

УДК 575.174.015.3

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И СТРУКТУРЫ АВТОХТОННЫХ ПОРОД ЛОШАДЕЙ РОССИИ И МОНГОЛИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

© 2022 г. В. Н. Воронкова^{1, *}, Э. А. Николаева¹, А. К. Пискунов¹, О. В. Бабаян², М. Takasu³,
Т. Tozaki⁴, Г. Р. Свищева^{1, 5}, Ю. А. Столповский¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²ООО “Гордиз”, Москва, 121205 Россия

³Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu, Japan

⁴Genetic Analysis Department, Laboratory of Racing Chemistry, Tochigi, Japan

⁵Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: valery.voronkova@gmail.com

Поступила в редакцию 01.03.2022 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

С использованием микросателлитного анализа по 17 локусам исследовано 866 лошадей из девяти пород: алтайской, тувинской, кушумской, печорской, мезенской, забайкальской, бурятской, русской верховой и монгольской. Уровень наблюдаемой гетерозиготности исследованных пород находится на высоком, не вызывающем опасения уровне (от 0.699 до 0.798). Суммарно было выявлено 183 аллеля, в том числе 15 частных. У монгольских лошадей породы Тэс в локусе АНТ4 обнаружен редкий аллель D, а также ранее неописанный аллель. Показаны филогенетические взаимоотношения, структура и взаимное влияние генофондов лошадей Монголии и России. Анализ полиморфизма контрольного региона D-петли мтДНК у 142 лошадей позволил вывить 16 гаплотипов, из них четыре, обнаруженные у монгольской, бурятской, забайкальской и тувинской пород, встречались прежде только в образцах древних лошадей Европы и Азии. Наиболее распространенными среди изученных пород оказались гаплотипы X2 и D3. Подтверждена гипотеза о том, что большинство гаплотипов мтДНК не привязаны к определенной породе или географической области. В популяциях лошадей различаются лишь набор и частоты гаплотипов. Вероятно, это связано с многократными событиями доместикиации, благодаря которым мтДНК лошадей так высокополиморфна, а также с активным перемещением лошадей в мире и их селекционной историей.

Ключевые слова: лошади, *Equus caballus*, аборигенная порода, сохранение биоразнообразия, генетический мониторинг, микросателлитный анализ, генетическое разнообразие, филогенетические отношения, D-петля, мтДНК.

DOI: 10.31857/S0016675822080100

На территории Российской Федерации сохранилось всего 16 аборигенных пород лошадей, созданных в течение столетий методами народной селекции под прессом давления суровых геоклиматических условий самых разных регионов нашей страны [1]. Синтез искусственного и естественного отбора позволил получить животных универсального назначения (мясного, молочного и пользовательского), хорошо адаптированных к круглогодичному пастбищному и культурно-табунному содержанию в лесных, горных и степных ландшафтах. Однако в настоящее время многие из них оказались близки к исчезновению и под-

держиваются лишь усилиями энтузиастов и местных жителей, сохраняющих традиционный уклад жизни.

Алтайская лошадь прекрасно приспособлена к горным условиям обитания. У нее прочные копыта, более сухие и крепкие конечности, чем у степных пород. Масти встречаются разнообразные (гнедая, рыжая, чубарая, серая, вороная, пегая) [1]. Тувинская лошадь, разводимая веками в условиях резко континентального климата при табунном содержании, приобрела ряд существенных внутренних биологических адаптивных качеств. К числу этих особенностей следует отнести хорошую плодови-

тость, способность лошадей к наживровке, хорошую мясность, выжеребку кобыл в оптимальные сроки [2]. Характерными чертами экстерьера тувинских лошадей являются длинное туловище, короткие костистые ноги, массивная голова. Преобладают масти гнедая, рыжая разных оттенков, серая, саврасая, пегая.

Типичным представителем степных лошадей России, родственной монгольской породе, является бурятская лошадь. Бурятская лошадь относится к самым низкорослым лошадям Сибири (высота в холке 130–133 см), но отличается массивным телосложением. Масти бурятских лошадей чаще всего гнедая, рыжая, серая, саврасая. Бурятская лошадь хорошо приспособлена к пастбищному содержанию на скудном травостое в течение года в условиях резко континентального климата Забайкалья, где морозы достигают -50°C .

Забайкальская лошадь отлично приспособлена к местным суровым природно-климатическим условиям, хорошо использует пастбища, быстро набирает подкожные запасы жира, в холодное время года обрастает обильным волосным покровом. Современная взрослая забайкальская лошадь имеет высоту в холке 135–140 см. Масти – в основном буланая, гнедая, рыжая, мышастая, саврасая, серая, пегая, чубарая.

Печорская лошадь относится к лесному типу, приспособлена к морозам и глубоким сугробам. Благодаря густому шерстному покрову и плотной коже устойчива к гнусу. Масти встречаются в основном темные: рыжая, гнедая, вороная, караковая, редко серая и буланая. Находится в критическом состоянии из-за низкой численности (<100 конематок) и отсутствия племенной работы [1].

Мезенская – местная порода лошадей северного лесного типа. Создана в Архангельской области. Животные хорошо переносят холод, прекрасно ориентируются в ненастье, неприхотливы к условиям кормления и содержания, не боятся гнуса, отличаются хорошими нагульными качествами. Свободно передвигаются по глубокому снегу и вязкой почве. Масти: гнедая, вороная, рыжая, серая, мышастая, чалая, соловая. У большинства встречается темный ремень по спине [3]. Благодаря активной племенной работе находится вне риска исчезновения [4].

Старинная вятская порода лошадей, известная своими упряжными тройками, была дважды за XX век практически утрачена, но большая работа по сохранению данной породы позволила сохранить их уникальный генофонд [1]. Вятская лошадь также относится к северному лесному типу, имеет крепкую конституцию и рост в холке до 150 см. Масти характерны в основном саврасые: гнедо-саврасая, мышастая, каурая, булано-саврасая. Типичны темный ремень вдоль позвоночника и потемнения на

шее, холке и плечах, встречается зеброидность на конечностях.

Кушумская порода обладает высокой мясо-молочной продуктивностью и хорошей приспособленностью к кругло-годовому пастбищно-тебеневочному содержанию. Масти преимущественно гнедая, рыжая, бурая, вороная, редко буланая и соловая [1].

Русские верховые лошади относятся к заводским породам спортивного направления. Для русской верховой характерны сухая, крепкая конституция и вороная, караковая, темно-гнедая, гнедая и рыжая масти. Большинство жеребцов-производителей основного центра репродукции – Старожиловского конного завода – имеют рост около 170 см и выше, кобылы маточного состава в среднем 166 см [5].

Монгольские лошади Тэс разводятся в аймаках Увс, Хубсугул и Завхан Монголии. Порода хорошо приспособлена к холодному климату и круглогодичному пастбищному содержанию. Большинство животных имеют гнедую, рыжую и бурую масти. От других пород ее отличают темная густая длинная грива и хвост. У лошадей Тэс сильно развиты грудь и ноги. Они сильны, выносливы и быстры, главное умеют тебеневать. Любопытный факт: в критические моменты гололедицы и джута лошади нередко спасают от гибели стада овец и КРС [6].

Лошади Дархат разводятся одноименной породностью в районе аймака Хубсугул. Дархатская порода отлично приспособлена к условиям высокогорной тайги с экстремальными перепадами температур в течение года. Масть преимущественно серая [6].

В настоящее время во всем мире для сохранения пород лошадей, изучения их происхождения и поддержания высокого уровня генетического разнообразия внутри популяций широко используются микросателлиты (STR) и маркеры, основанные на нуклеотидном полиморфизме различных участков геномной ДНК и мтДНК. Отечественные породы лошадей, особенно аборигенные, недостаточно изучены с использованием молекулярно-генетических подходов, однако именно они сильнее всего нуждаются в оценке уровня генетического разнообразия, степени инбридинга и других параметров, отражающих генетическое благополучие породы и позволяющих определить статус и риски.

Микросателлитные повторы и некодирующие участки митохондриальной ДНК хорошо зарекомендовали себя как маркеры в изучении генетического разнообразия. Они варибельны, не несут функциональной нагрузки, их комбинации содержат много уникальных сочетаний, которые позволяют устанавливать филогенетические отношения и рассчитывать стандартные популяционно-генетические параметры (число и частоты аллелей, уровни наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, индекс фиксации и др.). Поскольку

статистические методы для анализа маркерных данных основаны на сравнении вероятностных моделей, их интерпретация возможна только в контексте сравнения имеющихся баз данных. Ниже мы приводим результаты анализа опубликованных ранее исследований полиморфизма микросателлитных локусов у различных пород лошадей.

С помощью микросателлитных маркеров были исследованы породы лошадей по всему миру. Использование пересекающихся наборов маркеров позволяет численно сравнивать рассчитываемые параметры генетических оценок между популяциями. Было показано, что наблюдаемая гетерозиготность у четырех аборигенных испанских пород лошадей (0.736 ± 0.025) выше, чем у 10 заводских американских пород (0.694 ± 0.032) и четырех норвежских (0.641 ± 0.060) [7]. В целом для испанских пород отмечен высокий уровень H_o (от 0.700 до 0.752) [8]. Уровень наблюдаемой гетерозиготности у португальской породы пони гаррано составил 0.732 [9], у породы соррайа – 0.506 [10].

Исследование генетического разнообразия 11 средиземноморских пород лошадей по 12 микросателлитным локусам показало, что уровень гетерозиготности колеблется от 0.690 до 0.795. Самый низкий уровень гетерозиготности наблюдался у испанской чистокровной, португальской лузитано и сицилийских популяций лошадей [11].

