

Структура генома, геномные технологии

УДК 636.1:575.174(571.56)

doi: 10.15389/agrobiol.2022.2.272rus

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ЛОКАЛЬНОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЛОШАДЕЙ ЯКУТСКОЙ ПОРОДЫ ПО ГЕНАМ *MC1R*, *ASIP*, *DMRT3* и *MSTN**Л.В. КАЛИНКОВА¹✉, А.М. ЗАЙЦЕВ¹, Р.В. ИВАНОВ²

Якутская порода лошадей считается одной из древнейших конских пород. Она обладает уникальными морфологическими характеристиками и хорошо приспособлена к выживанию за Полярным кругом. Якутские лошади имеют компактное телосложение и чрезвычайно густую зимнюю шерсть с длинной гривой и хвостом. В породе преобладают светлые масти — серая и саврасая, что служит естественной маскировкой. Якутская порода универсальна, поскольку местные лошади веками использовались не только для производства молока и мяса, но и в качестве транспортных животных. В настоящей работе впервые дана характеристика генетической структуры аборигенной якутской породы с использованием четырех ДНК-маркеров, имеющих селекционное значение в специализированных породах лошадей различного направления использования. Нашей целью было изучение полиморфизма генов *ASIP* и *MC1R*, детерминирующих пигментацию кожи и волос, а также оценка встречаемости мутаций генов *MSTN* (g.66493737C>T) и *DMRT3* (g.22999655C>A), ассоциированных с рабочими качествами домашних лошадей. Материалом для исследований служили образцы волос с луковицами из гривы от 45 взрослых чистопородных якутских лошадей (*Equus caballus*), в том числе 11 образцов от животных коренного типа и 34 образца от животных янского типа. ДНК выделяли из волосиных луковиц с помощью реагентов ExtraGene™ DNA Prep 200 (ООО «Лаборатория Изоген», Россия). Генотипирование по SNP-маркеру C>T гена *MC1R* осуществляли методом PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) согласно L. Marklund с соавт. (1996). Детекцию делеции 11 п.н. в локусе *ASIP* проводили по методу S. Rieder с соавт. (2001). Обозначения аллельных вариантов исследованных генов *MC1R* и *ASIP* соответствовали номенклатуре M. Reißmann (2009): *E* — доминантный аллель дикого типа, *e* — рецессивный (мутантный) аллель (*MC1R*); *A* — доминантный аллель дикого типа, *a* — рецессивный (мутантный) аллель (*ASIP*). SNP-мутацию в гене *MSTN* (g.66493737C>T) детектировали методом ACRS-PCR (amplification-created restriction site-PCR), предложенным M. Gábor с соавт. (2014). Генотипирование образцов ДНК по SNP-маркеру гена *DMRT3* (g.22999655C>A) осуществляли методом PCR-RFLP. Детекцию полиморфизма C>A в амплифицированном фрагменте ДНК проводили с использованием эндонуклеазы рестрикции HpyF3I («Thermo Scientific», Литва). Генетико-популяционный анализ осуществляли с определением частоты встречаемости аллельных вариантов исследуемых генов, частоты встречаемости генотипов в популяции и наблюдаемой гетерозиготности. При исследовании полиморфизма генов *ASIP* и *MC1R* было обнаружено преобладание у якутских лошадей аллельных вариантов, детерминирующих преимущественный синтез эумеланина, то есть более темного варианта пигмента. Частота встречаемости доминантного аллеля *E* гена *MC1R*, детерминирующего выработку черного пигмента эумеланина, составила 0,711. Доля гомозиготных носителей рецессивной мутации гена *MC1R* (аллель *e*), детерминирующей подавление синтеза пигмента эумеланина и преимущественный синтез красно-желтого пигмента феомеланина, — 13,3 %. Частота встречаемости доминантного аллеля *A* гена *ASIP*, ограничивающего синтез черного пигмента эумеланина и влияющего на характер его распределения, — 0,400. Гомозиготными носителями рецессивной мутации гена *ASIP* (аллель *a*) были 40 % исследованных якутских лошадей. Это относительно высокий показатель, поскольку в большинстве современных пород лошадей рецессивный аллель *a* гена *ASIP* встречается достаточно редко. В целом по двум ключевым генам, влияющим на пигментацию, у 45 животных идентифицировали восемь различных вариантов генотипа. Наиболее типичны для якутских лошадей генотипы *E/E-A/a* и *E/E-a/a*. При исследовании полиморфизма генов *DMRT3* и *MSTN*, влияющих на рабочие качества, было установлено, что частота встречаемости мутаций генов *DMRT3* (g.22999655C>A) и *MSTN* (g.66493737C>T) у протестированных якутских лошадей составила соответственно 0,011 и 0,022. Очевидно, присутствуя в популяции с небольшой частотой, мутантные варианты генов *DMRT3* и *MSTN* не имеют селекционного значения, так как исторически якутская лошадь служила людям в качестве транспортного животного в лесной и болотистой местности, где возможна езда верхом преимущественно шагом.

Ключевые слова: лошади, якутская порода, ДНК-маркеры, полиморфизм, *MC1R*, *ASIP*, *DMRT3*, *MSTN*, эумеланин, феомеланин, рабочие качества.

