

Erfðabreytileiki í *MC1R* geninu í muskóttum (glóbrúnum) íslenskum hrossum

Hera Sól Hafsteinsdóttir



Landbúnaðarháskóli Íslands
Agricultural University of Iceland

Erfðabreytileiki í *MC1R* geninu í muskóttum (glóbrúnum) íslenskum hrossum

Hera Sól Hafsteinsdóttir

10 eininga lokaverkefni sem hluti af
Bachelor of Science-prófi í Búvísindum

Leiðbeinendur: Ólöf Ósk Guðmundsdóttir og Sæmundur Sveinsson

Ræktun & fæða

Landbúnaðarháskóli Íslands

Hvanneyri, nóvember 2022

Íslenskur titill: Erfðabreytileiki í *MC1R* geninu í muskóttum (glóbrúnum) íslenskum hrossum
Enskur titill: Polymorphism in the *MC1R* gene in smoky black Icelandic horses
10 eininga lokaverkefni sem hluti af Bachelor of Science

Höfundarréttur © 2022 Hera Sól Hafsteinsdóttir
Öll réttindi áskilin

Búvísindi
Ræktun & fæða

Landbúnaðarháskóli Íslands
Hvanneyri
311 Borgarnes
Sími: 433 5000

Skráningarupplýsingar:
Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022, *Erfðabreytileiki í MC1R geninu í muskóttum (glóbrúnum) íslenskum hrossum* BS ritgerð, Búvísindi, Landbúnaðarháskóli Íslands, 73 bls.

Yfirlýsing

Hér með lýsi ég því yfir að verkefni þetta er byggt á mínum eigin athugunum, er samið af mér og að það hefur hvorki að hluta né í heild verið lagt fram áður til hærri prófgráðu.

Hera Sól Hafsteinsdóttir

Hera Sól Hafsteinsdóttir

Ágrip

Muskóttur (glóbrúnn) er fágætur brúnleitur litur sem finnst í íslenska hrossakyninu. Erfðafræðilegur bakgrunnur litarins er ekki fullþekktur en líklegt er að hann komi fram vegna áhrifa nokkurra erfðasæta á brúnan grunnlit sem er arfblendinn fyrir leirlit. Eitt þeirra erfðasæta sem líklegt er að hafi áhrif er E-sæti, þar sem að genið *MC1R* stýrir litarefnamyndun ýmist í átt að svörtu eða brúnu eumelanín eða rauðu, gulu eða appelsínugulu feómelanín. Tvær meginsamsætur finnast í E-sæti í hrossum. Önnur þeirra er villigerðin E^+ sem er ríkjandi og eykur myndun eumelaníns, hin er samsætan E^e sem er víkjandi og raskar virkni *MC1R* gensins svo að feómelanín er myndað. Í E-sæti geta hross með brúnan grunnlit ýmist haft arfgerð E^+E^+ eða E^+E^e en almennt er ekki hægt að greina hvora arfgerðina þau bera útfrá lit þeirra. Arfgerð í E-sæti hefur þó áhrif á lit þar sem að tíðni E^+E^+ arfgerðar hefur reynst hærri í dökkum blæbrigðum brúns grunnlitar og lítilsháttar hvít mynstur eru umfangsmeiri í brúnum hrossum með arfgerð E^+E^e .

Markmið þessarar rannsóknar var að greina hvort að arfgerð í E-sæti geti haft áhrif á það hvort brúnt hross sem er arfblendið um leirlit verði brúnt eða muskótt að lit. Erfðasýnum var safnað úr 48 brúnum, skolbrúnum og muskóttum íslenskum hrossum sem talin voru bera leirlit. Genin *MC1R*, *ASIP* og *MATP* voru arfgerðargreind og tengsl arfgerðar í E-sæti við litasvipgerð hrossana athuguð með tölfræðigreiningu.

Niðurstöður rannsóknarinnar benda til þess að ekki séu tengsl á milli arfgerðar í E-sæti og muskóttis litar í íslenskum hrossum og að áhrif frá öðrum erfðasætum í samspili við arfblendni fyrir leirlit valdi því að muskóttur litur komi fram.

Lykilorð: hross, arfgerðargreining, erfðabreytileiki, muskóttur (glóbrúnn), *MC1R*, *MATP*

Þakkir

Fyrst og fremst vil ég þakka eigendum og umráðamönnum hrossa sem tóku þátt í verkefninu. Ég þakka þeim kærlega fyrir að taka vel á móti mér, leyfa mér að skoða hrossin sín og fá erfðasýni úr þeim og lána mér myndir af þeim. Án þeirra hefði framkvæmd verkefnisins verið ómöguleg.

Allir þeir sem sýndu verkefninu áhuga, bentu mér á hross og aðstoðuðu mig við að hafa samband við eigendur fá miklar þakkir fyrir. Einnig vil ég þakka Guðna Þorvaldssyni fyrir aðstoð og góð ráð við mat á litasvipgerðum. Erla Sturludóttir fær einnig þakkir fyrir aðstoð við tölfraðilega úrvinnslu gagna.

Þakkir fær Erfðanefnd landbúnaðarins fyrir að styrkja verkefnið og Matís fyrir góða þjónustu. Sérstakar þakkir fær Guðbjörg Ólafsdóttir, sérfræðingur erfðasviðs hjá Matís, fyrir góðar útskýringar um framkvæmd arfgerðargreininga, yfirllestur verkefnisins og ábendingar varðandi málfar. Einnig vil ég þakka Freyju Imsland fyrir aðstoð við vinnslu verkefnisins og hönnun vísa fyrir arfgerðargreiningar.

Ég þakka leinbeinendum mínum, Ólöfu Ósk Guðmundsdóttur og Sæmundi Sveinssyni fyrir aðstoð og leiðsögn við úrvinnslu og skrif verkefnisins. Ólöfu vil ég sérstaklega þakka fyrir einstaka þolinmæði í minn garð á meðan að verkefnið var unnið.

Að lokum vil ég þakka kærasta mínum, Karli Vernharði Þorleifssyni og systur minni, Gunni Rún Hafsteinsdóttur fyrir yfirllestur verkefnisins. Karli vil ég einnig þakka sérstaklega fyrir að keyra með mér um landið til að skoða hross og fyrir ómetanlegan stuðning á meðan á skrifum stóð.

Efnisyfirlit

| | |
|--|-----------|
| 1. Inngangur | 1 |
| 1.1 Hrossarækt..... | 1 |
| 1.1.1 Íslenska hrossakynið | 1 |
| 1.2 Litaákvörðun spendýra | 2 |
| 1.2.1 Þroskaferli litfrumna..... | 2 |
| 1.2.2 Litarefnamyndun | 4 |
| 1.3 Litafar og litaerfðir hrossa..... | 6 |
| 1.3.1 E-sæti (<i>MC1R</i>) og A-sæti (<i>ASIP</i>) | 7 |
| 1.3.2 C-sæti (<i>MATP</i>)..... | 9 |
| 1.3.3 Ch-sæti (<i>SLC36A1</i>) | 9 |
| 1.4 Muskóttur (glóbrúnn) litur..... | 10 |
| 1.5 Arfgerðargreiningar | 11 |
| 1.6 Markmið..... | 12 |
| 2. Efni og aðferðir | 14 |
| 2.1 Einstaklingar..... | 14 |
| 2.1.1 Prófun arfgerðargreininga | 15 |
| 2.2 Undirbúningur hársýna | 16 |
| 2.2.1 Einangrun erfðaefnis | 16 |
| 2.2.2 Foreldragreining | 16 |
| 2.3 Fram- og afturvísar | 17 |
| 2.4 Kjarnsýrumögnun..... | 17 |
| 2.5 Rafdráttur og gelhreinsun..... | 19 |
| 2.6 Arfgerðargreining..... | 20 |
| 2.6.1 Raðgreining..... | 20 |
| 2.6.2 Skerðibútagreining | 21 |
| 2.7 Gagnaúrvinnsla | 21 |
| 3. Niðurstöður | 23 |
| 3.1 Foreldragreining..... | 23 |
| 3.2 Arfgerðargreining..... | 23 |
| 3.2.1 Raðgreining..... | 23 |
| 3.2.2 Skerðibútagreining | 24 |
| 3.2.3 Rafdráttur á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun | 25 |
| 3.2.4 Arfgerðir | 26 |
| 3.2.5 Aðrir breytileikar í <i>MATP</i> | 28 |
| 3.3 Tölfræðigreining – Fishers próf..... | 28 |
| 4. Umræður | 29 |
| 4.1 Prófun arfgerðargreininga | 29 |
| 4.2 Erfðabreytileiki í muskóttum (glóbrúnum) íslenskum hrossum | 29 |
| 4.3 Mat á litasvipgerðum..... | 30 |
| 4.4 Mögulegt framhald | 31 |
| 5. Ályktanir | 32 |
| 6. Heimildaskrá | 33 |

| | |
|------------------------------------|-----------|
| 7. Töfluskrá..... | 42 |
| 8. Myndaskrá..... | 43 |
| 9. Viðauki I..... | 45 |
| 10. Viðauki II..... | 46 |
| 10.1 Muskótt (glóbrún) hross | 46 |
| 10.2 Skolbrún hross | 54 |
| 10.3 Brún hross | 64 |

1. Inngangur

1.1 Hrossarækt

Talið er að maðurinn hafi haldið og ræktað hross (*Equus caballus*) í um 5.500 ár en hvar þau voru fyrst tamin (e. domesticated) hefur lengi verið umdeilt (Librado o.fl., 2016; Ludwig o.fl., 2009). Fornleifarannsóknir hafa bent til þess að fyrsta tamning hrossa hafi átt sér stað á gresjum Evrasíu (Kasakstan og Úkraína) (Ludwig o.fl., 2009; Raudsepp o.fl., 2019; Warmuth o.fl., 2012), sem á sínum tíma voru aðal búsvæði villtra forfeðra þeirra, Tarpan hrossa (*Equus ferus*) (Warmuth o.fl., 2012). Nýleg sameindaerfðafræðileg rannsókn Librado o.fl. (2021) á uppruna tamdra hrossa hefur nú staðfest að fyrsta tamning þeirra átti sér stað á vestrænum gresjum Evrasíu. Maðurinn gerði sér gott mót með því að temja hross, en engin tamin dýrategund (húsdýr) hefur haft jafn mikil áhrif á sögu hans og hrossin. Tilkoma þeirra umbreytti samgöngum, landbúnaði og hernaði (Librado o.fl., 2016; Raudsepp o.fl., 2019) þar sem að með þeim gátu menn ferðast lengra og hraðar en nokkurn tímann áður og auk þess nýtt þau til burðar og dráttar við ýmis störf (Levine, 1999).

Mörg hagnýt hlutverk hrossa hafa nú fallið upp fyrir en maðurinn hefur á margan hátt haldið nánnum tengslum við þau (Bowling og Ruvinsky, 2000) og í dag eru þau mikilsmetnir félagar í bæði leik og starfi (Ingimar Sveinsson, 2010). Með ræktunarstarfi og úrvali fyrir ákveðnum frammistöðueiginleikum, m.a. hraða, úthaldi og ganghæfni, og ólíkum svipgerðum, eins og sköpulagi, stærð og lit, hefur maðurinn búið til 400-500 mismunandi hrossakyn (Raudsepp o.fl., 2019). Á seinustu árum hafa sérstök ræktunarmarkmið unnið að því að bæta áður nefnda eiginleika með mismunandi áherslum á milli kynja. Þar af leiðandi eru flest hrossakyn í dag einangraðir erfðahópar sem einkennast af einsleitni innan kyns en miklum breytileika á milli kynja (Petersen o.fl., 2013). Fjöldi hrossa í heiminum virðist hafa haldist nokkuð stöðugur en talið er að hrossum hafi fækkað um einungis 0,6% síðastliðin 20 ár. Árið 2021 var fjöldi þeirra áætlaður 57.419.470 hross (Allan, 2021).

1.1.1 Íslenska hrossakynið

Íslensk hross eru talin afkomendur hrossa sem bárust til Íslands með skandinavískum landnámsmönnum í kringum árið 870 (Hendricks, 1995; Stefán Aðalsteinsson, 2004). Ályktað er að þeir hafi einungis flutt með sér fá úrvalshross þar sem að skipakostur þeirra var ekki stór og siglingaleið hingað til lands erfið (Albert Jóhannsson, 1991; Ingimar, 2010). Allt frá landnámi voru hross ómissandi hluti samfélagsins á Íslandi og voru lengi vel eina samgöngutækið á landinu (Ingimar, 2010) en í dag njóta þau mikilla vinsælda sem reiðhross, bæði á Íslandi og erlendis (Gunnfríður Elín Hreiðarsdóttir o.fl., 2014).

Íslenska hrossakynið er eitt elsta og hreinræktaðasta hrossakyn heims (Hendricks, 1995). Íslensku hrossin hafa að miklu leiti mótast af einangrun í um árþúsund (Ingimar, 2010), en margt bendir til þess að lítið eða ekkert af hrossum hafi verið flutt til landsins eftir árið 1.100 (Albert, 1991). Hross hafa þá verið ræktað hér á landi án nokkurrar blöndunar við önnur hrossakyn og varðveitt eiginleika sem tapast hafa í öðrum kynjum (Ingimar, 2010). Náttúran hefur einnig átt sinn þátt í mótun kynsins þar sem að ómild veðráttá, fódurskortur og önnur harðindi á fyrri árum leiddu til þess að einungis harðgerðustu hrossin lifðu af (Gunnfríður o.fl., 2014; Ingimar, 2010).

Umfram allt annað einkennir fjölbreytni íslensk hross og ber þar hæst að nefna fjölhæfni á gangi og litafjölbreytileika. Í mörgum erlendum hrossakynjum hefur hreinræktun lita verið stunduð (Albert, 1991) en það hefur ekki tíðkast á Íslandi og Íslendingar virðast hafa lagt áherslu á að eiga hross með fallega liti (Ingimar, 2010). Fleiri litir eru því til í íslenska hrossakyninu en í flestum öðrum kynjum eða alls 15 aðallitir sem með öllum getur komið fyrir skjótt, hjálmskjótt (Stefán, 2004), yrjuskjótt (Haase o.fl., 2009) og ýruskjótt mynstur (Haase o.fl., 2015).

1.2 Litaákvörðun spendýra

Litir og litamynstur spendýra eru á meðal fjölbreyttustu eiginleika sem finnast í náttúrunni (Caro og Mallarino, 2020). Litafar þeirra ákvarðast af tvenns konar litarefni (e. melanin) í húð, og hárum, annars vegar eumelanín (e. eumelanin) sem er svart eða brúnt að lit og hins vegar feómelanín (e. pheomelanin) sem ýmist er rautt, gult eða appelsínugult (Freyja Imsland, 2015). Litarefnin eru mynduð í sérstökum litfrumum (e. melanocytes) en þroskaferli þeirra á einnig sinn þátt í ákvörðun litafars þar sem að ferli litarefnamyndunar (e. melanogenesis) getur ekki átt sér stað fyrir en að starfhæfar litfrumur hafa náð þroska. Fundist hafa yfir 150 gen sem tengjast litafari spendýra (Cieslak o.fl., 2011) sem ýmist hafa áhrif á þroska litfrumnanna eða á litarefnamyndunina sjálfa (Rieder o.fl., 2001).

1.2.1 Þroskaferli litfrumna

Þroskaferli litfrumna hefst snemma á fósturstigi með aðgreiningu sortukímfrumna (e. melanoblasts) út frá fjölhæfum stofnfrumum hnoðakambsins (e. neural crest) (Cieslak o.fl., 2011; Liu o.fl., 2014). Þær fjölga sér um leið og þær flytjast frá hnoðakambi og setjast að í yfirhúð (e. epidermis) og háarsekkjum (Freyja, 2015), þar sem þær sérhæfast að lokum í litfrumur og mynda litarefni í sérstökum frumulíffærum sem kallast sortuagnir (e. melanosomes) (Caro og Mallarino, 2020). Röskun á þessu ferli getur gert það að verkum að litfrumur flytjast ekki eðlilega um líkamann eða séu jafnvel ófærar um að mynda litarefni, en í slíkum tilfellum kemur alhvítt eða hvítt mynstur fram í svipgerð einstaklings (e. leucism)

(Cieslak o.fl., 2011). Nokkur gen stýra þroskaferli litfrumna með því að hafa áhrif á aðgreiningu, flutning, fjölgun, sérhæfingu og/eða lifun sortukímfrumna og litfrumna (Steingrímsson o.fl., 2006; Thiruvankadan o.fl., 2008). Meðal þeirra er þekkt að genin *MITF*, *PAX3*, *SOX10*, *KIT* og *EDNRB* gegni mikilvægum hlutverkum (Cieslak o.fl., 2011). Mikill breytileiki hefur fundist í þessum genum í húsdýrum þar sem að maðurinn hefur stundað talsvert úrval fyrir mynstruðum svipgerðum sem tengjast þeim (Freyja, 2015), þar af hefur mestur breytileiki fundist í hrossum (Henkel, o.fl., 2019).

MITF kóðar fyrir umritunarþættinum *MITF* sem er mikilvægur fyrir þroska og starfsemi litfrumna (Steingrímsson o.fl., 2006). Umritunarþátturinn hefur oft verið nefndur aðalstjórnandi við ákvörðun litafars þar sem hann stýrir tjáningu fjölda gena sem tengd hafa verið við þroska sortukímfrumna á fósturstigi, myndun og þroska sortuagna í litfrumum og ferli litarefnamyndunar (Cieslak o.fl., 2011; Thomas og Erickson, 2008). Genin *PAX3* og *SOX10* kóða fyrir samnefndum umritunarþáttum en tjáningu *MITF* er m.a. stýrt af þeim (Thomas og Erickson, 2008). Stökkbreytingar í þessum þremur genum valda því að litfrumur skortir í húð og hári (Mort, o.fl., 2015) sem leiðir til margskonar alhvíttra eða hvít mynstraðra svipgerða (Hou og Pavan, 2008). Hauswirth o.fl. (2012) voru fyrst til að tengja breytileika í *MITF* við litafar í hrossum og greindu frá 10 basapara innsetningu í geninu sem veldur hjálmskjóttu/slettuskjóttu (e. splashed white) litamynstri sem einkennist einkum af hvítu á höfði, fótum og kvið. Að auki hafa fundist fimm aðrar stökkbreytingar sem tengjast hjálmskjóttu í hrossum, þar af þrjár í *MITF* og tvær í *PAX3* (Hauswirth o.fl., 2012, 2013; Henkel, o.fl., 2019; Magdesian o.fl., 2020).

