

## ОЦЕНКА ГЕНЕАЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ ВЯТСКОЙ ПОРОДЫ ЛОШАДЕЙ (*Equus ferus caballus*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНАЛИЗА ДНК

© 2022 г. Л. А. Храброва<sup>1</sup>\*, Н. В. Блохина<sup>1</sup>, Н. Ф. Белоусова<sup>1</sup>, Е. Г. Котран<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства, Рязанская область, пос. Дивово, 391105 Россия

<sup>2</sup>Колледж ветеринарной медицины и биомедицинских наук Техасского университета, TX 77843 США

\*e-mail: l.khrabrova@yandex.ru

Поступила в редакцию 28.07.2021 г.

После доработки 18.09.2021 г.

Принята к публикации 28.09.2021 г.

Процесс формирования генеалогической структуры в вятской породе делает актуальной оценку ее дифференциации на генетическом уровне. В результате тестирования 293 вятских лошадей по 17 локусам микросателлитов ДНК было выявлено 136 аллелей ( $A_e = 4.11$ ,  $H_o = 0.726$ ) и дана оценка генетической дифференциации десяти линий по ряду показателей, включая индекс фиксации  $F_{st}$  (0.011–0.134). Секвенирование участка D-петли мтДНК (530 пн) показало наличие 11 гаплогрупп при высоком уровне варибельности гаплотипов в маточных семействах. Высокий уровень генетической дифференциации генеалогической структуры вятской породы лошадей является предпосылкой успешной работы по сохранению этой малочисленной автохтонной породы.

**Ключевые слова:** вятская лошадь, генеалогическая структура, микросателлиты, гаплогруппы митохондриальной ДНК.

**DOI:** 10.31857/S0016675822040063

Вятская лошадь создана с помощью метода “народной селекции” и известна с середины XIV в., относится к типу местных лесных пород. Эта уникальная отечественная порода была выведена в Вятской губернии, на современной территории Удмуртской Республики и Кировской обл., в бассейнах рек Вятка, Кама и Обва. В первой половине XIX в. тройки вятских лошадей были основным транспортом, но со временем они стали вытесняться орловскими рысаками. Уже к концу этого столетия вятку признали почти исчезнувшей породой. Попытки восстановления вятской лошади в 1930–1950-х гг. оказались нерезультативными, так как совпали с общей тенденцией сокращения численности лошадей в сельском хозяйстве. Целенаправленная работа по сохранению этой уникальной породы была начата в середине 1980-х гг. В результате обследования десятков хозяйств были отобраны наиболее типичные лошади и налажена система первичного племенного учета. Приоритетным направлением селекционной работы стало чистопородное разведение вятских лошадей на нескольких племенных фермах Удмуртии и Кировской обл. [1]. В настоящее время общая численность поголовья вятки составляет 760 лошадей, включая 250 кобыл. По современным критериям ФАО эта малочисленная порода имеет уязвимый статус, поэтому в программах по ее сохранению

целесообразно использовать генетические методы оценки биоразнообразия [2].

Молекулярные методы исследований последних десятилетий существенно расширили наши знания о генетических особенностях пород, их филогенетических связях и процессах породообразования [3–7]. Стандартизация тестирования микросателлитной ДНК лошадей под эгидой международного общества генетики животных (ISAG) позволила сопоставлять результаты тестирования разных лабораторий, необходимые как при контроле происхождения лошадей, так и при паспортизации конских пород [8, 9]. Изучение полиморфизма ядерного и митохондриального геномов у лошадей отечественных пород выявило достаточно высокий уровень генетического разнообразия даже в малочисленных популяциях, включая наличие ряда частных аллелей [10–14]. ДНК-маркеры подтвердили свою эффективность при оценке внутривидового генетического разнообразия на уровне популяций, линий и маточных семейств, характеризующего степень дифференциации генеалогической структуры породы [15–18].

Комплексные исследования полиморфизма ядерной и митохондриальной ДНК вятских лошадей ранее не проводились. Задача настоящего исследования – изучение варибельности микросателлитных локусов и последовательности D-

петли митохондриальной ДНК (мтДНК) у лошадей вятской породы, а также характеристика генетических особенностей и оценка дифференциации мужских линий и женских семейств.

