

TALLINNA PRANTSUSE LÜTSEUM

HANA GEARA

12. KLASS

HÕBEGEENI PÄRANDUMINE EESTI TÕUGU HOBUSE GENOFONDIS JA AVALDUMINE FENOTÜÜBIS HÕBEMUST

KOOLIPOOLNE JUHENDAJA SIRJE TEKKO

VÄLISJUHENDAJAD GRETE NUMMERT, MARIA LIIVRAND, PRIIDU TIKK

SISSEJUHATUS

Eesti hobune (eesti maahobune) on islandi hobuse ja šetlandi poni kõrval üks värvikirevamaid hobusetõuge maailmas. Eesti tõugu hobuse hõbemustad isendid eristuvad teistest värvustest fenotüübilise mustja keha ja valkjate jõhvide poolest.

Hobuse värvuste uurimisega tegeleb värvusgeneetika, mille eesmärk on suures osas inimesele meelepärase värvusega isendite saamine. Värvusgeneetika on aidanud leida kinnitust osade värvuste ja nendega kaasnevate anomaaliate vahel. Nii on tõestatud ka hõbemusta värvuse seotus silmavaeguste ja nägemispuuetega. Piisavate teadmistega värvusgeneetikast on võimalik ära hoida paljusid tõenäolisi haigusjuhtumeid.

Siinse uurimuse eesmärk on hõbemusta värvuse ühe põhjustaja, hõbe lookuse PMEL17, punktmutatsiooni teoreetiliselt tuletatud esinemise ja sügootsuse kontrollimine katseliselt hõbemustal eesti hobusel Muuksi Tuulel (edaspidi ka Tuul) ja tema kolmel lähisugulasel. Nende andmete põhjal otsitakse seoseid hõbemutatsiooni pärandumises ja püstitatakse hüpotees kumba sugupuu liini pidi on mutatsioon Tuuleni pärandunud. Eestis hobuse värvuse geneetilise ekspertiisi teenust ei pakuta, vajadusel on võimalus saata karvaprovv välismaale, kuid seda tehakse harva. Seega on teine eesmärk geneetilise ekspertiisi tegemine Eesti tingimustes Tallinna Loomaaia liigikaitse laboris.

Uurimistöös otsitakse vastuseid järgmistele küsimustele:

- Miks on hõbemust Tuul just seda värvi, nagu ta on?
- Kas fenotüübiliselt määratud hõbemust värvus vastab katseliselt kontrollitavale genotübile?

- Millist Tuule sugupuu liini pidi on temani jõudnud hõbemusta värvuse üheks põhjustajaks olev PMEL17 lookuse punktmutatsioon?

Lisaks eelnevalt mainitud põhiküsimustele otsitakse vastust eesti hobuse värvikirevuse põhjustele ja hõbemutatsiooni päritolule eesti hobuse genofondis.

Siinne uurimus koosneb neljast osast. Esimeses osas antakse ülevaade teemakohastest uurimustest ja kirjandusest. Teises osas kirjeldatakse proovide kogumise ja geneetilise testi tegemise käiku. Kolmandas osas esitatakse sugupuu uurimisel tehtud teoreetilised oletused ja katse käigus saadud tulemused. Neljandas osas võrreldakse katselisi tulemusi sugupuu alusel tehtud oletustega vaatlusaluste hobuste genotüüpide kohta hõbedast värvust põhjustava geeni alleeli seisukohast.

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	1
LÜHENDID	5
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	6
1.1. Hobuse värvuse tähtsus	6
1.2. Eesti hobuse värvus	9
1.3. Hobuse värvuse kujunemise põhjused.....	10
1.3.1. Geneetika põhitõed.....	10
1.3.2. Hobuse värvuse kujunemise geneetilised tegurid	11
1.3.3. Hobuse hõbegeen PMEL17	13
1.4. Hõbemust värvus hobusel	15
1.5. Hõbemusta värvusega kaasnev silmahaigus (MCOA)	16
1.6. Sugupuude uurimine.....	17
2. MATERJALID JA MEETODID	20
2.1. Proovide kogumine	20
2.2. DNA eraldamine	21
2.3. Töös kasutatud praimerid	21
2.4. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR).....	21
2.5. Sekveneerimine ja tulemuste hindamine.....	22
2.6. Sugupuude uurimine ja piltide töötlemine	22
3. TULEMUSED	23
3.1. Vaatlusaluste hobuste sugupuu analüüs.....	23
3.2. DNA amplifitseerimine hobuse karvaproovidest.....	25
3.3. Hõbedast fenotüüpi põhjustava missense mutatsiooni esinemine vaatlusaluste hobuste genotüübis.....	25
4. ARUTELU	29
4.1. Eesti hobuse värvikirevuse tagamaad.....	29
4.2. Sugupuu uuringu ja katseliste tulemuste kokkulangevus	29
4.3. Teadlikkus hõbemustast värvusest	29

4.4. Segadus värvusnimetustega.....	30
KOKKUVÕTE	32
SUMMARY	35
RÉSUMÉ	36
VIITED.....	37
LISA 1. Eesti Hobuse Kaitse Ühingu 2011. aasta eesti hobuse värvuste plakat.....	40
LISA 2. 1) Muuksi Tuul ja 2) Reia valkjäs-pruunikas varsakarvas	44
LISA 3. Muuksi Tuule hõbegeeni põhjustatud heledad mustrid jalgadel ja kõhu alaosal	45

LÜHENDID

µl - mikroliiter

ASIP - *agouti signalling protein*, aguuti signaliseeriv valk

bp - *basepair*, aluspaar

eKr - enne Kristuse sündi

pKr - pärast Kristuse sündi

FAO - *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, Ühinenud Rahvaste Toidu ja Põllumajanduse Organisatsioon

MCOA - *Equine Multiple Congenital Ocular Anomalies syndrome*, hobuslaste sünnipärane multisümptomaalse silma anomaalia sündroom

MC1R - *melanocortin 1 receptor*, melanokortiin 1 retseptor

MSH - *melanocyte- stimulating hormone*, melanotsüüti stimuleeriv hormoon

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*, Riiklik Biotehnoloogia Informatsiooni Keskus

PCR- *polymerase chain reaction*, polümeraasi ahelreaktsioon

PMEL17 - *pre-melanosomal protein 17*, premelanosomaalne valk 17

PRIA - Põllumajanduse Registrite ja Informatsiooni Amet

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1. Hobuse värvuse tähtsus

Hobuse juures hakkavad esimesena silma kuju ja värvus, mis on tema identiteedi tunnused ja esmamulje loojad. Karva ja naha pigemendil on oluline roll kaitsevärвина, kaitsena päikesekiirguse eest, sotsiaalses suhtluses, seksuaalses valikus ja kontakti loomises inimesega (Brunberg *et al.*, 2006). Metshobune (*Equus ferus*)¹ poleks värvikirevana ellu jäänud värvuse kaitsefunktsiooni tõttu, kuid kodustamise käigus inimese kõrval elades hakkas värvide mitmekesisus suurenema; silmapaistvamat värvi ja valgete märgistega isendid, kes oleks loodusliku valiku tõttu välja praagitud, said võimaluse paljuneda (Randlaht, 2015).

Värvusel on veel üks praktiline tähtsus hobuste elus. Nimelt on heledakarvalised hobused eelisseisus tumedakarvaliste ees vereimejate kärbest (kahetiivalised, parmlased (Id *Tabanidae*)) suhtes. Bioloog Terje Raudseppa (Raudsepp, 2011, lk 11) järgi on põhjus selles, et „kärbsed leiavad oma ohvri polariseeritud valguse peegelduse järgi karvadelt ning mustad - pruunid karvad annavad kärbestele tugevama „signaali““. Seevastu on heledatel ja vähese nahapigmentiga hobustel suurem tõenäosus saada päikese ultraviolettkiirgusest põhjustatud nahakahjustusi. Päikesepõletus võib esineda ka tumedatel hobustel valgete märgiste piirkonnas. Päikesepõletus avaldub hobusel punetava, paistetava, kooruva ja valuliku nahana nagu inimeselgi. (Kentucky Equine Research, 2011)

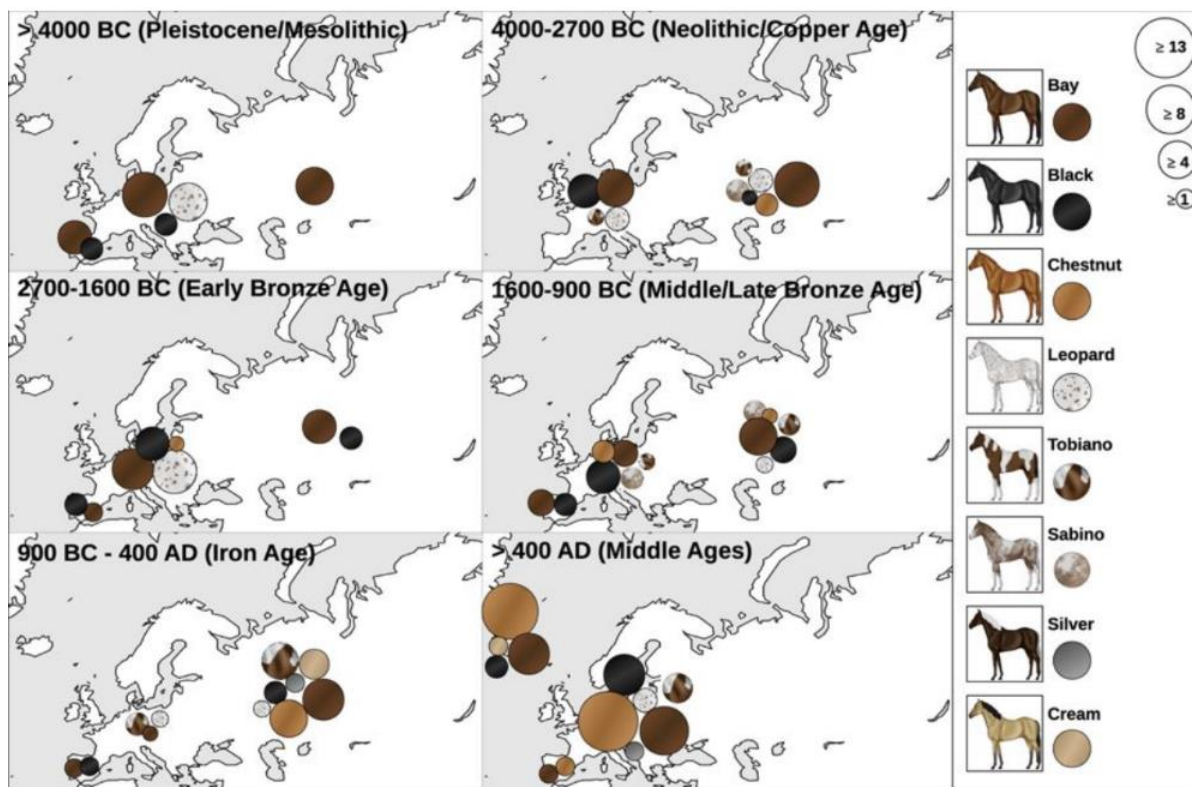
Märkimisväärselt seostuvad eri värvustega ka kindlad haigused. Nii esinevad hallidel hobustel sageli nahakasvajad melanoomid, appaloosa täpilise mustriga võivad kaasneda kanapimedus ja krooniline uveiit (silmapõletik), hõbemustadel on aga täheldatud erinevad silmahaigused (võrkkesta irdumine, tsüstid, kae). (Raudsepp, 2011) Hõbemusta värvusega seotud haigustest tuleb põhjalikumalt juttu allpool (ptk 1.5.).

Hobuse värvus on alati olnud inimese jaoks sümboolselt tähenduslik. Eelistused hobuse värvuse suhtes on palju muutunud läbi aja ja kultuuride. Hobuse kodustamisest (3500 eKr) Rooma impeeriumi languseni (476 pKr) olid levinud kirjud ja lahjendatud põhivärvustega hobused. Vase- (2700–900 eKr) ja rauaajal (900 eKr–400 pKr) kasvas hobuste värvuste arv algsest kuuest värvusest üheksani, mis kinnitab inimese huvi uute värvuste vastu.

