

ĐA HÌNH GEN *ASIP*, *MC1R*, *MATP* VÀ *TBX3* KIỂM SOÁT MÀU SẮC LÔNG NGỰA KUSHUM

Nguyễn Bá Trung^{1*}, Lê Nữ Anh Thu^{2,3}, Phạm Thị Kim Phượng⁴

¹ Bộ môn Chăn nuôi, Khoa Nông nghiệp, Đại học An Giang - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

² Bộ môn Chăn nuôi, Khoa Chăn nuôi thú Y, Đại học Nông Lâm, Đại học Huế

³ Trường sau đại học Môi trường và Khoa học sự sống Okayama, Nhật Bản

⁴ Tổ Hóa, Đại học An Giang - Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Màu lông phổ biến ở ngựa là đen, nâu và hạt dẻ, do hai đột biến *ASIP* c.2174 - 2184del, và *MC1R* c.901C > T chi phối. Các màu khác do tương tác gen tạo ra, như màu kem do gen *MATP* c.457 G > A; màu dun do gen *TBX3* g.18227267 + 1066 G > T; g.18227267 1.6del. Trong nguyên cứu này, kiểu gen 22 ngựa Kazakhstan kushum được xác định bằng phương pháp PCR-RFLP cho gen *MATP* (liên quan đến protein vận chuyển màng - membrane transport protein association); gen *MC1R* (thụ thể melanocortin 1- melanocortin 1 receptor); gen *ASIP* (protein tín hiệu agouti- agouti signaling protein) và giải trình tự gen *TBX3* (nhân tố phiên mã trong nang lông, T- box3, transcription factor in hair follicles). Mục tiêu nghiên cứu là xác định tần suất các alen kiểm soát đến màu sắc lông. Kết quả, một trăm phần trăm ngựa Kushum không mang alen qui định màu kem *C^{cr}*. Các số liệu kiểu hình cho thấy, trong số 22 cá thể nghiên cứu có 20 cá thể màu nâu đỏ-bay, 1 màu hạt dẻ và 1 màu đen. Tần suất các alen *A*, *E* và *C* thuộc gen *ASIP*, *MC1R* và *MATP* xuất hiện cao, lần lượt là 0,70; 0,70; và 1,00, điều này có thể do ưu tiên chọn lọc màu nâu đỏ trong công tác giống. Mặc khác, gen *TBX3* có bốn kiểu gen: *D/d1*; *d1/d1*; *d1/d2*; và *d2/d2*. Trong đó tần suất xuất hiện cao nhất là kiểu gen *d2/d2* (41 %), thấp nhất là *D/d1* và *d1/d1* (18%). Tần suất alen *D*, *d1*, và *d2* lần lượt là: 15%, 39%, và 46%. Phân bố kiểu gen dun (*D/D*, *D/d1*, *D/d2*); non dun-1 (*d1/d1*, *d1/d2*) và non dun-2 (*d2/d2*) tương ứng là 18%, 41%, và 41%. Có 59% cá thể mang alen liên quan màu dun, chứng tỏ quần thể mang dấu vết ngựa nguyên thủy, phản ánh sự đa dạng di truyền màu sắc lông. Kết quả nghiên cứu bộc lộ quần thể ngựa Kushum trong nghiên cứu này chủ yếu có lông màu nâu đỏ-bay, xen lẫn dấu vết sọc vằn của loài ngựa cổ đại.

Từ khóa: Gen *ASIP*, *MC1R*, *MATP* và *TBX3*, ngựa Kushum, màu sắc lông.

MỞ ĐẦU

Ngựa Kushum được tạo giống ở miền tây Kazakhstan từ năm 1931 đến 1976 bằng cách lai giữa các giống ngựa địa phương với các giống ngựa nhập như Trotter, Thoroughbred và Russian Don (Dmitriez, Ernst, 1989). Giống này khối xác lớn, dẻo dai, thích nghi tốt với môi trường đồng cỏ nửa sa mạc, giữ vai trò quan trọng trong cộng đồng địa phương như giúp chăn gia súc, dê cừu và phục vụ quân đội. Tuy nhiên, đặc điểm di truyền phân tử như đa dạng màu sắc lông da... chưa được nghiên cứu. Ở ngựa, màu lông có vai trò quan trọng, giúp phân biệt các kiểu hình đặc thù giữa các cá thể và các giống. Ngựa có khả năng sản xuất sắc tố trên bề mặt cơ thể, đặc biệt là màu sắc lông. Nghiên cứu đặc điểm di truyền màu sắc lông người ta thường xác định các gen ảnh hưởng đến các màu cơ bản như đen, hạt dẻ hay nâu đỏ -bay, còn các đốm hoặc pha trộn màu được mô tả sau đó. Sự pha trộn màu sắc này do tương tác giữa các kiểu gen qui định màu sắc phổ biến trên ngựa.

