

Identyfikacja wariantów genetycznych w locus genu *TBX3* związanych z prymitywnymi cechami umaszczenia u koni czystej krwi arabskiej*

Lucja Dulak¹, Monika Stefaniuk-Szmukier¹, Katarzyna Ropka-Molik², Barbara Kij³,
Monika Bugno-Poniewierska³

¹Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Hodowli Koni, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

²Instytut Zootechniki Państwowy Instytut Badawczy, Dział Genomiki i Biologii Molekularnej Zwierząt, 32-083 Balice k. Krakowa

³Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Instytut Nauk Weterynaryjnych, Zakład Weterynarii, Rozrodu i Dobrostanu Zwierząt, al. Mickiewicza 24/28, 30-059 Kraków

Konie czystej krwi arabskiej są jedną z najstarszych i najbardziej wpływowych ras na świecie. W ujęciu historycznym początki rasy koni czystej krwi arabskiej sięgają VII–VIII wieku n.e. na obszarze Środkowego Wschodu, głównie na Półwyspie Arabskim (Głazewska, 2010). Są one uznawane za najszlachetniejsze i najdoskonalsze pod względem ruchu i poprawności budowy. Cechują się dużą wytrzymałością i odpornością na trudne warunki środowiska, doskonałym zdrowiem, wysokim procentem płodności i żrebności. Ze względu na swoje cechy konie arabskie brały udział w tworzeniu wielu współczesnych ras koni (Kucera, 2013; Lange, 2016).

Konie czystej krwi arabskiej charakteryzują się występowaniem maści podstawowych, tj.: gniadej i jej odcieni, kasztanowatej oraz pojawiającej się najrzadziej maści karej, będących wariantami allelu E (ang. *Extension*) oraz allelu A (ang. *Agouti*). W loci E jest zlokalizowany receptor melanokortyny-1 (*MC1R*) kontrolujący ilość eumelaniny we włosach na ciele oraz w grzywie i ogonie. W locus A znajduje się natomiast białko sygnalizacyjne *Agouti* (*ASIP*) blokujące receptor *MC1R* i kontrolujące strefowe rozmieszczenie eumelaniny i feomelaniny we włosach (Rieder, 2009). Zgodnie z literaturą, u koni czystej krwi arabskiej opisywane są również wzory umaszczenia typu Sabino, który wykazuje różnokształtne, białe znakowania obejmujące kończyny, głowę oraz kłode (Brooks i Bailey, 2005) oraz Rabicano, w któ-

rym charakterystyczną cechą są pojawiające się między ciemnymi – białe włosy na brzuchu, boku oraz wzdłuż klatki piersiowej. Możliwe jest również występowanie pojedynczych białych kosmyków u podstawy ogona (Brooks, 2006). Niemniej jednak, najczęściej występującą maścią jest siwa G (ang. Grey) warunkowana przez duplikację 4,6 tysiąca nukleotydów w intronie 6 genu *STX17* kodującego białko syntaxynę 17 (Pielberg i in., 2008). Allel G jest dominujący i epistatyczny wobec pozostałych wariantów umaszczenia koni. Fenotypowo przejawia się to postępującym wraz z wiekiem siwieniem. Proces ten jest szybszy, gdy osobnik jest homozygotą dominującą G/G (Rieder, 2009). Konie o umaszczeniu srokatym są natomiast eliminowane z hodowli (Stachurska i Bruśniak, 2003).

W procesie udomowienia koni jednym z elementów selekcji i doboru osobników do kojarzeń był sposób ich umaszczenia. Preferencje te ulegały znacznym zmianom w zależności od epoki i danej kultury. Konie o srokatym umaszczeniu występowały znacznie częściej na początku procesu udomowienia (tj. końcowy etap epoki kamienia do epoki żelaza). W średniowieczu natomiast fenotyp srokaty stracił na popularności, a maści podstawowe, czyli gniady, kasztanowaty i kary zaczęły dominować (Wutke i in., 2016). Wzrost liczby koni o umaszczeniach rozjaśnionych, w tym rozjaśnienie DUN wykazywano od epoki żelaza do czasów średniowiecza, tj. od 900 lat p.n.e do 400 lat n.e. (Ludwig i in., 2009). Podłoże molekularne genu bułanego D (*DUN*) zostało opisane stosunkowo niedawno. Wykazano, że za występowanie fenotypu DUN

