-5	0.70
Halslängd	45	LR	1.14E-4	0.95
Fång	73	11/62	6.17E-8	0.10
Vargtänder	45	13/32	2.75E-6	0.18
Orädd/Tittig	58	43/15	3.60E-6	0.24
Lätt/Svårködd	51	49/2	2.05E-9	0.50
Ointresserad/Nyfiken	62	3/59	2.11E-7	0.63
Virvlar i pannan	72	66/6	2.51E-6	0.72
Huvudprofil	73	15/58	1.38E-5	0.73
Lugn/Nervös	50	44/6	2.38E-6	0.79
Hastrång/Vid	73	13/60	1.85E-5	0.86
Snäll/Elak	67	65/2	1.80E-7	0.87
Kvalitativ				
Gulanlag (C ^{cr})	110	5/105	9.40E-10	0.14
Skimmelanlag (G)	206	7/199	1.45E-8	0.15

#antal individer LR= Linjär regression EMP2= permuterat p-värde

DISKUSSION

Kandidatgener för flertalet färgegenskaper har identifierats i tidigare studier, dessa användes som *proof of principle* i aktuell studie, dvs. för att kontrollera och visa att det går att hitta associationer i det i studien ingående materialet. Studier på möss har visat att den recessiva allelen *e* innebär en icke fungerande MC1R receptor (Robbins *et al.*, 1993). Defekt receptor förhindrar bindande av liganden MSH (melanocyststimulerande hormon), resulterande i feomelaninproduktion. Hos hästar har en mutation i MC1R visats vara orsak till fenotypen fuxfärg (Marklund *et al.*, 1996). Hästar med svart grundfärg (Rieder *et al.*, 2001) har funnits vara homozygota (*a/a*) för en mutation i genen ASIP, med resultat att eumelanin (svart pigment) bildas. En mutation i genen PMEL 17 har konstaterats vara associerad med fenotypen silver (Brunberg *et al.*, 2006). På kromosom 3 har en inversion ~100 Kb nedströms KIT genen associerats med skäckanlaget tobiano (Brooks *et al.*, 2007). I aktuell studie har signifikanta associationer till markör erhållits för färgegenskaper knutna till E-lokus, A-lokus, Z-lokus och To-lokus. De funna markörerna är belägna på korrekt kromosom och i närheten av tidigare identifierade kandidatgener för färgegenskaper. De färgegenskaper som inte

genererade signifikanta associationer till markörer var gulanlag (C^{cf}) och skimmelanlag (G). Tidigare utförda studier har lokaliserat gulanlaget till kromosom 21 (Locke *et al.*, 2001) och skimmelanlaget har rapporterats till kromosom 25 (Swinburne *et al.*, 2002; Pielberg *et al.*, 2005). Orsaken till att dessa färggenskaper ej genererade signifikanta associationer till markör i genomförd studie var sannolikt att antalet individer med aktuell färg i fenotypmaterialet var för få. En annan möjlig orsak kan vara att relevanta SNPs saknas vid aktuella geners regioner, men det förefaller mindre troligt då övriga SNPs från chipet, Illumina SNP50, visat god överensstämmelse för övriga färggenskaper. Sammantaget har det i studien ingående materialet visats kunna generera signifikanta associationer i överensstämmelse med tidigare studier.

Målsättningen med denna studie var att försöka identifiera ej tidigare kända genetiska markörer eller gener associerade med fenotypiska egenskaper hos det i studien ingående hästmaterialet. Sådana genetiska markörer har erhållits för en kvalitativ och två kvantitativa egenskaper.

Kandidatgener för blackanlaget (Dn) har inte publicerats vid denna studies avslutande. Emellertid anges i ett abstract från Plant & Animal Genomes XI Conference 2003 att det finns en koppling mellan blackfärg och mikrosatelliter på kromosom 8, men att kandidatgen ej identifierats genom mappning (Bricker *et al.*, 2003). Associationsanalys avseende blackanlaget (Dn) genererade multipla signifikanta associationer till markör lokaliserade till kromosom 8. Den markör som skiljde sig mest signifikant ($EMP2=4.0 E-5$) i allelfrekvens mellan fall och kontroller var placerad ~34 Kb från början av närmaste gen, TBX3 (T-box transcription factor). Resultatet visade överensstämmelse med data från annan pågående studie vid SLU och UU där TBX3 identifierats som möjlig kandidatgen för blackfärg (opublicerad data). TBX3 funktion anges bl a vara att generera transkriptionsfaktorer vid embryonal utveckling (Bollag *et al.*, 1994).

Associationsanalys av egenskaperna fyrgång versus femgång genererade en signifikant association till markör på kromosom 23. Kandidatgener för aktuell egenskap har inte publicerats vid denna studies avslutande. Markörens position var belägen en bit nedströms från mittpunkten på genen DMRT1 (doublesex and mab-3 related transcription factor 1). DMRT1 har funktion vid reglering av hanlig differentiering och är nödvändig för testikelutveckling hos ryggradsdjur (Krentz *et al.*, 2009). Utökade tester krävs för verifiering av erhållen association. Initialt bör associerad markör genotypas i ett större hästmateriäl för verifiering av att association mellan kromosomregion och egenskap kvarstår. Om erhållen association kvarstår bör kromosomregionen finmappas, innebärande analys av flertalet SNPs placerade tätare än på chipet Illumina SNP50 i aktuell region. Finmappning avser exakt identifiering av gen i regionen med påverkan på aktuell egenskap. Utförande av utökade tester ligger utanför ramen för detta arbete.

Associationsanalysen genererade två signifikanta associationer till markör för egenskaperna slö kontra framåt på kromosom X. Närmaste gen, bakom markör med bästa $EMP2$ värde, tabell 1, var PRKX. PRKX enzym kan vara involverade i reglering av njurepitel i samband med organogenes hos däggdjur (Li *et al.*, 2002). Närmaste gen framför markören var NLGN1 (neuroligin 1). Neuroliginer är molekyler involverade vid excitoriska och inhibitoriska synapser (Blundell *et al.*, 2010). Samband mellan neuroliginer och autism hos människa kan föreligga

och stereotypa beteenden hos knock out möss har påvisats. Utökad kontroll av erhållen association är nödvändig eftersom markören är placerad på en könskromosom. Honor har två X-kromosomer och kan vara antingen homozygota eller heterozygota, medan hanar endast har en X-kromosom och betraktas som hemizygota. Det medför att allelfrekvens inte kan beräknas på samma sätt som för övriga kromosomer. För att kunna verifiera att erhållen association är sann, krävs genomförande av analys beaktande allelfördelning på könskromosomer. Utförande av en sådan analys ligger utanför ramen för detta arbete.

Vid associationsanalysen genererade de biometriska egenskaperna endast en borderline, egenskapen kroppslängd, och i övrigt erhöles inga signifikanta resultat. Att så blev fallet kan ha flera orsaker. Vissa mått som undersöktes hade ingen tidigare dokumentation avseende arvbarhet och kanske inte heller är relaterade till någon större genetisk variation. Andra måttfrågor utformades efter att man i tidigare studier funnit viss arvbarhet, exempelvis fann man i en studie av drygt tvåtusen brasilianska Pantaneiro hästar (Miserani *et al.*, 2002) den beräknade arvbarheten till 0,61 för mankhöjd och till 0,72 för hästens längd. I en annan studie av drygt tvåtusenfemhundra iranska arabhästar (Gharahveysi *et al.*, 2008) beräknades arvbarheten för mankhöjd till 0,57 och hästens längd till 0,27. Den genetiska variationen kan alltså vara olika beroende på undersökt population. Dessutom kan flera gener vara involverade i de biometriska egenskaperna och varje gen i sig kan ha ett litet bidrag till egenskapen som helhet. Små bidrag från många gener kan vara svåra att fånga upp, särskilt om studien innehåller en mindre mängd individer.

Konklusion

Associationsanalys avseende färgegenskaper knutna till A-lokus, E-lokus, Z-lokus och To-lokus genererade signifikanta associationer till markör och markörens position visade överensstämmelse med tidigare publicerade data avseende färgegenskapernas genetiska placering. Chipet, Illumina SNP50, föreföll tillförlitligt tillsammans med den i studien ingående islandshästpopulationen och det i studien ingående materialet har visats kunna generera signifikanta associationer till markör för dessa egenskaper.

Associationsanalys genererade två signifikanta associationer till markör för egenskaperna slö kontra framåt på kromosom X. Genomförande av ytterligare analys beaktande allelfördelning på könskromosomer krävs för verifiering av sanningsgrad i erhållen association.