Hầu hết việc mô tả màu lông ngựa thường dựa trên sự kết hợp giữa màu toàn thân và các gốc cạnh của cơ thể như bờm, đuôi, chân tay và viền tai. Quan sát và mô tả chính xác màu các vùng này thường rất quan trọng để xác định một màu cụ thể trên một cá thể. Bờm và đuôi đen có thể sáng hơn và sậm hơn bởi ánh sáng mặt trời. Trong những trường hợp này, màu sắc tứ chi là cơ sở chính xác nhất khi quan sát từ xa. Nhằm lẫn khi nhận dạng màu sắc thường được gây ra bởi mùa, tuổi của con vật hoặc các điều kiện khí hậu khác nhau. Vào mùa xuân, ngoại hình ngựa thường mượt mà hơn. Nắng, gió và mưa thường gây sạm màu da và bộ lông. Mặc khác, được nuôi dưỡng tốt, những con ngựa khỏe mạnh thường có màu sậm hơn. Một trở ngại khác khi phân biệt chúng là mỗi màu lông thường có nhiều sắc thái, vì vậy chúng ta thường tìm thấy màu trung gian của hai màu lông. Như vậy, xác định chính xác màu sắc lông ngựa dựa vào ngoại hình thường không khả thi, do đó người ta thường dựa trên mức độ DNA. Hiện nay, có 11 gen thường được phân tích để xác định màu sắc lông của ngựa.

Đột biến gen (*MC1R* c.901C > T) ở ngựa được mô tả lần đầu tiên bởi Marklund và đồng tác giả (1996). Gen *MC1R* (*ECA3p*) tại codon 83 có sự thay thế TCC thành TTC dẫn đến thay thế acid amin serine thành phenylalanine trong protein và liên quan đến alen lặn e. Kiểu gen lặn hoàn toàn ee liên quan đến kiểu hình hạt dẻ. Rieder và đồng tác giả (2001) nhận thấy các dị hợp tử *Ee* sẽ có màu nâu nhạt, trong khi các đồng hợp tử trội hoàn toàn *EE* sẽ cho màu nâu.

Abdel-Malek và đồng tác giả (2001) nhận thấy gen *ASIP* cạnh tranh với α -MSH để liên kết với gen *MC1R*. Chức năng của gen *MC1R* rất cần thiết cho hoạt động của melanocytes ở động vật có vú với protein tín hiệu agouti. Do đó, nó ảnh hưởng hoạt động eumelanotic và feomelanotic nơi có vai trò sản xuất eumelanin. Đa hình trong gen *ASIP* được mô tả bởi Rieder và đồng tác giả (2001), đột biến xóa 11 bp trong exon 2 của gen (*ASIP c.2174 - 2184del*) gây ra alen lặn *a* ở ngựa. Allele *a* ức chế chức năng protein, tín hiệu không bị chặn và eumelanin được hình thành trong toàn bộ cơ thể.

Protein *MATP* vận chuyển các phân tử xuyên màng melanocytic. Đột biến trong gen *MATP* được mô tả đầu tiên bởi Mariat và đồng tác giả (2003), ở vị trí 72 trên exon 2 (*MATPc.457G > A*), trong đó codon *GAT* được thay thế bằng codon *AAT*. Các alen màu kem *C^{cr}* trội không hoàn toàn, do đó nếu chỉ có một alen *C^{cr}* màu bị pha loãng một phần, nếu có cả hai alen *C^{cr}C^{cr}* màu sẽ bị pha trộn hoàn toàn.

