

제주마의 기본모색과 *MC1R*과 *ASIP* 유전자형 조합의 상관관계

김남영¹ · 한상현¹ · 이성수¹ · 이종언¹ · 박남건¹ · 고문석¹ · 양영훈^{2*}

¹농촌진흥청 국립축산과학원, ²제주대학교 생명공학부

Relationship Between *MC1R* and *ASIP* Genotypes and Basic Coat Colors in Jeju Horses

Nam-Young Kim¹, Sang-Hyun Han¹, Sung-Soo Lee¹, Chong-Eon Lee¹, Nam-Geon Park¹, Moon-Suck Ko¹
and Young-Hoon Yang^{2*}

¹National Institute of Animal Science, RDA, 175-6, O-deung Dong, Jeju, 690-150, Korea, ²Faculty of Biotechnology, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju, 690-756, Korea

ABSTRACT

This study was undertaken to reveal the relationship between genetic variations and the basic coat color classification system in Jeju horses. Genetic variations of the *melanocortinreceptor 1 (MC1R)* and *agouti signaling protein (ASIP)* genes were investigated using pyrosequencing technique. A nucleotide substitution mutation for *MC1R* g.901C>T and an *ASIP* 11-bp deletion mutation were screened. Black horses had *MC1R* $E^{+/-}$ (E^{+}/E^{+} or E^{+}/E^{e}) and *ASIP* A^{A}/A^{A} genotypes. In contrast, chestnut horse genotypes were *MC1R* E^{e}/E^{e} and *ASIP* $-/-$. Thus, black and bay horses have at least one dominant *MC1R* allele, E^{+} , whereas chestnut horses have homozygous recessive alleles E^{e}/E^{e} . This suggests that the *MC1R* genotypes determine chestnut or black/bay coat color, regardless of the genotype distribution of *ASIP*. In addition, the horses with *MC1R* $E^{+/-}$ and a dominant *ASIP* $A^{A}/-$ allele showed bay coat color, but not black, suggesting that the *ASIP* A^{A} allele represses black coat color development in the hairs of the body, but not in the mane and all four legs. Pedigree analysis showed a consistent relationship between the genotype distribution of the *MC1R* and *ASIP* genes and basic coat color patterns, even in the F_1 progeny. The results of this study revealed the relationship between the coat color phenotype and genetic background and suggested that useful information may be provided for molecular breeding of Jeju horses.

(Key words : Jeju horse, Coat color, Genetic variation, *MC1R*, *ASIP*)

서 론

포유류에서 모색은 세대간 유전양상을 나타내는 대표적인 형질로 표현형을 쉽게 확인할 수 있어 다양한 종에서 활발히 연구되어 왔다(Klungland 등, 1995; Valverde 등, 1995; Kijas 등, 1998; Schmutz 등, 2007). 포유류의 모색은 피부나 털에 멜라닌 색소의 존재여부에 따라 여러 가지 양상을 나타낸다. 모색을 결정하는 두 가지 색소인 eumelanin (black/brown)과 pheomelanin (yellow/red)의 생합성에 대한 효소활성, 이들 색소가 침착되는 색소세포(melanocyte)의 분포에 따라 결정되며, 색소세포의 분포는 배발생 단계(embryogenesis)에서 결정되며, 그 과정은 색소세포(melanocyte)의 이주(*KIT*, *KITLG*, *EDNRB* 등), melanin 생합성을 조절하는 신호전달자와 수용체(*MC1R*, *ASIP*, *MITF* 등), melanin 생합성(*TYP*, *TYRP1*, *DCT*), melanosome의 생성(*SILV*,

AP3 등)과 이동(*MYO5A*, *RAB27A* 등) 등 복잡한 여러 단계에 의해 표현된다(Mackenzie 등, 1997; Sulaimon 등, 2003; Slominski 등, 2004; Thiruvankadan 등, 2008).