Keskajal olid aga domineerivad puhtad põhivärvused, eriti raudjas värvus (vt joonis 1, joonis 2). Võimalik, et kristlusega seonduv religioosne sümbolism oli mõjutajaks keskaegsete värvuseelistuste kujunemisel. Uue Testamendi viimases osas, Johannese ilmutusraamatus, kirjeldatakse nelja ratsanikku neljal eri värvi hobusel: Võit valgel või valgekirjul hobusel, Nälg mustal, Surm kõrvil ja Sõda raudjal hobusel. Ühtlase tooni, eeskätt raudja värvuse eelistamisel

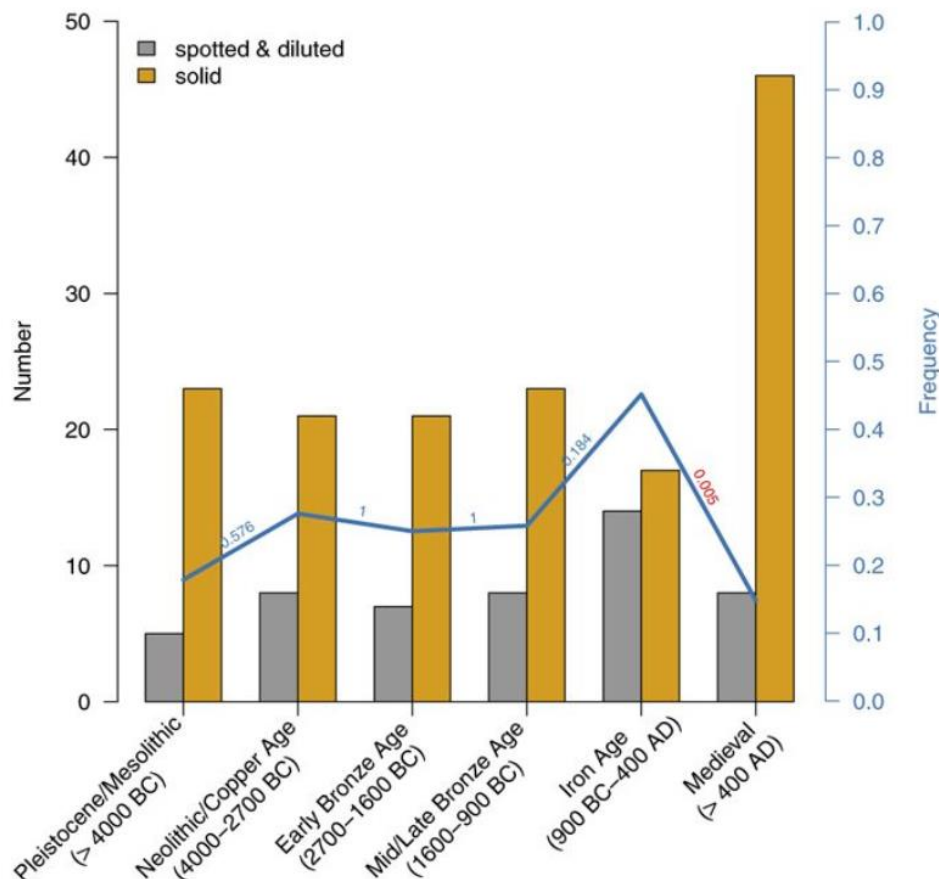
¹ Metshobune (*Equus ferus*) on liik kabjalisi hobuse perekonnast. Eestis elas metshobune kiviajal. Metshobuse alamliikide seas on koduhobune (*Equus ferus caballus*), väljasuremisohus Prževalski hobune (*Equus ferus przewalski*) ja väljasurnud tarpan (*Equus ferus ferus*). (Wilson & Reeder, 1982)

võis olla ka praktiline tähtsus: kuna kahel raudjal vanemal sünnib alati raudjas varss, oli selliseid hobuseid kerge aretada. Lisaks ühtlustus nii sõjaväe välimus ning tagasihoidlikult pruunikas hobune paistis vähem silma (Wutke *et al.*, 2016).



Joonis 1. Kaheksa fenotüübilise hobuse värvuse geograafiline ja kronoloogiline levik kuuel eri ajastul. Kaardil kujutatud ajastud: > 4000 eKr (pleistotseen/mesoliitikum), 4000–2700 eKr (neoliitikum/vaseaeg), 2700–1600 eKr (varane pronksiaeg), 1600–900 eKr (keskmise/hiline pronksiaeg), 900 eKr–400 pKr (rauaaeg), > 400 pKr (keskaeg). Hobuse värvused legendil paremal, ülevalt alla: kõrb, must, raudjas, leopard-täpiline, tobiano-valgel taustal tumedad laigud, sabino-valged jalad ja hallikad laigud punakal-pruunil taustal, hõbeda varjundid, kreemikas. (Wutke *et al.*, 2016)

Joonisel 2 on näha kirjute ja põhivärvi (raudjas, kõrb, must) hobuste esinemissagedusi eri ajastutel. 4400 aasta jooksul püsisid eelistatud värvused võrdlemisi muutusteta. Keskajast alates on näha suurt üldist tõusu hobuste arvus, keda kasutati tõenäoliselt põhiliselt sõjategevuseks, kusjuures põhivärvi hobuste osakaal on märkimisväärselt suurem kirjute hobuste osakaalust.



Joonis 2. Kirjute/lahjendatud (ingl *spotted/diluted*) ja põhivärvustega (ingl *solid*) hobuste esinemissagedus (parempoolsel teljel) eri ajastutel. Graafikul kujutatud ajastud: > 4000 eKr (pleistotseen/mesoliitikum), 4000–2700 eKr (neoliitikum/vaseaeg), 2700–1600 eKr (varane pronksiaeg), 1600–900 eKr (keskmise/hiline pronksiaeg), 900 eKr–400 pKr (rauaaeg), > 400 pKr (keskaeg) (Wutke *et al.*, 2016).

Paljude maade müütides figureerivad hobused. Suur osakaal on nn valgetel hobustel², keda on seostatud päikese, viljakuse ja puhtusega. Vana-Kreeka tiivuline Pegasus on hea näide müütides sageli esinevast valgekarvalisest hobusest (Battaglia, 2006). Keskajal oli valge ükssarvik³ armastuse, puhtuse ja truuduse sümbol, kellel oli eriline side neitsitega, kes ainukesena suutsid seda maagilist olendit taltsutada (Harris & Swinney, 2010, lk 31). Ka kuningas Arturi lugudes esinev kõigist rüütlitest vooruslikum Sir Galahad ratsutas valgekarvalisel hobusel (Parker & Stanton, 2009, lk 278).

² Enamik valgeteks peetavatest hobustest on geneetiliselt hallid, valge hobune on küllaltki haruldane nähtus ja võib olla mitme erineva geeni koostoime tulemus, valgel hobusel on roosa nahk (hallil hobusel on nahk must), valge karv ja sinised või tumedad silmad. Segadust võivad tekitada ka roosa nahaga, sinisilmne, kuid kuldse läikega karvaga kremello (ingl *cremello*) ja laiguline pinto (ingl *sabino*), kellel valged laigud on nii suureulatuslikud, et mõjuvad puhta valgena. (Wellman, 2014)

³ Piiblis kirjeldatud ükssarvik ei ole tegelikult sarvega hobune nagu enamasti arvatakse, vaid lõvisabaga ja habemega kitse ja hobuse vahepealne olend. Ükssarvikud on piltidel kujutatud enamasti korrektselt valgete hobustena (läbi kumav roosa nahk, roosa ninaots), mitte hallidena. (Harris & Swinney, 2010, lk 31)

1.2. Eesti hobuse värvus

Eesti hobune on islandi hobuse ja šetlandi poni kõrval üks maailma värvikirevamaid. Mõnedel tõugudel, nagu Friisi ja Lipizza hobusel, on värvus tõutunnuseks, kuid eesti hobuse teeb eriliseks just tema värvirohkus. 2011. aastaks oli eesti hobusel kirjeldatud 24 värvust ja varjundit, kõnealuseid värvuseid kujutav plakat on esitatud lisas 1 (Raudsepp, 2011, lk 6). Eesti hobune on üks väheseid tõuge, kes kannab oma geenipärandis ka metshobusel domineerinud hiirugeeni (Randlaht, 2011).

Eesti hobune on aborigeenne tõug⁴, kelle eellased elasid Eesti aladel enne kodustamist. Vanimad ürg- ehk ulukhobuse luuleiud kinnitavad hobuse asumist Eesti aladel juba 7000. aastal eKr. Koduhobuse luid on Eesti aladelt leitud alles 1000 aastat eKr. Arvatavasti on eesti hobune välja arenenud Euroopa metshobuse tarpani põjapoolsest alampopulatsioonist ehk põhja metshobusest. On tõenäoline, et põhja metshobuse rühma kuuluv eesti hobune (samasse rühma kuuluvad ka soome, žmuudi, obi ja paljud teised hobuse tõud (EHKAS, „Ajalugu“)), võis seguneda idast kaasa toodud kodustatud hobustega (Randlaht, 2011, lk 33).

Ürghobused olid teadaolevate andmete kohaselt valdavalt kõrvid⁵ (ingl *buckskin*) ja ulukvõigud⁶ (ingl *dun*) – kehavärvuselt mustjaspruunidest kollakateni, mustade jõhvide ja jalgadega, jutttselgsed (tumeda triibuga seljal, mis ulatub turjast sabani ja jätkub tihtipeale jõhvides), sebroidsete vöötidega jalgadel ja õlaristiga. Selline loodusesse sulanduv värvus oli hea kaitsevärvus metsikule hobusele (Raudsepp, 2011, lk 7). Kui osadel hobusetõugudel on värvus tõutunnuseks, siis eesti hobusel see nii ei ole. Värviliseks muutus hobune kodustamise käigus ~ 3500 eKr (vt joonis 1). Vanemad teated kirjeldavad eesti hobust kõrvi, musta, hiirja või võiguna ja valdavalt jutttselgsena (Randlaht, 2011, lk 33). Tänapäeval tunneme kümneid erinevaid hobustel esinevaid värvuseid, seejuures on eesti tõugu hobune üks suurima värvilise mitmekesisuse esindajaid (Raudsepp, 2011).

Eesti nõudlike elamistingimuste tõttu väikseks, vähenõudlikuks ja vastupidavaks kujunenud eesti hobune on säilinud tänapäevani. Inimtegevuse tulemusena on eesti hobust ristatud mitmete tõugudega, teadliku aretuse tagajärjel põhiliselt tori, soome ja araabia hobusega. Esimese maailmasõja järgselt 1921. aastal loodi Eesti Maahobuste Kasvatajate Selts, tänu millele hakati eesti hobuse tõuraamatut pidama. Praeguseks on tõuaretusinspeksioon võtnud eesmärgiks eesti hobuse säilitamise kultuuriväärtusena lähtudes FAO (Food and Agriculture

⁴ Aborigeenne tõug on mingi piirkonna (nt Eesti) kohalik primitiivne tõug, mis on aretatud looduslähedastes tingimustes ja lihtsal viisil. („Unioonepeedia“)

⁵ Kõrb on hobuse värvus, mille korral naha pigment on tume, kattekarvad punakaspruunid kuni tumepruunid, jalgade alaosa, ninamik, lakk, saba ja kõrvaotsad aga mustad.

⁶ Ulukvõik (ka põdravõik ja kõrbhiirjas) on hobuse värvus, mille korral naha pigment on tume, kattekarvad liivakarva või kuldse tooniga, lakk ja jalgade alaosa mustad. Seljal esineb tume jutt (harilikul võigul mitte alati).

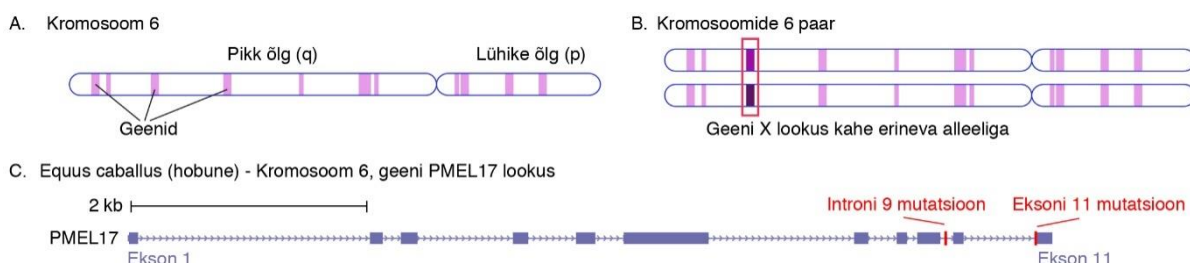
Organization of the United Nations) bioloogilise mitmekesisuse säilitamise eesmärkidest. Põhiline eesti hobuse aretusmeetod on puhasaretus. (EHKAS, „Ajalugu“)

1.3. Hobuse värvuse kujunemise põhjused

1.3.1. Geneetika põhitõed

Genoom⁷ sisaldab igale elusolendile omast pärilikkusainet desoksüribonukleiinhapet (DNA) ning paikneb peamiselt rakutuumas. Hobuse genoom koosneb umbes 2,6 miljardist DNA aluspaarist ning sisaldab umbes 20 000 geeni. (Raudsepp, 2008; Wade *et al.*, 2009). Hobuse keharakkudes on 64 kromosoomi, seega 32 paari (võrdluseks on inimese keharakkudes 3,2 miljardit DNA aluspaari, 46 kromosoomi 23 paaris). („Chromosomes and Genes“)

Geenid vastutavad biokeemiliste protsesside eest, mis elusorganismides aset leiavad. Geenid asuvad kromosoomides ja nende asukohta kirjeldatakse lookuste abil (vt joonis 3). Iga geeni lookus koosneb isemoodi nukleotiidide järjestusest, mis sisaldab kindlat infot raku elutegevuse juhtimiseks. Enamikud päristuumsete rakkudega organismide geenid koosnevad eri sorti vahelduvatest DNA järjestustest. Need on eksonid (ingl *exons*), millelt toimub otsene translatsioon valgu tootmiseks, ja intronid (ingl *introns*), mille järjestusi ei tõlgita valgu aminohapete järjestusse (vt joonis 3). Vaatamata sellele on paljudel intronitel tähtis regulatoorne roll, mis juhendab rakus eksonite kokku sobitamist. Seega võivad ka mittekodeerivates intronites asuvatel mutatsioonidel olla tagajärjed geeni lõplikel toimingutel. (Sponenberg & Bellone, 2017)



Joonis 3. Mõistete kromosoom, lookus, geen, ekson ja intron seletus PMEL17 lookuse näitel. A) geenide paiknemine kromosoomis, B) erinevad geeni esinemisvormid homologiliste kromosoomide samas lookuses, C) kodeerivate alade (eksonite) ja mittekodeerivate alade (intronite) ning nende mutatsioonide paiknemine kromosoomi 6 geeni PMEL17 lookuses.

