На правах рукописи

Воронкова Валерия Николаевна

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ЛОШАДЕЙ САЯНО-АЛТАЙСКОГО РЕГИОНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДНК МАРКЕРОВ

03.02.07 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва, 2012г.

Работа выполнена в лаборатории сравнительной генетики животных Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, г. Москва

Научный руководитель:
доктор биологических наук, профессор — **Сулимова Галина Ефимовна**

Официальные оппоненты:
доктор биологических наук — **Асланян Марлен Мкртичевич**
профессор кафедры генетики
Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, г. Москва

кандидат биологических наук — **Алимов Андрей Анатольевич**
доцент кафедры разведения и племенного дела
Российский государственный аграрный
университет – МСХА
имени К.А. Тимирязева, г. Москва

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «24» мая 2012 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 002.214.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук по адресу: 119991, ГСП-1, г. Москва, ул. Губкина, д.3. Факс: (499) 132-89-62, e-mail: aspirantura@vigg.ru, www.vigg.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН.

Автореферат разослан « » _____ 2012г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук — **Синельщикова Татьяна Аркадьевна**

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Изучение генетического полиморфизма пород лошадей имеет большое значение для поддержания разнообразия в популяциях, улучшения селекционной работы и определения их происхождения. Особенно важным является исследование аборигенных пород лошадей, имеющих в своем геноме редкие аллели и являющихся выносливыми и хорошо приспособленными к условиям среды обитания. Монгольская лошадь была приручена около 6000 лет назад и благодаря походам Чингиз-хана и его потомков приняла участие в формировании многих пород на территории Европы и Азии. Она является аборигенной породой и разводится только в монгольских степях, в связи с чем, плохо изучена. Бурятская, алтайская, забайкальская и тувинская породы лошадей также являются аборигенными и даже в наши дни они остаются незаменимыми благодаря приспособленности к суровым условиям обитания. Недостаточная изученность лошадей Центральной и Восточной Азии не позволяет точно локализовать основные области, где начался процесс доместикации (Warmuth et al., 2011).

В начале XX века в России насчитывалось более 20 млн. голов лошадей, к настоящему времени численность конного поголовья сократилась до 1,3 млн. (Федеральная служба государственной статистики, 2008). Резкое снижение численности поголовья лошадей в XX веке не могло не отразиться на уровне генетического разнообразия, в связи с чем, необходимо использовать современные подходы для оценки и поддержания высокого уровня генетического разнообразия для сохранения пород во избежание неблагоприятных последствий инбридинга и эффекта «бутылочного горлышка».

Одним из наиболее эффективных подходов оценки генетического разнообразия популяций является использование молекулярных маркеров ДНК. Наиболее информативными для популяционно-генетических исследований являются мультилокусные ДНК маркеры, позволяющие одновременно изучать большое число локусов. Анализ последовательностей мтДНК позволяет определять происхождение и генетическое сходство пород по материнской линии. Различные варианты аллелей гена миостатина (*MSTN*) определяют скоростные качества и выносливость лошадей. Представляет интерес выяснить, какие аллели и генотипы преобладают у аборигенных пород лошадей.

При сохранении пород *in situ* основная задача состоит в том, чтобы сохранить специфические генные комплексы и сбалансированную систему генов и аллелей, которые обуславливают фенотипические породные

характеристики, связанные с экстерьерными особенностями, продуктивностью, жизнеспособностью, резистентностью животных. Именно вышеперечисленные особенности, отличающие местные породы от широко распространенных импортных пород, необходимо сохранять в генофондных хозяйствах (Столповский, 2010).

Цель исследования

Цель данной работы состояла в изучении генетического разнообразия лошадей (*Equus caballus*) монгольской, алтайской, забайкальской, астраханской, бурятской и тувинской пород на основе мультилокусного межмикросателлитного анализа ДНК и анализа нуклеотидной последовательности мтДНК, а также типировании исследуемых образцов по однонуклеотидной замене (SNP: g.66493737C/T) в первом интроне гена миостатина.

Задачи исследвания:

1) Сравнить информативность ISSR-маркеров, полученных с использованием различных праймеров, для изучения полиморфизма лошадей.

2) Оценить генетическое разнообразие монгольской, алтайской, забайкальской, астраханской, бурятской и тувинской пород лошадей на основании результатов ISSR-анализа.

3) Определить нуклеотидную последовательность фрагментов гипервариабельного района мтДНК монгольской, алтайской, забайкальской, бурятской и тувинской пород лошадей.

4) Оценить генетическое разнообразие и филогенетическое сходство исследуемых пород лошадей.

5) Провести типирование изучаемых образцов по гену миостатина (*MSTN*), оценить частоты нуклеотидных замен и генотипов и сравнить их с частотами у других изученных пород.

Научная новизна

Впервые проведена оценка информативности ISSR-маркеров, разработанных с использованием праймеров к динуклеотидным и тринуклеотидным повторам, для изучения генетического разнообразия пород лошадей. Показано, что для исследования генофондов лошадей наиболее информативны ISSR-маркеры, полученные на основе тринуклеотидных, а не динуклеотидных микросателлитных повторов, которые более информативны для всех других домашних копытных.

Впервые проведена оценка генетического разнообразия аборигенных пород лошадей Саяно-Алтайского региона (монгольской, алтайской,

забайкальской, астраханской, бурятской и тувинской пород) с использованием ISSR-анализа. Показан высокий уровень генетического разнообразия (по Нею) алтайской популяции «Амальдива» и тувинских лошадей из хозяйств «Ямаалыг» и «Кошкорлыг».

Впервые определены нуклеотидные последовательности D-петли мтДНК местных пород лошадей РФ и были выявлены гаплотипы, идентичные древним гаплотипам лошадей Китая и Монголии, среди монгольской, забайкальской и тувинской пород лошадей. В целом показан высокий уровень полиморфизма мтДНК в изученных выборках при сравнению с ранее исследованными популяциями.

Впервые у аборигенных пород лошадей продемонстрировано наличие С-варианта однонуклеотидной замены (SNP: g.66493737C/T) в первом интроне гена миостатина, ассоциированного с высокими скоростными качествами лошадей, с частотами от 0,03 до 0,26 (средняя частота 0,11).

Практическая значимость

Предложенный в данной работе подход для оценки консолидированности популяций (табунов) и чистопородности племенных животных с использованием разработанных ISSR-маркеров является высокоэффективным инструментом в селекции сельскохозяйственных животных и может быть использован для паспортизации пород и популяций (табунов), сертификации генофондных и племенных хозяйств, при восстановлении редких и исчезающих пород. Уже в настоящее время данный подход нашел свое применение в коневодстве и был использован при проведении молекулярно-генетической экспертизы табунов лошадей из 18 хозяйств, претендующих на получение статуса генофондного хозяйства (Результаты молекулярно-генетической экспертизы переданы в Минсельхоз РФ).

Типирование однонуклеотидной замены (SNP: g.66493737C/T) в первом интроне гена миостатина позволяет оценивать скоростные качества лошадей, что может быть использовано для выведения лошадей с высокими скоростными характеристиками или для оценки потенциала скаковых лошадей. На основе данной нуклеотидной замены разработана и запатентована тест-система (Equinome Ltd, Ireland, http://www.equinome.com/).

Апробация результатов

Основные результаты работы были представлены на 7-ой международной научной конференции-школе «БиоТехЖ-2008» (Дубровицы, 2008), на V съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященного 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина (Москва, 2009), на международной

молодежной конференции «Популяционная генетика: современное состояние и перспективы», посвященной памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова (Москва, 2011), на 62nd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (Ставангер, Норвегия, 2011).