KIT kóðar fyrir týrósin kínasa frumuhimnuviðtaka (*KIT*) sem er ásamt bindli sínum, *KITL*, nauðsynlegur fyrir flutning, fjölgun og lifun sortukímfrumna (Marklund o.fl., 1999; Mort, o.fl., 2015). Virk boðleið viðtakans fjölgar starfhæfum litfrumum m.a. með því að leiða til umbreytinga á *MITF* sem auka umritunarvirgni hans (Thomas og Erickson, 2008). Tengsl *KIT* við litafar í hrossum hafa mikið verið rannsökuð, en alls hafa fundist 24 stökkbreytingar í geninu sem valda allt frá lítilsháttar hvítu mynstri upp í alhvítt í svipgerð (Brooks o.fl., 2007; Brooks og Bailey, 2005; Haase o.fl., 2007, 2009, 2011 2015; Hauswirth o.fl., 2013; Holl og Bailey, 2010; Marklund o.fl., 1999).

EDNRB kóðar fyrir öðrum viðtaka, G-próteintengdum frumuhimnuviðtaka (*EDNRB*) (Steingrímsson o.fl., 2006), en genið er eitt af þeim sem stýrt er af *MITF* (Vachtenheim og Borovanský, 2010). *EDNRB* og bindill hans, *EDN3*, eru nauðsynlegir fyrir flutning og lifun bæði sortukímfrumna og iðratauga (e. enteric neurons) á degi 10,5 til 12,5 á fósturstigi (Hou og Pavan, 2008; Shin o.fl., 1999). Stökkbreytingar í *EDNRB* orsaka því margvíslegar hvítar

svipgerðir ásamt ýmsum lífeðlisfræðilegum kvillum en greint hefur verið frá slíkum tilfellum í mönnum (McCallion og Chakravarti, 2001), músum (Matsushima o.fl., 2002) og hrossum (Metallinos o.fl., 1998). Í hrossum felst stökkbreytingin í tvíbasabreytileika sem í arfblendnu ástandi veldur síðuskjóttu litamynstri (e. frame-overo) sem einkennist af hvítu á síðum og kvið en í arfhreinu ástandi er stökkbreytingin hins vegar banvæn. Arfhrein folöld fæðast alhvít með bleika húð og blá augu en deyja stuttu eftir köstun vegna þarmastíflu (Metallinos o.fl., 1998; Santschi o.fl., 1998; Yang o.fl., 1998).

1.2.2 Litarefnamyndun

Litarefni í húð og hárum spendýra gegna ýmsum hlutverkum, þar á meðal sem hluti af samskiptafyrirkomulagi og makavali þeirra, sem felu- eða hermilitir, vörn fyrir geislun frá sólu og varnaraðgerð gegn sníkjudýrum (Reissmann og Ludwig, 2013). Líkt og áður hefur verið nefnt er tvenns konar litarefni myndað í spendýrum, svart/brúnt eumelanín og rautt/gult/appelsínugult feómelanín. Litarefnin eru í grunninn bæði myndað úr amínósýrunni týrósín í gegnum hvarfleiðir litarefnamyndunar (Mort, o.fl., 2015; Thiruvankadan o.fl., 2008), sem eiga sér stað í sortuögnum litfrumna (Caro og Mallarino, 2020). Litarefnamyndun hefst með umbreytingu týrósíns yfir í 3,4-díhýdroxýfenýlalanín (DOPA) og því næst yfir í dópakínón (e. dopaquinone), en bæði efnahvörfin eru hvötuð af ensíminu týrósínasa (TYR) (Thiruvankadan o.fl., 2008). Skortur á TYR leiðir því til þess að ekkert litarefni myndast í litfrumum og annað form af alhvítu kemur fram í svipgerð einstaklings (albinismi) (Cieslak o.fl., 2011; Mort, o.fl., 2015). Breytileiki í TYR geninu, sem kóðar fyrir ensíminu TYR, hefur mikið verið rannsakaður í tengslum við litafar í húsdýrum (Cieslak o.fl., 2011), en greint hefur verið frá stökkbreytingum í geninu sem valda albinisma í m.a. köttum (Imes o.fl., 2006), nautgripum (Schmutz o.fl., 2004) og sauðfé (Stefán Aðalsteinsson, 1977). Ekki hefur verið greint frá albinisma í hrossum (Sponenberg og Bellone, 2017).

Eftir að dópakínón hefur verið myndað af TYR aðskiljast hvarfleiðir litarefnanna, en þar á eftir ræðst hvort myndað er eumelanín eða feómelanín af boðvirkni frumuhimnuviðtakans MC1R (Mort, o.fl., 2015).

Við eumelanín myndun er dópakínón umbreytt í dópakrómm (e. dopachrome) sem getur í framhaldi farið í gegnum tvær hvarfleiðir til að mynda eumelanín (Thiruvankadan o.fl., 2008). Í þeim leiðum koma genin *TYRP1* og *DCT* (einnig þekkt sem *TYRP2*) við sögu (Cieslak o.fl., 2011; Sulaimon og Kitchell, 2003). Önnur hvarfleiðin felur í sér umbreytingu dópakróms yfir í 5,6-díhýdroxýíndólkarboxýlsýru (DHICA) sem ensím *DCT* gensins hvatar. Í hinni hvarfleiðinni umbreytist dópakrómm án utanaðkomandi áhrifa yfir í brúnleitt 5,6-díhýdroxýíndól (DHI)

(Sulaimon og Kitchell, 2003; Thiruvankadan o.fl., 2008). *TYRP1* genið kóðar fyrir ensíminu TYRP1 sem er svo nauðsynlegt til að umbreyta brúnleitu DHI yfir í svart eumelanín (Cieslak o.fl., 2011). Stökkbreytingar í *TYRP1* geta því valdið brúnni svipgerð líkt og sýnt hefur verið fram á í m.a. köttum (Lyons o.fl., 2005), hundum (Schmutz o.fl., 2002), nautgripum (Berryere o.fl., 2003) og sauðfé (Gratten o.fl., 2007). Í rannsókn Rieder o.fl. (2001) var breytileiki í *TYRP1* geninu skoðaður í tengslum við litafar í hrossum. Tveir einbasabreytileikar (SNP) fundust í geninu en þeir reyndust ekki hafa áhrif á litafar hrossa í sýnahópi rannsóknarinnar, sem innihélt þó engin hross með brúna svipgerð (Rieder o.fl., 2001). Li o.fl. (2014) skoðuðu einnig breytileika í *TYRP1* í hrossum, nánar tiltekið Mongólskum hrossum. Niðurstöðum þeirra bar saman við rannsókn Rieder o.fl. (2001), en að auki var greint frá því að tjáning gensins reyndist mest í húð rauðra hrossa og minnst í húð grárna hrossa (Li o.fl., 2014).

Myndun feómelaníns er óháð ensímunum DCT og TYRP1 og á sér einungis stað í viðvist amínósýrunnar systeín (Lamoreux o.fl., 2002; Sulaimon og Kitchell, 2003) og fjarveru TYR (eftir myndun dópakínón í upphafi litarefnamyndunar) (Cieslak o.fl., 2011). Dópakínón sameindir hvarfast þá við systeín amínósýrur, við það myndast nokkrar gerðir systeínýldópa (e. cysteinyldopa) og frekari oxun á þeim leiðir svo til myndunar feómelaníns (Lamoreux o.fl., 2002; Thiruvankadan o.fl., 2008).

MC1R er G-próteintengdur frumhimnuviðtaki (Wolf Horrell o.fl., 2016) sem virkjar þá boðleið sem stýrir hlutföllum eumelaníns og feómelaníns í litarefnamyndun, ferli sem kallast *pigment type switching* (Freyja, 2015). Virk boðleið viðtakans er meginskilyrði fyrir eumelanín myndun (Wolf Horrell o.fl., 2016) en hún ýtir undir virkjun *MITF* gensins sem eykur síðan umritun genanna *TYR*, *TYRP1* og *DCT* sem líkt og áður hefur verið lýst stuðla að myndun eumelaníns (Levy o.fl., 2006). Hormónið α -MSH virkjar boðleiðina með því að bindast MC1R, hins vegar ef próteinið ASIP er til staðar binst það viðtakanum og hindrar boðleiðina sem veldur því að feómelanín er myndað í stað eumelaníns (Cieslak o.fl., 2011; Freyja, 2015). Það má því segja að hlutföll eumelaníns og feómelaníns í litarefnamyndun ráðist í gegnum MC1R og jafnvæginu á milli α -MSH og ASIP (Cieslak o.fl., 2011). Stökkbreytingar í *MC1R* geninu sem leiða til þess að viðtakinn tapar virkni sinni (e. loss-of-function mutations) leiða einnig til myndunar feómelaníns og hafa þær verið tengdar við litafar í mörgum dýrategundum (Suzuki, 2013). Samsætur slíkra stökkbreytinga eru almennt víkjandi í spendýrum og hafa því einungis áhrif á litarefnamyndun í arfhreinu ástandi, þar með nægir yfirleitt ein ríkjandi samsæta til að virkja myndun eumelaníns (Cieslak o.fl., 2011). Að sama skapi hefur verið greint frá stökkbreytingum í *ASIP* geninu og tengslum þeirra við litafar í fjölda dýrategunda (Hubbard

o.fl., 2010). Í geninu hafa einnig fundist bæði ríkjandi og víkjandi samsætur, þar sem ríkjandi samsætur valda myndun feómelaníns og víkjandi samsætur í arfhreinu ástandi valda myndun eumelaníns (Cieslak o.fl., 2011).

1.3 Litafar og litaerfðir hrossa

Litir og litaerfðir hrossa hafa lengi verið áhugaefni hrossaeigenda og -ræktenda (Thiruvenkadan o.fl., 2008) og hafa margir lagt upp með því að rækta einstaka liti. Litir hrossa eru almennt taldir hafa aðeins fagurfræðilegt gildi (Sponenberg og Bellone, 2017) en þá er rétt að vísa í skrif Ingimars (2010) sem segja: „góður hestur hefur „engan“ lit en litfagur gæðingur gleður auga eiganda síns.“ Litirnir eru þó nytsamlegir við auðkenningu einstaklinga og eru oft fyrsta vísbending um rangt ætterni (Rieder, 2009; Thiruvenkadan o.fl., 2008), en ákveðnir litir geta einnig aukið verðgildi og sölumöguleika hrossa sem bera þá (Ingimar, 2010). Villtar dýrategundir eru almennt einsleitir að lit á meðan húsdýr búa yfir meiri litafjölbreytileika og á það við um hross (Rieder, 2009). Í dag búa hross yfir miklum litafjölbreytileika en enginn litur virðist vera takmarkaður við aðeins eitt hrossakyn. Það bendir til þess að litatengdar stökubreytingar hafi átt sér stað snemma í tamningarferli villtra hrossa (Thiruvenkadan o.fl., 2008). Í rannsókn Ludwig o.fl. (2009) fékkst sú kenning staðfest þar sem lítill litafjölbreytileiki fannst á meðal villtra hrossa en breytileikinn jókst á meðal fyrstu tömdu hrossanna.

Rauður, brúnn og jarpur eru þrír grunnlitir hrossa og ákvarðast þeir af samspili tveggja erfðasæta, E- og A-sæti (Bailey og Brooks, 2020). Rauður litur einkennist af jafndreifðum rauðleitum lit um líkamann (feómelanín allsstaðar), á móti einkennist brúnn litur af jafndreifðum svörtum lit (eumelanín allsstaðar) og jarpur litur einkennist þá af rauðleitum lit á bók (feómelanín) en svörtum lit á faxi, tagli og fótum (eumelanín). Húð hrossa sem bera grunnlitina er yfirleitt svört og augu dökk (Rieder, 2009). Öll rauð, brún eða jörp hross eru þó ekki eins á litinn þar sem að fjölmörg blæbrigði geta komið fyrir í hverjum lit (Sponenberg og Bellone, 2017). Litirnir geta verið allt frá því mjög ljósir yfir í mjög dökkir (Thiruvenkadan o.fl., 2008) en blæbrigði þeirra ráðast af óþekktum erfðasætum (Bailey og Brooks, 2020).

Aðrir litir sem finnast í hrossum koma fram vegna áhrifa frá öðrum erfðasætum sem ýmist deyfja grunnlitina eða valda hvítu mynstri samhliða þeim (Thiruvenkadan o.fl., 2008). C-sæti er eitt þeirra sem deyfir grunnlitina. Arfblandið ástand í sætinu veldur því að rauður verður að leirljósum lit og jarpur verður að moldóttum lit, en það hefur almennt engin áhrif á brúnan grunnlit (Rieder, 2009). Leirljós litur einkennist af jafndreifðum gulleitum eða rjómalituðum lit á feld ásamt ljósu eða nánast hvítu faxi og tagli. Moldóttur litur einkennist af sama lit og leirljós á bók en svipar til jarpa litarins þar sem svartur litur heldur sér á faxi, tagli og fótum

(Bændasamtök Íslands, e.d.-b, e.d.-c; Locke o.fl., 2001). Húð leirljósra og moldóttra hrossa er iðulega dökk en getur einnig verið brúnbleik og eru augu þeirra oftast dökk að lit en geta verið mó- eða gullit (Bændasamtök Íslands, e.d.-b, e.d.-c). Arfhreint ástand í sætinu veldur því hins vegar að allir grunnlitir verða að mjög ljósum lit sem kallast fögur (Bailey og Brooks, 2020). Jafndreifður rjómalitaður blær eða jafnvel nánast hvítur litur á feld einkennir fölan lit ásamt bleikri húð og bláum augum (Mariat o.fl., 2003). Leirljós, moldóttur og fögur eru saman nefndir leirlitir (e. cream colours) og líkt og með grunnlitina geta mörg mismunandi blæbrigði einnig komið fyrir í þeim (Sponenberg og Bellone, 2017).

Ch-sæti er annað erfðasæti sem deyfir grunnlitina og veldur litum sem einkennast af einskonar málmgljáa (Cook o.fl., 2008). Bæði arfblendid og arfhreint ástand í sætinu valda því að rauður verður að jafndreifðum gul- eða gulleitum lit á feld ásamt ljósu eða hvítu faxi og tagli og jarpur verður að lit sem einkennist af sama lit á bók en ljósbrúnum eða súkkulaðibrúnum lit á faxi, tagli og fótum (Sponenberg og Bellone, 2017). Þessum litum getur verið auðvelt að rugla saman við leirljósan og moldóttan lit en ólíkt þeim er litur húðar og augna almennt ljósari (Bailey og Brooks, 2020). Húð þeirra er jafnan ljósbrún eða brúnbleik og augu gulleit þó þau geti einnig verið dökk (Sponenberg og Bellone, 2017). Áhrif Ch-sætis eru frábrugðin áhrifum C-sætis að því leiti að arfblendid ástand í sætinu hefur einnig áhrif á brúnan grunnlit (Cook o.fl., 2008). Brúnn verður þá að lit sem einkennist af ljósbrúnum eða súkkulaðibrúnum lit á bók en oft dekkri brúnum lit á faxi, tagli og fótum (Bailey og Brooks, 2020) og sama húð- og augnlit og fyrrnefndir litir (Sponenberg og Bellone, 2017). Guðni Þorvaldsson (2004) hefur kallað þessa liti kampavínsliti sem vísar til enska heiti þeirra *champagne* en Stefán Aðalsteinsson (2001) hefur lagt til að þeir séu kallaðir glólitir og að Ch-sæti gefið þá glóbjart með rauðum lit, glóbrúnt með brúnum lit og glómoldótt með jörpum lit.

Önnur erfðasæti sem þekkt er að valdi breytingum á grunnlitunum eru m.a. D-sæti (álóttir litir), Z-sæti (vindóttir litir), G-sæti (gránun með aldri), Rn-sæti (litföróttir litir), To-sæti (skjóttir litir), O-sæti (síðuskjóttir litir) o.fl. sem tengjast genunum *MITF* og *KIT* og valda hvítum mynstrum (Bailey og Brooks, 2020; Sponenberg og Bellone, 2017; Rieder, 2009; Thiruvankadan o.fl., 2008) en þeim verður ekki gerð frekari grein hér.

1.3.1 E-sæti (MC1R) og A-sæti (ASIP)

E-sæti (e. extension) er annað tveggja erfðasæta sem ákvarðar grunnlit hrossa. Í E-sætinu er að finna genið *MC1R* (Thiruvankadan o.fl., 2008), sem líkt og áður hefur verið lýst stýrir litarefnamyndun ýmist í átt að eumelaníni eða feómelaníni. Í hrossum finnast tvær meginsamsætur í E-sæti sem segja til um það hvort að hross verði brúnt eða rautt að lit (Bailey

og Brooks, 2020). Önnur þeirra er villigerðin E^+ en hún virkjar MC1R viðtakann og eykur myndun eumelaníns. Hin er samsætan E^e en hún veldur óvirkum viðtaka og eykur þannig myndun feómelaníns (Shang o.fl., 2019). E^+ er ríkjandi yfir E^e og því valda arfgerðir E^+E^+ og E^+E^e brúnum grunnlit en arfhrein arfgerð E^eE^e veldur rauðum grunnlit (Thiruvankadan o.fl., 2008). Marklund o.fl. (1996) voru fyrst til að lýsa breytileika í *MC1R* geninu í hrossum og greindu frá stökkbreytingu sem er ábyrg fyrir samsætunni E^e en hún felur í sér einbasabreytileikann $C > T$.