Igas geenis võivad esineda väikesed muutused ehk punktmutatsioonid nukleotiidide järjestuses. Mutatsiooni tulemusel võib nukleotiid lisanduda (insertsioon), ära kaduda (deletsioon) või üks nukleotiid asenduda teisega. Olukorda, kus ühe nukleotiidi asendumine teisega viib aminohappelise järjestuse muutumiseni, nimetatakse missense mutatsiooniks (ingl *missense mutation*). Mutatsiooni tulemusel tekkinud alternatiivseid geeni vorme nimetatakse alleelideks. Mõned alleelid avalduvad fenotüübis vaid juhul, kui geenivariandid on

⁷ Liigiomane geenikomplekt haploidses kromosoomistikus.

samad mõlemal kromosoomil (homosügoot). Selliseid allelele nimetakse retsessiivseteks. Retsessiivsed tunnused võivad mitu põlve olla varjatud, kuna ei saa dominantsete varjus avalduda. Dominantse alleeli määratud tunnuste avaldumiseks piisab, kui üks kahest alleelist on dominante (teine seega retsessiivne ja sellisel juhul nimetatakse isendit selle geeni suhtes heterosügootseks). Geeni alleelid võivad erineda üksteisest vaid ühe nukleotiidi erinevusega. Ka ühe nukleotiidi muutumine, insertioon või deletsioon võib olla põhjus algsest erineva valgu kokku panemiseks. (Sponenberg & Bellone, 2017) Ühel geenil võib olla palju allele, kuid ühel isendil saab korraga olla kuni kaks alleeli, üks saadud emalt, teine isalt. Erinevad geeni variandid tagavad populatsioonile geneetilise mitmekesisuse, mis värvuse seisukohast avaldub eesti hobusel iseloomulikus värvikülluses. (Raudsepp, 2011)

1.3.2. Hobuse värvuse kujunemise geneetilised tegurid

Värvus on geneetiline tunnus, mis on kodeeritud elusorganismide geneetilise info kandjasse DNAsse. Nii karva, naha, kui ka iirise värvus olenevad pigmendirakkude (melanotsüütide) olemasolust või nende puudumisest ja sellest, millist pigmenti need rakud sisaldavad. Kindlad geenid määravad ära pigmendi olemasolu või puudumise, rohkuse ja vahekorra ning selle, kuidas pigmendirakud kehas jaotuvad (sabasse, lakka, jalgadesse, iirisesse). (Sponenberg & Bellone, 2017)

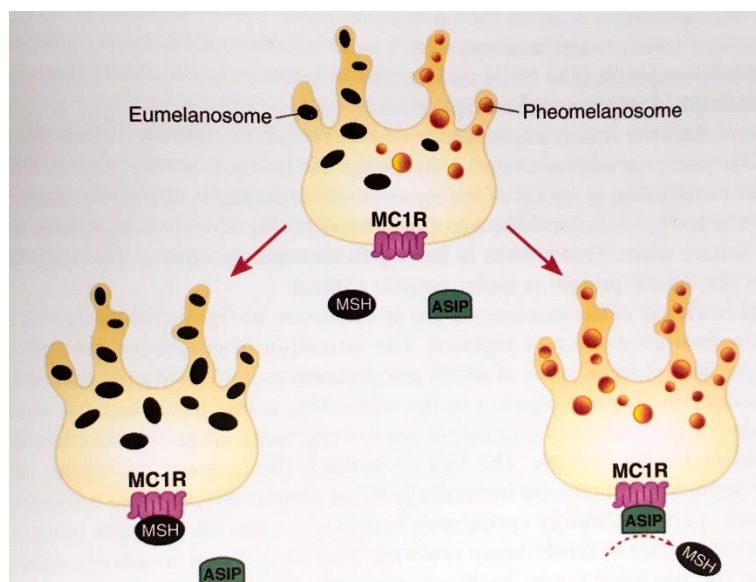
Imetajate värvust kujundavad kaks põhilist pigmenti ehk melaniini. Eumelaniin vastutab musta ja sinakasmusta värvuse eest. Väga harvadel juhtudel võib eumelaniin esineda ka pigem pruuni kui mustana, kuid üks isend saab toota vaid ühte varianti, kas pruuni või musta eumelaniini. (Sponenberg & Bellone, 2017)

Teine pigment on feomelaniin, mis põhjustab värve punakaspruunist kollaseni. Erinevalt eumelaniinist võib feomelaniini toon ühel isendil varieeruda. Enamikul hobustel on nii eumelaniini kui ka feomelaniini mõju näha: nende värvus on mustade ja punaste või kollaste alade kombinatsioon. Tume feomelaniin, mis on palju levinum, võib mõnikord meenutada pruuni eumelaniini, kuid feomelaniin säilitab enamasti ka väga tumedana punaka varjundi, mis aitab teda eristada eumelaniini põhjustatud värvialadest. (Sponenberg & Bellone, 2017)

Hobuste värvus on võimalik vaid tänu pigmendirakkudele ehk melanotsüütidele, mille ülesanne on tulevastesse karva- ja naharakkudesse sisestada pigmenditerakesi (valged karvad on pigmenditerakeste puudumise tulemus, samuti roosa nahk, millele annab värvi pinnapealsetest veresoontes voolav veri). Melanotsüüdid rändavad naharakkudesse embrüonaalses staadiumis. Pigmendirakud pärinevad embrüo välimisest lootelehest ehk ektodermist, seega samadest tüvirakkudest, millest hiljem moodustuvad ka kesknärvisüsteem, meeelundid, nahk, karvad, küüned ja piimanäärmed. Teadmine, et pigmentatsioonisüsteem ja närvisüsteem on embrüos nii lähedalt seotud, on oluline, kuna mõned geenid mõjutavad mõlema süsteemi funktsioone. (Sponenberg & Bellone, 2017)

Melanotsüütide võime toota kas eumelaniini või feomelaniini määrab ära pigmendiraku välispinnal paiknev retseptor. Tegemist on melanokortiin 1 retseptoriga, ametliku nimetusega MC1R, mille aktiveerib valk nimega melanotsüüti stimuleeriv hormoon MSH (ingl *melanocyte-stimulating hormone*), mida toodab ajuripats. Aktiveeritud retseptori korral toodab rakk eumelaniini, MSH puudusel feomelaniini (vt joonis 4). (Sponenberg & Bellone, 2017)

Eumelaniini ja feomelaniini tootmist pigmendirakus võivad mõjutada erinevad tegurid. Mõnede mutatsioonide korral, näiteks dominantne must (alleeli tähistusega E), toodetakse rakus vaid aktiveeritud MC1R retseptori vormi, mistõttu moodustavad melanotsüüdid eumelaniini ka MSH puudumise korral. Tulemuseks on eumelaniini põhjustatud, enamasti üleni must fenotüüp. Sellele vastandub ühtlaselt pruunikas (raudjas) fenotüüp (alleeli tähistusega e), mille põhjustavad rakkudes toodetud MSH äratundmise funktsioonita MC1R retseptorid. Tulemuseks on enamikul juhtudel feomelaniini põhjustatud punane/kollane fenotüüp. (Sponenberg & Bellone, 2017)



Joonis 4. Eumelaniini ja feomelaniini regulatsioon rakus. Melanotsüüdid suudavad toota kahte erinevat pigmenti. Pigmendiraku välispinnal olev retseptor (MC1R) aktiveerub, kui ühineb MSHga, ja sellisel juhul toodab rakk eumelaniini. Kui ASIP ühineb retseptoriga, siis ei pääse MSH enam ligi ega saa retseptorit aktiveerida ja rakk toodab feomelaniini (Sponenberg & Bellone, 2017, lk 19)

Teine võimalus pigmendi tootmist mõjutada on MC1R blokeerimine rakuväliselt. Sellisel juhul on tegemist normaalselt funktsioneeriva retseptoriga, mis ei saa aktiveeruda ka MSH olemasolul. Selline mehhanism on tüüpiline aguuti lookusele (ingl *Agouti locus*), mis põhjustab feomelaniini tootmist kohtades, kus aguuti valk (ASIP (*agouti signalling protein*), mis blokeerib MC1R) on esindatud, ja selle puudumisel (MC1R retseptor pole blokeeritud) toodetakse eumelaniini (vt joonis 4). (Sponenberg & Bellone, 2017)

Lisaks välistele teguritele on olulised melanotsüütide mehaanilised muutused, mis on samuti geneetilise kontrolli all. Melanogeneesi käigus toodetakse pigmendirakus pigmenti, mis pakitakse melanosoomi ja toimetatakse edasi naha- või karvarakku. Eumelaniini ja

feomelaniini tootmisel on aga ka erinevaid etappe, mistõttu võivad mõned mutatsioonid mõjutada vaid ühe pigmendi tootmist kahest. Melanotsüüdi sisemist tegevust mõjutavate tegurite tulemusena varieerub enamasti toodetava pigmendi kogus ja see, kuidas pakitakse. Seetõttu esinevad sisesed muutused pigem visuaalse värvi lahjendusena kui pigmendi tüübi muutusena. Sarnaselt töötab ka geen nimetusega PMEL17 (*pre-melanosomal protein 17*) lookus, mis mõjub eumelaniinile lahjendavalt, samas kui feomelaniini jääb puutumatuks ja on uuritava hõbemusta värvuse hõbeda tunnuste (hele lakk, saba, ripsmed, tähnid kehal) põhjustajaks. (Sponenberg & Bellone, 2017) Just geen PMEL17 on siinse töö raames luubi all ning järgnev peatükk kirjeldab selle bioloogiat lähemalt.

Ülevaatlik tabel värvust kujundavatest mehhanismidest ning tulemuseks olevatest värvuslikest fenotüüpidest on leitav Michael Cieslak'i 2012. aasta uurimusest „Coat colours and mitochondrial lineages of ancient horses to document domestication“. (Cieslak, 2012, lk 14)

1.3.3. Hobuse hõbegeen PMEL17

PMEL17 geeni produkt on transmembraanne⁸ valk, mida nimetatakse premelanosoomseks valguks 17 ehk PMEL17. Hõbe lookuse PMEL17 mutatsioone ja nende mõju on varem uuritud ja kirjeldatud hiire, kana, sebrakala ja koera fenotüüpides. Missense mutatsioon hõbe lookuses põhjustab hiirtel melanotsüütide kadu karvanääpsudes, mis avaldub enneaegse hallinemisena (Kwon *et al.*, 1991). Samas geenis esinevaid insertioone ja deletsioone seostatakse kana dominantse valge (ingl *Dominant white*) ja kõrvi (ingl *Dun*), suitsja/tomuja (inglisekeelse nimetuse *Smokey* vasteks pakutud nimetused) fenotüübiga (Kerje *et al.*, 2004). Hõbegeeni mutatsioonid põhjustavad ka sebrakalal ja koeral hüpopigmentatsiooni⁹, kuid erinevalt hiirest ja kanast on neil kirjeldatud mutatsiooniga kaasnevat nägemisvaegust (koertel ka kuulmisprobleeme) (Clark, Wahl, Rees, & Murphy, 2005). Hiirel on täheldatud PMEL17 geeni rolli varajastes aju melanoblastides¹⁰, mis annab alust oletada, et geenil on tähtis roll arengus. PMEL17 mutatsioonidega seostatud pigmentatsiooni variatsioone pole inimesel veel kirjeldatud, kuid nende olemasolu on tõenäoline. Oletatavalt võiks sellisel inimesel esineda fenotüübiliselt punased või blondid juuksed, hele nahk ja heledad silmad (Brunberg *et al.*, 2006).

2006. aastal tõestati katseliselt ära seos hobuse hõbe lookuse PMEL17 punktmutatsiooni ja teatud kehaosade hüpopigmentatsiooni vahel. 60 hobuse genoomi genotüüpimisel¹¹ ja edasisel DNA sekveneerimisel avastati tugev seos hõbeda fenotüübi ja missense mutatsiooni vahel PMEL17 lookuse 11. eksonis. Lisaks leiti eksoni mutatsiooniga eranditult kaasnev mutatsioon 9. intronis (vt ka Viinalass, 2011, lk 14). PMEL17 valgul on teadaolevalt roll

⁸ Rakumembraani läbiv valk, mille osad on paljastatud nii tsütoplasmas kui ka rakuvälises keskkonnas.

⁹ Vähene pigmentatsioon.

¹⁰ Melanotsüütide eellasrakud.

¹¹ Protsess, mille käigus tuvastatakse, millised geenivariandid DNAs esindatud on.

eumelaniini tootmisel ning valk on melanosoomides esindatud, kuid PMEL17 lookuse täpses toimemehhanismis pole veel ühese järelduseni jõutud. On leitud, et PMEL17 kodeeritud amüloid-kiud¹² on vajalikud normaalse melaniini tootmiseks. (Brunberg *et al.*, 2006) Sarnaselt sebrakalale ja koerale on ka hobusel täheldatud mutatsiooniga kaasnevaid silmade defekte (Clark *et al.*, 2005; Kerje *et al.*, 2004; Kwon *et al.*, 1991; Schonthaler *et al.*, 2005).

Hõbe fenotüüp hobusel on autosomaalne¹³ dominantsetl päranduv tunnus, mida iseloomustab eumelaniini lahjenemine, samas kui feumelaniin jääb puutumatuks. Hõbeda tunnuste põhjustaja on punktmutatsioon, mis asub hobuse kromosoomil 6 paiknevas hõbe lookuses (Silver locus (tähistusega Z)), geeni PMEL17 11. eksonis, mille tagajärjel on algse C (tsütosiini) lämmastikaluse nukleotiidi asemel T (tümiin). Punktmutatsiooni tulemusel muutub PMEL17 geeni saadus, transmembraanne valk. Täpsemalt muutub üks aminohappe jääk PMEL17 valgu rakusiseses piirkonnas arginiinist tsüsteiiniks (*Arg618Cys*). Lisaks geeni valku kodeerivas järjestuses (eksonis) paiknevale mutatsioonile, kaasneb sellega ka mittekodeerivas järjestuses (intronis) paicev punktmutatsioon. Täpsemalt vahetub 11. eksonist 759 aluspaari eespool, 9. introni 48. nukleotiidis, algne A (adeniin) T (tümiini) vastu. Selle mutatsiooni roll ei ole veel täpselt teada (vt tabel 1). (Brunberg *et al.*, 2006)

Tabel 1. PMEL17 lookuses paiknev 11. eksoni mutatsioon, mis põhjustavad hobusel musta pigmendi lahjenemise ja alati kaasnev mutatsioon 9. intronis. Tabel on esitatud modifitseeritud kujul olemasolevast tabelist. (Andersson *et al.*, 2013)

Asukoht	Algne alleel	Muteerunud alleel	Tagajärg
chr6:73665304 (EKSON)	C	T	Arg625Cys
chr6:73666064 (INTRON)	A	T	Pole teada

Mutatsioon geenis PMEL17 mõjub lahjendavalt vaid eumelaniinile ja jätab feumelaniini puutumatuks. Raudjatel hobustel on missense mutatsioon (*Ser83Phe*) MC1R geenis, mille tagajärjel tekib inaktiivne MSH retseptor. Tulemusena väljendub karvkattes vaid punane feumelaniin, millele PMEL17 ei mõju (Sponenberg & Bellone, 2017). Seetõttu saab hõbemutatsioon esineda raudjate hobuste genotüübis fenotüübiliselt väljendumata. Hobustel, kelle põhivärvus on tekkinud eumelaniini või eu- ja feumelaniini koostoimel, on PMEL17 mõju näha eumelaniini lahjendusena. Nii mõjub PMEL17 näiteks järgmistele hobuste värvustele: kõrb (ingl *Bay*) → hõbekõrb (ingl *Red silver, Bay silver*), võik (ingl *Buckskin*) → hõbevõik (ingl *Yellow silver*), ulukvõik (ingl *Zebra dun*) → hõbeulukvõik (ingl *Linebacked yellow Silver*, selline nimetus pole eesti keeles kasutusel, kuid genotüüpiliselt on see eesti hobusel tõenäoliselt

¹² β -struktuuriga (volditud lehe kujuga) valkude kogumik, millel on roll melaniini sünteesis ja mõnede hormoonide ladustamisel.

