

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДЛЯ КЫРГЫЗСКОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ ПО 17 МИКРОСАТЕЛЛИТНЫМ МАРКЕРАМ

© 2019 г. Ж. Т. Исакова¹, *, Б. И. Токтосунов², В. Н. Кипень³, **, Л. В. Калинкова⁴,
Э. Т. Талайбекова¹, Н. М. Алдашева¹, А. Х. Абдурасулов²

¹Институт молекулярной биологии и медицины, Бишкек, 720040 Киргизия

²Институт биотехнологии национальной академии наук, Бишкек, 720071 Киргизия

³ГНУ "Институт генетики и цитологии" НАН Беларуси, Минск, 220072 Республика Беларусь

⁴Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства, Рязанская область,
пос. Дивово, 391105 Россия

*e-mail: jainagul@mail.ru

**e-mail: slavakipen@rambler.ru

Поступила в редакцию 08.02.2018 г.

После доработки 18.04.2018 г.

Принята к публикации 03.05.2018 г.

Результаты данного исследования являются первыми в оценке субпопуляционной подразделенности кыргызской породы лошадей. Генотипирование лошадей проводилось по 17 микросателлитным локусам, рекомендованным Международным обществом генетики животных (ISAG). На основании результатов генотипирования по методу AMOVA рассчитаны парные генетические дистанции для лошадей кыргызской породы по отношению к 31 другой породе. Показано, что лошади кыргызской породы генетически наиболее близки к Уэльскому пони и Полукровной лошади.

Ключевые слова: кыргызская порода лошадей, микросателлитные маркеры, генетическое разнообразие, филогенетический анализ.

DOI: 10.1134/S0016675819010077

Изучение генетической структуры популяций аборигенных пород лошадей имеет важное значение для поддержания разнообразия, улучшения селекционной работы и определения места их географического происхождения [1]. Недостаточная изученность генофонда аборигенных пород лошадей Центральной и Восточной Азии не позволяет однозначно дифференцировать географическое место начала процессов доместикиции [1, 2]. К настоящему времени численность конного поголовья на территории стран СНГ сократилась более чем в 10 раз по сравнению с началом XX в. [3]. Негативные последствия данного процесса выражены, в первую очередь, в снижении общего уровня генетического разнообразия. В связи с этим на современном этапе в коневодстве актуально проведение исследований генетического потенциала аборигенных пород лошадей для оценки и поддержания высокого уровня их генетического разнообразия с целью недопущения негативных последствий инбридинга и эффекта “бутылочного горлышка” [4]. Сохранение фенотипических породных характеристик, связанных с экстерьерными особенностями, продуктивностью и жизне-

способностью лошадей, возможно лишь при сохранении “специфических генных комплексов и сбалансированной системы генов и аллелей” [5].

Предполагается, что дикий предок современной лошади (*Equus caballus*) вымер. В качестве предполагаемых диких предков лошади рассматриваются два вида: тарпан (*E. ferus*) и лошадь Пржевальского (*E. przewalskii*). Лошадь была одомашнена предположительно около 3700–3100 г. до н. э. на севере современного Казахстана (Ботайская культура) [6]. Однако по результатам молекулярно-генетических исследований, проведенных Vila et al. [7] и Jansen et al. [8], современное представление о доместикиции и последующей интродукции лошади таково, что, вероятнее всего, имели место многократные независимые случаи одомашнивания.

Экстерьерные характеристики и хозяйственное назначение лошадей кыргызской породы представлены в исследованиях Рипар с соавт. [9]. Начало же исследованиям генетического разнообразия кыргызской породы лошадей с использованием микросателлитных локусов было положено в работе Исаковой и др. [10].

Цель настоящего исследования – провести филогенетический анализ для кыргызской породы лошадей по 17 микросателлитным маркерам относительно 31 другой породы.