A-sæti (e. agouti) er hitt erfðasætið sem kemur að ákvörðun grunnlita en það stýrir staðbundinni dreifingu eumelaníns um líkamann þ.e.a.s. hvort að hross verði brúnt eða jarpt að lit (Bailey og Brooks, 2020). Í A-sætinu má finna genið *ASIP* (Thiruvankadan o.fl., 2008), sem eins og áður hefur verið fjallað um kóðar fyrir próteininu *ASIP* sem hindrar myndun eumelaníns. Í hrossum finnast tvær meginsamsætur í A-sæti, líkt og í E-sæti (Rieder, 2009). Villigerðin A^A leiðir til myndunar á virku *ASIP* próteini sem veldur því að feómelanín myndast á bók. Myndun eumelaníns heldur sér hins vegar á fangi, tagli og fótum (Sponenberg og Bellone, 2017) þar sem að *ASIP* genið virðist ekki vera tjáð þar í hrossum (Bailey og Brooks, 2020). Samsætan A^a orsakast af 11 basapara úrfellingu í *ASIP* (Rieder o.fl., 2001) og leiðir til myndunar á óvirku *ASIP* próteini sem leyfir myndun eumelaníns (Sponenberg og Bellone, 2017). A^A er ríkjandi yfir A^a , arfgerðir A^AA^A og A^AA^a valda því jörpum grunnlit en arfhrein arfgerð A^aA^a veldur brúnum grunnlit (Thiruvankadan o.fl., 2008).

Þar sem að A-sæti hefur einungis áhrif á dreifingu eumelaníns er a.m.k ein ríkjandi E^+ samsæta í E-sæti skilyrði fyrir því að áhrif ríkjandi A^A samsætu komi fram (virkur MC1R viðtaki verður að vera til staðar). Með arfhreinni víkjandi arfgerð E^eE^e í E-sæti er einungis myndað feómelanín og áhrif hennar koma því fram óháð arfgerð í A-sæti. Arfgerð E^eE^e er því það sem kallað er víkjandi yfirstæð (e. recessive epistatis) yfir A-sæti (Thiruvankadan o.fl., 2008). Í töflu 1 má sjá hvaða samsetningar arfgerða í E- og A-sæti geta verið á bak við rauðan, brúnan og jarpan grunnlit.

Tafla 1. Grunnlitir og mögulegar arfgerðir þeirra í E- og A-sæti (Bailey og Brooks, 2020).

| Grunnlitur | Arfgerð í E-sæti | Arfgerð í A-sæti |
|------------|-----------------------|----------------------------------|
| Rauður | E^eE^e | A^AA^A , A^AA^a eða A^aA^a |
| Brúnn | E^+E^+ eða E^+E^e | A^aA^a |
| Jarpur | E^+E^+ eða E^+E^e | A^AA^A eða A^AA^a |

1.3.2 C-sæti (*MATP*)

C-sæti (e. cream) er ábyrgt fyrir leirlitum í hrossum (Thirukenkadan o.fl., 2008). Leirlitir koma fram sökum stökkbreytingar í geninu *MATP* (einnig þekkt sem *SLC45A2*) sem felst í einbasabreytileikanum $G > A$ sem táknður er með samsætunni C^{Cr} (Mariat o.fl., 2003). C^{Cr} er ríkjandi og deyfir rautt feómelanín yfir í gult en hefur almennt engin áhif á eumelanín (Locke o.fl., 2001). Lífefnafræðileg áhrif samsætunnar á litarefnamyndun eru óþekkt þar sem að virkni *MATP* gensins hefur ekki enn verið skilgreind, þó er þekkt að genið tengist flutningi ensímsins týrósínasa (Bailey og Brooks, 2020). Villigerðin C^+ er víkjandi og hefur engin deyfandi áhrif á litarefni. Arfhrein arfgerð C^+C^+ hefur þar með engin áhrif á grunnliti en arfblendin arfgerð C^+C^{Cr} veldur leirljósum og moldóttum lit (Mariat o.fl., 2003). Arfhrein arfgerð $C^{Cr}C^{Cr}$ deyfir hins vegar bæði feó- og eumelanín og veldur því að allir grunnlitir verða að fölum lit (Bailey og Brooks, 2020). C^{Cr} samsætan sýnir svokallað ófullkomið ríki (e. incomplete dominance) þar sem að arfblendid og arfhreint ástand hennar valda ólíkum litum (Rieder, 2009). Í töflu 2 má sjá hvaða áhrif arfgerðir í C-sæti hafa á rauðan, brúnan og jarpan grunnlit.

Tafla 2. Áhrif arfgerðar í C-sæti á grunnliti (Thirukenkadan o.fl., 2008).

| Grunnlitur | Arfgerð í C-sæti | Litur sem kemur fram |
|------------|------------------|----------------------|
| Rauður | C^+C^+ | Rauður |
| | C^+C^{Cr} | Leirljós |
| | $C^{Cr}C^{Cr}$ | Fölur |
| Brúnn | C^+C^+ | Brúnn |
| | C^+C^{Cr} | Brúnn |
| | $C^{Cr}C^{Cr}$ | Fölur |
| Jarpur | C^+C^+ | Jarpur |
| | C^+C^{Cr} | Moldóttur |
| | $C^{Cr}C^{Cr}$ | Fölur |

1.3.3 Ch-sæti (*SLC36A1*)

Ch-sæti (e. champagne) deyfir grunnliti yfir í svokallaða kampavínsliti (glóliti) í hrossum (Sponenberg og Bellone, 2017). Í sætinu hafa fundist tvær samsætur, villigerðin Ch^+ sem er víkjandi og samsætan Ch^C sem er ríkjandi. Ch^+ hefur engin deyfandi áhrif á litarefni en Ch^C deyfir bæði rautt eumelanín yfir í gult og svart eumelanín yfir í brúnt (Thirukenkadan o.fl., 2008). Arfhrein arfgerð Ch^+Ch^+ hefur þar með engin áhrif á grunnliti en arfgerðir Ch^+Ch^C og Ch^CCh^C leiða báðar til kampavínslita. Ólíkt C^{Cr} samsætunni í C-sæti, sem sýnir ófullkomið ríki, koma sömu litir fram í arfblendnu og arfhreinu ástandi Ch^C , en samsætan sýnir þá svokallað fullkomið ríki (e. complete dominance) (Bailey og Brooks, 2020). Þar var ekki fyrr en nokkuð nýlega sem greint var frá því að genið *SLC36A1* er að finna í Ch-sæti, en það gerðu Cook o.fl.

í rannsókn sinni árið 2008. Þau fundu stökkbreytingu í *SLC36A1* sem felst í einbasabreytileikanum $C > G$ og er ábyrgur fyrir samsætunni Ch^C . Stökkbreytingin veldur breytingum á próteini sem genið kóðar fyrir og er talið tengjast þroska sortuagna í litfrumum, en þannig deyfir Ch^C litarefnin (Cook o.fl., 2008).

1.4 Muskóttur (glóbrúnn) litur

Í íslenska hrossakyninu finnst fágætur brúnleitur litur sem ýmist hefur verið nefndur muskóttur, glóbrúnn eða mórauður (e. smokey black) (Albert, 1991; Guðni Þorvaldsson, 2006; Stefán, 2001). Liturinn einkennist af jafndreifðum brúnleitum lit á feld, brúnbleikri eða súkkulaðiþrúnni húð og mó- eða gulleitum augum (mynd 1) (Freyja Imsland, munnleg heimild, 28. október 2021). Blæbrigði litarins geta svo verið frá ljósbrúnum lit, yfir í dökkbrúnan og allt þar á milli (Guðni Þorvaldsson og Guðrún Jóhanna Stefánsdóttir, 2008). Sé brúnleiti liturinn greinanlegur á feld en húð og augu dökk að lit nefnist liturinn skolbrúnn (Bændasamtök Íslands, e.d.-d).



Mynd 1. Muskótti (glóbrúni) stóðhesturinn Hlekkur frá Austurási (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).

Þekkt er að muskóttur litur komi fram sökum deyfingar á brúnum grunnlit (Stefán, 2001) og að arfblandni fyrir leirlit tengist honum á einhvern hátt (Albert, 1991; Guðni, 2004), en að öðru leiti er erfðafræðilegur bakgrunnur hans ekki þekktur.

Áhugafólk um liti hrossa hefur lengi velt vöngum yfir erfðafræðilegum bakgrunni litarins. Bowling (1996) og Stefán (2001) hafa varpað fram þeirri tilgátu að liturinn stafi af ríkjandi samsætu í Ch -sæti (kafla 1.3.3) en ekki af arfblandni fyrir leirlit. Breytileiki í Ch -sæti hefur þó ekki verið skoðaður í íslenskum hrossum. Á móti hafa rannsóknir Guðna (2004, 2006) á litnum eindregið bent til þess að liturinn tengist arfblandni fyrir leirlit. Í þessu verkefni er gengið útfrá því að arfblandni fyrir leirlit tengist muskóttum lit.

Líkt og áður hefur komið fram hefur arfblandni fyrir leirlit almennt engin áhrif á brúnan grunnlit, en muskóttur litur virðist þar vera undantekning (Freyja Imsland, munnleg heimild, 30. nóvember, 2021). Flest hross sem eru brún að grunnlit og bera leirlit (C^+C^{Cr}) eru áþekk brúnum hrossum sem ekki bera leirlit (C^+C^+) og er almennt ekki gerður greinarmunur á lit þeirra (Bændasamtök Íslands, e.d.-d). Brún hross sem bera leirlit koma því oft á óvart þegar undan þeim fæðast leirlit folöld (Sponenberg og Bellone, 2017). Sum hross sem eru brún að grunnlit og bera leirlit verða hins vegar muskótt og önnur skolbrún að lit. Líklegt er að um sé að ræða samspil nokkurra erfðasæta sem hafa áhrif á birtingarmynd arfblandins leirlitar í brúnum hrossum (Freyja Imsland, munnleg heimild, 30. nóvember, 2021).

Eitt þeirra erfðasæta sem líklegt er að hafi áhrif á það hvort að muskóttur litur komi fram er E-sæti (Freyja Imsland, munnleg heimild, 30. nóvember, 2021). Hross með brúnan grunnlit geta ýmist haft arfgerð E^+E^+ eða E^+E^e í E-sæti (tafla 1). Almennt er ekki hægt að greina hvora arfgerðina þau bera út frá lit þeirra (Bændasamtök Íslands, e.d.-a), en arfgerð í E-sæti hefur þó að einhverju leiti áhrif á lit. Greint hefur verið frá því að tíðni E^+E^+ arfgerðar er hærri í dökkbrúnum og -jörpum hrossum en í ljósari blæbrigðum litanna (Shang o.fl., 2019) og að lítilsháttar hvít mynstur (stjörnur, blesur, leistar og sokkar) eru að jafnaði umfangsmeiri í brúnum og jörpum hrossum með arfgerð E^+E^e en arfgerð E^+E^+ (Sponenberg og Bellone, 2017). Það er því ljóst að munur er á lífefnafræðilegum áhrifum arfgerðanna á litarefnamyndun og þar með gætu þær að hluta til úskýrt hvers vegna sum brún hross sem bera leirlit verða brún að lit en önnur muskótt.

1.5 Arfgerðargreiningar

Arfgerðargreining er ferli til að ákvarða hvaða samsætur er að finna í ákveðnum erfðasætum í erfðamengi einstaklings. Arfgerðargreiningu er hægt að framkvæma með mörgum mismunandi aðferðum (Adams, 2022a; Karch, 2016) en hér verður í stuttu máli greint frá þeim aðferðum sem notast var við í rannsókninni.

Grundvöllurinn fyrir því að hægt sé að arfgerðargreina erfðasýni er að næginlegt magn af erfðaeefni sé til staðar. Kjarnsýrumögnun (e. polymerase chain reaction, PCR) er ferli sem felst í því að magna upp það svæði erfðaefnis sem á að greina (Powledge, 2004). Við framkvæmd kjarnsýrumögnunar er útbúin hvarflausn sem fer í gegnum ákveðið hitunarferli. Hitunarferlið virkjar röð efnahvarfa sem búa til mörg eintök af einu ákveðnu svæði erfðaefnis. Þetta ferli skiptist í grunninn í þrjú stig (Klug og Cummings, 2002). Á fyrsta stigi á sér stað eðlissvipting (e. denaturation) þar sem að tvíþátta DNA sameindir aðskiljast og verða einþátta. Á öðru stigi bindast sérstakir fram- og afturvísar (e. forward and reverse primers) þeim til að afmarka það

svæði sem á að magna upp. Að lokum binst ensímið DNA pólýmerasi vísun og framlengir þá með því að afrita eftir einþátta DNA sameindunum og myndar á ný tvíþátta DNA sameindir (miniPCR bio, 2020; Powledge, 2004). Þessi þrjú skref mynda saman einn hring (e. cycle) sem hægt er að endurtaka eins oft og óskað er eftir. Með 20 til 30 endurtekningum myndast yfir milljón eins eintök af ákveðnu svæði efðæfnis. Eftir kjarnsýrumögnun er svo hægt að arfgerðargreina (Klug og Cummings, 2002).

Raðgreining erfðæfnis (e. DNA sequencing) er ein aðferð til að arfgerðargreina. DNA sameindir eru að hluta til byggðar upp af fjórum bösum (e. nucleotides), adenín (A), sýtósín (C), gúanín (G) og týmín (T) (Bates, 2022). Raðgreining felst í því að finna út nákvæma basaröð DNA sameindar og ákvarða arfgerð út frá röðinni (Adams, 2022b).

Skerðibútagreining er önnur aðferð til að arfgerðargreina og notast við sérstök skerðiensím (e. restriction enzyme) sem klippa DNA sameindir í sundur á ákveðnum stöðum í basaröð. Þessir staðir kallast skerðiset og verða þau að vera til staðar í basaröð DNA sameinda svo að skerðiensím klippi þær. Ef að skerðiset eru ekki til staðar í basaröð DNA sameinda, t.d. vegna einbasabreytileika, eru þær ekki klipptar. Skerðibútagreining felst svo í því að aðskilja afurðir skerðiensíma út frá stærð þeirra, en stærð fer eftir fjölda basa (Lantz, 2017). Rafstraumur er notaður til að flytja DNA sameindirnar í gegnum agarósagel (e. gel electrophoresis) þar sem að stærri sameindir flytjast styttra og minni sameindir lengra (Smith, 2022). Eftir rafdrátt koma DNA sameindirnar fram á gelinu sem skerðibútar (bönd) og er stærð þeirra ákvörðuð út frá stöðluðu sýni (*DNA ladder*) með þekktum stærðum, sem rafdregið er á sama geli (Lantz, 2017; Smith, 2022). Út frá stærð og fjölda banda á geli er svo hægt að ákvarða arfgerð (Lantz, 2017). Rafdráttur á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun er enn önnur aðferð til að arfgerðargreina. Sú aðferð notast við sama ferli og skerðibútagreining en án skerðiensíma (Smith, 2022).

1.6 Markmið

Eitt af opinberum ræktunarmarkmiðum fyrir íslenska hrossakynið er að viðhalda öllum mögulegum litaafbrigðum innan stofnsins (Fagráð í hrossarækt, e.d.). Til að vinna að því markmiði er nauðsynlegt að auka þekkingu okkar á erfðafræðilegum bakgrunni íslenskra hrossalita.

Markmið þessarar rannsóknar er að styrkja stoðir þekkingar á erfðum muskótts (glóbrúns) litar og tengslum hans við arfgerð í E-sæti í íslenskum hrossum. Rannsóknarspurningin sem þessu verkefnið er ætlað að nálgast er hvort arfgerð í E-sæti geti haft áhrif á það hvort brúnt hross sem er arfblendið í C-sæti verði brúnt eða muskótt að lit. *MC1R* genið var arfgerðargreint í 48

brúnum, skolbrúnum og muskóttum íslenskum hrossum sem talin voru bera leirlit. *ASIP* genið var einnig arfgerðargreint til að staðfesta að hrossin væru í grunninn brún (A^aA^a) og sömuleiðis var *MATP* genið arfgerðargreint til að staðfesta að hrossin bæru leirlit (C^+C^{Cr}). Tengsl arfgerðar í E-sæti við litasvipgerð brúnna hrossa sem reyndust bera leirlit voru athuguð með tölfræðigreiningu.

2. Efni og aðferðir

Einangrun erfðaeftnis og arfgerðargreining voru framkvæmd á rannsóknarstofu Matís (www.matis.is) í Reykjavík.

2.1 Einstaklingar

Valin voru 48 hross til arfgerðargreiningar úr WorldFeng (WF), skýrsluhaldskerfi og Upprunaættbók íslenska hestsins. Valið var byggt á litaskráningu og ætterni þar sem sett voru skilyrði fyrir brúnum aðallit í litaskráningu (2 Brúnn) og leirlitum einstaklingum (4 Leirljós; 5 Moldóttur; 40 Hvítur/Hvítingi) í ættartré. Við valið var einnig tekið mið af litblæ í litaskráningu (21 Brúnn/gló; 22 Brúnn/mó; 25 Brúnn/milli) með það að markmiði að velja einstaklinga með fjölbreytt blæbrigði brúns aðallitar.