Самый высокий уровень наблюдаемой гетерозиготности при изучении 20 микросателлитных локусов азиатских пород был получен в популяциях монгольских лошадей (от 0.750 до 0.770). Напротив, японские аборигенные породы отличались низким уровнем генетического разнообразия, по-видимому связанным с малым числом особей в популяциях. Все аллели, обнаруженные у японских пород, встречаются у монгольской лошади. Это позволило авторам работы [12] выдвинуть гипотезу о происхождении японских пород от монгольской лошади. Исследование семи японских аборигенных пород другой группой ученых [13] также выявило низкий уровень полиморфизма по сравнению с другими породами. Были изучены 318 местных и иностранных пород с использованием микросателлитных маркеров и мтДНК. Среди аборигенных пород уровень наблюдаемой гетерозиготности колебался от 0.437 до 0.682. Это значительно ниже значений, полученных для монгольской (0.794), чистокровной верховой (0.711), бретонской (0.735) и першерона (0.688). Низкий уровень разнообразия аборигенных японских пород ученые связывают со значительным снижением численности популяции, произошедшим в XIX в. [13–15].

В России с помощью 17 микросателлитных локусов у лошадей 12 местных пород было протестировано 184 STR-маркера. Число аллелей в микросателлитных локусах варьировало от двух

(HTG6 у печорской лошади) до 14 (ASB17 у алтайской лошади) и в среднем составило 6.82 на локус. Вариабельность общего числа аллелей, определенных в STR-локусах, менялась от 93 до 141, соответственно бурятская и башкирская породы. Число частных микросателлитных аллелей в популяциях варьировало от нуля (бурятская, забайкальская, тувинская и хакасская лошади) до четырех (башкирская лошадь). При этом уникальные STR-аллели были зарегистрированы у лошадей большинства местных пород, включая башкирскую, мезенскую, алтайскую, вятскую, якутскую, печорскую, а также монгольских лошадей и шетлендских пони [16].

Анализ мтДНК является ценным источником информации о происхождении и эволюции видов и популяций. Небольшой размер при консервативности структуры делают анализ мтДНК весьма эффективным методом установления филогенетических отношений [17]. Высокий уровень разнообразия гаплотипов мтДНК лошадей объясняется теорией о неоднократном одомашнивании разных материнских линий лошадей [18]. Согласно модели одомашнивания, предложенной Клаттон-Брок [19], дикие предки, от которых произошли все породы домашних животных, обитали на равнинах Южной России от Украины до Туркестана. Самые ранние прирученные лошади распространились из этой области, образовав в результате искусственного отбора разнообразные типы и породы лошадей [20]. Впоследствии были получены данные, свидетельствующие о том, что распределение гаплотипов мтДНК не связано с географическим ареалом и породной принадлежностью [13]. Однако другой группой ученых была высказана противоположная гипотеза: среди 25 азиатских и европейских пород лошадей выявлено 97 митотипов, сгруппированных в 17 филогенетических кластеров, некоторые из которых соответствовали определенному ареалу обитания или породе [21]. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа гаплогрупп мтДНК лошадей из трех обширных географических регионов (Дальний Восток, Ближний Восток и Европа) [22], позволило выявить пять кластеров, схожих с полученными в работе [18]. Анализ молекулярного разнообразия (AMOVA) нуклеотидных последовательностей лошадей, разделенных на две группы (западную и азиатскую), позволил выявить значимые различия ($P = 0.00782$) между данными группами, а также внутри азиатской группы, что соответствовало географическому распределению выборок. Авторы работы [23] считают, что более детальное изучение азиатских пород лошадей, которые не испытывали на себе воздействия селекции и прилития крови других пород, может пролить свет на происхождение, формирование генетической структуры и собственно процесс доместикировки лошади.

Таблица 1. Описание исследованных популяций

Название породы	Название популяции	Код	Число особей
Алтайская	Чингиз	AltChin	40
Тувинская	Ирбис	TuvaIrb	60
	Байлак	BaiLak	60
	Байдаг	Baidag	60
	Кошкорлыг	Koshkor	40
	Арыг-Хем	Aryghem	60
Кушумская	Итиль	KushItil	21
Печорская	Печорская	Pechor	19
Мезенская	Мезенская	Mesen	124
Забайкальская	Забайкальская	BayBur	40
Бурятская	Бурятская	Buryat	51
Монгольская	Дархат	MoDark	48
	Тэс	MonTes	50
	Гоби	Gobi	40
Русская верховая	Русская верховая	RusVer	153
		Vcero	866

С целью изучения материнской наследственности японской породы лошадей кисо [24], находящейся на грани вымирания (150 особей), был проведен анализ D-петли мтДНК и выявлено семь гаплотипов (K1–K7). Число гаплотипов породы кисо ниже, чем у пород лузитано (27), липицианской (37), арабской (27), но выше, чем у многих иберийских, южно- и североамериканских пород (2–6 гаплотипа, в среднем 3.8). Небольшое число гаплотипов авторы работы [24] объясняют низкой численностью и эффектом “бутылочного горлышка”, который порода пережила в 1970 г. В породе йонагуни были обнаружены два гаплотипа [14], а у островной породы мийако – всего один гаплотип; идентичный гаплотип встречается в породах токара и йонагуни [15].

Цель нашего исследования состояла в проведении сравнительного анализа генетического разнообразия отечественных и монгольских пород лошадей с использованием ядерных и митохондриальных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал для данной работы был получен в ходе экспедиций на Алтай и в Монголию, а также из крио-банка образцов лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН. С соблюдением этических и ветеринарных норм была собрана коллек-

ция цельной крови в пробирках с K3 ЭДТА Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) от 15 выборок лошадей из девяти пород (алтайская, тувинская, кушумская, печорская, мезенская, бурятская, забайкальская, русская верховая и монгольская). Выделение ДНК осуществлялось с использованием набора MagnaPure 200 (Изоген, Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя. Всего было получено 866 образцов ДНК. Названия исследованных выборок соответствуют породе, географическому расположению или названию предоставившего материал фермерского хозяйства. Описание выборок представлено в табл. 1.

Оценка концентрации ДНК проводилась с использованием прибора ImplenNanoPhotometerNP80 и в среднем составляла 73.7 нг/мкл для полученных образцов.

Мультиплексный анализ проведен с помощью панели, которая состоит из 17 STR-локусов (AHT4, AHT5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, HTG4, HTG6, HTG7, HTG10, LEX3 и VHL20). Использована микросателлитная панель, созданная компанией “Гордиз” (Москва), на основе одобренных в ISAG (International Society for Animal Genetics) локусов. Для определения длин аллелей микросателлитов использован генетический анализатор ABI3130xl (Applied Biosystems, США) и программное обеспечение GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems).

Таблица 2. Число аллелей в исследованных популяциях

AltChin	TuvaIrb	BaiLak	Baidag	Koshkor	Aryghem	KushItil	Pechor
126	140	131	144	133	138	119	100
Mesen	BayBur	Buryat	MoDark	MonTes	Gobi	RusVer	Всего
126	131	123	122	152	136	118	183

Для амплификации гипервариабельного участка контрольного региона мтДНК использовали праймеры Eq1F (CCCTGAAGAAAGAACCAGATG) и Eq1R (GAGTCCCTGTAGTATATCGCA). Амплификацию проводили в следующем режиме: начальная денатурация – 2 мин при 95°C, денатурация 30 с при 95°C, отжиг 30 с при 58°C, синтез 1 мин при 72°C. Финальный синтез 10 мин при 72°C. Число циклов – 35.

Для очистки продуктов ПЦР контрольного региона мтДНК их фракционировали в 1%-ном агарозном геле (смесь 1 : 1 легко- и тугоплавкой агарозы) с использованием в качестве маркера молекулярных масс 1kb DNA LadderPlus (GeneRuler™). Экстракцию продуктов ПЦР из геля проводили с использованием набора Get Quick Gel Extraction Spin Kit/250 (Genomed™) по методике производителя.

Определение нуклеотидной последовательности в исследуемом фрагменте проводили методом автоматического секвенирования на генетическом анализаторе ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США) с использованием наборов BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem). При секвенировании каждая последовательность считывалась с обоих концов. Длина амплифицированного участка составляет 516 пн (в области 15341–15857 пн D-петли мтДНК). После обработки длина полученных нуклеотидных последовательностей составила 398 пн (15399–15797 пн, нумерация соответствует референтной последовательности мтДНК NC_001640, GenBank). Полученные нами нуклеотидные последовательности зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами JQ936335–JQ936476.

Для оценки уровня генетического разнообразия в программе GenAlEx [25] были рассчитаны следующие показатели: наблюдаемая (H_o), ожидаемая (H_e) и несмещенная ожидаемая гетерозиготность (uH_e) (Nei, 1978), среднее число аллелей на локус (N_a), число эффективных аллелей на локус (N_e) и индекс фиксации (F_{is}). Генетические расстояния между популяционными выборками вычисляли как парные значения Jost's D [26], с помощью функции pairwise_D() из R-пакета mmod [27].

Выравнивание последовательностей гипервариабельного района мтДНК осуществляли при помощи программы ClustalW с использованием

программы ChromasPro Technelysium Pty Ltd (version 1.34). Для обработки данных нуклеотидных последовательностей использовали также программный пакет DNASTAR Lasergene (version 7.0.0). Для статистической обработки была использована программа Arlequin (version 3.5.1.2). Построение дендрограммы и частичная статистическая обработка данных были осуществлены в программе MEGA (version 5.05). Дендрограмма генетического сходства была построена методом ближайшего соседа (neighbour-joining) по числу различий (number of differences). Построение сети Neighbor-Net осуществлялось в программе SplitsTree 4.10 по генетическим расстояниям Jukes & Cantor. Для построения медианной сети была использована программа Network 4.6.1.0 и DNA Alignment 1.3.1.1 (Fluxus Technology Ltd, Великобритания) для создания выравнивания в rdf-формате.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для 15 исследованных выборок девяти пород лошадей ($n = 866$) с использованием стандартной микросателлитной панели из 17 локусов было выявлено 183 аллеля, которые представлены в табл. 2.