Associationsanalys avseende blackanlaget (Dn) genererade multipla signifikanta associationer till markör, lokaliserade till kromosom 8. Associationsanalysen genererade även en signifikant association till markör på kromosom 23 för egenskaperna fyrgång versus femgång. Utökade tester i ett större populationsurval krävs för verifiering av att erhållna associationer mellan kromosomregion och egenskap kvarstår. Om erhållna associationer kvarstår, bör kromosomregion för aktuella associationer finmappas och re-sekvenseras för att identifiera orsakande mutationer.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Björnsdóttir S., Árnason T., Lord P. (2003). Culling rate of Icelandic horses due to bone spavin. *Acta. Vet. Scand.*, 2003; 44(4): 161–169.
- Blundell J., Blaiss C.A., Etherton M.R., Espinosa F., Tabuchi K., Walz C., Bolliger M.F., Südhof T.C., Powell C.M. (2010). Neuroligin 1 deletion results in impaired spatial memory and increased repetitive behavior. *J. Neurosci.*, 30(6), 2115–2129.
- Bollag R.J., Siegfried R.J., Cebra-Thomas J.A., Garvey N., Davison E.M., Silver L.M. (1994). An ancient family of embryonically expressed mouse genes sharing a conserved protein motif with the T locus. *Nat. Genet.*, 7, 383–389.
- Bowling A: Genetics of Color variation. In *The Genetics of the Horse* Edited by: Bowling AT, Ruvinsky A. New York: CABI Publishing; 2000.p 62.
- Bricker S.J., Penedo M.C.T., Millon L.V., Murray J.D. (2003). Abstract: linkage of the dun coat color locus to microsatellites on horse chromosome 8. *Plant & Animal Genomes XI Conference 2003*. [online] http://www.intlpag.org/11/abstracts/P5n_P640_XI.html [2010-12-10]
- Broad Institute. *Plotting Genome-Wide Association Results*. [online] (2010) <http://www.broadinstitute.org/diabetes/scandinavs/figures.html> [2010-12-22]
- Brooks S.A., Lear T.L., Adelson D.L., Bailey E. (2007). A chromosome inversion near the KIT gene and the Tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenet. Genome. Res.*, 119(3-4), 225-30.
- Brooks S.A., Gabreski N., Miller D., Brisbin A., Brown H.E., Streeter C., Mezey J., Cook D., Antczak D.F. (2010). Whole-Genome SNP Association in the Horse: Identification of a Deletion in Myosin Va Responsible for Lavender Foal Syndrome. *PLoS Genet.*, [online], 6, no 4, e1000909.001-e1000909.007.
- Brunberg E., Andersson L., Cothran G., Sandberg K., Mikko S., Lindgren G.(2006). A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse. *BMC Genet.*,7:46.
- Cornell University, College of Veterinary Medicine. *Animal Health Diagnostic Center*. [online] (2010). <http://ahdc.vet.cornell.edu/pdf/lavendarfoalhair.pdf> [2010-09-22]
- Frank N., Elliott S.B., Brandt L.E., Keisler D.H.(2006). Physical characteristics, blood hormone concentrations, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 228, no 9, 1383-1390.
- Gharahveysi S., Emam Jome Kashan N., Gerami A., Vaez Torshizi R.(2008). Estimation of genetic parameters on conformation traits of the Iranian Arab horses population. *Pak. J. Bio. Sci.*, 11 (2), 280-284.
- International Federation of Icelandic Horse Associations (FEIF), Farmers Association of Iceland (FAIC). *World Fengur, the studbook of origin for the Icelandic horse* [online](2010). <http://www.worldfengur.com> [2010-09-22]
- Krentz A.D., Murphy M.W., Kim S., Cook M.S., Capel B., Zhu R., Matin A., Sarver A.L., Parker K.L., Griswold M.D., Looijenga L:H:J., Bardwell V.J., Zarkower D. (2009). The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2009; 106(52), 22323–22328.
- Li X., Li H-P., Amsler K., Hyink D., Wilson P.D., Burrow C.R. (2002). PRKX, a phylogenetically and functionally distinct cAMP-dependent protein kinase, activates renal epithelial cell migration and morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2002; 99(14): 9260–9265.

- Locke M.M., Ruth L.S., Millon L.V., Penedo M.C., Murray J.D., Bowling A.T. (2001). The cream dilution gene, responsible for the palomino and buckskin coat colours, maps to horse chromosome 21. *Anim. Genet.* 2001;32(6):340-343.
- Long N., Gianola D., Rosa G.J., Weigel K.A., Avendano S. (2007). Machine learning classification procedure for selecting SNPs in genomic selection: application to early mortality in broilers. *J. Anim. Breed. Genet.*, 124 (6), 377-389.
- Marklund S., Moller M.J., Sandberg K., Andersson L. (1996). A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome*, 7, 895–899
- Miserani M.G., McManus C., Santos S.A., Silva J.A., Mariante A.S., Abreu U.G.P., Mazza M.C., Sereno J.R.B. (2002). Heritability estimates for biometric measures of the Pantaneiro horse. *Arch. Zootec.*, 51, 107-112.
- Pei Y-F., Zhang L., Li J., Deng H-W. (2010). Analyses and Comparison of Imputation-Based Association Methods. *PLoS Genet.* [online], 5, no 5, e10827.001-e10827.010.
- Pielberg G., Mikko S., Sandberg K., Andersson L. (2005). Comparative linkage mapping of the Grey coat colour gene in horses. *Anim. Genet.*, 36(5):390-395.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., Sham P.C. (2007). PLINK: a tool set for whole-genome association and populationbased linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.*, 81, 559–575.
- Purcell S. (2010). *PLINK (1.07) Documentation*. [online] (2010) <http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/dist/plink-doc-1.07.pdf> [2010-12-22]
- Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B., Gu erin G. (2001). Mutations in the agouti (ASIP), the extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm. Genome*, 2001; 12, 450-455.
- Robbins L.S., Nadeau J.H., Johnson K.R., Kelly M.A., Roselli-Rehfuss L., Baack E., Mountjoy K.G., Cone R.D. (1993). Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell.*, 72, 827–834.
- Suontama M., Saastamoinen M.T., Ojala M.(2009). Estimates of non-genetic effects and genetic parameters for body measures and subjectively scored traits in Finnhorse trotters. *Livestock Science* [online], 124, 205-209.
- Swinburne J.E., Hopkins A., Binns M.M.). Assignment of the horse grey coat colour gene to ECA25 using whole genome scanning. *Anim. Genet.* 2002;33(5):338-342.
- UCSC Genome Bioinformatics. *Horse genome browser gateway* [online] (2010). <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> [2010-09-22]

APPENDIX

Appendix 1

Enkät

I-X

Appendix 2

Manhattan-plot och qq-plot

XI-XIX

E-lokus

XI

A-lokus

XII

Silveranlag (Z)

XIII

Skäckanlag (To)

XIV

Blackanlag (Dn)

XV

Fyrgång versus femgång

XVI

Slö versus framåt

XVII

Kroppslängd

XVIII

Vita tecken huvud

XIX

Appendix 1

Enkätstudie om koppling mellan gener och en rad olika egenskaper såsom exteriör och sjukdom hos islandshästar

Enkätfrågorna skall markeras med ett svarsalternativ om inte annat anges. Vid flervalfrågor anges i frågans text hur många markeringar som skall göras. Markering görs enklast genom att ringa in svarsalternativet. I de fall svaret skall textas, var vänlig och texta tydligt och läsbart. Förklaringar och utökad information till vissa frågor återfinns längst bak i enkäten.

Bildillustrationerna i enkäten är copyrightskyddade och bilderna till de flesta frågor (ej frågorna 14,15 samt K-N) har vänligen ställts till vårt förfogande av illustratören Staffan Philipsson.

Ägaruppgifter

Namn: * _____

Adress: _____

Telefon: * _____

E-post: _____

Ifylles endast vid ägarbyte. Ange ny ägare till hästen.

Namn: _____

Adress: _____

Telefon/E-post: _____

Information om hästen

Hästens fullständiga namn*: _____

* Dessa fält är obligatoriska

1a-1e Hur upplever du din hästs temperament?

Gör en markering på varje skala vid den egenskap som bäst överensstämmer med din häst. En häst som exempelvis är snäll, lugn och framåt samt ibland något tittig och varken är nyfiken eller ointresserad markeras enligt exemplet till höger.

Exempel

1 a. Lugn	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Nervös
1 b. Orädd	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Tittig
1 c. Slö	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Framåt
1 d. Ointresserad	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Nyfiken
1 e. Snäll	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Elak

1 a. Lugn	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Nervös
1 b. Orädd	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	Tittig
1 c. Slö	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	Framåt
1 d. Ointresserad	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Nyfiken
1 e. Snäll	<input checked="" type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	Elak

2. Är din häst normal, lätt eller svår att hålla i hull?

Lättfödd

Svårfödd

Normal

3. När din häst är i hagen och något oförutsett händer som gör att hästen vill springa iväg, vilken gångart väljer hästen spontant vid de flesta tillfällen?

TRAV

GALOPP

TÖLT

PASS

VET EJ

4. Är din häst en fyra eller femgångare?

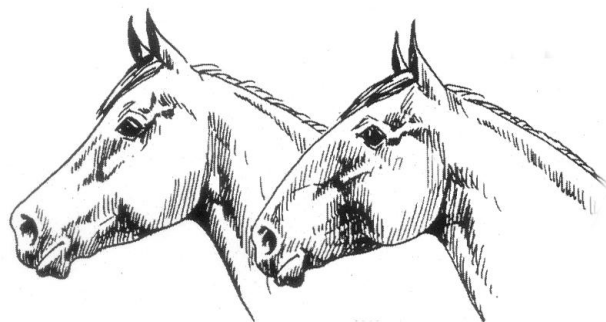
FYRA

FEM

VET EJ

Frågor angående din hästs exteriör.