Материалом для генетического исследования по 17 STR-локусам (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3, VHL20) послужили образцы волос с луковицами, взятые у взрослого поголовья кыргызских лошадей, находящихся в высокогорных экспериментальных зонах Джети-Огузского и Тонского районов Иссык-Кульской области (19 животных) и в Кара-Кульджинском районе Ошской области (16 животных) Республики Кыргызстан. Результаты молекулярно-генетического исследования представлены в нашей предыдущей публикации [10]. Статистическую обработку данных проводили с использованием программ GenAEx v. 6.5 [11], STRUCTURE v. 2.3.4 [12], PAST v. 3.17 [13] и POPHELPER v. 1.0.10 [14]. С использованием GenAEx v. 6.5 были рассчитаны следующие показатели: среднее число аллелей на локус (N_a), число эффективных аллелей (N_e), уровни ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности, значение информационного индекса Шеннона (I), коэффициенты F_{IS} и F_{ST} , расчет генетических дистанций по методу AMOVA (Analysis of molecular variance) [15]. В программе STRUCTURE v. 2.3.4 по методу Pritchard с соавт. был рассчитан критерий Q , который характеризует принадлежность каждого отдельного животного к соответствующей породе [12]. С использованием веб-приложения POPHELPER v. 1.0.10 произведена графическая интерпретация результатов, полученных в STRUCTURE v. 2.3.4, а также рассчитан параметр ΔK . В программе PAST v. 3.17 выполнено построение дендрограммы на основе расчета генетических дистанций по методу AMOVA.

Современная порода кыргызских лошадей обнаруживает высокий уровень внутривидовой генетической вариабельности [10]. В 17 исследованных микросателлитных локусах было идентифицировано 135 аллелей, в том числе 38 редких аллелей (с частотой встречаемости менее 5.0%). Число аллелей в каждом локусе варьировало от 4 до 13, при среднем значении 7.941 ± 0.525 . Для представителей кыргызской породы лошадей показано наличие редких аллелей – $D/F/M/O/S$ для STR-локуса ABS17, G/Q – для ASB23, $F/G/I/P$ – для CA425, I – для HMS1, O/P – для HMS2, Q – для HMS7, N – для HTG и Q – для HTG10. В дополнение к стандартизованной номенклатуре [16] у кыргызской лошади был выявлен не характерный для изученных заводских пород аллель 20 (код в данном исследовании O) для STR-локуса HMS1.

В качестве контрастных популяций для исследования межпопуляционной дифференциации – расчета коэффициента инбридинга субпопуляций относительно всей популяции F_{ST} – были использованы 35 групп лошадей, представленных следующими породами: Андалузская (AND), Аппалуза (APP), Арабская чистокровная (ARA), Камполина (CAM), Коннемара пони (CON), Дартмурский пони (DAR), Голландская тяжеловозная (DUT), Фалабелла (FAL), Фелл пони (FEL), Фиордская (FJO), Фризская (FRI), Гронингенская (GRO), Хакнэ (HAC), Хафлингер (HAF), Исландская (ICE), Ирландский коб (IRI), Каспийская (KAS), Польский коник (KON), Липпицанская (LIP), Лузитано (LUS), Арьежский пони (MER), Мини-лошадь (MIN), Нью-Форест-пони (NEW), Шетлендский пони (SHE), Шайр (SHI), Американская стандартбредная (STA), Теннессийская прогулочная (TEN), Чистокровная верховая (THO), Тинкер (TIN), Полукровная (WAR), Уэльский пони (WEL). Были использованы данные о генотипах 8676 животных, представленных в открытом доступе [16]. Дополнительно был проведен анализ с использованием STRUCTURE v. 2.3.4, направленный на формирование наиболее однородных групп обозначенных выше пород лошадей [16], который позволил нивелировать разницу в объемах выборки для каждой группы лошадей, минимизировав риск потерять потенциально важную генетическую информацию (т.е. объемы выборок были сокращены до 50 голов для выборок ARA, DUT, FAL, FEL, FJO, FRI, HAC, HAF, ICE, IRI, MIN, HE2, STA, WAR1, WAR2, WAR3, WEL1 и WEL2). Результаты проведенного анализа представлены в табл. 1.

Таким образом, нами были получены генотипы по 17 STR-локусам для 35 лошадей кыргызской породы. Дополнительно сформированы 35 групп для 31 породы лошадей общим объемом 1574 животных (26758 генотипов).

При расчете значения показателя F_{ST} (по алгоритму AMOVA) для двух географически разобнесенных групп кыргызских лошадей – группа № 1 из Джети-Огузского и Тонского районов Иссык-Кульской области (19 животных), группа № 2 из Кара-Кульджинского района Ошской области (16 животных) – не было найдено статистически значимых различий. Дальнейшие расчеты при оценке показателей N_a , N_e , H_e , H_o , I и F_{ST} для сравнения группы лошадей кыргызской породы с 35 группами (31 порода лошадей), представленными в исследовании Van de Goor et al. [16], проводились, исходя из данного положения.