Для всех исследованных популяций характерна высокая представленность различных аллелей (от 100 до 152 у печорской и монгольской Тэс соответственно). Данная информация подтверждает общепризнанный факт, что локальные породы обладают повышенным генетическим разнообразием при достаточной для нормального разведения численности (табл. 2). Например, у заводской русской верховой породы число аллелей (118) невелико относительно размера выборки (153), что косвенно свидетельствует о снижении разнообразия вследствие давления селекции. Для сравнения среди 34 пород лошадей, разводимых во Франции, число аллелей для разных выборок варьировало от 119 до 255 [28].

Наибольшее число аллелей было обнаружено для локусов ASB17 (21) и ASB23 (15), а наименьшее – для локуса HTG7 (6) (табл. 3).

Выявлено 15 частных аллелей для следующих выборок и пород: монгольские Тэс, Гоби и Дархат; тувинские Байдаг, Арыг-хем, Ирбис, Кошкорлыг; алтайская Чингиз; кушумская Итиль; мезенская. Наибольшее число частных аллелей (породо-специфичных) было выявлено среди лошадей ту-

Таблица 3. Число аллелей на локус

VHL20	HTG4	АНТ4	HMS7	HTG6	АНТ5	HMS6	ASB23	CA425
11	7	12	8	10	11	7	15	10
ASB2	HTG10	HTG7	HMS3	HMS2	ASB17	LEX3	HMS1	Всего
12	12	6	9	12	21	13	7	183

винской (6), монгольской (5) и алтайской (2) пород. Не было обнаружено частных аллелей для представителей русской верховой, печорской, бурятской и забайкальской пород, что может свидетельствовать о снижении генетического разнообразия или являться следствием небольшого размера выборки (кроме русской верховой).

Следует отметить, что в монгольской популяции лошадей породы Тэс в локусе АНТ4 был выявлен редкий аллель D, а также впервые обнаружен аллель длиной в два повтора или с возможной делецией вне области повтора. Его размер составил 124 пн.

В табл. 4 представлены популяционно-генетические параметры для исследуемых выборок лошадей. Наиболее низкое число различных аллелей было отмечено у печорской (5.882) и русской верховой (6.941). Численность конематок печорской породы на данный момент ниже 100 голов, что отражается в относительно невысоком числе аллелей, а также в относительно низком значении индекса Шеннона (1.489). Уровень наблюдаемой гетерозиготности у всех исследуемых выборок оказался сравнительно высоким, в том числе у печорской (0.700) и русской верховой пород (0.699). Однако в работе 2008 г. Храбровой и Зайцева значение данного параметра для печорской породы было выше (0.726) [16]. Это может свидетельствовать о негативных процессах, происходящих в породе, таких как снижение численности поголовья и уровня генетического разнообразия. Уровни наиболее высокой наблюдаемой гетерозиготности среди всех изученных пород зафиксированы в тувинской выборке Кошкорлыг (0.798) и у забайкальской породы (0.767). Сравнение полученных нами данных с результатами предыдущих исследований [16] позволяет оценить изменения параметров в динамике. По результатам мониторинга уровень наблюдаемой гетерозиготности тувинской и забайкальской пород возрос (0.748 и 0.732 соответственно), так же как у мезенской (от 0.693 до 0.703) и бурятской (от 0.694 до 0.735). Несмотря на одинаковый метод анализа, данная оценка уровней наблюдаемой гетерозиготности может варьировать в связи с различным объемом выборок и репрезентативностью генеральной совокупности, в данном случае породы.

Наибольшие значения индекса фиксации F (0.055) были получены для монгольской популя-

ции Тэс, наименьшие – для тувинской Кошкорлыг (–0.033). При схожем типе содержания данных двух выборок, по-видимому, существуют факторы, которые приводят к снижению числа гетерозигот в первом случае и увеличению во втором, возможно связанные с особенностью среды обитания или отбором.

Более половины (51%) различий генетического разнообразия среди исследуемых выборок был обеспечен на уровне особей, вклад различий между индивидами и между популяциями находился на уровне 25 и 24% соответственно (табл. 5).

Наибольшие значения коэффициентов инбридинга (F_{mean} , рис. 1) были получены для русской верховой и кушумской Итиль, что свидетельствует о снижении уровня генетического разнообразия в этих породах. Небольшие значения коэффициентов инбридинга у тувинской породы лошадей (выборки Байдаг, Кошкорлыг и Арыг-Хем), а также у алтайской и забайкальской пород отражают благополучную селекционную ситуацию и высокий уровень генетического разнообразия.

Наибольшие генетические расстояния (рис. 2) выявлены между русской верховой и монгольской Дархат (0.31), а наименьшие расстояния – между монгольскими Тэс и Гоби (0.05), а также между монгольской Тэс и тувинской Ирбис (0.05). Мезенская и русская верховая породы в целом отличаются наибольшим генетическим расстоянием от других пород.

Исследуемые выборки лошадей разводят в различных географических и климатических областях России и Монголии, где они используются в качестве рабочих и верховых лошадей, а также для получения молока и мяса. Различные условия обитания и цели использования отражаются в особенностях группировки популяций по кладам дендрограммы (рис. 3). Среди исследованных пород русская верховая – единственная выведенная человеком специально для верховой езды порода. Ее объединение в общую кладу с тувинской Арыг-Хем может свидетельствовать об общих предках применявшихся в СССР пород улучшателей. Хорошо известно, что для улучшения верховых качеств и резвости повсеместно применялись скрещивание верховых пород с местными лошадьми. Мезенская порода лошадей с высоким уровнем достоверности оказалась близкой бурятской по-

Таблица 4. Популяционно-генетические показатели для исследуемых выборок

Популяция	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F
AltChin	7.412	4.543	1.650	0.756	0.761	0.009
	0.462	0.312	0.066	0.032	0.019	0.030
TuvaIrb	8.235	4.579	1.663	0.755	0.754	-0.005
	0.572	0.381	0.079	0.020	0.021	0.022
KushItil	7.000	4.441	1.613	0.725	0.753	0.032
	0.402	0.335	0.070	0.028	0.019	0.036
Pechor	5.882	4.124	1.489	0.700	0.723	0.026
	0.445	0.369	0.088	0.047	0.026	0.056
BayBur	7.706	4.654	1.682	0.767	0.769	0.005
	0.554	0.320	0.066	0.029	0.016	0.028
Gobi	8.000	4.650	1.701	0.737	0.765	0.036
	0.582	0.329	0.073	0.026	0.018	0.028
Mesen	7.412	4.037	1.534	0.703	0.722	0.025
	0.536	0.278	0.081	0.033	0.030	0.022
Buryat	7.235	4.196	1.583	0.735	0.746	0.012
	0.450	0.259	0.060	0.022	0.017	0.028
MoDark	7.176	4.253	1.567	0.718	0.738	0.023
	0.472	0.381	0.071	0.034	0.020	0.040
BaiLak	7.412	4.422	1.566	0.725	0.717	-0.012
	0.728	0.440	0.128	0.050	0.050	0.017
Baidag	8.059	4.159	1.567	0.719	0.709	-0.013
	0.774	0.396	0.118	0.049	0.048	0.013
MonTes	8.941	5.031	1.769	0.728	0.771	0.055
	0.745	0.448	0.087	0.057	0.025	0.064
RusVer	6.941	3.857	1.463	0.699	0.709	0.009
	0.496	0.292	0.079	0.031	0.027	0.031
Koshkor	7.824	4.683	1.707	0.798	0.773	-0.033
	0.404	0.285	0.054	0.021	0.014	0.021
Aryghem	8.118	4.768	1.687	0.752	0.760	0.009
	0.737	0.429	0.090	0.027	0.023	0.021

Примечание. N_a – число различных аллелей, N_e – число эффективных аллелей, I – информационный индекс Шеннона, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации. Верхняя строка – среднее значение, нижняя строка – стандартная ошибка.

роде возможно по причине схожих условий обитания на севере страны. Монгольские Тэс и Дархат разместились в общем кластере дерева, что свидетельствует об их родстве, как и тувинских Байдаг, Байлак и Ирбис между собой. Забайкальская, тувинская Кошкорлыг и монгольская Гоби с невысоким значением бутстреп-поддержки оказались в общей кладе дерева, что скорее отражает отсутствие других близкородственных популяций нежели их фактическое родство.

Для определения структуры популяций был использован байесовский анализ на основе метода Марковских цепей Монте-Карло (MCMC) в программе STRUCTURE (рис. 4). Для определе-

ния оптимального числа кластеров (K) была рассчитана статистика ΔK от 2 до 7. Наиболее достоверное разделение было продемонстрировано при $K = 2$, при котором выборки разделялись на кластеры: 1) русская верховая и 2) все остальные. При $K = 3$ выделены кластеры: 1) русская верховая, 2) мезенская и 3) остальные популяции. При $K = 5$ выделялись в отдельные кластеры следующие популяции: 1) русская верховая, 2) мезенская, 3) тувинские Байлак и Байдаг, 4) бурятская, монгольская Дархат и тувинская Арыг-Хем, 5) остальные.

Мезенская и печорская лошади ожидаемо оказались изолированы генетически от остальных пород, расположенных южнее, как видно из

Таблица 5. Генетическое разнообразие исследуемых пород лошадей на основе анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) микросателлитных локусов

Изменчивость	<i>d.f.</i>	SS	MS	%
Между популяциями	14	88616.947	6329.782	24
Между особями	851	193511.877	227.394	25
Внутрииндивидуальная	866	100099.500	115.588	51
Всего	1731	382228.324		100

Примечание. *d.f.* – число степеней свободы, SS – сумма квадратов, MS – средние квадраты, % – процент изменчивости.