Материалом для анализа микросателлитов ДНК служили пробы крови и волос 293 лошадей вятской породы, принадлежащих племенным фермам и частным владельцам. Пробы ДНК амплифицировали с праймерами “StockMarks for Horses” (“Applied Biosystems”, США) и COrDIS S550 (ООО “ГОРДИЗ”, г. Москва); оба набора включают 17 STR-локусов, рекомендованных ISAG. Электрофорез и детекцию продуктов амплификации проводили на генетическом анализаторе ABI 3130 (“Applied Biosystems”, США) с использованием программного обеспечения GeneMapper™ 4.0. Лошадей тестировали в лаборатории генетики Всероссийского НИИ коневодства ( $n = 253$ ) и Техасского университета США ( $n = 40$ ).

При характеристике генетических параметров вятской породы и ее линейной структуры учитывали общее число аллелей ( $N_a$ ), среднее число аллелей на locus ( $MN_a$ ), эффективное число аллелей ( $A_e$ ), степень наблюдаемой ( $H_o$ ) и ожидаемой ( $H_e$ ) гетерозиготности и показатель информационного полиморфизма (PIC) для каждого локуса. Генетические различия между линиями оценивали с учетом коэффициентов генетического сходства и генетических дистанций между ними по М. Nei [19] и методов  $F$ -статистики [20]. Обработку данных проводили на базе программ Excel 2010, Statistica 12 v.10 и FSTAT 1.2 ([www2.unil.ch/popgen/fstat.htm](http://www2.unil.ch/popgen/fstat.htm)).

Для секвенирования D-петли мтДНК были взяты пробы волос 22 лошадей вятской породы из основных маточных семейств. Выделенную ДНК очищали и амплифицировали с праймерами, подобранными в соответствии с референсной последовательностью ископаемой шведской лошади X79547 [21]. Амплификаты секвенировали с использованием набора BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit (PE “Applied Biosystems”, США) на анализаторе ABI 3130xl (PE “Applied Biosystems”, США) в лаборатории ООО “Генетика”, г. Москва. Для сравнительного анализа последовательностей гипервариабельного участка D-петли мтДНК использовали данные GenBank по 18 базовым гаплогруппам (A–R) с номерами доступа JN398377–JN398457, а также результаты генотирования 18 вятских лошадей (18: DQ328020–DQ328037). При филогенетическом анализе секвенированного участка D-петли мтДНК с 15471 по 16000 основание использовали модель максимального комплексного правдоподобия и 50% уровень бутстреп-поддержки достоверности построения дерева на базе программ BioEdit 7.2.1 и MEGA7.

При тестировании вятских лошадей по 17-ти STR-локусам было определено 136 аллелей, что

свидетельствует о достаточно высоком уровне вариабельности микросателлитной ДНК в этой малочисленной породе. Число аллелей в локусах варьировало от 5 до 14, наиболее широкий спектр вариантов был представлен в локусах *ASB17* (14), *AHT4* (10) и *HTG10* (10). Для генетической структуры вятской породы была характерна высокая частота встречаемости аллелей: *VHL20Q* (0.224), *AHT4P* (0.386), *HTG6O* (0.708), *ASB2N* (0.380), *HTG10M* (0.389), *HMS2H* (0.448) и *LEX3L* (0.232). В двух локусах были выявлены редкие аллели – *HTG6L* (0.002) и *AHT5P* (0.007), не встречающиеся у лошадей Западной Европы [8] (табл. 1).

Число эффективных аллелей в локусах ( $A_e$ ) менялось в широком диапазоне от 1.861 (*HTG6*) до 6.972 (*ASB17*), при среднем значении 4.105. В большинстве локусов наблюдался положительный баланс гетерозиготных генотипов, среднее значение  $F_{is}$  составило  $-0.017$ . Показатели информационного полиморфизма (PIC), характеризующие число и частоту встречаемости аллелей в локусах, изменялись в интервале 0.426–0.838 (табл. 1). Среднее значение PIC оказалось достаточно высоким (0.691), что свидетельствует об эффективности использования микросателлитных локусов в качестве генетических маркеров.

Оценка генетической дифференциации мужских линий показала, что между ними имеются различия по ряду показателей, включая спектр аллелей, уровень полиморфности, степень гетерозиготности и коэффициент фиксации (табл. 2).