Ngoài ra, màu dun thường được đặc trưng bởi màu cơ bản bị pha loãng và xuất hiện các đặc điểm dun như sọc đen giữa lưng, hốc mắt, vai và cẳng chân. Theo Imsland và đồng tác giả (2016), màu pha loãng dun do hiện diện của một đoạn gen chèn 1.6 kb trong vùng downstream của gen *TBX3*, alen *D* trội hoàn toàn, ngựa không có đoạn này trên cả hai nhiễm sắc thể sẽ không có màu dun, alen *d2d2*, chúng sẽ không mang các vech tích liên quan đến màu dun, alen *d2* xuất hiện sau quá trình thuần hóa ngựa. Một đột biến điểm nằm trong phần chèn 1.6 kb (*G > T*, SNP), phá vỡ hiệu ứng pha loãng dun, cụ thể là do alen *d1*, non-dun 1, làm xuất hiện kiểu hình dun khác như sọc đen giữa lưng. Do đó, những con ngựa mang kiểu gen *d1/d1* và *d1/d2* thường có sọc giữa lưng sẫm tối và các dấu vech tích liên quan đến màu dun nguyên thủy, alen *d1* xuất hiện trước quá trình thuần hóa ngựa.

Trong nghiên cứu này, đa hình SNP thuộc bốn gen *MC1R c.901C > T*, *ASIP c.2174 - 2184del*, *MATPc.457G > A* và *TBX3* liên quan đến màu sắc lông được phân tích trên 22 cá thể ngựa Kushum.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

22 mẫu máu được thu thập ngẫu nhiên từ quần thể ngựa Kushum ở 2 vùng Zhanibek và Kaztalov, Kazakhstan. Máu được lấy từ tĩnh mạch cổ và trữ trong ống chân không chứa EDTA chống đông. Tách chiết DNA từ các tế bào bạch cầu được thực hiện theo phương pháp phenol - chloroform. Các gen chức năng như *MC1R*, *MATP*, *ASIP* và *TBX3* đã được khuếch đại qua PCR bằng các cặp mồi (Bảng 1) và nhận dạng kiểu gen bằng PCR - RFLP (Bảng 3). Phản ứng PCR (Bảng 2) được thực hiện trong hỗn hợp 10 μ L, gồm 10 ng DNA, 0,2 μ M mỗi, 0,25 μ mol /L dNTPs, dung dịch đệm 2x PCR GoTaq DNA, 1 U Go *Taq* DNA polymerase (Toyobo, Osaka, Nhật Bản). Chu trình nhiệt được trình bày trong bảng 2. Sau khi khuếch đại, các sản phẩm PCR và các sản phẩm cắt bởi enzyme cắt giới hạn đã được điện di trong gel agarose 1,5%, đệm TAE (15 - 45 phút/ 75-135 V), nhuộm màu bằng Gelred và quan sát bằng UV transilluminator. Tần số alen và kiểu gen được tính theo nguyên lý cân bằng Hardy Weinberg (HWE), dựa trên sự khác biệt giữa các giá trị được dự đoán và phát hiện ($p = P + H/2$, $q = Q + H/2$, trong đó *p* và *q* là tần suất alen. Các chuỗi thu được từ giải trình tự Sanger (bảng 4) đoạn 240 bp SNP1 *TBX3g.18227267+ 1066 G > T* và chuỗi tham chiếu (GenBank with accessions KT896508-KT896515) được sắp xếp qua ClustalW trong phần mềm MEGA 7.1. Kết hợp sản phẩm PCR *TBX3 1.6del* có xuất hiện hay không xuất hiện đoạn 215bp, khi đó kiểu gen *TBX3* được xác định (Stefaniuk *et al.*, 2017; Imsland *et al.*, 2016).

Bảng 1. Trình tự đoạn mồi, và enzyme cắt giới hạn

Gene	Mồi (5' - 3')	Kích thước sản phẩm PCR (bp) ^a	Nguồn
<i>MCR1</i>	F:CCTACCTCGGGCTGACCACCAA R:GAGAGGACACTAACCACCCAGATG	460	Thiết kế
<i>ASIP</i>	F:CTTTTGTCTCTCTTTGAAGCATTG R:GCTAGCTAGTACAGAAAGAT	329	Thiết kế
<i>MATP</i>	R:TTGCTGACCGAAGGAAGAAG R:GAAATGCACTGGGAGACTGA	327	Thiết kế
<i>TBX3- SNP</i>	F:TAAGCCTCCAGACACCCAAG R:CAGCTCCCGTCTCCCTAGAT	240	Stefaniuk <i>et al.</i> , 2016
<i>TBX3- Del</i>	F:CAAGACGCAAGGCTCTTTCT R:CGTTTCTTTAAGGGCTCGTG	In 1837 or Del 215 bp	