представленной миграционной сети (рис. 5). Бурятская является донором аллелей для тувинской Кошкорлыг, алтайская – для забайкальской, монгольская Дархат – для монгольской Тэс, а русская верховая – для забайкальской и тувинской Арыг-Хем. Между остальными представлен-

ными выборками осуществляется интенсивный обмен генетическим материалом в различных направлениях, наиболее интенсивно между тувинскими Ирбис, Кошкорлыг, Байлаг и Байдаг, монгольскими Гоби и Тэс. Подобный активный обмен аллелями и относительно высокий уровень

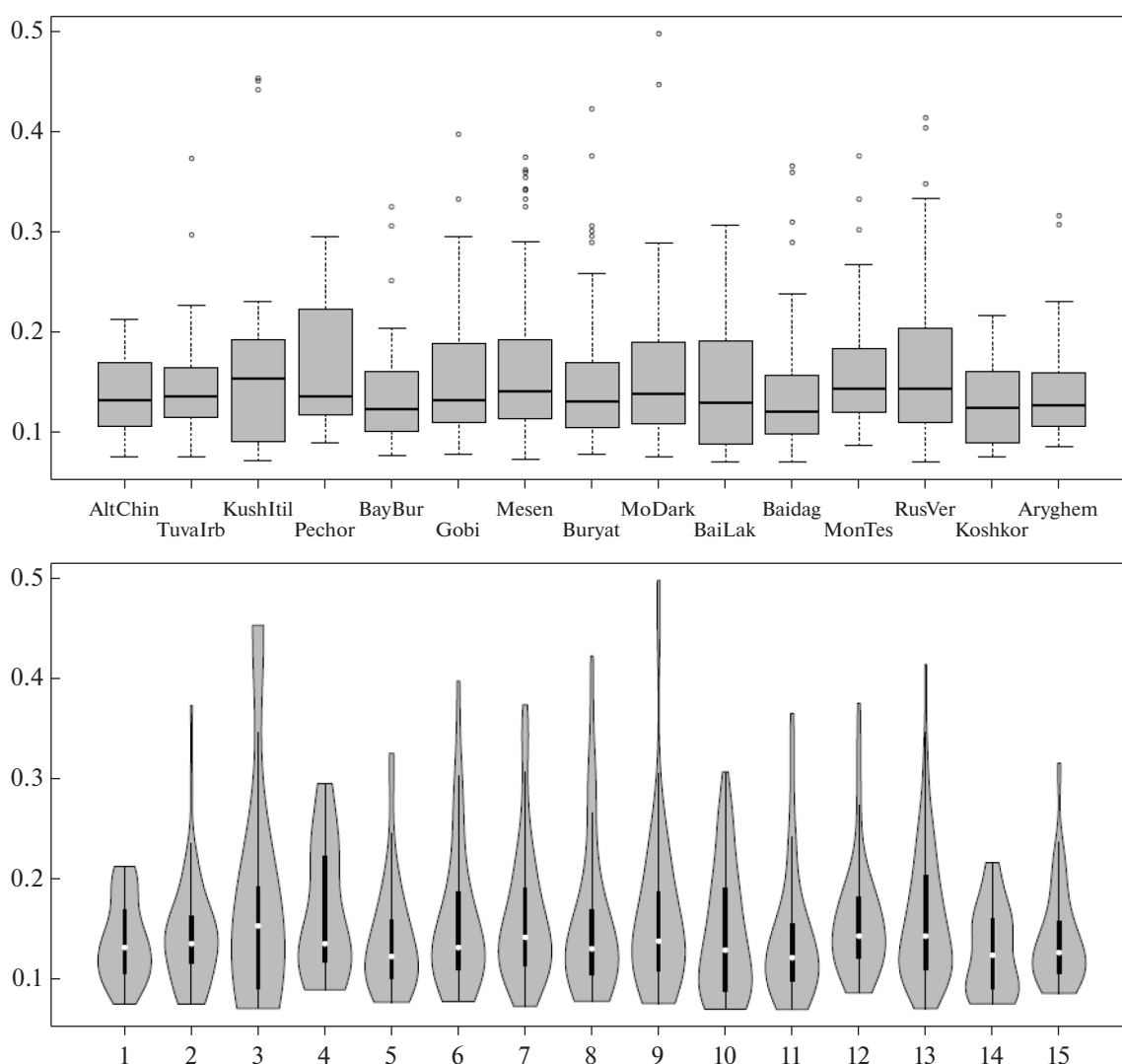


Рис. 1. Вертикальные графики плотностей распределения коэффициентов инбридинга лошадей для 15 исследуемых популяций. Внутри каждой диаграммы белые точки указывают медиану, а черный отрезок – межквартильный диапазон.

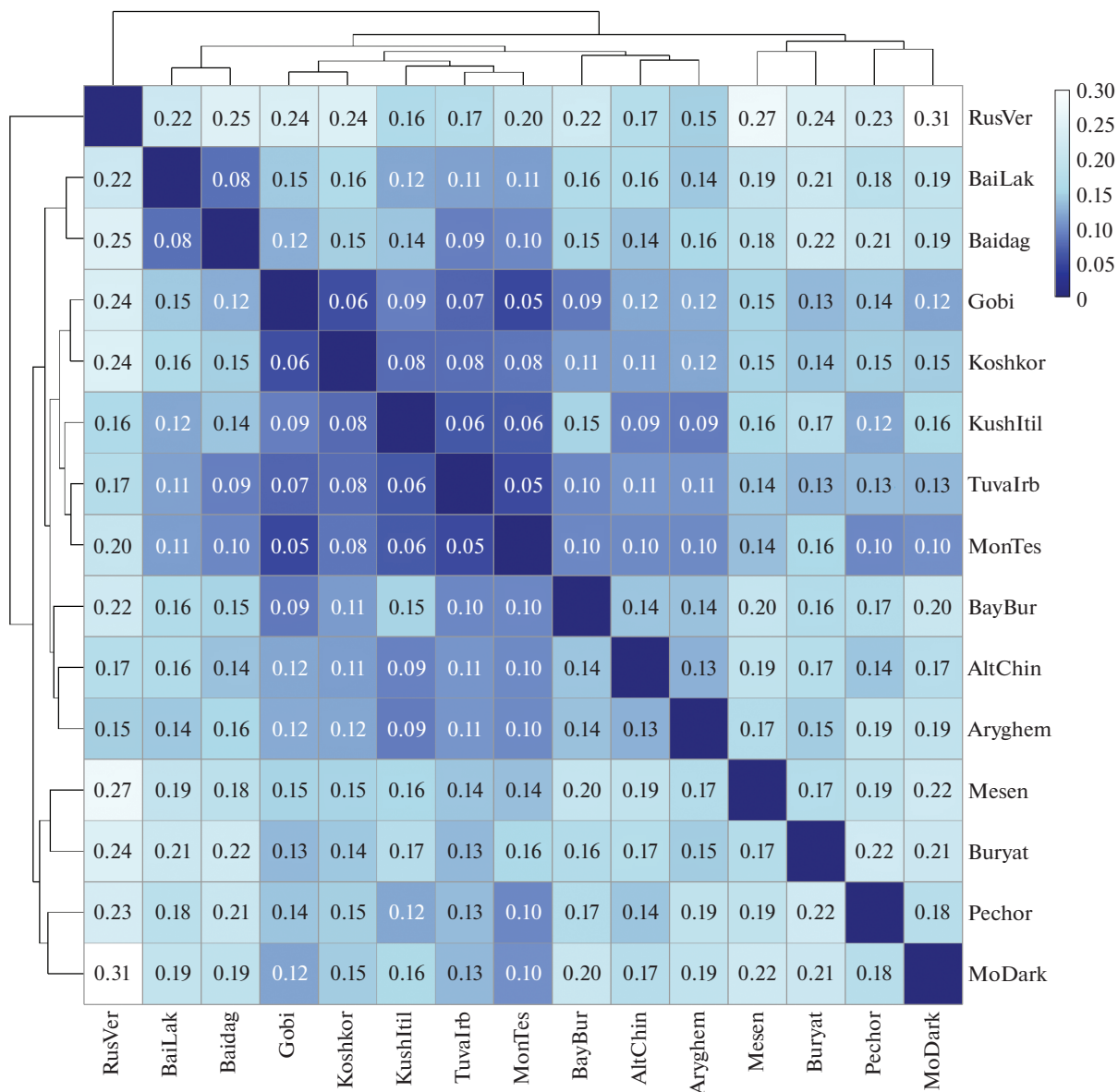


Рис. 2. Визуализация попарных генетических дистанций (по Jost) между исследуемыми выборками. Интенсивность цвета квадрата пропорциональна генетическому расстоянию.

генетического разнообразия могут отражать не только благополучие пород, но свидетельствовать о снижении чистопородности и потенциальной метизации (межпородной гибридизации) тувинских и монгольских лошадей.

В настоящей работе наиболее информативными (по значениям PIC, рис. 6) для микросателлитного анализа исследуемых популяций лошадей оказались локусы VHL20, ASB17, АНТ4 и ASB23. Наименьший информационный вклад внесли локусы НТG4, НТG6, НТG7 и НMS1. При этом уровень информативности каждого локуса различается от популяции к популяции.

Определены нуклеотидные последовательности контрольного региона D-петли мтДНК для 142 образцов из шести выборок (трех монгольских: из пустыни Гоби, Центральной и Северной Монголии; тувинской Арыг-Хем, забайкальской и бурятской). Полученные результаты даны в табл. 6.