Декларация личного участия автора

Автор участвовала в экспедиции по сбору образцов на Горном Алтае, самостоятельно получила ДНК исследуемых пород лошадей, провела ISSR анализ исследуемых образцов, получила нуклеотидные последовательности D-петли мтДНК, провела типирование однонуклеотидной замены (SNP: g.66493737C/T) в первом интроне гена миостатина для исследуемых популяций лошадей. Автор лично проводила статистическую обработку полученных результатов и оформляла результаты в виде статей. Построение сетей NeighborNet проведено совместно с к.б.н. Коноваловым Ф.А., ISSR анализ в программе STRUCTURE совместно со Столповским К.Ю.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 137 страницах и содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследования и их обсуждение, выводы, список использованной литературы, включающий 162 источника, и приложения. Работа иллюстрирована 32 рисунками и 14 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материал. В работе были изучены 15 выборок лошадей монгольской (пустыня Гоби n=48, северная Монголия n=51, Дархан n=48, центральная Монголия n= 24), алтайской («Амальдива» n=20, «Джумбаев» n=25, «Чингиз» n=50, «Энчи» n=52), бурятской (n=38), тувинской («Арыг-Хем» n=35, «Донгак» n=36, «Ямаалыг» n=58, «Кошкорлыг» n=56) забайкальской (n=50) и астраханской (n=50) пород. Образцы крови монгольских лошадей были получены во время экспедиции в 2008 году по Монголии, осуществлённой сотрудниками лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен РАН при содействии доктора Цэндсурэн Цэдев, сотрудника Института биологии МАН. Образцы крови алтайских лошадей были получены во время экспедиции в 2010 году по Горному Алтаю, организованной в.н.с. лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен РАН, д.б.н. Столповским Ю.А. Образцы крови бурятских лошадей были собраны во время экспедиции с.н.с. лаборатории сравнительной генетики животных, к.б.н. Каштанова С.Н. Образцы крови

лошадей получены из следующих фермерских хозяйств: УМСХП «Аксарайский», Астраханская область; Сельскохозяйственный кооператив «Арыг-Хем» Барун-Хемчикского кожууна Республики Тыва; Крестьянско-фермерское хозяйство «Донгак Д.В.» Кызылского Республики Тыва; Сельскохозяйственный производственный кооператив «Кошкорлыг» Республики Тыва; Сельскохозяйственный производственный кооператив «Ямаалыг» Республики Тыва; СПК «Победа», Еравнинский район, Бурятия, и были любезно предоставлены ООО «СКС-ТЕСТ».

Методы. Геномную ДНК выделяли из крови лошадей, используя набор Diatom™ Prep200 и Magna Prep 200 (Лаборатория Изоген, Москва) согласно инструкции изготовителя. Реакцию амплификации проводили с использованием «сухого» набора реагентов для ПЦР «GenePak™ PCR Core» согласно прописи фирмы-изготовителя (Лаборатория Изоген, Москва).

ISSR анализ. Электрофоретическое разделение продуктов ISSR ПЦР в агарозном геле проводили по стандартной методике (Маниатис и др.,1984). Размер и количество фрагментов в полученных ISSR-ампликонах определяли с использованием программы «GelPro» v3.1. С помощью программы «Excel» были созданы бинарные матрицы, в которых наличие и отсутствие каждого фрагмента в паттерне отмечалось цифрами 1 и 0 соответственно. Вычисления частот фрагментов, доли полиморфных локусов, индексов генетического разнообразия по Нею (Nei, 1973) проводили в программе PopGene 1.32. Полиморфное информационное содержание (PIC) для каждого праймера вычисляли суммированием индивидуальных индексов PIC каждого фрагмента: $\text{PIC} = \sum_{1}^{k}(1-p^2-q^2)$, где p, q – частоты фрагментов, k- число фрагментов (Vijayan, 2003). При помощи программы «STATISTICA 6.0 for Windows StatSoft, Inc.» было построено пространство главных компонент на основании генетических расстояний по формуле Нея и Ли (1979), рассчитанных в программе PopGene 1.32.

Получение нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК. Для очистки продуктов ПЦР контрольного региона мтДНК их фракционировали в 1% агарозном геле (смесь 1:1 легко- и тугоплавкой агарозы) с использованием в качестве маркера молекулярных масс 1kb DNA Ladder Plus Gene Ruler^{tm} (фирма «Fermentas», Канада). Экстракцию продуктов ПЦР из геля проводили с использованием набора Get Quick Gel Extraction Spin Kit/250 (Genomed^{tm}, Германия) и фирмы «Омникс» (Санкт-Петербург) по методике фирм

изготовителей. Определение нуклеотидной последовательности в исследуемом фрагменте проводили методом автоматического секвенирования на генетическом анализаторе ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США) с использованием наборов Big DyeTM Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem, США). Выравнивание последовательностей гипервариабельного района мтДНК осуществляли при помощи программы ClustalW и обрабатывали вручную с использованием программы ChromasPro Technelysium Pty Ltd (version 1.34). Для обработки данных нуклеотидных последовательностей использовали также програмный 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). Последовательности митохондриальной ДНК лошади, анализированные ранее в статье (Cieslak et al., 2010) с номерами записей из таблиц S2 и S11, были получены из базы данных GenBank в формате FASTA с помощью Perl-скрипта на основе модулей BioPerl. Последовательности были объединены в единый файл формата FASTA вместе с полученными в настоящей работе.

Типирование g.66493737C>T SNP проводилось с использованием набора TaqMan® Sample-to-SNP™ Kit Protocol (Applied Biosystems), на приборе StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Расчёт частот нуклеотидных замен и генотипов гена миостатина осуществлялся с использованием программы «Excel».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение информативности различных ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия лошадей

Анализ спектров продуктов амплификации участков, расположенных между инвертированными повторами микросателлитных локусов, использовался для выявления межвидовых и межпородных различий крупного рогатого скота (подсем. Bovinae) (Глазко и др., 1999; Ахани Азари и др., 2006; Сулимова, Ахани Азари, 2006; Столповский и др., 2011), яков (Ахани Азари и др., 2006), овец (Столповский и др., 2010а), оленей (Кол, Лазебный, 2006) и других видов. В данной работе метод ISSR-анализа был впервые применен для изучения популяций аборигенных пород лошадей. Оценку информативности различных ISSR маркеров проводили на выборках лошадей монгольской (n=31, Монголия, район Хувсугул, фермерское хозяйство Улаан-Цуя), тувинской (n=40, республика Тыва, Кызылский район, ООО Конный завод «Сяньби-Магнут») и бурятской пород (n=15, республика Бурятия, КФХ «Новососновка»)

с целью подбора наиболее подходящих маркеров и оптимизации условий ПЦР. При изучении крупного рогатого скота и других копытных успешно применяются ISSR-маркеры на основе динуклеотидных повторов (Столповский и др, 2009; Городная, Глазко, 2003; Ахани-Азари и др., 2006; Столповский и др., 2011). В этой связи первоначальные исследования генетического разнообразия лошадей также проводились с использованием праймеров, комплементарных к динуклеотидным повторам. Однако нами была показана низкая информативность маркеров данного типа для исследования популяций лошадей по причине низкого числа амплифицируемых фрагментов (табл. 1). Использование ISSR-праймеров к тринуклеотидным повторам позволило получить спектр с большим числом фрагментов, в том числе и полиморфных. Таким образом, установлено, что число ампликонов в спектрах ISSR-маркеров на основе динуклеотидных повторов ниже, чем в спектрах ISSR-маркеров на основе тринуклеотидных повторов.

Таблица 1. Характеристика ISSR-маркеров, разработанных на основе ди- и тринуклеотидных микросателлитных повторов.

ISSR-маркеры	Общее число локусов	Среднее число локусов на особь	Доля полиморфных локусов (%)	Дисперсия	PIC*
ISSR-маркеры на основе динуклеотидных повторов					
GA-ISSR	10	8,16	80,00	2,06	1,46
AG-ISSR	6	5,88	33,00	0,19	0,36
CA-ISSR	12	10,73	6,25	0,30	0,57
ISSR-маркеры на основе тринуклеотидных повторов					
GAG-ISSR	20	13,33	95,00	0,23	3,61
ACC-ISSR	18	14,85	94,50	6,76	2,50
CAC-ISSR	15	13,95	12,50	0,77	0,78

GAG-ISSR-маркер и ACC-ISSR-маркер отличаются самыми высокими значениями полиморфного информационного содержания (3,61 и 2,50), что делает их оптимальными маркерами, среди исследованных нами, для изучения генетического разнообразия лошадей. В дальнейшем в нашей работе были использованы именно эти два ISSR-маркера.