¹³ Mittesugukromosoomis esinev.

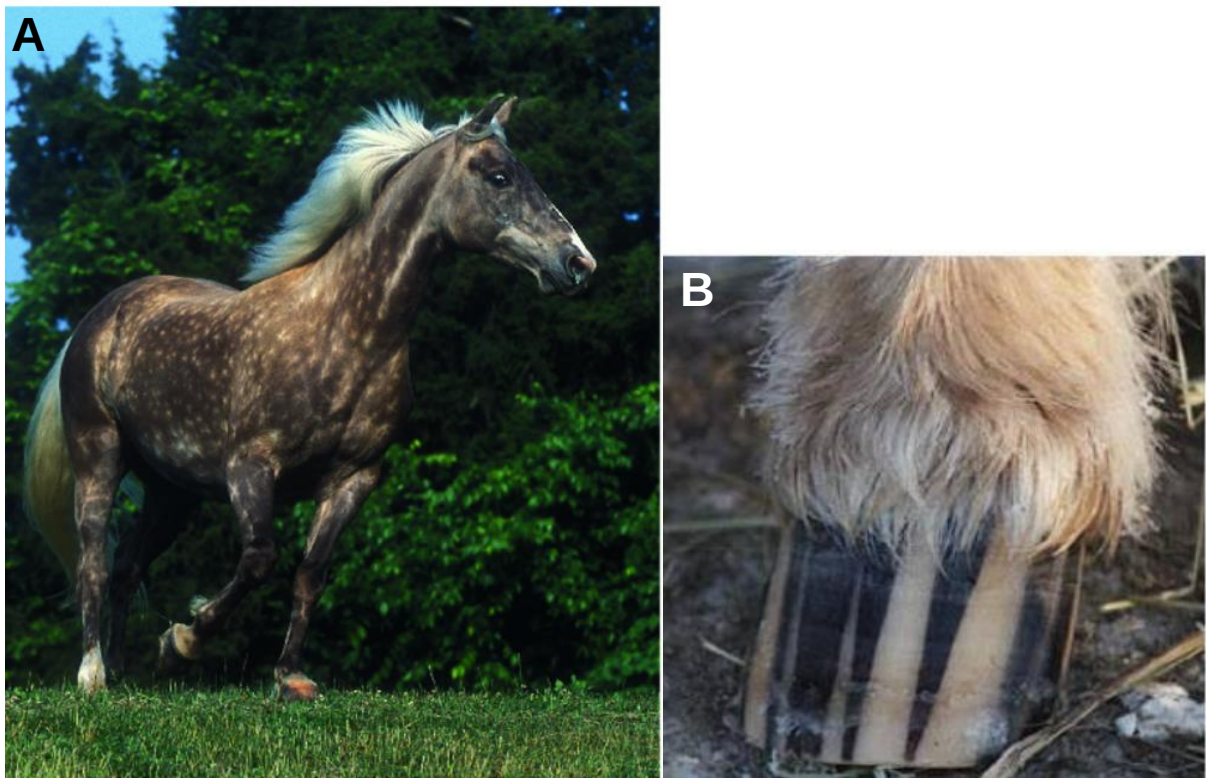
esindatud), hiirjas (ingl *Grullo*, *Mouse dun*) → hõbehiirjas (ingl *Linebacked chocolate silver* ka *Silver grullo*), must (ingl *Black*) → hõbemust (ingl *Blue silver*, *Black silver*, *Coal chestnut*, *Black chestnut*, *Dark chocolate silver*, *Light chocolate silver*) (Sponenberg & Bellone, 2017). Nimetatud värvused (v.a hõbeulukvõik) on kirjeldatud ja esindatud ka eesti hobuse värvustena. (PRIA, „Hobuslaste register“)

1.4. Hõbemust värvus hobusel

Hõbemust (ingl *Black silver*) hobune on genotüübiliselt must hobune, kellel hõbepunktmutatsiooni toime väljendub tüüpiline hõbe fenotüüp (vt joonis 5). Sellise hobuse põhivärv (keha värv) võib varieeruda sügavmustast heledama sinaka ja pruunika šokolaadikarva toonini, iseloomulikud on heledad tähnid ehk õunikud kehal (Sponenberg & Bellone, 2017, lk 114). Hõbegeen mõjub mustale karvkattele lahjendavalt seda tugevamalt, mida pikem on karv. Kõige enam alluvad värvuse lahjendamisele sabajõhvid ja lakakarvad, mis võivad varieeruda mustjast valkjani (Brunberg *et al.*, 2006). Selgeks hõbemusta värvuse tunnuseks on ka valged ripsmed ja varssadel triibulised kabjad (vt joonis 5), mis vananedes enamasti välja kasvavad, kuid erandite tõttu pole need tunnused vääramatud värvuse määramiseks (Brunberg *et al.*, 2006).

Hõbegeeni kandvate värvuste märkimine (hõbemust, hõbekõrb) võeti Eestis kasutusele 2004. aastal („Värvused ja eesti hobune“). Varasemalt on rahvasuus hõbemust värvus tuntud ka kui sinihall, hõbehall, linalakk, iiru ja Kärä sinine. See värvus on eesti hobusel küllaltki pikaajaline nähtus, mida tõestavad fotod ja kirjalikud hobuseid kirjeldavad andmed, mis ulatavad kuni paarisaja aasta tagusesse aega (Priidu Tikk, personaalne kommunikatsioon). Ühe teooria kohaselt on hõbegeen eesti hobuse genotüüpi¹⁴ tulnud aretuse käigus soome hobuselt, kellel hõbekõrb ja -must fenotüüp levinud on (Randlaht, 2011). Eesti hobuse värvuste ja nende ajaloo uurimisega tegelenud Priidu Tikk tõstatab aga teise teooria, mille kohaselt on tegu juba aborigeenidele omase nähtusega, millele viitab ka tõsiasi, et hõbedat fenotüüpi tekitav mutatsioon esineb kõigil laia genofondiga tõugudel nagu jakuutia, mongoolia ja islandi hobusel ning šetlandi ponil.

¹⁴ Organismi kõigi pärilike faktorite kogu ja koostoime. Genoom ja genotüüp on 2 erinevat mõistet: genoom on struktuurne, genotüüp aga informatiivne mõiste, genoom on mahuliselt väiksem. (Reino, 2008)



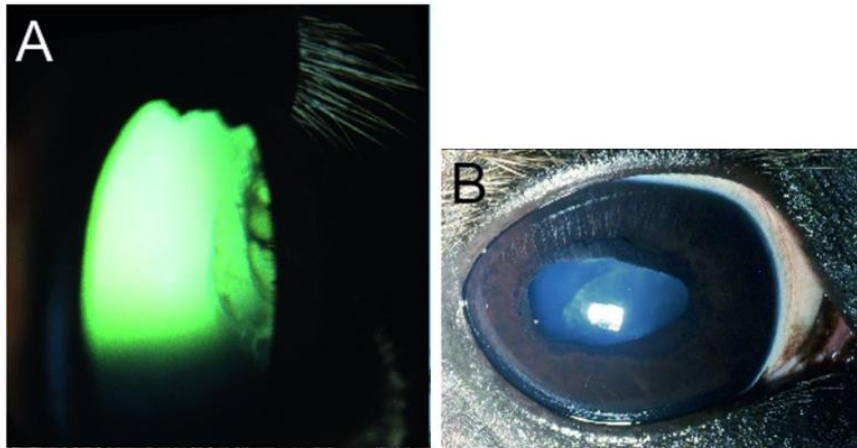
Joonis 5. Hõbemusta hobuse fenotüübilised tunnused. A) Valkjad saba ja lakk ning tähniline põhitoonilt tume keha on tüüpilised geneetiliselt hõbemusta hobuse tunnused (Andersson *et al.*, 2013). B) Hõbegeeni kandva islandi hobuse varsa triibuline kabi (Brunberg *et al.*, 2006).

On võimalik, et mütoloogilistel uskumustel põhinevatel seostel hobuse iseloomuomaduste ja värvuse vahel võib tõepõhi taga olla. Väide, et hõbemustad hobused on närvilisemad, raskemini kontrollitavad ja reageerivad äkilisemalt ohuolukordades, leidis osaliselt kinnitust 2013. aastal Uppsala teadlaste katselises uurimuses. Katses pandi geneetiliselt kontrollitud hõbemustad, raudjad ja mustad islandi hobused sarnastesse ohuolukordadesse ja hinnati nende reaktsioone. Tulemuseks saadi, et hõbemustad isendid on ettevaatlikumad ja kartlikumad, kui katses kasutatud teist värvi hobused. Põhjuseks võivad olla pigmentatsioonisüsteemi seotus närvisüsteemiga ning hõbemusta värvuse tekitaja hõbegeeni mutatsiooni põhjustatud sagedased silmadefektid (lähemalt järgmises peatükis). (Brunberg, Gille, Mikko, Lindgren, & Keeling, 2013)

1.5. Hõbemusta värvusega kaasnev silmahaigus (MCOA)

MCOA sündroom (ingl *Equine Multiple Congenital Ocular Anomalies syndrome*) on peamiselt hõbemustadel (uuritud on hõbemustadel) hobustel esinev pärilik silmahaigus, mis on otseselt seotud premelanosoomset valku kodeeriva geeni (PMEL17) mutatsiooniga eksonis 11. Hobuse genotüübist sõltuvalt saab haigust klassifitseerida kaheks. Mutantse alleeli suhtes homosügootidel esineb suuremas ulatuses ja tõsisemaid silmadefekte: iirise strooma hüpoplaasia (ingl *Iris stromal hypoplasia*), ebanormaalsed kõvakesta sidemed (ingl *abnormal*

pectinate ligaments), silmamuna suurenemine (ingl *Megaloglobus*), irduvad tsüstid (ingl *Iridiociliary cysts*) ja kaed (ingl *Cataract*) (vt joonis 6).



Joonis 6. Hõbemusta värvusega kaasnevad silmahaigused. A) Ripskehast, iirisest irduv tsüst, mis võib laieneda võrkkesta, on sageli esinev nähtus MCOA fenotüübiga hobustel B) MCOA fenotüüp, kus muuhulgas on näha kaed, väljaulatuvat silma soonkesta, läätse nihkumist ja ebanormaalset pupilli. (Andersson *et al.*, 2013)

Heterotsügotsetel hobustel on silmaprobleeme harvemini, põhiliselt on nendeks irduvad tsüstid. MCOA sündroom ei pärandu täielikult dominantse tunnusena ning selle sündroomi esinemist on täheldatud erinevat tõugu hobustel, kellel esineb hõbemusta värvust (Andersson *et al.*, 2013).

1.6. Sugupuude uurimine

Eesti hobuste tõuraamat loodi 1921. aastal. Sealt alates hakkas tsentraliseeritum eesti hobuse aretamine ja süstemaatiline isendite ülestähendamine. Tõuaretuse üks eesmärkidest on saada ajastu vajadustele vastavate omadustega isendeid. Eesti hobust on tõuparanduseks ristatud soome hobusega (1920–1940), tori hobusega (1950–1960) ja araabia täisverelise hobusega (1975–1985). Hilisematel aastatel ristamine ei lõppenud, kuna ristandest järglasi on omakorda aretuses vastavalt vajadusele ja eelistusele edasi kasutatud. Ristamise tulemusena on arvestatavalt kasvanud eesti hobuse turjakõrgus, sest sissetoodud tõud on olnud eesti hobusest kõrgemad (Tikk, 2015).

Eesti hobuste sugupuude andmed on leitavad PRIA (Põllumajanduse Registrite ja Informatsiooni Ameti) koduleheküljelt. Terviklikud andmed (nimi, sünni- ja surmaaasta, sugu, värvus, tõug) on leitavad keskmiselt kuni viis põlve tagasi. Varasemates andmetes on tihti puudu hobuse nimi, värvus, sünniaasta või on eelnev põlvnemine täiesti teadmata. Lisaks on nimetuste omistamine erinevatele värvustele ajas väga muutlik. Näiteks on 1977. aasta “Eesti hobuse riikliku tõuraamatu” III köites (vt tabel 2) nimetatud 12 eesti hobusel esinevat värvust, mille fenotüüpi pole aga lahti kirjutatud.

