

论 文

# 黑色素皮质素受体 1 基因对水牛毛色遗传的影响

苗永旺<sup>①②†</sup>, 吴桂生<sup>③†</sup>, 王磊<sup>②</sup>, 李大林<sup>④</sup>, 汤守锟<sup>⑤</sup>, 梁建平<sup>②</sup>, 毛华明<sup>②</sup>,  
罗怀容<sup>③</sup>, 张亚平<sup>①⑥\*</sup>

① 云南大学云南省生物资源保护与利用重点实验室, 昆明 650091;

② 云南农业大学动物科学技术学院, 昆明 650201;

③ 中国科学院昆明植物研究所, 昆明 650204;

④ 云南水牛科学技术研究所, 昆明 650021;

⑤ 云南省德宏州潞西市畜牧站, 潞西 678400;

⑥ 中国科学院昆明动物研究所, 遗传资源与进化国家重点实验室, 昆明 650223

† 同等贡献

\* 联系人, E-mail: [zhangyp@mail.kiz.ac.cn](mailto:zhangyp@mail.kiz.ac.cn)

收稿日期: 2009-09-21; 接受日期: 2009-10-12

国家自然科学基金(批准号: 30660024 和 30621092)、国家转基因重大专项(批准号: 2008ZX08009)、云南省应用基础研究重点项目(批准号: 2007C0003Z)、云南省应用基础研究计划面上项目(批准号: 2006C0034M)和国家高技术研究发展计划(批准号: 2008AA101001)资助

**摘要** MC1R在很多动物的色素沉积过程中发挥关键作用。为了阐明MC1R基因是否与水牛毛色性状相关, 本研究对216头遗传背景清楚的水牛进行了该基因编码区DNA序列测定。研究的样品包括49头黑色河流型水牛(包括摩拉水牛和尼里-拉菲水牛), 136头毛色为灰色或白色的沼泽型水牛(包括德宏水牛、滇东南水牛、德昌水牛、贵州水牛和西林水牛)和31头尼里-拉菲水牛或摩拉水牛与沼泽型水牛的杂交后代。序列分析发现在水牛群体中存在3个单核苷酸突变位点(SNPs), 其中SNP684是同义替换, 而SNP310和SNP384为非同义替换, 并分别导致p.G104S和p.M128I氨基酸的改变。只有基因型为河流型等位基因纯合子E<sup>BR</sup>/E<sup>BR</sup>的个体毛色表型为黑色。对黑色河流型水牛与灰色沼泽型水牛的杂交后代基因型和毛色表型的分析进一步揭示: 河流型等位基因E<sup>BR</sup>或编码p.104S的等位基因对保证MC1R具有正常功能起重要作用。生物信息学功能分析显示, p.G104S和p.M128I两个氨基酸替换对MC1R的功能有显著影响, 进一步支持E<sup>BR</sup>等位基因或编码p.104S的等位基因与水牛黑色性状相关。

关键词

水牛

毛色

黑色素皮质素受体 1

家养水牛(*Bubalis bubalis*)是牛科物种的成员之一, 广泛分布在亚洲、欧洲南部、南美洲和非洲北部等地区, 作为役用、肉用或奶用动物饲养。水牛有两种主要类型, 即河流型水牛和沼泽型水牛。沼泽型水牛毛色通常为灰色或深灰色, 四肢下部毛色较浅, 为灰白色, 颈下部和胸前有浅灰色或白色条带。也有少数沼泽型水牛为白毛带粉红色皮肤(图 1)。而河流型

水牛最常见的毛色为黑色, 有时带有棕色或白色的斑块(图 1)。以往的研究显示, 白色受单一基因控制, 对灰色为完全显性, 而对黑色为不完全显性或上位显性, 但黑色对灰色却为完全显性或上位显性<sup>[1]</sup>。迄今, 尽管毛色性状的遗传机制在其他动物上已进行了广泛研究, 但未见有与水牛毛色性状相关的基因报道<sup>[2-9]</sup>。