Оценка генетического разнообразия лошадей с использованием ISSR-фингерпринтинга

В нашей работе впервые с помощью межмикросателлитного анализа (ISSR-фингерпринтинга) с использованием двух праймеров $(ACC)_6G$ и $(GAG)_6C$ к микросателлитным локусам (TGG)n и (CTC)n была исследована генетическая изменчивость 641 лошади из 15 выборок шести пород (четырех из Монголии, четырех из Алтая, четырех из Тывы, одной из Бурятии, одной из Забайкалья и одной из Астрахани).

Для более точной оценки длин выявленных ISSR-фрагментов на основании сравнительного анализа спектров продуктов амплификации ДНК у различных видов сельскохозяйственных животных (в том числе были привлечены и данные ISSR-анализа, полученные в данной работе) была разработана универсальная шкала, где применена градация фрагментов ДНК по молекулярным массам (Столповский и др., 2010-а; Столповский и др., 2010-б; Столповский и др., 2011). В зависимости от зоны («тяжелые», «средние» и «легкие» фрагменты) использовался определенный шаг от 10 до 200 п.н. В результате было выделено 38 зон с фиксированным интервалом, которые позволяют достаточно точно определять молекулярную массу для 38 ПЦР-продуктов разной длины и стандартизировать результаты анализа. Размеры и обозначения ПЦР-продуктов приведены в таблицах 2 и 3. Поскольку данная шкала разрабатывалась как универсальная шкала для мониторинга генофондов различных видов сельскохозяйственных животных с использованием ISSR-PCR маркеров, то у конкретных видов могут быть представлены не все ISSR фрагменты. Так у изученных пород лошадей при использовании ACC-ISSR праймера было выявлено 24 фрагмента (табл. 2), а при использовании GAG-ISSR праймера был выявлен 21 фрагмент (табл. 3).

Частоты встречаемости ISSR фрагментов сильно варьируют у различных популяций лошадей. Многие фрагменты с достаточно высокой частотой обнаруживаются у всех исследованных популяций, некоторые встречаются у одной или нескольких выборок. С использованием ACC-ISSR маркера был получен один фрагмент (A27 = 430-410п.н.), встречающийся у всех особей среди изученных популяций, а также четыре фрагмента (A16=870-820, A18=750-720, A23=550-530, A36=230-220), встречающиеся во всех изученных популяциях у большинства особей (табл. 2). С помощью праймера $(GAG)_6C$ у всех особей лошадей был обнаружен один фрагмент (G28=400-380) и три фрагмента (G12=1110-1060, G17=810-760, G20=670-640), встречающихся во всех изученных популяциях (табл. 3).

Таблица 2.Частоты встречаемости фрагментов, полученных с использованием ACC-ISSR праймера для 15 популяций лошадей.

Фрагменты	Индивидуальный размер фрагмента	Гоби-Монголия (n=48)	Сев. Монголия (n=51)	Дархан Монголия (n=48)	Центр.Монголия (n=24)	Амальдива Алтай (n=20)	Джумбаев Алтай (n=25)	Чингиз Алтай (n=50)	Энчи Алтай (n=52)	Астрахань (n=50)	Забайкалье (n=50)	Арыг-Хем Тыва (n=35)	Донгак Тыва (n=36)	Ямаалыг Тыва (n=58)	Кошкорлыг Тыва (n=56)	Бурятия (n=38)
A1	2500-2300															
A2	2100-2000															
A3	1900-1800															
A4	1750-1700															
A5	1650-1600															
A6	1550-1500															
A7	1450-1400	0,087	0,390		0,345	0,776	1,000									
A8	1350-1300	0,236	0,196		0,184	0,051	0,084			0,600	1,000	0,303	0,629	0,684	0,577	
A9	1290-1240	0,122		0,427		0,553	1,000			0,553		0,761	0,191	0,213	0,104	1,000
A10	1230-1180															
A11	1170-1120	1,000	1,000	0,711	1,000								1,000	1,000	1,000	
A12	1110-1060					0,684	0,434			1,000						0,064
A13	1050-1000	0,158	0,314	0,371	0,345	0,194				0,717		0,155	0,384	0,400	0,373	0,389
A14	990-940	0,011	0,010		0,024							0,059				
A15	930-880	0,388	0,406	0,323	0,244		1,000			1,000		0,029				1,000
A16	870-820	1,000	0,802	1,000	0,691	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,329
A17	810-760										0,010					0,275
A18	750-720	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,869	0,859	0,221	1,000
A19	710-680															
A20	670-640	0,856	0,860	1,000	0,789	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
A21	630-600															
A22	590-560															
A23	550-530	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,869	0,859	0,166	0,430
A24	520-500	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000		1,000	1,000	0,509	0,490	0,577	0,120
A25	490-470										1,000					
A26	460-440					0,025	0,020	0,010		0,020		0,014				0,106
A27	430-410	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1.000
A28	400-380	0,099						0,031			0,684	0,662				0,329
A29	370-360															
A30	350-340	0,371		1,000		0,106	0,062	0,031	0,452	0,800		0,014	0,257	0,213	0,198	0,163
A31	330-320	1,000	1,000	0,856	1,000	0,613	0,471	0,510	0,510	1,000	0,041	0,059	1,000	1,000	1,000	0,452
A32	310-300					0,500	0,152	0,576		0,200	0,755	0,761				0,842
A33	290-280	0,618		0,405		0,293	0,128	0,322	0,322		0,084	0,090	0,180	0,200	0,134	0,348
A34	270-260	0,355		0,196		0,329	0,128	0,471	0,307	0,351	0,084	0,044	0,090	0,095	0,280	0,078
A35	250-240															
A36	230-220	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,600	0,761	1,000	1,000	1,000	1,000
A37	210-200															
A38	180-160															

Таблица 3. Частоты встречаемости фрагментов, полученных с использованием GAG-ISSR праймера для 15 популяций лошадей.

Фрагменты	Индивидуальный размер фрагмента	Гоби-Монголия (n=48)	Сев. Монголия (n=51)	Дархан Монголия (n=48)	Центр.Монголия (n=24)	Амальдива Алтай (n=20)	Джумбаев Алтай (n=25)	Чингиз Алтай (n=50)	Энчи Алтай (n=52)	Астрахань (n=50)	Забайкалье (n=50)	Арыг-Хем Тыва (n=35)	Донгак Тыва (n=36)	Ямаалыг Тыва (n=58)	Кошкорлыг Тыва (n=56)	Бурятия (n=38)
G1	2500-2300															
G2	2100-2000															
G3	1900-1800															
G4	1750-1700		1.000	0.856	1.0000	1.000	1.000									1.000
G5	1650-1600															
G6	1550-1500									1.000						
G7	1450-1400		1.000	1.0000	0.796	1.000	1.000									1.000
G8	1350-1300	0.236				0.613		1.000	1.000	0.800						1.000
G9	1290-1240															
G10	1230-1180	1.000	1.000	1.0000	1.000		1.000			1.000						
G11	1170-1120										0.531					
G12	1110-1060	1.000	1.000	0.7500	0.711	1.000	0.654	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
G13	1050-1000	1.000	1.000	0.8557	0.796	1.000	0.800	1.000	1.000	0.800	0.117		0.057	0.035	0.055	1.000
G14	990-940															
G15	930-880						0.106				0.200					
G16	870-820		0.0712		1.000											
G17	810-760	1.000	0.515	1.0000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.859	0.391	0.764	0.492	0.557	1.000
G18	750-720			0.0758					0.471							
G19	710-680															
G20	670-640	1.000	1.000	1.0000	1.000	0.776	0.717	0.800	0.800	1.000	0.576	0.439	0.592	0.459	0.622	1.0000
G21	630-600	0.856	0.358	1.0000	1.000				0.010	1.000	1.000					0.842
G22	590-560	1.000	1.000	1.0000	1.000	0.684	0.717	0.800	1.000		1.000	0.831	1.000	1.000	0.866	1.000
G23	550-530					1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
G24	520-500	0.339	1.000	1.0000	1.000	0.776	0.717	1.000	0.800	1.000		1.000	1.000		1.000	1.000
G25	490-470			0.1220	1.000			1.000								
G26	460-440															
G27	430-410															
G28	400-380	1.000	1.000	1.0000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
G29	370-360															
G30	350-340	1.000		1.0000		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
G31	330-320															
G32	310-300				1.000						0.238	0.106	0.529	0.246	0.418	
G33	290-280															
G34	270-260															
G35	250-240															
G36	230-220															
G37	210-200															
G38	180-160															

Таблица 4. Генетическое разнообразие по Нею (1973) у исследованных пород лошадей по данным ISSR-анализа.