В табл. 6 представлены сводные данные по числу замен, транзиций, трансверсий и нуклеотидному разнообразию для полученных нуклеотидных последовательностей контрольного региона мтДНК и для последовательностей из базы данных GenBank. Для анализа из 1756 последовательностей современных лошадей было отобрано

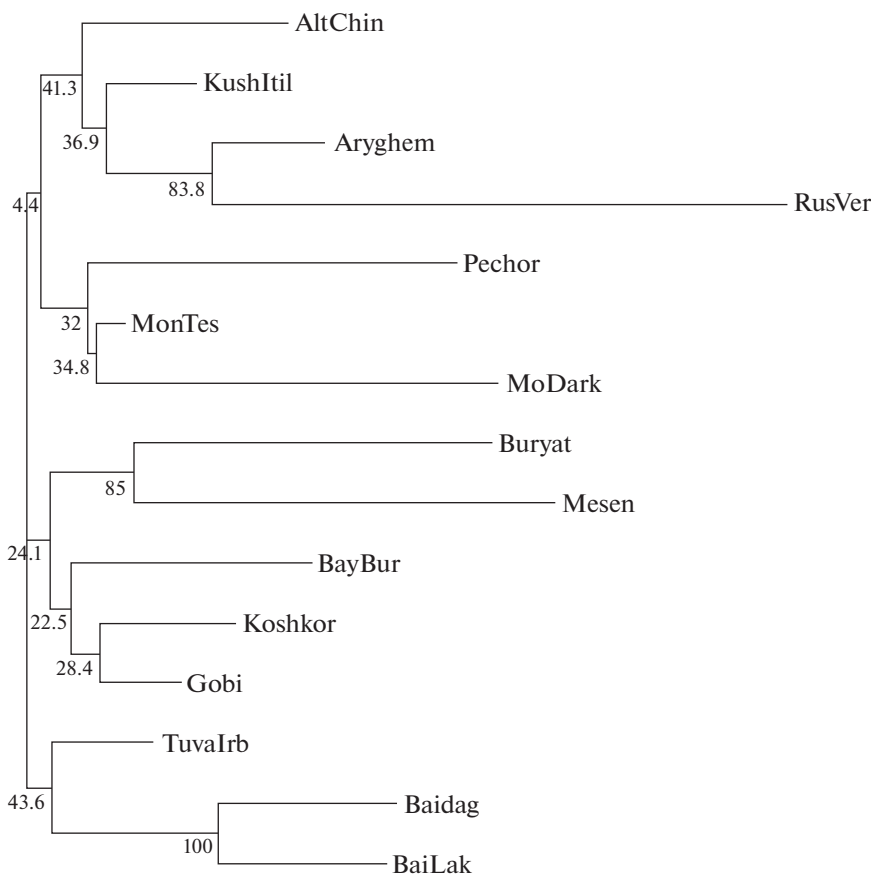


Рис. 3. Дендрограмма, построенная методом NJ (Neighbor-Joining) с бутстрэп-поддержкой (1000 итераций) на основе генетических расстояний Нея, для исследуемых популяций лошадей.

267, среди которых представлены все показанные авторами [29] гаплотипы и разнообразные породы. Наибольшее число замен было получено для монгольской популяции из пустыни Гоби и тувинской Арыг-Хем, наименьшее — для лошади Пржевальского, что может быть связано с небольшим числом исследуемых образцов и инбредной депрессией. Сайты с уникальными заменами были обнаружены в арабской, вятской, корейской чейю, китайской дебао, эксмур, польский коник, дуэлменер, лузитано, поттока и сицилийской выборках. Наибольшие значения нуклеотидного разнообразия были получены для сицилийской (0.030) выборки и лузитано (0.031), наименьшие — для лошади Пржевальского (0.000) и породы соррайя (0.007), которая находится на грани вымирания. Нуклеотидное разнообразие изучаемых популяций Саяно-Алтайского региона находится на высоком уровне (0.021–0.028). Обнаружены четыре горячие точки мутаций (15585, 15597, 15650 и 15604), которые были описаны в предыдущих работах [21, 29].

На основе полученных нуклеотидных последовательностей была построена дендрограмма методом Neighbor-Joining [30] в программе

MEGA 5.05 (рис. 7). В качестве корня была использована нуклеотидная последовательность D-петли осла (*Equus asinus*) как близкородственного вида лошади домашней, дивергенция которого от общего предка произошла около двух млн лет назад. Оценка надежности ветвей филогенетического дерева проведена с использованием бутстрэп-анализа [31] с использованием 1000 случайных выборок.

На дендрограмме (рис. 7) выделяется кластер северных пород — тувинской, забайкальской, северомонгольской и бурятской популяций. Промежуточное положение занимает центральномонгольская популяция и отдельно кластеризуется монгольская популяция из Гоби. Использование другого типа молекулярных маркеров, так же как и использование микросателлитного анализа, позволило выделить монгольскую лошадь из пустыни Гоби в отдельную от других монгольских породную группу.

Метод построения филогенетических сетей Neighbor-Net [32] основан на расчете генетических расстояний и усовершенствованном алгоритме ближайшего соседа (Neighbor-Joining). Neighbor-

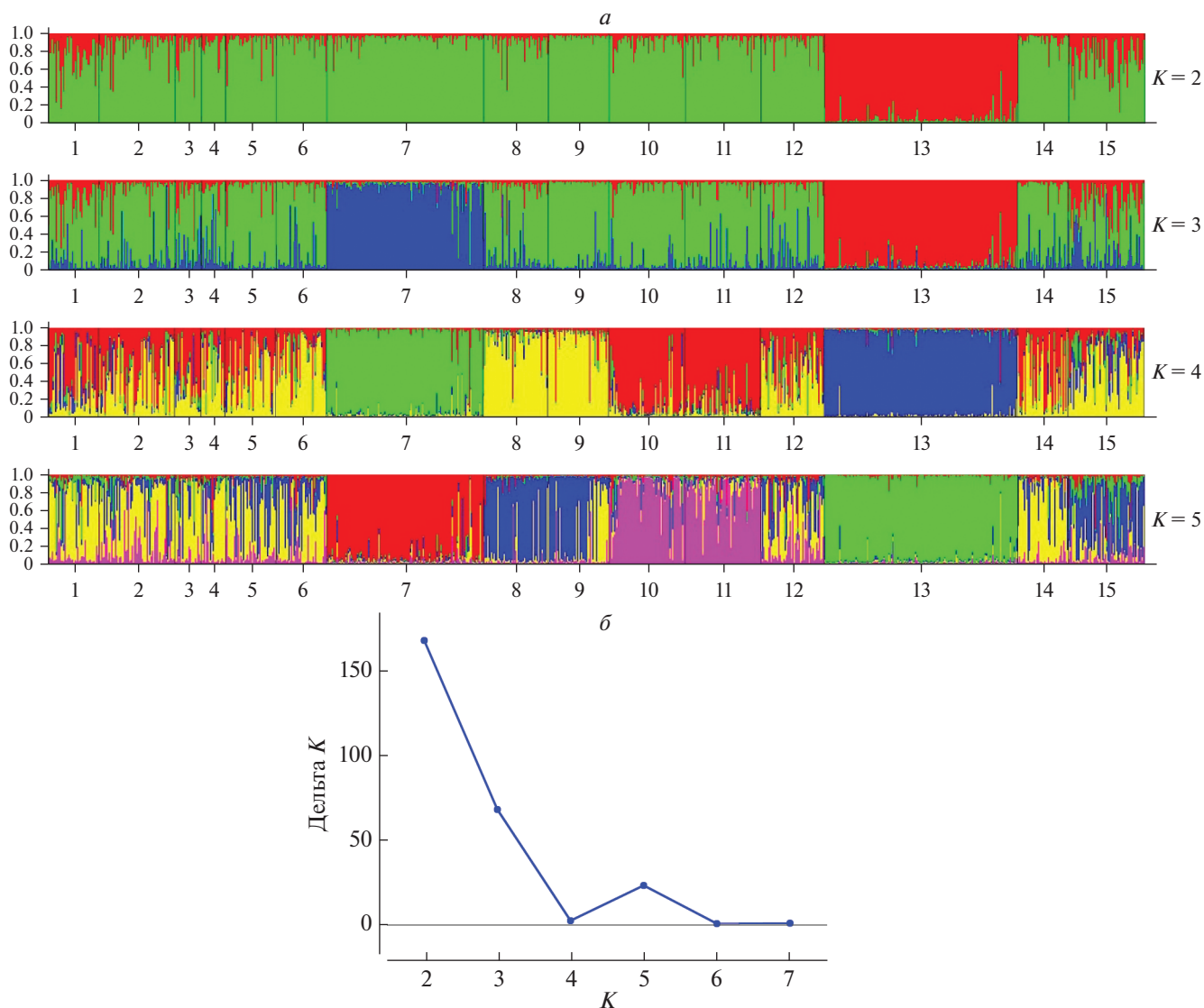


Рис. 4. Результаты анализа STRUCTURE на основе микросателлитных данных исследуемых популяций лошадей. *a* – цветное деление столбца отражает принадлежность каждого животного к одному из заданного числа кластеров K ($K = 2-5$). Нумерация популяций: 1 – алтайская Чингиз, 2 – тувинская Ирбис, 3 – кушумская Итиль, 4 – печорская, 5 – забайкальская, 6 – монгольская Гоби, 7 – мезенская, 8 – бурятская, 9 – монгольская Дархат, 10 – тувинская Байлак, 11 – тувинская Байдаг, 12 – монгольская Тэс, 13 – русская верховая, 14 – тувинская Кошкорлыг, 15 – тувинская Арыг-Хем; *b* – значения дельта K , рассчитанные по методу Evanno для $K = 2-7$.

Net позволяет получить характеристику данных для детального анализа и выявить связи между более чем двумя образцами. В отличие от метода ближайшего соседа Neighbor-Net при построении дихотомии дерева позволяет отобразить конфликт в имеющихся данных независимо от его происхождения (ошибка эксперимента или рекомбинация).