*Badania finansowane w ramach projektu BIOSTRA-TEG2/297267/14/NCBiR/2016.

odpowiedzialne są dwie polimorficzne zmiany pojedynczych nukleotydów typu SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) wraz z delecją 1,6 tysiąca par zasad w okolicy genu *TBX3*, kodującego czynnik transkrypcyjny T-box3 (Imsland i in., 2016). Rozjaśnienie DUN jest umaszczeniem dzikim charakteryzującym koniowate, takie jak kiang, onager czy osioł afrykański, jak również bliskiego krewnego konia udomowionego – konia Przewalskiego (Imsland i in., 2016). Można je obserwować również u koni prymitywnych, takich jak kuce islandzkie czy koniki polskie (Stefaniuk-Szmukier i in., 2017). Ich umaszczenie jest jednym z podstawowych kryteriów selekcyjnych, gdyż księga stadna tej rasy jest od 1984 r. księgą zamkniętą, co oznacza, że hodowla jest prowadzona w czystości rasy, a wpis mogą uzyskać niektóre osobniki o rozjaśnieniu DUN (Stachurska i Brodacki, 2003). Fenotyp DUN charakteryzuje się rozjaśnieniem umaszczenia kasztanowatego, gniadego oraz karego, przez co uwidaczniają się barwa bułana i myszata. We włosach jaśniejszych ilość ciemnego pigmentu jest zredukowana od 25 do 50%. Rozjaśnienie nie obejmuje włosów grzywy, ogona oraz okolicy pręgi grzbietowej, często występują również pręgowania na kończynach (Imsland i in., 2016). Dotychczas opisano trzy fenotypowe warianty w analizowanym loci genu *TBX3* – *Dun (D)*, który jest dominujący nad *non-dun1 (d1)* oraz *non-dun2 (d2)*. Fenotyp non-dun jest kodowany przez dwie wersje allelu: non-dun1 związany z prymitywnymi znakowaniami na nogach i grzbiecie oraz non-dun2 bez

znakowań, u którego obecna jest delecja 1617 par zasad. Zaobserwowano, że u niektórych osobników rasy czystej krwi arabskiej występują zarówno pręga grzbietowa, jak i prymitywne znakowania na nogach. Na tej podstawie stwierdzono, że konie czystej krwi arabskiej mogą również wykazywać zmienność w loci DUN.

Celem pracy była weryfikacja genotypu koni czystej krwi arabskiej w locus *TBX3*, odpowiedzialnego za rozjaśnienie typu DUN.

Material i metody

Materiał do badań stanowiła krew obwodowa pobrana od koni czystej krwi arabskiej utrzymywanych w stadninach Janów Podlaski i Białka w ilości 50 sztuk. 5 ml krwi obwodowej było przechowywane w temp. 4°C na antykoagulancie EDTA do czasu analiz. Genomowe DNA wyizolowano przy użyciu zestawu Sherlock (A & A Biotechnology), zgodnie z instrukcją producenta. Ocenę jakościową oraz ilościową uzyskanego DNA przeprowadzono na aparacie Nanodrop 2000. Obecność delecji in/del 1,6 kpz (chr8: 18,227,267) oznaczono przy pomocy reakcji PCR z użyciem Kappa HiFi PCR Kit (Kapa Biosystems) zgodnie z protokołem. Mutację SNP1 chr8: 18,227,267+1,066G>T oraz SNP2 chr8: 18,226,905A>G w locus *TBX3* (EquCab2.0). SNP1 i SNP2 zostały oznaczone metodą sekwencjonowania Sangera na sekwencjonatorze kapilarnym Genetic Analyzer 3500xl (Applied Biosystems). Sekwencje starterów użyte do amplifikacji i rozmiar amplifikowanych regionów zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Sekwencje starterów 5' à 3' użyte do amplifikacji fragmentów DNA w regionie genu *TBX3*
Table 1. Sequences of 5' à 3' primers used for amplification of DNA fragments in the *TBX3* gene region