Erfðasýni úr 30 völdum einstaklingum voru þegar til í sýnasafni rannsóknarstofu Matís, 3 í sýnasafni Tilraunastöðvar Háskóla Íslands í meinafræðum að Keldum (Keldur) og 15 hársýnum var safnað úr þeim einstaklingum sem ekki var til erfðasýni úr. Ljósmyndum sem sýndu lit hára/feldar, húðar og augna var safnað til að leggja mat á litasvipgerð. Leiðbeiningar um mat á litasvipgerðum má sjá í viðauka I og ljósmyndir af hluta einstaklinga má sjá í viðauka II. Í töflu 3 hér að neðan má sjá valin hross eftir litasvipgerð ásamt upplýsingum um erfðasýni, fæðingarnúmer, nafn og uppruna.

Tafla 3. Yfirlit yfir arfgerðargreind hross og upplýsingar um erfðasýni, fæðingarnúmer, nafn, uppruna og litasvipgerð.

| Sýni | Fæðingarnúmer | Nafn | Uppruni | Litasvipgerð |
|-------------|---------------|-------------|---------------|--------------|
| Ho024775540 | IS2009180601 | Árelíus | Hemla II | Muskótt |
| Ho024790686 | IS2021284976 | Dröfn | Hvolsvöllur | Muskótt |
| Hár | IS2019158161 | Dökkvi | Þúfur | Muskótt |
| KE4196 | IS2012235402 | Eir | Skipanes | Muskótt |
| Ho024787813 | IS2020182476 | Englasöngur | Klettholt | Muskótt |
| Ho024785367 | IS2013181053 | Erlingur | Uxahryggur | Muskótt |
| Ho024778839 | IS2012236751 | Eygló | Leirulækur | Muskótt |
| Ho024770546 | IS2007236639 | Fagranótt | Borgarnes | Muskótt |
| Hár | IS2020281024 | Ferskja | Uxahryggur II | Muskótt |
| Hár | IS2015280600 | Fold | Hemla II | Muskótt |
| Ho024754954 | IS1999280600 | Gjálp | Hemla II | Muskótt |
| Ho024787591 | IS2014225342 | Glódís | Reykir | Muskótt |
| Ho024788454 | IS2003281125 | Gullnótt | Pula | Muskótt |
| Ho024790388 | IS2017187573 | Hlekkur | Austurás | Muskótt |
| Hár | IS2016225342 | Nn | Reykir | Muskótt |
| Hár | IS2018187362 | Óskar | Langholt II | Muskótt |

Tafla 3. Framhald.

| Sýni | Fæðingarnúmer | Nafn | Uppruni | Litasvipgerð |
|-------------|---------------|-----------|--------------------|--------------|
| Hár | IS2013255619 | Smella | Fremri-Fitjar | Muskótt |
| Ho024753455 | IS1992257006 | Þoka | Sauðárkrókur | Muskótt |
| KE1945 | IS2008288712 | Alísa | Miðengi | Skolbrún |
| Ho024785090 | IS2012286756 | Ágústa | Árbæjarhjáleiga II | Skolbrún |
| Ho024790988 | IS2014257688 | Finndís | Íbishóll | Skolbrún |
| Ho024781390 | IS2008280519 | Freyja | Baldurshagi | Skolbrún |
| Ho024787590 | IS2013225342 | Heiðdís | Reykir | Skolbrún |
| Ho024778097 | IS2011137796 | Herkúles | Hjarðarfell | Skolbrún |
| Ho024787738 | IS2012265100 | Hreindís | Litli-Dalur | Skolbrún |
| Ho024787437 | IS2018201472 | Hressing | Þingbrekka | Skolbrún |
| Ho024782662 | IS2005235546 | Ísbrún | Syðstu-Fossar | Skolbrún |
| Ho024785206 | IS2016201219 | Katla | Hólateigur | Skolbrún |
| Hár | IS2002269975 | Kleópatra | Tunga | Skolbrún |
| Hár | IS2018180608 | Mökkur | Hemla II | Skolbrún |
| Hár | IS2017180608 | Nn | Hemla II | Skolbrún |
| Hár | IS2017125339 | Moli | Reykir | Skolbrún |
| Ho024790782 | IS2016280610 | Ronja | Hemla II | Skolbrún |
| Hár | IS2001225159 | Vænting | Reykir | Skolbrún |
| Ho024776441 | IS2001284163 | Vök | Skálakot | Skolbrún |
| Hár | IS2020135846 | Vörður | Skrúður | Skolbrún |
| Ho024756214 | IS2004235852 | Fía | Giljahlíð | Brún |
| Ho024786972 | IS2014280608 | Freydís | Hemla II | Brún |
| Hár | IS2017280612 | Lexía | Hemla II | Brún |
| Ho024778689 | IS2012136763 | Smyrill | Álftarós | Brún |
| Ho024780990 | IS2012156076 | Traustur | Hvammur 2 | Brún |
| Hár | IS2008280608 | Valdís | Hemla II | Brún |
| KE1011 | IS2001158503 | Andri | Vatnsleysa | Brún |
| Hár | IS2016281022 | Dimmalimm | Uxahryggur II | Brún |
| Ho024790784 | IS2016280608 | Fannís | Hemla II | Brún |
| Ho024789707 | IS2015280608 | Hrafndís | Hemla II | Brún |
| Ho024790618 | IS2017157001 | Sigurfari | Sauðárkrókur | Brún |
| Ho024774383 | IS2006280608 | Sóldís | Hemla II | Brún |

2.1.1 Prófun arfgerðargreininga

Valin voru 13 hross úr sýnasafni rannsóknarstofu Matís til að prófa aðferðir arfgerðargreininga. Valið var eingöngu byggt á litaskráningu með það að markmiði að sjá allar mögulegar arfgerðir genanna *MC1R*, *ASIP* og *MATP* í niðurstöðum. Upplýsingar um erfðasýni, fæðingarnúmer, nafn, uppruna og litasvipgerð þessara einstaklinga má sjá í töflu 4.

Tafla 4. Yfirlit yfir arfgerðargreind hross fyrir prófun arfgerðargreininga.

| Sýni | Fæðingarnúmer | Nafn | Uppruni | Litasvipgerð |
|-------------|---------------|---------|--------------|--------------|
| KE7938 | IS2021225360 | Auðlind | Kópavogur | Dökk brún |
| KE7941 | IS2017184978 | Eldur | Hvolsvöllur | Rauður |
| Ótilgreint | - | - | - | Móvindótt |
| KE8027 | IS2018158169 | Grímar | Þúfur | Jarpur |
| Ótilgreint | - | - | - | Móalóttur |
| KE7936 | IS2021182098 | Leikur | Laftún | Jarpur |
| KE8029 | IS2018158166 | Rokkur | Þúfur | Dökk jarpur |
| Ótilgreint | - | - | - | Grár |
| Ótilgreint | - | - | - | Brún |
| Ho024788592 | IS2018282700 | Sólrún | Selfoss | Hvít (Föl) |
| KE7939 | IS2021282096 | Stilla | Laftún | Jarpvindótt |
| KE8024 | IS2019256099 | Úlfynja | Skinnastaðir | Moldótt |
| Ótilgreint | - | - | - | Leirljós |

2.2 Undirbúningur hársýna

Erfðæfni var einangrað úr hársýnum og foreldragreining framkvæmd á þeim til að staðfesta ætterni einstaklingana. Búið var að einangra erfðæfni sýna sem til voru hjá rannsóknarstofu Matís og Keldna og staðfesta ætterni þeirra fyrir aðrar rannsóknir.

2.2.1 Einangrun erfðæfnis

Við einangrun erfðæfnis úr hársýnum var notast við svokallaða *HotSHOT* aðferð sem er einföld, fljótleg og mikið notuð aðferð við einangrun erfðæfnis úr vefjasýnum.

Svo að hægt sé að einangra erfðæfni úr hári er nauðsynlegt að háarsekkir fylgi hársýninu. Fyrir hvert hársýni voru nokkrir háarsekkir (u.þ.b. 6 sekkir) klipptir af endum háranna í 0,2 mL *PCR strip* glös og 75 µL af *Alkaline Lysis buffer* bætt út í hvert glas. Glösunum var næst komið fyrir í *MiniAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems) PCR vél sem keyrði hitunarferli þar sem að eðlissvipting á DNA sameindum á sér stað við 95°C í 30 mínútur og eftir það kælt niður í 4°C. Að lokum var 75 µL af *Neutralizaion buffer* bætt út í hvert glas og þar með voru erfðasýni tilbúin.

2.2.2 Foreldragreining

Foreldragreining var framkvæmd á hársýnum (15 sýni) þar sem að örmerki var ekki lesið af einstaklingum við hársýnatöku.

Við framkvæmd foreldragreiningar var notast við *Equine Genotypes Panel 1.1 Kit* (F850, Thermo Fischer), sérstakt prófefnasett (e. reagent kit) fyrir foreldragreiningar hrossa. Sautján þekkt erfðasæti (VHL20, HTG4, ATH4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2,

HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1 og CA425) voru arfgerðargreind og arfgerðir einstaklinga bornar saman við arfgerð foreldra þeirra. Upplýsingar um arfgerðir foreldra voru sóttar í WF. Hvarflausnir voru útbúnar eftir leiðbeiningum frá framleiðanda og sýnum komið fyrir í *3730 DNA analyzer* (Applied Biosystems) raðgreiningarvél.

2.3 Fram- og afturvísar

Upplýsingar um vísa sem notaðir voru fyrir kjarnsýrumögnun fengust hjá Freyju Imsland, sem jafnframt hannaði þá, og voru þeir pantaðir og framleiddir hjá *Eurofins Genomics* (<https://eurofinsgenomics.eu>). Í töflu 5 má sjá upplýsingar um vísana, basaraðir þeirra og lengd afurða (fjöldi basapara, bp) ásamt genum og þekktum breytileikum sem finnast í þeim.

Tafla 5. Fram- og afturvísar sem notaðir voru.

| Gen | Breytileiki | Vísir* | Basaröð | Afurð (bp) |
|-------------|-----------------|--------|--------------------------------|------------|
| <i>MC1R</i> | C > T | MC1R_F | 5'-CCTACCTCGGGCTGACCACCAA-3' | 460 |
| | | MC1R_R | 5'-GAGAGGACACTAACCACCCAGATG-3' | |
| <i>ASIP</i> | 11 bp úrfelling | ASIP_F | 5'-CTTTTGTCTCTCTTTGAAGCATTG-3' | 102/91 |
| | | ASIP_R | 5'-GAGAAGTCCAAGGCCTACCTTG-3' | |
| <i>MATP</i> | G > A | MATP_F | 5'-GAAGCTGACCTGGGCCATAAC-3' | 289 |
| | | MATP_R | 5'-CCGCGTGATGAGAGCATTCC-3' | |

*F stendur fyrir framvísi og R fyrir afturvísi

2.4 Kjarnsýrumögnun

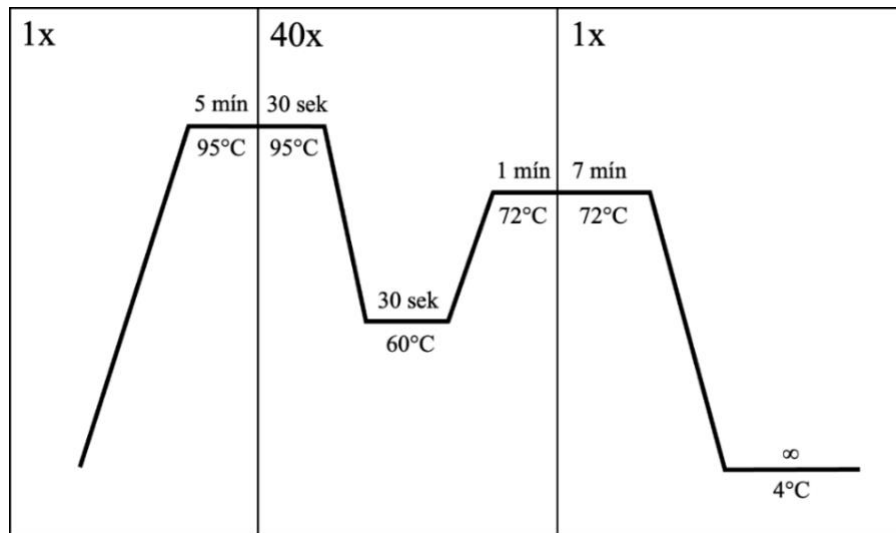
Kjarnsýrumögnun var framkvæmd þrisvar fyrir hvert erfðasýni, á þeim svæðum sem breytingar finnast í genunum. Fyrir *MC1R* var það útröð 1, fyrir *ASIP* útröð 2 og fyrir *MATP* útröð 2.

Til að byrja með var stokklaun vísa (100 µM) þynnt 1:10 með afjónuðu vatni (10 µL vísir og 90 µL vatn) svo úr varð 10 µM vinnslulaun.

Við framkvæmd kjarnsýrumögnunar var hvarflausn útbúin á eftirfarandi hátt: 10 µL *Taq DNA Polymerase 2x Master Mix RED 1,5 nM MgCl₂ 500* (A180303, Ampliqon), 1 µL framvísir (10 µM) (*MC1R*, *ASIP* eða *MATP*), 1 µL afturvísir (10 µM) (*MC1R*, *ASIP* eða *MATP*) og 6 µL afjónað vatn ásamt 2 µL af erfðasýni (2-10 ng/mL). Erfðasýni var búið að mægngreina í *NanoDrop Lite Spectrophotometer* og þynna eftir þörfum.

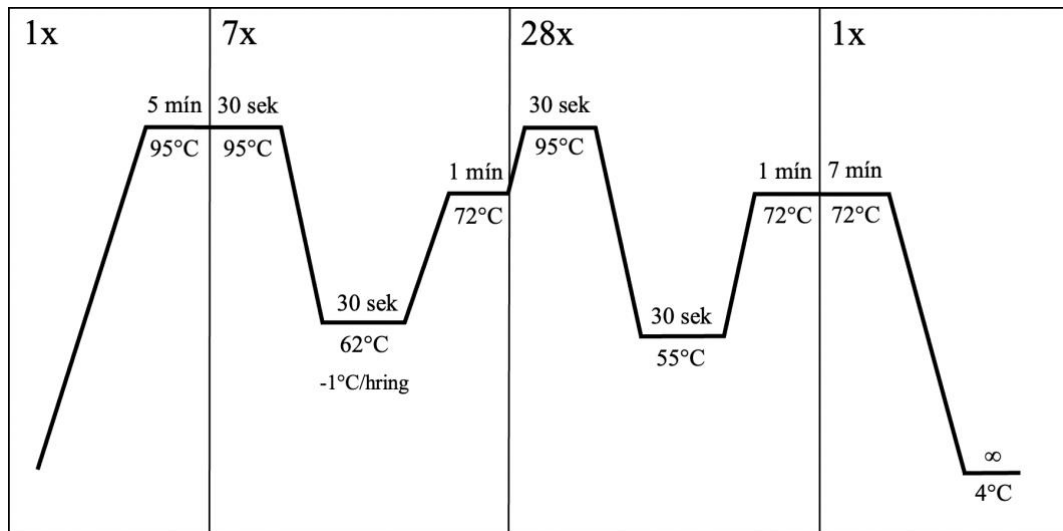
Hvarflausnunum var komið fyrir í 0,2 mL 96 holu PCR bakka þar sem lausnir sem innihéldu vísa fyrir *MC1R* fóru saman á bakka (alls 48) og lausnir sem innihéldu vísa fyrir *ASIP* eða *MATP* fóru saman á bakka (alls 96). Bökkunum var næst komið fyrir í tveimur *MiniAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems) PCR vélum sem keyrðu ákveðin hitunarferli.

MC1R fór í gegnum hitunarferli sem skiptist í þrjú stig og er lýst á mynd 2. Á fyrsta stigi á sér stað eðlissvipting á DNA sameindum lausnar við 95°C í 5 mínútur. Á öðru stigi heldur eðlissvipting DNA sameinda áfram við 95°C í 30 sekúndur, binding vísa við DNA á sér stað við 60°C í 30 sekúndur og loks lenging á DNA við 72°C í 1 mínútu. Annað stigið er endurtekið 40 sinnum í heildina áður en þriðja stig getur hafist. Á þriðja stigi heldur lenging á DNA áfram við 72°C í 7 mínútur og að lokum er lausnin kæld niður í 4°C.



Mynd 2. Hitunarferli kjarnsýrumögnunar *MC1R*.

ASIP og *MATP* fóru í gegnum hitunarferli sem skiptist í fjögur stig og er lýst á mynd 3. Líkt og í hitunarferli *MC1R* á eðlissvipting á DNA sameindum lausnar sér stað á fyrsta stigi við 95°C í 5 mínútur. Á öðru stigi heldur eðlissvipting DNA sameinda áfram við 95°C í 30 sekúndur, binding vísa á sér stað við 62°C í 30 sekúndur og loks lenging á DNA við 72°C í 1 mínútu. Annað stigið er endurtekið 7 sinnum í heildina en með hverri endurtekningu (hring) lækkar bindingarhitastigið um 1°C (úr 62°C í 55°C), aðferð sem kallast *Touchdown* PCR. Þriðja stig hefst á eðlissviptingu DNA sameinda við 95°C í 30 sekúndur, binding vísa heldur áfram við 55°C í 30 sekúndur og loks á sér stað lenging á DNA við 72°C í 1 mínútu. Þriðja stigið er endurtekið 28 sinnum í heildina áður en fjórða stig getur hafist. Á fjórða stigi heldur lenging DNA áfram við 72°C í 7 mínútur og að lokum er lausnin kæld niður í 4°C.



Mynd 3. Hitunarferli kjarnsýrumögnunar *ASIP* og *MATP*.

2.5 Rafdráttur og gelhreinsun

Árangur kjarnsýrumögnunar var metinn með því að rafdraga afurðir hennar á agarósageli. Tvenns konar gel var útbúið, 2% og 4% agarósagel.