5. Jämför nedanstående bilder och markera vilken typ av huvudform din häst har.



KONKAV PROFIL

KONVEX PROFIL

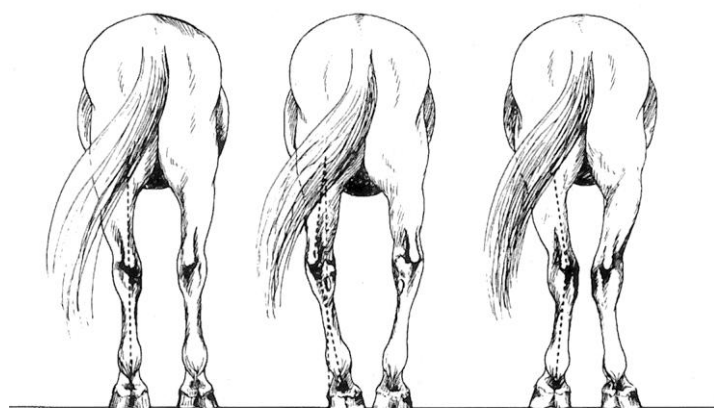


RAK PROFIL

6. Hur många virvlar har din häst i pannan? _____ stycken

VET EJ

7. Markera under den bild som bäst stämmer överens med hur din hästs bakben ser ut.



Rak benställning

Hasvid, hjulbent
– benaxeln bruten
utåt i hasen

Hastrång, kohasig
– benaxeln bruten
inåt i hasen.

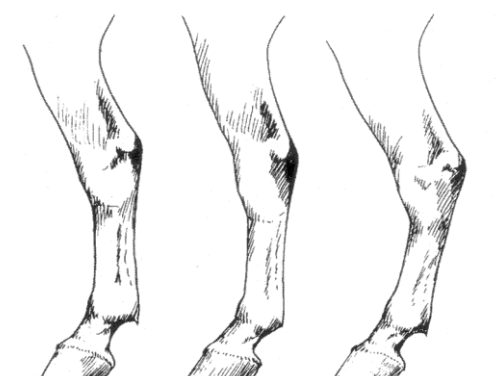
RAK

HASVID

HASTRÅNG

VET EJ

8. Markera under den bild du tycker bäst överensstämmer med din hästs hasvinkel.



Normal
has

Rak has –
stor hasvinkel

Krokhas, vinklad
has, liten hasvinkel

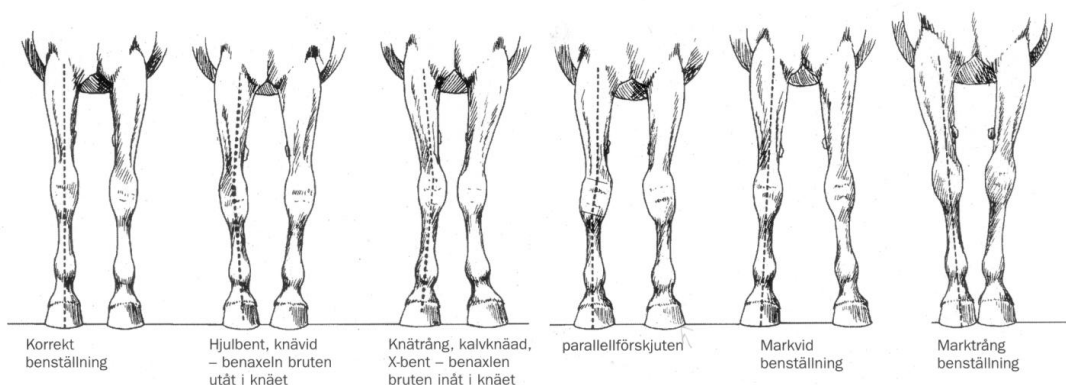
NORMAL HAS

RAKHAS

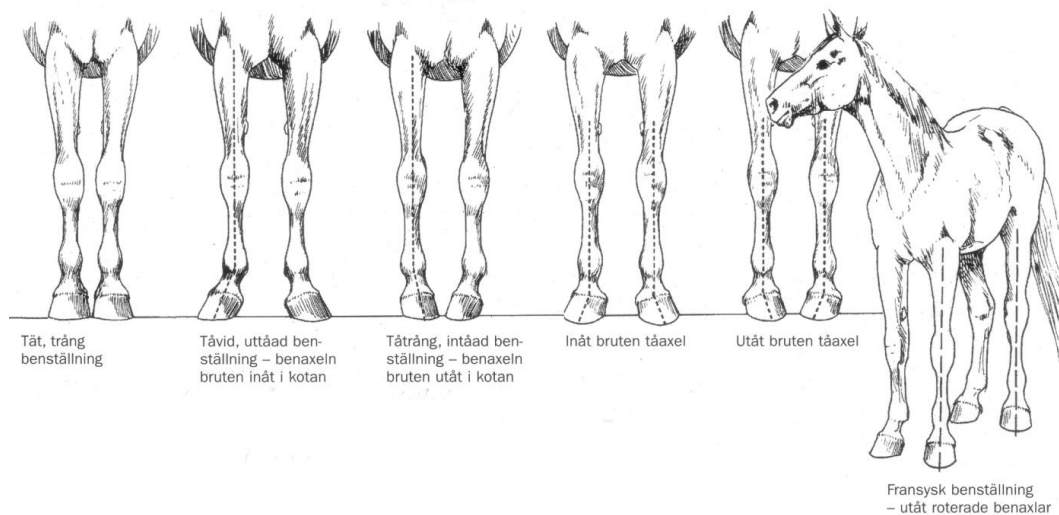
KROKIG HAS

VET EJ

9. Jämför nedanstående bilder och markera under de bilder som stämmer överens med hur din hästs framben ser ut framifrån. Minst en markering för varje framben, dvs minst två markeringar totalt. Exempel på hur frågan kan markeras finns längst bak i enkäten.

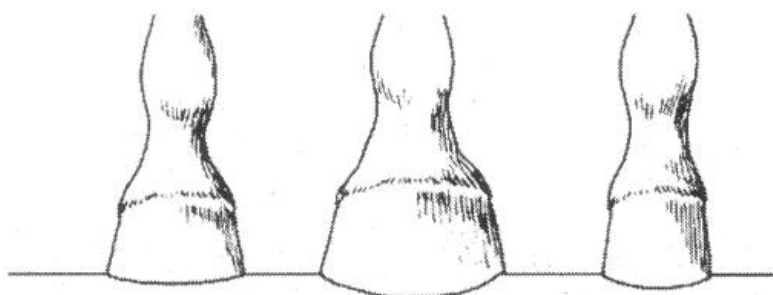


HF VF HF VF HF VF HF VF HF VF HF VF



HF VF HF VF HF VF HF VF HF VF HF VF VET EJ

10. Markera under den bild nedan som bäst stämmer överens med din hästs hovstorlek. Fyra markeringar, en för varje hov.



Normal hov

Stor hov

Liten hov

HF VF HB VB

HF VF HB VB

HF VF HB VB

VET EJ

11. Hur bedömer du din hästs hovkvalité?

Bra

Dålig

Exteriöra frågor med måttangivelser

A Mankhöjd

 cm

EJ MÄTT

Mät mankhöjden med hjälp av tumstock och ett vattenpass eller annat rakt föremål. Ställ hästen på ett jämnt icke sluttande underlag. Läg vattenpasset vågrätt vid manken, placera tumstocken lodrät och låt tumstock och vattenpass bilda en 90 gradig vinkel. Avläs mankhöjden i cm.

A1. Ange om mankhöjden är mätt med eller utan skor.

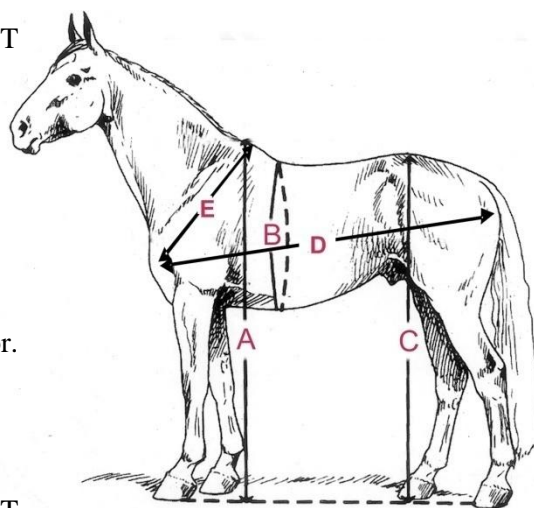
MED SKOR UTAN SKOR

B Bröstomfång

 cm

EJ MÄTT

Mät bröstomfång med måttband, placera måttbandet strax bakom manken och i sadelgjordsläget. Kontrollera att bandet är rakt och väl sträckt när omkretsen mäts.



