

**LIETUVOS VETERINARIJOS AKADEMIJA
GYVULININKYSTĖS TECHNOLOGIJOS
FAKULTETAS
GYVŪNŲ VEISIMO IR GENETIKOS KATEDRA
K.Janušausko gyvūnų genetikos laboratorija**

Inga Būtavičiūtė

**GENŲ, ATSAKINGŲ UŽ SPALVOS PAVELDĖJIMĄ, TYRIMAS
ARKLIŲ GENOME**

Magistro darbas

Darbo vadovas:
lekt. dr. A. Kanapeckas

Konsultantas:
e. prof. p. dr. Ilona Miceikienė

Kaunas, 2007

Magistro darbas atliktas 2005 – 2007 metais Lietuvos veterinarijos akademijoje, Gyvūnų veisimo ir genetikos katedroje, K.Janušausko gyvūnų genetikos laboratorijoje.

Magistro darbą paruošė: Inga Būtavičiūtė
(v., pavardė)

(parašas)

Magistro darbo vadovas: lekt. dr. A. Kanapeckas
(LVA, Gyvūnų veisimo ir genetikos katedra)

(parašas)

Magistro darbo konsultantas: e. prof. p. dr. Ilona Miceikienė
(LVA, Gyvūnų veisimo ir genetikos katedra)

(parašas)

Recenzentas:

(parašas)

TURINYS

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS	5
ĮVADAS	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA	9
1.1. Arklių evoliucija	9
1.2. Arklių spalvų įvairovė	10
1.3. Genai, lemiantys arklių spalvą	16
1.3.1. Genas W	16
1.3.2. Genas G	17
1.3.3. Genas E	17
1.3.4. Genas A	18
1.3.5. Genas C	19
1.3.6. Genas D	20
1.3.7. Genas TO	21
1.4. Genetinės formulės suteikimas spalvai	25
1.5. Kūno dangos spalvos molekulinė genetika	26
1.5.1. Mutacijos, nulemianšios pigmento gamyba ar pasiskirstymą	27
1.5.2. Melanino tipų gamybą lemiančios mutacijos	28
1.7. Lietuvos sunkiųjų arklių veislė	28
2. TYRIMŲ METODAI IR MEDŽIAGA	31
2.1. Tyrimų medžiaga	31
2.2. Tyrimų schema	31
2.3. Tyrimų metodai	32
2.3.1. DNR skyrimas iš plauko svogūnėlio ląstelių	32
2.3.2. DNR švarumo ir koncentracijos nustatymas	32
2.3.3. Polimerazės grandininė reakcija (PGR)	33
2.3.4. Karpymas fermentais ir elektroforezė	34
2.3.5. Statistinė analizė	35

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	36
3.1. Lietuvos sunkiųjų arklių veislės kūno dangos spalvos analizė	37
3.2. MC1R geno variantų ištyrimas	38
4. IŠVADOS	44
5. SUMMARY	46
6. LITERATŪROS SĄRAŠAS	47
7. PRIEDAI	51

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

bp – bazių pora

DNR – dezoksiribonukleininė rūgštis

PGR – polimerazinė grandininė reakcija

RFIP – restrikcinių fragmentų ilgio polimorfizmas

MC1R - melanocitus stimuliuojančio hormono receptoriaus genas

TaqI – restriktaze

LS - Lietuvos sunkiųjų arklių veislė

OD - optinis tankis

TAE – TAE buferis

DTT - dithiotreitol

Darbo tikslas

- ✚ Apibendrinti mokslinę literatūrą apie arklių spalvas bei genetinių jų pagrindimą.
- ✚ Atlikti fenotipinę Lietuvos sunkiųjų (LS) arklių veislės kūno dangos spalvos analizę.
- ✚ Nustatyti MC1R geno polimorfizmą Lietuvos sunkiųjų (LS) arklių veislėje molekulinio PGR-RFLP tyrimo metodu.
- ✚ Nustatyti ryšį tarp restrikcinių fragmentų ilgio polimorfizmo (RFLP) MC1R gene ir arklių kaštoninės plauko spalvos intensyvumo.

Darbo uždaviniai

- ✚ Surinkti ir išanalizuoti mokslinę literatūrą apie arklių spalvas bei genetinių jų pagrindimą.
- ✚ Apibūdinti LS arklių kūno dangos spalvos įvairovę.
- ✚ Įdiegti arklių MC1R geno tyrimo metodiką LVA K.Janušausko Gyvūnų genetikos laboratorijoje.
- ✚ Ištirti MC1R geno alelių ir genotipų dažnį Lietuvos sunkiųjų (LS) arklių veislėje.
- ✚ Ištirti MC1R geno polimorfizmo ryšį su kaštonine arklių plauko spalva.

Darbo naujumas

- ✚ LVA Gyvūnų genetikos laboratorijoje įdiegta arklių MC1R geno, įtakojančio arklių plauko spalvą, ištyrimo metodika.
- ✚ Pirmą kartą ištirtas MC1R geno polimorfizmas bei jo variantų paplitimas Lietuvos sunkiųjų arklių veislėje.

Praktinis pritaikymas

Arklių spalvų įvairovė bei gausybė faktorių, nuo kurių priklauso arklio kūno dangos spalva, sukuria pakankamai sudėtingą situaciją arklių veisėjams, prognozuojant spalvos paveldėjimą, siekiant užtvirtinti tam tikrą spalvą bei kitais su arklių kūno dangos spalva susijusiais klausimais. Todėl žinios, gautos tiriant konkrečius genus, atsakingus už įvairias arklių kūno dangos spalvas yra labai naudingos arklių augintojams.

Ivadas

Arklys - unikalus gyvulys, jų veislių pasaulyje priskaičiuojama apie 250, pradedant 60 kilogramų sveriančiais ponių arkliais ir baigiant 1,5 tonos sunkiasvoriais galiūnais. Arkliai auginami visuose pasaulio žemynuose. 1913 metais visame pasaulyje buvo 1,6 milijono arklių. Nuo šio šimtmečio pradžios skaičius kai kuriose šalyse pradėjo mažėti. Iki Antrojo pasaulinio karo arklių labiausiai sumažėjo išsivysčiusiose pramoninėse valstybėse, kaip Jungtinėse Amerikos Valstijose, Anglijoje, Prancūzijoje, Japonijoje, bet padaugėjo daugelyje kitų šalių. Todėl bendras arklių skaičius pasaulyje beveik nepakito.

Daugiau negu pusė visų pasaulio arklių yra Šiaurės ir Pietų Amerikoje - 31,6; Azijoje - 13,6; Europoje - 5,9; Afrikoje - 3,7 milijono. Arklių reikšmė įvairiais laikotarpiais buvo skirtinga. Prijaukinti arkliai iš pradžių buvo naudojami mėsai ir pienui, vėliau juos pradėta naudoti žemės ūkio ir karo reikalams. Šiuo metu žirgai yra plačiai naudojami sportui (Laskauskas, 2006).

Arklių spalvos genetika yra sudėtinga sritis. Didžiulį arklių spalvos rinkinį lemia daugybė skirtingų faktorių. Kiekvieną jų analizuodami atskirai galime išsiaiškinti pagrindines priežastis, lemiančias tokią spalvų įvairovę. Spalvą lemia daugybė faktorių. Vieni jų paaiškinami genų kombinacijomis, kiti genetiškai neištirti (nežinomi), tačiau kiekviena unikali kombinacija lemia vis kitą spalvą. Spalvų įvairovė yra didžiulė. Vienos labai paplitusios, kitos gana retos ar susijusios su veislės ypatumais. Gyvulių veisėjus ir biologus amžiais domino kūno dangos spalvų paveldimumas. Veisiant pirmenybė dažnai būdavo teikiama išoriniam skirtingų spalvų grožiui, bet prekybinis supratimas dėl individualaus temperamento ir ypatybių, kuris susijęs su atskira spalva, taip pat vaidino nemažą vaidmenį. Pavyzdžiui, tarp arklių veisėjų buvo paplitę tokie teiginiai kaip, kad „kaštanai yra greiti“ ar „kerši yra tvirtesni“. Spalva taip pat buvo naudojama kaip apytikris tėvystės/tapatybės testas veislėse su pastovia spalva, tai yra patikrinimas, kad gyvuliai yra grynaveisliai (Marklund, 1997).

Arklio spalvų galima priskaičiuoti virš 22. Lietuvoje yra daugiausia širmų, sartų, bėrų, juodbėrų ir obuolmušių. Reti kaštanai, labai reti derešai. Arklių spalvinę gamą sudaro trys pagrindinės spalvos: bėra, kaštana ir juoda. Visos kitos spalvos priklauso nuo šių trijų pagrindinių

spalvų paskirstymo. Kaštoninė arklio spalva yra viena pagrindinių spalvų, iš jos susidaro ir kitos spalvos. Tai vienspalvis auksiškai, šviesiai rudas arklys su tokiais pat karčiais ir uodega. Yra įvairių kaštoninių arklių atspalvių: kaip antai sarti (liemuo - rudas, karčiai ir uodega - beveik balti. Kartais taip vadinamas šviesiai rudas arklys), raudi (kaštoniniai rausvi, karčiai ir uodega su juodų plaukų priemaiša), kaštanai (liemuo - rudas, o karčiai ir uodega tokie pat ar tamsesni) ar Lietuvoje nepasitaikantys juodi kaštanai (kūnas visiškai juodas, o karčiai kaštoniniai) (www.blogas.lt/Viskasapiezirus/86599/arkliu-spalvos.html. Prieiga per internetą 2007 vasario 5d).

Genas, nulemiantis rudą/juodą spalvą yra melanocitus stimuliuojančio hormono receptoriaus 1 genas, taip pat dar vadinamas melanokortino 1 receptoriaus genas. Genas žymimas MC1R. Šis receptorių yra svarbus normaliai pigmentacijai. Receptorių pirmiausiai aptinkamas melanocitų (specializuotos ląstelės, kurios gamina pigmentą – melaniną) paviršiuje. Melaninas - tai medžiaga, kuri suteikia spalvą odai, plaukams ir akims. Melaninas taip pat aptinkamas ir šviesai jautriuose audiniuose, kaip pavyzdžiui tinklainė, kuri reguliuoja normalų regėjimą. Melanocitai gamina dviejų formų melaniną: eumelaniną (šviesiai rudas pigmentas) ir feomelaniną (juodas pigmentas). Šių dviejų pigmentų santykis nulemia plaukų ir odos spalvą. Melanokortino 1 receptorių kontroliuoja, kuris melanino tipas bus gaminamas melanocituose. Kada receptorių yra aktyvuojamas, jis melanocituose sukelia eilę cheminių reakcijų, ko pasekoje ląstelės gamina eumelaniną. Jei receptorių neaktyvuojamas arba blokuojamas, melanocitai vietoj eumelanino gamina feomelaniną (Marklund, 1997). Pagrindiniai MC1R geno variantai (polimorfizmas) yra susiję su skirtumais, kurie pasireiškia skirtinga individo odos ir plaukų spalva. Melanokortino 1 receptorių taip pat yra aktyvus ir kitose ląstelėse, įskaitant ląsteles, atsakingas už organizmo imuninį ir uždegiminį atsaką. Tačiau kol kas nėra žinomas receptoriaus vaidmuo šiose ląstelėse. Funkcijų praradimas, esant mutacijai MC1R nulemia recesyvinio geltono (e) genotipo pasireiškimą ir vietoj eumelanino gaminamas feomelaninas. Tokį patį fenotipą gali nulemti ir dominantinis genotipas, jei įvyksta agouti mutacija, kuri užblokuoja MC1R. MC1R mutacijos tai pat nulemia rudą jūrų kiaulyčių, galvijų ir kaštoninių arklių spalvą. Žmonėms MC1R mutacijos susijusios su raudonais plaukais, sunkiai įdegančia oda ir jautrumu melanomai. MC1R gene yra rasti du aleliai, atsakingi už kaštoninę plaukų spalvą – e ir e^a. e alelis turi *TaqI* kirpimo vietą, o e^a alelyje, kurio kodone 84 randama mutacija (GAC→AAC), *TaqI* kirpimo vieta išnyksta (Wagner, Reissmann, 2000).

1 LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 Arklių evoliucija

Arklys atsirado prieš 60-70 mln. metų. Jo protėvis (hirakoterijus (Hyracotherium) Europoje ir Azijoje, eohipas (Eohippus) Amerikoje, gyvenęs subtropinėse pelkėse, tebuvo 30-40 cm ūgio, trumpakaklis, dryžuotakailis, kuprotas, turėjo mažutę galvą. Galutinai neporakanopių (arklių) šeima susiformavo prieš 2-2,5 mln. metų.

Įvairios priežastys veikė arklio evoliuciją. Keitėsi klimatas. Kur vešėjo subtropinės džunglės, ten vėliau išsiplėtė neaprepiamos stepės. Ieškant maisto, dideliems atstumams įveikti, pabėgti nuo priešų prirėkė ilgų galūnių ir kanopų vietoj pirštų, galinčių atlaikyti stiprią kieto grunto atatraką. Arklys tapo greitas, išvermingas.