Якутская лошадь — самая северная порода в мире, отличающаяся от

* Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 19-76-20058).

других уникальными морфофизиологическими характеристиками (1). Эта древнейшая аборигенная порода сформировалась в экстремальных природно-климатических условиях Якутии — одного из наиболее холодных мест на Земле. Коренное население Якутии с незапамятных времен занималось разведением табунных лошадей, которые содержались на пастбищах, самостоятельно добывая подножный корм (2). В результате многовековой селекции местные лошади успешно приспособились к круглогодичному содержанию под открытым небом на естественных выпасах, используя растительность, которая в продолжительный зимний период находится под снежным покровом. Компактное телосложение якутских лошадей, их чрезвычайно густой волосяной покров и особенности метаболизма способствуют выживанию в экстремальных условиях Субарктики. Статус самостоятельной породы якутская лошадь получила в 1987 году (3). Порода универсальна, якутских лошадей используют на сельскохозяйственных работах, в качестве транспортных животных, в спорте, а также для производства мяса, кумыса, кожевенного и мехового сырья. В породе различают несколько внутривидовых типов (4).

Существует несколько гипотез о происхождении аборигенной якутской лошади (5). Р. Librado с соавт. (6) секвенировали и проанализировали полные геномы 11 якутских лошадей, включая девять современных животных и два ископаемых (один образец датировался началом XIX века, второй — 5200 лет до н.э.). Авторы пришли к выводу, что, вероятнее всего, современные якутские лошади — это потомки лошадей, приведенных якутским народом, который мигрировал в этот регион в XIII-XV веках. Основным механизмом, обеспечившим относительно быструю адаптацию животных к существованию в условиях Субарктики, были цис-регуляторные изменения в геноме. В отличие от мутаций в кодирующей области, которые могут привести к изменению структуры кодируемого белка, цис-регуляторные изменения способствуют адаптации популяции животных к экстремальным условиям за счет тонкой настройки экспрессии генов (6).

Развитие технологий молекулярной генетики предоставило новые возможности для детального изучения и сравнительного анализа геномов современных и ископаемых лошадей, позволяя реконструировать историю одомашнивания животных и формирования отдельных пород. Исследование древних геномов по полиморфизму генов, влияющих на пигментацию волос, показало, что в процессе доместикации лошади быстро увеличивалось разнообразие мастей, встречающихся в популяциях животных (7). Генотипирование образцов ДНК ископаемых лошадей на наличие 8 мутаций в 6 генах, детерминирующих масть, показало, что дикие лошади древних популяций характеризовались однотипностью окраски волосяного покрова. Напротив, быстрое и значительное увеличение разнообразия мастей среди древних лошадей наблюдалось как в Сибири, так и на территории Восточной Европы, начиная с 5-го тысячелетия до н.э., что связано с периодом одомашнивания (7).

Масть — один из наиболее значимых морфологических признаков домашних лошадей (8). Окраска волоса и кожи определяется пигментом меланином, представленным двумя основными формами — эумеланином (черный пигмент) и феомеланином (красно-желтый пигмент). Масть лошади определяется как количеством меланина, так и распределением его типов в покровных и защитных волосах (9). Пигментация кожи и волос у млекопитающих — это полигенный признак, определяемый суммарным действием большого количества генов, при этом ключевую роль играют

гены локусов *MC1R* и *ASIP* (10).

Ген *MC1R*, кодирующий меланокортиновый рецептор 1-го типа, локализован на 3-й хромосоме лошади и имеет два основных аллеля: доминантный аллель *E* детерминирует выработку пигмента эумеланина, рецессивный аллель *e* в гомозиготном состоянии подавляет синтез эумеланина и обуславливает синтез преимущественно красно-желтого пигмента феомеланина (9). Гомозиготные по рецессивному аллелю гена *MC1R* животные имеют рыжую масть. L. Marklund с соавт. (11) установили, что наследуемая по рецессивному типу мутация, детерминирующая рыжую масть у домашних лошадей, представляет собой однонуклеотидную замену С>Т в гене *MC1R* (11).

Ген *ASIP*, кодирующий агути-сигнальный белок, воздействует на выработку и распределение черного пигмента эумеланина, при этом доминантный аллель *A* дикого типа ограничивает синтез эумеланина и позволяет ему накапливаться лишь на определенных участках тела (в волосах ног, гривы и хвоста), детерминируя гнедую масть (9). В 2001 году S. Rieder с соавт. (12) установили, что рецессивный мутантный аллель *a* гена *ASIP*, не оказывающий влияния на распределение эумеланина и детерминирующий вороную масть, представляет собой делецию размером 11 п.н.