Сравнительно высокие показатели уровня полиморфности и наблюдаемой гетерозиготности ( $A_e = 3.68$ ,  $H_o = 0.707$ ) были характерны для линии Знатока, тогда как пока еще малочисленная линия Воробья выделялась низкими показателями генетической изменчивости ( $A_e = 2.63$ ,  $H_o = 0.678$ ). Высокие коэффициенты фиксации, характеризующие степень дифференциации линий на фоне породы по STR-локусам, были определены для линий Радиуса (0.134), Бурана (0.115) и Воробья (0.110). Для всех линий и породы в целом были рассчитаны отрицательные значения  $F_{is}$ , что свидетельствует о сохранении равновесия Харди–Вайнберга и отсутствии внутривидового инбридинга. Коэффициенты генетического сходства между представителями разных линий варьировали в интервале 0.664–0.905, что свидетельствует о существенной линейной дифференциации и эффективности зоотехнической работы по формированию линейной структуры вятской породы.

Изучение полиморфизма гипервариабельного региона D-петли мтДНК у 40 вятских лошадей, относящихся к 18-ти маточным семействам, показало широкую индивидуальную вариабельность гаплотипов, восходящих к гаплогруппам A, B, C, J, L, M, N, P и Q по классификации А.Т. Achilli с соавт.

**Таблица 1.** Характеристика полиморфизма 17-ти STR локусов у лошадей вятской породы

Локус	$N_a$	$A_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$	PIC
VHL20	9	6.312	0.835	0.842	0.008	0.824
HTG4	6	1.973	0.522	0.493	-0.058	0.444
AHT4	10	4.128	0.768	0.758	-0.013	0.729
HMS7	7	3.672	0.731	0.728	-0.004	0.700
HTG6	7	1.861	0.463	0.463	-0.002	0.426
AHT5	8	3.901	0.785	0.744	-0.055	0.709
HMS6	5	3.932	0.778	0.746	-0.043	0.707
ASB23	9	4.533	0.801	0.779	-0.027	0.758
ASB2	9	4.222	0.784	0.763	-0.027	0.724
HTG10	10	4.695	0.798	0.787	-0.014	0.757
HTG7	5	2.669	0.655	0.625	-0.048	0.569
HMS3	7	4.782	0.760	0.791	0.039	0.767
HMS2	7	3.370	0.718	0.703	-0.021	0.651
ASB17	14	6.972	0.895	0.857	-0.045	0.838
LEX3	9	5.816	0.593	0.628	0.000	0.803
HMS1	7	3.275	0.703	0.695	-0.012	0.663
CA425	7	3.672	0.758	0.728	-0.041	0.676
В среднем на локус	8.0	4.105	0.726	0.714	-0.017	0.691

Примечание.  $N_a$  – общее число аллелей,  $A_e$  – эффективное число аллелей,  $H_e$  – теоретическая гетерозиготность,  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $F_{is}$  – уровень популяционного инбридинга,  $N_a$  – общее число аллелей в локусе, PIC – информационное значение полиморфизма.