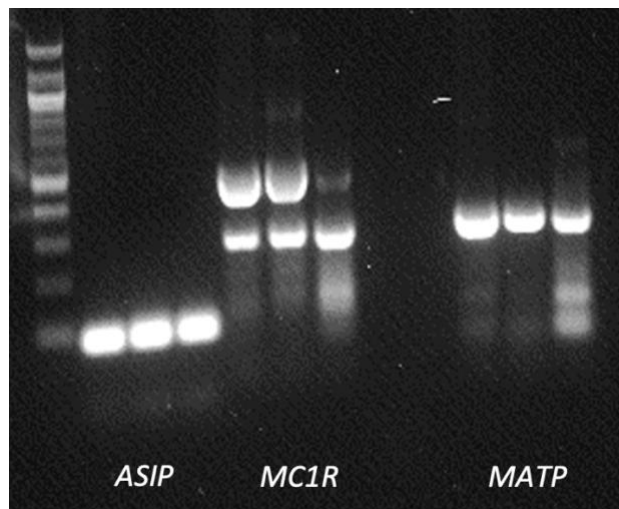
2% gel var útbúið með því að blanda 7 grömmum af agarósa saman við 350 mL af *1xTAE* lausn og 4% gel með því að blanda 14 grömmum af agarósa saman við 350 mL af *1xTAE* lausn. Í framhaldi var notast við sömu aðferð við gerð gelana sem var eftirfarandi: Lausnin var hituð í örbylgjuofni og hrist upp í henni inn á milli þar til allur agarósi leystist upp og eftir það geymd í hitaskáp við 65°C fram að notkun. 75 mL af agarósalausn var blandað saman við 3,8 µL af *SYBR® Safe DNA Gel Stain* og þeirri lausn komið fyrir í rafdráttarformi. Brunnar voru mótaðir í gelið með sérstökum brunnskömbum á meðan það var látið standa og storkna í 10-15 mínútur. Brunnkambar voru þá fjarlægðir og gelinu komið fyrir ofan í *Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System* (Bio-Rad) ásamt *1xTAE* vökva.

20 µL af afurðum kjarnsýrumögnunar *MC1R* var komið fyrir í brunnum 2% gels, 5 µL af afurðum *ASIP* í brunnum 4% gels og 5 µL af afurðum *MATP* í brunnum 2% gels. Til að áætla basastærð afurða var notast við *100 bp DNA ladder* (N3231, NEB) og *1 kb DNA ladder* (N3232, NEB) til viðmiðunar. Þeim fyrrnefnda var komið fyrir í fyrsta brunni gelsins og þeim seinni í seinasta brunni þess. Gelin voru öll rafdregin við 100 V spennu en *MC1R* og *MATP* í 40 mínútur og *ASIP* í 60 mínútur.

Að loknum rafdrætti var gelum komið fyrir í *Molecular Imager® Gel Doc™ XR+* (Bio-Rad) myndavél og myndir teknar af þeim með forritnu *Image Lab 6.0* (Bio-Rad) til að meta framdrátt

rafdráttar og árangur kjarnsýrumögnunar. Árangur kjarnsýrumögnunar reyndist góður ef greinileg bönd sást í gelinu.

Í tilfalli *MC1R* voru vísar ekki nógu sértækir og mögnuðu upp fleiri en eitt svæði. Geli *MC1R* var þá komið fyrir á *Syngene™ LED Blue Light Transilluminator* tæki sem lýsti útfjólubláuljósi í gegnum það og gelbútur með tilheyrandi erfðasýni af réttri basastærð skorin úr gelinu. Gelhreinsun *MC1R* til að ná erfðasýni úr rafdráttargeli var framkvæmd eftir leiðbeiningum frá framleiðanda með *Monarch® Gel Extraction Kit* (T1020, NEB). Ekki þurfti að gelhreinsa *ASIP* og *MATP* þar sem að einungis eitt band sást í gelum og nægt magn af afurðum kjarnsýrumögnunar þeirra var til fyrir framhald. Á mynd 4 hér fyrir neðan má sjá bönd *ASIP*, *MC1R* og *MATP* eftir rafdrátt.



Mynd 4. Bönd *ASIP*, *MC1R* og *MATP* í 2% agarósageli eftir rafdrátt.

2.6 Arfgerðargreining

Arfgerðargreining var framkvæmd með þremur mismunandi aðferðum, fyrst var raðgreining fyrir *MC1R*, *ASIP* og *MATP*, önnur var skerðibútagreining fyrir *MC1R* og *MATP* og þriðja aðferðin var rafdráttur á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun fyrir *ASIP* (sjá aðferð rafdráttar kafla 2.5).

2.6.1 Raðgreining

Raðgreiningarsýni voru útbúin í þremur skrefum (*Exosap*, *Cycle* og *MagBio beads*) eftir leiðbeiningum frá framleiðendum efnanna sem voru notuð. Hitunarferli í skrefum eitt og tvö voru framkvæmd í *MiniAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems) PCR vél. Fyrir sýni *MC1R* voru notaðir bæði fram- og afturvísar, fyrir *ASIP* bæði fram- og afturvísar og fyrir *MATP* afturvísir. Vísar voru þynntir úr 10 μM vinnslulausn í 3,5 μM lausn (3,5 μL vísir og 6,5 μL afjónað vatn).

Til að byrja með voru hvarflausnir útbúnar með *Exonuclease I* (*E. coli*) (M0293, NEB) og *Antarctic Phosphatase* (M0289, NEB) sem fóru í gegnum eftirfarandi hitunarferli: 37°C í 30 mínútur og 95°C í 5 mínútur.

Í öðru skrefi voru hvarflausnir útbúnar með *Big Dye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Cat: 4337455, Thermo Fischer) sem fóru í gegnum eftirfarandi hitunarferli: 96°C í 30 sekúndur, 50°C í 15 sekúndur og 60°C í 4 mínútur. Hitunarferlið var endurtekið var 25 sinnum í heildina og að lokum voru lausnir kældar niður í 4°C.

Í þriðja og seinasta skrefi voru lausnir hreinsaðar með *HighPrep™ DTR* (DT-70050, MagBio).

10 µL af hverju sýni voru settir í 0,2 mL 96 holu PCR bakka og bökkum komið fyrir í 3730 *DNA analyzer* (Applied Biosystems) raðgreiningarvél.

2.6.2 Skerðibútagreining

Við skerðibútagreiningu var notast við skerðiensímin *TaqI-v2* (R0149, NEB) með skerðiset T/CGA og AGC/T fyrir *MCR1* og *MseI (TruII)* (R0525, NEB) með skerðiset T/TAA og AAT/T fyrir *MATP*. Hvarflausnir voru útbúnar eftir leiðbeiningum frá framleiðanda í 0,2 mL 96 holu PCR bakka, *MCIR* í einn bakka og *MATP* í annan. Bökkunum var komið fyrir í tveimur *MiniAmp Thermal Cycler* (Applied Biosystems) PCR vélum þar sem *MCIR* var hitað við 65°C í 25 mínútur og *MATP* var fyrst hitað við 37°C í 25 mínútur og svo við 65°C í 20 mínútur.

10 µL af *MCIR* sýnum ásamt sama magni af *Gel Loading Dye* (4 mL *EDTA* (0,5 M) pH 8,0, 22,52 mL 87% glýseról, 0,02 mL *Bromophenol Blue* og 13,28 mL afjónað vatn) og 10 µL af *MATP* sýnum var komið fyrir í brunnnum 2% agarósagels og rafdregin í 45 mínútur. Að lokum voru teknar myndir af gelum (sjá aðferð rafdráttar kafla 2.5).

2.7 Gagnaúrvinnsla

Gögn foreldragreiningar voru yfirfarin í forritinu *Gene Mapper v4.1* (Applied Biosystems™, <https://www.thermofisher.com/is/en/home/brands/applied-biosystems.html>). Að því loknu voru niðurstöður arfgerðargreiningar færðar inn í *Microsoft Excel* (Microsoft Corp., <https://www.microsoft.com>) þar sem arfgerðir voru bornar saman við arfgerðir foreldra eða afkvæma.

Unnið var úr gögnum raðgreiningar í forritinu *Sequencer 5.2.4* (Gene Codes Corp., <http://www.genecodes.com>). Raðgreiningarniðurstöður voru færðar inn í forritið þar sem endar þeirra voru snyrtir og niðurstöður bornar saman við viðmiðunar gen úr gagnagrunni GeneBank®

(*MC1R*: AF288357.1; *ASIP*: AF288358.1; *MATP*: AH012460.2). Arfgerðir voru ákvarðaðar út frá þeim breytileika sem fannst í genunum.

Niðurstöður skerðibútagreiningar og rafdráttar fengust með því að lesa af gelmyndum. Fyrir skerðibútagreiningu voru arfgerðir ákvarðaðar með því að skoða skerðibúta á geli og fyrir rafdrátt með því að skoða bönd á geli.

Tengsl arfgerðar í E-sæti við litasvipgerð voru athuguð með tölfræðigreiningu í forritinu *RStudio* (Posit Software, <https://posit.co>). Gögnin voru sett upp í tíðnitöflu sem var færð inn í forritið og Fishers próf framkvæmt með skipuninni `fisher.test()`.

3. Niðurstöður

3.1 Foreldragreining

Foreldragreiningar gengu vel og niðurstöður arfgerðargreininga fengust fyrir alla 15 einstaklinga. Fyrir 13 einstaklinga voru arfgerðir foreldra til í WF og stóðust ætternisskráningar þeirra allra (arfgerð einstaklinga bar saman við arfgerð foreldra). Fyrir 2 einstaklinga, Ferskju (Sýni: Hár) og Dimmulimm (Sýni: Hár), voru arfgerðir foreldra ekki til í WF og var því ekki hægt að staðfesta ætternisskráningu þeirra. Tafla 6 sýnir niðurstöður í 6 af 17 erfðasætum fyrir Mola (Sýni: Hár) í samanburði við foreldra sína.

Tafla 6. Hluti af niðurstöðum úr foreldragreiningu Mola í samanburði við foreldra. Litur táknar hvaðan afkvæmi fékk samsætur sínar. Rauður litur táknar samsætur sem komið hafa frá móður og blár litur táknar samsætur sem komið hafa frá föður.

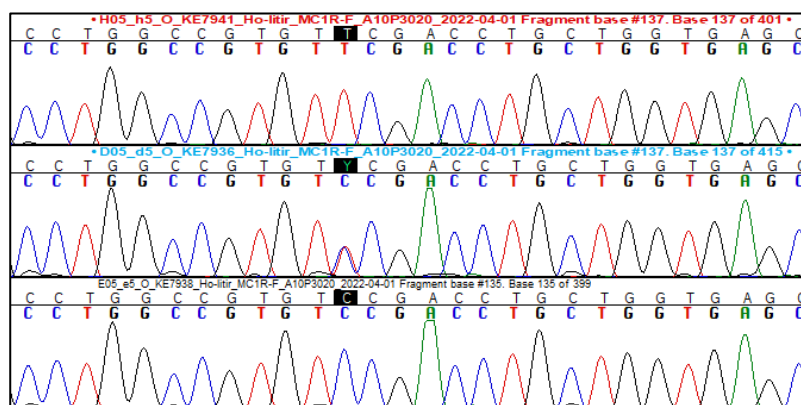
| Fæðingarnúmer | Nafn | Tengsl | ABS23 | AHT4 | ASB2 | VHL20 | HMS2 | HMS6 |
|---------------|----------|---------|-------|------|------|-------|------|------|
| IS2017125339 | Moli | Afkvæmi | I U | O O | J O | M M | I K | P P |
| IS2001225159 | Vænting | Móðir | I S | H O | O R | M R | I I | P P |
| IS2005135936 | Trymbill | Faðir | K U | J O | B J | J M | J K | P P |

3.2 Arfgerðargreining

3.2.1 Raðgreining

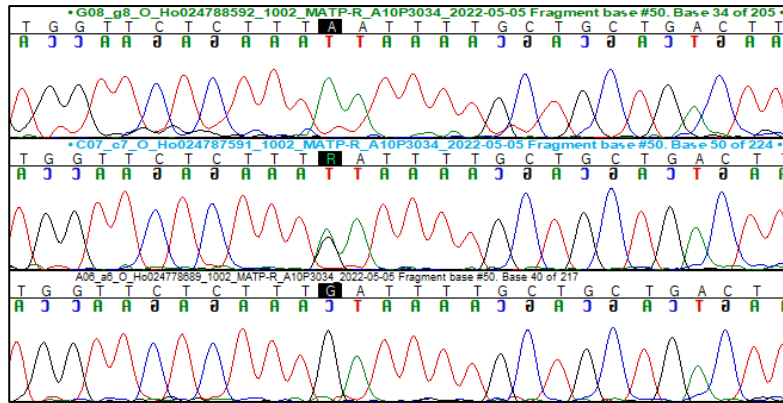
Raðgreiningar gengu heilt yfir vel fyrir *MC1R* og *MATP*. Niðurstöður fengust fyrir alla 13 einstaklinga fyrir prófun arfgerðargreininga og fyrir 44 af 48 völdum einstaklingum. Raðgreining fyrir *ASIP* tókst ekki og niðurstöður fengust ekki fyrir neinn einstakling.

Mynd 5 sýnir hvernig niðurstöður raðgreiningar líta út fyrir *MC1R*. Niðurstöður á myndinni eru fyrir 3 einstaklinga sem allir bera mismunandi arfgerð í E-sæti. Þessir 3 einstaklingar eru Eldur (Sýni: KE7941), Leikur (Sýni: KE7936) og Auðlind (Sýni: KE7938). Svörtu boxin tákna einbasabreytileikann sem finnst í geninu. T stendur fyrir arfhreinu arfgerðina E^eE^e, Y stendur fyrir arfblendnu arfgerðina E⁺E^e og C stendur fyrir arfhreinu arfgerðina E⁺E⁺.



Mynd 5. Niðurstöður raðgreiningar fyrir *MC1R* fyrir 3 einstaklinga.

Mynd 6 sýnir hvernig niðurstöður raðgreiningar líta út fyrir *MATP*. Niðurstöður á myndinni eru fyrir 3 einstaklinga sem allir bera mismunandi arfgerð í C-sæti. Þessir 3 einstaklingar eru Sólrún (Sýni: Ho024788592), Glódís (Sýni: Ho024787591) og Smyrill (Sýni: Ho024778689). Svörtu boxin tákna einbasabreytileika sem finnst í geninu. A stendur fyrir arfhreinu arfgerðina $C^{Cr}C^{Cr}$, R stendur fyrir arfblendnu arfgerðina $C^{+}C^{Cr}$ og G stendur fyrir arfhreinu arfgerðina $C^{+}C^{+}$.

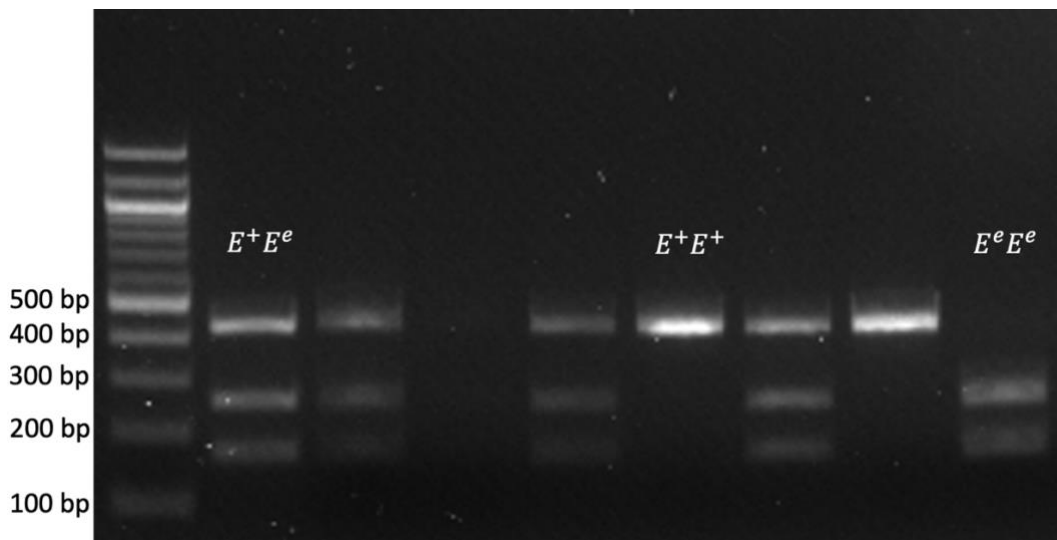


Mynd 6. Niðurstöður raðgreiningar fyrir *MATP* fyrir 3 einstaklinga.

3.2.2 Skerðibútagreining

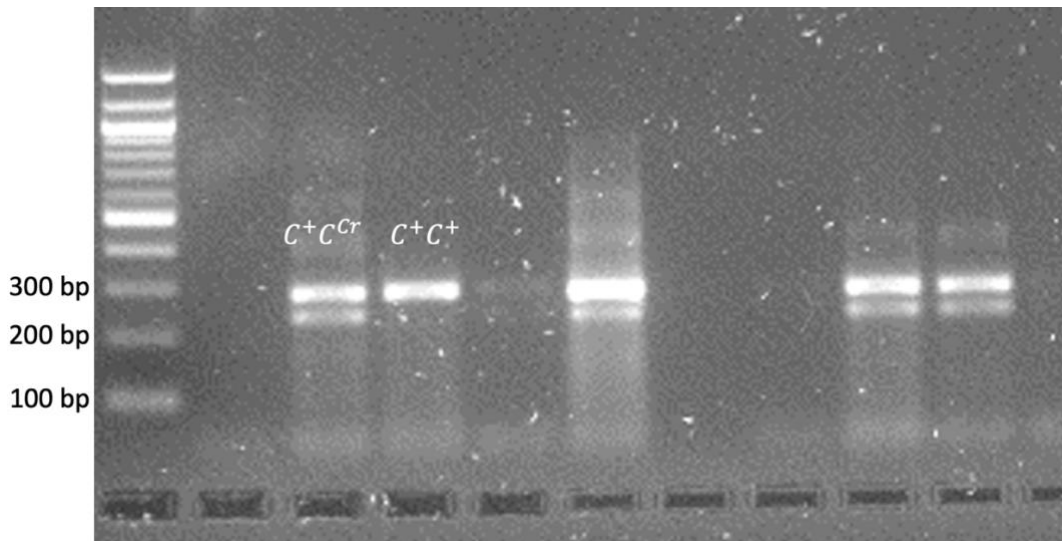
Skerðibútagreiningar gengu að mestu leiti vel. Niðurstöður fengust fyrir alla 13 einstaklinga fyrir prófun arfgerðargreininga og fyrir 44 af 48 völdum einstaklingum.