Для построения сети Neighbor-Net в программе SplitsTree 4.10 были использованы полученные нами нуклеотидные последовательности D-петли, а также последовательности 1754 современных лошадей, полученные из базы данных GenBank в соответ-

ствии с работой [29]. При этом были убраны идентичные нуклеотидные последовательности и имеющие большое число ошибок секвенирования, таким образом для анализа были использованы 228 последовательностей, из которых 142 получены в процессе нашей работы и отмечены разноцветными точками (рис. 8). Как мы можем наблюдать, полученные нами нуклеотидные последовательности расположены практически во всех кластерах сети, что свидетельствует о высоком уровне генетического разнообразия аборигенных лошадей России и Монголии. Нуклеотидные последовательности монгольской лошади из

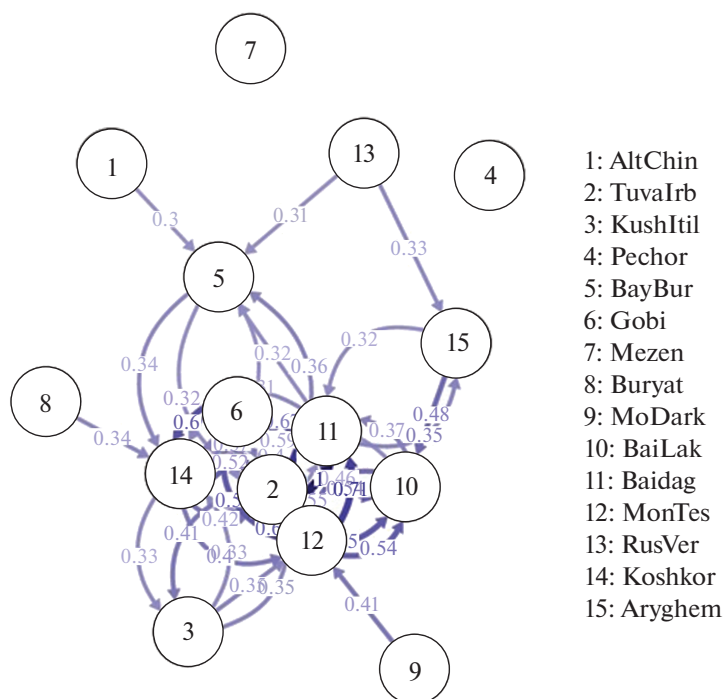


Рис. 5. Миграционная сеть исследуемых пород лошадей.

Гоби и тувинской породы присутствуют во всех ветвях сети, к тому же тувинская популяция образует уникальный кластер IV, где отсутствуют образцы из других выборок кроме тувинской и монгольской Гоби (один образец). Северомонгольская выборка встречается преимущественно в I кластере (14 образцов из 26), почти отсутствует в V и VI, полностью отсутствует в II и IV. Центральномонгольская выборка располагается преимущественно в V и VI, отсутствует в I, IV и VII. Большинство образцов забайкальской породы локализуется в VII кластере (11 из 25) и присутствуют во всех кластерах кроме IV. Последовательности из бурятской выборки преимущественно обнаруживаются в VI и II кластерах и полностью отсутствуют в IV и V.

В I кластере преимущественно встречаются образцы из северомонгольской, из пустыни Гоби и бурятской выборок, а также примитивные породы (дебао, чейю, монгольская, якутская и норвежская фьордовая) и восточные породы лошадей (арабская, берберийская, ахалтекинская). Во II кластере выявлены все изученные нами выборки, кроме северомонгольской, и примитивные породы (чейю, исландская, якутская) и восточные (арабская, берберийская, ахалтекинская). В III кластере обнаружены образцы из всех изученных нами выборок, а также восточные породы (ахалтекинская, фулани) и примитивные (чейю, дебао). Единственными породами, обнаруженными в IV кластере, оказались тувинская и мон-

гольская Гоби. Преимущественно европейские породы (лузитано, поттока, дуэлменер) были обнаружены в V кластере вместе с изученными нами породами (кроме бурятской). В VI кластере встречаются все исследуемые нами выборки и европейские породы лошадей (сицилийская местная, шетлендский пони, лузитано). В последнем VII кластере выявлены образцы из всех изученных нами популяций (кроме центральномонгольской), а также локальные лошади (якутская, дебао, чейю и лошадь Пржевальского) и европейские породы (польский коник, лузитано, соррайа).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне полиморфизма последовательностей D-петли мтДНК лошадей тувинской породы и монгольской Гоби, обнаруженных во всех кластерах сети и даже образующих отдельную группу, где не встречаются образцы других пород.

На основе объединения полученных нами и представленных в базе данных нуклеотидных последовательностей 409 современных лошадей из 28 выборок и 207 древних была построена медианная сеть в программе Network методом MJ (Median-Joining) [33] и алгоритма MP [34], позволяющего убрать избыточные медианные векторы и связи. Все настройки были стандартными за исключением опции "frequency>1", при использовании которой отражаются только гаплотипы, которые встречаются в выборке более одного раза.

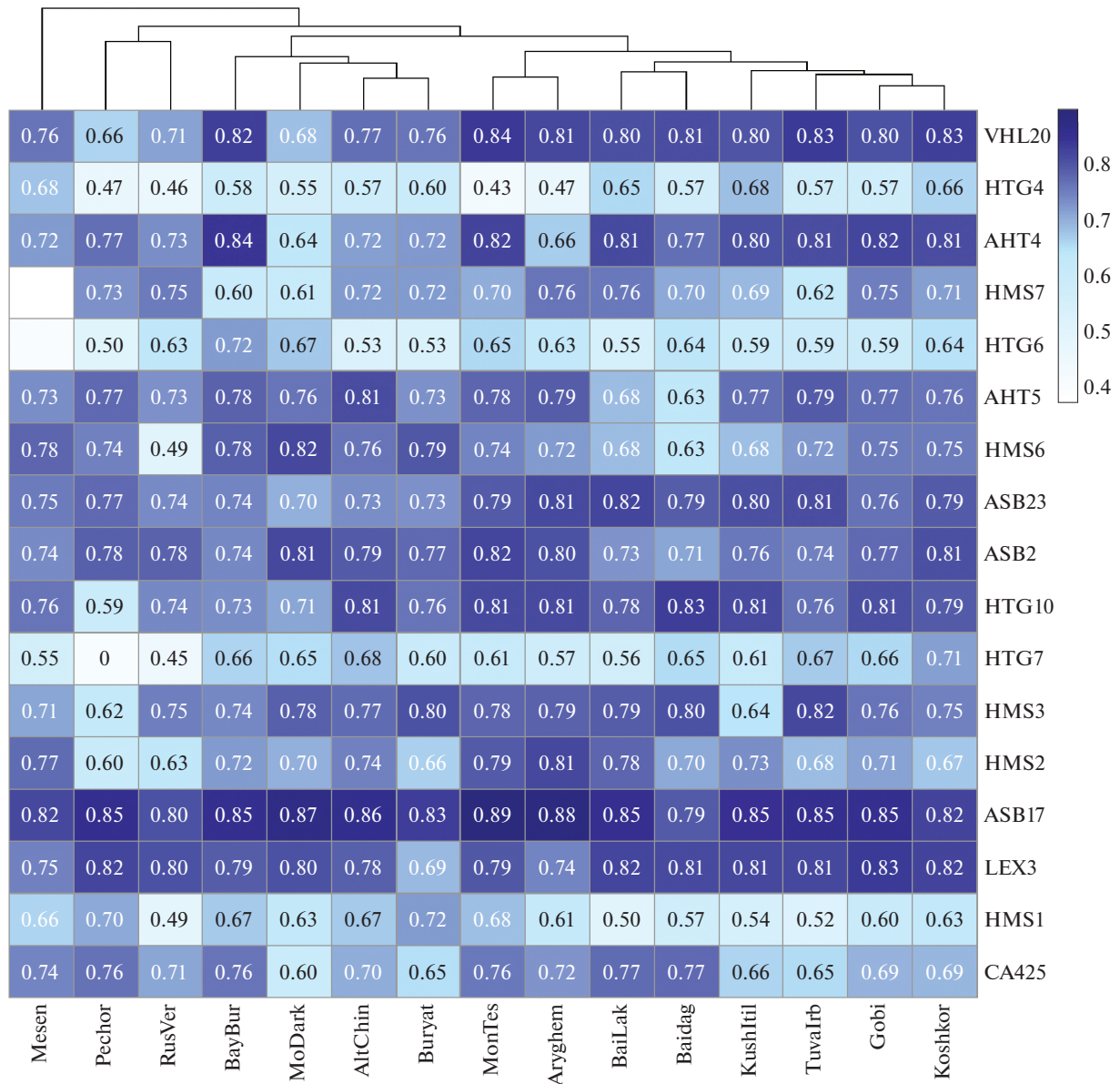


Рис. 6. Величина информационного полиморфизма (polymorphism information content, PIC) для исследуемых выборок и локусов. Интенсивность цвета клетки пропорциональна значению PIC.

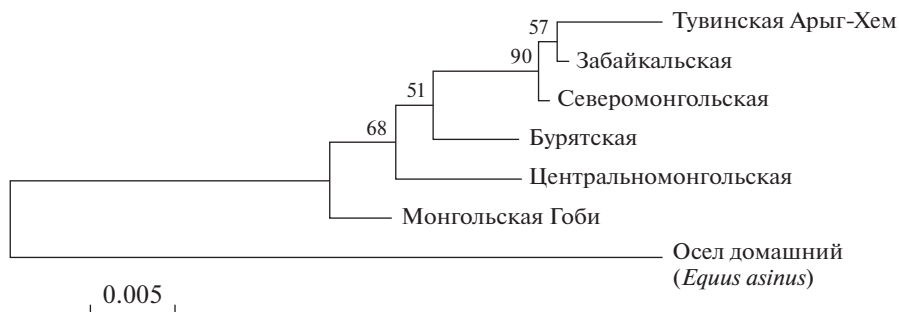


Рис. 7. Дендрограмма, построенная методом Neighbor-Joining в программе MEGA 4.3 по данным нуклеотидных последовательностей для шести популяций лошадей. Над ветвями указаны значения бутстрэп-поддержки >50.