Tabel 2. 1977. aasta „Eesti hobuse riikliku tõuraamatu“ III köites esitatud eesti hobuse värvused ja nende esinemisprotsendid. (Eesti NSV Põllumajanduse Ministeeriumi Teaduslik-Tehnilise Informatsiooni Valitsus, 1977, lk 9)

Värvus	Esinemise %	Värvus	Esinemise %
punane	33,6%	Hiiirjas	0,9%
kõrb	32,5%	kõrb-kimmel	0,5%
must	12,2%	raudjas-kimmel	0,7%
hahk-must	7,4%	puna-kimmel	0,1%
kollane	4,0%	kimmel-must	0,2%
võik	3,1%	tuhkur	0,1%

Loetelus puuduvad praegu kasutuses olevad hõbeda vormid. Nimetuste raudjas ja punane juures ei tunnetata tänapäeval enamasti värvuslikku erinevust: raudjas ehk punane ehk lepu (rahvakeeles). Varem on tõenäoliselt tehtud vahet erksama punase (praegune nimetus: punane) ja maksakarva, rauarooste tooni (praegune nimetus: raudjas) vahel. 1977. aasta liigituses esinevad mõlemad nimetused, kusjuures punane esineb nii iseseisva värvusena kui ka puna-kimli koosseisus, seejuures raudjas vaid sõnaühendis raudjas-kimmel. (Eesti NSV Põllumajanduse Ministeeriumi Teaduslik-Tehnilise Informatsiooni Valitsus, 1977, lk 9). Ka hiljutistes andmetes ei saa täielikult kindel olla, kuna segane värvusnimetuste süsteem ja erineva tasemega teadmised värvustest tingivad erinevaid lähenemisi värvuste määramisele.

Hobuse värvusi kirjeldavaid artikleid uurides selgub, et eestikeelne värvuste süstemaatika on praegugi veel puudulik. Konsensust pole ka nende inimeste seas, kes on hobustega tihedalt seotud. Puuduvad kindlad nimetused osade värvuste kirjeldamiseks ja vasted ingliskeelsetele terminitele (järelkus on tehtud erinevaid artikleid uurides ja inimestega suheldes). Värvuste määramise süsteem ja inimeste teadlikkus värvustest ei ole ühesed. Omamoodi oli värvuste määramine ka seltsi algusaastatel, mistõttu tuleb registriandmetesse suhtuda kriitiliselt ja pole mõistlik liikuda sugupuud uurides väga ammustesse aegadesse (PRIA, „Hobuslaste register“).

Sugupuid uurides selgub, et hõbeda fenotüübiga eesti hobuste põlvnemine ulatub suurelt jaolt hobuste Rommi, Epu või Edgari lähisugulasteni (Priidu Tikk, personaalne kommunikatsioon). Hõbeda kasutamine ametlikes värvusnimetustes on eesti keeles uus nähtus: varem on sellised hobused liigitatud valdavalt hallide, raudjate või raudjaslinalakkade alla (tõenäoliselt on paljud raudjaslinalakkadeks nimetatud hobused hõbemutatsiooni suhtes tänapäeva mõistes hõbekõrvid). Andmebaasis olevad värvused on vastavuses oma ajastu vajaduste ja teadmistega ning seal nimetatud värvustele tuleb läheneda loominguliselt: tuleb otsida kunagi määratud värvuste tagant tänapäeval genotüübiliste teadmiste abil täpsemalt eristatud

värvuseid. Nii on ka varem nimetatud halli ja raudjaslinakaga, keda võib osadel juhtudel, kui on piisavaid andmeid põlvnemise kohta, pidada hõbemustadeks või kõrbideks.

Sugupuude kriitilisel uurimisel aitavad kaasa teadmised geeni ekspressiooni ja esinemisvormide kohta. Nende põhjal on võimalik teha tõenäolisi oletusi nii tulevase varsa võimalike värvuste kohta kui ka sugupuud mööda tagasi minnes teatud geeni pärandumislüüsi tuvastada. Nii saab väita, et raudjas hobune, kelle üks vanem on heterosügootne hõbegeeni suhtes, on 50% tõenäosusega PMEL17 mutatsiooni kandja, mis aga raudjal hobusel ei avaldu (v.a võimalikud triibulised kabjad (vt ptk 1.3.2. ja joonis 5)). Kui kõnealusel raudjal hobusel on hõbeda fenotüübiga järglasi ja teise vanema hõbeda genotüüp on välistatud, saab kindlalt väita, et kõnealune raudjas hobune on PMEL17 mutatsiooni kandja. Sarnaseid oletusi võib teha kõikide värvuste kohta. Allolevas tabelis 3 on esitatud musta ja hõbemusta ning mustade vanemate järglaste värvuste esinemise suhtelised sagedused.

Tabel 3. Vanemate värvusest tuletatud varsa oodatava värvuse suhteline sagedus. Tabel on esitatud modifitseeritud kujul olemasolevast tabelist. (Sponenberg & Bellone, 2017)

1 vanema värv	2 vanema värv	Varsa oodatava värvuse suhteline sagedus			
		alati (<i>Always</i>)	tavaline (<i>Common</i>)	juhuti (<i>Occasional</i>)	harv (<i>Rare</i>)
must (ingl <i>Black</i>)	must (ingl <i>Black</i>)	must (ingl <i>Black</i>)		raudjas (ingl <i>Chestnut</i>)	kõrb (ingl <i>Bay</i>), ingl <i>Mushroom</i> , ingl <i>Pearl</i>
must (ingl <i>Black</i>)	hõbemust (ingl <i>Blue silver</i>)	hõbemust (ingl <i>Blue silver</i>)	must (ingl <i>Black</i>)	raudjas (ingl <i>Chestnut</i>)	Ingl <i>Red silver</i> , kõrb (ingl <i>Bay</i>), ingl <i>Pearl</i> , ingl <i>Mushroom</i>

2. MATERJALID JA MEETODID

2.1. Proovide kogumine

Katses uuritavad proovid koguti 6. juulil Nuhja tallist Kata külas Muuksi Tuulelt ja 13. juulil Viljandimaal Lemmakõnnu külas Tukkerilt, Voore tallides Raplamaal Reialt ja Voore Antariselt (vt joonis 7). Proovid võeti nii sabajõhvidest kui ka lakakarvadest, kuid katses kasutati proove valikuliselt (vt tabel 4). Proove säilitati kuni DNA eraldamiseni temperatuuril -20°C .

Tabel 4. Katsesse valitud hobused, nende värvused ning karvaproovi täpsustus.

HOBUNE	VÄRVUS	KARVAD
1. Voore Antaris	hõbehiirjas	lakk
2. Tukker	must	lakk
3. Muuksi Tuul	hõbemust	saba
4. Reia	hõbemust	lakk



Joonis 7. Vaatlusalused hobused ning nende värvuse fenotüübid. (1) hõbehiirjas Voore Antaris, (2) must Tukker, (3) hõbemust Muuksi Tuul, (4) hõbemust Reia hõbehiirja Voore Antarisega. („Eesti tõugu mära Reia täkkvarss“, 2018; „Tukker 703E“, 2011; autori erakogu)

2.2. DNA eraldamine

DNA eraldamiseks kasutati tootja AmpliSense® biotechnologies DNA eraldamise komplekti nimega DNA-sorb-B (*nucleic acid extraction and purification of DNA variant 100*). DNA eraldamine tehti vastavalt tootja protokollile.

2.3. Töös kasutatud praimerid

Töös kasutati nii 11. eksonis oleva kui ka 9. intronis oleva võimaliku mutatsiooni uurimiseks artiklis “A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse” (Brunberg *et al.*, 2006) avaldatud praimerite järjestusi, mis on välja toodud tabelis 5.

Tabel 5. PMEL17 lookuse kahe mutatsiooni uurimiseks kasutatud praimerite järjestused ja amplifitseeritava DNA lõigu pikkus

Mutatsioon	Senss (S)/ antisenss (AS)	Järjestus (5'→3')	PCR produkti pikkus
Eksoni mut.	S	5'-GCAGGGAAGCTTGTAGAGTGA-3'	318 bp
	AS	5'-CTTCCCCCTTTGGTGAGAG-3'	
Introni mut.	S	5'-AATGTGTCTTTGGCTGATGC-3'	629bp
	AS	5'-TCTGCCCCTCTTACAGGTGA-3'	

2.4. Polümeraasi ahelreaktsioon (PCR)

Polümeraasi ahelreaktsiooniks (*polymerase chain reaction - PCR*) kasutati 5x HOT FIREPol Blend Master Mix segu (Solis BioDyne Data Sheet). Iga reaktsiooni lõppmaht oli 40 µl, mis sisaldas järgmisi reagentide: HOT FIREPol segu (1x); praimereid (10 pmol); iga reaktsiooni kohta 10 µl uuritavat DNAd. Reaktsioon tehti tingimustel, mis on esitatud tabelis 6. Kusjuures mõlema lookuse amplifitseerimiseks kasutati sama programmi. Negatiivseks prooviks tehti kõrvale reaktsioon, kuhu ei lisatud DNAd. PCR saadusi kontrolliti agarosgeelelektroforeesil. Valmistati 1% agarososi sisaldusega geel, millele lisati DNA visualiseerimiseks UV-valguses etiidiumbromiidi. DNA puhastati geelist Thermo Scientific Geno JET Gel Extraction Kitiga.

Tabel 6. PCR reaktsioonitingimused PMEL17 lookuse mutatsioonide amplifitseerimiseks.

	Temperatuur	Aeg	Korduste arv
Esmane	95 °C	15 min	
Denaturatsioon	95 °C	20 s	12x (iga tsükliga alandati seondumise temperatuuri 0,5 °C)
Praimerite seondumine	58°C	45 s	
DNA süntees	72 °C	1 min	
Denaturatsioon	95 °C	20 s	35x
Praimerite seondumine	52 °C	45 s	
DNA süntees	72 °C	1 min	
Lisasüntees	72 °C	10 min	
Jahutus	4 °C	15 min	

2.5. Sekveneerimine ja tulemuste hindamine

Proovid sekveneeriti Tartus, Eesti Biokeskuse tuumiklaboris. Saadud kromatogramme hinnati programmi Chromas abil silmaga. Saadud sekventsides nukleotiidsete järjestuste kuulumist hobusele kontrolliti NCBI (National Center for Biotechnology Information) leheküljel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programmiga.

2.6. Sugupuude uurimine ja piltide töötlemine

Uurimuses kasutatud põlvnemist puudutavad andmed on võetud PRIA (Põllumajanduse Registrite ja Informatsiooni ameti) kodulehelt.

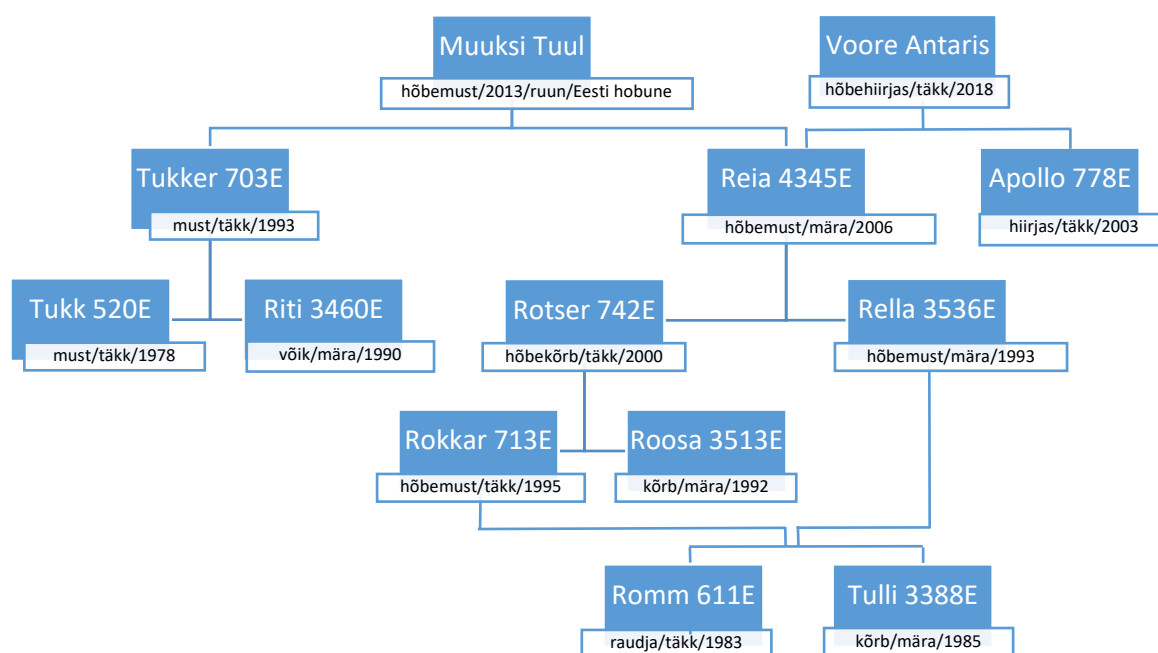
Pilte töödeldi programmidega GIMP 2.10.4 ja Photoshop CC 2018.

3. TULEMUSED

3.1. Vaatlusaluste hobuste sugupuu analüüs

Sugupuu põhjal on tehtud oletused nelja isendi genotüüpide kohta: (1) Voore Antarise, (2) Tukkeri, (3) Muuksi Tuule ja (4) Reia. Nimetatud hobuste genotüüpe kontrolliti ka katseliselt.

Hõbemusta Tuule (vt joonis 7) isapoolset põlvnemist vaadates pole näha ühtegi viidet hõbeda fenotüübi kohta. Mustal põhivärvusel hakkab PMEL17 mutatsiooni lahjendus selgelt silma, sellise hobuse mustaks määramine pole tõenäoline. Tukkeri pilt kinnitab musta, lahjenduseta fenotüüpi (vt joonis 7). Must Tukk ja võik Riti välistavad omakorda PMEL17 mutatsiooni pärandumise Muuksi Tuulele isaliini kaudu (vt joonis 8).