Mynd 7 sýnir hvernig niðurstöður skerðibútagreiningar líta út fyrir *MC1R*. Einn skerðibútur tákna arfhreinu arfgerðina $E^{+}E^{+}$, þrjár skerðibútar tákna arfblendnu arfgerðina $E^{+}E^{e}$ og tveir skerðibútar tákna arfhreinu arfgerðina $E^{e}E^{e}$.



Mynd 7. Skerðibútar *MC1R* í 2% agarósageli eftir skerðibútagreiningu.

Mynd 8 sýnir hvernig niðurstöður skerðibútagreiningar líta út fyrir *MATP*. Einn skerðibútur táknar arfhreinu arfgerðina C^+C^+ og tveir skerðibútar táknar arfblandu arfgerðina C^+C^{Cr} . Arfhreina arfgerðin $C^{Cr}C^{Cr}$ kom ekki fram í skerðibútagreiningu.

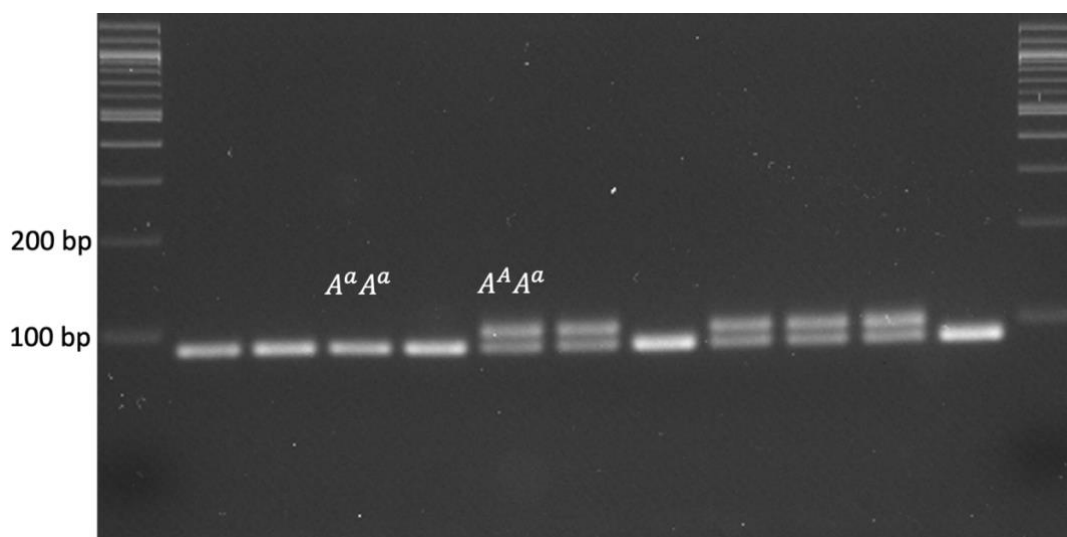


Mynd 8. Skerðibútar *MATP* í 2% agarósageli eftir skerðibútagreiningu.

3.2.3 Rafdráttur á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun

Rafdráttur á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun fyrir *ASIP* gekk vel. Niðurstöður fengust fyrir alla 13 einstaklinga fyrir prófun arfgerðargreininga og fyrir 44 af 48 völdum einstaklingum.

Mynd 9 sýnir hvernig niðurstöður rafdráttar líta út fyrir *ASIP*. Eitt band táknar arfhreinu arfgerðina A^aA^a og tvö bönd táknar arfblandnu arfgerðina A^AA^a . Arfhreina arfgerðin A^AA^A kom ekki fram í rannsókninni.



Mynd 9. Bönd *ASIP* í 4% agarósageli eftir rafdrátt.

3.2.4 Arfgerðir

Í töflu 7 má sjá arfgerð og litasvipgerð einstaklinga fyrir prófun arfgerðargreininga. Niðurstöður fengust fyrir öll erfðasæti fyrir alla 13 einstaklinga.

Tafla 7. Arfgerð og litasvipgerð einstaklinga fyrir prófun arfgerðargreininga. Arfgerðir A- og C-sæta eru úr raðgreiningu og arfgerð A-sætis er úr rafdrætti á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun.

| Sýni | Nafn | Litasvipgerð | E-sæti (MC1R) | A-sæti (ASIP) | C-sæti (MATP) |
|-------------|---------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| KE7938 | Auðlind | Dökk brún | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| KE7941 | Eldur | Rauður | E ^e E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ótilgreint | - | Móvindótt | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| KE8027 | Grímar | Jarpur | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ótilgreint | - | Móalóttur | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| KE7936 | Leikur | Jarpur | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| KE8029 | Rokkur | Dökk jarpur | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ótilgreint | - | Grár | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ótilgreint | - | Brún | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ho024788592 | Sólrún | Hvít (Föl) | E ^e E ^e | A ^a A ^a | C ^{Cr} C ^{Cr} |
| KE7939 | Stilla | Jarpvindótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| KE8024 | Úlfynja | Moldótt | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ótilgreint | - | Leirljós | E ^e E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |

Í töflu 8 má loks sjá arfgerð og litasvipgerð valinna einstaklinga. Niðurstöður fengust ekki eða voru óreiðanlegar fyrir 4 af 48 einstaklingum og var þeim eytt úr sýnahóp. Af 44 einstaklingum sem niðurstöður fengust fyrir reyndust 7 einstaklingar ekki bera leirlit (C⁺C⁺ í C-sæti) og var þeim einnig eytt úr sýnahóp. Litir í töflu tákna þá einstaklinga sem eytt var úr sýnahóp. Blár litur táknar að niðurstöður fengust ekki og gulur litur táknar arfgerð C⁺C⁺ í C-sæti.

Tafla 8. Arfgerð og litasvipgerð valinna einstaklinga. Arfgerðir E- og C-sæta eru úr raðgreiningu og arfgerð A-sætis er úr rafdrætti á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun.

| Sýni | Nafn | Litasvipgerð | E-sæti (MC1R) | A-sæti (ASIP) | C-sæti (MATP) |
|-------------|-------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Ho024775540 | Árelíus | Muskótt | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024790686 | Dröfn | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Dökkvi | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| KE4196 | Eir | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024787813 | Englasöngur | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024785367 | Erlingur | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024778839 | Eygló | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024770546 | Fagranótt | Muskótt | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Ferskja* | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Fold | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024754954 | Gjálp | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |

Tafla 8. Framhald.

| Sýni | Nafn | Litasvipgerð | E-sæti (MC1R) | A-sæti (ASIP) | C-sæti (MATP) |
|-------------|---------------|--------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| Ho024787591 | Glódís | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024788454 | Gullnótt | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024790388 | Hlekkur | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Nn (Reykir) | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Óskar | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Smella | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024753455 | Þoka | Muskótt | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| KE1945 | Alísa | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024785090 | Ágústa | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024790988 | Finndís | Skolbrún | - | - | - |
| Ho024781390 | Freyja | Skolbrún | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024787590 | Heiðdís | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024778097 | Herkúles | Skolbrún | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024787738 | Hreindís | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024787437 | Hressing | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024782662 | Ísbrún | Skolbrún | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024785206 | Katla | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Kleópatra | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Mökkur | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Nn (Hemla II) | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Moli | Skolbrún | - | A ^a A ^a | - |
| Ho024790782 | Ronja | Skolbrún | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Vænting | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024776441 | Vök | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Vörður | Skolbrún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024756214 | Fía | Brún | E ⁺ E ⁺ | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ho024786972 | Freydís | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Hár | Lexía | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ho024778689 | Smyrill | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ho024780990 | Traustur | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Valdís | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| KE1011 | Andri | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Hár | Dimmalimm | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |
| Ho024790784 | Fanndís | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ^{Cr} |
| Ho024789707 | Hrafndís | Brún | - | - | - |
| Ho024790618 | Sigurfari | Brún | - | - | - |
| Ho024774383 | Sóldís | Brún | E ⁺ E ^e | A ^a A ^a | C ⁺ C ⁺ |

**Ekki hægt að staðfesta ætterni með foreldragreiningu en ekki eytt úr gagnasafni þar sem C⁺C^{Cr} greindist í C-sæti.*

3.2.5 Aðrir breytileikar í MATP

Í niðurstöðum raðgreiningar fundust tveir aðrir einbasabreytileikar í MATP geninu í samanburði við viðmiðunargen (AH012460.2, GeneBank®). Breytileikarnir fundust bæði í einstaklingum fyrir prófun arfgerðargreininga og völdum einstaklingum. Í töflu 9 má sjá í hvaða einstaklingum breytileikarnir fundust.

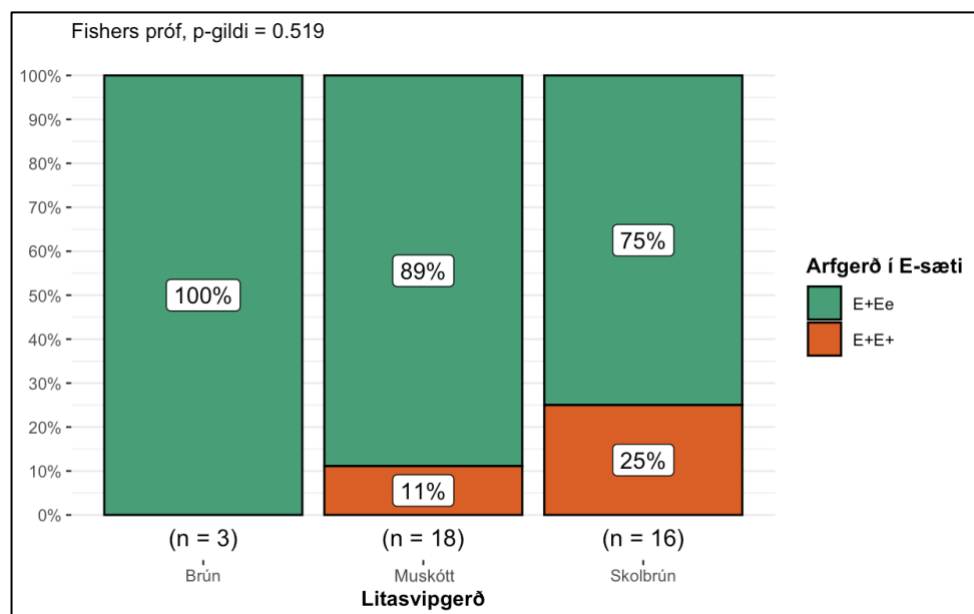
Tafla 9. Aðrir breytileikar sem fundust í MATP.

| Sýni | Nafn | Litasvipgerð | Arfgerð í C-sæti (MATP) | Breytileiki* |
|-------------|-----------|--------------|--------------------------------|--------------|
| KE8029 | Rokkur | Dökk jarpur | C ⁺ C ⁺ | 1 |
| - | - | Móalóttur | C ⁺ C ⁺ | 1 |
| Ho024785367 | Erlingur | Muskótt | C ⁺ C ^{Cr} | 1 |
| KE7941 | Eldur | Rauður | C ⁺ C ⁺ | 1 |
| Ho024787590 | Heiðdís | Skolbrún | C ⁺ C ^{Cr} | 1 |
| Hár | Kleópatra | Skolbrún | C ⁺ C ^{Cr} | 1 |
| Hár | Vænting | Skolbrún | C ⁺ C ^{Cr} | 1 |
| Ho024780990 | Traustur | Brún | C ⁺ C ^{Cr} | 2 |
| KE8027 | Grímar | Jarpur | C ⁺ C ⁺ | 2 |
| Ho024775540 | Árelíus | Muskótt | C ⁺ C ^{Cr} | 2 |
| KE4196 | Eir | Muskótt | C ⁺ C ^{Cr} | 2 |
| Ho024753455 | Þoka | Muskótt | C ⁺ C ^{Cr} | 2 |

*1 táknar annan einbasabreytileikann sem fannst og 2 táknar hinn einbasabreytileikann.

3.3 Tölfræðigreining – Fishers próf

Mynd 10 sýnir niðurstöður tölfræðigreiningar með Fishers prófi ($p = 0,519$) sem framkvæmt var fyrir 37 einstaklinga. Grænn litur táknar hlutfall arfgerðar E^+E^e og rauður litur táknar hlutfall arfgerðar E^+E^+ innan litasvipgerða.



Mynd 10. Niðurstöður tölfræðigreiningar með Fishers prófi. n = fjöldi einstaklinga.

4. Umræður

4.1 Prófun arfgerðargreininga

Í þessari rannsókn voru genin *MC1R*, *ASIP* og *MATP* arfgerðargreind í fyrsta skipti í hrossum hjá rannsóknarstofu Matís og því voru nokkrar aðferðir arfgerðargreiningar prófaðar. 13 einstaklingar voru valdir fyrir prófun arfgerðargreininga til að sjá hvernig niðurstöður líta út áður en að arfgerðargreining var framkvæmd fyrir valda einstaklinga. Líkt og áður hefur komið fram gekk arfgerðargreining mjög vel fyrir prófun arfgerðargreininga. Niðurstöður fengust fyrir öll erfðasæti fyrir alla 13 einstaklinga og bar arfgerðum saman við litasvipgerð í öllum tilfellum.

Í prófun arfgerðargreininga kom í ljós að ekki var hægt að raðgreina *ASIP* genið. Afurðir kjarnsýrumögnunar gensins voru of stuttar (tafla 5) og því ekki hægt að lesa neitt markvert úr niðurstöðum raðgreiningar. Þar með var ákveðið að arfgerðargreina *ASIP* með rafdrætti á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun.

Einnig kom í ljós að niðurstöður skerðibútagreininga fyrir *MC1R* og *MATP* voru ekki jafn áreiðanlegar og niðurstöður raðgreiningar. Fyrir 2 einstaklinga bar niðurstöðum skerðibútagreiningar ekki saman við niðurstöður raðgreiningar. Út frá niðurstöðum skerðibútagreiningar fyrir *MC1R* fyrir Eir (Sýni: KE4196) var arfgerð E^+E^+ ákvörðuð en út frá niðurstöðum raðgreiningar var arfgerð E^+E^e ákvörðuð. Út frá niðurstöðum skerðibútagreiningar fyrir *MATP* fyrir Úlfynju (Sýni: KE8024) var arfgerð C^+C^+ ákvörðuð en út frá niðurstöðum raðgreiningar var arfgerð C^+C^{Cr} ákvörðuð. Skerðibútar sáust oft illa í agarósageli og því erfitt að ákvarða arfgerð út frá þeim. Þar með var ákveðið að horfa einungis á niðurstöður raðgreiningar fyrir *MC1R* og *MATP*.

Stefna Matís er að bjóða almennt upp á arfgerðargreiningar litatengdra gena í hrossum. Af fenginni reynslu við arfgerðargreiningar í þessari rannsókn myndi Matís notast við rafdrátt eftir kjarnsýrumögnun við arfgerðargreiningu *ASIP* gensins og raðgreiningu fyrir arfgerðargreiningu genanna *MC1R* og *MATP*.

4.2 Erfðabreytileiki í muskóttum (glóbrúnum) íslenskum hrossum

Líkt og komið hefur fram gekk arfgerðargreining að mestu leiti vel fyrir valda einstaklinga. Áreiðanlegar niðurstöður fengust fyrir öll erfðasæti fyrir 44 af 48 einstaklingum. Erfðaefni í erfðasýnum þeirra sem ekki fengust niðurstöður fyrir hefur með tímanum líklega skemst í geymslu í frysti. Af þeim 44 einstaklingum sem niðurstöður fengust fyrir reyndust 7 einstaklingar ekki bera leirlit (C^+C^+ í C-sæti). Alls var 11 einstaklingum því eytt úr sýnahóp,

þeim sem ekki fengust niðurstöður fyrir og þeim sem reyndust bera arfgerð C^+C^+ í C-sæti. Sýnahópur endaði þá í 37 einstaklingum.

Einstaklingarnir 7 sem reyndust ekki bera leirlit voru allir metnir með brúna litasvipgerð, hins vegar reyndust allir einstaklingar metnir með muskótta eða skolbrúna litasvipgerð bera leirlit (C^+C^{Cr} í C-sæti). Niðurstöður arfgerðargreiningar fyrir *MATP* benda því sterklega til þess að tengsl séu á milli muskótts litar og arfblendni fyrir leirlit, líkt og Guðni (2004, 2006) ályktaði.

Allir 37 valdir einstaklingar reyndust bera a.m.k. eina ríkjandi E^+ samsætu í E-sæti og arfgerð A^aA^a í A-sæti og var því hægt að staðfesta að þeir væru með brúnan grunnlit.

Tíðni arfgerða í E-sæti einstaklinga kom á óvart. Einungis 6 af 37 einstaklingum reyndust bera arfgerðina E^+E^+ og þá reyndust 31 einstaklingur bera arfgerðina E^+E^e . Með Fishers prófi greindist ekki marktækni á milli arfgerðar í E-sæti og litasvipgerðar ($p = 0,519$) og benda niðurstöður þá til þess að ekki séu tengsl á milli arfgerðar í E-sæti og muskótts litar. Einungis 3 einstaklingar með brúna litasvipgerð reyndust bera leirlit og báru þeir allir arfgerð E^+E^e í E-sæti. Í sýnahóp vantaði þar með einstaklinga með brúna litasvipgerð sem bera leirlit og arfgerð E^+E^+ í E-sæti. Niðurstöður hefðu því verið áreiðanlegri með fleiri einstaklingum í sýnahóp.