**Таблица 2.** Характеристика полиморфизма 17-ти STR локусов в разных линиях вятских лошадей

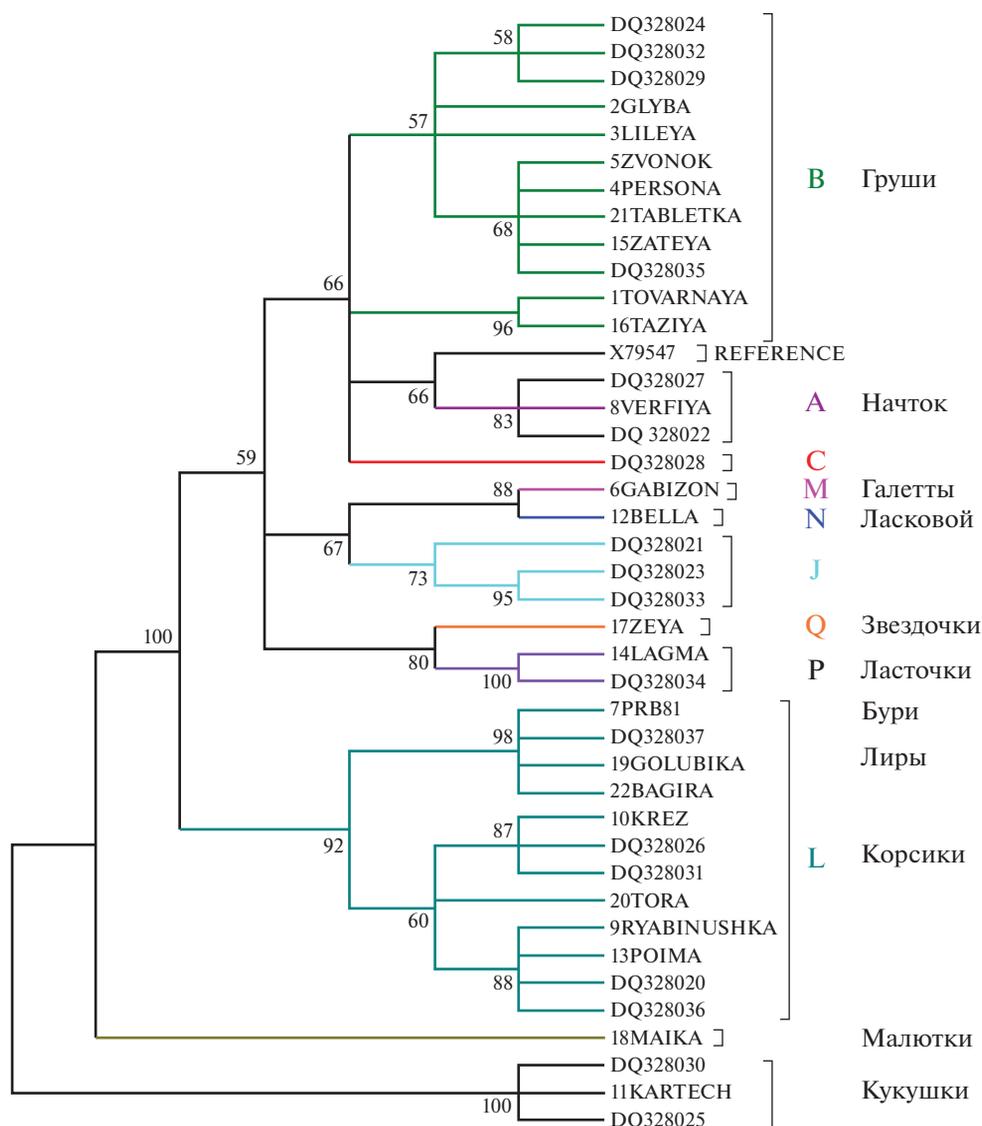
Линия	$N$	$N_a$	$MN_a$	$A_e$	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$	$F_{st}$
Боба	44	111	6.529	3.322	0.683	0.636	-0.071	0.054
Боцмана-Бубенчика	6	73	4.294	2.818	0.676	0.593	-0.139	0.122
Бурана	34	100	5.882	2.757	0.670	0.593	-0.128	0.115
Воробья	6	63	3.706	2.627	0.678	0.589	-0.149	0.113
Габизона	38	106	6.235	2.888	0.651	0.602	-0.070	0.110
Добрика	67	111	6.529	3.459	0.720	0.653	-0.098	0.032
Знатока	28	110	6.471	3.678	0.707	0.667	-0.050	0.011
Кабура	12	86	5.059	3.083	0.696	0.623	-0.111	0.075
Малахита	11	75	4.412	3.047	0.727	0.610	-0.189	0.087
Радиуса	17	91	5.353	3.263	0.639	0.600	-0.065	0.134
В среднем по линиям	26	92.6	5.447	3.094	0.685	0.617	-0.107	0.085

Примечание.  $N_a$  – общее число аллелей,  $MN_a$  – среднее число аллелей на локус,  $A_e$  – эффективное число аллелей,  $H_e$  – теоретически ожидаемая гетерозиготность,  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $F_{is}$  – уровень популяционного инбридинга,  $F_{st}$  – коэффициент фиксации.

[6]. Дополнительно к этому семейства Кукушки и Малютки продемонстрировали два новых уникальных ответвления гаплогрупп, не описанных ранее (рис. 1).

Проанализированный участок митохондриального генома вятских лошадей размером 530 пн

включал 69 нуклеотидных замен, представленных преимущественно трансверсиями, при этом коэффициент нуклеотидных замен Rsi/sv составил 0.5. Среднее число замен на сайт достигло  $0.13 \pm 0.0118$ , что указывает на сравнительно высокий уровень индивидуального разнообразия в этой породе.



**Рис. 1.** Филогенетическое дерево гаплогрупп мтДНК лошадей вятской породы, построенное по методу Neighbor-Joining при бутстреп-поддержке >50%.