Из данных табл. 1. видно, что для кыргызской породы лошадей среднее число выявленных аллелей на локус для 17 микросателлитов является од-

Таблица 1. Генетическая характеристика 35 популяций лошадей различных пород по результатам генотипирования 17 STR-локусов (название популяции соответствует принятой классификации в исследовании [16])

Популяция	N	N_a	N_e	I	$H_o^{\#}$	$H_e^{\#}$	$F_{IS}^{\#}$
AND	45	6.529	3.372	1.375	0.668	0.659	-0.017
APP	54	6.882	3.859	1.491	0.713	0.713	0.007
ARA	50	6.000	3.142	1.300	0.621	0.638	0.032
CAM	61	6.765	3.604	1.417	0.667	0.681	0.022
CON	40	6.824	4.144	1.542	0.726	0.736	0.024
DAR	22	5.353	3.227	1.312	0.631	0.657	0.027
DUT	50	5.529	3.191	1.272	0.663	0.630	-0.045
FAL	50	6.647	3.479	1.399	0.693	0.679	-0.017
FEL	50	5.882	3.796	1.421	0.715	0.692	-0.033
FJO	50	6.471	3.864	1.479	0.705	0.708	0.001
FRI	50	4.000	2.106	0.834	0.452	0.450	-0.024
GRO	27	6.059	3.884	1.483	0.752	0.727	-0.032
HAC	50	5.765	3.220	1.294	0.645	0.647	0.009
HAF	50	5.235	3.355	1.289	0.642	0.646	0.006
ICE	50	6.529	3.867	1.457	0.692	0.688	-0.013
IRI	50	7.000	3.732	1.487	0.715	0.710	-0.006
KAS	17	5.941	4.140	1.511	0.816	0.731	-0.125
KIR	35	7.941	5.080	1.751	0.761	0.779	0.022
KON	51	6.235	3.705	1.422	0.708	0.690	-0.030
LIP	45	6.235	3.461	1.382	0.729	0.694	-0.051
LUS	43	6.471	4.071	1.490	0.725	0.706	-0.019
MER	23	5.529	3.326	1.339	0.698	0.671	-0.035
MIN	50	7.059	4.062	1.535	0.718	0.714	-0.005
NEW	54	7.941	4.405	1.632	0.760	0.733	-0.039
SHE1	57	6.706	3.554	1.409	0.677	0.677	-0.005
SHE2	50	5.941	3.487	1.371	0.653	0.681	0.037
SHI	29	5.235	3.015	1.268	0.649	0.641	-0.017
STA	50	6.235	3.661	1.451	0.715	0.702	-0.018
TEN	23	5.176	3.204	1.295	0.679	0.653	-0.039
THO	55	5.118	3.542	1.336	0.688	0.685	-0.008
TIN	28	6.412	3.741	1.483	0.714	0.713	0.001
WAR1	50	6.882	4.248	1.574	0.749	0.748	0.001
WAR2	50	7.647	4.463	1.636	0.740	0.751	0.012
WAR3	50	6.706	4.097	1.531	0.743	0.730	-0.015
WEL1	50	7.118	4.225	1.582	0.712	0.738	0.038
WEL2	50	7.529	4.218	1.621	0.718	0.746	0.039

Примечание. N – число животных в группе, N_a – среднее число выявленных аллелей на locus (No of Different Alleles per Locus), N_e – число эффективных аллелей (No of Effective Alleles), I – индекс разнообразия Шеннона (Shannon's Information Index), H_o – наблюдаемая гетерозиготность (Observed Heterozygosity), H_e – ожидаемая гетерозиготность (Expected Heterozygosity), F_{IS} – индивидуальный индекс фиксации (Fixation Index); $^{\#}$ среднее для 16 STR-локусов (кроме LEX3).