Arklio gimtine laikoma Šiaurės Amerika. Maždaug prieš 50 mln. metų dabartinio Beringo sąsiaurio vietoje, vandens lygiui nusekus, susidarydavo sausuma. Šiuo „tiltu“ iš Šiaurės Amerikos arklių protėviai ir migravo į Aziją, paskui - į Europą ir Afriką. Prieš 30 mln. metų Amerikos žemyne arkliai visai išnyko, jų pėdsakų neranda net archeologai. Viena iš prielaidų - kažkokios musės įkandimai arkliams buvę nuodingi. Į Ameriką arklius tik XVI a. atplukdė ispanų konkistadorai.

Visos pasaulio arklių veislės yra kilę iš dviejų arklių rūšių: Europos laukinio arklio tarpano ir Pržvalskio Azijos laukinio arklio.



Prževalskio arklys



Tarpanas

1 paveikslas. **Prževalskio Azijos laukinis arklys ir tarpanas.**

(http://www.arkliomuziejus.lt/Viskas_apie_arkli/Prževalskio%20arklys#Prževalskio%20arklys. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.)

Tarpanas - pilkas, su juoda juosta išilgai nugaros, didele galva, plačia kakta, trumpu storu kaklu, juodais stačiais karčiais, plonomis kojomis, kokių 136 cm aukščio laukinis arklys. Yra žinomi du porūšiai: miškų ir stepių. Miškų tarpanai dar XVII a. bėgiojo ir Lietuvos miškuose. Manoma, kad jie išnyko XVIII-XIX a. sandūroje. Stepių tarpanas gyvavo ilgiausiai. Yra žinoma, kad paskutinis stepių tarpanas buvo nušautas 1879 m. dabartinėje Ukrainos teritorijoje Krymo pusiasalyje, netoli Askanijos Novos. Šios vietovės pavadinimas dabar garsus visame pasaulyje, kadangi tai viena iš nedaugelio vietų, kur rezervato sąlygomis yra veisiami Prževalskio arkliai.

Prževalskio arklys - gelsvai rudas, trumpais juodais karčiais ir tokia pat uodega, mažomis ausimis ir ilgomis kojomis. Šią veislę aprašė rusų keliautojas, geografas N. Prževalskis 1879 m. Iš vienos ekspedicijos jis parsivežė arklio kaukolę ir kailį.

Dabar šitie arkliai labai reti - visame pasaulyje tėra likę daugiau kaip 200 grynakraujų Prževalskio arklių. Laisvėje juos, gyvenančius kaimenėmis po 5-20, galima sutikti tik Vidurinėje Azijoje. Jie yra įrašyti į tarptautinę Raudonąją knygą. Gyvą Prževalskio arklį galima išvysti ir Rygos zoologijos sode Latvijoje (Laskauskas, 2006).

1.2 Arklių spalvų įvairovė

Dažniausiai žirgo plauko spalva nustatoma pagal galvos, kaklo ir liemens spalvas, karčių, uodegos bei kojų skirtingus atspalvius.

Grynų spalvų arklių beveik ir nėra, nebent balti ir juodi, laikomi pačiais elegantiškiausiais.

Lietuvoje dažniausiai jie yra pereinamųjų spalvų. Vyrauja bėri - tamsiai rudi. Jeigu toks žirgas į juodumą - jis juodbėris, jei į šviesumą - šviesbėris, jeigu į rusvumą - sartis. Pietų lietuviai juos dar vadina palviais, vakarų aukštaičiai - timsriais. Jeigu tas rusvumas dar intensyvesnis, beveik auksinis, ypač karčiuose ir uodegoje, žirgai šaukiami raudbėriais arba tiesiog raudais. Kartais žirgas atrodo lyg nublukęs: būtų bėras ar sartis, tik kad tarsi „apdulkėjęs“. Tai dulšvas žirgas.

„Pabalnokit šešis žirgus, visus šešis širmus!“ - dainuodavo mūsų seneliai. Širmi - tai balti su įvairių formų ir skirtingo intensyvumo tamsių plaukų priemaiša žirgai. Kumeliukai gimsta tamsūs (juodi, bėri), bet antrais-trečiais metais, po išsišėrimo, prisimaišo šviesių plaukų.

Suaugę širmiai išgražėja, sušvyti sidabrinium atspalviu. Kai šitame sidabriniam fone ant liemens dar išsidėstę obuolio dydžio tamsių plaukų ratai, tokius žirgus vadiname obuolmušiais.

Jeigu nuo pat gimimo žirgas šviesus - jis šyvis arba palšis, o jei liemuo iš prigimties „žilas“ - žirgas derešas.

Jei žirgas tamsus, jo liemuo pelenų spalvos, o per nugarą dar eina juoda juosta - tiesiog kaip laukinės pelės - jis taip ir vadinamas - pelėkas.

Mūsų senoliams mažiausiai patrauklūs atrodė keršiai, gal todėl, kad tokių žirgų buvo nedaug. Tai margi žirgai, ant kurių juodo ar rudo kūno išsimėtę balti lopai, panašiai kaip juodmargių ar žalmargių karvių. O latviai į margą arklį žiūri visai palankiai, sako: jei sutiksi margą arklį, išsipildys troškimai. Amerikos žemyne tai irgi gana mėgstamo plauko arkliai, turbūt todėl, kad kažkuo primena mustangus. Buvo išvesta netgi atskira veislė, vadinama pinto, kuriai būdingas keršumas.

Tarpinę grupę tarp bėrių ir širmių sudaro gelsviai - galva ir liemuo šviesaus smėlio spalvos, o kitos kūno dalys bemaž baltos. Tokius vadina „izabeliuotais“, „izabeliavais“ - nuo Ispanijos karalienės Izabelos vardo. Pasak legendos, karalienė davusi žodį nekeisti marškinių tol, kol iš Ispanijos nebus išvaryti maurai. Šio pažado jai reikėjo laikytis ištisus dvejus metus.

Jei gelsvio karčiai, uodega ir kojos juodi - jis jau bulanas. O kai žirgelis tamsiai šokoladinis, iš tolo ruduoja kaip prinokęs kaštonas, jis taip ir vadinamas - kaštanu.

Nusakant arklio plauką, minimos dar ir žymės kaktoje - žilutė, žvaigždutė, baltas brūkšnys, laukas (Bražaitė, 2006).

Arklio spalvų galima priskaičiuoti virš 22. Lietuvoje yra daugiausia širmų, sartų, bėrų, juodbėrų ir obuolmušių. Reti kaštanai, labai reti derešai. Arklių spalvinę gamą sudaro trys pagrindinės spalvos: bėra, kaštana ir juoda. Visos kitos spalvos priklauso nuo šių trijų pagrindinių spalvų paskirstymo. Kaštoninė arklio spalva yra viena pagrindinių spalvų, iš jos susidaro ir kitos spalvos. Tai vienspalvis auksiškai, šviesiai rudas arklys su tokiais pat karčiais ir uodega. Yra įvairių kaštoninių arklių atspalvių: kaip antai sarti (liemuo - rudas, karčiai ir uodega - beveik balti. Kartais taip vadinamas šviesiai rudas arklys), raudi (kaštoniniai rausvi, karčiai ir uodega su juodų plaukų priemaiša), kaštanai (liemuo - rudas, o karčiai ir uodega tokie pat ar tamsesni) ar Lietuvoje nepasitaikantys juodi kaštanai (kailis visiškai juodas, o karčiai kaštoniniai) (<http://www.blogas.lt/Viskasapiezirgus/86599/arkliu-spalvos.html> Prieiga per internetą 2007 vasario 5 d).

Arklių spalvinę gamą sudaro trys pagrindinės spalvos :

Bėra – liemuo rudas, o karčiai, uodega ir galūnės juodi.

Kaštana – liemuo rudas, karčiai ir uodega tokios pat spalvos arba tamsesni.

Juoda – galva, liemuo, galūnės, karčiai ir uodega juodos spalvos.

Visos kitos spalvos priklauso nuo šių trijų pagrindinių spalvų paskirstymo. Laikydami šiu principo galima išskirti vienuolika variantų:

1. Kaštana spalva (Ee) yra recesyvinė nekaštaninei (juodai ar bėrai) (EE). Kaštaniniai arkliai iš esmės yra „raudoni“, nors iš tikrųjų turi daug dėmių, kurios yra tamsios arba juodos.
2. Nekaštaninės spalvos arkliai, bėri (A+) yra dominuojantys juodos spalvos atžvilgiu (Aa). Nors kaštaninė spalva yra recesyvinė, tačiau, bet kuriuo atveju arklys gali būti juodas ar bėras, tačiau bet kuriuo atveju arklys gali būti juodas ar bėras. Pavyzdžiui, suporavus kaštaninės spalvos ir juodos spalvos arklius, kumeliukas gimsta bėras, tačiau jis gali turėti kaštaninės spalvos, juodos, nors jos ir yra recesyvinės bėrai spalvai.
3. „Shade“ (šešėlinė) spalva yra gana sudėtinga, greičiausiai lemia keletas genų, todėl ją išskaidysime į keletą grupių: tamsi, vidutinė ir šviesi. 1 lentelėje pateikiama jų sąveika su trimis pagrindinėmis spalvomis.

1 lentelė. „Šešėlinės“ spalvos variacijos

SPALVA	TAMSI VERSIJA	VIDURINĖ VERSIJA	ŠVIESI VERSIJA
Bėra	Rausvai raudona – kaštana	Raudonai bėra, bėrai vyšninė	Bėrai gelsva, bėrai auksinė
Kaštana	Tamsiai kaštana	Raudonai kaštana	Auksinė ir šviesiai kaštana
Juoda	Juoda	Juoda	„Vasariškai“ juoda

(<http://members.aol.com/MFTHorses/sponenbg.htm>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

4. „Sooty“. „Suodina“ (juoda kaip suodžiai) spalva yra viena iš lemiančių tamsius plaukus. Ji gali varijuoti nuo ryškiai šviesios iki suodinai juodos spalvos.

2 lentelė. „Suodinos“ spalvos variacijos

PAGRINDINĖS SPALVOS	„SUODINOS“ SPALVOS VARIANTAS
Bėra	Ruda ar rausvai raudona (bėra)
Kaštana	Kaštana ar tamsiai kaštana
Juoda	Juoda

(<http://members.aol.com/MFTHorses/sponenbg.htm>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

Taigi šešėlinė ir suodina spalva lemia didžiulę spalvų įvairovę.

5. Kaštaninės spalvos arklių karčiai ir uodega yra nepastovios spalvos. Ji labai įvairuoja: nuo tamsiai rudos iki juodos, net iki šviesiai raudonos, nuo linų spalvos iki beveik baltos spalvos. Šie skirtumai priklauso nuo daugybės genų ir yra sudėtingi.

6. „Balzguna“ spalva. Ją lemia dominuojantis genas (Pa+), kuris lemia pilvo, snukio, vidinės kojų pusės ir ploto virš akių spalvą. Paprastai arklių aprašymuose į šį požymį nekreipiamas dėmesys, išskyrus tuos atvejus, kai vykdomas veislinis darbas, kada tamsi spalva keičiasi į rudą ar kaštaninę į bėrą (http://www.mustangs4us.com/colors_and_color_patterns.htm. prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

3 lentelė. **Balzganos spalvos variacija**

PAGRINDINĖS SPALVOS	BALZGANOS SPALVOS VARIANTAS
Juoda	Ruda
Bėra	Blazganai bėra
Kaštana	Bėra

(<http://members.aol.com/MFTHorses/sponenbg.htm>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

7. „Cremello“ (kreminės) spalvos genas (C^{cr}) vienoje dozėje susilpnina raudoną spalvą iki geltonos spalvos, ir neturi įtakos juodai spalvai. Tačiau dozėse jis keičia raudoną pigmentą ir

juoda pigmentą į kreminę, nulemia rožinės spalvos odą ir mėlynas akis (Bowling, Ruvinsky, 2000).

4 lentelė. „Cremello“ spalvos variacija

PAGRINDINĖS SPALVOS	VIENA DOZĖ	DVI DOZĖS
Bėra	„Bucksins“ (elnio odos)	Kreminė
Ruda	Suodina	Kreminė
Kaštana/bėra	Sarta	Kreminė
Kaštana	Suodina sarta	Kreminė
Juoda	Dulsva	Kreminė (tiksliau dulsvai kreminė)

(<http://members.aol.com/MFTHorses/sponenbg.htm>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

8. Pilkšvai ruda spalva (lemianti nugaros linijos spalvą) yra dominuojanti (Dn+) šviesių spalvų atžvilgiu, ir lemia juostų buvimą ant išorinės kojų pusės, taip pat žemiau nugaros ir dažnai juostų buvimą ant gogo.

5 lentelė. Pilkšvai rudos spalvos variacija

PAGRINDINĖS SPALVOS	PELĖKOS SPALVOS VARIANTAS
Bėra	Pilkšvai ruda
Ruda	Pelėka
„Buckskin“	Pelėka (aukso spalvos)
Kaštana	„Raudonai“pelėka
Bėra	Pelėka (abrikoso spalvos)
Sarta	Sartas (juosta nugaroje)
Juoda	„Grullo“
„Dulsva“juoda	Pelėka
„Šviesi“ juoda	Pelėka (alyvos spalvos)
Kreminė	Kreminė (juosta nugaroje)

(<http://members.aol.com/MFTHorses/sponenbg.htm>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

9. „Sidabro“ spalvos išmargintos dėmės, genas yra dominuojantis (ZZ). Veikia juoda spalva į šviesesnę, tačiau nepakeičia raudonų plotų. Tai gana retas, bet vis dažniau pasikartojantis arklių veislėse. Iš esmės ši spalva maišyta kaštoninė, bet čia trūksta kaštanams būdingo raudonumo. Taip pat šviesesni karčiai, uodega, kojos pereina į gelsvą atspalvį ar apskritai gali nekisti (Bowling ir kt., 2000).