Regiony Regions	SNP1 chr8: 18,227,267+1,066	SNP2 chr8: 18,226,905	IN/DEL chr8: 18,227,267
Metody Methods	Sekwencjonowanie metodą Sangera <i>Sanger-based sequencing</i>	Sekwencjonowanie metodą Sangera <i>Sanger-based sequencing</i>	Analiza długości otrzymanych fragmentów PCR <i>Length analysis of PCR fragments</i>
Produkt PCR PCR product	240 pz/bp	155 pz/bp	IN 1,837 pz/bp ^a DEL 215 pz/bp
Primer 5'-3'	F: TAAGCCTCCA GACACCCAAG R: CAGCTCCCGT CTCCCTAGAT	F: TTCCAGGAAC CTGAGCAAAT R: ATAACCAGGC ACCCCTTCTC	F: CAAGACGCAA GGCTCTTCT R: CGTTTCTTTA AGGCTCGTG

SNP-polimorfizm pojedynczego nukleotydu; PCR-łańcuchowa reakcja polimerazy; ^ana podstawie sekwencji NCBI gbKT896509.1. *SNP-single nucleotide polymorphism; PCR-polymerase chain reaction; ^abased on NCBI gbKT896509.1 sequence.*

Wyniki i ich omówienie

W procesie udomowienia koni podstawą selekcji i doboru osobników do kojarzeń było ich umaszczenie. Obecnie żyjące konie wykazują różnorodne formy umaszczenia, począwszy od maści podstawowych do rozjaśnionych czy srokatek (Wutke i in., 2016; Eken i Mikko, 2009). Istotne znaczenie w dynamizacji sposobów umaszczenia miał nie tylko wpływ genów odpowiadających za syntezę barwników we włosach, ale również genów kodujących białka mające wpływ na rozmieszczenie melanocytów w cebulkach włosów. Przykładem jest opisany wpływ genu *TBX3* na ekspresję genu *KITLG* (ligand KIT) (Imsland i in., 2016) kodującego białko, które bierze udział w migracji melanocytów w skórze i cebulkach włosów (Miller i in., 2007). Wykazano, że zmodyfikowaną ekspresję genu *TBX3* w cebulkach włosów koni o fenotypie Dun można zauważyć w sposobie rozmieszczenia barwnego pigmentu. Lokalizuje się on w rozwijających się keratynocytach budujących korę włosa. U osobników non-dun nie zaobserwowano ekspresji genu *TBX3* w keratynocytach włosów pobranych z zadu, jak również koni o fenotypie Dun, których próbki stanowiły włosy z pręgi grzbietowej. Jego aktywność stwierdzono w najbardziej zewnętrznych partiach włosa, czyli w oskórku mieszków włosowych. Na tej podstawie wywnioskowano, że gen *TBX3* działa w wybranych rejonach kory włosa, by zahamować syntezę pigmentu we włosach rozjaśnionych u koni o fenotypie Dun (Imsland i in.,

2016). Ponadto, u koni non-dun *TBX3* wpływa na ekspresję genu *KITLG* powodując, że melanocyty gromadzą się tylko w jednej połowie tej cebulki. Uważa się, że *TBX3* oddziałuje na keratynocyty cebulek włosowych hamując syntezę barwnego pigmentu we włosach rozjaśnionych u koni o fenotypie Dun. Podsumowując, włosy rozjaśnione zawierają pigment, który jest jaśniejszy i niesymetrycznie rozłożony w cebulce przez wpływ genu *TBX3* na zmienioną ekspresję genu *KITLG*, natomiast u koni o fenotypie non-dun dochodzi do swobodnej migracji melanocytów (Imsland i in., 2016).

W przeprowadzonych badaniach dla wszystkich zwierząt oznaczono mutację w locus genu *TBX3*: chr8: 18,227,267+1,067 (SNP1: G w *Dun*, T w *non-dun1*); chr8: 18,226,905 (SNP2: G w *Dun*, A w *non-dun1* i *non-dun2*) oraz indel w pozycji chr8: 18,227,267 (IN/DEL). W populacji koni czystej krwi arabskiej wykazano 100% frekwencję genotypu AA w SNP2. Zidentyfikowano genotyp IN/IN w ilości 58,6% u klaczy i 61,9% u ogierów. Heterozygoty IN/DEL zajęły drugie miejsce co do częstotliwości występowania – 24,1% u klaczy i 33,3% u ogierów. Najrzadziej pojawił się genotyp DEL/DEL w ilości 17,2% u klaczy oraz 4,7% u ogierów. SNP1 zlokalizowany we fragmencie 1,6 tysiąca pz pojawił się w 58,6% u klaczy i 61,9% u ogierów (tab. 2). Obecność SNP1 jest wystarczająca do występowania fenotypu *non-dun1*, natomiast delecja 1,6 tysiąca pz jest podstawą pojawienia się fenotypu *non-dun2* (tab. 3).