ним из наибольших среди исследованных групп и составляет 7.941 ± 0.525 . Аналогичное значение данного показателя отмечено лишь для одной группы из оставшихся 35, а именно – для породы

Нью-Форест-пони (NEW) и составляет 7.941 ± 0.621 аллелей. Для показателя N_e , отражающего число эффективных аллелей, расчетное значение для группы KIR составило 5.080 ± 0.364 и оказа-

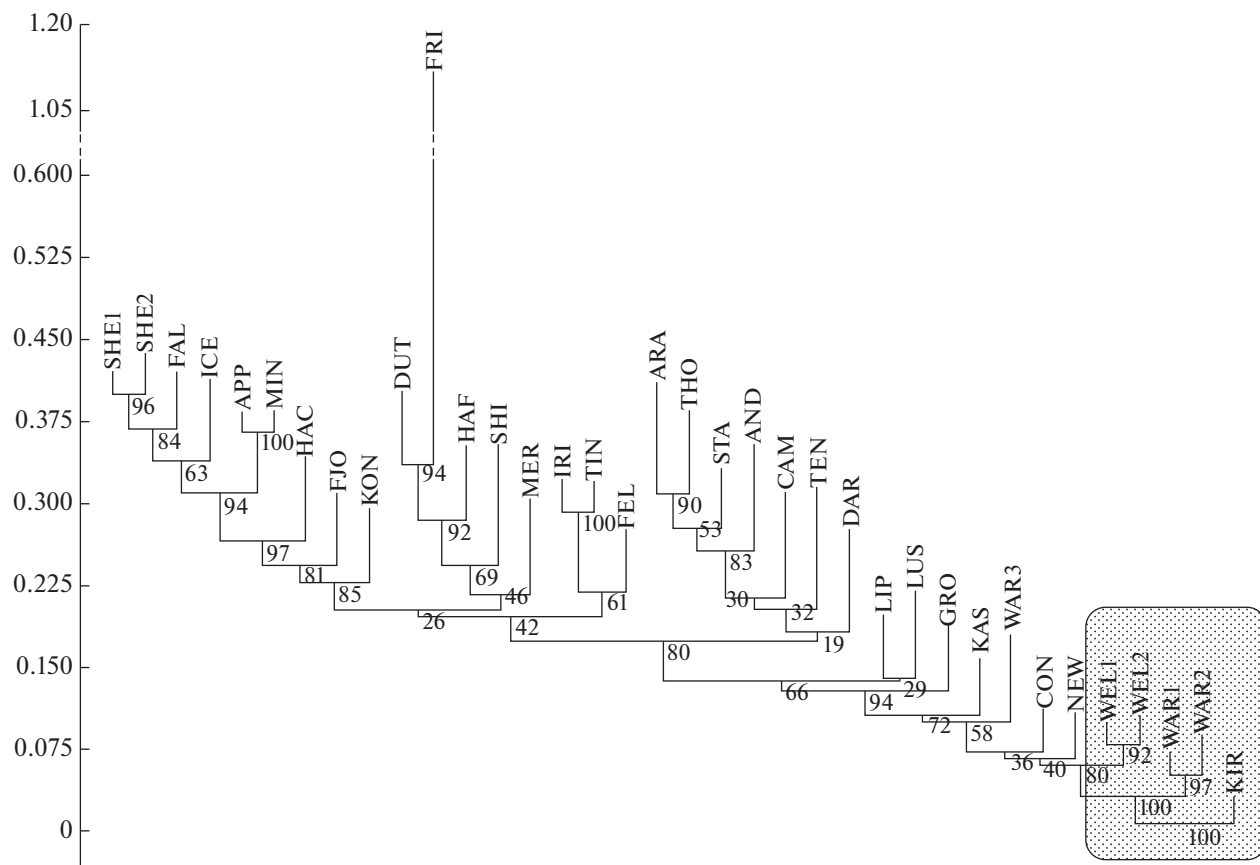


Рис. 1. Дендрограмма на основе матрицы попарных генетических дистанций F_{ST} между изучаемыми группами лошадей (по методу AMOVA).

лось также выше, чем для оставшихся групп, включая группу NEW (4.405 ± 0.380 аллеля). Таким образом, для исследуемой выборки лошадей кыргызской породы показаны высокие значения показателей N_a и N_e , это может свидетельствовать о значительном генетическом разнообразии данной породы в сравнении с другими, анализируемыми в рамках настоящего исследования, породами.