Bảng 2. Chu trình nhiệt phản ứng PCR

Gene	Bước 1	Bước 2	Bước 3	Kết thúc
<i>MC1R</i>	95°C, 10 phút 1 chu kỳ	95°C - 30 giây; 60°C - 60 giây; 72°C - 30 giây; 35 chu kỳ	72°C - 10 phút 1 cycle	8°C - ∞ 1 chu kỳ
<i>ASIP</i>	95°C, 10 phút 1 chu kỳ	95°C - 30 giây; 60°C - 30 giây; 72°C - 60 giây; 35 chu kỳ	72°C - 10 phút 1 chu kỳ	8°C - ∞ 1 chu kỳ
<i>MATP</i>	95°C, 10 phút 1 chu kỳ	95°C - 30 giây; 60°C - 60 giây; 72°C - 30 giây; 35 chu kỳ	72°C - 10 phút 1 chu kỳ	8°C - ∞ 1 chu kỳ
<i>TBX3- IN/DEL</i>	94°C, 10 phút 1 chu kỳ	94°C - 30 giây; 58°C - 30 giây; 72°C - 30 giây; 33 chu kỳ	72°C - 5 phút 1 chu kỳ	8°C - ∞ 1 chu kỳ
<i>TBX3- SNP</i>	94°C, 10 phút 1 chu kỳ	94°C - 30 giây; 58°C - 30 giây; 72°C - 30 giây; 33 chu kỳ	72°C - 5 phút 1 chu kỳ	8°C - ∞ 1 chu kỳ

Bảng 3. Enzyme cắt giới hạn và xác định kiểu gen

Gene	Trình tự điểm cắt	Enzyme giới hạn	Nhiệt độ ủ (°C)	Thời gian ủ	Xác định kiểu gene
MC1R c.901 C > T	5'...T/CGA...3'	Taqα1	65	1 giờ	C = 460 bp, T = 276, 184 bp
MATP c.457 G > A	5'...T/TAA..3'	Mse1	37	1 giờ	G = 327 bp; A = 215, 112 bp
ASIP c.2174 - 2184 del		PCR			Normal = 329 bp; Mutation = 318 bp
TBX3g.18227267+ 1066 G > T		Sequencing			G = dun; T = d1
TBX3 1.6del		PCR			Normal = dun/d1; Deletion = d2

Bảng 4. Quy trình tinh sạch sản phẩm PCR (240 bp SNP1 TBX3g.18227267+ 1066 G > T) và giải trình tự - Sanger

Thành phần các chất		Chu trình nhiệt		Giải trình tự-Sanger	
Thành phần	Hàm lượng	Nhiệt độ	Phút	Thành phần	Hàm lượng
TBX3	5,00 µL	37° C	30	TBX3	2,00 µL
Exosap-IT	0,50 µL	80° C	15	Môi xuôi (F)	0,50 µL
Nước cất	3,50 µL	4° C	5	Nước cất	12,50 µL
Tổng cộng	9,00 µL			Tổng	15,00 µL

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Đa dạng các kiểu gen ảnh hưởng màu sắc lông trên ngựa từ các gen *ASIP c.2174 - 2184 del*, *MATP c.457 G > A*, *MC1R c.901 C > T*, và *TBX3* đã được phân tích trên 22 cá thể ngựa Kushum. Kết quả cho thấy tần suất các alen *A*, *E* và *C* thuộc gen *ASIP*, *MC1R* và *MATP* hiện diện cao, lần lượt là 0,70; 0,70; và 1,00. Kết quả ở Bảng 5 cho thấy một trăm phần trăm ngựa Kushum không mang alen *C^{cr}*, nếu ngựa mang alen này thì cá thể đó sẽ xuất hiện màu kem nhạt (Hình 3). Do đó, sự kết hợp các kiểu alen *AA*, *Aa*, *aa* và *EE*, *Ee*, *ee* từ 2 gen *ASIP* và *MC1R* đã quyết định màu sắc lông của quần thể (Hình 1 và Hình 2). Dựa vào nghiên cứu của Rieder và đồng tác giả (2001), kết quả có 20 con màu nâu đỏ-bay, 1 màu hạt dẻ và 1 ngựa đen. Đối chiếu kết quả này với hình chụp mô tả chi tiết từng cá thể ngựa lúc thu thập mẫu máu là phù hợp.