Благодаря совместному действию генов *MC1R* и *ASIP*, а также ряда генов-модификаторов, которые могут вызывать ослабление пигментации и появление в волосяном покрове примеси белых или темных волос, масти современных домашних лошадей характеризуются исключительно широкой вариабельностью (10). В некоторых современных заводских породах масть служит одним из основных отбираемых человеком признаков, при этом животные редких оригинальных мастей пользуются повышенным спросом у покупателей. Гены, детерминирующие масти аборигенных лошадей, веками разводимых методом круглогодичного табунного содержания, находились под значительным влиянием естественного отбора. В якутской породе лошадей в результате действия естественного отбора преобладают серая и саврасая масти (4, 13). М.Ф. Габышев (13) отмечает, что в полярных условиях светло-серая масть служит естественной защитой животных, делая их менее заметными для хищников на фоне зимней природы. Серая масть у лошадей представляет собой аутосомно-доминантный признак, при котором наблюдается прогрессирующее «поседение» покровных и защитных волос, при этом кожа остается пигментированной (10). В 2008 году было установлено, что фенотип серой масти у домашней лошади детерминируется дупликацией в интроне 6-го гена *STX17* размером 4,6 п.н., представляющей собой цис-регуляторную мутацию (14). Саврасая масть обусловлена доминантным геном *TBX3*, вызывающим снижение интенсивности пигментации волосяного покрова (15). Фенотип саврасых мастей также способствует эффективной визуальной маскировке животных на фоне природных ландшафтов.

Использование лошадей в качестве рабочих и транспортных животных оказало огромное влияние на развитие человеческой цивилизации. На протяжении тысячелетий домашние лошади использовались для верховой езды, при этом во многих культурах особо ценились животные, способные к движению комфортными для всадника аллюрами (иноходью) (16, 17). В наши дни во многих странах мира огромной популярностью пользуются породы лошадей, способных к альтернативным аллюрам.

L. Andersson с соавт. (18) установили, что ключевое влияние на характеристики локомоции у домашних лошадей оказывает однонуклеотидная замена С>А (chr23:22999655) в гене *DMRT3* (doublesex and mab-3 related

transcription factor 3) (18). Высокая частота встречаемости мутации гена *DMRT3* наблюдается в заводских и аборигенных породах, для которых характерны альтернативные аллюры (19). По мнению Е.А. Staiger с соавт. (20), мутация гена *DMRT3* (g.22999655C>A) могла появиться либо непосредственно перед одомашниванием, либо, что более вероятно, через некоторое время после одомашнивания лошади и впоследствии широко распространилась по всему миру вследствие интенсивного искусственного отбора (20). Установлено, что в узкоспециализированной стандартбредной породе, разводимой исключительно для участия в ипподромных бегах иноходцев и рысаков, мутантный аллель был полностью зафиксирован селекцией (19).

В отличие от стандартбредной породы, чистокровная верховая лошадь — узкоспециализированная заводская порода, эволюция которой проходила под давлением интенсивного искусственного отбора животных по способности к выдающейся резвости на галопе (21). Исследуя геном чистокровных верховых лошадей, Е.W. Hill с соавт. (22) выявили мутацию — однонуклеотидную замену в первом интроне гена миостатина (*MSTN*, g.66493737C>T), ассоциированную с высокой резвостью скаковых лошадей на короткие дистанции. Для победы в скачках на коротких дистанциях от лошади требуется развивать максимальную скорость движения прямо со старта. Установлено, что чистокровные верховые лошади с генотипом *C/C* предрасположены к проявлению выдающихся спринтерских способностей, а генотип *T/T* характерен для лошадей-стайеров (22). В работе М.А. Bower с соавт. (23) показано, что аллель *C* получил широкое распространение в чистокровной верховой породе во второй половине XX века, что объясняется ростом популярности скачек на спринтерские дистанции в этот период. Установлено, что под влиянием одностороннего искусственного отбора по резвости на короткие дистанции мутация гена *MSTN* (g.66493737C>T) полностью зафиксирована среди лошадей скаковых линий в американской четвертьмильной породе (24). Интересно, что аллель *C* встречается не только в полукровных породах, разводимых с использованием чистокровных верховых производителей, но и в большинстве аборигенных пород лошадей различного географического происхождения (23), что свидетельствует о древности происхождения этого аллеля.

Полученные данные о полиморфизме ДНК у лошадей различных пород и направлений использования дают основные представления о механизмах эволюции пород и внутривидовых групп лошадей. На протяжении веков человеческая деятельность избирательно влияла на различные популяции лошадей. Исследования генома лошади показали, что популяции древних животных характеризовались значительным генетическим разнообразием. Искусственный отбор с течением времени сдвигал средние характеристики различных популяций, формируя породы (25).

В настоящей работе впервые дана характеристика генетической структуры аборигенной якутской породы по четырем ДНК-маркерам, имеющим селекционное значение в специализированных породах лошадей различного направления использования.

Нашей целью было изучение полиморфизма генов *ASIP* и *MC1R*, детерминирующих пигментацию кожи и волос, а также оценка встречаемости мутаций генов *MSTN* (g.66493737C>T) и *DMRT3* (g.22999655C>A), ассоциированных с рабочими качествами домашних лошадей.