	Бурятия	Тыва Арыг-Хем	Тыва Донгак	Тыва Ямаалыг	Тыва Кошкорлыг
GAG-ISSR	0,025	0,063	0,063	0,062	0,078
ACC-ISSR	0,099	0,117	0,096	0,127	0,122
	Забайкалье	Астрахань	Монголия Гоби	Северная Монголия	Центральная Монголия
GAG-ISSR	0,092	0,028	0,046	0,048	0,046
ACC-ISSR	0,070	0,105	0,138	0,095	0,100
	Монголия Донгак	Алтай Амальдива	Алтай Джумбаев	Алтай Энчи	Алтай Чингиз
GAG-ISSR	0,053	0,070	0,095	0,072	0,028
ACC-ISSR	0,119	0,156	0,083	0,077	0,086

С использованием данных ISSR анализа было рассчитано генетическое разнообразие по Нею (1973) для изученных популяций в программе PopGene v.1.32. ACC-ISSR маркер позволяет выявить больше фрагментов, в том числе и полиморфных, что отражается в более высоких значения генетического разнообразия. По GAG-ISSR маркеру самый высокий уровень генетического разнообразия был отмечен для алтайской «Джумбаев» и забайкальской популяций, наименьший – для бурятской, астраханской и алтайской популяции «Чингиз». По данным ACC-ISSR маркера наибольшее значение генетического разнообразия было получено для алтайской популяции «Амальдива» и монгольской Гоби, а также для двух тувинских популяций («Кошкорлыг» и «Ямаалыг»). Наименьшие значения были получены для забайкальской популяции и трех алтайских («Джумбаев», «Энчи» и «Чингиз»).

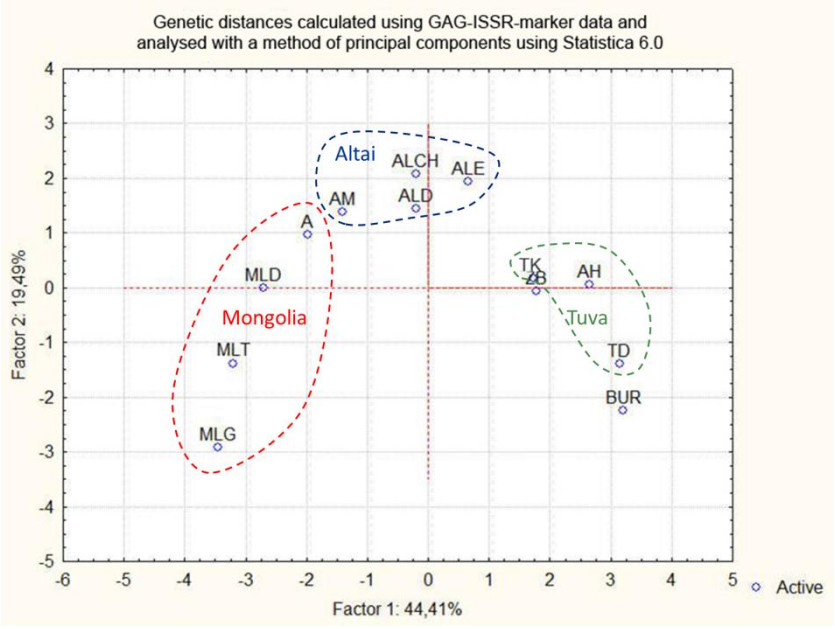

Рисунок 1. Распределение выборок в пространстве главных компонент, построенном в программе Statistica 6.0 по данным GAG-ISSR маркера.

С использованием метода главных компонент по генетическим расстояниям, рассчитанным по данным GAG- и ACC-ISSR анализа, были получены схожие картины. На рисунке 1 видно, что монгольские, алтайские и тувинские популяции образуют отдельные группы. Забайкальская популяция попала в тувинскую группу, бурятская также оказалась к ней ближе. Монгольская лошадь из пустыни Гоби располагается достаточно дискретно даже внутри группы монгольских популяций, демонстрируя высокую степень консолидированности, что может быть связано с сильно отличными от остальных популяций условиями обитания и изоляцией. Наибольшие различия по обоим маркерам отмечены между монгольской лошадью из пустыни Гоби и бурятской популяцией, что также свидетельствует в пользу теории об их генетическом отличии в силу разнящихся геолого-климатических условий обитания. Монгольские и алтайские группы расположены рядом, что может свидетельствовать об их близком генетическом родстве, даже более тесном чем между ними и тувинской группой.

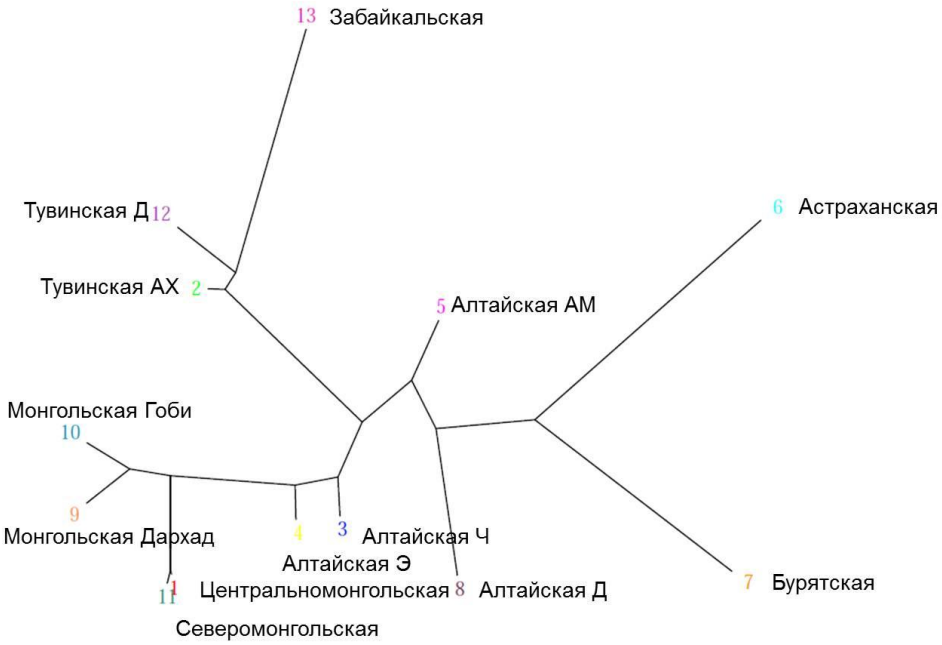

Рисунок 2. Дендрограмма, построенная на основе популяционно-статистической обработки данных ACC-ISSR анализа с использованием программы STRUCTURE v2.3.3.