Joonis 8. Muuksi Tuule sugupuu. Sugupuu on esitatud lühendatud variandis. Andmed on võetud PRIA hobuslaste registrist. (PRIA, „Hobuslaste register“)

Muuksi Tuule emapoolses liinis on esindatud palju hõbeda lahjendusega värvuseid. Vaadates joonisel 8 Reia põlvnemist, on näha, et Romm ja Tulli on nii emapoolsed vanavanemad kui ka isapoolsed vanavanemad. Kuni Rommi (Romm on andmebaasis märgitud raudjaks, kuid säilinud mustvalge fotomaterjali põhjal on alust oletada, et tegu oli hõbekõrvi hobusega (vt ptk 1.6.) (Priidu Tikk, personaalne kommunikatsioon)) ja Tullini on mõlemat liini pidi esindatud hõbeda värvused: isaliinist hõbekõrb Rotser (vt joonis 9) ja hõbemust Rokkar (vt joonis 9), emaliinist hõbemust Rella (vt joonis 9). Kuna Tulli on kõrb, kellel PMEL17 mutatsiooni olemasolul see fenotüübis avalduma peaks, siis on alust oletada, et mutatsioon on kandunud raudja/hõbekõrvi Rommi liini pidi. Paljude hõbeda fenotüübiga hobuste sugupuud ulatuvad tagasi Rommini (vt ptk 1.6.).



Joonis 9. Piltidel kujutatud hobuste värvused: hõbekõrb Rotser 742E, hõbemust Rokkar 713E, hõbemust Rella 3536E varsaga, hiirjas Apollo („Eesti tõugu hiirjas sugutäkk Apollo 778E“; „Eesti tõugu mära Reia täkkvarss“, 2018; „Rokkar 713E“; „Rotser 742E“).

Hõbemustal Reial (vt joonis 7) on PMEL17 mutatsioon esindatud nii ema kui isa fenotüübis, kusjuures kõik Reia järglased on olnud hõbeda fenotüübiga (valdavalt hõbemustad) (PRIA, „Hobuslaste register“), mistõttu on alust oletada, et Reia on PMEL17 mutatsiooni suhtes homosügootne. Oletust kinnitab ka vasaku silma defekt, mis on tihti kaasnev nähtus mutatsiooni suhtes homosügootsetel isenditel (vt joonis 10).

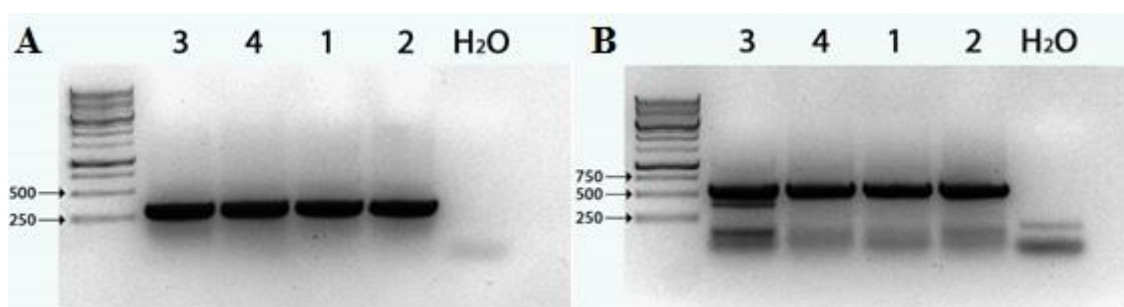


Joonis 10. Reial esinev silmadefekt (MCOA), mis põhjustab ühe silma pimedust. (autori erakogu)

Hõbehiirja Voore Antarise (vt joonis 7) isal, hiirjal Apollol, pole ei fenotüübiliselt ega järglaste põhiselt tuvastatud hõbemutatsiooni (PRIA, „Hobuslaste register“), mistõttu võib selle teadmise ja eelnevate lõikude põhjal kokkuvõtvalt oletada, et Reia on PMEL17 mutatsiooni suhtes homosügoot, Muuksi Tuul ja Voore Antaris on PMEL17 mutatsiooni suhtes heterotsügootid ja Tukker on PMEL17 mutatsioonita homosügoot.

3.2. DNA amplifitseerimine hobuse karvaproovidest

DNA eraldati 4 eesti hobuse karvaproovidest. PCR-i reaktsiooniga õnnestus kõikides proovides amplifitseerida nii PMEL17 lookuse 9. eksoni 318 aluspaari (bp) pikkune fragment kui ka 11. introni 629 aluspaari pikkune fragment (vt joonis 11). PCR-i reaktsiooni negatiivseks kontrolliks oli kõrval proov, kuhu lisati DNA asemel vesi. Negatiivsest kontrollist ei õnnestunud amplifitseerida huvi all olevaid DNA fragmente, mistõttu loeti PCR-i reaktsioon õnnestunuks. Amplifitseeritud DNA fragmendid lõigati geelist välja, puhastati ning sekveneeriti. Sekveneerimise järgselt kinnitati proovide kuulumist hobusele NCBI (National Center for Biotechnology Information) leheküljel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programmi abil.



Joonis 11. Mutatsioonanalüüsiks amplifitseeritud PMEL17 lookuse 9. eksoni ja 11. introni DNA fragmendid. Gelelektroforeesil geelile kantud proovid on tähistatud joonis 6 vastavuses olevate katsealuste numbritega: 3) Muuksi Tuul 4) Reia 1) Voore Antaris 2) Tukker. Oodatavate produktide pikkused on A) 9. ekson 318bp ja B) 11. intron 629bp.

3.3. Hõbedast fenotüüpi põhjustava missense mutatsiooni esinemine vaatlusaluste hobuste genotüübis

Analüüsitud neljast proovist esines kolmes [1) Voore Antaris, 3) Muuksi Tuul, 4) Reia] mutatsioon eksonis. Kõigil eksoni mutatsiooniga isenditel esines ka mutatsioon intronis, mis kirjanduse andmetel eksoni mutatsiooniga kaasas käib (Brunberg *et al.*, 2006) (vt tabel 7 ja tabel 8). Tukkeril, kelle värvus on must, ei esinenud kummaski PMEL17 amplifitseeritud DNA piirkonas hõbedast fenotüüpi põhjustavaid mutatsioone. Sekveneerimisest saadud sekventsidsid kuvati programmiga Chromas ja tehti järgnevad järeldused:

1. kromatogrammil on eristatavad kaks piiki eksoni ja introni lookustes (vt joonis 11). Ühel kromosoomil esineb eksoni lookuse 5. nukleotiidis mutatsioon, kus lämmastikalus tsütosiin on asendunud tümiiniga, mille tulemusena sünteesitakse valgu arginiini asemel tsüsteiini (vt tabel 7). Sama kromosoomi introni lookuse 48. nukleotiidis on lämmastikalus adeniin asendunud tümiiniga (vt tabel 8). Järeldub, et (1) Voore Antaris on hõbemutatsiooni suhtes heterosügoot. Sellest annavad aimu heledad karvad lakas ja sabas, kuid tegu on veel noore loomaga, kelle fenotüüp võib oluliselt muutuda.

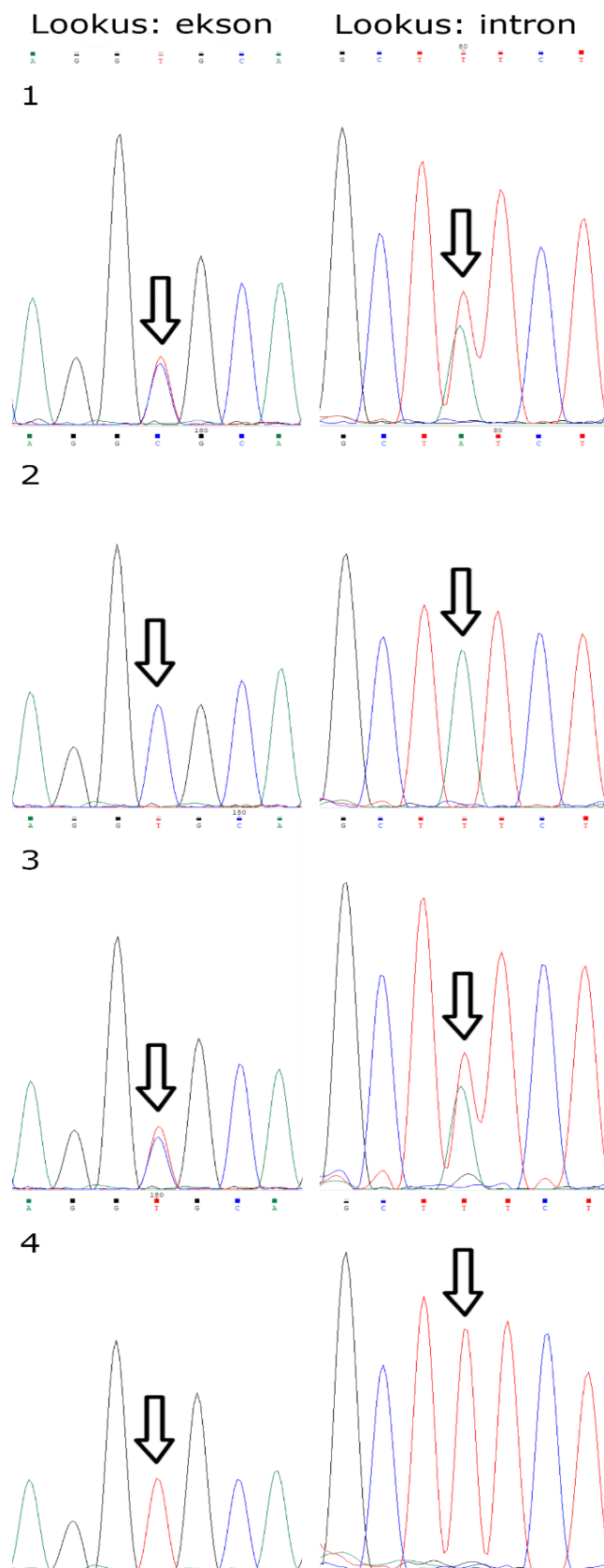
Tabel 7. Eksoni (sense) mutatsiooni esinemine vaatlusaluste genotüüpides. Noolega märgitud nukleotiid osutab punktmutatsioonile.

Hobused	chr6:73666064		Sügootsus	Tagajärg
	alleel 1	alleel 2		
1. Voore Antaris	C→T	C	heterosügoot	arginiin→tsüsteiin
2. Tukker	C	C	homosügoot	arginiin
3. Muuksi Tuul	C→T	C	heterosügoot	arginiin→asüsteiin
4. Reia	C→T	C→T	homosügoot	arginiin→tsüsteiin

Tabel 8. Introni (sense) mutatsiooni esinemine vaatlusaluste genotüüpides. Noolega märgitud nukleotiid osutab punktmutatsioonile.

Hobune	chr6:73665304		Sügootsus
	alleel 1	alleel 2	
1. Voore Antaris	A→T	A	heterosügoot
2. Tukker	A	A	homosügoot
3. Muuksi Tuul	A→T	A	heterosügoot
4. Reia	A→T	A→T	homosügoot

2. kromatogrammil (vt joonis 11) on mõlemas lookuses selgelt üks piik. Eksoni lookuse 5. alusel on lämmastikaluse tsütosiin nukleotiid (vt tabel 7) ja introni lookuse 48. alusel adeniini nukleotiid (vt tabel 8). Mõlemas kromosoomis esineb mutatsioonita geenialleel. Järeldub, et (2) Tukker on homosügoot, kellel ei esine PMEL17 mutatsiooni. Fenotüüp on genotübile vastavalt ühtlaselt must ja pigmendilahjendusetu.



Joonis 11. Eksoni ja introni lookuste kromatogrammid mutatsiooni esinemise ja puudumise kirjeldamiseks. Eri värvi piigid kromatogrammil tähistavad erinevate lämmastikaluste nukleotiide: rohelisega adeniiin (A), sinisega tsütosiin (C), mustaga guaniin (G), punasega tümiin (T). Erinevate värvuste numbritele vastavad isendid: 1) Voore Antaris, 2) Tukker, 3) Muuksi Tuul 4) Reia.

3. kromatogrammil (vt joonis 11) on näha topelt piigid eksoni ja introni lookustes. Mutatsioon esineb ühe kromosoomi eksoni lookuses, kus 5. nukleotiidis on tsütosiin asendunud tümiiniga, mille tulemusena toodetakse valgu arginiin asemel transmembraanset valku tsüsteiin. (vt tabel 7). Sama kromosoomi introni lookuses on 48. nukleotiidis tsütosiin asendunud tümiiniga (vt tabel 8). Järeldub, et (3) Muuksi Tuul on hõbemutatsiooni suhtes heterosügoot. Fenotüübiliselt hõbemustale hobusele tüüpilised valkjad saba ja lakk, valged ripsmed ja tume tähniline keha on vastavuses genotüübiga (vt tähne kehal ja jalgadel lisast 4).

4. kromatogrammil (vt joonis 11) on mõlemas lookuses üks piik. Mõlemas kromosoomis on eksoni lookuses muteerunud tümiini nukleotiid, mille tulemusel toodetakse transmebraanset valku tsüsteiin (vt tabel 7), ja introni lookuses muteerunud tüümini nukleotiid (vt tabel 8). Järeldub, et (4) Reia on hõbemutatsiooni suhtes homosügoot. Hõbemust fenotüüp kinnitab genotüüpi. Samuti esineb Reial silmade defekt, mis on sage nähtus hõbemutatsiooni suhtes homosügootsete isendite puhul (vt joonis 10).