同样作为牛科物种的成员之一, 黄牛(*Bos primigenius*)毛色性状的分子遗传学研究要比水牛清楚得多。黄牛的毛色主要受E或A等位基因座位控制, 这两个基因座位分别编码黑色素皮质素受体 1 (melanocortin-1 receptor, MC1R)和Agouti蛋白<sup>[2,10-12]</sup>。在黄牛中, 共发现 4 种主要的E座位等位基因来调控不同的色素沉积状态。携带野生型等位基因E<sup>+</sup>个体的性状表型要依赖于其他座位调控色素沉积<sup>[13]</sup>, 而E<sup>D</sup>, e和E<sup>L</sup>等位基因却分别控制黑色, 红色(e/e 型纯合子)和从淡黄褐色到棕色或灰色毛色表型<sup>[11,13,14]</sup>。但是, 在牛科物种的另外一个成员——牦牛(*Bos grunniens*)中, 已报道MC1R基因与牦牛毛色没有关联<sup>[15]</sup>。本研究采用DNA序列分析技术对水牛MC1R基因多态性进行了检测, 并对其是否与毛色性状遗传相关联进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究共采集了 216 头遗传背景清楚的水牛耳

组织或血液样品。其中包括毛色为黑色的(河流型)摩拉水牛 20 头, 尼里-拉斐水牛 29 头; 毛色为灰色或白色的(沼泽型)德宏水牛 62 头, 滇东南水牛 36 头, 贵州水牛 15 头, 德昌水牛 13 头和西林水牛 10 头; 还包括 31 头摩拉水牛或尼里-拉斐水牛与当地沼泽型水牛的杂交后代(表 1)。

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用常规的酚/氯仿法提取基因组 DNA, 在分析前于-20℃保存。

### 1.3 PCR 扩增与测序

使用上游引物 74U18: 5'-GGGCAACCGCACATCCAG-3', 和下游引物 1292L20: 5'-GGTCTAGCCGA TCCTCTTG-3'扩增MC1R基因完整的编码区。25 μLPCR反应体系中含有 50~100 ng基因组DNA, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 μmol/L dNTP, 0.5 μmol/L上、下游引物和 1U DNA聚合酶(TaKaRa)。PCR反应条件: 95℃预变性 3 min, 然后, 94℃变性 1 min, 62℃退火 1

表 1 样品信息以及水牛毛色与黑色素皮质素受体 1 基因变异之间的关系

品种或群体	毛色	采样地点	样本量	单倍型 <sup>a)</sup>				基因型			
				GGG	GGC	ATC	AGC	E <sup>BS</sup> /E <sup>BS</sup>	E <sup>BR</sup> /E <sup>BR</sup>	E <sup>BR</sup> /E <sup>BS</sup>	E <sup>BR</sup> /E <sup>BR</sup> S
德宏水牛	白色	云南	35	40	30			35			
	灰色		27	40	14			27			
西林水牛	白色	广西	8	11	5			8			
	灰色		2	3	1			2			
贵州水牛	白色	贵州	5	9	1			5			
	灰色		10	18	2			10			
滇东南水牛	白色	云南	10	3	17			10			
	灰色		26	42	10			26			
德昌水牛	灰色	四川	13	20	6			13			
尼里-拉斐水牛	黑色	云南	29			58			29		
摩拉水牛	黑色	云南	20			40			20		
F <sub>1</sub> 代杂合子 <sup>b)</sup>	棕黑色	四川	9	9		9				9	
F <sub>1</sub> 代杂合子 <sup>b)</sup>	棕黑色	云南	14	9	5	14				14	
F <sub>1</sub> 代杂合子 <sup>c)</sup>	白色或 灰白色	云南	5	5		5				5	
高代杂交 后代(F <sub>n</sub> ) <sup>d)</sup>	深(黑) 棕色	云南	3	1		1	4			1	1
合计			216	210	91	127	4	136	49	28	1
											1

a) 根据检测到的 3 个 SNPs(SNP310, SNP384 和 SNP618)定义的单倍型。例如, 单倍型 ATC 代表相应序列的 310, 384 和 618 位置的 3 个核苷酸分别为 A, T 和 C; b) 沼泽型水牛(灰色)和河流型水牛(黑色)的杂交后代; c) 沼泽型水牛(白色)和河流型水牛(黑色)的杂交后代;