6 lentelė. „Sidabro“ spalvos variacija

PAGRINDINĖS SPALVOS	SIDABRO (išmargintos dėmės) variantas
Juoda	Mėlynai sidabrinis, šokoladiškai sidabrinis
Ruda	Rudai sidabrinis
Bėra	Raudonai sidabrinis
Pilkšvai ruda	Geltonai sidabrinis (juosta nugaroje)
Kaštana	Kaštana

(<http://members.aol.com/MFTHorses/sponenbg.htm>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

10. „Champagne“ (šampano) spalvos genas (ChC) retai pasitaikantis, tačiau dominuojantis. Nušviesina tamsius plotus į vienodai šviesų šokoladą ar raudoną arba geltoną. Oda būna rausva ar kerša, o akys šviesiai rudos (Bowling ir kt., 2000).

7 lentelė. Šampano spalvos variacija

PAGRINDINĖS SPALVOS	„ŠAMPANO“ SPALVOS VARIANTAS
Juoda	Šampaninė
Bėra	Gintaro atspalvio šampaninė
Kaštana	Auksiškai šampaninė
Sarta	Dramblio kaulo spalva. Šampaninė (su tamsiais mėlynomis akimis)

(<http://members.aol.com/MFTHorses/sponenbg.htm>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

11. Labai greitai prisitaikanti spalva marga, tai primenanti suodinę, tačiau su vertikaliomis juostomis (Sponenberg, 1996).

8 lentelė. Margos spalvos variacija

PAGRINDINĖ SPALVA	MARGOS SPALVOS VARIANTAS
Ruda II	Raudonai marga

(Geurts, 1977)

1.3 Genai, lemiantys arklių spalvą

Išskiriami septyni pagrindiniai genai lemiantys arklių spalvą: W, G, E, A, C, D, TO.

W - Baltas genas (dominuojantis genas ir letalus homozigotiniams individams);

G - Pilkas genas (modifikuoja ir veikia visą arklio augimo laiką);

E – Raudonas faktoriaus genas (kontroliuoja dėmių spalvą. Dominuojant Ee gaunamas juodos spalvos dėmės, esant dviem resecyvams ee raudonos dėmės);

A - “Agouti” genas (kontroliuoja kūno spalvą, jei jei kartu yra dominuojantys E);

C - “Creme” genas („atskiedžia” arklio kūno spalvą ir gaunamas „grullos”, raudonai pelekas;

D – „dilute” (atskiedžia juodą ir raudoną pigmentus, bet neatskiedžia kitų dėmių pigmento);

TO – „Tobiano” (baltos dėmės) (Mariat, Taourit, Guerin, 2003).

1.3.1 Genas W

Šis genas ir genas G nagrinėjami pirmiausia, kadangi jie turi alelius, kurių veikimas nežinomas su kitų spalvų genais. Bet kuris W geno alelis W, ar geno G alelis G yra arklių paveldimi ir sunku ar neįmanoma suprasti kitų genų įtaką tiriant vien optiškai (Santschi ir kt, 1999).

Esant dominantiniam aleliui W, arklys gims su trūkumu odoje bei plaukuose. Oda bus rausva, akys rudos (kartais mėlynos), o plaukai balti. Kartais tokie arkliai vadinami albinosais.

W alelis yra retai sutinkamas. Visi nebalti arkliai yra ww (Mau, Poncet, Bucher, Stranzinger, Rieder, 2004).

1.3.2 Genas G

Šis procesas pastebimas ir žmonių tarpe, kada bėgant metams buvę blondinai, brunetai ar raudonplaukiai praranda pigmentą ir plaukų spalva tampa pilka ar visiškai balta (pražyla). Šis fenomenas arklių pasaulyje, kai plaukai tampa „sidabriniai“ yra vadinami pilkais. Arklių pilkumas (pražilimas) yra lemiamas dominantinio alelio G.

Jaunas arklys turintis G alelį, gimsta pilkas ir palaiptisui (bėgant metams) tampa baltas, ar baltas su raudonomis ar juodomis dėmėmis būdingoms gyvuliams. Anksčiausi požymiai, rodantys pasikeitimą į pilką spalvą pastebimi jauno kumeliuko galvoje, pirmiausia pilkų plaukų požymis matomas aplink akis. Tarpinė grandis yra pilkėjimo procese yra arkliai, kurių balta ir tamsi spalvos susimaišo, tačiau daugumos tokių arklių spalvą yra sudėtinga identifikuoti.



a



b



c

2 paveikslas. **Genas G lemia plauko spalvos pasikeitimą;** a - dominantas baltas (Ww), šis arklys gimsta baltas, turi rausvą odą aiškiai matoma aplink lūpas, šnerves, akis, akys yra rudos ir retais atvejais gali būti mėlynos; b - arabų eržilas, gimė pilkas, bet vėliau tapo baltas, lyginant su (Ww) arkliu, šis pasižymi juoda oda aplink lūpas, šnerves ir akis; c - raudonas Tobiano kumeliukas, tampantis pilku (Gg, ee, Toto), pasižymi apskritimais aplink akis. Pilkos spalvos plaukai pajavairinti raudona spalva, subrendus šiam arkliui, akivaizdžiai nebematome, kad būdamas kumeliuku jis buvo raudonas.

1.3.3 Genas E

Pirmiausias požymis, išskiriantis šiuos arklius, kurie yra nei pilki, nei balti, yra juodo pigmento **buvimas** plaukuose. Plaukai gali būti bet kurioje arklio kūno vietoje. Pavyzdžiui, kojose, karčiuose, uodegoje arba arklys turi juodus plaukus visame kūne (išimtis arklys su baltomis žymėmis). Jei arklys turi šių požymių, darome išvadą, kad jis turi E geno alelį, kuris

lemia juodo pigmento buvimą plaukuose. Genetiškai geno E alelis žymimas E. Alternatyvus alelis E yra e. Alelis e lemia juodą pigmentą odoje, bet ne plaukuose, e įtakoje plaukai atrodo raudoni (Klungland ir kt, 1995).

Jeigu gyvulys neturi juodo pigmento plaukuose, jis žymimas ee. Tuomet šie arkliai (ee) bus kelių atspalvių: nuo šviesiai kaštaninės, tamsiai kaštaninės, kaštaninės ar rusvai rudos. Daugumos uodegos gali būti šviesios, tamsesnės arba kūno spalvos. Šis pigmentas varijuoja spalvą, bet kol kas dar nepaaiškinamas paprastomis genetinėmis schemomis.

Genas, nulemiantis rudą/juodą spalvą yra melanocitus stimuliuojančio hormono receptoriaus 1 genas, dar vadinamas melanokortino 1 receptoriaus genas. Šis genas turi 2 alelius E^D ir e. Taip pat yra rečiau pasitaikantis E^+ alelis, vadinamas „laukiniu tipu“. Kada E^D yra gyvuliuose, jie yra juodi. Tai yra dominantinis alelis.

Tačiau daugelyje veislių E^+ gali pasireikšti kaip „neutralus“ alelis ir todėl E^D/E^+ gyvulys yra juodas, o E^+/e - rudas. E^+/E^+ gyvulys gali būti bet kokios spalvos, priklausomai nuo vyraujančių genų (pavyzdžiui, Agouti), kurių pigmentas yra gaminamas. Reikia pažymėti, kad E^D alelis nepasiduoda Agouti.

1.3.4 Genas A

Tai genas lemiantis juodų plaukų pasiskirstymą. Alelis A kombinacijoje su E, apriboja juodų plaukų pasiskirstymą bėryje. Todėl egzistuoja įvairių atspalvių bėriai: nuo tamsaus bėrio iki rudo su rausvu atspalviu, nuo kraujo spalvos iki vario spalvos ar net šviesios. Genetiškai šios variacijos neapibrėžiamos, tačiau dauguma bėrių priklauso nuo A ir E ir jų genetinė formulė yra ww ir gg.

Alelis a neriboja juodų plaukų buvimo ir tokiu būdu esant E geno aleliui, arklys yra juodas. Daugumoje arklių veislių a alelis yra retas, todėl juodų arklių nėra daug. Dauguma juodų arklių „išblunka“ snukio srityje, šonuose. Todėl jie gali būti vadinami rudais. Terminas rudas gali būti vartojamas skirtingose genetikos kombinacijose (raudonas, bėras, tamsiai bėras arba net kaip juodas).



a



b,c



d

3 paveikslas. A genas lemia juodų plaukų pasiskirstymą

a - tamsi kaštana (ee), Arabų kumelė Tamasina, jos spalva bus nagrinėjama kaip ir kitų dviejų E ir F, norint išvengti skirtingų terminų įvairiose šalyse; b - kaštana (ee); c - rusvai rudas (ee); d - bėras (A, Ee).

Alelis a neriboja juodų plaukų buvimo ir tokiu būdu esant E geno aleliui, E arklys yra juodas. (4 pav., a). Daugumoje arklių veislių a alelis yra retas, todėl juodų arklių nėra daug. Dauguma juodų arklių „išblunka“ snukio srityje, šonuose, todėl jie gali būti vadinami rudais. Terminas rudas gali būti vartojamas skirtingose genetikos kombinacijose (raudonas, bėras, tamsiai bėras (4 pav., b), arba net kaip juodas).



a



b

4 paveikslas. E geno įtaka arklių plaukų spalvai

a - juodas (aa, E); b - tamsiai bėra (A,E)

1.3.5 Genas C (pigmento „atskiedimas“)

C^{cr} yra C geno alelis, lemiantis pigmento „atskiedimą“. Visiškai pigmentuoti arkliai yra CC. Heterozigotiniai arkliai (CC^{cr}) ir turi raudoną pigmentą „atskiestas“ geltonu, bet juodas pigmentas yra nepaveiktas. A bėras (E,A) tampa „buckskin“ formulė ww, gg, A, E, CC^{cr} . Raudonas arklys (ee) tampa sartu „atskiedus“ raudoną pigmentą geltonu, karčiai ir uodega gelsvo

atspalvio. Sarto formulė ww, gg, ee, CC^{cr} , visiškai „atskiedžia“ spalvą iki blyškiai kreminės (rausva oda ir mėlynos akys). Tokie arkliai vadinami cremello, net kartais ir albinosu. Šie arkliai gaunami suporavus du „atskiestom“ spalvom gyvulius, pavyzdžiui, sartą ar „buckskin“.

Kreminius sunku atskirti nuo baltų. $C^{cr}C^{cr}$ gyvulių plaukai kreminės spalvos, tuo tarpu plaukai W arklių yra balti (Mariat, Taourit, Guerin, 2003).



a



b



c

5 paveikslas. C genas apsprendžia pigmento atskiedimą

a - „Buckskin“ (A, E, CCcr) kumelė, nors šis arklys yra bėras, bet raudono pigmento plotai „atskiesti“ gelsvu atspalviu; b - Sarta (ee, CCCI) poni kumelė, genas raudoną spalvą „skiedžia“ geltonai; c -Cremello (CcrCcr) poni kumelė.

1.3.6 Genas D

Šis genas lemia kitos rūšies pigmento „atskiedimą“ ir lyginamas su C^{cr} . Tačiau kartais yra esminių skirtumų tarp D ir C^{cr} spalvos. Pirma, D genas „atskiedžia“ abu: juodą ir raudoną pigmentus, bet neatskiedžia kitų dėmių pigmento. Raudona kūno spalva „atskiedžiama“ į rausvą, gelsvai rausvą ar į geltoną; juoda kūno spalva „atskiedžiama“ į pilką. Antra, papildoma pigmento „atskiedimą“, alelio D buvimas lemia kai kurias tamsias dėmes: nugaros juostą, peties juostą. Trečia, homozigotinis D neatskiedžia iki kreminės spalvos, kaip daro C^{cr} (<http://hometown.aol.com/battyatty/index.htm#dilutions>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).



a



b



6 paveikslas. Geno D įtaka arklių spalvai






a - Buckskin (pelekas (A, E, D)); b - Raudonas tobiano (ee, Toto)




1.3.7 Genas TO






Egzistuoja keli balto dėmėtumo modeliai, bet toks dėmėtumas aiškiai sąlygojamas vieno geno tobiano dėmėtumo. Tobiano dėmėtumas nėra griežtai apibrėžtas, tačiau vyrauja balti plaukai su rausva oda (gali pasitaikyti ir kitų atspalvių). Paprastai balta spalva tęsiasi nuo kaklo viršaus per gogą iki kryžiaus ir toliau leidžiasi žemyn. Balti plotai gali išsiplėsti ir dar toliau. Kojos taip pat baltos, bet galva įprastai tamsi išskyrus snukio sritį (Duffield, Goldie, 1998); (Spritz, Hearing, 1994).