말의 모색을 결정하는 핵심 유전자들은 *melanocortin 1 receptor (MC1R)*과 *agouti signaling protein (ASIP)*으로 *Extension (E)*와 *Agouti (A)* 좌위에 암호화되어 있다. *Extension* 좌위의 E^{+} 와 E^{e} , 두 개의 대립인자는 *MC1R*의 유전적 변이 중 g.901C>T 염기치환에 의해 결정되며, 적모색(chestnut) 또는 흑모(black)/유마(bay) 모색을 결정하는 유전자형으로 알려져 있다. 우성 대립인자인 E^{+} 는 eumelanin 합성과 침착을 통해 흑색 또는 갈색을 나타낸다. 반면, 열성 대립인자인 E^{e} 는 eumelanin 생합성이 결핍되고 pheomelanin만을 생합성하여 적색 또는 황색계 모색을 나타낸다(Marklund 등, 1996). 반면, *A* 좌위는 *ASIP* exon 2에서 11-bp 절편의 삽입/결실 돌연변이(insertion/deletion mutation)에 의해

* Corresponding author : Young-Hoon Yang, Major of Animal Biotechnology, Jeju National University, 102 Jejudaehakno, Jeju, 690-756, Korea. Tel: 82-64-754-3338, Fax: 82-64-725-2403, E-mail: yhyang@jejunu.ac.kr

결정되며, *MC1R*에 대한 상호 길항작용을 통해 흑모색의 발현을 2차적으로 조절하게 된다(Rieder 등, 2001; Thiruvankadan 등, 2008).

말의 모색명칭은 모색 및 형태에 따라 적색-흑색만으로 나타나는 기본모색, 희색모색에 의해 2차적으로 변화하는 2차 모색, 백모색의 출현과 형태 등으로 구분되는 혼모색 양상 등 3 그룹으로 나뉜다. 기본 모색(basic coat color)은 보통 흑모색(black), 유마모색(bay), 적모색(chestnut)으로 구분하고 있다(Thiruvankadan 등, 2008). 제주마의 모색은 12가지 대부분을 기본으로 42가지로 세분류하고 있으며(Lee, 1971), Lee (1971)는 제주마의 기본모색에 대한 명칭은 ‘가라’, ‘유마’, ‘적다’라는 명칭을 사용하고 있다.

현재까지 제주마 모색에 관한 연구보고들은 모색 명칭에 따른 외부 표현형적 분류에 대한 보고(Lee, 1971)와 총마(gray) 모색 원인 유전자의 다형성에 대한 보고(Han 등, 2009)에 국한되어 있다. 본 연구는 제주마 집단에서 빈번하게 출현하는 기본 모색(가라, 유마, 적다)과 기존에 알려진 기본 모색 결정 유전자인 *MC1R*, *ASIP*의 유전자형의 분포, 교배를 통해 생산된 자손의 모색 등과의 상관관계를 구명하고자 수행하였다.

재료 및 방법

1. 공시동물 및 DNA 추출

연구시료는 농촌진흥청 국립축산과학원 난지축산시험장에서 현재 사육중이거나 농가에서 수집한 제주마 108두의 혈액이나 DNA를 이용하였다. 혈액에서 DNA 분리는 Sambrook 등(1989)의 방법을 변형하여 수행하였다. 경정맥에서 채취한 전혈에 red cell lysis solution을 첨가하여 적혈구를 용해한 후, 회수한 백혈구는 nuclei lysis buffer를 첨가하고 55°C에서 overnight 처리하여 분해하였다. Phenol-chloroform을 이용하여 단백질을 제거한 후, ethanol 침전법으로 DNA를 회수하고 TE buffer에 용해하였다. 준비한 DNA 용액은 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, USA)로 흡광도를 측정 후 A₂₆₀/A₂₈₀ 1.8 이상인 DNA 용액들을 100 ng/μl로 희석하여 PCR 증폭을 위한 주형으로 이용하였다.

