

ALLELE FREQUENCY OF KIT GENE ASSOCIATED WITH TOBIANO SPOTTING PATTERN IN PAINT HORSE BREED

FREKVENCE ALEL GENU KIT ASOCIOVANÉHO SE STRAKATOSTÍ TOBIANO U KONÍ PLEMENE PAINT HORSE

Chalupová P., Déduchová V., Knoll A.

Ústav morfologie, fyziologie a genetiky zvířat, Agronomická fakulta, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika.

E-mail: xchalup1@node.mendelu.cz, caraya@seznam.cz, knoll@mendelu.cz

ABSTRACT

The aim of this work was to determine allele frequency of gen, associated with tobiano spotting pattern in Paint Horse breed. Four main kinds of spotting are distinguished: tobiano, frame overo, sabino and splashed white. Tobiano spotting pattern is characterized by white patches that cross the dorsal midline and include legs. Depigmented areas descend vertically. Face markings are the same as on normal horses. Allele KM1 of protooncogene c-kit (KIT) with MspI restriction site is associated with tobiano spotting pattern. Fifty Paint Horses were tested for genotype of KIT gene, by PCR-RFLP. From 37 tobiano (or tovero) horses were 5 homozygous KM1 KM1, 32 heterozygous KM1 KM0. Thirteen non-tobiano horses (solid or other spotting pattern) were homozygous KM0 KM0. Allele frequency of KM1 in Paint Horse breed is 0,42.

Key words: horse, coat colour, tobiano, PCR-RFLP, allele frequency

ÚVOD

Vzor strakatosti tobiano u koní je jedním ze základních vzorů požadovaných pro registraci plemene Paint Horse u American Paint Horse Association (APHA) a často se také objevuje u dalších plemen, včetně pony a chladnokrevníků. Rozeznáváme čtyři základní vzory strakatosti: frame overo, sabino, splashed white a tobiano. Za strakatost tobiano je zodpovědný autozomálně dominantní gen – jedinci mají genotyp *ToTo* nebo *Toto*. Tobiano je charakterizováno bílými skvrnami různého rozsahu, které vytěšňují pigment ze srsti. Bílé skvrny jsou velké, okrouhlé, s jasně ohraničenými okraji, vertikálního směru, přecházející přes hřbet. Typické jsou vysoké bílé odznaky na končetinách. Hlava zůstává pigmentovaná, odznaky se objevují jako u ostatních koní. Minimálně exprimovaný vzor se může projevit pouze odznaky na končetinách či malým množstvím bílé barvy na kohoutku a hřbetě. Při maximálním vyjádření jsou depigmentované oblasti velmi rozsáhlé, což může být zapříčiněno i spolupůsobením jiných genů pro strakatost. Posledními oblastmi, ze kterých je pigment vytěšňován, je krajina slabin a hlava. Kůň může nést několik genů pro strakatost, což znesnadňuje identifikaci dle fenotypu.

Gen *To* tvoří vazbovou skupinu (LG II) s geny pro albumin (*AL*) a pro vazebné proteiny pro vit. D (*GC*). Se vzorem tobiano jsou asociovány alely *AL-B* a *GC-S*. Nejméně 90 % tobiano koní má *AL-B* a *GC-S* alely. (Bowling, 1996).

Porovnáváním DNA sekvencí jednobarevných koní a koní homozygotních pro gen tobiano (*To*) byl nalezen v intronu 13 protoonkogenu *c-kit* (*KIT*) polymorfismus *MspI* (substituce C/G). Alela s restrikčním místem asociována se vzorem tobiano byla nazvána *KMI*, alela bez restrikčního místa *KM0*. Všechny 129 koní tobiano neslo alelu *KMI*, nicméně 3 ze 104 testovaných jednobarevných koní rovněž nesli alelu *KMI*. Přestože alela *KMI* je silně vázaná s genem *To*, asociace není absolutní. Nicméně, tento test se jeví mnohem účinnější pro identifikaci homozygotů *ToTo* než současný biochemický test používající *AL* a *GC* haplotypu (Brooks *et al.*, 2002).

Cílem této práce bylo ověřit a optimalizovat metodiku dle Brooks *et al.* (2002) na zkoumaném souboru vybraných koní plemene Paint Horse chovaných v České republice, stanovit jejich genotypy a vypočítat alelové a genotypové frekvence.