d) 河流型水牛(黑色)和沼泽型水牛(灰色)高代杂交后代(F<sub>n</sub>)

min, 72℃延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 ℃延伸 10 min 并结束扩增。

PCR 产物使用回收试剂盒(Watson BioTechnologies 公司)纯化回收并直接测序。测序使用 PCR 扩增引物和一对内引物 MCR2-F: 5'-CATCCCTGACGG GCTCTTCTC-3' 和 MC1R2-R: 5'-AGCACCTCTGG AGCGTCTTCC-3'<sup>[16]</sup>。PCR 扩增引物参照黄牛 *MCIR* 基因序列(GenBank accession number: AF445641)使用 Oligo 6 软件(Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, Colo.)设计。

#### 1.4 序列分析

测序结果使用 DNASTAR 软件包(DNASTar Inc.)核对并编辑后, 已经提交 GenBank(NCBI accession number: GQ359864-GQ359954; GU121238-GU121363)。SNPs 的位置、数量以及单倍型采用 Mega version 4.0 软件<sup>[17]</sup>输出。

#### 1.5 基因功能分析

编码区突变对基因产生的功能影响采用 PANTHER 软件<sup>[18,19]</sup>进行评估。该软件根据已知功能的蛋白质家族多条序列的比对信息, 分析蛋白质家族中不同位置氨基酸发生变化时, 对蛋白质功能产生的影响程度。可能产生的影响用特定位置取代进化保守值(substitution position-specific evolutionary conservation score, subPSEC)来衡量, 该指标进一步表述为异义替换 SNP 对蛋白质功能损害的概率( $P_{\text{deleterious}}$ )。subPSEC 值或  $P_{\text{deleterious}}$  越小(即越是趋向负值方向)表明越有可能对蛋白质功能产生损害。

## 2 结果

### 2.1 *MCIR* 基因序列特征

河流型和沼泽型水牛 *MCIR* 基因编码区测序得到的片段长度均为 954 bp, 编码 317 个氨基酸。水牛与黄牛 *MCIR* 基因序列有 97% 的一致性, 并与黄牛 *MCIR* 野生型等位基因序列长度相同。相比之下, 牦牛的 *MCIR* 基因, 根据报道<sup>[15]</sup>与黄牛的 *MCIR* 基因有 99% 的一致性(图 2)。值得注意的是, 牛科的另一亚属矮水牛(Anoa)的 *MCIR* 基因却与沼泽型水牛的 *MCIR* 基因序列有 100% 的一致性<sup>[20]</sup>(图 2)。

在测得的 216 条编码区序列中, 共发现了 3 个单核苷酸突变位点(SNP310, SNP384 和 SNP618)(图 2)(为了叙述方便, 使用一条沼泽型水牛序列作为参考序列, 该序列在编码区 310, 384 和 618 处的核苷酸都是 G。本研究 SNP 的记录均以此序列为标准)。SNP310(c.310G>A) 和 SNP384(c.384G>T) 为异义替换, 分别导致 MC1R 中氨基酸 p.G104S 和 p.M128I 的变化。而 SNP618(c.618G>C) 为同义替换。在这 3 个 SNPs 中, 河流型水牛 *MCIR* 基因 310, 384 处为 c.310A(p.104S) 和 c.384T(p.128I), 而沼泽型水牛在这两处却为 c.310G(p.104G) 和 c.384G(p.128M), 同义替换 SNP618(c.618G>C) 仅发现存在沼泽型水牛中。与沼泽型水牛相比, 没有发现河流型水牛 *MCIR* 基因具有多态性。所有测得的河流型水牛 *MCIR* 基因都拥有 c.310A(p.104S) 和 c.384T(p.128I), 该类型等位基因用  $E^{BR}$  表示。在沼泽型水牛中虽然存在同义替换 SNP618(c.618G>C), 但是在蛋白质水平并没有多态性。因此, 沼泽型水牛 *MCIR* 等位基因都带有 c.310G (p.104G) 和 c.384G(p.128M), 且在蛋白质水平没有差异, 将该种类型的 *MCIR* 等位基因都记作  $E^{BS}$ 。由此, 本研究所有的河流型水牛和沼泽型水牛 *MCIR* 基因座位都是纯合子基因型, 分别记作  $E^{BR}/E^{BR}$  和  $E^{BS}/E^{BS}$ 。与预期的相一致, 河流型水牛和沼泽型水牛杂交得到的 F<sub>1</sub> 代基因型为  $E^{BR}/E^{BS}$ 。而在它们的高代杂交后代(F<sub>n</sub>)个体中, 发现一个新的等位基因, 该等位基因为 SNP310 和 SNP384 重组得到的纯合体。新得到的中间型等位基因携带 c.310A(p.104S) 和 c.384G (p.128M), 命名为  $E^{BRS}$ 。Fn 代还有两个个体为杂合子, 检测到的基因型分别为  $E^{BR}/E^{BRS}$  和  $E^{BS}/E^{BRS}$ 。