В программе STRUCTURE v2.3.3. по данным ACC-ISSR анализа была построена дендрограмма (рис. 2), топология которой оказалась схожа с дендрограммой, построенной по даным GAG-ISSR анализа. Аналогично картине, полученной с использованием метода главных компонент, алтайская группа на дендрограмме занимает промежуточное положение между монгольской и тувинской, при этом расположена ближе к монгольской группе. Монгольская лошадь из пустыни Гоби занимает самую дальнюю ветвь среди

монгольского кластера. Забайкальская популяция вновь попадает в группу тувинских лошадей. Бурятская и астраханская популяции образуют отдельные ветви от остальных групп. Таким образом, можно считать забайкальскую популяцию наиболее генетически родственной тувинской породе, бурятская же и астраханская сильно отличаются от остальных популяций.

Для разведения и сохранения генофондов отечественных пород лошадей необходимы знания об их генетической и популяционной структуре. До недавнего времени возможность применения ISSR анализа в данных целях была ограничена небольшим числом программных пакетов, пригодных для анализа доминантных типов маркеров. Однако в 2007 году появилась новая версия компьютерной программы STRUCTURE v 2.2, позволяющая работать с маркерами доминантного типа (RAPD, AFLP и ISSR) (Negrini et al., 2007).

В программе STRUCTURE были смоделированы различные структуры выборок, которые характеризуются рядом частот фрагментов ISSR локусов. Вычислительные возможности программы STRUCTURE позволяют выявить наличие субпопуляций в исследуемой популяции и наглядно продемонстрировать отношение конкретных особей ко всей выборке, выявлять гибридных и чужеродных особей, а также определять сходство популяций и исследовать родословные (Pritchard et al., 2000). Особи внутри выборки формируют кластеры – один, в случае если популяция однородна, два и более, если генотипы особей указывают на то, что популяция гетерогенна. Каждая особь в массиве данных представлена на гистограмме отдельным вертикальным столбцом (рис. 3).

На рисунке 3 показаны результаты анализа генетической структуры исследуемых популяций лошадей по данным ACC-ISSR анализа в программе STRUCTURE. GAG-ISSR маркер оказался менее информативным при анализе генетической структуры вследствие более равномерного распределения фрагментов и их частот внутри популяций. В астраханской, забайкальской и двух алтайских популяциях («Амальдива» и «Джумбаев») наблюдается общая однородность структуры, за исключением отдельных особей – одна помесная особь в популяции «Амальдива», несущая кластер характерный для тувинской породы, и одна в забайкальской популяции. Некоторые популяции, вероятно, были получены путем скрещивания двух линий, что приводит к появлению в целом однородной картины, сформированной из двух кластеров (центральномонгольская, северномонгольская, тувинская «Арыг-Хем» и «Донгак», алтайская «Чингиз» и «Энчи»). Неоднородный генетический состав (см. разноцветно окрашенные столбцы) был отмечен для двух монгольских выборок – из пустыни Гоби и Дархана, причем три особи из Дархана имеют кластеры (оранжевого цвета) характерные для алтайской породы.

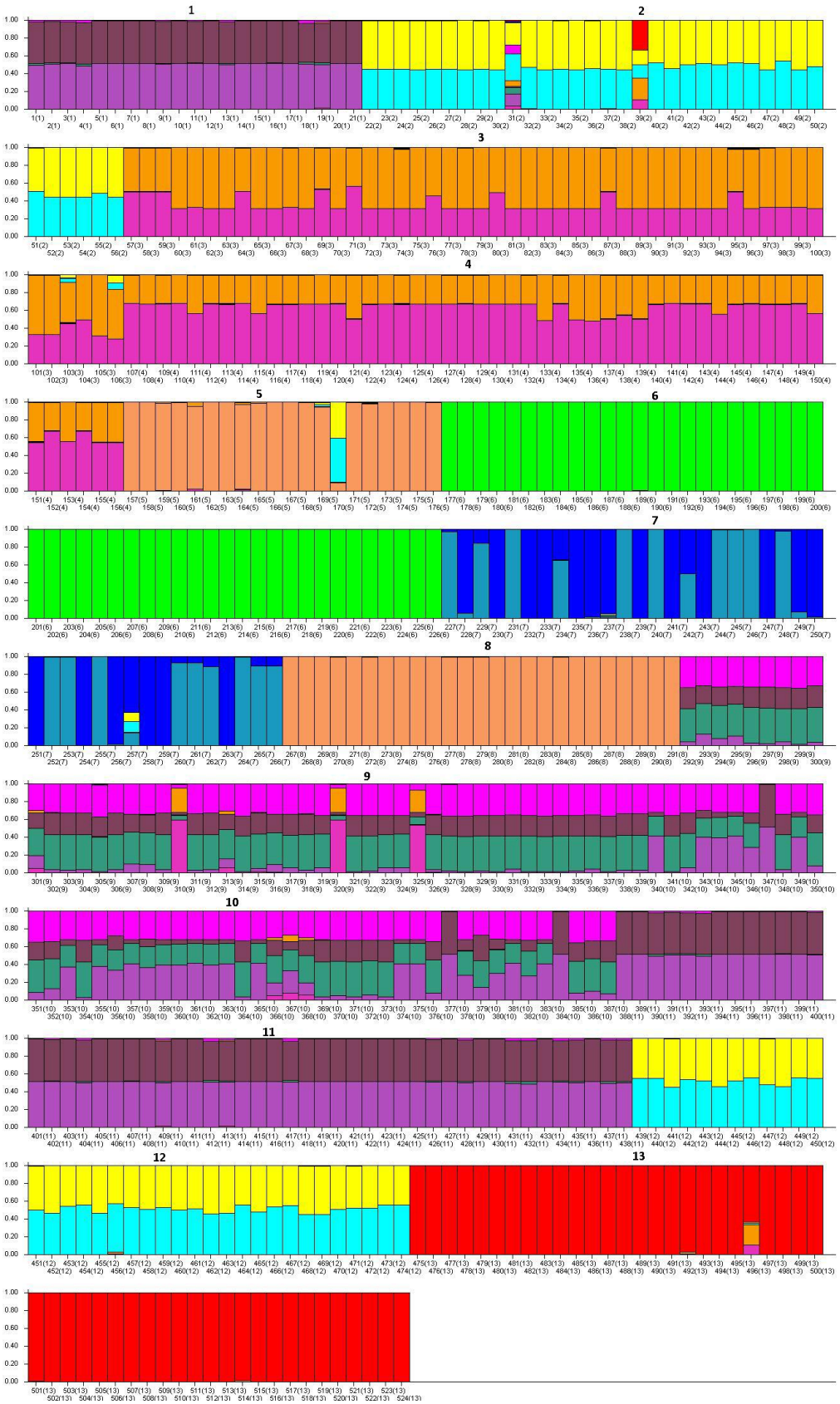

Рисунок 3. Анализ популяционной структуры в программе STRUCTURE 2.2.3 (K=13) по данным ACC-ISSR маркера. Номерами снизу обозначены популяции: 1 – центральномонгольская, 2 – тувинская «Арыг-Хем», 3 – алтайская «Чингиз», 4 – алтайская «Энчи», 5 – алтайская «Амальдива», 6 – астраханская, 7 – бурятская, 8 – алтайская «Джумбаев», 9 – монгольская Дархан, 10 – монгольская Гоби, 11 – северомонгольская, 12 – тувинская «Донгак», 13 – забайкальская

В бурятской выборке имеются особи с различной генетической структурой (однородно окрашенные столбцы двух разных цветов), что вероятно связано с недавним слиянием двух независимых популяций, т.к. всего несколько особей являются гибридными вариантами кластеров двух цветов. Одна лошадь из бурятской выборки несет характерный для тувинской породы кластер (желто-бирюзового цвета). Две алтайские популяции «Чингиз» и «Энчи» имеют схожие картины генетической структуры, что может свидетельствовать об общности происхождения и генетическом обмене между ними, т.к. они расположены в соседних хозяйствах.

