

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ МАСТИ ДРЕВНИХ ЛОШАДЕЙ БУРЯТИИ

© М. А. Куслий,^{1,*} А. С. Дружкова,^{1,3} К. О. Попова,^{1,3}
Н. В. Воробьева,^{1,3} А. И. Макунин,¹ А. А. Юрлова,¹ А. А. Тишкин,⁴
С. С. Миняев,⁵ В. А. Трифонов,^{1,3} А. С. Графодатский,¹
М. А. Дымова,² М. Л. Филипенко²

¹Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090,

²Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, 630090,

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090,

⁴Кафедра археологии, этнографии и музеологии
Алтайского государственного университета, Барнаул, 656049,

и ⁵Институт истории материальной культуры РАН,
Санкт-Петербург, 191186;

* электронный адрес: kusliy.maria@mcb.nsc.ru

С генетической точки зрения различия между древними и современными лошадьми могут быть реконструированы с помощью филогеографического анализа митохондриальных геномов и изучения фенотипически важных ядерных локусов. Многообразие мастей современных лошадей является результатом искусственного отбора и свидетельствует о высокой степени одомашнивания. Мы провели филогенетический анализ митохондриальной ДНК, выделенной из костных образцов 6 древних лошадей из пади Царам в Республике Бурятия, и установили, что они относятся к гаплогруппе E по классификации Ачили. Эта гаплогруппа встречается среди современных лошадей породы мареммано из Италии. Определение у 2 древних лошадей серой масти, отличной от дикого типа, свидетельствует о достаточно высокой степени одомашнивания лошадей Бурятии в период I в. до н. э.—I в. н. э. На основе анализа фрагмента гипервариабельного района митохондриального генома определили, что древние лошади Бурятии принадлежат гаплотипу X3 по классификации Чеслак, который является предковым для гаплогруппы X3 современных лошадей Монголии, Тывы и Бурятии.

Ключевые слова: древняя ДНК, филогенетический анализ.

Принятые сокращения: е. а. — единица активности.

В настоящее время собраны большие коллекции костных останков древних лошадей, обнаруженных на территории Сибири при археологических раскопках погребальных комплексов, относящихся ко всем историческим эпохам (Косинцев, 2005; Миняев, 2009; Тишкин, Лукерина, 2011). Анализ древней ДНК дает возможность проследить динамику изменения популяций во времени (Willerslev et al., 2005). Дикий тип окраски лошади — гнедой — был необходим для маскировки (Ludwig et al., 2009). В 4-м тысячелетии до н. э. в Европе появляются дикие лошади вороной масти. Одомашненные лошади уже отличаются разнообразием мастей. Причинами вариаций основного цвета шерсти лошадей являются мутации в генах окраски. Базовые масти лошадей — вороная, гнедая и рыжая — контролируются генами *MC1R* (melanocortin-1 receptor) и *ASIP* (agouti signaling protein). Характерная мутация в гене *ASIP* приводит к рецессивному черному фенотипу (Rieder et al., 2001), а в гене *MC1R* — к рецессивному рыжему (Marklund et al., 1996). Мутации в генах-модификаторах связаны с различными формами пятни-

стости, осветления и разбавления цвета (Campana et al., 2010). Так, мутация в гене *PMEL-17* (premelanosome protein 17) приводит к серебристой масти (Komaromy et al., 2011), в гене *PAX3* (paired box gene 3) — к типу пегой масти сплешед уайт (Hauswirth et al., 2012), в гене *STX17* (syntaxin-17) — к серой масти (Pielberg et al., 2008), в гене *TRPM1* (transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1) — к леопардовому типу чубарой масти (Bellone et al., 2010).

Нашими основными задачами являлись выделение ДНК из костных образцов 7 древних лошадей (археологи не смогли точно определить, принадлежат ли все эти кости разным лошадям) и последующее секвенирование их митохондриальных геномов, а также фрагментов всех вышеперечисленных генов окраски после предварительного обогащения библиотек для секвенирования. На основе анализа митохондриальных геномов и генов окраски древних лошадей предполагалось определить их масти, гаплотипы и филогенетические отношения с современными лошадьми.

Материал и методика

Использованные реактивы: Taq ДНК-полимераза (ABI, США, 100 е. а./мл); Phusion ДНК-полимераза (Thermo Fisher Scientific, США, 2 е. а./мл); протеиназа K (Roche, Швейцария, 600 е. а./мл); Taq буфер 10 × (ABI, США); Phusion High-Fidelity буфер 5 × (Thermo Fisher Scientific, США); MgCl₂ (FINNZYMES, Финляндия); набор dNTP (Медиген, Россия); dTTP и bio dUTP (Thermo Fisher Scientific, США); Streptavidin Dynabeads (Invitrogen, США); Na-соль N-лаурил-саркозина (SIGMA, США).

Выделение древней ДНК. Поверхностный слой кости (0.5—1 мм) удаляли алмазным диском, 0.5 г компактного вещества кости измельчали в порошок, к нему добавляли 10 мл 0.5 М раствора аммонийной соли ЭДТА, 0.5 % раствора Na-соли N-лаурил-саркозина и 0.5 мг/мл протеиназы K. Суспензию инкубировали с перемешиванием в течение 2—2.5 ч при 55 °С до полного растворения кости. После центрифугирования проводили связывание ДНК с диоксидом кремния (Rohland, 2012). Очищали образцы на колонках MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Нидерланды). Для удаления ингибиторов ПЦР использовали Agencourt AMPure XP PCR Purification Kit (Beckman Coulter, США).