Также показано, что для кыргызской породы лошадей характерны максимальные, усредненные по 16 STR-локусам, значения ожидаемой гетерозиготности (H_e), в сравнении с оставшимися 35 группами: показатель ожидаемой гетерозиготности составил 0.779 ± 0.017 , наблюдаемой гетерозиготности (H_o) – 0.761 ± 0.029 .

Среднее арифметическое значение индекса Шеннона, отражающего сложность структуры сообщества, для группы KIR также оказалось наиболее высоким среди исследованных групп и составило 1.751 ± 0.066 . Данный факт свидетельствует о средней сложности структуры популяций исследованных кыргызских лошадей.

Таким образом, по результатам оценки среднего числа аллелей на локус (N_a), числа эффективных аллелей (N_e), уровней ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности, а также значения информационного индекса Шеннона (J) можно констатировать о высоких значениях внутрипопуляционного генетического разнообразия кыргызской породы лошадей и значительном генетическом потенциале данной породы.

Анализ субпопуляционной структуры исследуемых 36 групп лошадей, включая группу лошадей кыргызской породы, был проведен с использованием программы STRUCTURE v. 2.3.4 [12] и веб-приложения POPHELPER v. 1.0.10 [14].

Для некоторых групп лошадей, например Коннемара пони (CON), Гронингенской лошади (GRO), Каспийской лошади (KAS), Аржежского пони (MER), Нью-Форест-пони (NEW), Теннесийской прогулочной лошади (TEN), Полукровной лошади (WAR), Уэльского пони (WEL), а также для Кыргызской лошади (KIR) характерна весьма гетерогенная структура исследуемой выборки, вплоть до значения $K = 10$. Отношение $\Delta K/K$ соответствовало значениям $4.595/4$ и $4.640/8$

для CON, 1.107/6 – GRO, 1.694/4 и 2.074/10 – KAS, 1.797/4 – MER, 3.191/3 и 2.814/8 – NEW, 4.925/3 – TEN, 1.540/4 – WAR1, 2.065/6 и 2.601/8 – WAR2, 2.126/3 – WAR3, 12.835/5 и 8.642/8 – WEL1, 2.941/5 и 3.356/9 – WEL2, 6.228/8 – KIR. Данный факт может свидетельствовать, в первую очередь, о сложной и разнообразной схеме скрещивания при пороодообразовании обозначенных групп, а также о наличии значительного генетического разнообразия, которое, в свою очередь, в эволюционном контексте ассоциировано со способностью адаптироваться к условиям окружающей среды, а также с продолжающимися процессами эволюции пород.

На основе рассчитанных в GenAlEx v. 6.5 парных генетических дистанций F_{ST} (по методу AMOVA) была построена дендрограмма в программе PAST v. 3.17 (рис. 1). Оценка надежности ветвей филогенетического дерева проведена с использованием бутстрэп-анализа [17] с использованием 1000 случайных выборок.

При кластеризации изучаемых групп лошадей, основанной на рассчитанных значениях генетических дистанций методом AMOVA (рис. 1), наблюдаются некоторые закономерности. Из дендрограммы видно, что группа KIR генетически наиболее близка к группам WEL (Уэльский пони) и WAR (Полукровная лошадь) – генетическое расстояние (отн. ед.) равно 0.028 (WEL2/KIR), 0.0286 (WEL1/KIR), 0.0202 (WAR1/KIR) и 0.0205 (WAR2/KIR). В целом группа KIR располагается в субкластере с группами WAR и WEL, для которых ранее показаны высокие значения среднего числа аллелей на локус (N_a), числа эффективных аллелей (N_e), уровней ожидаемой (H_e) и наблюдаемой (H_o) гетерозиготности (табл. 1).