Полученные молекулярно-генетические данные могут служить критериями для определения следующих фундаментальных параметров селекционных достижений в области коневодства: породной принадлежности, отличимости, консолидированности и стабильности породы, что крайне важно при регистрации новых пород (селекционных достижений), чистопородном разведении или сохранении породы как резерва определенных наследственных качеств. ISSR анализ используется фирмой ООО «СКС-ТЕСТ» на базе НИЦ Института Общей Генетики им. Н.И. Вавилова РАН согласно лицензии МСХ РФ № 000020 ПЖ 77 регистрационный код 774500701000 для проведения молекулярно-генетической экспертизы популяций лошадей для установления или подтверждения ее генофондного статуса. На данный момент статус генофондного хозяйства был получен 18 хозяйствами, разводящими лошадей алтайской, тувинской и кушумской породы.

Анализ нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК лошадей

Были определены нуклеотидные последовательности контрольного региона (D-петли мтДНК), отличающегося высокой скоростью мутирования и способностью отражать демографические изменения популяции (цит. по Холодова и Приходько, 2006), для 142 образцов из 6 выборок лошадей (трех монгольских: из пустыни Гоби, центральной и северной Монголии; тувинской «Арыг-Хем», забайкальской и бурятской). При секвенировании каждая последовательность считывалась с обоих концов. В анализе рассматривались нуклеотидные замены, встречающиеся более чем у 4 образцов. После обработки длина полученных нуклеотидных последовательностей составила 398 п.н. (15399-15796п.н., нумерация соответствует референтной последовательностью мтДНК NC_001640, GenBank). Нуклеотидные последовательности отправлены в базу данных GenBank, номера с JQ936335 по JQ936476. В сравнительном анализе с последовательностями из базы данных длина последовательностей составила 245п.н. Полученные результаты представлены в таблице 5 (жирным шрифтом выделены полученные нами нуклеотидные последовательности).

Таблица 5. Характеристики полученных нуклеотидных последовательностей в области D-петли мтДНК.

N	**Монг. Гоби**	**Север. Монголия**	**Центр. Монголия**	**Тыва**	**Забайкалье**	**Бурятия**	Фулани	Ахалтекинская	Анатолийская	Арабская	Берберийская	Норв. фьордовая	Якутская	Вятская
Образцов	**25**	**26**	**20**	**25**	**24**	**22**	9	19	17	21	21	9	15	15
Транзиций	**27**	**17**	**16**	**26**	**21**	**25**	13	13	17	17	22	18	20	15
Трансверсий	**2**	**2**	**0**	**1**	**0**	**2**	0	0	0	0	0	0	0	0
Замен	**29**	**19**	**16**	**27**	**21**	**27**	13	13	17	17	22	18	20	15
Сайтов с уникальными заменами	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	**0**	2	0	0	2	0	0	2	1
Нуклеотидное разнообразие	**0,025 +/- 0,014**	**0,021 +/- 0,012**	**0,024 +/- 0,014**	**0,028 +/- 0,015**	**0,024 +/- 0,013**	**0,025 +/- 0,014**	0,026 +/- 0,015	0.017 +/- 0,009	0,021 +/- 0,012	0,013 +/- 0,008	0,022 +/- 0,012	0,024 +/- 0,014	0,022 +/- 0,012	0,018 +/- 0,011

N	Исландская	Корейская чейю	Китайская дебао	Эксмур пони	Польский коник	Шотландский пони	Дуэлменер	Лузитано	Соррайа	Гаррано	Маремано	Сицилийская	Поттока	лошадь Пржевальского
Образцов	7	21	21	12	5	15	9	10	10	5	11	11	3	2
Транзиций	16	19	24	20	11	21	10	20	3	16	12	24	10	0
Трансверсий	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Замен	16	19	24	20	11	21	11	20	3	16	12	24	10	0
Сайтов с уникальными заменами	0	1	6	3	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0
Нуклеотидное разнообразие	0,025 +/- 0,015	0,020 +/- 0,011	0,024 +/- 0,013	0,024 +/- 0,014	0,025 +/- 0,016	0.028 +/- 0,015	0,011 +/- 0,007	0,031 +/- 0,018	0,007 +/- 0,005	0,027 +/- 0,018	0,023 +/- 0,013	0,030 +/- 0,017	0,027 +/- 0,022	0,000 +/- 0,000

Примечание: собственные данные выделены жирным шрифтом.

В таблице 5 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 267, среди которых представлены все показанные авторами (Cieslak et al., 2010) 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 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 соррайа (0,007), которая находится на грани вымирания. Нуклеотидное разнообразие изучаемых популяций Саяно-Алтайского региона находится на высоком, не вызывающем опасения о статусе породы уровне (0,021-0,028). Обнаружены 4 горячие точки мутаций (15585, 15597, 15604 и 15650), которые уже были описаны в ряде работ (Jansen et al., 2002; Lei et al., 2009; Cieslak et al., 2010).

На основе полученных нуклеотидных последовательностей была построена дендрограмма (рис. 4) методом Neighbor Joining (Saitou, Nei, 1987) в программе MEGA 5.05. 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 (Zharkikh, Li, 1992a; Zharkikh, Li, 1992b; Zharkikh, Li, 1995) с использованием 1000 случайных выборок.

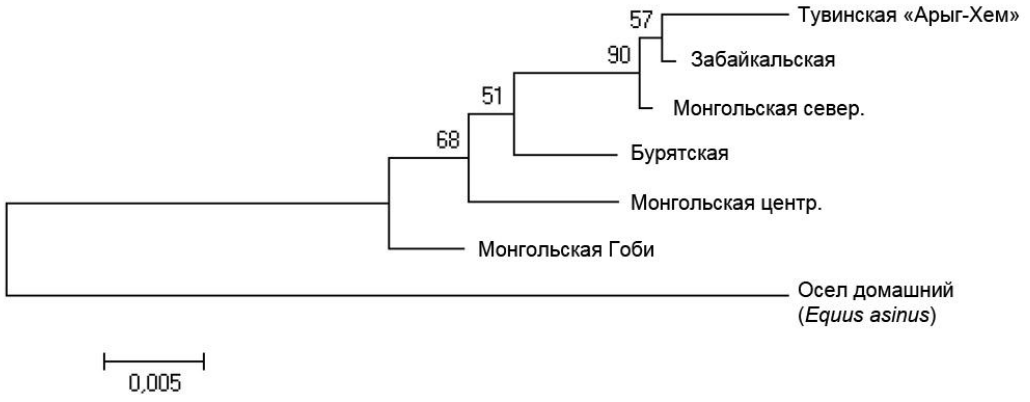

Рисунок 4. Дендрограмма, построенная методом Neighbor Joining в программе MEGA 4.3 по данным нуклеотидных последовательностей для шести популяций лошадей. Над ветвями указаны значения бутстрэп-поддержки > 50.

На дендрограмме (рис. 4) отдельно выделяется северный кластер пород – тувинской, забайкальской, северномонгольской и бурятской популяций. Промежуточное положение занимает центральномонгольская популяция и отдельно кластеризуется монгольская популяция из Гоби. Использование двух типов молекулярных маркеров (полиморфизм нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК и ISSR-маркеров) с привлечением разных методов статистического анализа данных позволило выделить монгольскую лошадь из пустыни Гоби в отдельную группу.

На основе 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 4.6.1.0 (Fluxus Technology Ltd, Великобритания) методом MJ (Median Joining, Bandelt et al., 1999) и алгоритма MP (Polzin et al., 2003), позволяющего убрать ненужные медианные векторы и связи (рис. 5). Все настройки были стандартными за исключением опции “frequency>1”, при использовании которой отражаются только гаплотипы, которые встречаются в выборке более одного раза.

Обозначения гаплотипов соответствуют приведенным в работе Cieslak et al., 2010. 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.