9. lentelė. **Arklių spalvos genai**

Genas	Aleliai	Rezultatas
W	W w	Yra abejojančių W geno būvimu. Letalinis White kaip genetinis sindromas pripažystamas. WW: Letalus Ww: Pigmento stoka odoje, plaukuose ir akyse. Arkliai yra baltos spalvos. ww: arkliai yra pilnai pigmentuoti.
G	G g	GG ar Gg: arkliai palaiptiesiems su amžiumi pražyla iki baltos ar derešos spalvų, bet gimsta ne pilki. Pigmentas visada išlieka odoje ir akyse. gg: arkliai gyvenimo eigoje ne pilkėja.
E	E e	EE ar Ee: juodas odos ir akių pigmentas. Juodas pigmentas gali būti pasiskirstęs taškais arba viedodai per visą kūną. ee: juodas odos pigmentas, tačiau plaukai rudi. Arkliai nėra rudi, jei dalyvauja baltos, pilkos, keršos spalvų ar spalvos susilpninimo genai.
E+	E+ e+	 E+E+ or E+e+ Dominuojanti juoda, panaikina A ar bėrą alelį, rezultate juodas arklys. e+e+ jokio poveikio
A	A a	 Agouti-bėras: paveikia "E", apribojant eumelaniną, ar juodą pigmentą. Jokio poveikio "e" ar rudam. AA or Aa: jei arklio plaukai juodi (E ne E+), tada jie yra vietomis aa: jei arklys turi E alelį, tada jis bus

		juodas.	
C	C		<p>CC: Arkliai pilnai pigmentuoti. CC^{cr}: Rudas pigmentas susilpninamas iki geltono; juodo pigmento neveikia.</p>
	C ^{cr} taip pat žymima kaip 'c'	<p>CC^{cr} Palomino</p>  <p>C^{cr}C^{cr}:</p> 	<p>C^{cr}C^{cr}: Rudas ir juodas pigmentai susilpninami iki blyškaus kreminio. Odos ir akių spalva taip pat blyškesnė.</p>
D	D d		<p>DD ar Dd: pelėkos spalvos arklių kūno spalva susilpninama iki šviesiai rožinės-rudos, geltonos-rudos, geltonos ar pilkos ir su tamsiais plėmais, įskaitant nugaroje juostą, juostą ties pečiais ir kojomis. dd: kūno spalva nesusilpninama.</p> 

TO	TO to	<p>TOTO ar Toto: Įprastinės ar individualios ovalinės baltos ir spalvotos žymės, kurios tęsiasi žemyn per kaklą ir krūtinę, bei sudaro skydo vaizdą.</p> <p>toto: Nepasireiškia tobiano žymės.</p>
O Taip pat žymima kaip Fr ar FrO	O o	<p>OO ar Oo: Overo ar Frame Overo marginimas – spalva sudaro rėmą baltam marginimui. Homozigotai susiję su letaliniu White sindromu.</p> <p>oo: Nepasireiškia overo margumas.</p> 
Ch	Ch ch	<p>Šampano (Champagne): retas susilpninimo genas, kuris suteikia moliūgo spalvos šlakuotai margintą odą, gintarines ar mėlynas akis ir suteikia plaukams bronzinį atspalvį. Oda aplink akis turėtų būti rožinės spalvos su strazdanomis. Champagne arkliai gimsta tamsesnės spalvos, kuri pašviesėja subrendus.</p> <p>ChCh ar Chch: akivaizdus champagne susilpninimas</p> <p>chch: nėra champagne susilpninimo.</p> 
F	F f	<p>Matomas poveikis tik rudos ar kaštoninės spalvos arkliams.</p> <p>FF ar Ff: Rudi taškai ee arkliams.</p> <p>ff: ee arkliams linų spalvos dėmės.</p>
P	P p	<p>Pangare (Mealy) pasireiškia apatinėje arklio kūno dalyje, „minkštose“ dalyse, ar ant snukio, už alkūnių, šonuose, ant sėdmens, virš ar aplink akis ir palei pilvą.</p> <p>PP ar Pp: Mealy ar Pangare pigmento susilpninimas.</p> <p>pp: nėra mealy šviesinančio pigmento.</p> 

Rn	Rn rn		RnRn ar Rnrn: keršas marginimas, kai balti plaukai susimaišę su pagrindine spalva. rnrn: nėra keršo margumo.
Rb	Rb rb		Rabicano: Dalinis keršumas su “meškėno” uodegos žymėmis. RbRb ar Rbrb: rabicano žymės. rbrb: nėra rabicano požymių.
Sb	Sb sb		Sabino plunksniškas baltas margumas. Nėra rizikos lėtaliniam White. Vienintelis margumas randamas grynakraujų Arabų veislėje. SbSb ar Sbsb: sabino žymės. sbsb: nėra sabino žymių.
Spl	Spl spl		Splash, Splashed White Atrodo kaip atvirkštinis tobiano su baltom dėmėm einančiom nuo gyvulio apačios į viršų. Arkljo galva atrodo kaip pamirkyta baltų dažų kibire. Balta spalva. SplSpl ar Splspl: išmargintas lopais. splspl: nėra išmarginimo
Sty	Sty sty		Sooty (suodinas) StySty ar Stysty: juoda spalva susimaišius su kūno spalva. stysty: nėra išimaišiusių juodų plaukų

Z taip pat žymima kaip S	Z z		ZZ ar Zz: sidabrinis išmarginimas dėmėmis - susilpnina eumelaniną ar juodą pigmentą. Juoda spalva pavirsta į rudą su baltais karčiais ir uodega, arba sidabrine spalva. zz: nėra sidabrinė dėmė.
LpOp			Širmo išmarginimo genas. Šis genas yra numanomas ir juo egzistavimu yra abejojama.. Sponenbergas pritaria jo egzistavimu. Kiti mano, kad tai yra daugybinių alelių požymis.

(Bowling, 1980).

1.4 Genetinės formulės suteikimas spalvai

Norėdami sistemiškai apibūdinti arklių spalvas, turime įvesti genetinius simbolius, identifikuojančius tas spalvas.

GENETINĖ FORMULĖ	SPALVA
W	Balta
G	Pilka
E, A, CC, dd, gg, ww, oto	Bėra
E, aa, CC, dd, gg, ww, toto	Juoda
Ee, aa, CC, dd, gg, ww, toto	Raudona
E, A, CC ^{cr} , dd, gg, ww, toto	Rusva
ee, CC ^{cr} , dd, gg, ww, toto	Sarta
C ^{cr} C ^{cr}	Kremine
E, A, CC, D, gg, ww, toto	Tamsiai rusva
E, aa, CC, D, gg, ww, toto	Pelėka
ee, aa, CC, dd, gg, ww, toto	Kaštana

gg, ee, CC, dd, RN	Kerša
gg, E, A, CC, dd, RN	
gg, E, aa, CC, dd, RN	

(Bowling, 1980).

1.5 Kūno dangos spalvos molekulinė genetika

Gyvulių veisėjus ir biologus amžiais domino kūno dangos spalvų paveldimumas. Klausimai apie jų paveldimumą dažnai būdavo diskusijų, o kartais ir prieštaringų teorijų tema. Yra aišku tai, kad daugybė selekcijoje taikomų priemonių pirmiausia buvo skiriama naminių gyvulių kailio spalvai (Marklund, Moller, Sandberg, Andersson, 1999).

Veisiant pirmenybė dažnai būdavo teikiama išoriniam skirtingų spalvų grožiui, bet prekybinis supratimas dėl individualaus temperamento ir ypatybių, kuris susijęs su atskira spalva, taip pat vaidino nemažą vaidmenį. Pavyzdžiui, tarp arklių veisėjų buvo paplitę tokie teiginiai kaip, kad „kaštanai yra greiti“ ar „kerši yra tvirtesni“. Spalva taip pat buvo naudojama kaip apytikris tėvystės/tapatybės testas veislėse su pastovia spalva, tai yra patikrinimas, kad gyvuliai yra grynaveisliai. Kitu atveju, kūno spalvos danga turėjo tiesioginę ekonominę svarbą, kadangi ji paveikia parduodamų gyvulių produkcijos kokybę. Pavyzdžiui, avininkystėje, stipriai sumažinti vilnos kainą gali net ir nedidelis juodų plaukų kiekis, **esantis** tarp baltų. Panašiai yra ir kiaulininkystėje: smulkiai pigmentuotoje kiaulių skerdenoje esant plaukų svogūnėlių, mėsos paviršius atrodo dėmėtas, ir prieš pardavimą bus reikalingas brangus jų pašalinimas iš odos.

Žinduolių kailio spalvos kintamumas priklauso nuo pigmentų gaminančių ląstelių (melanocitų) pasiskirstymo. Ankstyvos embriogenėzės metu, melanocitai juda iš nervinio gūbrio, plinta ir išsiskiria odoje ir plaukų folikuluose, tuo tarpu pigmentinės tinklainės ląstelės išsivysto iš embrioninės optinės taurelės. Melanocitai, kartu su plauku folikulų svogūnėliais yra raginiame epidermio sluoksnyje. Matoma spalva priklauso nuo pigmento tipo sudėties bei jų detalių dydžio ir pasiskirstymo. Melaninas gaminamas organelėse (melanosomose), melanocitų viduje. Žinduolių ląstelėse yra gaminami du pagrindiniai pigmentų tipai. Tai rusvai-juodas eumalaninas ir rausvai-gelsvas feomelaninas (Siracusa ir kt., 1994).

Pigmentacija priklauso nuo daugelių genų ir jų produktų, kurie sąveikauja eilėje procesų per nervinį gūbrį, melanocitų vystymosi, augimo, migracijos ir diferenciacijos metu. Šie procesai

yra tik iš dalies suprantami, bet genų funkcija, kontroliuojanti kiekvieną stadiją gali būti gyvybiškai svarbi pigmentacijai. Be to, daugelis iš šių genų pasireiškia pleotropiniu poveikiu prieš kitus svarbius procesus. Vadinasi, genų pakitimai nulemia kailio spalvos anomalijas, dažnai sukelia paveldimus sutrikimus, kurie atsispindi kitose svarbiose šių genų funkcijose.

Žinduolių pigmentacija labiausiai ištirta tarp pelių. Ankstesni klasikiniai tyrinėjimai buvo pagrįsti tarpveisliniais (krosbrydingo) eksperimentais, tuo tarpu pastaraisiais metais keletas kailio spalvos genų buvo sekvenuoti ir apibūdinti (Rana, 1999).

Pelėse buvo rasta beveik šimtas genų ir daugiau nei šimtas penkiasdešimt mutacijų, paveikiančių kailio spalvą. Daugelis iš jų pasitarnavo kaip pradinis taškas tyrinėjant žmonių ir kitų žinduolių pigmentacijos fenotipus ir mutacijų apibūdinimui (Marklund, 1997).

1.5.1 Mutacijos, nulemiančios pigmento gamybą ir pasiskirstymą

Melanocitai yra organelėse – melanosomose, kur kiekvienas amino rūgšties tirozino virtimas dopaquinonu (pagrindinis feomelanimas ir eumelanino pirmtakas), katalizuojamas fermentu tirozinaze. Taigi, tirozinazei esant neaktyviai yra sutrukdomas pigmento susiformavimas, kas nulemia albinizmą, tai yra pilną pigmentacijos nebuvimą odoje, plaukuose ir akyse (raudonos). Recesyvinės albinų mutacijos albino (C) lokuse, koduojamos tirozinazės, buvo rastas žmonėse, pelėse ar medako žuvyse. Galvijuose albinizmas pasitaiko keliose veislėse, tuo tarpu apie raudonų akių albino kiaules ar arklius pranešimų nėra. Manoma, kad pranešimai apie balzganos spalvos Mongolijos kiaules, kaip ir šinčilas, šunis ir siamo kates susiję su mutacijomis C lokuse. Tai pat yra manoma, kad kai kurias arklių spalvas nulemia C lokuso mutacijos. Pavyzdžiui, šviesesnės cremello spalvos arkliai (genotipas $C^{Cr} C^{Cr}$) kombinacija su e/e genotipu. E lokusas dažnai priskiriamas albinosam, bet jų oda nėra visiškai balta ir tai pat akyse yra pigmentas, todėl jie nėra tikri albinosai. Heterozigotiniai arkliai, turintys dominantinį C^{Cr} alelį dažniausiai yra daugiau ar mažiau aukso spalvos, taip pat kaip ir Palomino ($C^{Cr/-}$, e/e) ar Buckskin ($C^{Cr/-}$, E/-) (Robbins ir kt, 1993).

Susilpninimas (d) (dilute) pelėse yra recesyviškai paveldimas spalvos genas (alelis), nelemiantis netolygų melanosomų pasiskirstymą. D lokusas koduoja mioziną V –baltymą, kuris dalyvauja viduląsteliniam transporte. Miozinas V geno mutacijas nulemia žmonių Griscellis susirgimą, kuris paveikia pigmentaciją ir imuninę sistemą. Arklių dominantiška paveldimas dun

alelis (peleka saplva) susilpnina abu – ir eumelaniną, ir feomelaniną, esančius kūno plaukuose, bet lieka juoda galva, tamsūs taškai ir juostos ant pečių ar nugaros. Dun pasireiškia keletoje arklių veislių ir tai tipiniai Norvegijos Fiordų arkliai. Panašumai tarp dun ir susilpninimo pelėse gali reikšti, kad jei kontroliuojami homologinių genų (Marklund ir kt., 1996).