Методика. Материалом для исследований служили образцы волос с луковицами из гривы, взятые в 2014 году в коневодческих хозяйствах Республики Саха (Якутия) от 45 взрослых чистопородных якутских лошадей

95 °С; 30 с при 95 °С, 40 с при 60 °С, 1 мин 30 сек при 72 °С (35 циклов); 30 мин при 72 °С (финальная элонгация). Детекцию полиморфизма С>А в амплифицированном фрагменте ДНК осуществляли с использованием эндонуклеазы рестрикции HpyF3I («Thermo Scientific», Литва) в соответствии с рекомендациями производителя с последующим разделением полученных фрагментов в 3 % агарозном геле (28).

Генетико-популяционный анализ проводился с определением частоты встречаемости аллельных вариантов исследуемых генов, частоты встречаемости генотипов в популяции и наблюдаемой гетерозиготности (H_o). Статистическую обработку полученных результатов выполняли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2010.

Результаты. При генотипировании якутских лошадей (рис. 1) по гену *MC1R* мы идентифицировали три генотипа: 25 лошадей имели гомозиготный по доминантному аллелю дикого типа генотип *E/E*, 6 лошадей были гомозиготами по рецессивному мутантному аллелю (генотип *e/e*) и 14 лошадей имели гетерозиготный генотип *E/e*. Большинство исследованных животных (39 гол.) оказались носителями доминантного аллеля *E*, детерминирующего выработку черного пигмента эумеланина. При этом частота встречаемости мутации С>Т в гене *MC1R* (аллель *e*), детерминирующей подавление синтеза пигмента эумеланина, составила в группе исследованных лошадей 0,289 (табл. 1).



Рис. 1. Жеребец якутской породы на экспериментальной конюшне Всероссийского НИИ коневодства (Рязанская обл.).

Исследование якутских лошадей по гену *ASIP* показало, что частота встречаемости мутантного аллеля *a* в популяции составляла 0,600, в том числе 18 животных (40 % поголовья) были его гомозиготными носителями. Это относительно высокий показатель, поскольку у большинства современных пород лошадей рецессивный аллель *a* в гене *ASIP* встречается достаточно редко (10). Например, частота встречаемости аллеля *a* у лошадей владимирской породы составляет 0,252, а у

чистокровных арабских лошадей российской популяции — 0,100 (29, 30). Следовательно, в популяции якутских лошадей преобладают гены, детерминирующие синтез эумеланина.

1. Характеристика популяции лошадей (*Equus caballus* L.) якутской породы по частоте встречаемости аллелей генов *MC1R* и *ASIP*, детерминирующих пигментацию кожи и волос ($n = 45$, Республика Саха—Якутия, 2014 год)

Ген	Аллель	Частота встречаемости	Наблюдаемая гетерозиготность
<i>MC1R</i>	<i>E</i>	0,711	0,311
	<i>e</i>	0,289	
<i>ASIP</i>	<i>A</i>	0,400	0,400
	<i>a</i>	0,600	

В целом по двум исследованным генам, детерминирующим пигментацию, у 45 якутских лошадей мы идентифицировали 8 вариантов генотипов (табл. 2). Интересно, что наиболее типичными для якутских лошадей были генотипы *E/E-A/a* и *E/E-a/a*, не обнаруженные в группе из 80 лошадей чистокровной арабской породы (30) (рис. 2).

2. Варианты генотипов по генам *MC1R* и *ASIP*, детерминирующим пигментацию кожи и волос, у лошадей (*Equus caballus* L.) якутской породы ($n = 45$, Республика Саха—Якутия, 2014 год)

Генотип	Число лошадей		Частота встречаемости в популяции
	янский тип ($n = 34$)	коренной тип ($n = 11$)	
<i>E/E-A/A</i>	4	0	0,089
<i>E/E-A/a</i>	11	0	0,244
<i>E/e-A/A</i>	1	2	0,067
<i>E/e-A/a</i>	6	1	0,156
<i>E/E-a/a</i>	6	4	0,222
<i>E/e-a/a</i>	2	2	0,089
<i>e/e-A/A</i>	2	0	0,044
<i>e/e-a/a</i>	2	2	0,089

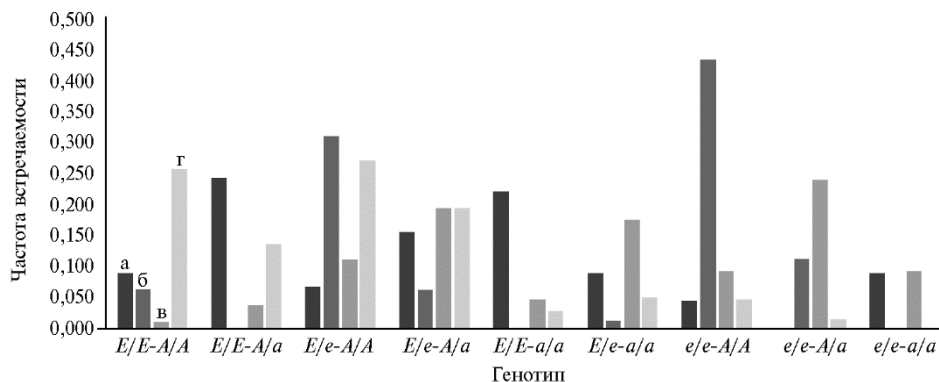


Рис. 2. Сравнительная характеристика четырех пород лошадей (*Equus caballus* L.) по частоте встречаемости различных генотипов по генам *MC1R* и *ASIP*: а — якутская порода ($n = 45$, настоящее исследование, Республика Саха—Якутия, 2014 год); б — арабские лошади ($n = 80$) (30); в — аборигенные лошади с острова Jeju (Чеджу) ($n = 108$) (31), г — владимирская порода ($n = 220$) (29).