C Korsets höjd cm EJ MÄTT

Mät korsets höjd vid den högsta punkten med hjälp av tumstock och ett vattenpass eller annat rakt föremål. Tillvägagångssätt som vid mankhöjdens mätande.

D Hästens längd cm EJ MÄTT

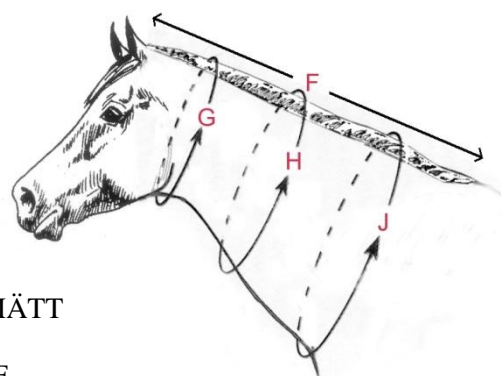
Mät längden med måttband på vänster sida från bogbladsspetsen till sittbensknölen.

E Bogbladets längd. cm EJ MÄTT

Mät från bogbladsspetsen till mankens högsta punkt.

F Halsens längd cm EJ MÄTT

Mät halsens längd i en rak linje med början mittemellan bakre öroninfästningen fram till manken, där det bildas en liten grop. Huvud och hals skall vara i normal upprätt position.



G Halsens omkrets mätt vid 0,25F cm EJ MÄTT

Var halsens omkrets skall mätas beror av halsens längd, måttet F. Om måttet på halsens längd exempelvis blir 100 cm, skall omkretsen G mätas 25 cm från bakre öroninfästningen, omkretsen H mätas vid 50 cm och omkretsen J mätas vid 75 cm. Om halsens längd istället är 80 cm, skall G mätas vid 20 cm, H vid 40 cm och J vid 60 cm.

H Halsens omkrets mätt vid 0,50F cm EJ MÄTT

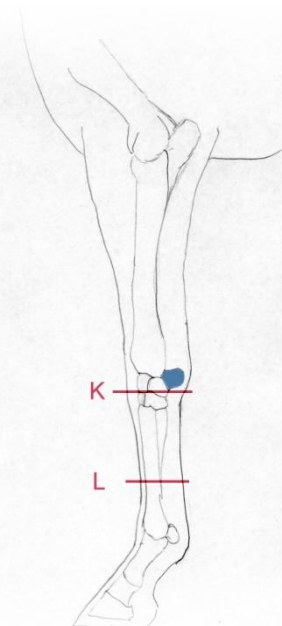
J Halsens omkrets mätt vid 0,75F cm EJ MÄTT

K Omkrets Vänster framknä cm EJ MÄTT

Identifiera ärtbenet, markerat med blått på bilden till höger, känns som en utbuktning på baksidan av framknäet. Placera måttbandet strax under ärtbenet, enligt den röda markeringen vid K på bilden och mät omkretsen på VF.

L Skenbensomfång Vänster fram cm EJ MÄTT

Mät mellan kota och framknä på vänster framben. Ange skenans minsta omkrets, således behöver mätning ej ske exakt vid markeringen för L på bilden till höger

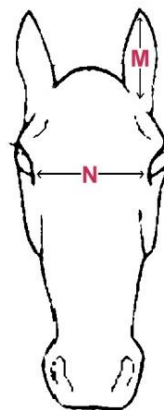


M Örats längd cm EJ MÄTT

Mät med måttband, från örontippen till skallbasen enligt bild.

N Avståndet mellan ögonvinklarna cm EJ MÄTT

Mät med måttband, enligt bild.



Frågor om din hästs hälsa och munstatus

12 a. Har din häst någon gång drabbats av fång?

JA NEJ VET EJ

12 b. Om JA på fråga 12 a, ange vilket/vilka ben som drabbades då hästen fick fång. Om hästen fått fång upprepade gånger, ange de ben som drabbades då hästen fick fång första gången.

HF VF HB VB VET EJ

13 a. Har din häst fått diagnosen spatt?

JA NEJ VET EJ

13 b. Om JA på fråga 13 a, hur ställdes diagnosen spatt? Mer än ett svarsalternativ kan väljas.

HÄLTUTREDNING

RÖNTGEN

VETERINÄRBESIKTNING

VET EJ

13 c. Om JA på fråga 13 a, hur gammal var hästen när symptom på spatt upptäcktes?

0-1år 1-2år 2-3år 3-4år 4-5år 5-6år 6-7år 7-8år 9år och äldre VET EJ

14 a. Har din häst fått sk vargtänder?

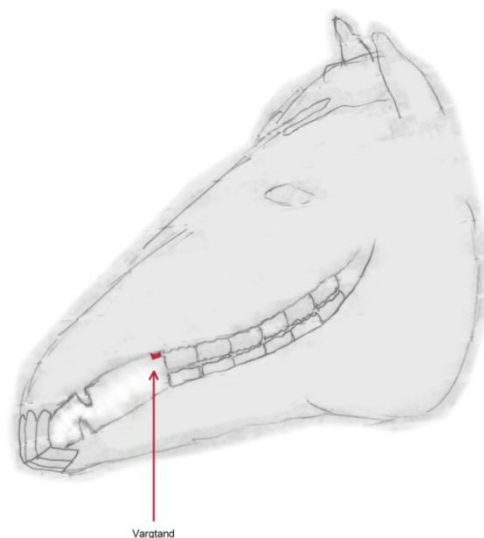
JA NEJ VET EJ

14 b. Om JA på fråga 14 a, har hästen vargtänder i

ÖVERKÄKE

UNDERKÄKE

BÅDE ÖVER och UNDERKÄKE

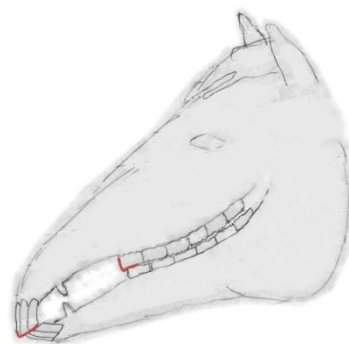


15. Vilken typ av bett har din häst?

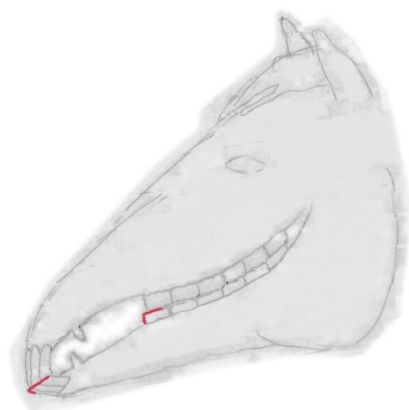
Jämför nedanstående bilder och markera under den bild som stämmer överens med din hästs bett.



NORMALBETT



ÖVERBETT



UNDERBETT

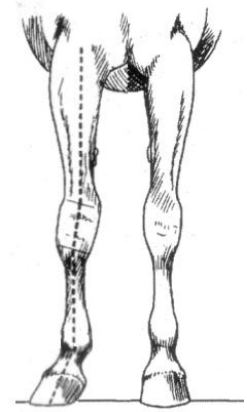
BETTYP KAN INTE BEDÖMAS

Övriga kommentarer till enkätens frågor som ej kunnat delges vid respektive fråga.

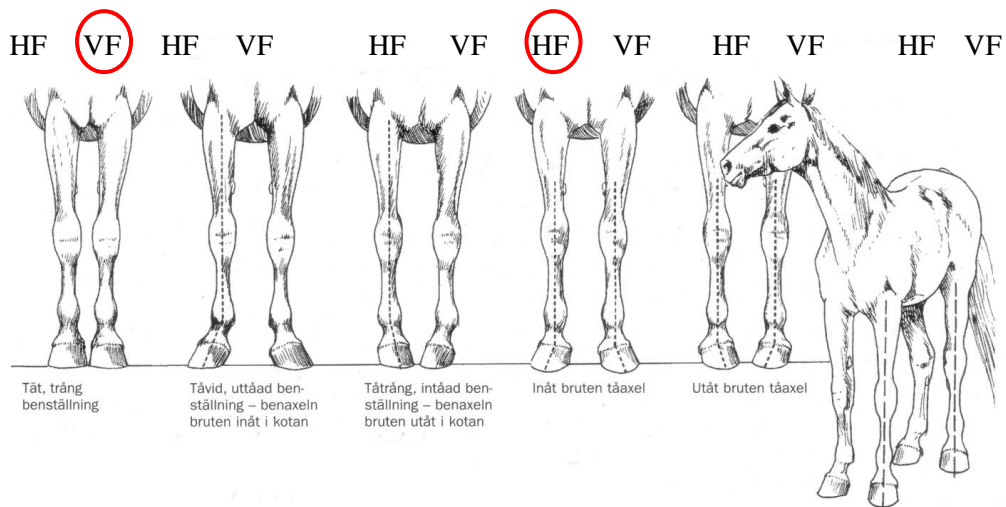
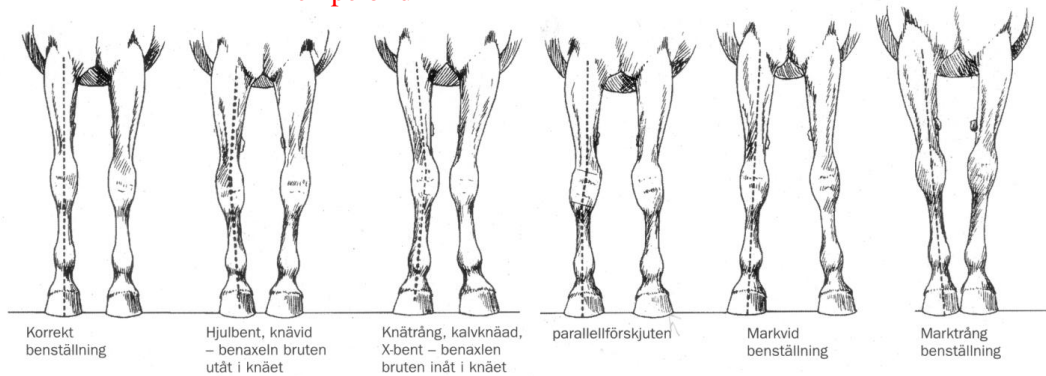
Förklaring till vissa av frågorna.