1.5.2 Melanino tipų gamybą lemiančios mutacijos

Mutacijos, kurių pasekoje gaunami panašūs eumelanino ir feomelanino kiekiai labai stipriai įtakoja spalvai. Kartu su melanosoma, dopaquinonas gali būti paverstas arba į eumelaniną, arba feomelaniną. E lokusas sumažina eumelanino kiekį. Šis lokusas koduoja melanokortino receptorių 1 (MC1R) – transmembraninį baltymą, kuris yra gaminamas melanocituose. Kada ligandas (α –melanocitus stimuliuojantis hormonas, α - MSH) prijungia MC1R, signalas išsiunčiamas į ląstelę, kuri stimuliuoja eumelaninogamybą. Tačiau jei prisijungia agouti baltymas, kuris yra koduojamas agouti (A) lokuso, α - MSH prisijungimas gali būti sutrukdomas (Lu ir kt, 1994).

Funkcijų paradimas, esant mutacijai MC1R nulemia recesyvinio geltono (e) genotipo pasireiškimą pelėse ir vietoj eumelanino gaminamas feomelaninas. Tokį patį fenotipą gali nulemti ir dominantinis genotipas, jei įvyksta agouti mutacija, kuri užblokuoja MC1R. MC1R mutacijos taip pat nulemia rudų jūrų kailyčių, galvijų ir kaštoninių arklių spalvą. Žmonėms MC1R mutacijos susijusios su raudonais plaukais, sunkiai įdegančia oda ir jautrumu melanomai (Marklund ir kt., 1996), (Andre, 1992).

1.6 Lietuvos sunkiųjų arklių veislė

Lietuvos sunkiųjų arklių veislė buvo pradėta kurti XIX a. pabaigoje. Veislės kūrimu 1894 m. užsiėmė „Darbui ir važiuoti arklių veisimo draugija“, kuri padidino Brabansonų, Peršeronų, Ardėnų ir kitų sunkiųjų veislių eržilų įvežimą. Su šiais eržilais buvo kryžminamos vietinės kumelės. 1923 m. karo sunaikintai veislinei medžiagai papildyti iš Olandijos buvo importuoti sunkiojo tipo arkliai. 1925 m. iš Švedijos atgabenti Ardėnai. Gauti mišrūnai buvo žymiai gyvybingesni, geriau vystėsi ir, svarbiausia, labiau prisitaikę vietos sąlygoms, negu importuoti arkliai. Tokie mišrūnai pietvakarinėje Lietuvos dalyje nulėmė tolimesnį sunkaus tipo arklių formavimąsi (*www.horses.lt/lsavaa/about.html. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d*).

Lietuvos sunkieji išvesti kryžminant vietinį arklį su eile sunkiųjų veislių Belgų kilmės, iš kurių didžiausią įtaką turėjo Švedų Ardėnai.

Išvedant Lietuvoje sunkiuosius, buvo panaudotas stelbiamasis kryžminimo būdas su tolimesniu veisimu savyje. Stelbiamasis kryžminimas daugelyje atvejų siekė II – III kartą.

Masiškas geriausių mišrūnų panaudojimas veislei prasidėjo nuo 1930 metų. Jau iki 1940 metų jie sudarė 88-94% visų reproduktorių norimo tipo. 1940 -1953 metais buvo naudojami tik eržilai mišrūnai.

Didelis dėmesys buvo kreipiamas atrankai ir parankai. Atranka buvo vykdoma pagal konstituciją, eksterjerą, ir darbinės savybes. Kryžminimas, atranka ir paranka norimo tipo arklių geras laikymas ir šėrimas buvo tais faktoriais, kurių įtakoje susiformavo Lietuvos sunkiųjų arklių veislė, kuri Žemės ūkio ministerijos įsakymu 1963 metais pripažinta kaip savarankiška (www.zum.lt/agroweb/Tekstai/FAO_ataskaita.pdf. *Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.*)

Lietuvos sunkiųjų veislės arkliai yra ištvermingi, tvirtos konstitucijos, judrūs, vislūs ir ilgaamžiai.

Lietuvos sunkieji yra vidutinio ūgio, gilos krūtinės, ilgo, plataus liemens. Jų galva vidutinio didumo, tiesi arba kumpanosė, kaklas trumpas, storas, raumeningas, gogas vidutinio didumo ir aukštumo, kartais trumpas, bet platus, nugara tiesi, kartais truputi įlinkusi, plati, raumeninga, juosmuo trumpas, platus, strėnos plačios, skeltos, normaliai nuleistos, kojos trumpos, storos, šepetėliai nedideli, kanopos taisyklingos formos, vidutinio kietumo. Dažniausia pasitaikantys trūkumai: įlinkusi nugara, plokčiapadiškumas, netaisyklingos kojų pastatymas. Apie trys ketvirtadaliai Lietuvos sunkiųjų yra sarti, kiti –bėri, rečiau dereši.

Vidutinis eržių ūgis ties gogu 157 cm, krūtinės apimtis 197 cm, plaštakos apimtis 24,3. kumelių ūgis ties gogu 154 cm, krūtinės apimtis 193 cm, plaštakos apimtis 22,9 cm.

Dėl vertingų veislinių savybių ir geros aklimatizacijos Lietuvos sunkieji arkliai buvo eksportuojami kitoms arklių veislės pagerinti į kai kurias Rusijos sritis, Ukrainą, Baltarusiją, Kazakstaną. Kiniją, Mongoliją ir kitas šalis (Miceikienė, Kanapeckas, Krasnopiorova, Baltrėnaitė, 2005).

Krypatingas veislininkystės darbas, geras šėrimas ir laikymas sudarė palankias sąlygas formuoti veislei, kuri 1963 m. buvo patvirtinta savarankiška, turinti 12 linijų. Lietuvos sunkieji arkliai kryžminami su 1963 m., 2000 m., 2001 m. iš Švedijos įvežtais Ardėnų veislės eržilais. Nuo 2003 m. už Lietuvos sunkiųjų arklių išbandymus ir kilmės knygų vedimą atsakinga

„Lietuvos Sunkiųjų arklių veislės augintojų asociacija“. Lietuvos sunkieji į kilmės knygas įrašomi nuo 1948 m. kaip Ardėnų veislės arkliai ir jų mišrūnai. Antroji Lietuvos sunkiųjų arklių kilmės knyga išleista 1951 m. ir leista iki 1996 m. Lietuvos sunkiųjų arklių kilmės knygas veda Lietuvos arklių augintojų asociacija. Veisliniai arkliai identifikuojami pagal spalvą bei žymes. Visų pirma Lietuvos sunkieji arkliai naudojami darbui, tačiau vis dažniau jie eksportuojami į užsienį mėšai. XIX amžiaus viduryje buvo pradėti darbo arklių jėgos bandymai. Lietuvoje pirmą kartą jie buvo atlikti 1857. Nuo 2002 m. už Lietuvos sunkiųjų arklių išbandymus atsakinga „Lietuvos arklių augintojų asociacija“. Šiuo metu pastebimas spartus Lietuvos sunkiųjų arklių populiacijos mažėjimas. Krištkai sumažėjo eržilų linijų skaičius, prastėja veislinės ir darbinės savybės. Kiekvienas Lietuvos sunkiųjų arklių augintojas iš esmės užsiima tik savo bandos gerinimu. Lietuvos sunkiųjų arklių veislės būklę galima įvertinti kaip pavojingą dėl išnykimo (Valstybinė gyvulių veislininkystės priežiūros tarnyba prie ŽŪM, 2005).

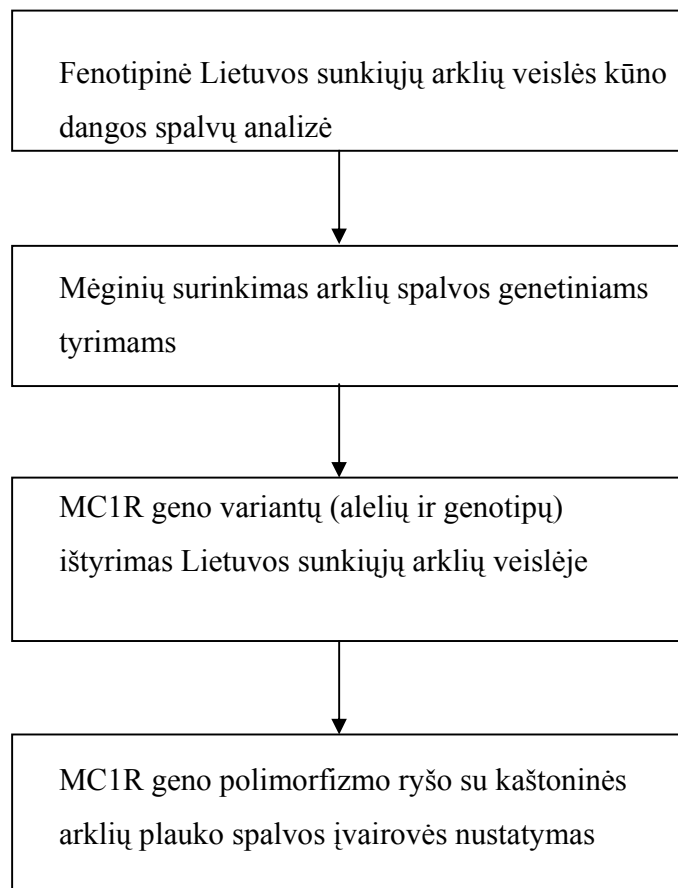
2 TYRIMŲ METODAI IR MEDŽIAGA

2.1 Tyrimų medžiaga

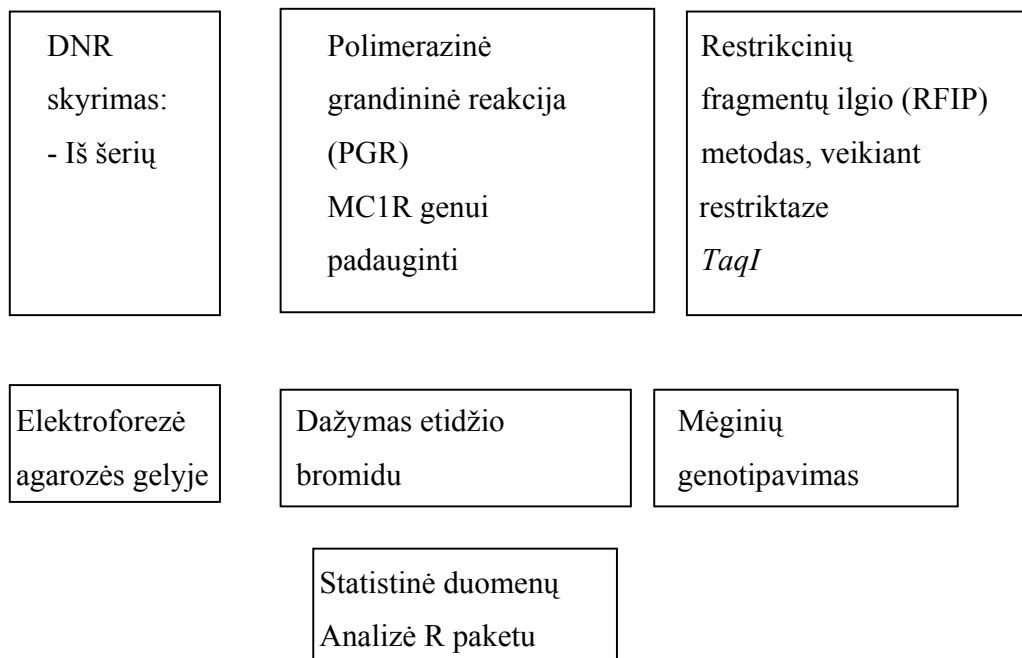
Mėginiai buvo paimti iš 32 Lietuvos sunkiujų veislės arklių (8 eržilų, 24 kumelių), laikomų ūkininko Bekampio ūkyje. Fenotipinė kūno dangos spalvų analizė buvo atlikta nufotografuojant kiekvieną tyrimams atrinktą arklių, aprašant jo spalvą.

Karčiai (20-30 vnt.) buvo pešami su svogūnėliais, dedami į vienkartinius plastikinius maišelius. Iš visų tirtų mėginių buvo išskirta DNR, nustatytas jos švarumas ir koncentracija. MC1R genas buvo tiriamas PGR-RFIP metodu.

2.2 Tyrimų schema



2.3 Tyrimų metodai



2.3.1 DNR skyrimas iš plauko svogūnėlio ląstelių

Nukerpami 4-5 plaukų svogūnėliai ir patalpinami į mėgintuvėlius. Paruošiamas lizavimo mišinys (DTT -7,5 μ l, Chelex- 200 μ l, Protenaze K (20mg/ml)- 10.7 μ l). Mėgintuvėlio turinys užpilamas lizavimo mišiniu (vienam pavyzdžiui imama 218,2 μ l paruošto mišinio). Mėgintuvėliai 30s. maišomi maišyklės „Vortex“ pagalba. Centrifuguojami 10s. 13500 aps./min. greičiu. Pavyzdžiai 30 min. inkubuojami 56°C temperatūroje. Po inkubacijos mėginiai (po 10 μ m) pakaitinami 94°C temperatūroje (inaktyvuojami - amplifikatoriuje) bei paliekami nakčiai.

2.3.2 DNR švarumo ir koncentracijos nustatymas

Genominės DNR kiekis ir grynumas nustatomas spektrofotometrinio metodo pagalba. Tam tikslui paruošiamas 100 μ l skiestos DNR tirpalas: imama 10 μ l koncentruotos DNR ir skiedžiama 90 μ l distiliuotu vandeniu. DNR kiekis nustatomas išmatuojant skiesto tirpalo optinį tankį (OD) prie 260nm bangos ilgio. Kai OD = 1, tai 1ml tirpalo yra 50 μ g dvigrandės DNR.