4. ARUTELU

4.1. Eesti hobuse värvikirevuse tagamaad

Eesti hobune pole alati nii värvikirev olnud kui tänapäeval. Algseteks värvusteks peetakse kõrbi ja ulukvõiku, värviliselt mitmekesisemaks muutus eesti hobune kodustamise käigus (vt ptk 1.2.). PMEL17 mutatsiooni olemasolu pikaajalisusele eesti hobuse genotüübis siinses uurimuses täpset vastust ei leitud. Teooriad on erinevaid, kuid jooniselt 1 võib näha, et hõbe on pikaajaline nähtus hobuste geno- ja fenotüübis ning võis olla esindatud ka eesti hobuse aborigeensetel eellastel. Teadmine, et eesti ja soome hobune on väljaarenenud samast eellasest, paneb kahtluse alla Randlahti väite, et hõbemutatsioon tuli eesti hobuse genotüüpi soome hobuselt (vt ptk 1.4.).

4.2. Sugupuu uuringu ja katseliste tulemuste kokkulangevus

Värvuseid käsitledes peab arvestama, et värvused pole üheselt määratud omadused. Ühe fenotüübilise värvuse tekkimiseks on palju erinevaid genotüübilisi mudeleid (kombinatsioone). Siinses uurimuses võeti vaatluse alla vaid hõbemutatsioon. Mutatsiooni olemasolu või puudumine ei anna tõestust teiste geenialleelide esinemisele. Värvusnimetuses esinevad must, hiirjas ja kõrb on fenotüübiliselt määratud omadused.

Sugupuud mööda liikudes tehtud järeldused hõbedat põhjustava mutantse alleeli olemasolu ja sügootsuse kohta said katseliselt kinnitust. Tuul ja Voore Antaris osutusid mutatsiooniga heterosügootideks, Reia homosügootiks, mille oletusele andis alust ka homosügootsusega tihti kaasnev silmadefekt (vt joonis 10), ja Tukker mutatsioonita homosügootiks (vt ptk 3.). Teadmine hõbemutatsiooni esinemise ja sügootsuse kohta hobusel on olulised, kuna teadliku aretusega on võimalik vältida homosügootseid, suure silmaanomaalia esinemise riskiga isendeid.

On võimalik, et hõbemutatsiooni suhtes homosügootsed hobused on heledamad kui heterosügootsed isendid, kuid seda pole veel teaduslikult tõestatud (Brunberg *et al.*, 2006). Väidet kinnitab homosügootse Reia fenotüüp, mis on oluliselt heledam heterosügootse Tuule omast. Joonisel 7 on näha, et Reia näol ja kõhu alaosal on rohkem heledaid varjundeid kui Tuulel, lakk ja saba on samuti valkjamad kui Tuule pigem kollakad jõhvid. Tuule ja Reia juures pandi tähele, et hõbemustad hobused sünnivad võrdlemisi heledana ja lähevad elu jooksul tumedamaks. Tumenemine võib toimuda ka jõhvides. Võrdlev pilt hõbemustast Tuulest ja Reiast varssadena on leitav lisast 2.

4.3. Teadlikkus hõbemustast värvusest

Inimeste teadlikkus hobuste värvusnimetustest sõltub nende kokkupuutest hobustega. Levinumad värvuste nimetused nagu kõrb, raudjas, must on üldjuhul tuntud ka hobuvõõraste

inimeste seas. Samuti teatakse laiemalt ilukirjanduses esinevaid värvusnimetusi: tuhkur, õunik, kimmel, kuid enamasti ei osata neid nimetusi fenotüübiga kokku viia. Lisaks on eesti hobusel ebatavaliselt palju värvusnüansse, mille tabamine eeldab spetsiifilist ettevalmistust, erinevalt paljudest teistest tõugudest, mis on monotoonsema värviskaalaga.

Järelepärimiste tulemusena selgus, et nimetus hõbemust ja vastav värvus on ühtviisi tundmatud nii hobustega mitte tegelevate kui ka paljude hobustega tegelevate inimeste seas. Üks põhjus on kindlasti see, et hõbemust on uus nimetus, mis võeti kasutusele 2004. aastal. Seetõttu võivad vanemate generatsioonide inimesed tunda värvust raudja ühe väljundina, nagu seda varem tihti kategoriseeriti.

Teine põhjus vähesele teadlikkusele värvustest on see, et ei osata hinnata nende tundmise praktilist väärtust. Ometi on hobuse aretaja ja tõu edasiarendaja jaoks tegu tähtsa küsimusega. Teadmine, milliseid värvuseid eelistatakse (ka alateadlikult) ja kuidas vältida värvustega kaasnevaid haiguseid, on kasuks loomade turustamisel.

Hobuse värvus ja märgised omavad paratamatult inimese jaoks tähtsust, kuid harva esitatakse küsimus, miks hobune mingit värvi on. Värvuste tekkemehhanismidest huvitumine pakuks uue väljundi hobustega tegelemiseks ja aitaks hobuinimesel oma lemmikut täiesti uuest aspektist paremini tundma õppida.

4.4. Segadus värvusnimetustega

Uurimuse käigus selgus, et kasvavad värvusgeneetikaalased teadmised on kaasa toonud suure segaduse värvusnimetuste alal.

Esiteks kerkib esile küsimus, kas peaks hakkama värvuseid nimetama genotüübi või fenotüübi alusel. Rahvasuus tuntud fenotüübiliselt määratud värvusnimetused jäävad segaseks (osadel juhtudel osutuvad kitsendavaks, teistel juhtudel jällegi liiga laiahaardeliseks) genotüübiliste värvuste määramisel, sest silmaga eristamatute fenotüübiliste värvusteni võib jõuda erinevate genotüüpide alusel. Näiteks raudjas hobune, kes kannab hõbemutatsiooni, kuid kellel mutatsioon ei avaldu fenotüübis, peaks olema genotüübi järgi hõberaudjas. Lisaks tekib küsimus, kui paljude geenide alleele peaks nimetuses mainima, sest kõikide geenide esinemisvormide üles loetlemine ei oleks praktiline. Peale selle pole eesti hobuse kohta hetkel ammendava genotüübpõhise nimetuste süsteemi loomiseks piisavalt infot ja on vähe tõenäoline, et lähiajal viidaks läbi suuremahuline hobuste värvuse tuvastamise geneetiline ekspertiis.

Teiseks puuduvad eesti keeles mõisted paljude fenotüübiliselt selgete värvuste nimetamiseks, mis näiteks ingliskeelses terminoloogias on olemas. Uued rahvapärased nimetused on antud ainult osadele nüüdseks eristatavatele värvustele, näiteks uuritav hõbemust. Ka siinses

uurimuses kasutatud värvusnimetused on eestikeelse vaste puudumisel tuletatud inglise keelest, näiteks ingliskeelne *Smokey* ja eestikeelne suitsjas või tomujas.

Ideaalis võiks olla korralik eestikeelne värvusnimetuste süsteem, mille abil hobuseid määrata ja ära tunda. Üheks võimalikuks lahenduseks on Priidu Tikku välja pakutud idee, kus värvusnimetuste süsteem on kahetasandiline: esimese tasandi moodustavad üldkasutuses olevad fenotüübilised värvusnimetused, mis on loogilised ja lihtsalt mõistetavad ja millest piisab enamike hobuste eristamiseks. Selle käigus võiks ellu äratada ka rahvasuus kõlanud nimetused nagu lepu punase hobuse kohta või iiru alternatiivina hõbemustale. Teise tasandi moodustavad genotüübiliselt määratud spetsiifilised värvusnimetused, mis oleksid määratud vastavalt genotüübile ja võiksid kasuks tulla nii veterinaarile kui ka hobusearetajale.

KOKKUVÕTE

Eesti hobune (eesti maahobune) on Eesti aladel aborigeenne tõug. Siinsetes rasketes elutingimustes vähenõudlikuks ja vastupidavaks kujunenud eesti hobuse tänapäeval enim tähelepanu äratavaks omaduseks on tõu eriline värviküllus. Peale teiste laialt levinud värvide on eesti hobuse fenotüübis esindatud ka hõbe värvus, mis on geneetiliselt päranduv ja seostatud mitme geenimutatsiooniga.

Siinne uurimistöö käsitleb hõbemutatsiooni pärandumist ja avaldumist hõbemusta eesti hobuse Muuksi Tuule (edaspidi Tuule) näitel. Uurimusse olid kaasatud täpsemate järelduste tegemiseks Tuule isa Tukkeri, ema Reia ja poolvenna Voore Antarise geneetiline materjal.

Uurimuse teoreetilises osas selgus, et värvuslik mitmekesisus hakkas hobusel kujunema juba ligi 3500 eKr kodustamise käigus; turvaline elu inimese seltsis on ka eesti hobuse värvikirevuse põhjus. Tõenäoliselt on PMEL17 missense mutatsioon eesti hobusel aborigeenne nähtus ega pole lähiajal mõnelt teiselt tõult sisse tulnud. Sugupuude uurimisest selgus, et hõbedase fenotüübiga eesti hobused koonduvad kolme põhiliini: Rommi, Epu ja Edgari liin.

Tuule sugupuu uurimise ja värvusgeneetika alaste teadmiste põhjal tehtud oletused Tuule ja Voore Antarise heterosügootsusest ja Reia homosügootsusest PMEL17 mutatsiooni suhtes, ning Tukkeri mutatsioonita homosügootsuse kohta, said töö praktilises osas katselise kinnituse. Samuti tõestati sellega hõbemutatsiooni kandumine Muuksi Tuuleni emaliini (Rommi liini) pidi. Varem teistel hobuse tõugudel kirjeldatud MCOA silma anomaalia seotus PMEL17 mutatsiooniga sai kinnitust hõbemutatsiooni suhtes homosügootsel eesti hobusel Reial, kes moodustise tõttu vasakus silmas sellest silmast pime on.

Kasvavad värvusgeneetika alased teadmised on kaasa toonud suure segaduse värvusnimetuste alal. Rahvasuus tuntud fenotüübiliselt määratud värvusnimetused jäävad segaseks või osutuvad eksitavateks genotüübiliste värvuste määramisel. Osad uurimuses kasutatud värvusnimetused on eestikeelse vaste puudumisel tuletatud inglise keelest, kuid ideaalis võiks olla korralik eestikeelne värvusnimetuste süsteem, mille abil hobuseid määrata ja ära tunda. Üheks potentsiaalseks variandiks on Priidu Tikku välja pakutud kahetasandilise värvusnimetuste süsteemi idee, kus esimese tasandi moodustavad rahvasuust pärinevad fenotüübilised värvusnimetused, teise tasandi genotüübiliselt määratud spetsiifilised värvusnimetused.

Järeldärimiste kohaselt selgus, et hõbemust värvus ja sellega kaasnevad võimalikud okulaarsed anomaaliad on hobuinimeste jaoks veel tundmatu ala. Siinse uurimistöö üks väljunditest võiks olla inimeste teadlikkuse kasv eesti hobuse värvustest, eelkõige hõbemustast värvusest ja olla tõukeks eesti hobuse värvusnimetuste süsteemi edasi arendamiseks ja korrastamiseks.

Siinne töö võiks ühtlasi innustada hobuste värvuste geneetilise ekspertiisi läbiviimist Eesti tingimustes ja julgustada hobuinimesi oma huviobjekti teaduslikult uurima.

RESÜMEE

Uurimistöö „Hõbegeeni pärandumine eesti tõugu hobuse genofondis ja avaldumine fenotüübis Hõbemust“ kirjeldab eesti tõugu hõbemusta hobuse Muuksi Tuule näitel hõbedast fenotüüpi põhjustava PMEL17 mutatsiooni esinemist.

Uurimus selgitab PMEL17 mutatsiooni mõju hobusele. Hõbemutatsioon põhjustab musta pigmendi lahjenemist (ingl *dilution*), mille tulemuseks on hõbemusta hobuse korral mustja keha ja valkjate jõhvidega isend. Hõbemutatsiooni esinemine on teaduslikult seotud MCOA silma anomaaliaga, mis esineb valdavalt homosügootsetel isenditel.

Praktilises osas tehti sugupuu põhjal teoreetilised oletused PMEL17 punktmutatsiooni esinemise ja sügootsuse kohta Muuksi Tuulel ja tema kolmel lähisugulasel, et teha kindlaks kumba liini pidi (ema- või isaliini) mutantne alleel Tuuleni jõudnud on. Hüpoteese kontrolliti katseliselt, mille tulemusena kinnitati Muuksi Tuule heterosügootsus, ema Reia homosügootsus ja emapoolse poolvenna Voore Antarise heterosügootsus PMEL17 mutatsiooni suhtes, ning et isa Tukker on mutatsioonita homosügoot. Saadud tulemuste baasil tõestati ära hõbemutatsiooni liikumine suguvõsa emaliini mööda.

Lisaks individipõhisele uuringule annab uurimus vastuse eesti hobuse värvikirevuse võimalikule põhjusele ja mutantse hõbegeeni päritolule eesti hobuse genofondis. Uurimuses selgus, et värvuslik mitmekesisus hakkas hobusel kujunema kodustamise käigus seoses karva värvuse kaitsefunktsiooni taandumisega juba ligi 3500 aastat eKr, mis on aluseks ka eesti hobuse värvikirevusele. Tõenäoliselt on paljudel aborigeenidel esinev PMEL17 missense mutatsioon ka eesti hobusel aborigeenne nähtus ega pole lähiajaloos mõnelt teiselt tõult sisse tulnud.

Hobuhuviliste üldine teadlikkus eesti hobuste värvustest on pigem tagasihoidlik. Värvusgeneetika arenguga on tekkinud lõhe uute teadmiste ja keeleliselt kasutusel olevate värvusnimetuste vahel, mis tekitab palju segadust. Uurimuses pakutakse välja üks võimalik lahendus värvusnimetuste süsteemi loomiseks.

SUMMARY

The current research paper “The Inheritance of the *Silver* Gene in the Gene Pool of the Estonian Horse and the Expression of the Gene in the *Silver Dapple* Phenotype” describes the occurrence of the PMEL17 mutation that causes the Silver phenotype on the example of an Estonian horse called Muuksi Tuul.

The aim of the research is to explain the effect that the PMEL17 mutation has on the horse. The Silver mutation causes the dilution of black pigment which in case of a Silver dapple horse appears in a blackish body and in the white mane and tail. The association between the occurrence of Silver mutation and the MCOA syndrome, which mostly affects homozygous horses, is scientifically proven.