2. 중합효소연쇄반응 (PCR)을 통한 *MC1R*과 *ASIP* 증폭

말의 기본모색을 결정하는 주요 유전자인 *MC1R*은 g.901C>T 변이와 *ASIP* 11-bp 돌연변이가 분석을 위해 PyroMark Assay Design 2.0 (Qiagen, Germany) 프로그램을 이용하여, PCR primer와 pyrosequencing primer들을 고안하였다(Table 1). 유전자 절편의 증폭을 위한 PCR 반응은 1× reaction buffer, 20 mM dNTP, 각각 15 pmol primer, 0.5 units HS Prime Taq DNA polymerase (GenetBio, Korea)와 25~50 ng genomic DNA를 혼합하여 25 μl volume으로 혼합하였다. PCR 반응조건은 DNA Engine Tetrad 2 (Bio-Rad, USA)를 이용하여 94°C 5분 초기변성 후, 94°C 30초, template-primer annealing 30초(*MC1R* 69°C, *ASIP* 58°C), 72°C 30초로 구성된 연쇄반응을 35회 반복한 후 72°C에서 5분간 최종 신장하였다. PCR 증폭 산물은 agarose gel 상에서 전기영동법으로 확인한 후 Pyrosequencing에 이용하였다.

3. *MC1R*과 *ASIP* 유전자형 결정

Single-stranded biotinylated PCR product는 sequencing 반응을 위해 pyrosequencing Vacuum Prep Tool (Qiagen, Germany)을 이용하였다. Streptavidin Sepharose HP beads를 2× PyroMark Binding buffer (Qiagen, Germany)와 혼합한 후 PCR product와 증류수를 첨가하여 혼합하였다. 부착된 DNA는 vacuum을 이용하여 filter probes에 흡착하고, 변성, 세척하여 준비하였다. 준비한 주형 DNA와 pyrosequencing primer를 혼합한 후 80°C에서 변성하고, 냉각하여 혼성화하고 PyroMark Gold Reagents (Qiagen, Germany)를 이용하여 PyroMark Q96 ID (Qiagen, Germany)로 분석하였다.

4. 가계도 분석

제주마와 Thoroughbred 품종 간 교배를 통해 생산된 망아지에서 기본 모색의 유전양상과 모색관련 유전자의 변이와의 상관관계를 분석하기 위해 기본 모색간 교배 가계를 선정하여 가계도를 작성하였다.

Table 1. PCR and sequencing primers for pyrosequencing

Target	Sequence(5'→3') ^a
<i>MC1R</i> g.901C>T	Forward : F1 CTGCACTCACCCATGTACTACTTC
	Reverse : R1 *-CCTCCAGCAGCAGCAAGAT
	Sequencing : S1 CTGCTGCCTGGCCGT
<i>ASIP</i> ex2 11-bp deletion	Forward : F1 GGGGGAAAAGACCAGAAACA
	Reverse : R1 *-CATGTAGGCCTGAAAAATCCTT
	Sequencing : S1 AAATCCAAAAAGATCAGC

a * : 5'-end biotinylated.

결과 및 고찰

Lee (1971)는 가라모색은 전신에 ‘털빛이 검은 말’이라고 하여 흑모색으로 표현하였고, 적다 모색은 ‘전신의 피모가 적색인 것’으로, 유마는 ‘피모는 갈색이고 다리 하부는 흑색’으로 설명하였다. Gremmel (1939)과 Salisbury (1941)는 black 모색은 전신과 point (갈기, 꼬리, 하지, 귀 가장자리)가 흑색, chestnut 모색은 전신 붉은색이고 point에 흑색을 갖지 않는 것, bay 모색은 point는 흑색이며 모색은 황갈색에서 갈색으로 다양하게 나타난다고 하였다. 제주마의 모색 분류 체계와 비교해 볼 때, 가라 모색은 black, 적다 모색은 chestnut, 유마 모색은 bay 모색의 특징들과 일치하는 것을 알 수 있다.