4.3 Mat á litasvipgerðum

Erfitt getur reynst að leggja mat á litasvipgerð hrossa þar sem að litir þeirra eru ekki afmarkaðir flokkar heldur eins og einn stór litaskali þar sem að margir litir skarast á milli flokka (Guðni Þorvaldsson, munnleg heimild, 17. nóvember, 2022). Í þessari rannsókn var ekki alltaf samræmi á milli mats á litasvipgerð og litaskráningu í WF. Flest hross sem skráð voru muskótt í WF (21 Brúnn/gló) voru þó einnig metin muskótt í rannsókninni. Ekki kom á óvart að hross sem metin voru skolbrún voru öll með aðra litaskráningu í WF (21 Brúnn/gló, 22 Brúnn/mó eða 25 Brúnn/milli) þar sem að skolbrúnn litur er ekki valmöguleiki í litaskráningu. Öll hross sem metin voru brún voru einnig með brúna litaskráningu (22 Brúnn/mó eða 25 Brúnn/milli) í WF, fyrir utan eitt sem skráð var muskótt (21 Brúnn/gló).

Muskóttur litur, líkt og flestir aðrir litir hrossa, er breytilegur á milli árstíða. Liturinn er skarpari og gljáameiri á sumrin en daufari og gljáaminni á veturna (Stefán, 2001). Helsti gallinn við þessa rannsókn er að mat á litasvipgerð var ekki nægilega nákvæmt en höfundur áttaði sig ekki á því fyrr en eftir á. Litasvipgerðir hrossa voru ekki allar metnar á sama árstíma og litasvipgerð of margra hrossa var einungis metin af ljósmynd en ekki skoðuð í návígi, en ljósmyndir gefa ekki alltaf rétta mynd af litasvipgerð.

4.4 Mögulegt framhald

Út frá niðurstöðum þessarar rannsóknar er ljóst að skoða þarf fleiri erfðasæti sem líklegt er að hafi áhrif á það hvort að muskóttur litur komi fram.

Í *MATP* geninu fundust tveir aðrir einbasabreytileikar í samanburði við viðmiðunargen (tafla 9). Ekki fundust augljós tengsl á milli breytileikanna og litasvipgerða svo þeir voru ekki skoðaðir nánar. Þessar niðurstöður benda þó til þess að fleiri breytileikar finnist í *MATP* geninu í íslenskum hrossum og hugsanlegt að þar sé að finna aðra breytileika sem tengjast muskóttum lit.

Annað sem hægt væri að gera er að athuga hvort að breytileiki finnist í Ch-sæti (kafla 1.3.3) í íslenskum hrossum. Í erlendum hrossakynjum hefur einbasabreytileiki fundist í sætinu sem tengist kampavínslitum (glólitum) (Cook o.fl., 2008), en liturinn sem kemur fram sökum áhrifa frá breytileikanum á brúnan grunnlit svipar til muskóttis litar í íslenskum hrossum (Stefán, 2001).

Í frekari rannsóknum þyrfti að vera með fleiri einstaklinga í sýnahóp og framkvæma nákvæmara mat á litasvipgerð til að fá áreiðanlegri niðurstöður. Einnig væri hægt notast við aðrar aðferðir til að leita uppi einbasabreytileika í erfðasætum sem gætu tengst muskóttum lit. Erfðamengis-tengslaggreining (e. genome-wide association studies, GWAS) er aðferð sem að felst í því að arfgerðargreina erfðamengi margra einstaklinga og leita að genum og breytileikum sem gætu tengst ákveðnum eiginleikum (Hutter, 2022). *EquineSNP50 Genotyping BeadChip* (Illumina®, <https://www.illumina.com>) er sérstaklega hannað fyrir slíkar greiningar í hrossum og væri hægt að nota til að arfgerðargreina sýni og leita að genum og breytileikum sem gætu tengst muskóttum lit í íslenskum hrossum.

5. Ályktanir

Niðurstöður þessarar rannsóknar benda til þess að ekki séu tengls á milli arfgerðar í E-sæti (*MC1R*) og muskóttts litar í íslenskum hrossum. Niðurstöður benda hins vegar sterklega til þess að tengsl séu á milli litarins og arfblendni í C-sæti (*MATP*). Líklegt er að áhrif frá öðrum erfðasætum valdi því að liturinn komi fram í brúnum grunnlit sem er arfblendinn um leirlit.

Í rannsókninni voru nokkrar aðferðir arfgerðargreininga prófaðar og þar kom í ljós að betur hentaði að raðgreina genin *MC1R* og *MATP* en notast við rafdrátt á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun fyrir *ASIP* genið.

Gera þyrfti frekari rannsóknir með fleiri einstaklingum í sýnahóp og nákvæmara mati á litasvipgerð ásamt því að skoða fleiri erfðasæti í tengslum við muskóttan lit.

6. Heimildaskrá

- Adams, D. (2022a, 8. desember). *Genotype*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/genotype>
- Adams, D. (2022b, 8. desember). *DNA Sequencing*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/DNA-Sequencing>
- Albert Jóhannsson. (1991). *Handbók íslenskra hestamanna*. Örn og Örlygur.
- Allan, F. K. (2021). *A Landscaping Analysis of Working Equid Population Numbers in LMICs, with Policy Recommendations*. https://www.thebrooke.org/sites/default/files/Images/Equid_Population_Landscaping_Analysis.pdf
- Bailey, E. og Brooks, S. A. (2020). *Horse Genetics* (3. útgáfa). CABI.
- Bates, S. A. (2022, 8. desember). *Deoxyribonucleic acid (DNA)*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Deoxyribonucleic-Acid>
- Berryere, T. G., Schmutz, S. M., Schimpf, R. J., Cowan, C. M. og Potter, J. (2003). *TYRP1* is associated with dun coat colour in Dexter cattle or how now brown cow?. *Animal Genetics*, 34(3), 169-175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2003.00985.x>
- Bowling, A. T. (1996). *Horse Genetics* (1. útgáfa). CABI.
- Bowling, A. T. og Ruvinsky, A. (2000). Genetic Aspects of Domestication, Breeds and Their Origins. Í A. T. Bowling og A. Ruvinsky (ritsjórar), *The Genetics of the Horse* (bls. 25-51). CABI.
- Brooks, S. A. og Bailey, E. (2005). Exon skipping in the *KIT* gene causes a Sabino spotting pattern in horses. *Mammalian Genome*, 16, 893-902. <https://doi.org/10.1007/s00335-005-2472-y>
- Brooks, S. A., Lear, T. L., Adelson, D. L. og Bailey, E. (2007). A chromosome inversion near the *KIT* gene and the Tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenetic and Genome Research*, 119, 225-230. <https://doi.org/10.1159/000112065>
- Bændasamtök Íslands. (e.d.-a). *Brúnn litur*. https://myndir.bondi.is/wf/litamyndir/ISL/2500_ISL.pdf?refresh=0.518096954438727

Bændasamtök Íslands. (e.d.-b). *Leirljós litur*.

https://myndir.bondi.is/wf/litamyndir/ISL/4500_ISL.pdf?refresh=0.694934881046763

Bændasamtök Íslands. (e.d.-c). *Moldóttur litur*.

https://myndir.bondi.is/wf/litamyndir/ISL/5500_ISL.pdf?refresh=0.694934881046763

Bændasamtök Íslands. (e.d.-d). *Brún hross sem bera erfðir fyrir leirlit*.

https://myndir.bondi.is/wf/litamyndir/ISL/2100_ISL.pdf?refresh=0.017213651863150825

Caro, T. og Mallarino, R. (2020). Coloration in Mammals. *Trends in Ecology and Evolution*, 35(4), 357-366. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2019.12.008>

Cieslak, M., Reissmann, M., Hofreiter, M. og Ludwig, A. (2011). Colours of domestication. *Biological Reviews*, 86(4), 885-899. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00177.x>

Cook, D., Brooks, S., Bellone, R. og Bailey, E. (2008). Missense Mutation in Exon 2 of SLC36A1 Responsible for Champagne Dilution in Horses. *PLOS Genetics*, 4(9), e1000195. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000195>

Fagráð í hrossarækt. (e.d.). *Ræktunarmarkmið fyrir íslenska hrossakynið*.

https://www.rml.is/static/files/Hrossaraekt_RML/raektunarmarkmid.pdf

Freyja Imsland. (2015). *Monogenetic Traits Associated with Structural Variants in Chicken and Horse* [doktorsritgerð, Uppsala Universitet]. Opin Vísindi.

<https://opinvisindi.is/bitstream/handle/20.500.11815/1486/FULLTEXT01.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Gratten, J., Beraldi, D., Lowder, B. V., McRae, A. F., Visscher, P. M., Pemberton, J. M. og Slate, J. (2007). Compelling evidence that a single nucleotide substitution in *TYRP1* is responsible for coat-colour polymorphism in a free-living population of Soay sheep. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Science*, 274(1610), 619-626.

<https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3762>

Guðni Þorvaldsson og Guðrún Jóhanna Stefánsdóttir. (2008). Litir og litbrigði íslenska hestsins. Í Landbúnaðarháskóli Íslands (annast útgáfu ritraðar), *Rit LbhÍ 16*.

<https://rafhladan.is/handle/10802/6626>

- Guðni Þorvaldsson. (2004). *Eru kampavínslitir til í íslenska hrossastofninum?*
<https://www.lhhestar.is/static/files/Baeklingar/Kampavinsgen.pdf>
- Guðni Þorvaldsson. (2006). Loftfari frá Vilmundarstöðum: Litgreining á afkvæmum. Í Landbúnaðarháskóli Íslands (annast útgáfu ritraðar), *Rit LbhÍ* 7.
https://rafhladan.is/bitstream/handle/10802/6391/Rit_LbhI_nr_7.pdf?sequence=1
- Gunnfríður Elín Hreiðarsdóttir, Þorvaldur Árnason, Vilhjálmur Svansson og Jón Hallsteins Hallsson. (2014). Analysis of the history and population structure of the Icelandic horse using pedigree data and DNA analyses. *Icelandic Agricultural Sciences*, 27(1), 63-79.
https://www.researchgate.net/publication/297823739_Analysis_of_the_history_and_population_structure_of_the_Icelandic_horse_using_pedigree_data_and_DNA_analyses
- Haase, B., Brooks, S. A., Schlumbaum, A., Azor, P. J., Bailey, E., Alaeddine, F., Mevissen, M., Burger, D., Poncet, P. -A., Rieder, S. og Leeb, T. (2007). Allelic Heterogeneity at the Equine *KIT* Locus in Dominant White (*W*) Horses. *PLOS Genetics*, 3(11), e195.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030195>
- Haase, B., Brooks, S. A., Tozaki, T., Burger, D., Pincet, P. -A., Rieder, S., Hasegawa, T., Penedo, C. og Leeb, T. (2009). Seven novel *KIT* mutations in horses with white coat colour phenotypes. *Animal Genetics*, 40(5), 623-629. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01893.x>
- Haase, B., Jagannathan, V., Rieder, S. og Leeb, T. (2015). A novel *KIT* variant in an Icelandic horse with white-spotted coat colour. *Animal Genetics*, 46(4), 466.
<https://doi.org/10.1111/age.12313>
- Haase, B., Rieder, S., Tozaki, T., Hasegawa, T., Penedo, M. C. T., Jude, R. og Leeb, T. (2011). Five novel *KIT* mutations in horses with white colour phenotypes. *Animal Genetics*, 42(3), 337-339. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02173.x>
- Hauswirth, R., Haase, B., Blatter, M., Brooks, S. A., Burger, D., Drögemüller, C., Gerber, V., Henke, D., Janda, J., Jude, R., Magdesian, K. G., Matthews, J. M., Poncet, P. -A., Svansson, V., Tozaki, T., Wilkinson-White, L., Penedo, M. C. T., Rieder, S. og Leeb, T. (2012). Mutations in *MITF* and *PAX3* Cause “Splashed White” and Other White

- Spotting Phenotypes in Horses. *PLOS Genetics*, 8(4), e1002653.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002653>
- Hendricks, B. L. (1995). *International Encyclopedia of Horse Breeds*. University of Oklahoma Press.
- Henkel, J., Lafayette, C., Brooks, S. A., Martin, K., Pattersson-Rosa, L., Cook, D., Jagannathan, V. og Leeb, T. (2019). Whole-genome sequencing reveals a large deletion in the *MITF* gene in horses with white spotted coat colour and increased risk of deafness. *Animal Genetics*, 50(2), 172-174. <https://doi.org/10.1111/age.12762>
- Holl, H. Og Bailey, E. (2010). *De novo* mutation of *KIT* discovered as a result of a non-hereditary white coat colour pattern. *Animal Genetics*, 41(2), 196-198.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02135.x>
- Hou, L. og Pavan, W. J. (2008). Transcriptional and signaling regulation in neural crest stem cell-derived melanocyte development: Do all roads lead to MITF?. *Cell Research*, 18, 1163-1176. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.303>
- Houswirth, R., Jude, R., Haase, B., Bellone, R. R., Archer, S., Holl, H., Brooks, S. A., Tozaki, T., Penedo, M. C. T., Rieder, S. og Leeb, T. (2013). Novel variants in the *KIT* and *PAX3* genes in horses with white-spotted coat colour phenotypes. *Animal Genetics*, 44(6), 763-765. <https://doi.org/10.1111/age.12057>
- Hubbard, J. K., Uy, J. A. C., Hauber, M. E., Hoekstra, H. E. og Safran, R. J. (2010). Vertebrate pigmentation: from underlying genes to adaptive function. *Trends in Genetics*, 26(5), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.02.002>
- Hutter, C. M. (2022, 8. desember). *Genome-Wide Association Studies (GWAS)*. National Human Genome Research Institute. <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Genome-Wide-Association-Studies>
- Imes, D. L., Geary, L. A., Grahn, R. A. og Lyons, L. A. (2006). Albinism in the domestic cat (*Felis catus*) is associated with a *tyrosinase (TYR)* mutation. *Animal Genetics*, 37(2), 175-178. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052-2005.01409.x>
- Ingimar Sveinsson. (2010). *Hrossafræði Ingimars*. Uppheimar.
- Karch, S. B. (2016). Autopsy: Molecular. Í J. Payne-James og R. W. Byard (ritsjórar), *Encyclopedia of Forensic and Legal Medicine* (bls. 290-296). Academic Press.

- Klug, W. S. og Cummings, M. R. (2002). *Essentials of Genetics*. Prentice Hall.
- Lamoreux, M. L., Wakamatsu, K. og Ito, S. (2002). Interaction of Major Coat Color Gene Functions in Mice as Studied by Chemical Analysis of Eumelanin and Pheomelanin. *Pigment Cell Research*, 14(1), 23-31. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2001.140105.x>
- Lantz, N. (2017, 29. april). *Gel Electrophoresis to Determine Genotype* [myndband]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=dXYGYCPYKEo>
- Levine, M. A. (1999). Botai and the Origins of Horse Domestication. *Journal of Anthropological and Archaeology*, 18(1), 29-78. <https://doi.org/10.1006/jaar.1998.0332>
- Levy, C., Khaled, M. og Fisher, D. E. (2006). MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in Molecular Medicine*, 12(9), 406-414. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.07.008>
- Li, B., He, X. -I., Zhao, Y. -P., Zhao, Q. -N., Unierhu, Bai, D. -Y. og Manglai, D. (2014). *Tyrosinase-related protein 1 (TYRP1)* gene polymorphism and skin differential expression related to coat color in Mongolian horse. *Livestock Science*, 167, 58-64. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.06.003>
- Librado, P., Fages, A., Gaunitz, C., Leonardi, M., Wagner, S., Khan, N., Hanghøj, K., Alquraishi, S. A., Alfarhan, A. H., Al-Rasheid, K. A., Sarkissian, C. D., Schubert, M. og Orlando, L. (2016). The Evolutionary Origin and Genetic Makeup of Domestic Horse. *Genetics*, 204(2), 423-434. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.194860>
- Librado, P., Khan, N., Fages, A., Kusliy, M. A., Suchan, T., Tonasso-Calvière, L., Schiavinato, S., Alioglu, D., Formentier, A., Perdereau, A., Aury, J. -M., Gaunitz, C., Chauvey, L., Seguin-Orlando, A., Sarkissian, C. D., Southon, J., Shapiro, B., Tishkin, A. A., Kovalev, A. A., ... Orlando, L. (2021). The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes. *Nature*, 598, 634-640. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04018-9>
- Liu, J., Fukunaga-Kalabis, M., Li, L. og Herlyn, M. (2014). Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 563, 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.07.023>