6. Ange endast antalet virvlar. Var virvlarna är placerade i pannområdet behöver ej anges.

9. Om din häst ser ut som på exemplet till höger, dvs parallellförskjuten samt uttåad från kotan på HF och har korrekt benställning på VF, markerar du de olika beställningarna under de bilder som överensstämmer. I detta exempel totat tre markeringar.



Exempelbild



HF VF **HF** VF HF VF HF VF HF VF HF VF **HF** VF VET EJ

12 a. Fång är benämning på akut inflammation i hästens hovar. Inflammationen ger upphov till smärta och hästen uppvisar ovilja att röra sig.

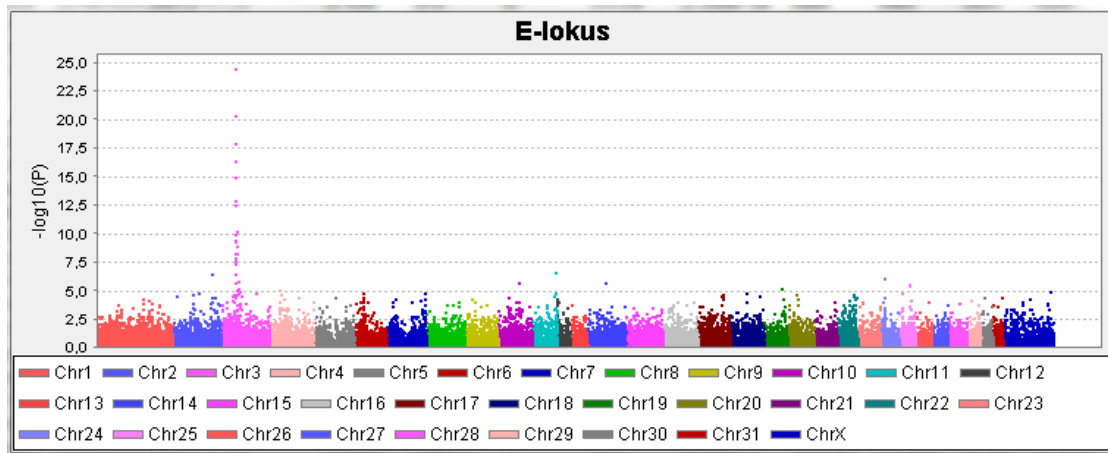
13 a. Spatt är benämning på en ledsjukdom som drabbar hasleden. Symtomen kan variera ifrån stelhet till hälta.

14 a. En vargtand är en normal tand, men i rudimentär form. Det är en liten tand som återfinns framför hästens första kindtand (premolar 2). Om hästen utvecklat vargtänder återfinns dessa vanligtvis i överkäken, men hos en del hästar även i underkäken”

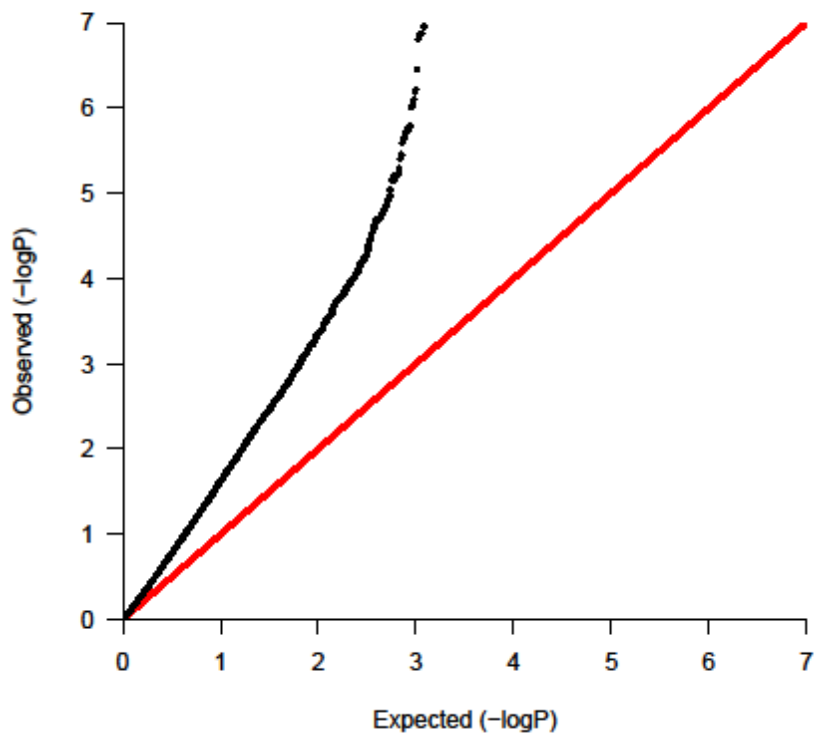
15. Att avgöra om en häst har över eller underbett kan ibland vara svårt och kan ofta inte endast avgöras med hjälp av framtändernas position, utan man behöver inspektera de första kindtändernas läge i förhållande till varandra.

Appendix 2

E-lokus

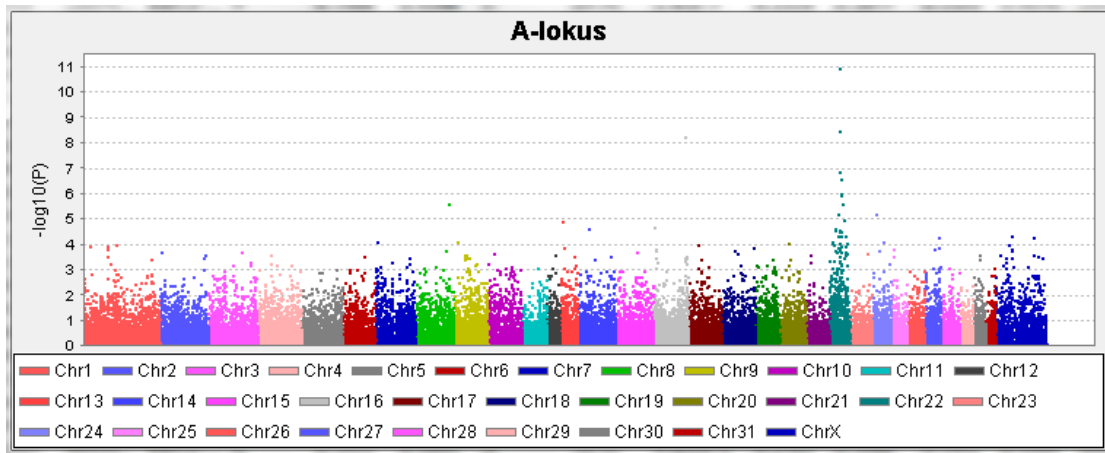


Figur 3. *E-lokus*, manhattan-plot.

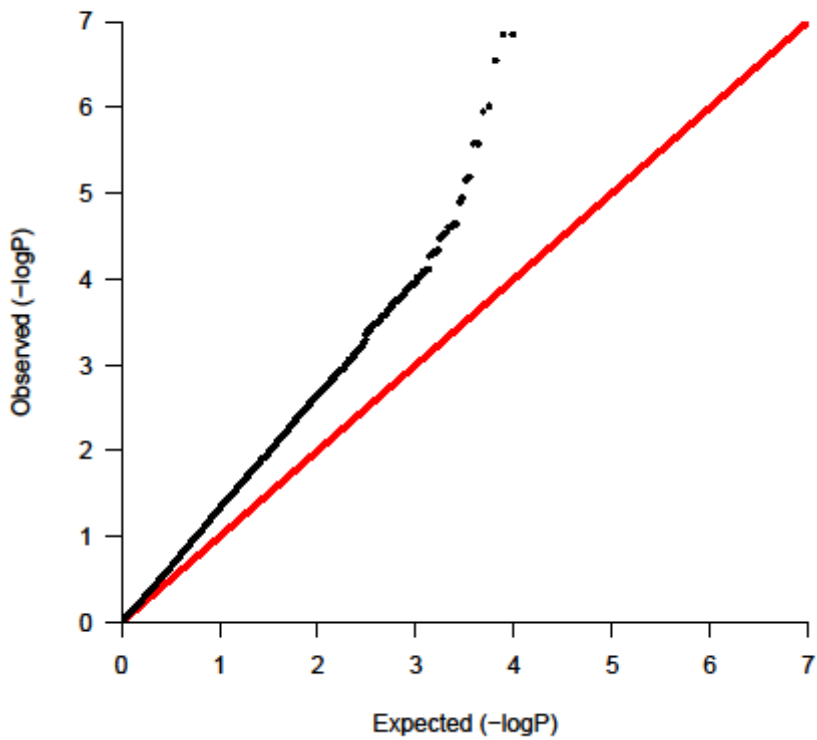


Figur 4. *E-lokus*, qq-plot.