MATERIÁL A METODIKA

Bylo testováno 50 koní plemene Paint Horse. DNA byla izolována z chlupových cibulek pomocí JETQUICK® Blood&Cell culture DNA Spin Kit.

PCR byla optimalizována pro termální cykly PTC 200 (MJ Research).

Použité primery:

KIT-II 3-11F 5'-ACCCGCTTGCATTTTATCACCTGTCG-3',

KIT-II 3-1235R 5'-CGAGCATATAGGAAAAGGGTAGAAAGAGGTGAG.3'

Reakční směs o celkovém objemu 25 µl obsahovala: 11,55 µl H₂O; 2,5 µl LA PCR buffer compl.; 0,5 µl dNTP mixu; 0,125 µl primeru KIT-II 3-11F; 0,125 µl primeru KIT-II 3-1235R; 0,2 µl LA DNA polymerázy; 8 µl H₂O a 2 µl templátové DNA.

Teplotní profil PCR reakce: Úvodní denaturace 95 °C/2 min; 35 cyklů (denaturace 95 °C/20 s, annealing 65 °C/30 s, elongace 68 °C/70 s); závěrečná elongace 68 °C/10 min.

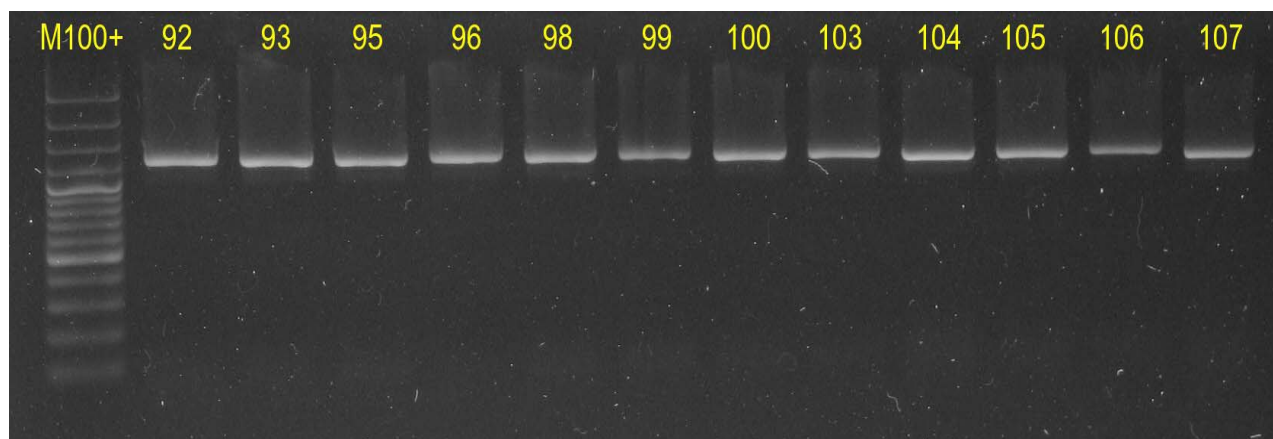
Následně proběhlo štěpení PCR produktu restriční endonukleázou *Msp*I. Štěpené fragmenty byly elektroforeticky separovány na 2% agarózovém gelu. Vizualizace pomocí ethidium bromidu za použití UV světla.