Reissman và đồng tác giả (2016) đã nghiên cứu các alen liên quan đến màu lông ở 1093 cá thể ngựa thuộc 5 giống trên toàn thế giới và 20 mẫu vật của ngựa Przewalski (được xem là giống trung gia giữa ngựa cổ nguyên thủy và ngựa đã thuần hóa) phát hiện 12 alen thuộc 5 gen liên quan màu lông cơ bản trên ngựa (đen, hạt dẻ, nâu đỏ-Bay). Chúng phân bố rộng rãi ở hầu hết các giống, trong khi các alen gây pha loãng màu hoặc hoa văn rất hiếm gặp ở các giống ngựa đã thuần hóa và không tìm thấy ở ngựa cổ Przewalski. Mặc khác, Nakamura và đồng tác giả (2019) cũng đã phân tích tần suất các alen *E*, *e*, *A*, *a*, *C* và *Cr* ở ngựa Kiso kết quả tương ứng là 0,80; 0,20; 0,86; 0,14; 0,98 và 0,02 ứng với các gen cơ bản *MC1R*, *ASIP* và *MATP*. Không xuất hiện alen đột biến *Cr*, như vậy ngựa Kushum có thể đã trải qua chọn lọc để loại trừ các màu không phải là màu lông cơ bản.

Bảng 5. Phân bố kiểu gen và tần suất các alen

Genes	Phân bố kiểu gen (n)			Tần suất alen		HWE*
	<i>AA</i>	<i>Aa</i>	<i>aa</i>	<i>A</i>	<i>a</i>	
<i>ASIP c.2174 - 2184 del</i>	10	11	1	0.70	0.30	0.89
<i>MATP c.457 G > A</i>	22	0	0	1.00	0.00	NA
<i>MC1R c.901 C > T</i>	10	11	1	0.70	0.30	0.89

* HWE: Giá trị Chi-square trong Hardy Weinberg Equilibrium

Kết quả phân tích gen *TBX3* Bảng 6 cho thấy sự hiện diện của bốn kiểu gen: *D/d1*; *d1/d1*; *d1/d2*; và *d2/d2*. Trong đó tần suất xuất hiện cao nhất là kiểu gen *d2/d2* (9 ngựa, 41 %) và thấp nhất là *D/d1* và *d1/d1* (4 ngựa, 18 %). Tần suất alen *D*, *d1*, *d2* lần lượt là: 15%, 39%, và 46%.

Phân bố kiểu gen dun (*D/D*, *D/d1*, *D/d2*); non dun-1 (*d1/d1*, *d1/d2*); và non dun-2 (*d2/d2*) tương ứng là 18%, 41%, và 41 % (Bảng 7). Tần suất alen của các gen này không khác biệt đáng kể theo Cân bằng Hardy Weinberg, ngoại trừ alen *D*. Như vậy, có tổng cộng 4 con ngựa màu dun kiểu gen *D/d1* và 9 con có kiểu gen non dun-1 (*d1/d1*, *d1/d2*) mang vech tích màu dun nguyên thủy. Đối chiếu kết quả này với ảnh chụp và chi tiết mô tả từng cá thể ngựa khi thu thập mẫu ngoài thực địa là hoàn toàn phù hợp với các vằn sẫm màu xuất hiện ở lưng, hốc mắt, vai và cẳng chân. Chứng tỏ quần thể ngựa Kushum tuy mới thành lập giống trong những thập niên 1930, 1970 nhưng chúng vẫn mang dấu vech sắc lông của giống ngựa nguyên thủy. Với các dấu vech cổ xưa này, phản ánh có sự đa dạng di truyền màu sắc lông của quần thể ngựa Kushum.

Bảng 6. Phân bố kiểu gene và tần suất alen gen *TBX3 g.18227267 + 1066 G>T; g .18227267 1.6del*

Kiểu gen						Tần suất alen		
<i>D/D</i>	<i>D/ d 1</i>	<i>D/ d 2</i>	<i>d 1/ d 1</i>	<i>d 1/d 2</i>	<i>d 2/d 2</i>	<i>D</i>	<i>d 1</i>	<i>d 2</i>
0	4	0	5	4	9	0,15	0,39	0,46