DNR kokybė įvertinama išmatavus skiesto tirpalo optinius tankius prie 260 ir 280 nm bangos ilgių. Švarumą rodo santykis OD260/OD280. Švarių DNR tirpalų santykis yra 1.8-2.0. Jei tirpale yra baltymų ar fenolio priemaišų, šis santykis bus mažesnis nei nurodyta. Baltymų koncentracija neturi viršyti 0.5 mg/ml ribos. Jei tirpale priemaišų yra daugiau, reikia atlikti pakartotinį genominės DNR valymą.

Šiuo metu laboratorijose naudojami spektrofotometrai iš karto nustato ir apskaičiuoja tiek DNR, tiek baltymų koncentraciją tirpale.

2.3.3 Polimerazinė grandininė reakcija (PGR)

Polimerazinė grandininė reakcija yra metodas, pavadintas pagal DNR polimerazę, fermentą, vykdančią DNR replikaciją ląstelėje. Tai yra nukleino rūgščių sintezės *in vitro* metodas, kuriuo laboratoriniame mėgintuvėlyje gali būti specifiskai padauginti (amplifikuoti) atskiri DNR fragmentai. PGR metodas yra labai jautrus, todėl padauginti pasirinkta DNR atkarpa gali sudaryti netgi vieną milijoninę bendro DNR pavyzdžio dalį. Tai reiškia, kad, naudojant PGR galima amplifikuoti net ir vienintelį pasirinktą geną.

MC1R geno pradmenys:

MC1R 1 5'- CCT ACC TCG GCT GAC CAC CAA - 3'

MC1R 2 5'- GAG AGG ACA CTA ACC ACC CAG ATG - 3'

10 lentelė. Mišinys PGR reakcijai MC1R geno polimorfizmo tyrimui

PGR komponentai:	Vienai reakcijai atlikti (μl)
Dejonizuotas vanduo dd H ₂ O	4,75
Buferis 10xPCR (be MgCl ₂)	2,5
MgCl ₂ (konc. 50mM)	1,5
dNTP (2mM)	2,5
MC1R 1 (konc. 10pmol)	1,5
MC1R 2 (konc. 10pmol)	1,5
BSA	0,25
Taq polymerazė (lvnt./μl) aktyvumo	0,5

Į vieną mėgintuvėlį supilama 10µl genominės DNR ir 15µl PGR reakcijos mišinio. Galutinis mišinio kiekis yra 25 µl. Supylus visus komponentus, gautas mišinys gerai išmaišomas ir nucentrifuguojamas. PGR atliekama automatiniam amplifikatoriuje. PGR ciklai kartojasi 35 kartus.

PGR sąlygos:

94 °C, 3 min (pirminė denatūracija)

35 ciklų:

94 °C, 1 min. (denatūracija)

60 °C, 20s (oligonukleotidų prisijungimas)

72 °C, 30s (DNR grandinėlių sintezė)

Sintezės užbaigimui: 72 °C, 10 min.

Laikyti: 4 °C.

2.3.4 Karpymas fermentais ir elektroforezė

10µl PGR produkto karpoma su 10 µl restrikcinio mišinio (ddH₂O-7,5 µl, 10x Taq I buf. - 2µl, Taq - 0,5 µl). Paliekama termostate 1 valandai 65°C.

Karpytas PGR produktas frakcionuojamas 3 % agarozės gelyje, 120V, 45 min. Pagaminti 3,0 % agarozės gelį, reikia 2,25 g agarozės miltelių ištirpinti 75 ml 1 x TAE buferyje kaitinant ir maišant tol, kol tirpalas pasidaro skaidrus ir vientisos konsistencijos. Vėstant, indas su ištirpinta agaroze maišomas atsargiai, kad nesusidarytų oro burbulai. Iki 70 - 65°C atvėsintą agarozę greitai, bet tolygiai supilame į paruoštą formą. Po to, į gelį įstatome „šukutes“ ir formą paliekame 30 min kambario temperatūroje, kad gelis sustingtų. Sustingus geliui, atsargiai ištraukiame „šukutes“. Prieš įvedant DNR mėginius į susiformavusius „šulinėlius“, gelį reikia įstatyti į elektroforezės vonelę, užpildytą 1 x TAE buferiu taip, kad šis apsemtų gelį. Į kiekvieną šulinėlį įvesti po DNR mėginį, sumaišytą su bromfenolio mėlio dažais (15,0-20,0 DNR mėginio + 2,0 µl dažo). Elektroforezė vykdoma leidžiant elektros srovę per gelį, ko poveikyje DNR fragmentai juda nuo katodo link teigiamo poliaus - anodo. Fragmentų judėjimo greitis gelyje priklauso nuo jų dydžio: mažesni fragmentai juda greičiau, didesni - lėčiau.

Elektroforezės metu išfrakcionuotus DNR mėginius nudažome etidžio bromido tirpalu:

- a) iš elektroforezės formos išimamas agarozės gelis
- b) į dažymo vonelę įpilti 300 ml dist. H₂O ir 30 µl etidžio bromido tirpalo (10mg/ml). Galutinė dažų koncentracija - 0,5 µl/ml.
- c) gelį panardinti į paruoštus etidžio bromido dažus.
- d) gelį gerai nuskalauti distiliuotu H₂O taip, kad neliktų etidžio bromido dažų liekanų.
- e) rezultatus įvertinti UV šviesoje. Dažymo metu DNR ir etidžio bromidas sudaro ultravioletinėje šviesoje fluorescuojantį kompleksą.

Gelis dažomas etidžio bromido tirpale 5-10 min. ir analizuojamas UV šviesoje (bangos ilgis 300 nm) video analizės ir dokumentavimo aparatu Mini Bis Pro.

2.3.5 Statistinė analizė

Alelių, genotipų, homozigotų ir heterozigotų analizė atlikta su statistiniu R – paketu (Gentlemen R. ir kt., 1997).

Genotipų dažnis p apskaičiuojamas pagal formulę:

$$p = \frac{n}{N} \quad p - \text{genotipų dažnis}$$

n – atskiro genotipo individų skaičius

N – tirtų individų skaičius

Faktinis heterozigotiškumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$h_o = \frac{n_2}{N} \quad h_o - \text{faktinis heterozigotiškumas}$$

n_2 - heterozigotinių individų skaičius

N - tirtų individų skaičius

Numatomas heterozigotiškumas apskaičiuojamas pagal formulę:

$$h_e = 1 - (p^2 + q^2) \quad h_e - \text{numatomas heterozigotiškumas}$$

p ir q – alelių dažniai

$h_o < h_e$ reiškia heterozigotiškumo trūkumą

Nukrypimas nuo Hardy-Weinbergo dėsnio buvo patikrintas F_{is} fiksacijos indeksu (Nei, 1987) naudojant formulę $(h_e - h_o)/h_e$.

3. TYRIMŲ REZULTATAI IR JŲ APITARIMAS

3.1 Lietuvos sunkiujų arklių veislės kūno dangos spalvos analizė

Fenotipiškai ištyrus 32 Lietuvos sunkiujų veislės arklių kūno dangos spalvą buvo rasta sekanti jos įvairovė:

Šviesiai sarti	- 2	(6 pav., c)
Sarti	- 17	(6 pav., a)
Tamsiai sarti	- 5	(6 pav., b)
Kaštani	- 3	(6 pav., d)
Bėri	- 4	(6 pav., e)
Kerši	- 1	(6 pav., f)

Kaštoninė arklio spalva yra viena pagrindinių spalvų, iš jos susidaro ir kitos spalvos. Kaštana spalva (Ee) yra recesyvinė nekaštoninei (juodai ar bėrai) (EE). Kaštoniniai arkliai iš esmės yra „raudoni“, nors ištikrųjų turi daug dėmių, kurios yra tamsios arba juodos.

Kaštoninis - tai vienspalvis auksiškai, šviesiai rudas arklys su tokiais pat karčiais ir uodega.

Yra įvairių kaštoninių arklių atspalvių:

Raudi - kaštoniniai rausvi, karčiai ir uodega su juodų plaukų priemaiša;

Kaštanai - liemuo - rudas, o karčiai ir uodega tokie pat ar tamsesni;

Juodi kaštanai - kailis visiškai juodas, o karčiai kaštoniniai;

Sarti - liemuo - rudas, karčiai ir uodega - beveik balti;

Bėras – rudas arklys su juodais karčiais ir uodega. Kojos iki kelių ir alkūnių, snukis juodi. Bėras arklys visada vienspalvis;

Keršas – arklys su dideliais netaisyklingais kitos spalvos lopais ant kailio.



a) sarta spalva

b) tamsiai sarta



c) šviesiai sarta

d) kaštana spalva



e) kerša

f) bėra

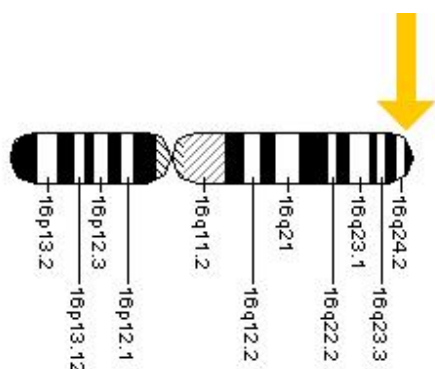
7 paveikslas. Lietuvos sunkiųjų arklių spalvų įvairovė

3.2 MC1R geno variantų ištyrimas

Melanocitus stimuliuojančio hormono receptoriaus genas (MC1R) yra pagrindinis genas, nulemiantis kaštanų arklių spalvą. Rastas viengrandės DNR konformacijos polimorfizmas (SSCP) parodė ryšį su kaštonine spalva. Sekų analizė atskleidė MC1R geno alelyje esančią mutaciją (83 Ser → Phe), kuri susijusi su kaštana arklio spalva. Polimorfizmą galima nustatyti paprastu PGR-RFIP metodu, kadangi mutacija randama “Chesnut” alelio TaqI kirpimo vietoje (Kriegesmann ir kt.,1996).

Genas kontroliuoja baltymo, vadinamo melanokortino 1 receptorių, gamybą. Receptorių yra svarbus normaliai pigmentacijai. Receptorių pirmiausiai aptinkamas melanocitų (specializuotos ląstelės, kurios gamina pigmentą – melaniną) paviršiuje. Melaninas - tai medžiaga, kuri suteikia spalvą odai, plaukams ir akims. Melaninas taip pat aptinkamas ir šviesai jautriuose audiniuose, kaip pavyzdžiui tinklainė, kur reguliuoja normalų regėjimą (Duttlinger ir kt., 1993). Melanocitai gamina dviejų formų melaniną: eumelaniną ir feomelaniną. Šių dviejų pigmentų santykis nulemia plaukų ir odos spalvą. Melanokortino 1 receptorių kontroliuoja kuris melanino tipas bus gaminamas melanocituose. Kada receptorių yra aktyvuojamas, jis melanocituose sukelia eilę cheminių reakcijų, ko pasekoje ląstelės gamina eumelaniną. Jei receptorių neaktyvuojamas arba blokuojamas, melanocitai vietoj eumelanino gamina feomelaniną (Valverde ir kt., 1995).

Pagrindiniai MC1R geno variantai (polimorfizmas) yra susiję su skirtumais, kurie pasireiškia skirtinga individo odos ir plaukų spalva.



8 paveikslas. **MC1R geno vieta chromosomoje**

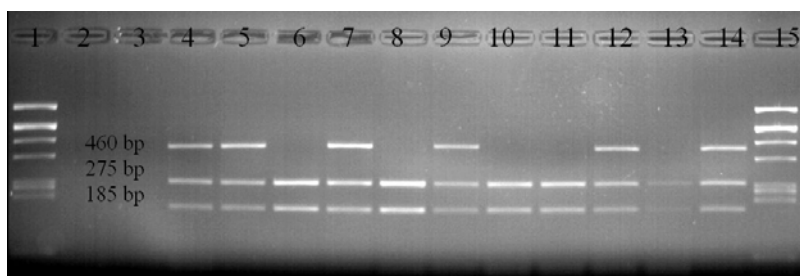
MC1R genas yra ilgajame 16 chromosomos petuke, 24.3 pozicijoje. Tiksliau apibūdinant, MC1R genas yra nuo 88,512,526 bazių poros iki 88,514,885 bazių poros,16 chromosomoje (<http://ghr.nlm.nih.gov/gene=mc1r#name> Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.).

MC1R yra vienas iš lokusų, kuris apsprendžia plaukų spalvą daugelyje žinduolių rūšių. Daugelio žinduolių laukinio tipo spalvos yra sudarytos iš rudo ir juodo pigmentų mišinio. MC1R mutacijos susijusios su skirtingu kailio spalvos fenotipu buvo nustatytos daugelyje rūšių, įskaitant, peles, galvijus, arklius, vištas, lapes, avis, šunis, kates, kiaules (Kijas ir kt., 2001). Genas turi du pagrindinius alelius. Vienas alelis (E) nulemia juodo pigmento gamybą, kas nulemia rudos, juodos ar bėros spalvos pasireiškimą. Kitas alelis (e) sumažina eumelanino gamybą, bet padidina feomelanino kiekį (raudonas pigmentas). Kadangi gyvuliai vieną geno kopiją paveldi iš tėvo, o kitą iš motinos, tai gyvuliai turintys dvi geno ee kopijas bus kaštoninės spalvos, o turintys EE ar Ee – juodi, rudi ar bėri. Arklių, turinčių ee genotipą, fenotipas gali įvairuoti nuo tamsios kaštoninės iki šviesiai rudos spalvų (<http://www.aegrc.uq.edu.au/index.html?page=30054>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.). Yra dar vienas alelis, žymimas e^a, kuris nuo e nežymiai skiriasi savo molekuline sudėtimi, bet turi tokį patį poveikį fenotipo pasireiškimui. (<http://www.horse-genetics.com/chestnut-horses.html>. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.) Šis alelis atsirado dėl mutacijos kodone 84 (GAC→AAC) (Wagner, Reissmann, 2000).

