

Mgr. inż. Dominika Grabolus

Dziedzina: Nauki Rolnicze

Dyscyplina: Zootechnika

Otwarcie przewodu doktorskiego: 28.09.2018

Temat: Analiza podłoża fizykochemicznego i molekularnego barwy okrywy włosowej gatunku *Mustela putorius furo*

Promotor: dr hab. inż. Heliodor Wierzbicki, prof. uczelni

Promotor pomocniczy: dr hab. inż. Magdalena Zatoń-Dobrowolska, pro. uczelni

Streszczenie

Umaszczenie zwierząt determinowane jest przez wiele czynników, do których należy rodzaj pigmentu, jego ilość, kształt komórek pigmentowych oraz ich dystrybucja w ciele. W przypadku ssaków głównym barwnikiem odpowiedzialnym za kolor jest melanina. W procesie melanogenezy zaangażowanych jest wiele genów, jednakże te odpowiadające za regulację produkcji eumelaniny i feomelaniny odgrywają kluczową rolę w pigmentacji. Celem niniejszej pracy była analiza podłoża fizykochemicznego oraz molekularnego barwy okrywy włosowej gatunku *Mustela putorius furo*, aby zidentyfikować przyczyny zróżnicowania umaszczenia fretek i tchórzy hodowlanych.

Materiałem badawczym były włosy, pobrane wraz z cebulkami włosowymi w trakcie naturalnej wymiany okrywy włosowej od 104. osobników (52. fretek oraz 52. tchórzy hodowlanych). Przeprowadzone badania obejmowały izolację pigmentu z włosów przy użyciu stężonych kwasów i zasad (H_2SO_4 , HCl i KOH), wykonanie fotografii przekrojów oraz powierzchni włosów pokrywowych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM), a także analizę sekwencji wybranych fragmentów genów Agouti signalling protein (Asip), Melanocortin 1 receptor (Mclr) i Tyrosinase related protein 1 (Tyrp1).

Analiza fotografii SEM oraz preparatów mikroskopowych, będących wynikiem izolacji melanin, pozwoliła na zaobserwowanie różnic w kształcie, rozmiarze, a także liczbie i intensywności barwy granulek pigmentu pomiędzy badanymi odmianami barwnymi.

Dominika Grabolus¹

Większość obserwowanych melanosomów miała kształt elipsoidalny (eumelanosomy), jedynie część badanych granulek, o stosunkowo mniejszych wymiarach, posiadała kształt owalny (feomelanosomy). Osobniki o czarnej barwie podstawowej (black standard, black roan) posiadały największe granulki pigmentu, natomiast zwierzęta o umaszczeniu jasnobrązowym (champagne) miały melanosomy o najmniejszych wymiarach. W przypadku osobnika albinotycznego nie odnotowano melanosomów. Ponadto, melanosomy zwierząt o umaszczeniu czarnym, czarno-brązowym oraz ciemnobrązowym występowały w dużej liczbie oraz były ulokowane głównie w przestrzeniach rdzenia. Zwierzęta o barwie brązowej posiadały granulki pigmentu częściowo scalone ze strukturami nabłonków rdzenia, a ich liczba była mniejsza niż u osobników o ciemnym umaszczeniu. Natomiast zwierzęta posiadające futro w kolorze jasnego brązu charakteryzowały się niewielką liczbą melanosomów, które były w większości scalone ze strukturami rdzenia. Nie odnotowano zależności pomiędzy umaszczeniem badanych osobników a kształtem łusek oskórka oraz układem przestrzeni rdzenia włosów.

Przeprowadzone analizy molekularne dla badanej grupy zwierząt pozwoliły na uzyskanie sekwencji genu *Mclr* o długości 935 par zasad, oraz sekwencji fragmentu genomu odpowiadającego eksonowi pierwszemu (701pz), trzeciemu (202pz) oraz czwartemu (183pz) dla genu *Tyrp1*. Nie stwierdzono polimorfizmów w obrębie zsekwencjonowanych fragmentów genów związanych z barwą okrywy włosowej – wszystkie zlokalizowane SNP miały charakter zmienności osobniczych. Zaobserwowano natomiast różnicę pomiędzy fretkami oraz tchórzami hodowlanymi w obrębie fragmentu odpowiadającemu eksonowi pierwszemu genu *Tyrp1*. Dla fretek, poza pasmem o długości 701 par zasad, uzyskano również produkt długości około 900-1000pz, który nie był obecny u tchórzy hodowlanych. Otrzymane wyniki dają możliwość rozróżnienia fretek i tchórzy hodowlanych dzięki analizie produktów PCR na żelu agarozowym.

Abstract

Animals' coat colour is determined by many factors, including but not limited to the type and amount of the pigment, the shape of the pigment cells and their distribution in the animals' body. In case of mammals the main pigment responsible for the coat colour is melanin. There are many genes involved in the process of melanogenesis, however those regulating the production of eumelanin and pheomelanin play a pivotal role in the whole process. The aim of the study was to analyse the physicochemical and molecular background of coat colour in

Daniewska Grabowska

Mustela putorius furo, for differences between coat colour types in the studied population of ferrets and farm polecats.

The research material was the hair from 104 animals, collected together with the hair follicles from 52 ferrets and 52 farm polecats during the natural moult. The study included pigment isolation from the hair using concentrated acids and alkali (H₂SO₄, HCl and KOH), capturing photos of the cross-sections and the surface of guard hairs using a scanning electron microscope (SEM), as well as analysing selected fragments of Agouti signalling protein (Asip), Melanocortin 1 receptor (Mc1r) and Tyrosinase related protein 1 (Tyrp1) genes.

Analysing the photos captured by SEM and microscopic specimens, obtained via melanin isolation, allowed for observing differences in the shape, size, amount and colour intensity of the pigment granules between the studied coat colours. The majority of melanosomes observed had an ellipsoidal shape (eumelanosomes), only a part of the granules displayed smaller dimensions and more oval shape (pheomelanosomes). Animals with black base colour (black standard, black roan) had the biggest pigment granules, whereas the light brown coat colours (champagne) had the smallest melanosomes. Concerning the albinotic individual – no melanosomes were found. Moreover, the melanosomes of black, black-brown and dark brown colour types were abundant and located mostly in the hair core cavities. The animals with brown coat colour had their pigment granules partially embedded in the structures of hair core epithelium and the amount of visible pigment granules was lesser, compared to the dark colours. Lastly, animals with light brown fur were characterised by small number of melanosomes, which were mostly embedded in the core epithelium. No correlations between the coat colour and the shape of the hair cuticle scales or the structure of hair core were observed within the studied population.

The conducted molecular analyses for the research group allowed to obtain a sequence of the Mc1r gene, of 935 base pairs length, and of the genome fragments corresponding with first (701 bp), third (202 bp) and fourth (183 bp) exons in the Tyrp1 gene. No coat colour associated polymorphisms were observed between the studied colours, within the sequenced fragments – all of the located SNP were characteristic for individual variability. However, a difference between ferrets and farm polecats was observed within the genome fragment corresponding with the first exon of the Tyrp1. In ferrets two bands were visible, first – at 701 bp length and second – at approximately 900-1000 bp, which was not present in farm polecats. The results obtained allow the differentiation of ferrets from farm polecats, by analysing the PCR products on the agarose gel.

Dominika Grobels