Таблица 6. Характеристики полученных нуклеотидных последовательностей в области D-петли мтДНК

Порода	Число					Нуклеотидное разнообразие
	образцов	транзиций	трансверсий	замен	сайтов с уникальными заменами	
Монгольская из Гоби	25	27	2	29	0	0.025 ± 0.014
Северомонгольская	26	17	2	19	0	0.021 ± 0.012
Центральномонгольская	20	16	0	16	0	0.024 ± 0.014
Тувинская	25	26	1	27	0	0.028 ± 0.015
Забайкальская	24	21	0	21	0	0.024 ± 0.013
Бурятская	22	25	2	27	0	0.025 ± 0.014
Фулани	9	13	0	13	2	0.026 ± 0.015
Ахалтекинская	19	13	0	13	0	0.017 ± 0.009
Анатолийская	17	17	0	17	0	0.021 ± 0.012
Арабская	21	17	0	17	2	0.013 ± 0.008
Берберийская	21	22	0	22	0	0.022 ± 0.012
Норв. фьордовая	9	18	0	18	0	0.024 ± 0.014
Якутская	15	20	0	20	2	0.022 ± 0.012
Вятская	15	15	0	15	1	0.018 ± 0.011
Исландская	7	16	0	16	0	0.025 ± 0.015
Корейская чейю	21	19	0	19	1	0.020 ± 0.011
Китайская дебао	21	24	0	24	6	0.024 ± 0.013
Эксмурский пони	12	20	0	20	3	0.024 ± 0.014
Польский коник	5	11	0	11	1	0.025 ± 0.016
Шетлендский пони	15	21	0	21	0	0.028 ± 0.015
Дуэлменер	9	10	1	11	1	0.011 ± 0.007
Лузитано	10	20	0	20	1	0.031 ± 0.018
Соррайа	10	3	0	3	0	0.007 ± 0.005
Гаррано	5	16	0	16	0	0.027 ± 0.018
Марисмено	11	12	0	12	0	0.023 ± 0.013
Сицилийская	11	24	0	24	1	0.030 ± 0.017
Поттока	3	10	0	10	1	0.027 ± 0.022
Лошадь Пржевальского	2	0	0	0	0	0.000 ± 0.000

Обозначения гаплотипов соответствуют приведенным в работе Cieslak et al. [29]. Всего авторами было выявлено 87 гаплотипов мтДНК лошадей, из которых 48 встречались только у древних лошадей и не обнаружены у современных. Среди полученных нами образцов было выявлено 16 гаплотипов (A, B, B1, D, D2, D3, I, Gx4, K2, K2b, K2b1, X2, X2b, X3, X3c1, X4a). Самыми распространенными гаплотипами являются X2 и D3.

Как видно из представленной медианной сети (рис. 9), большинство забайкальских образцов имеют гаплотипы X3c1, X2 и D2. Для тувинских лошадей характерны гаплотипы X2b, D3 и A. У бурятских лошадей чаще встречаются гаплотипы I, D и D3; у монгольских Гоби – A, X2b, и X3; у цен-

тральномонгольских – X2b, A и B1; у северомонгольских – D2, D3 и K2. Среди монгольской, бурятской, забайкальской и тувинской пород были выявлены гаплотипы, идентичные гаплотипам древних лошадей Европы и Азии (A, D2, D3, группы X2). Как было показано ранее, большинство гаплотипов не привязано к определенной породе или географической области, в различных популяциях различаются лишь набор и частоты гаплотипов [29]. Вероятно, это связано с многократными событиями доместикации, благодаря которым мтДНК лошадей так высокополиморфна, а также с активным перемещением лошадей в мире, различными типами скрещиваний и селек-

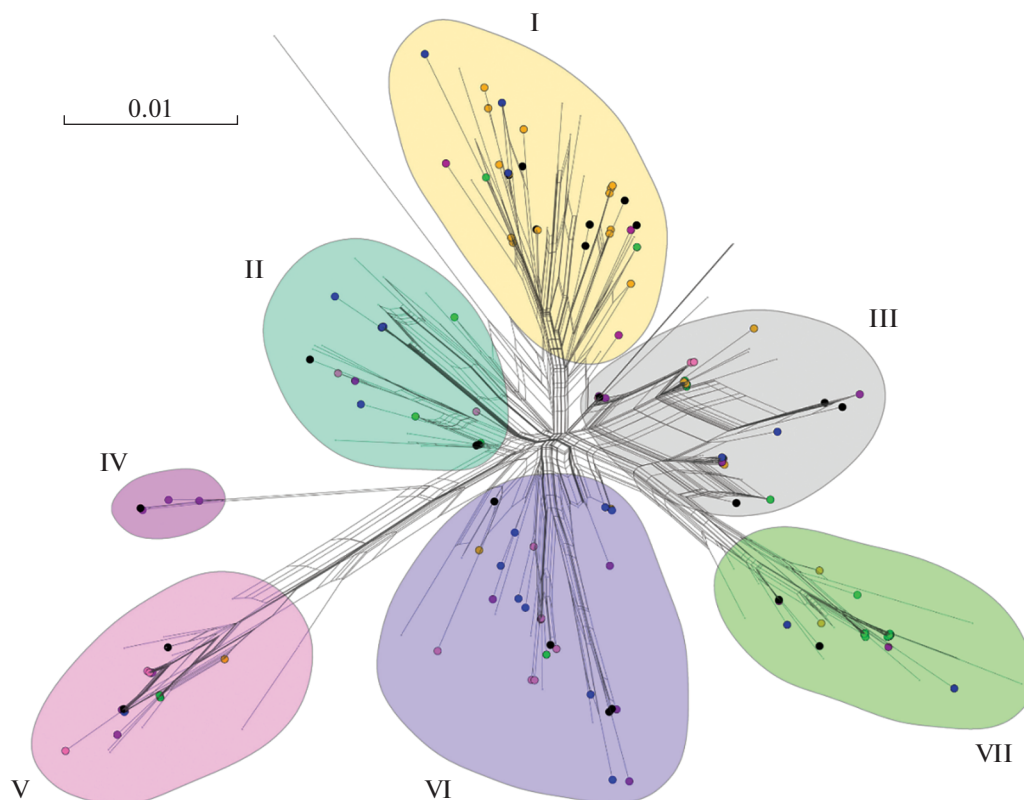


Рис. 8. Сеть Neighbor-Net, построенная по генетическим расстояниям Jukes & Cantor по данным нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК лошадей. Различными цветами точек обозначены полученные нами последовательности: черным – монгольская Гоби, оранжевым – северомонгольская, розовым – центральномонгольская, сиреневым – тувинская, зеленым – забайкальская, синим – бурятская. I–VII – объяснение в тексте.

ционной историей, во многом связанной с человеком.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдаемая гетерозиготность среди исследуемых выборок находится на высоком, не вызывающем опасения уровне, даже наиболее низкие значения. Значения H_o для пещорской (0.700) и русской верховой (0.699) пород не вызывают опасений, хотя вышеуказанные породы малочисленны. Наибольшие значения наблюдаемой гетерозиготности были обнаружены для выборок тувинской Кошкорлыг (0.798) и забайкальской породы (0.767), что совместно с минимальным уровнем инбридинга свидетельствует о благополучии данных пород и низких генетических рисках, связанных с селекцией и снижением численности. Мониторинг уровня наблюдаемой гетерозиготности (в сравнении с данными ВНИИК от 2008 г. [16]) позволил выявить положительный тренд к росту данного показателя для тувинской, забайкальской, мезенской и бурятской пород. Лишь у пещорской породы наблюдается снижение уровня H_o , что вызывает озабоченность статусом породы

и требует активных действий по увеличению численности племенного ядра, подбору оптимальных пар и динамической оценке генетического разнообразия.

Наиболее генетически близкородственными оказались монгольские лошади Тэс и из пустыни Гоби совместно с тувинской Ирбис. Родство двух монгольских выборок не вызывает вопросов, в то время как тувинская популяция Ирбис находится в центре миграционной сети и принимает активное участие в обмене аллелями с другими исследованными выборками, что свидетельствует в пользу ее метизации.

Анализ структуры популяций позволил выделить в отдельные кластеры мезенскую и русскую верховую породы, которые также отличаются наибольшими генетическими дистанциями от остальных исследованных выборок, остальные выборки не демонстрировали четкого разделения при увеличении числа кластеров (K), что совместно с анализом миграционных сетей свидетельствует о панмиксии местных пород лошадей, обитающих в близких к естественным условиям на табунном выпасе (традиционное животноводство), и ин-

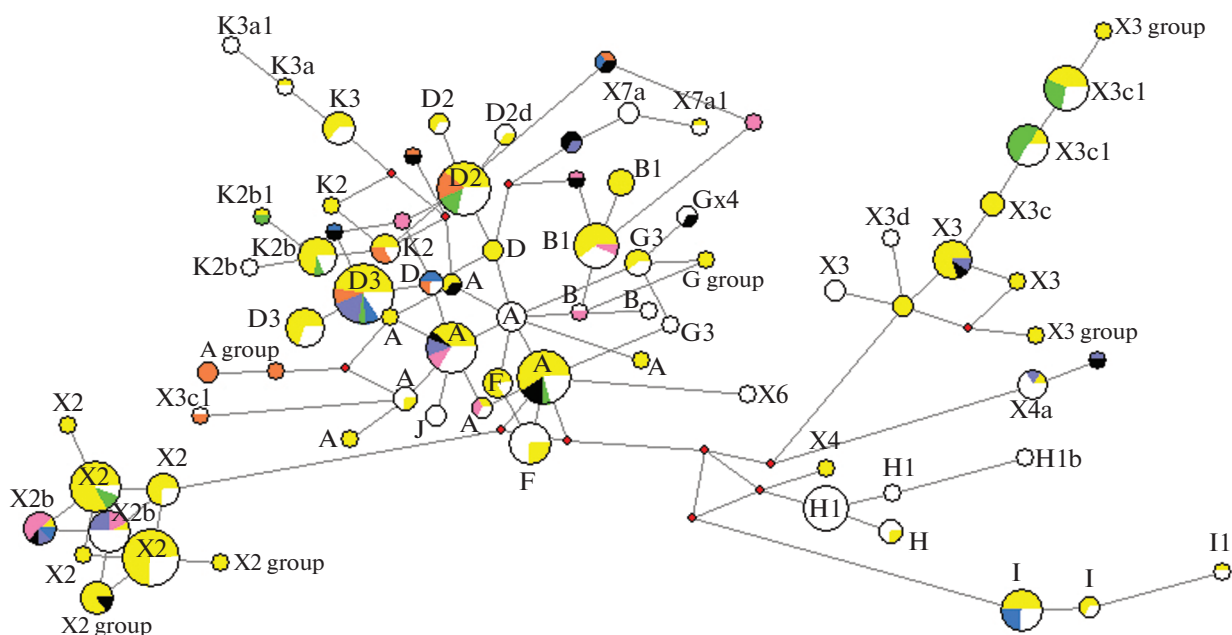


Рис. 9. Медианная сеть на основе 409 нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК современных лошадей и 207 древних. Гаплотипы указаны рядом или внутри кругов. Цветами обозначены различные выборки: желтым – образцы из базы данных, белым – древние, черным – монгольская выборка из Гоби, оранжевым – северомонгольская, розовым – центральномонгольская, сиреневым – тувинская, зеленым – забайкальская, синим – бурятская.