제주마 집단에서 표현형 관찰을 통해 기본 모색을 몸통과 사지, 갈기, 꼬리가 모두 흑색인 가라 (black)와 적색인 적다 (chestnut), 적갈색 몸통이나 하지 말단과 갈기, 꼬리 등이 흑갈색인 유마 (bay) 등으로 분류하였다. Table 2에서는 조사된 제주마 집단의 기본모색 분포를 나타내었다. 조사 집단에서는 적다 모색이 전체의 42.6%인 46 두로 가장 높은 빈도를 나타내었고, 유마와 가라 모색인 각각 35.2%, 22.2%로 조사되었다.

Table 2. Basic coat color patterns found in Jeju horse population

Basic coat color	No. of horses	Frequency
Black	24	0.222
Bay	38	0.352
Chestnut	46	0.426

Fig. 1은 pyrosequencing 기법을 이용하여 *MC1R* (A) 및 *ASIP* (B)에 대한 유전자형을 결정한 결과이다. *MC1R*에서 E^+E^+ 와 E^+E^e , E^eE^e 가, *ASIP*에서는 A^4A^4 와 A^4A^a , A^aA^a 가 모두 확인되었으며, Marklund 등(1996)에 의한 *MC1R* 유전자형 분석 및 Rieder 등(2001) 방법에 의한 *ASIP* 유전자형 분석 결과와 일치하였다 (data not shown). Table 3에서는 모색별 제주마 집단에서 *MC1R*과 *ASIP*의 유전자형의 분포와 빈도를 나타내었다. *MC1R* 유전자형 분석에서는 두 가지 대립인자 E^+ , E^e 가 모두 관찰되고, 대립인자 조합에 따른 유전자형은 각각 E^+E^+ 0.093, E^+E^e 0.481, E^eE^e

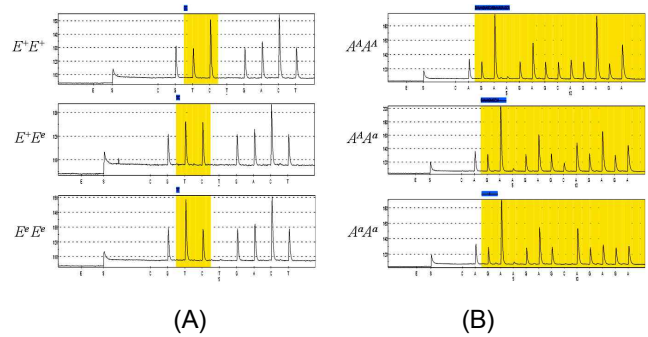


Fig. 1. Pyrograms generated with the PyroMark Q96 ID showing the pyrosequencing pattern and genotypes for *MC1R* (A) and *ASIP* (B).

0.426으로 확인되었다. 또한 *ASIP*에서는 대립인자 A^4 , A^a 의 조합에 의해 세 가지 유전자형이 각각 A^4A^4 0.213, A^4A^a 0.472, A^aA^a 0.315의 빈도를 나타내었다. 가라모색의 *MC1R* 유전자형 및 유전자 빈도는 E^+E^+ 0.208, E^+E^e 0.791, E^+ 0.604, E^e 0.396로 나타났으며, *ASIP*에서는 A^aA^a 1로 나타났다. 가라모색에서는 적어도 1개의 E^+ 대립유전자가 있어야 하며 *ASIP*는 A^a 동형접합이어야 한다. 유마모색에서는 *MC1R* 유전자형 및 유전자 빈도는 E^+E^+ 0.131, E^+E^e 0.868, E^+ 0.566 E^e 0.434로 나타났으며, *ASIP*에서는 A^4A^4 0.342, A^4A^a 0.657, A^4 0.671, A^a 0.329로 나타났다. 유마모색에서는 *MC1R*과 *ASIP*에서 적어도 1개의 E^+ , A^4 대립유전자가 있어야 한다. 적다모색에서는 *MC1R*은 E^eE^e 유전자형만 나타났으며, *ASIP*에서는 A^4A^4 0.217, A^4A^a 0.565, A^aA^a 0.217 3가지 유전자형이 모두 나타났으며, 유전자빈도는 A^4 0.5, A^a 0.5로 나타났다.