### 2.2 SNPs 对 MC1R 功能的影响

本研究中发现的氨基酸替换 p.G104S 和 p.M128I, 都是由非极性氨基酸变为极性氨基酸。这两个替换分别位于 MC1R 蛋白质的细胞膜外第一外环区和第三跨膜区(图 2)。这两处氨基酸的变化有可能改变 MC1R 的构象, 或者直接影响其与配体的结合能力<sup>[21]</sup>。为了推测 *MCIR* 基因编码区的突变对其功能的影响, 对比了与其进化相关的蛋白质中特定位点发生突变时对蛋白质功能的影响程度, 由此得到功能损伤的似然值。subPSEC 值是特定位置的野生型和

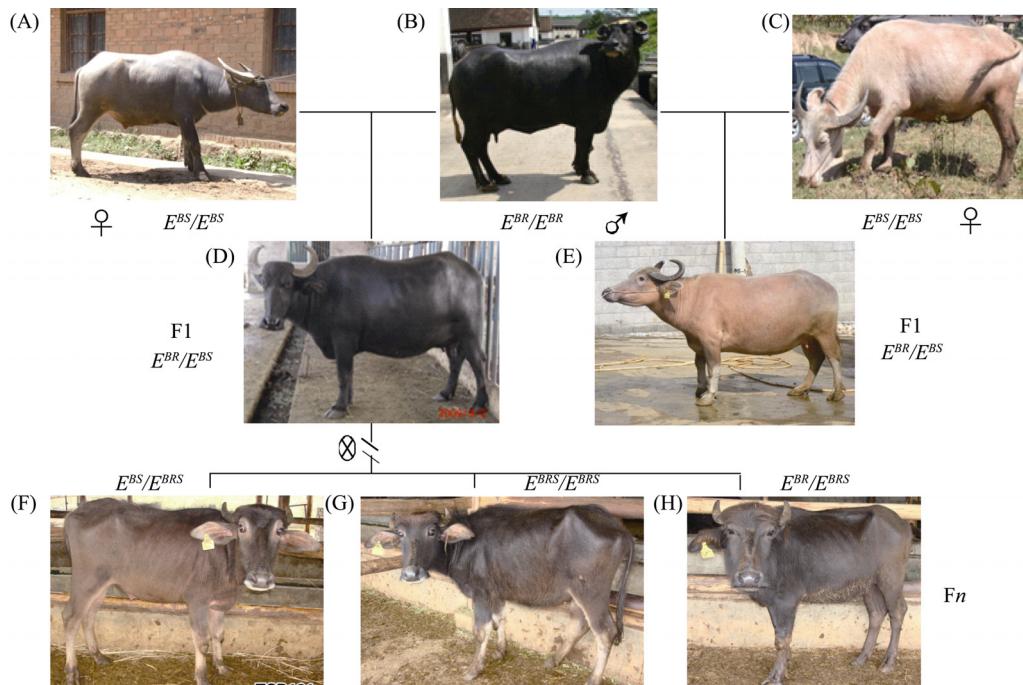


图 1 各种毛色的水牛及其基因型

(A) 灰色沼泽型水牛; (B) 黑色河流型水牛(尼里-拉菲水牛); (C) 白色沼泽型水牛; (D) 黑色河流型水牛与灰色沼泽型水牛杂交 F1 代棕黑色水牛; (E) 黑色河流型水牛与白色沼泽型水牛杂交 F1 代水牛; (F)~(H) 河流型水牛与灰色沼泽型水牛高代杂交后代(Fn)