- Locke, M. M., Ruth, L. S., Millon, L. V., Penedo, M. C. T., Murray, J. D. og Bowling, A. T. (2001). The cream dilution gene, responsible for the palomino and buckskin coat colours, maps to horse chromosome 21. *Animal Genetics*, 32(6), 340-343. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2001.00806.x>
- Ludwig, A., Pruvost, M., Reissmann, M., Benecke, N., Brockmann, G. A., Castaños, P., Cieslak, M., Lippold, S., Llorente, L., Malaspinas, A.-S., Slatkin, M. og Hofreiter, M. (2009). Coat Colour Variation at the Beginning of Horse Domestication. *Science*, 324(5926), 485. <https://doi.org/10.1126/science.1172750>
- Lyons, L. A., Foe, I. T., Rah, H. C. og Grahn, R. A. (2005). Chocolate coated cats: *TYRPI* mutations for brown color in domestic cats. *Mammalian Genome*, 16, 356-366. <https://doi.org/10.1007/s00335-004-2455-4>
- Magdesian, K. G., Tanaka, J. og Bellone, R. R. (2020). A De Novo *MITF* Deletion Explains a Novel Splashed White Phenotype in an American Paint Horse. *Journal of Heredity*, 111(3), 287-293. <https://doi.org/10.1093/jhered/esaa009>
- Mariat, D., Taourit, S. og Guérin, G. (2003). A mutation in the *MATP* gene causes the cream coat colour in the horse. *Genetics Selection Evolution*, 35(1), 119-133. <https://doi.org/10.1051/gse:2002039>
- Marklund, L., Moller, M. J., Sandberg, K. og Andersson, L. (1996). A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome*, 7, 895-899. <https://doi.org/10.1007/s003359900264>
- Marklund, S., Moller, M., Sandberg, K. og Andersson, L. (1999). Close association between sequence polymorphism in the *KIT* gene and the roan coat color in horses. *Mammalian Genome*, 10, 283-288. <https://doi.org/10.1007/s003359900987>
- Matsushima, Y., Shinkai, Y., Kobayashi, Y., Sakamoto, M., Kunieda, T. og Tachibana, M. (2002). A mouse model of Waardenburg syndrome type 4 with a new spontaneous mutation of the endothelin-B receptor gene. *Mammalian Genome*, 13, 30-35. <https://doi.org/10.1007/s00335-001-3038-2>
- McCallion, A. S. og Chakravarti, A. (2001). *EDNRB/EDN3* and Hirschsprung Disease Type II. *Pigment Cell Research*, 14, 161-169. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749-2001.140305.x>

- Metallinos, D. L., Bowling, A. T. og Rine, J. (1998). A missense mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with Lethal White Foal Syndrome: an equine version of Hirschsprung Disease. *Mammalian Genome*, 9, 426-431.
<https://doi.org/10.1007/s003359900790>
- miniPCR bio. (2020, 5. febrúar). *What is PCR? Polymerase Chain Reaction | miniPCR bio™* [myndband]. Youtube. https://www.youtube.com/watch?v=c07_5BfIDTw
- Mort, R. L., Jackson, I. J. og Patton, E. E. (2015). The melanocyte lineage in development and disease. *Development*, 142(4), 620-632. <https://doi.org/10.1242/dev.106567>
- Petersen, J. L., Mickelson, J. R., Rendahl, A. K., Valberg, S. J., Andersson, L. S., Axelsson, J., Bailey, E., Bannasch, D., Binns, M. M., Borges, A. S., Brama, P., Machado, A. C., Capomaccio, S., Cappelli, K., Cothran, E. G., Distl, O., Fox-Clipsham, L., Graves, K. T., Guérin, G., ... McCue, M. E. (2013). Genome-Wide Analysis Reveals Selection for Important Traits in Domestic Horse Breeds. *PLOS Genetics*, 9(1), e1003211.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003211>
- Powledge, T. M. (2004). The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education*, 28(2), 44-50. <https://doi.org/10.1152/advan.00002.2004>
- Raudsepp, T., Finno, C. J., Bellone, R. R. og Petersen, J. L. (2019). Ten years of the horse reference genome: insight into equine biology, domestication and population dynamics in the post-genome era. *Animal Genetics*, 50(6), 569-597.
<https://doi.org/10.1111/age.12857>
- Reissmann, M. og Ludwig, A. (2013). Pleiotropic effects of coat colour-associated mutations in humans, mice and other mammals. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 24,(6-7), 576-586. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2013.03.014>
- Rieder, S. (2009). Molecular tests for coat colour in horses. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 126(6), 415-424. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2009.00832.x>
- Rieder, S., Taourit, S., Mariat, D., Langlois, B. og Guérin, G. (2001). Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat colour phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome*, 12, 450-455.
<https://doi.org/10.1007/s003350020017>

- Santschi, E. M., Purdy, A. K., Valberg, S. J., Vrotsos, P. D., Kaese, H. og Mickelson, J. R. (1998). Endothelin receptor B polymorphism associated with lethal white foal syndrome in horses. *Mammalian Genome*, 9, 306-309.
<https://doi.org/10.1007/s003359900754>
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G. og Goldfinch, A. D. (2002). TYRP1 and MC1R genotypes and their effects on coat color in dogs. *Mammalian Genome*, 13(7), 380-387.
<https://doi.org/10.1007/s00335-001-2147-2>
- Schmutz, S. M., Berryere, T. G., Ciobanu, D. C., Mileham, A. J., Schmitz, B. H. og Fredholm, M. (2004). A form of albinism in cattle is caused by tyrosinase frameshift mutation. *Mammalian Genome*, 15, 62-67. <https://doi.org/10.1007/s00335-002-2249-5>
- Shang, S., Yu, Y., Zhao, Y., Dang, W., Zhang, J., Qin, X., Irwin, D. M., Wang, Q., Liu, F., Wang, Z., Zhang, S. og Wang, Z. (2019). Synergy between *MC1R* and *ASIP* for coat color in horses (*Equus caballus*). *Journal of Animal Science*, 97(4), 1578-1585.
<https://doi.org/10.1093/jas/skz071>
- Shin, M. K., Levorse, J. M., Ingram, R. S. og Tilghman, S. M. (1999). The temporal requirement for endothelin receptor-B signalling during neural crest development. *Nature*, 402, 496-501. <https://doi.org/10.1038/990040>
- Smith, M. (2022, 8. desember). *Electrophoresis*. National Human Genome Research Institute.
<https://www.genome.gov/genetics-glossary/Electrophoresis>
- Sponenberg, D. P. og Bellone, R. (2017). *Equine Color Genetics* (4. útgáfa). Wiley-Blackwell.
- Stefán Aðalsteinsson (2004). Sérstaða íslenskra húsdýra. *Freyr*, 100(5), 15-28.
- Stefán Aðalsteinsson. (1977). Albinism in Icelandic sheep. *The Journal of Heredity*, 68(6), 347-349. <https://doi.org/oxfordjournals.jhered.a108857>
- Stefán Aðalsteinsson. (2001). *Íslenski hesturinn – litir og erfðir*. Ormstunga
- Steingrímsson, E., Copeland, N. G. og Jenkins, N. A. (2006). Mouse coat colour mutations: From fancy mice to functional genomics. *Developmental Dynamics*, 235(9), 2401-2411. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20840>
- Sulaimon, S. S. og Kitchell, B. E. (2003). The biology of melanocytes. *Veterinary Dermatology*, 14(2), 57-65. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.2003.00327.x>

- Suzuki, H. (2013). Evolutionary and phylogeographic views on *Mc1r* and *Asip* variation in mammals. *Genes and Genetic Systems*, 88(3), 155-164.
<https://doi.org/10.1266/ggs.88.155>
- Thiruvankadan, A. K., Kandasamy, N. og Panneerselvam S. (2008). Coat colour inheritance in horses. *Livestock Science*, 117(2-3), 109-129.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2008.05.008>
- Thomas, A. J. og Erickson, C. A. (2008). The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment cell & Melanoma Research*, 21(6), 598-610. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00506.x>
- Vachtenheim, J. og Borovanský, J. (2010). “Transcription physiology” of pigment formation in melanocytes: central role of MITF. *Experimental Dermatology*, 19(7), 617-627.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2009.01053.x>
- Warmuth, V., Eriksson, A., Bower, M. A. og Manica, A. (2012). Reconstructing the origin and spread of horse domestication in the Eurasian steppe. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(21), 8202-8206. <https://doi.org/10.1073/pnas.1111122109>
- Wolf Horrell, E. M., Boulanger, M. C. og D’Orazio, J. A. (2016). Melanocortin 1 Receptor: Structure, Function and Regulation. *Frontiers in Genetics*, 7.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00095>
- Yang, G. C., Croacker, D., Zang, A. L., Manglick, P., Cartmill, T. og Cass, D. (1998). A dinucleotide mutation in the endothelin-B receptor gene is associated with lethal white foal syndrome (LWFS), a horse variant of Hirschsprung disease. *Human Molecular Genetics*, 7(6), 1047-1052. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.6.1047>

7. Töfluskrá

| | |
|--|----|
| Tafla 1. Grunnlitir og mögulegar arfgerðir þeirra í E- og A-sæti (Bailey og Brooks, 2020). | 8 |
| Tafla 2. Áhrif arfgerðar í C-sæti á grunnliti (Thiruvenkadan o.fl., 2008). | 9 |
| Tafla 3. Yfirlit yfir arfgerðargreind hross og upplýsingar um erfðasýni, fæðingarnúmer, nafn, uppruna og litasvipgerð. | 14 |
| Tafla 4. Yfirlit yfir arfgerðargreind hross fyrir prófun arfgerðargreininga. | 16 |
| Tafla 5. Fram- og afturvísar sem notaðir voru..... | 17 |
| Tafla 6. Hluti af niðurstöðum úr foreldragreiningu Mola í samanburði við foreldra. Litur táknar hvaðan afkvæmi fékk samsætur sínar. Rauður litur táknar samsætur sem komið hafa frá móður og blár litur táknar samsætur sem komið hafa frá föður. | 23 |
| Tafla 7. Arfgerð og litasvipgerð einstaklinga fyrir prófun arfgerðargreininga. Arfgerðir A- og C-sæta eru úr raðgreiningu og arfgerð A-sætis er úr rafdrætti á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun..... | 26 |
| Tafla 8. Arfgerð og litasvipgerð valinna einstaklinga. Arfgerðir E- og C-sæta eru úr raðgreiningu og arfgerð A-sætis er úr rafdrætti á agarósageli eftir kjarnsýrumögnun..... | 26 |
| Tafla 9. Aðrir breytileikar sem fundust í MATP..... | 28 |
| Tafla 10. Leiðbeiningar um mat á litasvipgerð. | 45 |

8. Myndaskrá

| | |
|---|----|
| Mynd 1. Muskótti (glóbrúni) stóðhesturinn Hlekkur frá Austurási (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 10 |
| Mynd 2. Hitunarferli kjarnsýrumögnunar MC1R..... | 18 |
| Mynd 3. Hitunarferli kjarnsýrumögnunar ASIP og MATP. | 19 |
| Mynd 4. Bönd ASIP, MC1R og MATP í 2% agarósageli eftir rafdrátt. | 20 |
| Mynd 5. Niðurstöður raðgreiningar fyrir MC1R fyrir 3 einstaklinga. | 23 |
| Mynd 6. Niðurstöður raðgreiningar fyrir MATP fyrir 3 einstaklinga. | 24 |
| Mynd 7. Skerðibútar MC1R í 2% agarósageli eftir skerðibútagreiningu. | 24 |
| Mynd 8. Skerðibútar MATP í 2% agarósageli eftir skerðibútagreiningu. | 25 |
| Mynd 9. Bönd ASIP í 4% agarósageli eftir rafdrátt. | 25 |
| Mynd 10. Niðurstöður tölfræðigreiningar með Fishers prófi. n = fjöldi einstaklinga..... | 28 |
| Mynd 11. Nn frá Reykjum. Hausmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022)..... | 46 |
| Mynd 12. Nn frá Reykjum. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 46 |
| Mynd 13. Árelíus frá Hemlu II (Hemla II Hrossaræktarbú, 2015). | 47 |
| Mynd 14. Erlingur frá Uxahrygg (Samúel Örn Erlingsson, 2016). | 47 |
| Mynd 15. Fold frá Hemlu II. Hausmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022)..... | 48 |
| Mynd 16. Fold frá Hemlu II. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 48 |
| Mynd 17. Gjálþ frá Hemlu II. Hausmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 49 |
| Mynd 18. Gjálþ frá Hemlu II. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 49 |
| Mynd 19. Glódis frá Reykjum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022)..... | 50 |
| Mynd 20. Eir frá Skipanesi (Svandís Lilja Stefánsdóttir, 2022). | 50 |
| Mynd 21. Óskar frá Langholti II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 51 |
| Mynd 22. Dökkvi frá Þúfum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 51 |
| Mynd 23. Dröfn frá Hvolsvelli (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 52 |
| Mynd 24. Smella frá Fremri-Fitjum. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022)..... | 52 |
| Mynd 25. Smella frá Fremri-Fitjum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022)..... | 53 |
| Mynd 26. Faganótt frá Borgarnesi (Erla Rún Rúnarsdóttir, 2022)..... | 53 |
| Mynd 27. Ferskja frá Uxahrygg II (Ragnheiður Elín Gunnarsdóttir, 2022). | 54 |
| Mynd 28. Freyja frá Baldurshaga (Lovísa Herborg Ragnarsdóttir, 2012). | 54 |
| Mynd 29. Ísbrún frá Syðstu-Fossum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 55 |
| Mynd 30. Ísbrún frá Syðstu-Fossum. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 55 |
| Mynd 31. Heiðís frá Reykjum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022)..... | 56 |
| Mynd 32. Vænting frá Reykjum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 56 |

| | |
|--|----|
| Mynd 33. Mökkur frá Hemlu II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 57 |
| Mynd 34. Ronja frá Hemlu II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 57 |
| Mynd 35. Hressing frá Þingbrekku (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 58 |
| Mynd 36. Hressing frá Þingbrekku. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 58 |
| Mynd 37. Vörður frá Skrúð (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 59 |
| Mynd 38. Vörður frá Skrúð. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 59 |
| Mynd 39. Hreindís frá Litla-Dal (Ásdís Helga Sigursteinsdóttir, 2022). | 60 |
| Mynd 40. Hreindís frá Litla-Dal. Standmynd (Ásdís Helga Sigursteinsdóttir, 2022). | 60 |
| Mynd 41. Katla frá Hólateigi (Hólateigur Hrossarækt, 2020). | 61 |
| Mynd 42. Katla frá Hólateigi. Hausmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 61 |
| Mynd 43. Vök frá Skálakoti (Sigurður Anton Pétursson, 2022). | 62 |
| Mynd 44. Kleópatra frá Tungu (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 62 |
| Mynd 45. Nn frá Hemlu II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 63 |
| Mynd 46. Ágústa frá Árbæjarhjáleigu II (Lára Björk E. Birgisdóttir, 2022). | 63 |
| Mynd 47. Fanndís frá Hemlu II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022). | 64 |
| Mynd 48. Andri frá Vatnsleysu (Vatnsleysa, 2010). | 64 |
| Mynd 49. Traustur frá Hvammi 2 (Lilja Maria Suska, 2019). | 65 |

9. Viðauki I

Í töflu 10 má sjá leiðbeiningar um mat á litasvipgerð. Matið var fyrst og fremst byggt á brúnleitum lit á feld en einnig voru húð- og augnlitur skoðaðir. Ekki var greint nánar á milli blæbrigða.

Tafla 10. Leiðbeiningar um mat á litasvipgerð.

| Litasvipgerð | Lýsing |
|-------------------|---|
| Muskótt (Glóbrún) | Brúnleitur litur jafndreifður á feld, brúnbleik eða súkkulaði-brún húð og augu mó- eða gulleit. |
| Skolbrún | Brúnleitur litur greinanlegur á feld, dökk eða svört húð og augu dökk að lit. |
| Brún | Brúnleitur litur ekki til staðar á feld, dökk eða svört húð og augu dökk að lit. |

10. Viðauki II

10.1 Muskótt (glóbrún) hross



Mynd 11. Nn frá Reykjum. Hausmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 12. Nn frá Reykjum. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 13. Árelíus frá Hemlu II (Hemla II Hrossaræktarbú, 2015).



Mynd 14. Erlingur frá Uxahrygg (Samúel Örn Erlingsson, 2016).



Mynd 15. Fold frá Hemlu II. Hausmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 16. Fold frá Hemlu II. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 17. Gjálp frá Hemlu II. Hausmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 18. Gjálp frá Hemlu II. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 19. Glódís frá Reykjum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 20. Eir frá Skipanesi (Svandís Lilja Stefánsdóttir, 2022).



Mynd 21. Óskar frá Langholti II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 22. Dökkvi frá Þúfum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 23. Dröfn frá Hvolsvelli (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 24. Smella frá Fremri-Fitjum. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 25. Smella frá Fremri-Fitjum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 26. Faganótt frá Borgarnesi (Erla Rún Rúnarsdóttir, 2022).



Mynd 27. Ferskja frá Uxahrygg II (Ragnheiður Elín Gunnarsdóttir, 2022).

10.2 Skolbrún hross



Mynd 28. Freyja frá Baldurshaga (Lovísa Herborg Ragnarsdóttir, 2012).



Mynd 29. Ísbrún frá Syðstu-Fossum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 30. Ísbrún frá Syðstu-Fossum. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 31. Heiðís frá Reykjum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 32. Vænting frá Reykjum (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 33. Mökkur frá Hemlu II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 34. Ronja frá Hemlu II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 35. Hressing frá Þingbrekku (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 36. Hressing frá Þingbrekku. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 37. Vörður frá Skrúð (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 38. Vörður frá Skrúð. Standmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 39. Hreindís frá Litla-Dal (Ásdís Helga Sigursteinsdóttir, 2022).



Mynd 40. Hreindís frá Litla-Dal. Standmynd (Ásdís Helga Sigursteinsdóttir, 2022).



Mynd 41. Katla frá Hólateigi (Hólateigur Hrossarækt, 2020).



Mynd 42. Katla frá Hólateigi. Hausmynd (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 43. Vök frá Skálakoti (Sigurður Anton Pétursson, 2022).



Mynd 44. Kleópatra frá Tungu (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 45. Nn frá Hemlu II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 46. Ágústa frá Árbæjarhjáleigu II (Lára Björk E. Birgisdóttir, 2022).

10.3 Brún hross



Mynd 47. Fanndís frá Hemlu II (Hera Sól Hafsteinsdóttir, 2022).



Mynd 48. Andri frá Vatnsleysu (Vatnsleysa, 2010).



Mynd 49. Traustur frá Hvammi 2 (Lilja Maria Suska, 2019).