По данным N.-Y. Kim с соавт. (31), генотипы *E/E-A/a* и *E/E-a/a* — редкие для корейских аборигенных лошадей с острова Чеджу (31). Во владимирской породе лошадей генотип *E/E-A/a* имеет небольшую частоту встречаемости (0,136), а генотип *E/E-a/a* — редкий (29). Вероятно, преобладание у якутских лошадей аллельных вариантов генов *MC1R* и *ASIP*, детерминирующих синтез эумеланина, может иметь приспособительное значение для выживания животных в условиях Субарктики.

Известно, что многие гены, контролирующие особенности пигментации кожи и волос у домашних лошадей, обладают плеiotропным эффектом (32). L.N. Jacobs с соавт. (33) исследовали зависимость особенностей темперамента у теннессиjsких прогулочных лошадей от генотипов по *MC1R* и *ASIP* и обнаружили такую корреляцию для гена *ASIP*. Интересно, что согласно полученным авторами результатам, теннессиjsкие лошади с генотипом *a/a* были более независимыми и самостоятельными.

Якутские лошади приспособлены к круглогодичному табунному содержанию, что предполагает селекционную значимость определенных поведенческих реакций. Большой интерес может представлять детальное изучение зависимости нейрогуморальных механизмов, регулирующих поведение табунных лошадей, от полиморфизма генов, контролирующих пигментацию кожи и волос.

При анализе генетической структуры якутской породы с использованием SNP-маркеров, ассоциированных с рабочими качествами лошадей, была выявлена одна лошадь коренного типа — гетерозиготный носитель мутации гена *DMRT3* (g.22999655C>A) и две лошади янского типа с гетеро-

зиготным генотипом *MSTN* (g.66493737C>T) (табл. 3). Частота встречаемости мутантных вариантов генов *DMRT3* и *MSTN* в исследованной группе якутских лошадей составила соответственно 0,011 и 0,022. Очевидно, что, присутствуя в популяции с небольшой частотой встречаемости, эти мутации не имеют селекционного значения, поскольку якутская лошадь исторически служила людям в качестве транспортного животного в лесной и болотистой местности (13).

3. Генотипы лошадей (*Equus caballus* L.) якутской породы по локусам *MSTN* и *DMRT3* ($n = 45$, Республика Саха—Якутия, 2014 год)

Ген	Генотип	Число животных	
		коренной тип	янский тип
<i>MSTN</i> (g.66493737C>T)	T/T	11	32
	C/T	0	2
	C/C	0	0
<i>DMRT3</i> (g.22999655C>A)	C/C	10	34
	A/C	1	0
	A/A	0	0

Многочисленные исследования показали, что мутации генов *DMRT3* и *MSTN*, ассоциированные с ключевыми для селекции характеристиками современных узкоспециализированных заводских пород, встречаются во многих географически обособленных популяциях аборигенных лошадей (19, 20, 23). Согласно гипотезе Р. Librado с соавт. (25), генетический полиморфизм, связанный с желаемыми фенотипами современных призовых лошадей, существовал в популяциях древних животных. В процессе одомашнивания лошадей и последующего породообразования отбор по важнейшим селекционируемым признакам происходил не по мутациям *de novo*, а по генетическим вариациям, имевшимся в одомашненном поголовье древних популяций (25).

Таким образом, изучение полиморфизма генов *MC1R* и *ASIP*, детерминирующих пигментацию кожи и волос, в аборигенной якутской породе показало, что частота встречаемости доминантного аллеля *A* гена *ASIP* и доминантного аллеля *E* гена *MC1R* составляла соответственно 0,400 и 0,711. В исследуемой популяции преобладали аллельные варианты генов, детерминирующие преимущественный синтез эумеланина. У протестированных лошадей чаще всего встречались генотипы *E/E-A/a* (24,4 %) и *E/E-a/a* (22,2 %), где *E* — доминантный аллель дикого типа *MC1R* (отсутствие мутации C>T); *A* и *a* — соответственно доминантный аллель дикого типа и рецессивный (мутантный) аллель *ASIP* (с делецией 11 п.н.). Частота мутантного аллеля *A* гена *DMRT3* (g.22999655C>A) и мутантного аллеля *C* гена *MSTN* (g.66493737C>T) составила соответственно 0,011 и 0,022. Очевидно, что мутантные варианты генов *DMRT3* и *MSTN* у якутских лошадей не имеют селекционной значимости.