	核苷酸和氨基酸变异		等位基因
核苷酸位置	111 111 222 222 222 222	333 333 333 333	等位基因
沼泽型水牛	111 222 777 777 777 222 888 222 334 555 999	333 444 444 444 555 555 555 666 666 666 666 666 666 777 777 888 888 999	
沼泽型水牛	012 234 012 345 678 456 789 678 890 345 567	111 444 777 777 888 666 677 777 666 888 899 111 111 444 666 666 777 777 777 333 888 888 888 333	
河流型水牛	CTC AGA CTC ACT CCG GAT ATC TTA TTG CTG CTG	GGT CAG TGC AGC ATG AGC ACG TCC GTA TTC GTA ATC CTG GCC ATC --- --- --- ACC TTG AAT GCC ACA	E <sup>BS</sup>
Fn杂交后代	.....	.....	
矮水牛	.....	.....	E <sup>BS</sup>
黄牛	..T..G T...C.T...C..T..T.C..T....	.....G.A.....T..AC..A.C..C..A..G...C....T CGG GCC ATT GCC ..C...C...G E <sup>L</sup>	
黄牛	..T..G T...C.T...C..T..T.C..T....	.....G.A.....T..AC..A.C..C..A..G...C....T--- --- ..C...C...G e	
黄牛	..T..G T...C.T...C..T..T.C..T....	.....G.A.....T..AC..A.C..C..A..G...C....T--- --- ..C...C...G E <sup>+</sup>	
黄牛	..T..G T...C.T...C..T..T.C..T....	.....G.A.....T..AC..A.C..C..A..G...C....T--- --- ..A..C...C...G E <sup>D</sup>	
牦牛	..T..G T...C.T...C..T..T.C..T....	.....A.....G.A.....T..AC..A.C..C..A..G...C....T--- --- ..C...C..A..G E <sup>V1</sup>	
牦牛	..T..G T...C.T...C..T..T.C..T....	.....T.G.A.....T..AC..A.C..C..A..G...C..G.... --- ..C...C..G E <sup>V2</sup>	
牦牛	..T..G T...C.T...C..T..T.C..T....	.....T.G.A.....T..AC..A.C..C..A..G...C....T--- --- ..C...C..G E <sup>V3</sup>	
氨基酸序列位置	L24F P26L L76F L99P G104S S126G M128I S159P V188I F195L V197I I205V	R G I A	
蛋白质结构域	膜外区 第二跨膜区 膜外环区 第三跨膜区 膜外环区 膜内环区 第五跨膜区		

图 2 水牛 *MC1R* 等位基因序列变异

不同类型水牛的各等位基因核苷酸序列和蛋白质序列信息(包括河流型水牛, 沼泽型水牛和两者高代杂交后代个体). 牛科其他种, 如矮水牛、牦牛和黄牛的相应信息也列在图中. 图中点(.) 表示参考序列(沼泽型*MC1R*等位基因E<sup>BS</sup>)核苷酸相同. 序列编号从E<sup>BS</sup>等位基因的第一个密码子开始. 核苷酸序列变异信息下方为氨基酸替换信息和蛋白质结构域信息. 为了显示水牛、牦牛和黄牛间的遗传差异, 黄牛的 4 个等位基因和牦牛 3 个等位基因也列在了图中. 本研究中发现的氨基酸替换已标注在方框中