Tabela 2. Frekwencja i procentowy udział analizowanych genotypów w loci *TBX3* u koni czystej krwi arabskiej
Table 2. Frequency and percentage of analysed genotypes at *TBX3* loci in purebred Arabian horses

	DEL/DEL	IN/DEL	IN/IN	SNP1			SNP2
				TT	T/DEL	AA	
KLACZE – MARES (29)	17,2% (5)	24,1% (7)	58,6% (17)	58,6% (17)	24,1% (7)	100% (29)	
OGIERY – STALLIONS (21)	4,7% (1)	33,3% (7)	61,9% (13)	61,9% (13)	33,3% (7)	100% (21)	

Tabela 3. Frekwencja i procentowy rozkład analizowanych wariantów fenotypu w loci genu *TBX3*
Table 3. Frequency and percentage distribution of analysed phenotype variants at *TBX3* loci

	non-dun1 (d1/d1)	non-dun2 (d1/d2;d2/d2)
KLACZE – MARES (29)	58,6% (17)	41,4% (12)
OGIERY – STALLIONS (21)	61,9% (13)	38% (8)

Przeprowadzone badania wykazały obecność w populacji koni czystej krwi arabskiej alleli *non-dun1* oraz *non-dun2*. Allel *non-dun1* wykazuje słabszy efekt fenotypowy niż allel *non-dun2* (Imsland i in., 2016). Fenotyp *non-dun2* charakteryzuje się brakiem występowania prymitywnych znakowań, takich jak pręga grzbietowa czy znakowania na kończynach. Fenotyp *non-dun1* ilustruje efekt pośredni między rozjaśnieniem Dun a non-dun, to znaczy, że możliwa jest do zaobserwowania pręga grzbietowa, choć nie tak wyraźna jak u koni o genotypie D/- i D/D. Allel *non-dun2* nie został zaobserwowany u innych gatunków zwierząt niż *Equus caballus*, co może świadczyć o jego współczesnym pochodzeniu w przeciwieństwie do allelu *non-dun1*, który został zidentyfikowany w materiale genetycznym koniowatego z okresu sprzed około 43 000 lat (Imsland i in., 2016). Wywnioskowano, że różnobarwne formy umaszczenia uwydatniały się także u koni nieudomowionych.

Typ współczesnego konia czystej krwi arabskiej ukształtował się w VII wieku n.e. za sprawą powstającej religii muzułmańskiej oraz jej przywódcy Mahometa. Jak głosi legenda, wszystkie rody koni czystej krwi arabskiej wywodzą się od pięciu klaczy Proroka, na których odbył słynną ucieczkę z Mekki do Medyny (Bielawski, 1971). Choć bezsprzecznie ustalono, że VII wiek n.e. stanowi początek rasy, to jednak wiele wieków wcześniej koczownicze plemiona Beduinów odnosiły sukcesy w hodowli koni na Półwyspie Arabskim (Kucera, 2013). Z uwagi na fakt wielowiekowej tradycji i hodowli koni tej rasy można spodziewać się, że tak wcześnie odkryte allele jak allel *non-dun1* występowały u poszczególnych osobników koni czystej krwi arabskiej oraz pełniły istotną rolę w selekcji i doborze wartościowych rozplodników. Uzyskanie materiału genetycznego koni z tego okresu umożliwiłoby potwierdzenie tej hipotezy i dalsze badania nad rasą koni czystej krwi arabskiej.