Table 4는 제주마 집단에서 *MC1R*과 *ASIP* 유전자형 조합과 기본모색간의 관계를 나타내었다. Rieder 등(2001)은 22 품종의 모색에 따른 *MC1R* 및 *ASIP* 유전자형에 대해 보고하였다. Black은 E^+E^+/A^4A^4 , E^+E^+/A^4A^a 유전자형을 갖고, Bay는 E^+E^+/A^4A^4 , E^+E^+/A^4A^a , E^+E^e/A^4A^4 , E^+E^e/A^4A^a , Chestnut은 E^eE^e/A^4A^4 , E^eE^e/A^4A^a , E^eE^e/A^aA^a 유전자형을 갖는 것으로 보고하였다. 본 연구결과는 Rieder 등(2001)의 연구결과와 일치하는 양상을 나타내었다. *MC1R* 유전자형 분석으로 가라/유마모색과 적다모색 간의 분류가 가능하였으며, 가라모색과 유마모색에서는 *MC1R* 유전자형은 동일하므로 *ASIP* 유전자형에 따라 가라모색과 유마모색으로 구분이 가

Table 3. Distribution of genotypes and frequencies of *MC1R* and *ASIP* among different Jeju horse coat colors

Genetic variation	Genotype	No. of horse (Frequency)	Black	Bay	Chestnut
<i>MC1R</i> g.901C>T	E^+E^+	10 (0.093)	5 (0.208)	5 (0.131)	—
	E^+E^e	52 (0.481)	19 (0.791)	33 (0.868)	—
	E^eE^e	46 (0.426)	—	—	46 (1.000)
<i>ASIP</i> exon 2 11-bp deletion	A^4A^4	23 (0.213)	—	13 (0.342)	10 (0.217)
	A^4A^a	51 (0.472)	—	25 (0.657)	26 (0.565)
	A^aA^a	34 (0.315)	24 (1.000)	—	10 (0.217)

Table 4. Relationship between the basic coat color patterns and the combined genotypes of *MC1R* and *ASIP* in Jeju horse population tested in this study

Basic coat color	Genotype of <i>MC1R/ASIP</i>	No. of horse	Frequency
Black	E^+E^+/A^aA^a	5	0.046
	E^+E^e/A^aA^a	19	0.176
Bay	$E^+E^+/A^A A^A$	1	0.009
	$E^+E^+/A^A A^a$	4	0.037
	$E^+E^e/A^A A^A$	12	0.111
	$E^+E^e/A^A A^a$	21	0.194
Chestnut	$E^eE^e/A^A A^A$	10	0.093
	$E^eE^e/A^A A^a$	26	0.241
	$E^eE^e/A^a A^a$	10	0.093

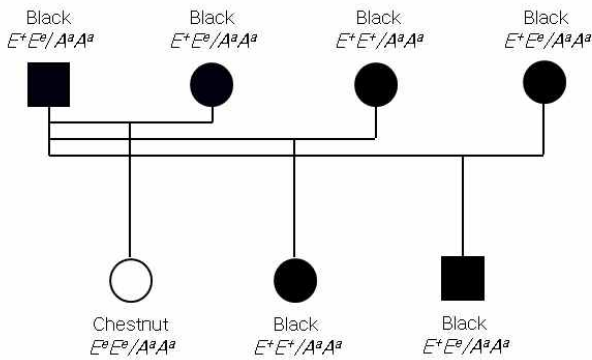


Fig. 2. A pedigree showed the Mendelian inheritance pattern of Black and Chestnut coat colors in the horse family.