A-lokus

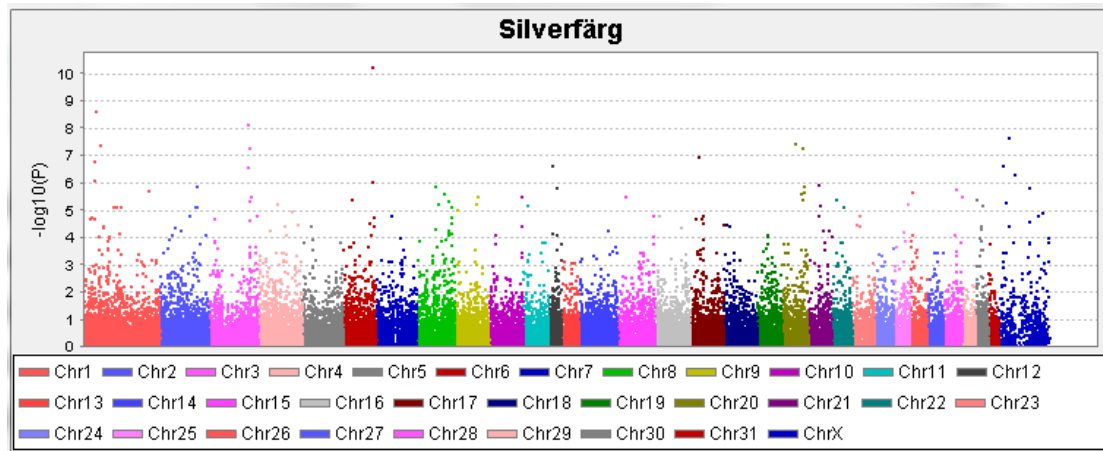


Figur 5. A-lokus, manhattan-plot.

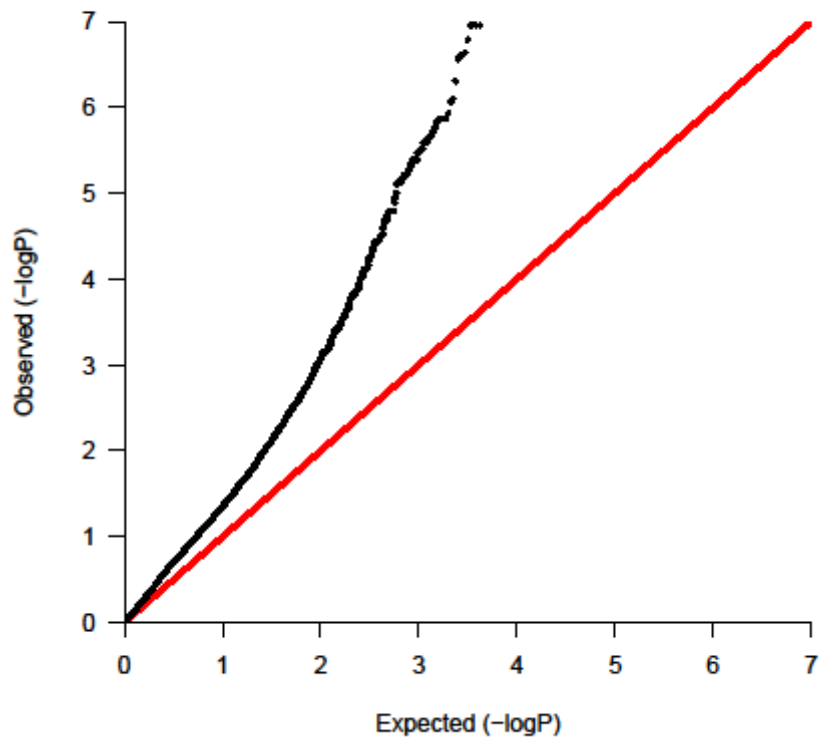


Figur 6. A-lokus, qq-plot.

Silveranlag

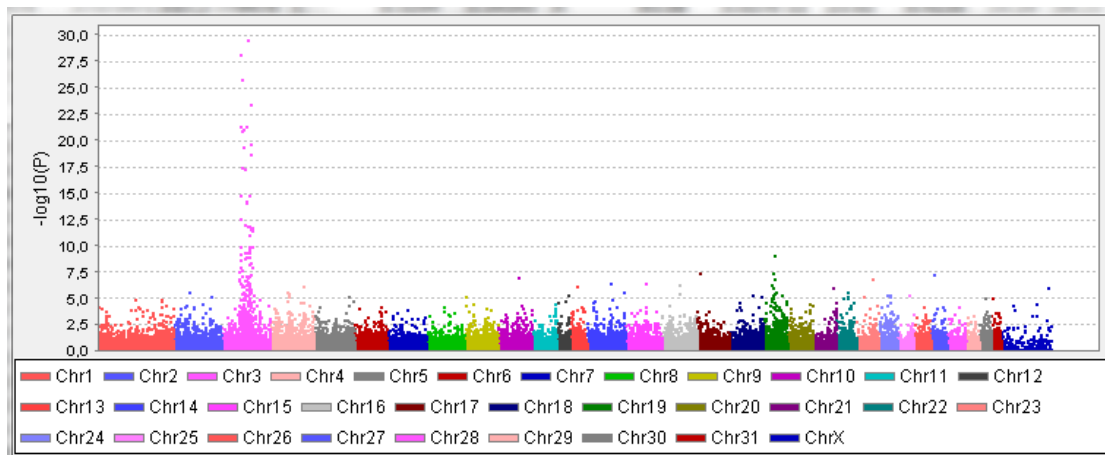


Figur 7. Z-lokus, manhattan-plot.

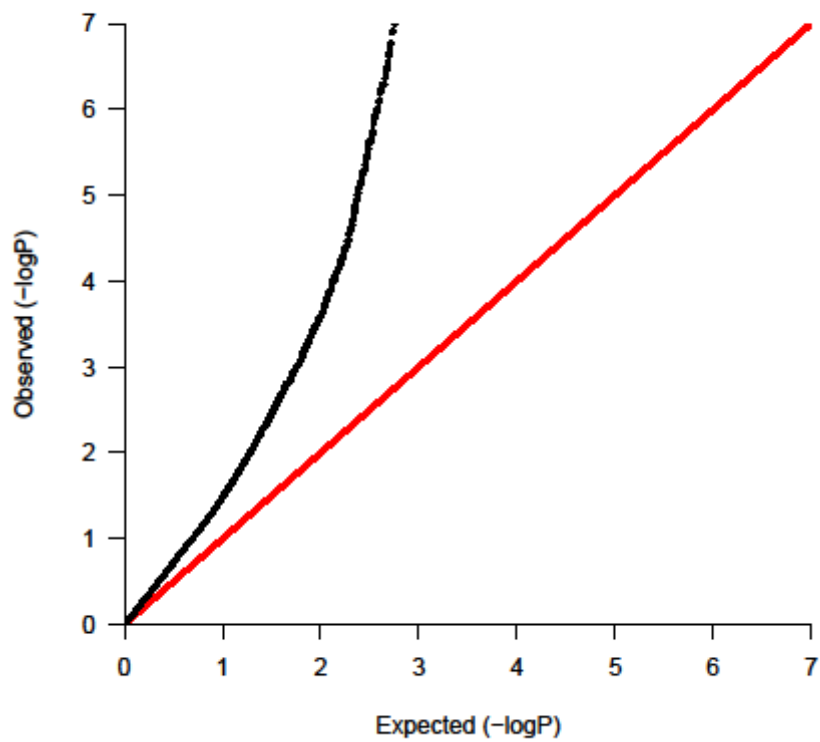


Figur 8. Z-lokus, qq-plot.