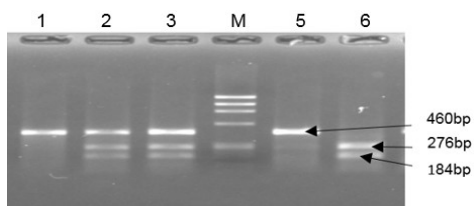
Alen qui định sắc tố dun là kiểu hình hoang dại so với ngựa đã thuần hóa. Imsland và đồng tác giả (2016) chứng minh sự pha trộn màu dun là do sự hiện diện hay vắng mặt của đoạn chèn 1.6 kb trong vùng downstream gen *TBX3* (alen *D* trội) và đột biến điểm G > T SNP nằm trong phần chèn 1.6 kb trên ngựa. Sau đó, Stefaniuk-Szmukier và đồng tác giả (2017) phát hiện sự hiện diện màu dun trong giống ngựa konik nguyên thủy. Khi phân tích gen *TBX3* tác giả kết luận những con ngựa này có thể xem chúng có màu lông dun cổ xưa. Mặc khác, nghiên cứu kiểu gen của các biến thể gen *TBX3* (1.6 kb in/ del) và SNP ở 74 con ngựa Hucul cho thấy sự hiện diện của cả 6 kiểu gen, trong đó kiểu *d1/d1* có tần xuất cao nhất (0,27) và *d2/d2* thấp nhất (0,05), trong khi đó tần số alen *d1* đạt 0,50; *D* và *d2* lần lượt bằng 0,30 và 0,20 (Mackowski *et al.*, 2019).

Mặc khác, Ezoë (2019) nghiên cứu gen *TBX3* trong bốn quần thể ngựa Lào, Kazakhstan, Nepal và Việt Nam không tìm thấy kiểu gen *D/D*, nhưng phát hiện năm kiểu gen với tần suất trung bình *d1/d1* cao nhất (0,34) và *D/d1*, *D/d2* thấp nhất (0,05), trong đó tần suất alen *D* (dun) dao động từ 0,03 đến 0,05 với trung bình 0,05; tần suất alen *d1* nằm trong khoảng 0,25 đến 0,67 với trung bình 0,52 và tần suất alen *d2* từ 0,27 đến 0,71 với trung bình 0,43. Như vậy, kiểu gen trội dun *D/D* cổ xưa tiếp tục không xuất hiện trong nghiên cứu này và cũng như trong nghiên cứu của Ezoë.

Tóm lại, các kiểu alen dun gen *TBX3* ở ngựa Kushum đã được phân tích (Hình 4). Có thể sự đa hình kiểu gen này đã duy trì từ đàn giống tổ tiên của quần thể ngựa bản địa Kazakhstan Kushum, mặc dù các alen này được cho là rất hiếm xuất hiện trong các giống đã thuần hóa. Đôi khi chúng xuất hiện ở ngựa bản địa châu Á nhưng không tìm thấy ở tất cả 8 quần thể giống ngựa Nhật Bản (Ripon *et al.*, 2019). Điều này có thể do áp lực chọn lọc, alen *D*, *d1* bị loại ra khỏi quần thể và phản ánh sự khác biệt trong công tác chọn giống ngựa ở các vùng miền khác nhau trên thế giới.

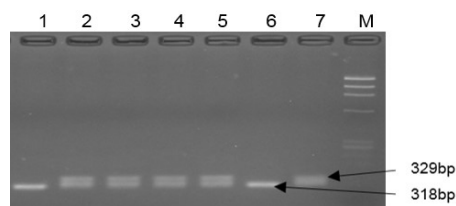
Bảng 7. Phân bố kiểu gen (*Dun*, *non dun-1* và *non dun-2*)

Dun (<i>D/D</i>, <i>D/d1</i>, <i>D/d2</i>)	Non dun-1 (<i>d1/d1</i>, <i>d1/d2</i>)	Non dun-2 (<i>d2/d2</i>)
4 (18%)	9 (41%)	9 (41%)



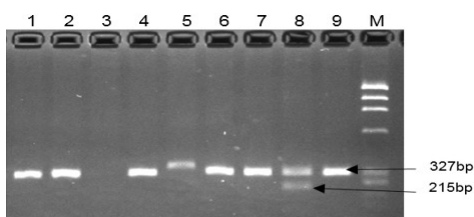
Hình 1. Kiểu gen *MC1R*: 1,4(CC); 2,3(CT); và 5(TT)

Giếng M: Thang DNA chuẩn (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp). Giếng số 1-6 lần lượt là sản phẩm do enzyme *Taq1* cắt đoạn *MC1R* 460bp khuếch đại từ DNA tổng số của ngựa thứ 1 - 6.