¹ФГБНУ Всероссийский НИИ коневодства,
391105 Россия, Рязанская обл., Рыбновский р-н, пос. Дивово,
e-mail: genlab.horses.ru@gmail.com ✉, vniik08@mail.ru;

Поступила в редакцию
6 октября 2021 года

²Якутский НИИ сельского хозяйства им. М.Г. Сафронова —
обособленное подразделение ФГБУН ФИЦ ЯНЦ СО РАН,
677001 Россия, г. Якутск, ул. Бестужева-Марлинского, 23, корп. 1,
e-mail: revoriy@list.ru

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2022, V. 57, № 2, pp. 272–282

GENETIC STRUCTURE OF THE LOCAL YAKUTIAN HORSE

POPULATION FOR GENES *MC1R*, *ASIP*, *DMRT3*, AND *MSTN*

L.V. Kalinkova¹ ✉, A.M. Zaitsev¹, R.V. Ivanov²

¹All-Russian Research Institute for Horse Breeding, Divovo, Rybnoe District, Ryazan Province, 391105 Russia, e-mail genlab.horses.ru@gmail.com (✉ corresponding author), vniik08@mail.ru;

²Safronov Yakut Research Institute of Agriculture, FRC Yakut Research Center SB RAS, 23/1, ul. Bestuzheva-Marlinskogo, Yakutsk, Republic of Sakha (Yakutia), 677001 Russia, e-mail revoriy@list.ru

ORCID:

Kalinkova L.V. orcid.org/0000-0002-7129-3133

Ivanov R.V. orcid.org/0000-0001-9940-2162

Zaitsev A.M. orcid.org/0000-0003-4260-602X

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation (project № 19-76-20058)

Received October 6, 2021

doi: 10.15389/agrobiol.2022.2.272eng

Abstract

The Yakutian horse is believed to be one of the oldest breeds. The breed has unique morphological characteristics and is well adapted to survive within the Arctic Circle. Yakutian horses have compact body conformation and extremely thick winter coats with long mane and tail. In the Yakutian breed dominate light coat colours: gray and dun. The gray and dun coat colours of Yakutian horses are their natural camouflage. The Yakutian horse is multipurpose breed, because the local horses have been used by people not only for the production of milk and meat, but also as transport animals. In this paper, the genetic structure of the native Yakutian breed was characterized using markers of four genes that are associated with important selected traits in different modern populations of domestic horses (*Equus caballus*). The aim of our study was to investigate the polymorphism of the *ASIP* and *MC1R* genes that determine skin and hair pigmentation, as well as to assess the occurrence of mutations in the *MSTN* (g.66493737C>T) and *DMRT3* (g.22999655C>A) genes associated with athletic performance and locomotion in domestic horses. Hair samples were collected from 45 adult purebred Yakutian horses (*Equus caballus*), including 11 samples from animals of the indigenous type and 34 samples from animals of the Yana type. DNA was isolated using ExtraGene™ DNA Prep 200 reagents (Isogen Laboratory, Russia). Genotyping for the SNP marker C>T of the *MC1R* gene was carried out using the PCR-RFLP (PCR-restriction fragment length polymorphism) method according to L. Marklund et al. (1996). Detection of 11 bp deletion in the *ASIP* gene was carried out according to the method described by S. Rieder et al. (2001). Allele nomenclature was used according to M. Reißmann (2009): *E* — dominant wild-type allele, *e* — recessive (mutant) allele (*MC1R*); *A* — dominant wild-type allele, *a* — recessive (mutant) allele (*ASIP*). The SNP mutation in the *MSTN* gene (g.66493737C>T) was detected by the amplification-created restriction site-PCR (ACRS-PCR) method described by M. Gábor et al. (2014). Genotyping of DNA samples for the SNP marker of the *DMRT3* gene (g.22999655C>A) was performed by PCR-RFLP method, C>A polymorphism was detected using restriction endonuclease HpyF3I (Thermo Scientific, Lithuania). Frequencies of alleles, frequencies of genotypes in the population and observed heterozygosity were calculated. Polymorphism of the *ASIP* and *MC1R* genes observed in Yakutian horses demonstrated a predominance of allelic variants that determine the synthesis of eumelanin, the darker type of the pigment. In the studied group of horses the frequency of the dominant *E* allele of the *MC1R* gene that determines the production of the black pigment eumelanin, was 0.711. The number of homozygous carriers of the recessive mutation of the *MC1R* gene (*e* allele) that determines production of red pigment pheomelanin was 13.3 %. The frequency of the dominant *A* allele of the *ASIP* gene that limits the synthesis of the black pigment eumelanin and affects the character of its distribution was 0.400. The number of homozygous carriers of the recessive mutation of the *ASIP* gene (*a* allele) among the tested Yakutian horses was 40 %. This is relatively high value, because in the most of modern horse breeds, the recessive *a* allele of the *ASIP* gene is rather rare. In total, eight different genotypes were identified for two key genes affecting skin and hair pigmentation. The most typical genotypes for Yakutian horses were *E/E-A/a* and *E/E-a/a*. The character of skin and hair pigmentation in the Yakutian horses could have an adaptive meaning for survival within the Arctic Circle. The frequency of the mutant variants of genes *DMRT3* (g.22999655C>A) and *MSTN* (g.66493737C>T) in the tested horses were 0.011 and 0.022, respectively. Obviously, being presented in the population at a low frequency, the mutant variants of the *DMRT3* and *MSTN* genes have no selection value, because historically, the Yakutian horse has served people as a transport animal in the forest and swampy areas, where only riding is suitable and the most convenient gait is walk.