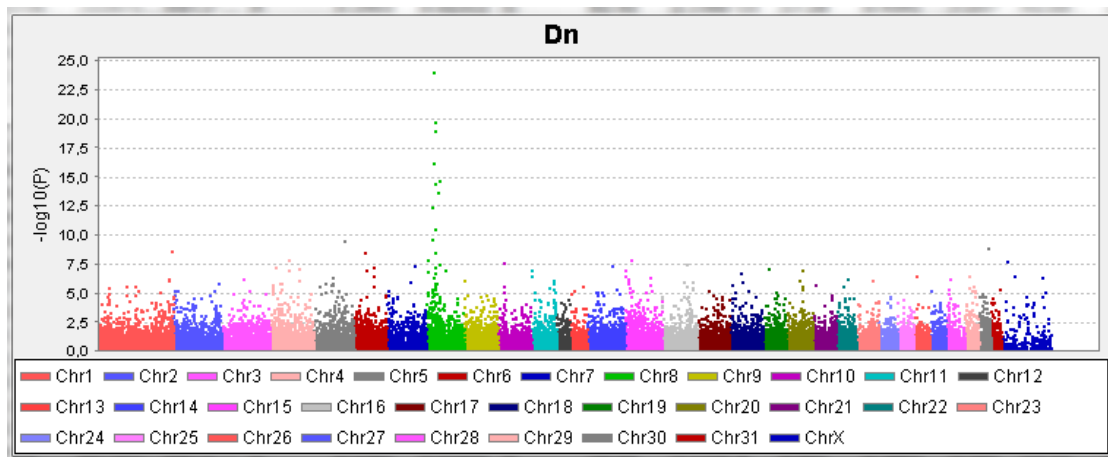
Skäckanlag



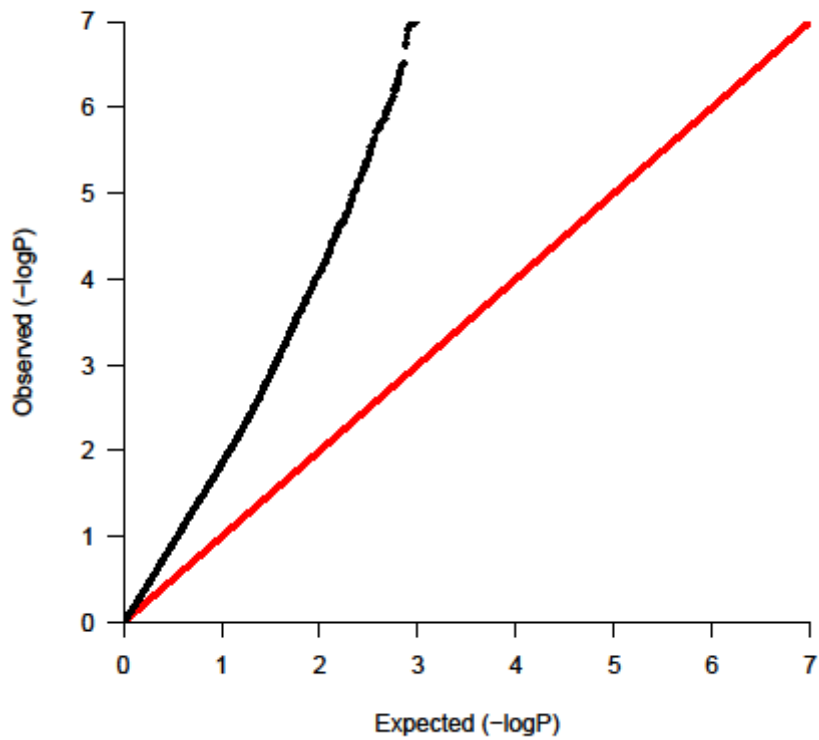
Figur 9. To-lokus, manhattan-plot.



Figur 10. To-lokus, qq-plot.

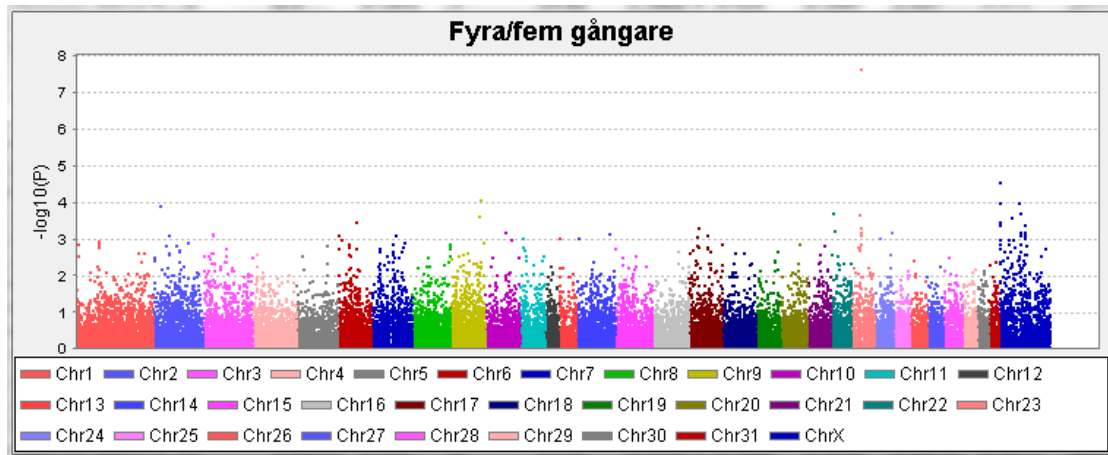


Figur 11. Dn-lokus, manhattan-plot.

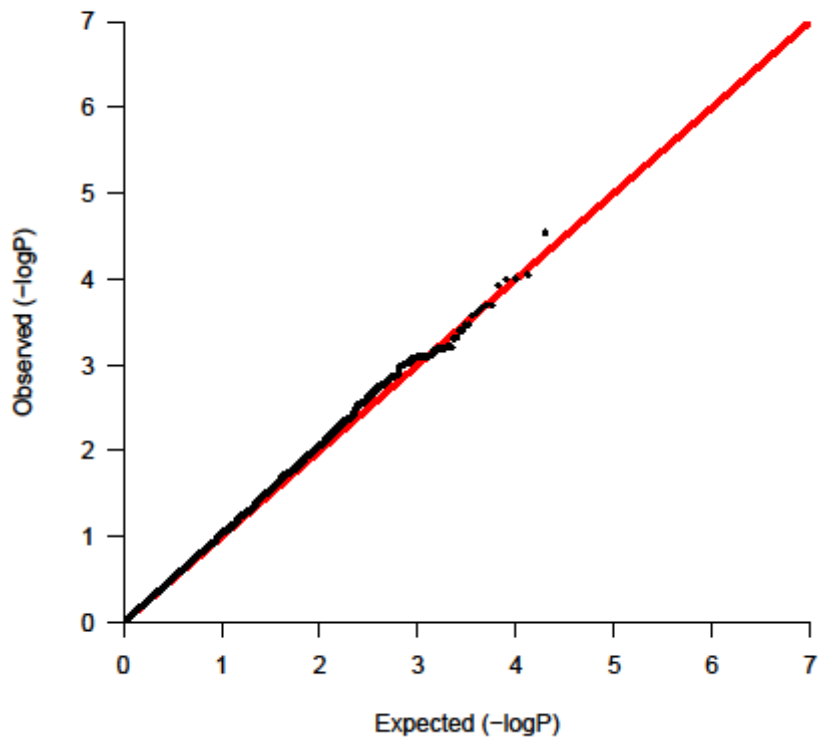


Figur 12. Dn-lokus, qq-plot.

Fyrgång versus Femgång

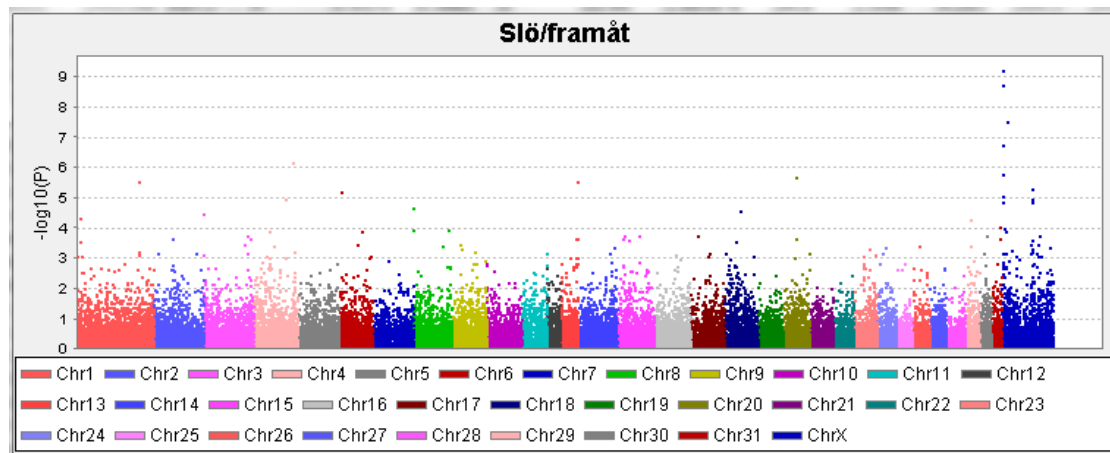


Figur 13. Manhattan-plot.