능한 것으로 확인되었다. 즉, *ASIP*의 우성대립유전자인 A^1 는 유마모색에서 사지를 제외한 부위에서 흑모색 발현을 억제하는 것으로 추정된다. Fig. 2는 제주마와 Thoroughbred 품종 간 교배를 통해 생산된 망아지에서 기본 모색의 유전양상과 모색관련 유전자형의 상관관계를 나타내었다. 가계 분석에 이용된 개체들은 국제동물유전학회 (International Society of Animal Genetics)에서 권고하는 microsatellite 표지인자를 이용하여 친자감별을 확인하였다 (data not shown). 교배에 이용된 수말의 유전자형은 E^+E^e/A^aA^a 인 가라모색이며, 종빈마의 유전자형은 *ASIP*는 모두 A^aA^a 동형접합이며 *MC1R* E^+E^+ 또는 E^+E^e 인 가라모색이다. 가계분석 결과 $E^+E^e \times E^+E^e$ 교배에서 출생한 자손이 E^+E^e 인 가라모색과 E^eE^e 인 적다모색 자손이 출현하여 *ASIP* A^aA^a 동형접합인 경우 *MC1R*의 유전자형에 따라 가라모색과 적다모색이 나타나는 것으로 확인되었다.

연구결과 제주마에서 12가지로 대분류 되고 있는 모색들 (Lee, 1971) 중 기본 모색인 가라모색, 유마모색, 적다모색에 대해

pyrosequencing 기법을 이용한 *MC1R*과 *ASIP* 유전자형에 대한 분자유전학적 분석이 가능하였다. Han 등 (2009)이 제주마의 총마모색에 대한 유전양상 및 유전자형 분석법을 보고한 바 있어, 본 연구결과와의 조합을 통해 제주마 집단에 대한 가라모색, 유마모색, 적다모색, 총마모색에 대해서는 분자유전학적으로 분류체계는 정립되었다고 할 수 있다. 반면, 제주마 집단에서 출현하는 모색에 대한 분자수준의 해석 체계를 완성하기 위해서는 기본모색 몸통에 백모색 반점이나 띠로 나타내는 율라모색 (tobiano) (Brooks 등, 2007; Haase 등, 2008), 사지나 머리 부분에서의 국소 백반, 회색모색 등 2, 3차 모색에 대한 연구들이 지속적으로 수반되어야 할 것이다. 천연기념물로 지정 보호되고 있는 제주마의 다양성 확보뿐만 아니라, 경마, 승마 산업에서도 매우 중요한 경제형질인 모색 관련 유전자형 분석법의 확립을 통해 유전자형의 조합을 근간으로 한 분자유종 체계의 적용도 가능해 질 것으로 예측된다.

요 약

본 연구는 제주마의 기본모색 분류체계와 유전 변이간의 관계를 확인하기 위해 수행되었다. pyrosequencing 방법을 이용하여 *melanocortin receptor 1 (MC1R)*과 *agouti signaling protein (ASIP)* 유전자의 변이를 분석하였다. *MC1R*은 $g.901C>T$ 염기치환을 분석하였고, *ASIP*는 11-bp 결실돌연변이를 분석하였다. 가라마필은 *MC1R*에서는 $E^+/-$ (E^+/E^+ or E^+/E^e), *ASIP*에서는 A^a/A^a 유전자형이 나타났다. 유마 마필에서는 *MC1R*은 $E^+/-$ 그리고 *ASIP*는 A^a/A^a 유전자형이 나타났다. 반면에 적다 마필에서 *MC1R*은 E^e/E^e 유전자형만이 나타났으며, *ASIP*에서는 모든 조합의 유전자형이 나타났다. 가라모색과 유마모색은 *MC1R*에서 적어도 1개의 E^+ 우성대립유전자를 갖고 있어야하며, 적다모색에서는 동형열성대립유전자인 E^e/E^e 유전자형을 가져야 한다. 이는 *ASIP* 유전자형 분포와 관계없이 *MC1R* 유전자형에 의해 가라/유마모색과 적다모색을 결정하는 것이다. 또한 *MC1R*은 $E^+/-$ 그리고 *ASIP*은 우성대립유전자인 $A^1/-$ 를 갖는 마필은 유마모색을 나타내는데 이는 *ASIP*은 우성대립유전자인 A^1 에 의해 사지를 제외한 부분에서 흑모색 발현을 억제하는 것으로 추정된다. 가계분석에서는 제주마와 더러브렛간에 교배로 생산된 F1 자마의 기본모색 양상과 *MC1R* 및 *ASIP* 유전자형 분포와의 관계에 대해 일정한 결과를 보여주고 있다. 본 결과는 모색에 대한 표현형과 유전양상 간의 관계를 보여주고 있으며, 제주마의 분자유종을 위한 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