тенсивном генетическом обмене между тувинскими и монгольскими популяциями.

Выявлены гаплотипы мтДНК, идентичные древним гаплотипам лошадей Европы и Азии среди монгольской, забайкальской, бурятской и тувинской пород лошадей при анализе нуклеотидной последовательности гиперварибельного контрольного региона мтДНК (D-петли). Последние исследования в области палеогенетики лошадей свидетельствуют о том, что предком всех современных пород являлись одомашненные лошади в степях между Днепром и Уралом [35]. Таким образом, на территории нашей страны находится один из основных центров доместикировки лошадей. Данный факт может объяснять присутствие редких и считавшихся исчезнувшими гаплотипов мтДНК в местных популяциях лошадей России и Монголии. В целом стоит отметить высокий уровень полиморфизма изученных нуклеотидных последовательностей при сравнении с ранее изученными образцами (база данных GenBank).

Продемонстрирована высокая степень генетического отличия монгольской популяции из Гоби от остальных исследуемых популяций по совокупным данным анализа последовательностей D-петли мтДНК и STR-анализа, которая может являться результатом изоляции, искусственного и естественного отбора на фоне специфических условий обитания.

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. Местные (аборигенные) породы лошадей России. Дивово: Изд-во ВНИИ коневодства, 2018. 148 с.
2. Ооржак Р.Т., Монгуш С.Д. Нагульные качества лошадей тувинской породы, разводимой в разных природно-климатических зонах Республики Тыва // Вестник Тувинского гос. ун-та. Естественные и сельскохозяйств. науки. 2014. № 2. С. 148.
3. Дунин И.М., Данкверт А.Г., Ерохин А.С. и др. Справочник пород и типов сельскохозяйственных животных, разводимых в РФ. М.: ЦБГНУ ВНИИПлем, 2013. 554 с.
4. Юрьева И.Б., Вдовина Н.В. Генофонд отечественного коневодства: мезенская порода лошадей // Farm Animals. 2012. № 1. С. 44–48.
5. Парфенов В.А., Рябова Е.В. Комплексная оценка производящего состава лошадей русской верховой породы Старожиловского конного завода // Коневодство и конный спорт. 2010. № 5. С. 9–10.
6. Столповский Ю.А., Цэндсурен Ц., Кол Н.В. и др. Генофонды домашних животных Монголии / Под ред. Захарова И.А. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2013. 275 с.

7. *Solis A., Jugo B.M., Meriaux J.C. et al.* Genetic diversity within and among four south European native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: Implications for conservation // *J. Heredity*. 2005. V. 96. № 6. P. 670–678.
8. *Canon J., Checa M.L., Carleos C. et al.* The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data // *Animal Genet.* 2000. V. 31. № 1. P. 39–48.
9. *Morais J., Oom M.M., Malta-Vacas J., Luis C.* Genetic structure of an endangered Portuguese semiferal pony breed, the Garrano // *Biochem. Genet.* 2005. V. 43. № 7/8. P. 347–364.
10. *Luis C., Cothran E.G., Oom Mdo M.* Inbreeding and genetic structure in the endangered Sorraia horse breed: implications for its conservation and management // *J. Heredity*. 2007. V. 98. P. 232–237. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm009>
11. *Marletta D., Tupac-Yupanqui I., Bordonaro S. et al.* Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers // *J. Anim. Breed. Genet.* 2006. V. 123. P. 315–325. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2006.00603.x>
12. *Tozaki T., Takezaki N., Hasegawa T. et al.* Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup // *J. Heredity*. 2003. V. 94. № 5. P. 374–380.
13. *Kakoi H., Tozaki T., Gawahara H.* Molecular analysis using mitochondrial DNA and microsatellites to infer the formation process of Japanese native horse populations // *Biochem. Genet.* 2007. V. 45. № 3–4. P. 375–395.
14. *Senju N., Tozaki T., Kakoi H. et al.* Genetic diversity of the Yonaguni horse based on polymorphisms in microsatellites and mitochondrial DNA // *J. Vet. Med. Sci.* 2017. V. 79. № 2. P. 425–431. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0040>
15. *Senju N., Tozaki T., Kakoi H. et al.* Genetic characterization of the Miyako horse based on polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA // *J. Vet. Med. Sci.* 2017. V. 79. № 1. P. 218–223. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0111>
16. *Храброва Л.А., Зайцев А.М.* Особенности аллелофонда местных пород лошадей // *Коневодство и конный спорт*. 2008. № 3. С. 9–10.
17. *Лукашов В.В.* Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. 256 с.
18. *Vila C., Leonard J.A., Gotherstrom A. et al.* Widespread origins of domestic horse lineages // *Science*. 2001. V. 291. № 5503. P. 474–477.
19. *Clutton-Brock J.* The process of domestication // *Mammal Review*. 1992. V. 22. P. 79–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1992.tb00122.x>
20. *Kavar T., Brem G., Habe F. et al.* History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis // *Genet. Sel. Evol.* 2002. V. 34. № 5. P. 635–648.
21. *Jansen T., Forster P., Levine M. et al.* Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse // *PNAS*. 2002. V. 99. № 16. P. 10905–10910.
22. *Hill E.W., Bradley D.G., Al-Barody M. et al.* History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation // *Animal Genet.* 2002. V. 33. № 4. P. 287–294.
23. *McGahern A., Bower A.M., Edwards C.J. et al.* Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations // *Animal Genet.* 2006. V. 37. № 5. P. 494–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01495.x>
24. *Takasu M., Ishihara N., Tozaki T. et al.* Genetic diversity of maternal lineage in the endangered kiso horse based on polymorphism of the mitochondrial DNA D-loop region // *J. Vet. Med. Sci.* 2014. V. 76. № 11. P. 1451–1456. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0231>
25. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
26. *Jost L.* GST and its relatives do not measure differentiation // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. P. 4015–4026.
27. *Winter D.J.* MMod: an R library for the calculation of population differentiation statistics // *Mol. Ecol. Resour.* 2012. V. 12. P. 1158–1160.
28. *Leroy G., Callède L., Verrier E. et al.* Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism // *Genet. Sel. Evol.* 2009. V. 41. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-5>
29. *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.
30. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
31. *Zharkikh A., Li W.H.* Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1995. V. 4. P. 44–63.
32. *Bryant D., Moulton V.* Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 2. P. 255–265.
33. *Bandelt H.J., Forster P., Rohl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.
34. *Polzin T., Daneschmand S.* On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs // *Operations Res. Letters*. 2003. V. 31. P. 12–20.
35. *Librado P., Khan N., Fages A. et al.* The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes // *Nature*. 2021. V. 598. P. 634–640. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04018-9>

Assessment of Genetic Diversity and Structure of Autochthonic Horses of Russia and Mongolia Using Nuclear and Mitochondrial DNA Markers

V. N. Voronkova^{a, *}, E. A. Nikolaeva^a, A. K. Piskunov^a, O. V. Babayan^b, M. Takasu^c, T. Tozaki^d, G. R. Svishcheva^{a, e}, and Yu. A. Stolpovsky^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^b"GORDIZ LLC", Moscow, 121205 Russia

^cDepartment of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu, Japan

^dGenetic Analysis Department, Laboratory of Racing Chemistry, Tochigi, Japan

^eFederal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: valery.voronkova@gmail.com

In this work, using microsatellite analysis for 17 loci, 866 horses from 9 breeds were studied: Altai, Tuva, Kushum, Pechora, Mezen, Transbaikal, Buryat, Russian riding and Mongolian. The level of observed heterozygosity of the studied breeds is at a high level that does not cause concern (from 0.699 to 0.798). A total of 183 alleles were identified, including 15 private ones. For the first time, the D allele of the AHT4 locus was found in Mongolian horses Tes with a length of about 124 bp with a putative deletion outside the repeat region. The phylogenetic relationships, structure and mutual influence of the gene pools of Mongolian and Russian horses are shown. Analysis of the polymorphism of the control region of the mtDNA D-loop in 142 horses made it possible to identify 16 haplotypes, of which four, found in the Mongolian, Buryat, Transbaikal, and Tuva breeds, were previously found only in samples of ancient horses in Europe and Asia. Haplotypes X2 and D3 turned out to be the most common among the studied breeds. The hypothesis that the majority of mtDNA haplotypes is not tied to a particular breed or geographic area has been confirmed. In horse populations, only the set and frequencies of haplotypes differ. This is probably due to the multiple domestication events that make horse mtDNA so highly polymorphic, as well as the active movement of horses in the world and their breeding history.

Keywords: horses, *Equus caballus*, native breed, biodiversity conservation, genetic monitoring, microsatellite analysis, genetic diversity, phylogenetic relationships, D-loop, mtDNA.