突变型氨基酸的概率比值的负对数, 该值在0(中性的)~ -10(极可能对蛋白质功能有害)之间连续变化。p.G104S处的subPSEC值和P<sub>deleterious</sub>分别为-3.88051和0.70693, 这表明该处氨基酸替换对蛋白质功能有重要影响。p.M128I处的subPSEC值和P<sub>deleterious</sub>分别为-1.89112和0.24808, 表明该处氨基酸替换对蛋白质功能的影响相对于p.G104S替换较小。河流型水牛等位基因E<sup>BR</sup>编码产物携带p.G104S和p.M128I两个氨基酸替换, 提示极有可能对MC1R功能产生较强的影响。

### 2.3 毛色的表型与基因型

49头黑色尼里-拉菲水牛和摩拉水牛的MC1R基因型全部为E<sup>BR</sup>/E<sup>BR</sup>(p.104S 和 p.128I)纯合子(表 1, 图 2)。但是所有沼泽型水牛(滇东南、贵州、德昌、德宏和西林水牛, 58头白色, 78头灰色), 尽管毛色表型为白色和灰色, 但都具有E<sup>BS</sup>/E<sup>BS</sup>基因型, 即其编码产物携带p.104G和p.128M氨基酸。为了揭示河流型等位基因E<sup>BR</sup>是否与黑色毛色表型相关, 对河流型水牛和灰色沼泽型水牛杂交后代F1代的表型和基因型进行了分析。与预期的相符, F1代所有个体的基因型均为E<sup>BR</sup>/E<sup>BS</sup>杂合型, 毛色为棕黑色(图 1), 表明等位基因E<sup>BR</sup>与黑色毛色表型相关。进一步对河流型与沼泽型水牛高代杂交后代(Fn)的基因型和表型进行了检测和分析, 发现存在E<sup>BS</sup>/E<sup>BRS</sup>, E<sup>BRS</sup>/E<sup>BRS</sup>或E<sup>BR</sup>/E<sup>BRS</sup>基因型的个体, 毛色分别由棕色到棕黑色(表 1, 图 1)。由此可见, 河流型等位基因E<sup>BR</sup>, 特别是该等位基因编码产物中p.104S氨基酸对保证MC1R正常功能起重要作用。

## 3 讨论

与牦牛相比, 水牛的MC1R基因和黄牛的差异较大, 这与它们之间的进化地位相一致<sup>[22,23]</sup>。但是矮水牛(Anoa)作为一个与水牛不同亚属的动物, 它们与沼泽型水牛之间的密切关系却是出乎意料的。MC1R基因在不同的牛种之间同义突变数多于异义突变数, 这说明MC1R基因在牛科物种中的功能具有保守性(图 2)。河流型水牛和沼泽型水牛高代杂交后代中出现E<sup>BRS</sup>等位基因, 表明两个相邻很近的位点SNP310和SNP384之间发生了重组事件。

以前的研究认为, MC1R基因在河流型水牛中的e等位基因频率高达 20%<sup>[24]</sup>。但本研究在河流型水牛和沼泽型水牛中都没有发现e等位基因。实际上, 任何在黄牛和牦牛MC1R基因中已发现的突变在本研究的水牛序列中都不存在。并且我们发现水牛的MC1R基因序列与黄牛的MC1R基因序列存在较大差异, 所以, 根据在黄牛中已发现的MC1R等位基因去推断它们在水牛毛色遗传上的作用是不合适的。

在本研究中, 同义替换 c.618C>G 只出现在中国沼泽型水牛群体中(如德宏水牛和西林水牛等品种), 或是具有相同毛色(比如都是白色或灰色)的个体中。因此, 本研究结果不支持该突变与其品种或毛色相关。