Literatura

- Bielawski J. (1971). Mały słownik kultury świata arabskiego. Wiedza Powszechna.
- Brooks S.A., Bailey E. (2005). Exon skipping in the KIT gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mamm. Genome*, 16 (11): 893–902.
- Brooks S.A. (2006). Studies of genetic variation at the KIT locus and white spotting patterns in the horse. University of Kentucky Doctoral Dissertations. 479 pp.
- Eken H., Mikko S. (2009). Genetic characterization and inheritance of belly spot and splashed white coat color in horses. SLU, Dept. of Animal Breeding and Genetics.
- Głazewska I. (2010). Speculations on the origin of the Arabian horse breed. *Livest. Sci.*, 129 (1): 49–55.
- Imsland F., McGowan K., Rubin C.J., Henegar C., Sundström E., Berglund, J., Schwochow D., Gustafson U., Imsland P., Lindblad-Toh K., Lindgren G., Mikko S., Millon L., Wade C., Schubert M., Orlando L., Penedo M.C., Barsh G.S., Lindgren, G. (2016). Regulatory mutations in *TBX3* disrupt asymmetric hair pigmentation that underlies Dun camouflage color in horses. *Nat. Genet.*, 48 (2): 152–158.
- Kucera F. (2013). Koń arabski w kulturze Orientu. *Sensus Historiae*, 12 (3).
- Lange C. (2016). Purity, nobility, beauty, and performance – past and present construction of meaning for the Arabian horse. In: Davis D.L., Maurstad A. (eds), *The meaning of horses: biosocial encounters*. Routledge, Oxford.
- Ludwig A., Pruvost M., Reissmann M., Benecke N., Brockmann G.A., Castaños P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L., Malaspinas A.S., Slatkin M. (2009). Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science*, 324 (5926): 485–485.
- Miller C.T., Beleza S., Pollen A.A., Schluter D., Kittles R.A., Shriver M.D., Kingsley D.M. (2007). cis-Regulatory changes in Kit ligand expression and parallel evolution of pigmentation in sticklebacks and humans. *Cell*, 131 (6): 1179–1189.
- Pielberg G.R., Golovko A., Sundström E., Curik I., Lennartsson J., Seltenhammer M.H., 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., Heldin C.H., Sölkner J., Andersson L. (2008). A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nat. Genet.*, 40 (8): 1004.

- Rieder S. (2009). Molecular tests for coat colours in horses. *J. Anim. Breed. Genet.*, 126 (6): 415–424.
- Stachurska A., Brodacki A. (2003). Selection of Polish Konik horses for coat colour and the ways to improve its effectiveness. *Electron. J. Pol. Agric. Univ. Ser. Anim. Husb.* 6 (1).
- Stachurska A., Bruśniak A. (2003). Struktura genetyczna polskiej populacji koni czystej krwi arabskiej pod względem umaszczenia. *Zesz. Nauk. Prz. Hod.*, 68 (5): 91–99.
- Stefaniuk-Szmukier M., Ropka-Molik K., Piórkowska K., Szmatoła T., Długosz B., Pisarczyk W., Bugno-Poniewierska M. (2017). Variation in *TBX3* gene region in Dun coat color Polish Konik horses. *JEVS*, 49: 60–62.
- Wutke S., Benecke N., Sandoval-Castellanos E., Döhle H.J., Friederich S., Gonzalez J., Hallsteinn Hallsson J., Hofreiter M., Lõugas L., Magnell O., Morales-Muniz A., Orlando L., Pálsdóttir AH., Reissmann M., Ruttkay M., Trinks A., Ludwig A. (2016). Spotted phenotypes in horses lost attractiveness in the Middle Ages. *Sci. Rep.*, 6: 38548; doi: 10.1038/srep38548.

IDENTIFICATION OF GENETIC VARIANTS AT *TBX3* LOCUS ASSOCIATED WITH PRIMITIVE COAT COLOUR TRAITS IN PUREBRED ARABIAN HORSES

Summary

Arabian horses are one of the oldest and most influential breeds in the world. They are characterized by the appearance of basic coat colours, i.e. bay, chestnut, black and seal brown, which are variants of the E allele (Extension) and the A allele (Agouti). Moreover, white patterns like sabino and rabicano occur. However, dominant and epistatic gray is the most common. It has been observed that some individuals of Arabian breed have both dorsal stripe and primitive markings on the legs. The aim of the study was to verify the Arabian horse genotype at the locus *TBX3*, responsible for DUN dilution. The performed research showed the presence of non-dun1 and non-dun2 alleles in the Arabian horse population. The non-dun2 phenotype is characterized by the lack of occurrence of primitive markings such as dorsal stripe or markings on the limbs. The non-dun1 phenotype illustrates the indirect effect between the dilution of Dun and non-dun, that is, it is possible to observe the dorsal stripe, although not as pronounced as in the genotype D/- and D/D horses.

Key words: Arabian horses, genetic variants, coat colour



Fot. D. Dobrowolska