Результаты анализа матрилинейной структуры породы свидетельствуют, что 9 из 18 маточных семейств (50%) являются обладателями “фамильной” гаплогруппы мтДНК, которая может служить генетическим маркером конкретной женской линии. Было установлено, что кобылы семейства Ветки, относящиеся к гаплогруппе А, имели отдаленное родство с ископаемой шведской лошастью, представленной референсной последовательностью X79547 [21]. В отличие от лошадей владимирской породы [22], сформированной в центральной части России, у вяток были дополнительно определены С и Q гаплогруппы мтДНК, указывающие на наличие и азиатских корней в их происхождении.

В структуре митохондриального генома вяток преобладала гаплогруппа L (27.8%), объединяющая пять маточных семейств (Бури, Зуры, Корсики, Лиры и Пумы), при этом было определено близкое родство кобыл-основательниц Зуры и Пумы по материнской линии. Кластер гаплогруппы В включал семейства Груши и Начток, представленные двумя отдельными подгруппами (рис. 1).

Попытка использования анализа мтДНК для уточнения происхождения трех типичных вятских кобыл с неправильно указанным происхождением оказалась результативной и позволила установить их принадлежность к конкретному семейству. У кобылы Тора был определен гаплотип, типичный для семейства Корсики и гаплогруппы L. Кобыла Таб-

летка вошла в кластер, образованный семейством Груши (гаплогруппа В). Кобыла Багира (гаплогруппа L) примкнула к семейству Лиры при высоком уровне бутстреп-поддержки (98%).

В настоящее время сформирована база данных генетических маркеров лошадей вятской породы, что позволяет эффективно вести контроль происхождения по микросателлитам ДНК и оценивать ресурсы внутривидового разнообразия. Проведенный молекулярно-генетический анализ вятской породы лошадей на базе 17-ти микросателлитных локусов и мтДНК свидетельствует о достаточно высоком уровне геномного разнообразия и отсутствии внутривидового инбридинга. Установленные различия между лошадьми десяти разных линий по спектру аллелей, уровню гетерозиготности и коэффициентам генетического сходства, свидетельствуют о продуктивной зоотехнической работе по формированию генеалогической структуры, являющейся основой внутривидового гетерозиса. Изучена матрилинейная структура породы, представленная 40 гаплотипами и 11 гаплогруппами мтДНК, свидетельствующими об участии в процессе образования вятской лошади женских предков азиатского происхождения.

Мы благодарим канд. с.-х. наук С.И. Сорокина (Лаборатория HorseGene, Москва) за помощь в лабораторных анализах мтДНК.

Исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 19-76-20058).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусова Н.Ф. История, современность и проблемы северных лесных пород лошадей России // Аборигенные породы лошадей: их роль и место в коневодстве РФ. I Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. Ижевск: Ижевская ГСХА, 2016. С. 8–22.
2. The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: 2015. 784 p.
3. Jansen T., Foster P., Levine M.A. et al. Mitochondrial DNA and the origin of the domestic horse // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 99. № 16. P. 10905–10910. <https://doi.org/10.1073/pnas.152330099>
4. McGahern M.A., Bower A., Edwards C.J. et al. Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA in eastern horse populations // Animal Genet. 2006. V. 37. № 5. P. 494–497.
5. Cieslak M., Pruvost M., Benecke N. et al. Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses // PLoS One. 2010. V. 5. № 12. e15311. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015311.t002>
6. Achilli A., Olivieri A., Soares P. et al. Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication // PNAS. 2012. V. 109. № 7. P. 2449–2454.
7. Khanshour A.M., Cothran E.G. Maternal phylogenetic relationships and genetic variation among Arabian horse populations using whole mitochondrial DNA D-loop sequencing // BMC Genetics. 2013. V. 1. P. 14–83. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-83>
8. Van de Goor L.H.P., van Haeringen W.A. A proposal for standardization in forensic equine DNA typing: Allele nomenclature for equine-specific STR loci // Animal Genet. 2010. V. 41. № 2. P. 122–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01975.x>
9. Warmuth V., Manica A., Eriksson A. et al. Autosomal genetic diversity in non-breed horses from eastern Eurasia provides insights into historical population movements // Animal Genet. 2012. V. 44. № 1. P. 53–61. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2012.02371.x>
10. Калашиников В.В., Храброва Л.А., Зайцев А.М. и др. Изучение полиморфизма сателлитной ДНК лошадей заводских и местных пород // Докл. РАСХН. 2010. № 6. С. 48–50.
11. Khrabrova L.A. Characterization of Genetic Horse Breeding Resources in Russia. Saarbruchen, Germany. Lap Lambert Acad. Publ., OmniScriptum GmbH & Co. KG, 2015. 68 p.
12. Воронкова В.Н., Столповский Ю.А. Оценка генетического разнообразия аборигенных пород Саяно-Алтайского региона с использованием ядерных и митохондриальных ДНК-маркеров // Аборигенное коневодство России: история, современность, перспективы. Сб. науч. тр. Архангельск: 2018. С. 60–69.
13. Юрьева И.Б., Свищева Г.Р., Вдовина В.Н. и др. Генетическое разнообразие мезенской породы лошадей (*Equus ferus caballus*) по микросателлитной ДНК // Генетика. 2018. Т. 54. Прилож. С. 564–569.
14. Khaudov A.D., Duduev A.S., Kokov Z.A. et al. Genetic analysis of maternal and paternal lineages in Kabardian horses by uniparental molecular markers // Open Vet. J. 2018. V. 8. № 1. P. 40–46. <https://doi.org/10.4314/ovj.v8i1.7>
15. Hill E.W., Bradley M., Al-Barody M. et al. History and integrity of Thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation // Anim. Genet. 2002. V. 33. № 4. P. 287–294.
16. Lopes M.S., Mendonca D., Cymbron T. et al. The Lusitano horse maternal lineage based on mitochondrial D-loop sequence variation // Anim. Genet. 2006. V. 36. № 3. P. 196–202. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.01279.x>
17. Храброва Л.А., Блохина Н.В., Сулейманов О.И. и др. Оценка линейной дифференциации в чистокровной верховой породе лошадей с использованием локусов микросателлитов ДНК // Вавилов. журн. генет. и селекции. 2019. Т. 23. № 5. С. 569–574. <https://doi.org/10.18699/VJ19.526>
18. Khrabrova L.A., Zaitsev M.A., Vikulova L.L. et al. MtDNA haplotype analysis in dam families of the Thoroughbred

- riding horses // Proc. Conf. Modern Trends in Agricultural Production in the World Economy. 2020. P. 34–42.  
<https://doi.org/10.32743/kuz.agri.2020.34-42>
19. Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N.Y.: Columbia Univ. press, 1987. 512 p.
20. Вейр Б. Анализ генетических данных. М.: Мир, 1995. 399 с.
21. Xu X., Arnason U. The complete mitochondrial DNA sequence of the horse *Equus caballus*: Extensive heteroplasmy of control region // Gene. 1994. V. 1480. P. 357–362.
22. Сорокин С.И. Молекулярно-генетический анализ петли митохондриальной ДНК представителей маточных семейств владимирской породы // Ковеводство и конный спорт. 2015. № 6. С. 27–29.

## Estimation of the Genealogical Structure of Vyatskaya Horse Breed (*Equus ferus caballus*) Using DNA Analysis

L. A. Khrabrova<sup>a, \*</sup>, N. V. Blohina<sup>a</sup>, N. F. Belousova<sup>a</sup>, and E. G. Cothran<sup>b</sup>

<sup>a</sup>All-Russian Research Institute for Horse Breeding, Ryazan obl., Divovo, 391105 Russia

<sup>b</sup>Texas A&M University College Station, TX 77843 USA

\*e-mail: l.khrabrova@yandex.ru

The process of forming a genealogical structure in the Vyatka breed makes it relevant to assess its differentiation at the genetic level. As a result of testing 293 Vyatka horses at 17 DNA microsatellite loci, 136 alleles were identified ( $A_e = 4.11$ ,  $H_o = 0.726$ ) and the genetic differentiation of 10 lines was assessed for a number of indicators, including the fixation index  $F_{st}$  (0.011–0.134). Sequencing of the mtDNA D-loop region (530 bp) showed the presence of 11 haplogroups with a high level of haplotype variability in family lines. The high level of genetic differentiation of the genealogical structure of the Vyatka horse breed is a prerequisite for successful work to preserve this unique small population.

**Keywords:** Vyatka horse, genealogical structure, microsatellites, haplogroups mtDNA.