黑色素皮质素受体 1(MC1R)通过调节真黑素和褐黑素两种主要色素成分的合成, 对很多物种的色素沉着起着重要作用<sup>[2~7,9,25,26]</sup>。当MC1R受到α-促黑色素细胞激素(α-MSH)的刺激时, 就会通过激活酪氨酸酶产生真黑素, 动物毛色表现为黑色。在MC1R功能丧失或MC1R受到与其拮抗的agouti蛋白抑制时, MC1R不能激活酪氨酸酶, 较低活性的酪氨酸酶造成真黑素被稀释, 出现棕色或红色等较浅的毛色性状<sup>[12,27,28]</sup>。本研究中白色和灰色沼泽型水牛的基因型相同, 都为E<sup>BS</sup>/E<sup>BS</sup>, 这表明MC1R基因与水牛的白色和灰色毛色性状无关。白色和灰色毛色的形成可能与控制真黑素和褐黑素合成信号通路中的上游某些基因座位有关, 比如黑色素细胞的发生和迁移过程的相关基因, 这类似于黄牛中色素沉着的调控机制<sup>[13]</sup>。白色沼泽型水牛和黑色河流型水牛杂交得到的F1代个体, 毛色为白色或灰白色, 基因型为E<sup>BR</sup>/E<sup>BS</sup>(图 1, 表 1), 表明水牛的白毛性状相对于黑色为部分显性或上位显性, 除了MC1R基因以外, 该性状还受其他基因座的控制, 这与先前的研究结果相一致<sup>[11]</sup>。

只有基因型为E<sup>BR</sup>/E<sup>BR</sup>纯合子的个体(其MC1R携带p.104S和p.128I氨基酸)毛色为黑色。黑色河流型水牛和灰色沼泽型水牛杂交的F1代毛色为棕黑色, 携带一个拷贝的E<sup>BR</sup>等位基因。先前的研究认为黑色对于灰色为完全显性或具有上位作用<sup>[11]</sup>, 而在本研究中发现F1代个体出现了棕黑色毛色, 显示出黑色组分被少许稀释。提示沼泽型等位基因E<sup>BS</sup>可能在一定程度上削弱了MC1R的作用, 导致真黑素合成量减少。

和褐黑素合成量增加。Fn代个体表型为棕黑色,它们或者携带一拷贝的 $E^{BR}$ 等位基因或含有编码p. 104S氨基酸的等位基因,揭示仅携带一拷贝编码p.104S的等位基因不足以保证MC1R的正常功能。生物信息学功能分析表明p.G104S和p.M128I氨基酸替换对MC1R功能有显著影响。这一结果支持 $E^{BR}$ 等位基因,特别是携带编码p.104S氨基酸的等位基因与水牛黑色表型有关。

本研究表明,水牛 $MC1R$ 基因中的河流型等位基因 $E^{BR}$ 或携带c.310A(p.104S)的等位基因与其黑色表型相关。除了 $MC1R$ 基因外,其他很多与黑色素形成有关的基因,尤其是编码黑色素沉积和黑色素细胞形成所必需的基因,都参与毛色的形成<sup>[7,8]</sup>。因此,进一步深入研究其他候选基因的变异,并对找到的变异进行功能分析,将有助于阐明水牛毛色遗传的分子机制。