(주제어: 제주마, 모색, 유전변이, 유전자형, *MC1R*, *ASIP*)

인 용 문 헌

Brooks, S. A., Lear, T. L., Adelson, D. L. and Bailey, E. 2007. A chromosome inversion near the *KIT* gene and the Tobiano spotting pattern in horses. *Cytogenetic and Genome Research.*

119:225-30.

- Gremmel, F. 1939. Coat color in horses. *J. Heredity*. 30:437-445.
- Haase, B., Jude, R., Brooks, S. A. and Leeb, T. 2008. An equine chromosome 3 inversion is associated with the tobiano spotting pattern in German horse breeds. *Animal Genetics*. 39:306-309.
- Han, S. H., Lee, C. E., Kim, N. Y., Ko, M. S., Jeong, H. Y. and Lee, S. S. 2009. Genetic Polymorphisms of Candidate Loci and Inheritance Patterns of Gray Coat Color in Jeju Horses. *Journal of Life Science*. 19:793-798.
- Kijas, J., Wales, R., Tornsten, A., Chardon, P., Moller, M. and Andersson, L. 1998. Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics*. 150:1177-1185.
- Klungland, H., Vage, D. I., Gomez-Raya, L., Adalsteinsson, S. and Lien, S. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm. Genome*. 6:636-639.
- Lee, K. M. 1971. Studies on the old name and distribution of coat color in the Cheju Horse. *건국학술지*. 제12집. 893-909.
- Mackenzie, M. A., Jordan, S. A., Budd, P. S. and Jackson, I. J. 1997. Activation of the receptor tyrosine kinase Kit is required for the proliferation of melanoblasts in the mouse embryo. *Dev. Biol.* 192:99-107.
- Marklund, L., Moller, M. J., Sandberg, K. and Andersson, L. 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mamm. Genome*. 7:895-899.
- Rieder, S., Taourit, S., Mariat, D., Langlois, B. and Guerin, G. 2001. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mamm. Genome*. 12:450-455.
- Salisbury, G. W. 1941. The inheritance of equine coat colour. II. The basic colors and patterns. *J. Heredity*. 31:235-240.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Manniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schmutz, S. M. and Berryere, T. G. 2007. Genes affecting coat colour and pattern in domestic dogs: a review. *Animal Genetics*. 38:539-549.
- Slominski, A., Tobin, D. J., Shibahara, S. and Wortsman, J. 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol. Rev.* 84:1155-1228.
- Sulaimon, S. S. and Kitchell, B. E. 2003. The biology of melanocytes. *Vet. Dermatol.* 14:57-65.
- Thiruvankadan, A. K., Kandasamy, N. and Panneerselvam, S. 2008. Coat colour inheritance in horses. *Livestock Science*. 117:109-129.
- Valverde, P., Healy, E., Jackson, I., Rees, J. L. and Thody, A. J. 1995. Variants of the melanocyte-stimulating hormone receptor gene are associated with red hair and fair skin in humans. *Nature Genetics*. 11:328-330.

(Received Jan. 10, 2011; Revised Mar. 14, 2011; Accepted Mar. 17, 2011)