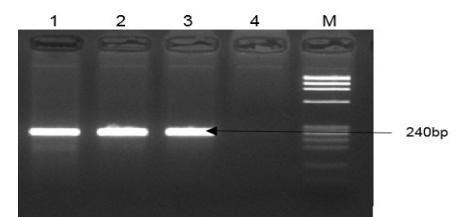
Hình 2. Kiểu gen *ASIP*: 1,6(aa), 2,3,4,5,7 (Aa)

Giếng M: Thang DNA chuẩn (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp). Giếng số 1-7 lần lượt là đoạn gen *ASIP* khuếch đại từ DNA tổng số của ngựa thứ 1 - 7.



Hình 3. Kiểu gen *MATP*: 1,2,4,6,7(GG); 8(GA: control); 9(GG: control)

Giếng M: Thang DNA chuẩn (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp). Giếng số 1 - 7 lần lượt là sản phẩm do enzyme *Mse1* cắt đoạn gen *MATP* 327 bp khuếch đại từ DNA tổng số của ngựa thứ 1-7. Giếng 8: mẫu đối chứng kiểu gen là GA. Giếng 9: mẫu đối chứng kiểu gen là GG.



Hình 4. Sự có mặt đoạn gen *TBX3-SNP1* – 240 bp

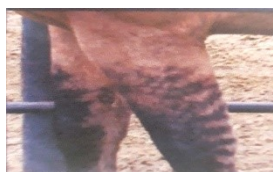
Giếng M: Thang DNA chuẩn (1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72 bp). Giếng số 1 - 3 lần lượt là sản phẩm 240 bp *SNP1* *TBX3g.18227267+ 1066 G > T* khuếch đại từ DNA tổng số của ngựa thứ 1 - 3. Giếng 4: đối chứng không chứa DNA



Hình 5. Bộ lông nâu đỏ-bay, 4 chân có sọc vàng



Hình 6. Sọc lưng và sọc vằn ở chân ngựa Kushum



Hình 7. Bộ lông màu hạt dẻ

KẾT LUẬN

Quần thể ngựa Kushum chủ yếu có lông màu nâu đỏ - bay, xen lẫn dấu vết sọc vằn của loài ngựa cổ, điều này có thể do ưu tiên chọn lọc màu lông nâu đỏ trong công tác giống. Do đó, các alen qui định màu sắc lông cơ bản chiếm tỷ lệ cao, trong khi alen liên quan màu kem không thấy xuất hiện, đặc biệt có 59% cá thể ngựa Kushum mang alen liên quan đến vết tích màu dun ở giống ngựa cổ đại. Kết quả có thể hữu ích cho các kế hoạch bảo tồn giống, cho phép xác định tình trạng di truyền màu sắc lông và duy trì đa dạng di truyền các tính trạng hiếm gặp ở ngựa.

Lời cảm ơn: Xin trân trọng cảm ơn tất cả các thành viên trong Hội các Nhà nghiên cứu về vật nuôi bản địa đã tham gia vào nghiên cứu thực địa ở các nước Trung Á. Nghiên cứu này được tài trợ bởi Hiệp hội Phát triển Khoa học Nhật Bản (KAKENHI), đặc biệt là Giáo sư Tetsuo Kunieda, Đại học Khoa học Okayama, Nhật Bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Albertsdóttir E, Eriksson S, Sigurdsson Á, Árnason T (2011). Genetic analysis of 'breeding field test status' in Icelandic horses. *J Ani Breed Genet* 128: 124-132.
- Dmitriev NG, Ernst LK (1989). Animal genetic resources of the USSR. *Fao Animal Production and Health paper*: 330-331.
- Ezoe (2019). Genetic diversity of coat color related genes in Asian native horses. *Master thesis, Department of Animal Science, Okayama University, Japan*.
- Imstrand F, Kelly McGowan, Carl-Johan Rubin, Corneliu Henegar, Elisabeth Sundström, Jonas Berglund, Doreen Schwochow, Ulla Gustafson, Páll Imstrand, Kerstin Lindblad-Toh, Gabriella Lindgren, Sofia Mikko, Lee Millon, Claire Wade, Mikkel Schubert, Ludovic Orlando, Maria Cecilia T Penedo, Gregory S Barsh, Leif Andersson (2016). Regulatory mutations in TBX3 disrupt asymmetric hair pigmentation that underlies Dun camouflage color in horses. *Nature Genet* 48: 152-158.
- Marklund L, Moller MJ, Sandberg K, Andersson L. (1996). A missense mutation in the gene for melanocytostimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammal Genom* 7: 895-899.
- Mariat D, Taourit S, Guerin G (2003). A mutation in the MATP gene causes the cream coat colour in the horse. *Genet Select Evol* 35: 119-133.
- Mackowski ML, Wodas. Brooks SA, Cieslak J (2019). TBX3 and ASIP genotypes reveal discrepancies in officially recorded coat colors of Hucul horses. *Animal* 13(9): 1811-1816.
- Nakamura K, Tozaki T, Kakoi H, Owada S, Takasu M (2019). Variation in the MC1R, ASIP, and MATP genes responsible for coat color in Kiso horse as determined by SNaPshot™ genotyping. *J Vet Med Sci* 81(1): 100-102.
- Reissmann M, Lutfi M, Sonia Z, Ludwig A (2016). Distribution of coat-color-associated alleles in the domestic horse population and Przewalski's horse. *J Appl Genet* 57(4): 519-525.
- Rieder S, Taourit S, Mariat, D, Langlois B, 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). *Mammal Genom* 12: 450-455.
- Ripon C.P (2019). Study on genetic diversity and characteristics of Japanese native horse populations. *PhD dissertation, Department of Animal Science, Okayama University, Japan*.
- Stefaniuk-Szmukier M, Molik KR, Piórkowska K, Szmatoła K, Długosz B, Pisarczyk W, Bugno-Poniewierska M. (2017). Variation in TBX3 Gene Region in Dun Coat Color Polish Konik Horses. *J Equine Vet Sci* 49: 60-62.