In the practical part, first assumptions were made, based on the research on a family tree about the occurrence and zygosity of the PMEL17 missense mutation in the genotypes of Muuksi Tuul and his three close relatives, to verify whether the mutant allele originates from the maternal or paternal strain. Hypotheses were confirmed experimentally: Muuksi Tuul was proven to be heterozygous for the mutant allele, her mother Reia homozygous, his maternal half-brother (uterine brother) Voore Antaris heterozygous and his father Tukker homozygous for the wild type allele (the allele without the mutation). The results of the experiment confirmed that the mutant allele originates from the maternal strain of the family tree.

In addition to the studies about individual horses, the research offers a possible reason to the wide range of coat colors of the Estonian native horse and gives a possible answer to the origin of the Silver gene in the genotype of the Estonian native horse. It appeared that the diversity of colours started to grow during the domestication of the horse approximately 3500 years BC as the importance of the protective coloration became reduced, which is also the main reason for the large variety of colours among Estonian native horses. It is probable that the missense mutation in PMEL17 is a native phenomenon in the gene pool of the Estonian native horse, as it is for many native horse breeds, and has not entered in the gene pool from another breed in recent history.

The awareness about horse coat colours in the community of their breeders and lovers is relatively low. A gap in knowledge can be noted between new knowledge in colour genetics and linguistically used colour terms. The research at hand proposes one possible solution for creating a system for the designations of the (Estonian) horse coat colours.

RÉSUMÉ

Le titre de cette recherche est „ L'hérédité du gène *Silver* dans le patrimoine génétique du cheval estonien et sa manifestation dans le phénotype *Silver dapple* “. Son objectif est d'observer et vérifier l'existence de la mutation PMEL17, responsable du phénotype *Silver*, dans le génotype du cheval estonien Muuksi Tuul, de couleur *Silver dapple*.

Nous procédons par l'observation de l'effet que la mutation PMEL17 implique sur la couleur du cheval. En fait, la mutation *Silver* cause la dilution du pigment noir, surtout dans les crins noirs, ce qui engendre une crinière et une queue claires (blanches, ivoires, grises ou encore argentées) et un corps de couleur foncé avec des pommelures. Le lien entre la présence du gène *Silver* et l'anomalie oculaire MCOA, observé surtout chez les porteurs de deux copies du gène mutant, a été scientifiquement prouvé.

Ensuite, dans la partie pratique nous avons formulé l'hypothèse à partir des données de l'arbre généalogique, sur la présence et la zygosity de mutation ponctuelle PMEL17 dans les génotypes de Muuksi Tuul et de ses trois géniteurs proches. Ce qui est nécessaire pour vérifier si le gène mutant est originaire de la lignée maternelle ou de la lignée paternelle. Les hypothèses avancées ont été mises à l'épreuve par une expérience scientifique dont les résultats ont confirmé l'hétérozygosity de Muuksi Tuul, l'homozygosity de sa mère Reia, l'hétérozygosity de son demi-frère maternel Voore Antaris et l'homozygosity sans la mutation de son père Tukker. Sur la base de ces résultats on a pu prouver la transmission de la mutation *Silver* à travers la lignée maternelle.

À part la recherche menée sur les cas individuels, l'étude explique les causes de l'existence d'une large diversité de couleurs des robes du cheval estonien. Elle répond aussi à la question de l'origine du gène *Silver* dans le génofond du cheval estonien. Il est apparu que la variation de couleurs des robes du cheval a commencé à se former pendant la domestication des chevaux il y a à peu près 3500 ans avant J. C., ce qui est également la cause de la diversité des robes parmi les chevaux estoniens. Il est probable que la mutation faux-sens PMEL17, représentée dans les patrimoines génétiques de la plupart des races aborigènes, est un phénomène indigène aussi chez le cheval estonien.

La connaissance des noms des couleurs des robes parmi les cavaliers et les amateurs des chevaux est plutôt discrète. Avec le développement de la génétique des couleurs de robe, un écart est apparu entre les nouvelles connaissances et les termes utilisées dans la langue courante. Pour résoudre cette situation, notre étude propose un nouveau système de terminologie pour les couleurs des robes du cheval estonien que nous estimons utile pour combler l'écart entre langue courante et terminologie scientifique.

VIITED

- Andersson, L. S., Wilbe, M., Viluma, A., Cothran, G., Ekesten, B., Ewart, S., & Lindgren, G. 2013. *Equine Multiple Congenital Ocular Anomalies and Silver Coat Colour Result from the Pleotropic Effects of Mutant PMEL*. PLOS ONE, 8(9). Kättesaadav: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0075639> (10.12.2018).
- Battaglia, V. 2006. *Le cheval blanc*. Kättesaadav: http://www.dinosoria.com/cheval_blanc.htm (07.08.2018).
- Brunberg, E., Andersson, L., Cothran, G., Sandberg, K., Mikko, S., & Lindgren, G. 2006. *A missense mutation in PMEL17 is associated with the Silver coat color in the horse*. BMC Genetics, 7:49, 1–10. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1186/1471-2156-7-46> (10.12.2018).
- Brunberg, E., Gille, S., Mikko, S., Lindgren, G., & Keeling, L. J. 2013. *Icelandic horses with the Silver coat colour show altered behaviour in a fear reaction test*. Elsevier, 72–78. Kättesaadav: http://www.academia.edu/14084574/Icelandic_horses_with_the_Silver_coat_colour_show_altered_behaviour_in_a_fear_reaction_test (10.12.2018).
- Chromosomes and Genes*. Kättesaadav: http://www.equine-world.co.uk/breeding-horses/basic_genetics.asp (24.06.2018).
- Clark, L. A., Wahl, J. M., Rees, C. A., & Murphy, K. E. 2005. *Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog*. Kättesaadav: <http://www.pnas.org/content/pnas/103/5/1376.full.pdf> (10.12.2018).
- Eesti NSV Põllumajanduse Ministeeriumi Teaduslik-Tehnilise Informatsiooni Valitsus 1977. *Eesti hobuste riiklik tõuraamat III köide*. Tallinn.
- Eesti tõugu hiirjas sugutäkk Apollo 778E*. Kättesaadav: <http://www.vooretallid.com/sugutakk-apollo> (27.10.2018).
- Eesti tõugu mära Reia täkkvarss 30. juuli 2018*. Kättesaadav: <http://www.vooretallid.com/eesti-hobune/voore-varsad-2018/reia-varss> (28.09.2018).
- EHKAS – Eesti hobuse eest, *Ajalugu*. Kättesaadav: <http://eestihobu.ee/about/ajalugu/> (06.11.2018).
- Harris, M. C., & Swinney, N. J. 2010. *Chevaux*. GEO.
- Hõbemust Reia*. Kättesaadav: <http://www.esthorse.ee/index.php?id=hobuste-varvused> (12.09.2018).
- Kentucky Equine Research 2011. *Sunburn & Photosensitivity: Too Much of a Good Thing*, Canadian Horse Journals, Kättesaadav: <https://www.horsejournals.com/sunburn-photosensitivity-too-much-good-thing> (10.12.2018).

- Kerje, S., Sharma, P., Gunnarsson, U., Kim, H., Bagchi, S., Fredriksson, R., ... Andersson, L. 2004. *The Dominant white, Dun and Smoky Color Variants in Chicken Are Associated With Insertion/Deletion Polymorphisms the PMEL17 Gene*. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1448810/pdf/7995.pdf> (10.12.2018).
- Kwon, B. S., Chintamaneni, C., Kozak, C. A., Copeland, N. g., Gilbert, D. J., Jenkins, N., ... Kim, K. K. 1991. *A melanocyte-specific gene, Pmel17, maps near the silver coat color locus on mouse chromosome 10 and is a syntenic region on human chromosome 12*. Kättesaadav: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC52687/pdf/pnas01070-0374.pdf> (10.12.2018).
- Parker, J., & Stanton, J. 2009. *Mütoloogia*. Pegasus.
- PRIA, *Hobuslaste register*. Kättesaadav: <https://ariel.pria.ee/hobu/> (23.10.2018).
- Randlaht, I. 2011. *Eesti hobuse värvused*. Eesti hobune, 33–38. Kättesaadav: <https://www.pikk.ee/upload/files/Loomakasvatus/Eesti-Hobune-2011-WEB.pdf> (10.12.2018).
- Randlaht, I. 2015. *Populaarne hõbegeen võib hobused pimedaks teha*. Kättesaadav: <http://lemmikloom.delfi.ee/loomad/populaarne-hobegeen-voib-hobused-pimedaks-teha?id=71739669> (10.07.2018)
- Raudsepp, T. 2008. *Quo vadis hobusegeneetika aastal 2008?* Oma Hobu, 2, 60–63.
- Raudsepp, T. 2011. *Heal hobusel ei ole värvi*. Eesti hobune, 6–16. Kättesaadav: <https://www.pikk.ee/upload/files/Loomakasvatus/Eesti-Hobune-2011-WEB.pdf> (10.12.2018)
- Reino, H. 2008. *Klassikaline geneetika*. Kättesaadav: <https://www.slideshare.net/helina20/klassikaline-geneetika> (10.12.2018)
- Rokkar 713E. Kättesaadav: http://www.esthorse.ee/index.php?id=hobused&horse_id=51 (26.10.2018)
- Rotser 742E. Kättesaadav: http://www.esthorse.ee/index.php?id=sugutakud&horse_id=7 (26.10.2018)
- Schonhaler, H. B., Lampert, J. M., Lintig, J. von, Schwarz, H., Geisler, R., & Neuhauss, S. C. F. 2005. *A mutation in the silver gene leads to defects in melanosome biogenesis and alterations in the visual system in the zebrafish mutant fading vision*. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.001> (10.12.2018)
- Sponenberg, D. P., & Bellone, R. 2017. *Equine Color Genetics* (Fourth Edition). Wiley Blackwell.
- Tikk, P. 2015. *Armastagem oma hobust sellisena, nagu ta on*. Oma Hobu, 51–53.
- Tukker 703E. 2011. Kättesaadav: http://www.esthorse.ee/index.php?id=sugutakud&horse_id=38 (28.09.2018)

Unioonpeedia. Kättesaadav: https://et.unionpedia.org/i/Aborigeenne_t%C3%B5ug (27.10.2018).

Viinalass, H. 2011. *Põllumajandusloomade aretusmeetmete ja kohalike ohustatud tõugude säilitusmeetmete täiustamine*. Eesti Maaülikool. Kättesaadav: https://www.pikk.ee/upload/files/Teadusinfo/Viinalass_PM_lopparuanne_2011.pdf (12.12.2018).

Värvused ja eesti hobune. Kättesaadav: <http://www.esthorse.ee/index.php?id=diagrammid> (06.12.2018).

Wade, C., Giulotto, E., Sigurdsson, S., Zoli, M., Gnerre, S., Imsland, F., ... Lindblad-Toh, K. 2009. *Genome sequence, comparative analysis and population genetics of the domestic horse (Equus caballus)*. Science (New York, N.Y.), 326(5954), 865–867. Kättesaadav: <https://doi.org/10.1126/science.1178158> (10.12.2018)

Wellman, K. 2014. *There's NO such thing as an albino horse!* Kättesaadav: <http://www.whitehorseproductions.com/white.html> (16.09.2018)

Wilson, D. E., & Reeder, D. M. 1982. *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (3. tr, Kd 1). The Johns Hopkins University Press Baltimore.

Wutke, S., Benecke, N., Sandoval-Castellanos, E., Döhle, H.-J., Friederich, S., Gonzalez, J., ... Ludwig, A. 2016. *Spotted phenotypes in horses lost attractiveness in the Middle Ages*. Scientific Reports, 6.

LISA 1. Eesti Hobuse Kaitse Ühingu 2011. aasta eesti hobuse värvuste plakat



Must (*Black*) aaE



Pleekiv must (*Fading black*) aaE



Kõrb (*Bay*) AE



Tumekõrb (*Dark bay*) AE



Ulukvõik (*Dun*) AED



Kõrbhiirjas (*Bay dun*) AED



Raudjas (Chestnut) a(A)ee



Tumeraudjas (Dark chestnut) a(A)ee



Mustjaskõrb (Black bay) AE



Hall (Gray) Kõik+G



Punahiirjas (Red dun) a(A)eeD



Hiiirjas (Grullo) aaED



Valkjaskollane (*Cremello / Perlino*) $a(A)eeCrCr/AECrCr$



Kollane (*Palomino*) $a(A)eeCr$



Hõbekõrb (*Bay silver*) AEZ



Hõbemust (*Black silver / Silver dapple*) $aaEZ$



Linalakk (*Flaxen*)



Tumedad varjundid / pigi (*Shooty*)



Võik (*Buckskin*) AECr



Ahkmust (*Smokey black*) aaECr



Hõbevõik (*Silver buckskin*) AECrZ/AEDCr



Kimmel / moorapea (*Roan*) Kõik+Rn



Heledad varjundid / tuhkur (*Pangare / Mealy*)



Kimmel-raudjas (*Sabino / Rabicano*)

Joonis 12. 2011. aasta seisuga kirjeldatud eesti hobuse värvused. (Randlaht, 2011, lk 17)

**LISA 2. 1) Muuksi Tuul ja 2) Reia valkjas-pruunikas
varsakarvas**



Joonis 14. Hõbemustad 1) Muuksi Tuul ja 2) ema Reia valkjas-pruunikas varasakarvas. Pildil 1 on näha tumedamat ninaümbrust, kus varsakarv vahetuma hakkab. („Hõbemust Reia“.; Randlaht, 2015)

LISA 3. Muuksi Tuule hõbegeeni põhjustatud heledad mustrid jalgadel ja kõhu alaosal



Joonis 15. PMEL17 lookuse mutatsiooni põhjustatud pigmendi lahjenemine jalgadel ja kõhu alaosal.
(autori erakogu)