Keywords: horses, Yakutian breed, DNA markers, polymorphism, *MC1R*, *ASIP*, *DMRT3*, *MSTN*, eumelanin, pheomelanin, performance traits.

REFERENCES

1. Alekseev N.D. *Nauka i tekhnika v Yakutii*, 2007, 1(12): 15-18 (in Russ.).

2. Vinokurov I.N. *Traditsionnaya kul'tura narodov Severa: produktivnoe konevodstvo severo-vostoka Yakutii* [Traditional culture of the peoples of the North: productive horse breeding in the northeast of Yakutia]. Novosibirsk, 2009 (in Russ.).
3. Abramov A.F., Ivanov R.V., Alekseev N.D., Stepanov K.M., Semenova A.A., Mironov S.M. *Myasnaya produktivnost' i kachestvo myasa porod loshadei, razvodimyykh v Yakutii* [Meat productivity and meat quality of horse breeds bred in Yakutia]. Yakutsk, 2013 (in Russ.).
4. Alekseev N.D., Stepanov N.P. *Dostizheniya nauki i tekhniki APK*, 2006, 5: 8-10 (in Russ.).
5. Ivanov R.V. *Konevodstvo i konnyi sport*, 2021, 1: 28-30 (doi: 10.25727/HS.2021.1.62644) (in Russ.).
6. Librado P., Der Sarkissian C., Ermini L., Schubert M., Jónsson H., Albrechtsen A., Fumagalli M., Yang M. A., Gamba C., Seguin-Orlando A., Mortensen C.D., Petersen B., Hoover C.A., Lorente-Galdos B., Nedoluzhko A., Boulygina E., Tsygankova S., Neuditschko M., Jagannathan V., Thèves C., Alfathan A.H., Alquraishi S.A., Al-Rasheid Kh.A.S., Sicheritz-Ponten T., Popov R., Grigoriev S., Alekseev A.N., Rubín E.M., McCue M., Rieder S., Leeb T., Tikhonov A., Crubézy E., Slatkin M., Marques-Bonet T., Nielsen R., Willerslev E., Kantanen J., Prokhortchouk E., Orlando L. Tracking the origins of Yakutian horses and the genetic basis for their fast adaptation to subarctic environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112(50): 6889-6897 (doi: 10.1073/pnas.1513696112).
7. Ludwig A., Pruvost M., Reissman M., Benecke N., Brockmann G.A., Castaños P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L., Malaspinas A.-S., Slatkin M., Hofreiter M. Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science*, 2009, 324(5926): 485 (doi: 10.1126/science.1172750).
8. Bailey E.F., Brooks S.A. *Horse genetics*. CABI, 2020.
9. Reißmann M. *Die Farben der Pferde*. Cadmos, 2009.
10. Sponenberg D.P., Bellone R. *Equine color genetics*. Willey-Blackwell, 2017.
11. Marklund L., Johansson Moller M., Sandberg K., Andersson L. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (*MC1R*) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome*, 1996, 7: 895-899 (doi: 10.1007/s003359900264).
12. Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B., Guérin G. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*). *Mammalian Genome*, 2001, 12: 450-455 (doi: 10.1007/s003350020017).
13. Gabyshev M.F. *Yakutskaya loshad'* [Yakut horse]. Yakutsk, 1957 (in Russ.).
14. Rosengren Pielberg G., Golovko A., Sundström E., Curik I., Lennartsson J., Seltenhammer M.H., Druml T., Binns M., Fitzsimmons C., Lindgren G., Sandberg K., Baumung R., Vetterlein M., Strömberg S., Grabherr M., Wade C., Lindblad-Toh K., Pontén F., Heldin C.-H., Sölkner J., Andersson L. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature Genetics*, 2008, 40: 1004-1009 (doi: 10.1038/ng.185).
15. Imsland F., McGowan K., Rubín C.-J., Henegar C., Sundström E., Berglund J., Schwochow D., Gustafson U., Imsland P., Lindblad-Toh K., Lindgren G., Mikko S., Millon L., Wade C., Schubert M., Orlando L., Penedo M.C.T., Barsh G.S., Andersson L. Regulatory mutations in *TBX3* disrupt asymmetric hair pigmentation that underlies Dun camouflage color in horses. *Nature Genetics*, 2016, 48: 152-160 (doi: 10.1038/ng.3475).
16. Wutke S., Andersson L., Benecke N., Sandoval-Castellanos E., Gonzalez J., Hallsson J.H., Löugas L., Magnell O., Morales-Muniz A., Orlando L., Pálsdóttir A.H., Reissmann M., Muñoz-Rodríguez M.B., Ruttikay M., Trinks A., Hofreiter M., Ludwig A. The origin of ambling horses. *Current Biology*, 2016, 26(15): R697-R699 (doi: 10.1016/j.cub.2016.07.001).
17. Toktosunov B.I., Abdurasulov A.Kh., Musakunov M.K. *Zootehnicheskaya nauka Belarusi*, 2018, 2: 235-242 (in Russ.).
18. Andersson L.S., Larhammar M., Memic F., Wootz H., Schwochow D., Rubín C.-J., Patra K., Arnason T., Wellbring L., Hjälml G., Imsland F., Petersen J.L., McCue M.E., Mickelson J.R., Cothran G., Ahituv N., Roepstorff L., Mikko S., Vallstedt A., Lindgren G., Andersson L., Kullander K. Mutations in *DMRT3* affect locomotion in horses and spinal circuit function in mice. *Nature*, 2012, 488(7413): 642-646 (doi: 10.1038/nature11399).
19. Promerová M., Andersson L.S., Juras R., Penedo M.C.T., Reissmann M., Tozaki T., Bellone R., Dunner S., Hořín P., Imsland F., Imsland P., Mikko S., Modrý D., Roed K.H., Schwochow D., Vega-Pla J.L., Mehrabani-Yeganeh H., Yousefi-Mashouf N., Cothran E.G., Lindgren G., Andersson L. Worldwide frequency distribution of the 'Gait keeper' mutation in the *DMRT3* gene. *Animal Genetics*, 2014, 45(2): 274-282 (doi: 10.1111/age.12120).
20. Staiger E.A., Almén M.S., Promerová M., Brooks S., Cothran E.G., Imsland F., Jäderkvist Fegraeus K., Lindgren G., Mehrabani Yeganeh H., Mikko S., Vega-Pla J.L., Tozaki T., Rubín C.-J., Andersson L. The evolutionary history of the *DMRT3* 'Gait keeper' haplotype. *Animal Genetics*, 2017, 48(5): 551-559 (doi: 10.1111/age.12580).
21. Kharing F. *Rukovodstvo po razvedeniyu zhivotnykh. Tom III. Kniga I. Porody loshadei i krupnogo rogatogo skota* [Animal breeding guide. Volume III. Book I. Breeds of horses and cattle]. Moscow, 1965 (in Russ.).
22. Hill E.W., McGivney B.A., Gu J., Whiston R., Machugh D.E. A genome-wide SNP-association