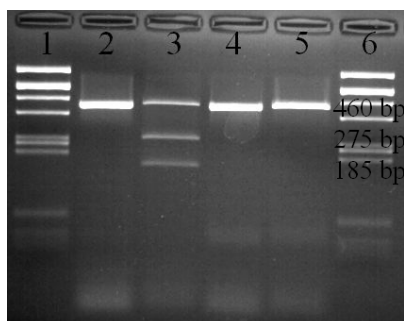
Tiriant MC1R geną Lietuvos sunkiųjų arklių veislėje buvo gautas 460 bp PGR produktas. DNR fragmentų dydis po karpymo restrikciniu fermentu *TaqI* priklausė nuo arklių MC1R geno alelių dydžio:

E/E; e^a/e^a – 460 bp
 e/e – 275 bp; 185 bp
 E/e; e/e^a – 460 bp; 275 bp; 185 bp

	PGR produktas	E/E	e ^a /e ^a	e/e	E/e	e/e ^a
185 bp				—	—	—
275 bp				—	—	—
460 bp	—	—	—		—	—



9 paveikslas. **MC1R geno alelių įvairovė ir dydžiai, bp.** 1, 15 –pBR322 DNA/AluI Marker, 20 ; 4, 5– E/e genotipas; 7, 9, 12, 14 – e/e^a genotipas, 6, 8,10, 11, 13 – e/e genotipas



10 paveikslas. **MC1R geno, įtakojančio arklių kūno spalvos dangą, polimorfizmas.** 1,6 – pBR322 DNA/AluI Marker, 20; 2, 4 – PGR produktas, 3 – e/e^a genotipas; 5 – E/E genotipas

Genotipus E/E nuo e^a/e^a ir E/e nuo e/e^a galima atskirti derinant molekulinį genetinį tyrimų rezultatus su fenotipinių tyrimų rezultatais.

11 lentelė. **Genotipų pasiskirstymas MC1R lokuse, esant skirtingoms arklių spalvoms.**

Genotipas	Sarta spalva	Bėra spalva	Kerša spalva	Viso
E/E	0	1 (0,250)	0	1 (0,031)
E/e	0	3 (0,750)	1 (1,000)	4 (0,125)
e/e	11 (0,407)	0	0	11 (0,344)
e ^a /e ^a	0	0	0	0
e/e ^a	16 (0,593)	0	0	16 (0,500)

Viso	27 (0,844)	4 (0,125)	1 (0,031)	32
-------------	------------	-----------	-----------	----

Iš 32 tirtų arklių, 11 t.y 34,4 procentai tirtų arklių turėjo e/e genotipą, 4 E/e (12,5 %), 16 e/e^a (50 %) ir 1 E/E genotipus (3,1%) (11 lentelė). Visi arkliai, turėję e/e ir e/e^a genotipus buvo sartos spalvos įvairaus intensyvumo. Sartos spalvos (įvairaus intensyvumo) arkliai sudarė 84,4 % visų tirtų Lietuvos sunkiųjų arklių veislės arklių. Tik vienas, bėros spalvos arklys buvo homozigotinis su genotipu E/E, o visi kiti, ne kaštoninės spalvos gyvuliai buvo heterozigotiniai kaštoninę spalvą lemiančiam „e“ aleliui, t.y. bėri arba kerši.

12 lentelė. **Genotipų pasiskirstymas MC1R lokuse, esant skirtingam kaštanos spalvos intensyvumui**

Genotipas	Šviesiai sarta spalva	Sarta spalva	Tamsiai sarta spalva	Kaštana	Viso
e/e	1 (0,500)	7 (0,412)	3 (0,600)	0	11 (0,407)
e ^a /e ^a	0	0	0	0	0
e/e ^a	1 (0,500)	10 (0,588)	2 (0,400)	3 (1,000)	16 (0,593)
Viso	2 (0,074)	17 (0,630)	5 (0,185)	3 (0,111)	27

Tarp kaštoninės spalvos įvairaus intensyvumo t.y. šviesiai sartų, sartų, tamsiai sartų ir kaštanų arklių buvo rasti du skirtingi genotipai e/e ir e/e^a. Genotipą e/e turėjo 40,7 %, o e/e^a 59,3 % arklių. Nebuvo rasta individo, kuris būtų homozigotinis mutantiniui e^a aleliui (12 lentelė).

Nebuvo pastebėta jokio ryšio tarp rudos spalvos intensyvumo ir alelių polimorfizmo. Visose spalvos grupėse abu genotipai e/e ir e/e^a buvo pasiskirstę maždaug per pusę.

13 lentelė. **MC1R geno alelių dažniai tirtoje Lietuvos sunkiųjų arklių veislėje**

MC1R geno aleliai	Alelių dažniai	Gyvulių, turinčių alelį %
e	0,250	25,0
e ^a	0,656	65,6
E	0,094	9,4

Tirtoje Lietuvos sunkliųjų arklių grupėje labiausiai paplitęs buvo alelis e^a t.y 65,6 %, mažiau alelis e (25 %), ir mažiausiai alelis E (9,4 %). E alelis rastas tik nekaštoninės t.y bėros ir keršos spalvos arklių tape.

Ištirti tų pačių tėvų 2 palikuonys ir pastebėta, kad motina (Blindė 1501) buvo homozigotinė (e/e), tėvas (Aras 624) – heterozigotinis (e/e^a) e^a aleliui, o abi jų palikuonės (Beta 1179 ir Bitė 1026) – heterozigotinės (e/e^a) e^a aleliui (11 lentelė). Visoje tirtoje arklių grupėje buvo rasta 12 arklių homozigotinių tirtame MC1R geno lokuse kas sudarė 37,5 %, ir 20 arklių heterozigotinių, kas sudarė 62,5 %. Apskaičiavus esamą heterozigotiškumą h_o (0,588) ir numatomą h_e (0,490) buvo nustatytas heterozigotiškumo perteklius tiriamame lokuse, F_{is} (-0,2).

Iki šiol molekulinė genetika nedaug įtakojo spalvų veisime, bet galima tikėtis, kad ateityje suvaidins svarbų vaidmenį. Vienas svarbus tikslas molekuliniam kailio spalvos paveldimumo apibūdinime yra paprastų DNR testų pagalba veisėjams suteikti informaciją apie kailio spalvos genus. Dar daugiau, šie testai tai pat gali suteikti pagrindą pigmentacijos, susijusios su paveldimais sutrikimais, tyrimams. Norint DNR testų pagalba kontroliuoti tokius defektus ir pritaikyti gyvulių modelius atitinkantiems žmonių sutrikimams. Kitas molekulinės kailio spalvos genetikos impulsas yra mokslinė vertė randant genotipus tarp atskirų fenotipų, nes tai gali atskleisti ar padėti išsiaiškinti genų ir jų produktų funkcijas.

4 IŠVADOS

1. Fenotipiškai ištyrus 32 Lietuvos sunkiųjų veislės arklių kūno dangos spalvą buvo rasta sekanti jos įvairovė: šviesiai sarti, sarti, tamsiai sarti, kaštani, bėri, kerši. Įvairaus intensyvumo sartos spalvos arkliai sudarė 84,4 % visų tirtų Lietuvos sunkiųjų arklių veislės arklių.
2. Iš 32 tirtų arklių, 34,4 % tirtų arklių turėjo e/e genotipą, E/e – 12,5 %, e/e^a – 50 % ir 1 E/E genotipus – 3,1 %.
3. Tarp įvairaus intensyvumo kaštoninės spalvos t.y. šviesiai sartų, sartų, tamsiai sartų ir kaštanų arklių buvo rasti du skirtingi genotipai e/e ir e/e^a . Genotipą e/e turėjo 40,7 %, o e/e^a 59,3 % arklių.
4. Nebuvo pastebėta jokie ryšio tarp rudos spalvos intensyvumo ir alelių polimorfizmo. Visose sartos spalvos grupėse abu genotipai e/e ir e/e^a buvo pasiskirstę maždaug per pusę.
5. Tirtoje Lietuvos sunkiųjų arklių grupėje labiausia paplitęs buvo alelis e^a t.y 65,6 %, mažiau alelis e (25 %), ir mažiausiai alelis E (9,4 %). E alelis rastas tik nekaštoninės t.y bėros ir keršos spalvos arklių tape.
6. Rastas didesnis kiekis 62,5 % heterozigotinių gyvulių $MC1R$ genui, nei homozigotinių 37,5 %. Apskaičiavus esamą heterozigotiškumą h_o (0,588) ir numatomą h_e (0,490) buvo nustatytas heterozigotiškumo perteklius tiriamame lokuse F_{is} (-0,2).

PADĖKA

Dėkoju vadovui lek. dr. A. Kanapeckui bei konsultantei e. prof. p. dr. I. Miceikienei už metodinę pagalbą, j. m. darb. R. Indriulytei už pagalbą įsisavinant genetikos laboratorijoje molekulinės genetikos tyrimo metodus bei atliekant tyrimus, ūkininkui J. Bekampiui už galimybę paimti jo augintinių mėginius bei visiems geranoriškai padėjusiems, kad šis kūrinys išvystų pasaulį.

5 SUMMARY

Master Inga Butavičiūtė

Topic of Master thesis **Investigations of Investigations of genes responsible for coat color inheritance in horses genome**

Master's work

Tutor of M. Sc. thesis Lector A.Kanapeckas; Consultant Prof. Ilona Miceikiene

Lithuanian Veterinary Academy, Department of Animal Breeding and Genetics, K. Janušauskas Laboratory of Animal Genetics.

Master's work accomplished in the year 2005 – 2007, volume of Master work 52 page original, 13 tables and 10 pictures.

Object and tasks of work. 1. Analyse and summarize literature about horse coat colour and its genetic background. 2. Perform phenotypical analysis of Lithuanian Heavy Draught horse coat colour polymorphism. 3. Introduce horse MC1R gene research methodology at K. Janušauskas Laboratory of Animal Genetics, LVA. 4. Investigate MC1R gene polymorphism and distribution of different alleles at Lithuanian heavy draught by PCR-RFLP method. 5. Determine correlation between restriction fragment length polymorphism (RFLP) in MC1R gene and horse bay coat colour polymorphism.

Research methodology. 1. DNA extraction from hair roots. 2. PCR to amplify MC1R gene. 3. RFLP method-MC1R – enzyme Tag I. 3. Electrophoresis in agarose gel. 4. Staining with Etidium bromide. 5. Genotyping. 6. Statistical analysis of data.

Results and conclusions. The following DNA restriction fragments were obtained for the MC1R – Tag I polymorphism: PCR product - 460 bp; genotypes E/E; e^a/e^a – 460 bp; genotypes e/e – 275 bp; 185 bp; genotypes E/e; e/e^a – 460 bp; 275 bp; 185 bp. After phenotypical investigation of coat colour from 32 Lithuanian Heavy draught horses following variation have been found: light bay, bay, dark bay, roan and chesnut. Light bay horses with different intensity of coat colour comprised 84,4 %. From total investigated animals 34.4 % had e/e genotype, E/e – 12.5 %, e/e^a - 50 % and E/E genotype – 3.1 %. Two different genotypes e/e (40.7 %) and e/e^a (59.3) were found among bay colour horses. There was no correlation between bay colour intensity and allele polymorphism. The most frequent allele in Lithuanian Heavy Draught horse was e^a (65.6 %), less frequent allele e (25 %) and the least allele E (9.4 %). The allele E was found between the horses with not chesnut coat colour – bay or roan. 62.5 % of tested horses were heterozygotes for MC1R gene and 37.5 % homozygotes. Observed heterozygosity was h_o (0.588) and expected h_e (0.490) showing its excess.