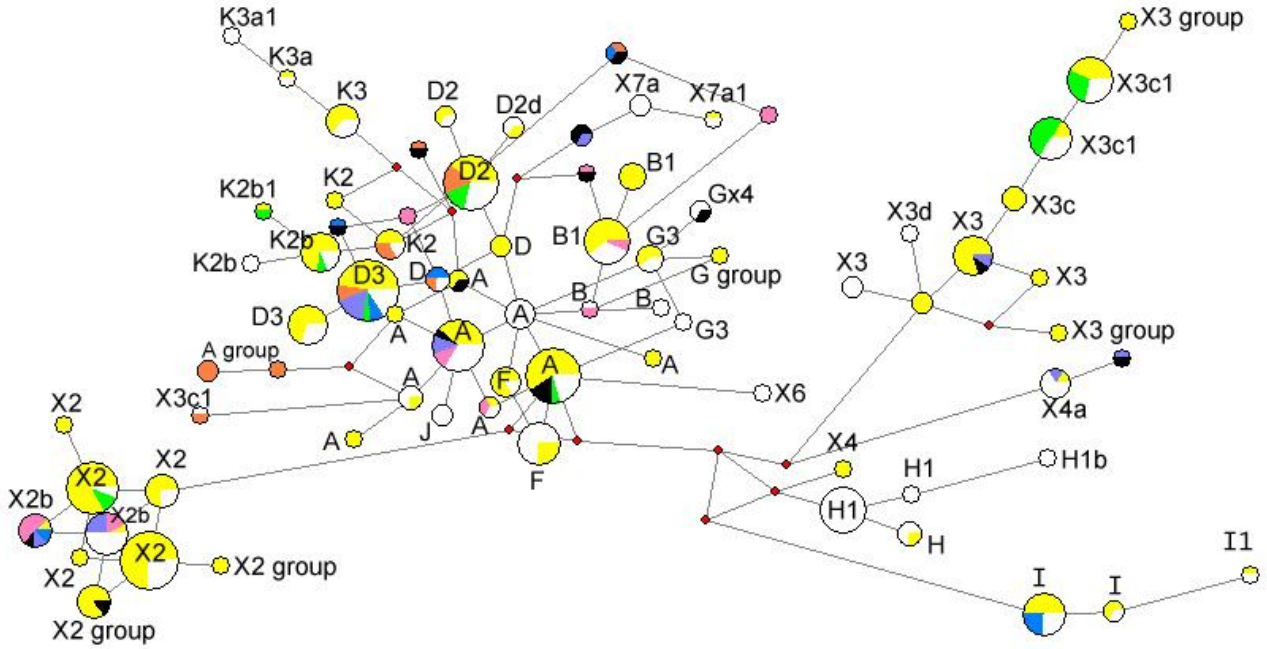

Рисунок 5. Медианная сеть на основе 409 нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК современных лошадей и 207 древних. Гаплотипы указаны рядом или внутри кругов. Цветами обозначены различные выборки: желтым – образцы из базы данных, белым – древние, черным – монгольская выборка из Гоби, оранжевым – северомонгольская, розовым – центральномонгольская, сиреневым – тувинская, зеленым – забайкальская, синим – бурятская.

Как видно из представленной медианной сети 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 центральномонгольских – X2b, A и B1; у северомонгольских – D2, D3 и K2. Как было показано Cieslak et al. (2010) большинство гаплотипов не привязано к определенной породе или географической области, в различных популяциях различается лишь набор и частоты гаплотипов. Вероятно, это связано с многократными событиями доместикации, благодаря которым мтДНК лошадей так высокополиморфна, а также активным перемещением и разведением лошадей человеком.

Изучение частоты встречаемости однонуклеотидной замены (g.66493737C>T) в первом интроне гена миостатина (*MSTN*)

Полиморфные варианты гена *MSTN*, кодирующего отрицательный регулятор мышечного роста миостатин, ассоциированы с гипертрофией мышц у различных млекопитающих (КРС, собак, мыши и человека). Группой ученых (Hill et al., 2010b) была обнаружена новая однонуклеотидная замена (g.66493737C>T) в первом интроне гена миостатина, достоверно ассоциированная ($P=4.85\times10^{-8}$) с лучшей дистанцией скачек среди выигравших элитных английских чистокровных лошадей. Животные с генотипом C/C по этому SNP больше приспособлены для коротких дистанций (1,000-1,600м), C/T – для средних дистанций (1,400-2,400м), T/T – для длинных дистанций (>2,000м). Анализ последовательностей в области SNP g.66493737C>T показал, что различные нуклеотидные замены могут приводить к появлению предположительного сайта связывания транскрипционного фактора Homeobox C8/Hox-3alpha и/или разрушению предполагаемых сайтов связывания следующих транскрипционных факторов: Distal-less homeobox 3, E2F и Pdx1 (Hill et al., 2010a).

С использованием метода Real-Time PCR Taqman были генотипированы различные популяции лошадей по мутации в гене миостатина (*MSTN*), приводящей к чрезмерному развитию мышц. Фенотип с сильно развитой мускулатурой и отличными спринтерскими качествами характерен для скаковых лошадей (английских чистокровных верховых - ЧКВ, четвертьмильных лошадей). ЧКВ были выведены путем скрещивания местных британских конематок с завезенными восточными жеребцами и с начала XVIII века подвергались интенсивной селекции с целью получения лучших скаковых лошадей (Lee et al., 2006). Представляло интерес выяснить, у предка из какой руппы пород впервые появилась эта мутация и распространилась вплоть до территории Англии и в дальнейшем Америки (Bower et al., 2012).

Таблица 6. Данные генотипирования образцов ДНК различных пород лошадей по локусу (g.66493737C>T) в гене миостатина

Популяция	Регион	n	Частота генотипов			Частота локусов	
			C/C	C/T	T/T	C	T
Equus asinus	Англия	40	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00
E.Grevyi, E.quagga boehmi	Чехия	2	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00
Др. лошадиные		*42*	*0,00*	*0,00*	*1,00*	*0,00*	*1,00*
Коннемара	Ирландия	22	0,05	0,09	0,86	0,09	0,91
Хайлэнд	Шотландия	21	0,05	0,09	0,86	0,10	0,90
Шотландский1	Шотландия	16	0,38	0,25	0,38	0,50	0,50
Шотландский2	Швеция	42	0,29	0,40	0,31	0,49	0,51
Британские острова		*101*	*0,20*	*0,25*	*0,55*	*0,32*	*0,68*
Ахалтекинская	Россия/ Туркменистан	18	0,00	0,11	0,89	0,06	0,94
Анатолийская	Турция	19	0,00	0,11	0,89	0,05	0,95
Арабская	Египет	30	0,03	0,10	0,87	0,08	0,92
Фулани	Камерун	18	0,11	0,44	0,44	0,33	0,67
Туркская	Туркменистан	15	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00
Средняя Азия и Сев. Африка		*100*	*0,03*	*0,15*	*0,82*	*0,10*	*0,90*
Алтайская	**Алтай**	**25**	**0,08**	**0,36**	**0,56**	**0,26**	**0,74**
Монгольская северная	**Монголия север**	**30**	**0,00**	**0,07**	**0,93**	**0,03**	**0,97**
Монгольская Гоби	**Монголия пустыня Гоби**	**25**	**0,00**	**0,20**	**0,80**	**0,10**	**0,90**
Забайкальская	**Сибирь**	**25**	**0,04**	**0,24**	**0,72**	**0,16**	**0,84**
Тувинская АХ	**Тыва**	**25**	**0,00**	**0,20**	**0,80**	**0,10**	**0,90**
Тувинская 1	**Тыва**	**29**	**0,00**	**0,14**	**0,86**	**0,07**	**0,93**
Якутская	**Якутия**	**18**	**0,00**	**0,06**	**0,94**	**0,03**	**0,97**
Азия		*177*	*0,02*	*0,18*	*0,80*	*0,11*	*0,89*
ЧКВ ≤1400м	GB/IRE/NZ/USA	69	0,46	0,46	0,07	0,70	0,30
ЧКВ ≥1800м	GB/IRE/NZ/USA	96	0,03	0,61	0,35	0,34	0,66
ЧКВ (Австр.)	Австралия	123	0,38	0,51	0,11	0,64	0,36
ЧКВ 1000-3000м	GB/IRE/NZ/USA	207	0,22	0,57	0,21	0,51	0,49
Франц. рысак	Франция	46	0,00	0,02	0,98	0,01	0,99
Исландская	Исландия	21	0,05	0,24	0,71	0,17	0,83
Ирландский тяжеловоз	Ирландия	30	0,07	0,27	0,67	0,20	0,80
Четвертьмильная	США	35	0,83	0,14	0,03	0,90	0,10
Стандартбредная	США/Канада	63	0,00	0,00	1,00	0,00	1,00

Примечание: собственные данные выделены жирным шрифтом.