Таким образом, результаты проведенного нами анализа, направленного на оценку аллелофонда и генетической характеристики кыргызской породы лошадей по микросателлитным маркерам, свидетельствуют о значительном генетическом потенциале и высоком генетическом разнообразии аборигенной для Кыргызской Республики породы лошадей. Однако сохранение данного разнообразия в отдаленной перспективе может быть достигнуто только путем использования в селекционной схеме принципов рационального и эффективного природопользования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронкова В.Н. Оценка генетического разнообразия лошадей Саяно-Алтайского региона с использованием ядерных и митохондриальных ДНК маркеров: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: ИОГен, 2012. 46 с.
2. Warmuth V., Eriksson A., Bower M.A. et al. European domestic horses originated in two holocene refugia // PLoS One. 2011. V. 30. P. 1–7 (e18194). doi 10.1371/journal.pone.0018194
3. Ливанова Т.К., Ливанова М.А. Все о лошади. М.: АСТ-ПРЕСС СКД, 2002. 384 с.
4. Molecular genetic characterization of animal genetic resources // FAO Animal Production and Health Guidelines. № 9. FAO. Publ. in 2011. 85 p.
5. Столповский Ю.А. Концепция и принципы генетического мониторинга для сохранения *in situ* пород domestцированных животных // С.-х. биология. 2010. № 6. С. 3–8.
6. Olsen S.L. Early horse domestication on the Eurasian steppe // Documenting Domestication: New Genetics and Archaeological Paradigms / Eds Zeder M.A., Emshwiller E., Smith B.D., Bradley D.G. California, USA: Univ. California Press, 2006. P. 245–269.
7. Vilà C., Leonard J.A., Götherström S. et al. Widespread origins of domestic horse lineages // Science. 2001. V. 291(5503). P. 474–477. doi 10.1126/science.291.5503.474
8. Jansen T., Foster P., Levine M.A. et al. Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99(16). P. 10905–10910. doi 10.1073/pnas.152330099
9. Punar Ж., Yammo С., Perez С. Кыргызская лошадь, сохранение и использование скачки на выносливость и экотуризм. Практическое указание / Перевод А. Илиязова. Бишкек, 2007. 32 с.
10. Исакова Ж.Т., Токтосунов Б.И., Купень В.Н. и др. Генетический портрет кыргызской лошади // Коневодство и конный спорт. 2018. № 1. С. 21–23.
11. Peakall R., Peter E. Smouse GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // Bioinformatics. 2012. V. 28. P. 2537–2539. doi 10.1093/bioinformatics/bts460
12. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155(2). P. 945–959.
13. Hammer Q., Harper A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeontol. Electronica. 2001. V. 4. P. 1–9.
14. Francis R.M. POPHELPER: an R package and web app to analyse and visualize population structure // Mol. Ecol. Res. 2017. V. 17. P. 27–32. doi 10.1111/1755-0998.12509
15. Excoffier L. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among dna haplotypes: Application to human mitochondrial dna restriction data / Eds Excoffier L., Smouse P.E., Quattro J.M. // Genetics. 1992. V. 131. P. 479–491.
16. Van De Goor L.H.P., Panneman H., Van Haeringen W.A. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: allele nomenclature for 17 equine-specific STR loci // Anim. Genet. 2010. V. 41(2). P. 122–127. doi 10.1111/j.1365-2052.2009.01975.x
17. Zharkikh A. Statistical properties of bootstrap estimation of phylogenetic variability from nucleotide sequences. I. Four taxa with a molecular clock // Mol. Biol. Evol. 1992. V. 9(6). P. 1119–1147. doi 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040782

Phylogenetic Analysis of Kyrgyz Horse Using 17 Microsatellite Markers

Zh. T. Isakova^{a, *}, B. I. Toktosunov^b, V. N. Kipen^c, L. V. Kalinkova^d,
E. T. Talaibekova^a, N. M. Aldasheva^a, and A. H. Abdurasulov^b

^a*Institute of Molecular Biology and Medicine, Bishkek, 720040 Kyrgyzstan*

^b*Institute of Biotechnology of the National Academy of Sciences, Bishkek, 720071 Kyrgyzstan*

^c*Scientific and Practical Centre of the State Committee of Forensic Expertises, Minsk, 220114 Belarus*

^d*All-Russian Scientific Research Institute of Horse Breeding, Divovo, Ryazanskaya oblast, 391105 Russia*

**e-mail: jainagul@mail.ru*

The study of the genetic structure of native populations of Kyrgyz horse breeds – Kyrgyz breed, – is important for maintaining genetic diversity and improving breeding work. Based on the results of genotyping for 17 microsatellite loci recommended by the ISAG, by the method of ANOVA calculated pairwise genetic distances for horses of Kyrgyz breed in relation to 31 other breed. Horses of Kyrgyz breed are genetically closest to the Welsh pony and Warmblood horses.

Keywords: horses of Kyrgyz breed, microsatellite markers, genetic diversity, phylogenetic analysis.