POLYMORPHISM IN ASIP, MC1R, MATP AND TBX3 GENES WHICH CONTROL COAT COLORS IN KUSHUM HORSES

Nguyen Ba Trung^{1*}, Le Nu Anh Thu^{2,3}, Pham Thi Kim Phuong⁴

¹ Animal Science Department, Faculty of Agriculture, An Giang University - Vietnam National University - Ho Chi Minh City.

² Animal Science Department, Faculty of Husbandry and Veterinary Medicine, Hue University of Agriculture and Forestry

³ Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University, Japan.

⁴ Department of Chemistry, Faculty of Education, An Giang University - Vietnam National University - Ho Chi Minh City.

SUMMARY

The basic coat colors in horses are black, brown and chestnut, resulted from combining two genes *ASIP* c.2174 - 2184del, and *MC1R* c.901C > T. Other colors are produced by gene interactions such as cream color due to the gene *MATP* c.457 G > A; dun color by gene *TBX3*g.18227267 + 1066 G > T; g.18227267 1.6del. In this study, the 22-horse Kazakh kushum genotype was determined by PCR-RFLP method for the gene *MATP* (related to membrane transport protein association); gene *MC1R* (melanocortin receptor 1); gene *ASIP* (agouti signaling

protein) and sequencing gene *TBX3* (transcription factor in hair follicles, T-box3). The purpose of this study was to determine the frequency of alleles related to coat color. As a result, one hundred percent of kushum horses do not carry allele C^{cr} that regulate cream color. Therefore, the combination of alleles *AA*, *Aa*, *aa* and *EE*, *Ee*, *ee* from *ASIP* and *MC1R* genes determined the basic coat color, resulting in 20 bay horses, 1 chestnut and 1 black. The frequency of *A*, *E* and *C* alleles of *ASIP*, *MC1R* and *MATP* genes was high by 0.70; 0.70; and 1.00, respectively. This may be due to the selection of bay in breeding. On the other hand, *TBX3* gene has four genotypes: *D/d1*; *d1/d1*; *d1/d2*; and *d2/d2*. The highest frequency of occurrence was *d2/d2* genotype (41%), lowest was *D/d1* and *d1/d1* by (18%). Allele frequencies *D*, *d1*, and *d2* are 15%, 39%, and 46%, respectively. Genotypic distribution dun (*D/D*, *D/d1*, *D/d2*); non dun-1 (*d1/d1*, *d1/d2*); and non dun-2 (*d2/d2*) are 18%, 41%, and 41%, respectively. There were 59% of individuals bearing alleles related to dun color, showing that the population bears primitive horse marks, reflecting the genetic diversity of coat colors in this population. Thus, the kushum horse population was mainly bay coat color, mixed with the stripes of ancient horses.

Keywords: *ASIP*, *MC1R*, *MATP*, and *TBX3* gene, Kushum horses, coat colors.