6 LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Adelsteinsson Stefan Inheritance of the Palomino Color in Icelandic Horses. Jour Hered 65: (1974) 15-20,
2. Adelsteinsson Stefan Inheritance of Yellow Dun and Blue Dun in the Icelandic Toelter Horse. Jour Hered 69:1(1978), 46-148,
3. Andre C. Martin E., Cornu F., Hu W., Wang X. & Galibert F Genomic characterization of human c-kit gene: evolution of the receptor tyrosine kinase subclass III Oncogene 7(4), (1992) 685-691
4. Bowling AT&A. Ruvinsky "The genetics of the horse, (2000)" 53-77.
5. Bowling AT Equine linkage group II: phase conservation of *TO* with *Al^B* and *Gc^S*. Jour Hered 78: (1987) 248-250.
6. Bowling AT Dominant inheritance of overo spotting in Paint horses. Jour Hered 85: (1994) 222-224.
7. Brooks SA ,Terry RB, Bailey E (2002) A PCR-RFLP for KIT associated with tobiano spotting pattern in horses. Anim Genet 33(4), 301-303
8. Castle WE and King FL New Evidence on the Genetics of the Palomino Horse. Jour Hered 42: (1951) 61-64.
9. Duffield D.A.& Goldie P.L. Tobiano spotting pattern in horse: linkage of To with Al-A and linkage disequilibrium. Juornal of Heredity 89, (1998) 104-6.
10. Duttlinger R,Manova K, Chu TY, Gyssler C, Zelenetz AD,et al. W-sash affects positive and negative elements controlling c-kit expression; ectopic c-kit expression at sites of kit- ligand expression affects melanogenesis. Development 118(3), (1993) 705-717
11. Garipey CE, Cass DT, Yanagisawa M (1996) Null mutation of endothelin-B receptor gene in spitting lethal rats causes aganglionic megacolon and white coat color. Proc Natl Acad Sci USA 93, 867-872.
12. Geurts R Hair Colour in the Horse. (Canaan, NY:Sporting Book Center, Inc.) (1977).
13. Gower J Horse Color Explained. (North Pomfret, VT:Trafalgar Square Publishing) (1999)
14. Klemola V: The "Pied" and "Splashed White" Pattern in Horses and Ponies. Jour Hered 24:65-69, 1933.

15. Klungland H., Vage D.I., Gomez-Raya L., Adalsteinsson S., Lien S., (1995) The role of melanocyte- stimulating hormone (MSM) receptor in bovine coat color determination. *Mammalian Genome* 6, 636-639.
16. Kriegesmann B., Janses S., Bishop M., Brenig B., The equine MSH-R TaqI RFLP is not informative for hair colour in Arabian horses. *Anim. Genet* 27, 64. (1996)
17. Lu D., Willard D., Patel I. R., Kadwell S., Overton L., Kost T., Luther M., Chen W., Woychik R P., Wilkison W O., Cone R.D., (1994) Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371, 799-802
18. Mariat D, Taourit S, Guerin G (2003) A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genet Sel Evol* 35(1), (2003) 119-133
19. Marklund S, *Applied Molecular Genetics in Domestic Animals with Particular Focus on the Horse*, doctoral thesis, Swedish University of Agricultural sciences, Uppsala. (1997)
20. Marklund L. et al. *Maam Genome* 7, (1996) 895-9
21. Marklund S, Moller M, Sandberg K, Andersson L Close association between sequence polymorphism in the KIT gene and yhe roan coat color in horses. *Mamm Genome* 10(3), (1999) 283-288
22. Marklund S, Moller M, Sandberg K, Andersson L A missense mutation in the gene for melanocyte- stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horse. *Mamm Genoma* 7, (1996), 895-899.
23. Mau C, Poncet A, Bucher B, Stranzinger G, Rieder S, Genetic mapping of dominant white (W), a homozygous lethal condition in the horse. (*Equus caballus*). *J. Anim Breed Genet* 121(6), ,(2004) 374-383.
24. Miceikienė I., Kanapeckas A., Krasnopiorova N., Baltrėnaitė L., *Arklių veisimas ir genetika*, Kaunas, 2005, 24-25.
25. Pulos WL and Hutt FB Lethal Dominant White in Horses. *Jour Hered* 60, (1969) 59-63,
26. Rana BK, Hewett-Emment D, Jin L, Chang BHJ, Sambuughin N et al. (1999) High polymorphism at the human melanocortinI receptor locus. *Genetics* 151, 1547-1557.
27. . Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B., Guerin G., – mutations in the agouti (ASIP), the Extension (MC1R), and the brown (TYRP1) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome* 12, (2001) 450-455.
28. Rieder S, Stricker Ch, Joerg H, Dummer R, Stranzinger G, A comparative genetic approach for the investigation of grey horse melanoma. *J Anim Breed Genet* 117, 7, (2000) 3-82.

29. Robbins LS, Nadeau JH, Johnson KR, Kelly MA, Roselli-Rehfuss L et al.(1993) Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell* 72, 827-834.
30. Salisbury FW: The Inheritance of Equine Coat Color: The Basic Colors and Patterns. *Jour Hered* 32:235-240, 1941.
31. Santschi EM, Purdy AK, Valberg SJ, Vrotsos PD, Kaese H, et al, 1998 Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mammalian Genome* 9(4), 306-309.
32. Siracusa LD The agouti gene: turne on to yellow, 1994 *Trends Genet.* 10, 423-428.
33. Sponenberg DP, Weise MC Dominant black in horse, 1997 *Genet. Sel Evol* 29, 403-408.
34. Sponenberg DP *Equine Color Genetics.*, 2003, 2 nd ed. (Ames IA: Iowa State University Press).
35. Sponenberg DP and Beaver BV, *Horse Color.* Texas A&M University Press. College Station, 1983
36. Spritz R.&Hearing V. Genetic disorders of pigmentation. *Advances in Human Genetics* 22, 1994, 1-45.
37. Sturtevant AH: On the Inheritance of Color in the American Harness Horse. *Biol Bull* 19-204-216, 1910.
38. Trommershausen-Smith A: Linkage of Tobiano Coat Spotting and Albumin Markers in a Pony Family. *Jour Hered* 69:214-216, 1978.
39. Trommershausen-Smith A, Suzuki Y and Stormont C: Use of Blood Typing to Confirm Principles of Coat Color Genetics in Horses. *Jour Hered* 67:6-10, 1976.
40. Van Vleck LD and Davitt M: Confirmation of a Gene for Dominant Dilution of Horse Colors. *Jour Hered* 68:280-282, 1977.
41. Valstybinė gyvulių veislininkystės priežiūros tarnyba prie ŽŪM, Valstybės įmonė žemės ūkio informacijos ir kaimo verslo centras 2005 m.“ Lietuvoje veisiami arkliai ir jų įvertinimai“ I tomas, Vilnius, 2005m.
42. Valverde P., Healy E., Jackson I., Rees J,L., Thody A.J., Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genet.* 11, (1995) 328-330.
43. Wagner H-J, M. Reissmann., – New polymorphism detected in the horse MC1R gene. *Animal Genetics*31, (2000) 280-291.

Interneto medžiaga:

44. Ann T. Bowling, Coat color genetics, Veterinary Genetics Laboratory, School of Veterinary Medicine, University of California, 1980. Prieiga per internetą 2007 vasario 5d: <http://www.vgl.ucdavis.edu/~lvmillon/coats.html>
45. Rasa Bražaitė, Žirgo plauko spalva, 2006. Prieiga per internetą 2007 vasario 5d: <http://www.arkliomuziejus.lt>
46. Audrius Laskauskas, Arklio evoliucija, 2006. Prieiga per internetą 2007 vasario 5d: <http://www.arkliomuziejus.lt>
47. Equine Coat Colors, Color in Horses. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.: <http://hometown.aol.com/battyatty/index.htm#dilutions>
48. Nancy Kerson, Horse Colors, Color Genes and Color Patterns. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d. http://www.mustangs4us.com/colors_and_color_patterns.htm
49. Phillip Sponenberg, Horse color genetics. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.: <http://members.aol.com/MFTHorses/sponenbg.htm>
50. Žirgai, arklių spalvos. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.: <http://www.blogas.lt/Viskasapiezirus/86599/arkliu-spalvos.html>
51. Šveistienė R, LVA Gyvulininkystės institutas, Lietuvos sunkieji. Prieiga per internetą vasario 6 d.: <http://www.horses.lt/lsavaa/about.html>
52. L.Baltrėnaitė, E.Jeninas, V.Juškienė, J.Kriauzienė, A.Kučinskas V.Macijauskienė, I.Miceikienė, A.Muzikevičius, V.Razmaitė, A.Svitojus R.Šveistienė, B.Zapasnikienė, Lietuvos Lietuvos žemės ūkio gyvūnų genetiniai ištekliai – dabartis ir perspektyvos, Lietuvos veterinarijos akademija, Kaunas, 2003. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.: http://www.zum.lt/agroweb/Tekstai/FAO_ataskaita.pdf
53. Genetics Home Reference, Genes, MC1R. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.: <http://ghr.nlm.nih.gov/name>
54. Australian Equine Genetics Research Centre, The University of Queensland, Australia, Chestnut Coat Colour. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.: <http://www.aegrc.uq.edu.au/index.html?page=30054>
55. Glynis Scott, Chestnut horses, The horse genetics web site. Prieiga per internetą 2007 vasario 6 d.: <http://www.horse-genetics.com/chestnut-horses.html>

7 PRIEDAI

1 Priedas. Duomenys apie tirtus gyvulius

Gyvulio vardas	Motinos vardas	Tėvo vardas	Spalva	Genotipas
Sabalas 604	Sultė 943	Agregatas 445	Tamsiai sarta	e/e ^a
Dukatas 657	Diena 826	Veliūras 609	Tamsiai sarta	e/e
Snobas 690	Snaigė 1120	Papartis 600	Sarta	e/e ^a
Aras 624	Audra 1322	Žiogas 548	Sarta	e/e ^a
Karaliukas Rg 1264	Kriaušė 1645	Žolynas 642	Sarta	e/e ^a
Fūlas	Rūta 1604	Flatentas ŠVAGR2	Bėra	E/E
Bekilmis	xxx	xxx	Kerša	e/e ^a
Braškė Rg 734	Bižuterija 1005	Žygūnas 612	Bėra	E/e
Kriaušė 1645	Ksena 1054	Papartis 600	Bėra	E/e
Dangė 1628	Dora 990	Bananas 650	Šviesiai sarta	e/e ^a
Akacija 1626	Audra 1322	Granitas 651	Sarta	e/e
Sigulda 1476	Samara 1112	Žygūnas 612	Bėra	E/e
Blindė 1501	Brasta 1015	Žiogas 584	Šviesiai sarta	e/e
Gitara Rg 944	Gulbė 1474	Bosas 683	Sarta	e/e
Garantija Rg 1039	Gulbė 1474	Sabalas 604	Sarta	e/e
Achema Rg 1103	Ameba 1473	Sabalas 604	Sarta	e/e ^a
Ameba Rg 1473	Audra 990	Lynas 681	Sarta	e/e ^a
Gulbė 1474	Gildija 1022	Žiogas Rg 135	Sarta	e/e
Vata 1597	Vokė 962	Žaizdras 691	Tamsiai sarta	e/e ^a
Venta 1596	Vimba 1615	Drakonas 594	Sarta	e/e ^a
Morka 1242	Migla 896	Beržas 466	Sarta	e/e
Beta Rg 1179	Blindė 1501	Aras 624	Sarta	e/e ^a
Bitė Rg 1026	Blindė 1501	Aras 624	Sarta	e/e ^a
Vėgėlė 1278	Vasara 1130	Sniegė 607	Sarta	e/e
Audėja 1535	Audra 990	Lyderis 503	Sarta	e/e ^a
Gaura 1616	Guma 1598	Papartis 600	Kaštana	e/e ^a
Baidarė 1609	Brydė 809	Žgutas 434	Kaštanas	e/e ^a
Dora	Diena 826	Lapas 489	Sarta	e/e
Bazė Rg 1104	Brasta 1015	Sabalas 604	Sarta	e/e ^a
Vynas	Baidarė 1609	Dukatas	Kaštanas	e/e ^a
Varža	Vimba 1615	xxx	Tamsiai sarta	e/e
Karmen	Kaštanė IC 07732	Saturnas	Tamsiai sarta	e/e

2 Priedas. Įranga, instrumentai ir reagentai

Elektroforezės aparatai

Elektroforezės maitinimo šaltinis ES 135
Midicell® Primo gelio sistema

E-C Aparatų įmonė, JAV
E-C Aparatų įmonė, JAV

DNR termocikleriai

GeneAmp® PGR sistema 2700

AB Applied Biosystems

Centrifugos

Nanofuga
Mikro-Kentaura Centrifuga
Centrifuga D 5445

JAV
SANYO, Jungtinė Karalystė
Ependorfas AG, Vokietija

Maišytuvai

Minikratytuvas MS1

IKA, JAV

Kita įranga

II RNR/DNR koncentracijos matuoklis
Mini –Transiluminatorius 2000
Sartorius Basic^{plus}
pH mV Meter (pH 5380)
Termostatas
Šaldytuvas Snaigė C 290
Mikrobangų krosnelė R 234

Farmacijos Biotech, Švedija
BIO RAD, JAV
Sartorius AG, Vokietija
Werkstaetten GmbH, Vokietija
WTB BINDER, Vokietija
“Snaigė“, Lietuva
Sarp elektronika

Buferiai

0,15 M KCl :

KCl 11,8g
H₂O iki 1 litro

6 M NaCl:

NaCl 350, 658g
Sterilizuoti autoclave.

0,5M EDTA (pH 8,0)

Na₂ EDTAx2 H₂O 186,1g
H₂O iki 700 ml

50x TAE (Tri-acetato buferis)

Ledine acto rūgštis 57,1ml
Trisas 242,0g

Suderinti pH iki 8,0 su 10M NaOH (ca 50ml)	0,5 M EDTA (Ph)	100ml
H ₂ O iki 1 litro	Sterilizuoti autoklave.	

Sterilizuoti autoklave.

Chelex

Chelex 05g

H₂O 10 ml

10 mg/ml Etidžio Bromidas

Etidžio Bromidas 0,2g

H₂O iki 20 ml

Gerai išmaišyti ir laikyti 4°

Loading Dye

Formamidas 10mM

Bromfenolio mėlio dažas 0.25%

Ksilolo cidas 0.25