Совместно с ирландскими коллегами из лаборатории Equine Science университета University College Dublin было осуществлено определение SNP (g.66493737C>T) в гене миостатина для изучаемых нами популяций аборигенных лошадей и других пород лошадей, а также ослов и зебр (табл. 6).

У зебры и осла не было обнаружено SNP g.66493737C, что позволяет сделать вывод о том, что более древним (диким типом) является именно Т-замена. Это согласуется с травоядным образом жизни диких лошадей, при котором им приходится преодолевать большие дистанции по равнинам в поисках лучших пастбищ.

У лошадей из Средней Азии и Северной Африки SNP g.66493737C встречается с частотой от 0,00 до 0,11 (средняя частота 0,03), таким образом, показано, что восточные лошади (в основном арабские) не являлись источником данной мутации при выведении английских чистокровных верховых (ЧКВ). Судя по представленным данным, именно местные британские конематки привнесли SNP g.66493737C в чистокровную верховую породу.

Рисунок 6. Частоты генотипов гена миостатина в различных выборках лошадей. Белым обозначен генотип C/C, черным C/T и серым T/T.

Среди алтайских, монгольских, тувинских и забайкальских лошадей мутантная замена «С» встречается с более низкой частотой (от 0,03 до 0,26, средняя частота 0,11), чем у британских пород. Лошади с генотипом «СС» практически не встречаются, за исключением одной лошади забайкальской породы и двух - алтайской, что свидетельствует о возможном давлении отбора. Скоростные качества для лошадей живущих фактически в естественных условиях обитания не являются ключевыми, гораздо важнее является выносливость и способность выжить в зачастую не легких условиях. Таким образом, скоростной SNP-маркер «С» стал преобладать (частота от 0,34 до 0,90) в породах скаковых лошадей после целенаправленного отбора человеком и не является типичным для диких популяций лошадей.

ВЫВОДЫ

1. ISSR-маркеры, разработанные с использованием праймеров к тринуклеотидным повторам, более информативны для исследования генофондов лошадей, чем маркеры на основе динуклеотидных повторов, в отличие от других видов сельскохозяйственных животных. Наиболее высокие значения полиморфного информационного содержания (PIC) были получены для ISSR-маркеров с праймерами $(GAG)_6C$ и $(ACC)_6G$ – 2,50 и 3,61 соответственно.
2. Наиболее высокий уровень генетического разнообразия (по Нею) показан для алтайской популяции «Амальдива» и тувинских лошадей из хозяйств «Ямаалыг» и «Кошкорлыг» среди 15 исследованных популяций шести пород лошадей (монгольской, тувинской, алтайской, забайкальской, бурятской и астраханской) по GAG- и ACC-ISSR маркерам. Сниженный уровень генетического разнообразия отмечен для бурятской, астраханской и алтайской популяции «Чингиз».
3. Выявлены гаплотипы мтДНК, идентичные древним гаплотипам лошадей Китая и Монголии среди монгольской, забайкальской, бурятской и тувинской пород лошадей при анализе нуклеотидной последовательности гипервариабельного контрольного региона мтДНК (D-петли) для 142 образцов из шести выборок (трех монгольских: из пустыни Гоби, центральной и северной Монголии; тувинской «Арыг-Хем», забайкальской и бурятской). В целом показан высокий уровень полиморфизма исследованных нуклеотидных последовательностей при сравнении с ранее изученными образцами (база данных GenBank).
4. Продемонстрирована высокая степень генетического отличия монгольской популяции из Гоби от остальных исследуемых популяций по совокупным данным анализа последовательностей D-петли мтДНК и ISSR-анализа, которая может являться результатом изоляции, искусственного и естественного отбора на фоне специфических условий обитания.
5. Впервые у аборигенных пород лошадей Саяно-Алтайского региона продемонстрировано наличие С-варианта однонуклеотидной замены (SNP: g.66493737C/T) в первом интроне гена миостатина, ассоциированного с высокими скоростными качествами лошадей, с частотами от 0,03 до 0,26 (средняя частота 0,11), хотя в естественной среде для лошадей более важным качеством является выносливость, а не скоростные качества.

ПУБЛИКАЦИИ

1. Сулимова Г.Е., Столповский Ю.А., Кол Н.В., Рузина М.Н., **Воронкова В.Н.**, Ахани Азари М., Лазебный О.Е. Применение межмикросателлитного анализа ДНК (ISSR-фингерпринтинга) для оценки консолидированности и чистоты пород сельскохозяйственных животных // 7-я Международная научная конференция-школа «БиоТехЖ-2008», 2008.

2. **Воронкова В.Н**., Сулимова Г.Е. Анализ генетического разнообразия лошадей турано-монгольского корня с использованием ISSR-фингерпринтинга // Материалы V съезда Вавиловского общества генетиков и селекционеров, посвященного 200-летию со дня рождения Чарльза Дарвина, Москва, 21-28 июня 2009 г, часть I, с.70.

3. **Voronkova V**. and Sulimova G. Estimation of the genetic diversity level in local populations of Turano-Mongolian horse breeds. Book of abstracts of the 62nd Annual Meeting of the European Federation of Animal Science. 2011. P. 186.

4. **Воронкова В.Н**., Сулимова Г.Е. Международная молодежная конференция «Популяционная генетика: современное состояние и перспективы» посвященная памятной дате – 75-летию со дня рождения академика Ю.П. Алтухова. 2011. С.198.

5.* Столповский Ю.А., Ахани Азари М., Евсюков А.Н., Кол Н.В., Рузина М.Н., **Воронкова В. Н**., Сулимова Г.Е. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров у пород крупного рогатого скота // Генетика. 2011. Т. 47, №2. С. 213-226

6.* Столповский Ю.А., Ахани Азари М, Евсюков А.Н., Кол Н.В., Рузина М.Н., **Воронкова В.Н**., Сулимова Г.Е. Дифференциация пород КРС с использованием данных мультилокусного межмикросателлитного анализа (ISSR) // Сельскохозяйственная биология. 2011. № 4. С. 36-45.

7.* **Воронкова В.Н**., Цэндсурэн Цэдэв, Сулимова Г.Е. Сравнительный анализ информативности ISSR-маркеров для оценки генетического разнообразия пород лошадей / Генетика. 2011. Т.47. №8. С. 1131-1134.

8. Сулимова Г.Е., Кол Н.В., Рузина М.Н., Столповский К.Ю., **Воронкова В.Н.**, Бояринцева И.С., Столповский Ю.А. Разработка универсального метода оценки генетического разнообразия и паспортизации пород и популяций доместицированных видов животных // Молекулярная и прикладная генетика. Сборник научных трудов. 2011. Т.12. С.19-27.

9.* Bower M.A., McGivney B.A., Campana M.G., Gu J., Andersson L.S., Barrett E., Davis C.R., Mikko S., Stock F., **Voronkova V**., Bradley D.G., Fahey A.G., Lindgren G., Machugh D.E., Sulimova G., Hill E.W. The genetic origin and history of speed in the Thoroughbred racehorse // Nature Communications. 2012. №3. doi:10.1038/ncomms1644.

* - статьи в журналах, рецензируемых ВАК.