- study confirms a sequence variant (g.66493737C>T) in the equine myostatin (*MSTN*) gene as the most powerful predictor of optimum racing distance for Thoroughbred racehorses. *BMC Genomics*, 2010, 11: 552 (doi: 10.1186/1471-2164-11-552).
23. 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: 643 (doi: 10.1038/ncomms1644).
 24. Pereira G.L., Matteis R., Regitano L.C.A., Chardulo L.A.L., Curi R.A. *MSTN*, *CKM*, and *DMRT3* gene variants in different lines of quarter horses. *Journal of Equine Veterinary Science*, 2016, 39: 33-37 (doi: 10.1016/j.jevs.2015.09.001).
 25. Librado P., Fages A., Gaunitz C., Leonardi M., Wagner S., Khan N., Hanghoj K., Alqurashi S.A., Alfarhan A.H., Al-Rasheid K.A., Der Sarkissian C., Schubert M., Orlando L. The evolutionary origin and genetic makeup of domestic horses. *Genetics*, 2016, 204(2): 423-434. (doi: 10.1534/genetics.116.194860).
 26. Cieslak J., Cholewinski G., Mackowski M. Genotyping of coat color genes (*MC1R*, *ASIP*, *PMEL17*, and *MATP*) polymorphism in cold-blooded horses bred in Poland reveals sporadic mistakes in phenotypic descriptions. *Animal Science Papers and Reports*, 2013, 31(2): 159-164.
 27. Gábor M., Miluchová M., Trakovická A. Development of ACRS-PCR method for detection of single nucleotide polymorphism g.66493737C/T of the equine myostatin gene (*MSTN*). *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*, 2014, 47(2): 52-55.
 28. Kalinkova L.V., Zaitsev A.M., Kalashnikov V.V. *Veterinariya, zootekhnika i biotekhnologiya*, 2019, 7: 60-65 (in Russ.).
 29. Kuznetsova M.M., Sorokin S.I., Mavropulo V.A., Gladyr' E.A. *Zootekhnika*, 2012, 12: 9-12 (in Russ.).
 30. Kalinkova L.V. *Genetika i razvedenie zivotnykh*, 2020, 2: 50-53 (in Russ.).
 31. Kim N.-Y., Han S.-H., Lee S.-S., Lee C.-E., Park N.-G., Ko M.-S., Yang Y.-H. Relationship between *MC1R* and *ASIP* genotypes and basic coat colors in Jeju horses. *Journal of Animal Science and Technology*, 2011, 53(2): 107-111 (doi: 10.5187/JAST.2011.53.2.107).
 32. Bellone R.R. Pleiotropic effects of pigmentation genes in horses. *Animal Genetics*, 2010, 41(s2): 100-110 (doi: 10.1111/j.1365-2052.2010.02116.x).
 33. Jacobs L.N., Staiger E.A., Albright J.D., Brooks S.A. The *MC1R* and *ASIP* coat color loci may impact behavior in the horse. *Journal of Heredity*, 2016, 107(3): 214-219 (doi: 10.1093/jhered/esw007).