VÝSLEDKY A DISKUZE

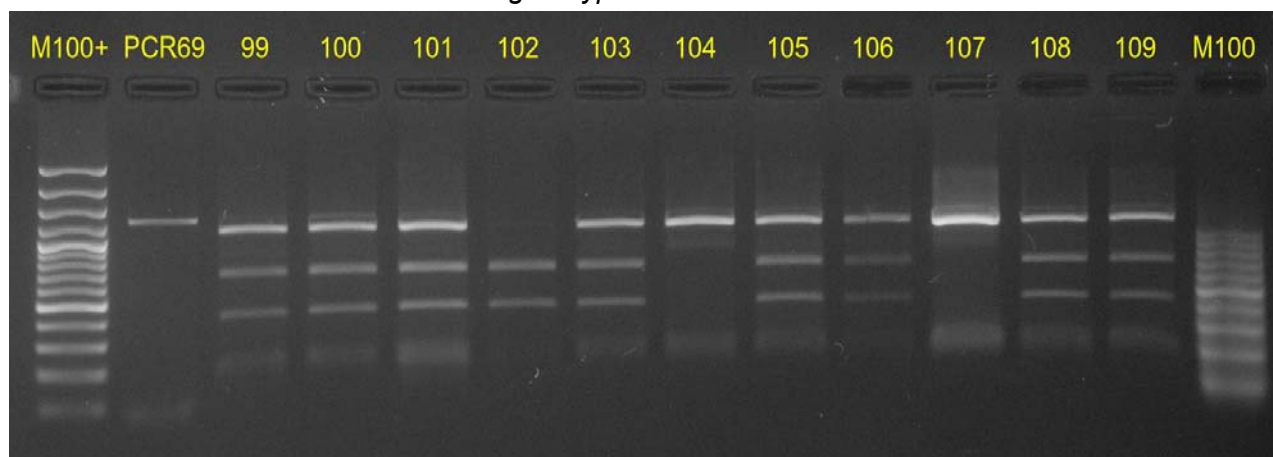
Bylo testováno 50 koní plemene Paint Horse na přítomnost alely *KMI*. Fenotyp jedinců byl potvrzen fotografickou dokumentací. U všech koní vykazujících fenotyp tobiano (případně tovero – tj. kombinace vzoru tobiano a overo) byla alela *KMI* nalezena. Žádný jednobarevný kůň *KMI* alelu nenesl. Frekvence alel a genotypů viz Tab. 1 a Tab. 2.

U homozygotů *KM0 KM0* se PCR produkt štěpí na fragmenty velikosti 189 a 1060 bp.
Heterozygoti *KMI KM0* tvoří fragmenty 189, 397, 663 a 1060 bp.
Homozygoti *KMI KMI* – 189, 397 a 663 bp.

Obr. 1 Ověření kvality PCR produktů



Obr. 2 PCR-RFLP – stanovení genotypů



KM0 KM0 – vzorky č. 104 a 107

KM1 KM0 – vzorky č. 99, 100, 101, 103, 105, 106, 108, 109

KM1 KM1 – vzorek č. 102

Tab. 1 Frekvence genotypů

Genotyp	četnost absolutní	četnost relativní
<i>KM1 KM1</i>	5	0,1
<i>KM1 KM0</i>	32	0,64
<i>KM0 KM0</i>	13	0,26
Σ	50	1

Tab. 2 Frekvence alel

Alela	četnost absolutní	četnost relativní
<i>KM1</i>	42	0,42
<i>KM0</i>	58	0,58
Σ	100	1

ZÁVĚR

Všichni jedinci, u nichž byla nalezena alela *KM1*, vykazovali fenotyp tobiano, případně tovero – celkem 37 koní. 13 koní neslo pouze alely *KM0*. Vykazovali buď jiný vzor strakatosti, nebo byli jednobarevní (i tyto jedince lze registrovat mezi plemeno Paint Horse). 10 % koní mělo genotyp *KM1 KM1*, 64 % *KM1 KM0* a 26 % *KM0 KM0*. Frekvence alely *KM1* zkoumaného souboru je 0,42. Test se jeví slibně pro stanovení homozygotnosti koní tobiano, avšak pro vyšší průkaznost by bylo třeba rozšířit soubor testovaných jedinců. Výzkum stále pokračuje.

LITERATURA

Brooks S. A., Terry R.B., Bailey E. (2002): A PCR-RFLP for KIT associated with tobiano spotting pattern in horses. *Animal Genetics*, 33: 301-303.

Bowling A. (1996): *Horse Genetics*. Cambridge: CABI Publishing, 224p. ISBN 0851991017. Chapter 5, Tobiano: 43-58.

Gower J. (2000): *Horse Color Explained, A breeder's Perspective*. The Crowood Press, 144p. ISBN 1-86126-384-8. Part 14, Tobiano: 66-70.

Sponenberg D. P. (2003): *Equine Color Genetics*. 2nd ed. Ames: Iowa State University Press, 215p. ISBN 0-8138-0759-X. Chapter 5, Patterns Characterized by Patches of White: 71-89.