## 参考文献

- 1 Rife D C. Color and horn variations in water buffalo: the inheritance of coat color, eye color and shape of horns. *J Hered*, 1962, 53: 239—246
- 2 Robbins L S, Nadeau J H, Johnson K R, et al. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles result from point mutations that alter MSH receptor function. *Cell*, 1993, 72: 827—834 [[DOI](#)]
- 3 Valverde P, Healy E, Jackson I, et al. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nat Genet*, 1995, 11: 328—330 [[DOI](#)]
- 4 Joerg H, Fries H R, Meijerink E, et al. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the *MSHR* gene. *Mammol/L Genome*, 1996, 7: 317—318 [[DOI](#)]
- 5 Marklund L, Moller M J, Sandberg K, et al. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammol/L Genome*, 1996, 7: 895—899 [[DOI](#)]
- 6 Hoekstra H E, Hirschmann R J, Bundey R A, et al. A single amino acid mutation contributes to adaptive beach mouse color pattern. *Science*, 2006, 313: 101—104 [[DOI](#)]
- 7 Schmutz S M, Berryere T G. Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Anim Genet*, 2007, 38: 539—549
- 8 Mohanty T R, Seo K S, Park K M, et al. Molecular variation in pigmentation genes contributing to coat colour in native Korean Hanwoo cattle. *Anim Genet*, 2008, 39: 550—553 [[DOI](#)]
- 9 Anderson T M, vonHoldt B M, Candille S I, et al. Molecular and evolutionary history of melanism in North American gray wolves. *Science*, 2009, 323: 1339—1343 [[DOI](#)]
- 10 Jackson I J. Molecular and developmental genetics of mouse coat color. *Annu Rev Genet*, 1994, 28: 189—217 [[DOI](#)]
- 11 Adalsteinsson S, Bjarnadottir S, Vage D I, et al. Brown coat color in icelandic cattle produced by the loci extension and agouti. *J Hered*, 1995, 86: 395—398
- 12 Gutierrez-Gil B, Wiener P, Williams J-L. Genetic effects on coat colour in cattle: dilution of eumelanin and phaeomelanin pigments in an F2-Backcross *Charolais* x *Holstein* population. *BMC Genet*, 2007, 8: 56 [[DOI](#)]
- 13 Klungland H, Vage D I, Gomez-Raya L, et al. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mammol/L Genome*, 1995, 6: 636—639 [[DOI](#)]
- 14 Rouzaud F, Martin J, Gallet P-F, et al. A first genotyping assay of French cattle breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (Mc1r). *Genet Sel Evol*, 2000, 32: 511—520 [[DOI](#)]
- 15 Chen S-Y, Huang Y, Zhu Q, et al. Sequence characterization of the MC1R gene in yak (*Poephagus grunniens*) breeds with different coat colors. *J Biomed Biotechnol*, 2009, 2009: 861046
- 16 Gan H Y, Li J B, Wang H M, et al. Relationship between the melanocortin receptor 1(*MC1R*) gene and the coat color phenotype in cattle. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29: 195—200 [[DOI](#)]
- 17 Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform*, 2008, 9: 299—306 [[DOI](#)]
- 18 Brunham L-R, Singaraja R-R, Pape T-D, et al. Accurate prediction of the functional significance of single nucleotide polymorphisms and mutations in the *ABCA1* gene. *PLoS Genet*, 2005, 1: e83 [[DOI](#)]
- 19 Thomas P-D, Kejariwal A, Guo N, et al. Applications for protein sequence-function evolution data: mRNA/protein expression analysis and coding SNP scoring tools. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34: W645—650 [[DOI](#)]

- 20 Ayoub N-A, McGowen M-R, Clark C, et al. Evolution and phylogenetic utility of the melanocortin-1 receptor gene (*MC1R*) in *Cetartiodactyla*. Mol Phylogenet Evol, 2009, 52: 550—557[\[DOI\]](#)
- 21 Garcia-Borron J C, Sanchez-Laorden B-L, Jimenez-Cervantes C. Melanocortin-1 receptor structure and functional regulation. Pigment Cell Res, 2005, 18: 393—410
- 22 Hassanin A, Ropiquet A. Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovidae, Bovinae) and the taxonomic status of the Kouprey, *Bos sauveli* Urbain 1937. Mol Phylogenet Evol, 2004, 33: 896—907[\[DOI\]](#)
- 23 Gu Z, Zhao X, Li N, et al. Complete sequence of the yak (*Bos grunniens*) mitochondrial genome and its evolutionary relationship with other ruminants. Mol Phylogenet Evol, 2007, 42: 248—255[\[DOI\]](#)
- 24 Klungland H, Olsen H-G, Hassanane M-S, et al. Coat colour genes in diversity studies. J Anim Breed Genet, 2000, 117: 217—224[\[DOI\]](#)
- 25 Chhajlani V, Wikberg J-E. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. FEBS Lett, 1992, 309: 417—420[\[DOI\]](#)
- 26 Kadekaro A-L, Kanto H, Kavanagh R, et al. Significance of the melanocortin 1 receptor in regulating human melanocyte pigmentation, proliferation, and survival. Ann N Y Acad Sci, 2003, 994: 359—365[\[DOI\]](#)
- 27 Bultman S-J, Michaud E-J, Woychik R P. Molecular characterization of the mouse agouti locus. Cell, 1992, 71: 1195—1204[\[DOI\]](#)
- 28 Lu D, Willard D, Patel I-R, et al. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. Nature, 1994, 371: 799—802[\[DOI\]](#)