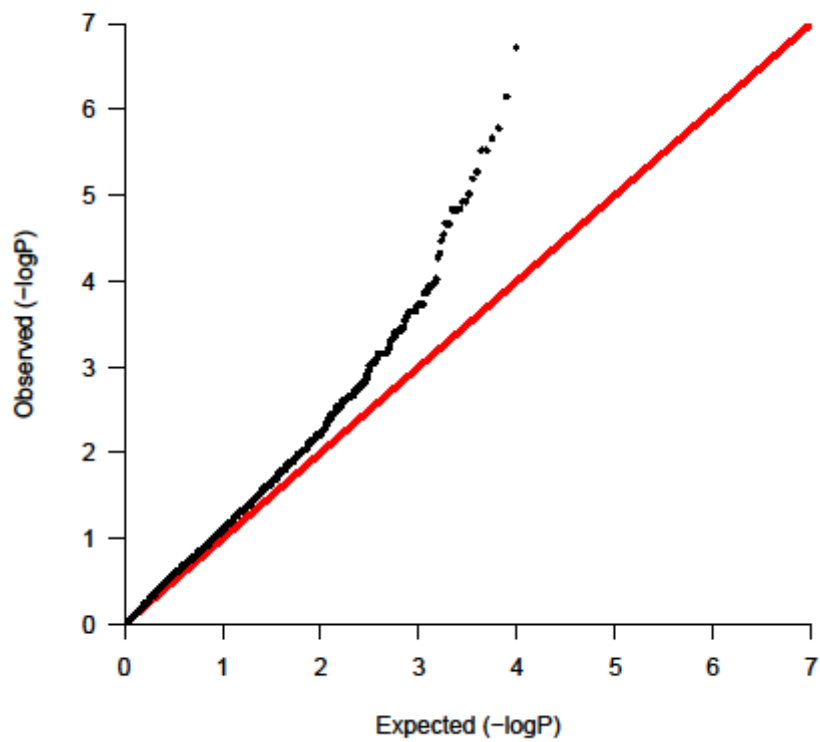


Figur 14. qq-plot.

Slö versus Framåt

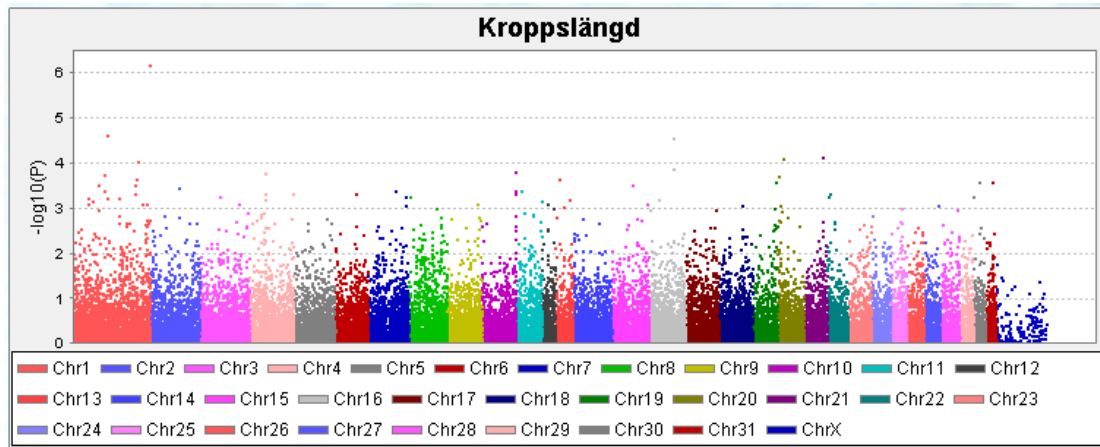


Figur 15. Manhattan-plot.

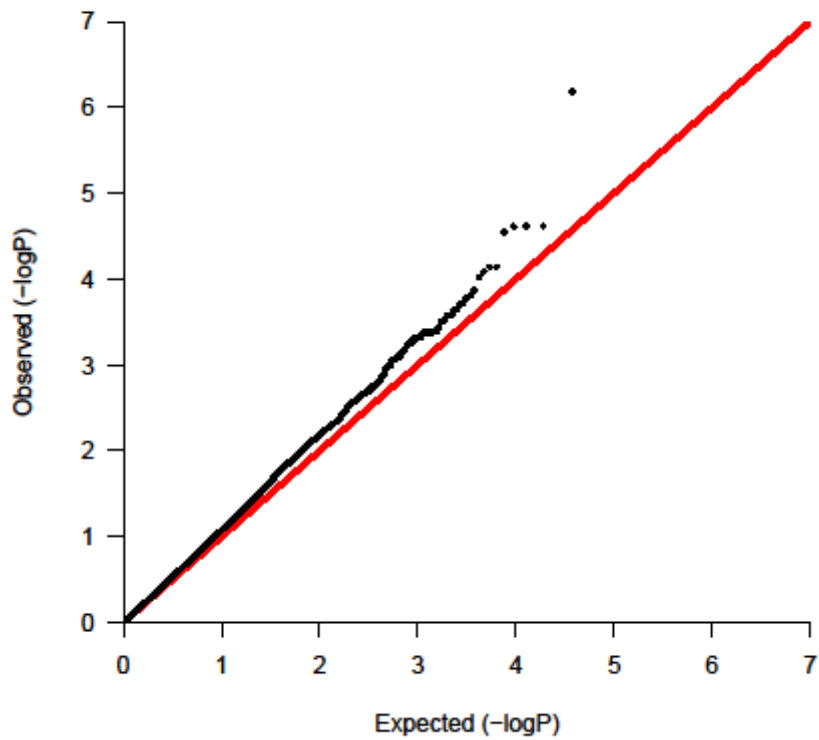


Figur 16. qq-plot.

Kroppslängd

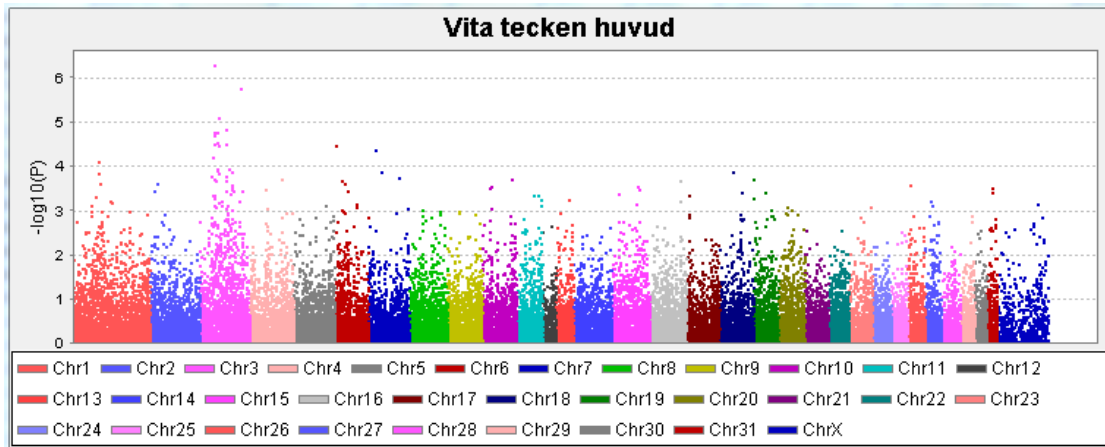


Figur 17. Manhattan-plot.

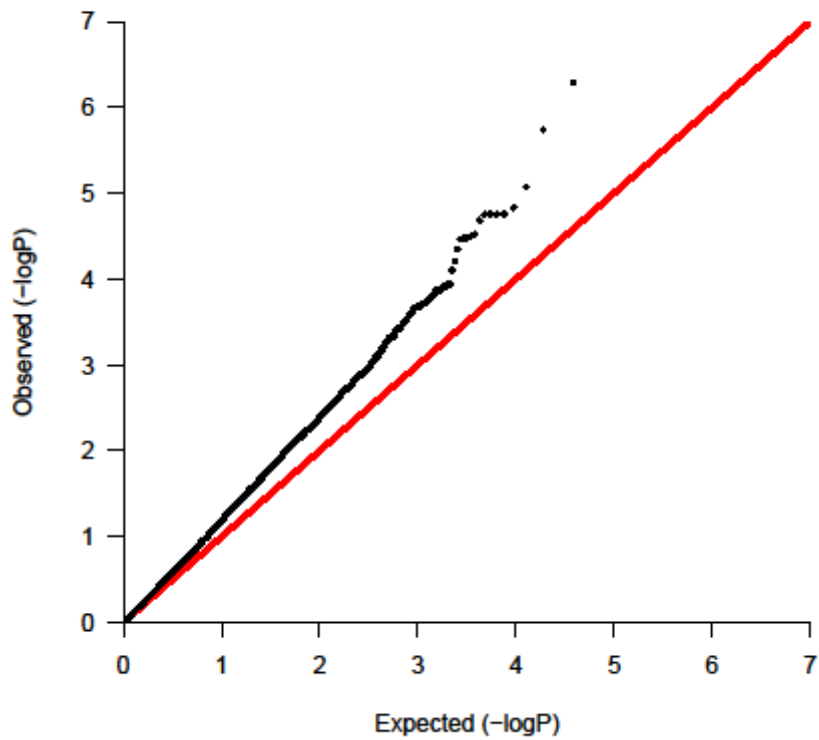


Figur 18. qq-plot.

Vita tecken huvud



Figur 19. Manhattan-plot.



Figur 20. qq-plot.