Получение библиотек для секвенирования. Библиотеки фрагментов древней ДНК получали с использованием TruSeq® Nano DNA Sample Preparation Kit (Illumina, США) по протоколу производителя (High Sample Protocol). Для очищения библиотек использовали QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Нидерланды).

Обогащение библиотек. Митохондриальную ДНК лошади нарабатывали при помощи ПЦР с Taq ДНК-полимеразой в виде четырех фрагментов (около 4 т. п. н. каждый) с праймерами: 1F-gaggagcctgtccataatcg, 1R-ggtagggggaggagtagg, 2F-tccatccacaacaacataaa, 2R-gagcctggagaagggtgaag, 3F-tgaccaccacaggtatcca, 3R-acgttggtggagtgtctagt, 4F-ggcagcattttgccggatt, 4R-gatggtgggtttatcgggg. Эквимолярную смесь митохондриальных фрагментов биотинилировали с помощью Nick Translation Bionik Labeling System Kit (Invitrogen, США), а биотинилированные фрагменты генов окраски получали при помощи ПЦР с Taq ДНК-полимеразой и bio dUTP в виде 8 фрагментов (около 0.2—0.25 т. п. н. каждый) с праймерами: MC1R_F, MC1R_R (5'-tactggtggtgactgccatgcc-3', 5'-cccaggaagcagagcctggacac-3'); ASIP_F, ASIP_R (5'-aagggg-gaaaagaccagaacatctggc-3', 5'-gctgaaaaatccttattgtctatgcc-3'); PMEL17_F, PMEL17_R (5'-ctgctctaccaaaaggggaagagc-3', 5'-ggaggcagctagatcaaggccaag-3'); TRPM1_F, TRPM1_R (5'-ccccctgatgctttaccactgc-3', 5'-gggaaagtgaagaggaggtggaaggaag-3'); KIT_F, KIT_R (5'-gtgagtactcacatttcttgaccaca-3', 5'-ggattgtagaacataagcagcattctag-3'); PAX3_F, PAX3_R (5'-gacggatggagcctgtctcctggtac-3', 5'-gtcaaccagctcggcgtgtatttattc-3'); STX17_F, STX17_{FV} (5'-ccaggaattatgggaaggttga-3', 5'-tctgagattgtgatctgggaactc-3'); STX17_R, STX17_{RV} (5'-gtgtgcaccagaatcacctggag-3', 5'-ttgtatgtgggtaccaccacag-3'). Смешивали биотинилированные фрагменты генов окраски в эквимолярном соотношении. Биотинилированные зонды очищали на колонках MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Нидерланды).

Иммобилизацию биотинилированных зондов на магнитные частицы со стрептавидином проводили, используя Dynabeads® Streptavidin Trial Kit (Life Technologies, США), согласно инструкции производителя. Биотинилированные зонды денатурировали 5 мин при 95 °С и иммобилизовывали на магнитные частицы (предварительно

3 раза промытые раствором 2 × SSC) в растворе 2 × SSC 30 мин при комнатной температуре (на 1000 нг зондов добавляли 30 мкл магнитных частиц). Количество иммобилизованной митохондриальной ДНК обычно составляло 1.2—1.7 мкг, а фрагментов ядерных генов — 0.47 мкг на 50 мкл исходной суспензии Dynabeads.

Обогащение библиотек. Проводили гибридизацию библиотек и биотинилированных зондов, иммобилизованных на магнитные частицы со стрептавидином. Библиотеки, содержащие 900—1500 нг ДНК в 30 мкл 10 mM Трис-НСl-буфера, денатурировали 5 мин при 95 °С, к ним добавляли 5 мкл магнитных частиц с 0.24—0.34 мкг митохондриальной ДНК и 10 мкл магнитных частиц с 0.09 мкг фрагмента каждого гена окраски, 0.1 объема 20 × SSC и проводили гибридизацию при 65 °С 48—72 ч. Затем частицы промывали 3 раза 100 мкл 2 × SSC при 65 °С, 2 раза 0.2 × SSC при комнатной температуре и элюировали в 30 мкл MilliQ H₂O 5 мин при 96 °С. Амплификацию обогащенных библиотек проводили в объеме 50 мкл, содержащем Phusion HF Buffer, 0.25 mM 4dNTP, 1 мкM праймеров для адаптеров фрагментов библиотек, 1 е. а. Phusion ДНК-полимеразы.

Секвенирование. Квантификацию полученных библиотек проводили при помощи ПЦР в реальном времени в присутствии красителя SYBR Green 1 и референсного красителя ROX, используя ПЦР-комплект: 2.5 × реакционную смесь (Синтол, Россия), согласно протоколу производителя. Секвенировали образцы на платформе MiSeq (Illumina, США).

Анализ данных. Картирование ридов на референсный геном (JN398377), создание консенсусной последовательности митохондриального генома древних лошадей и определение его среднего покрытия производили в программе Geneious 8.1.6. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили в программе MAFFT. С помощью программы PartitionFinder в митохондриальном геноме выделили 3 части, которые эволюционируют по-разному, и определили эволюционную модель нуклеотидных замен для каждой части: для вторых кодонов белок-кодирующих генов использовали модель HKY + G, для РНК-кодирующих генов, первых и третьих кодонов белок-кодирующих генов — HKY + G + I, а для гипервариабельных районов — GTR + G + I. Для построения филогенетического древа использовали Байесовский метод (программа MrBayes): 2 млн поколений Марковской цепи, частота взятия образцов — 1000, первые 25 % деревьев отбрасываются. Филогенетическую сеть строили на основе медианного графа в программе NETWORK 4.612.

Результаты и обсуждение

Генотипирование и филогенетический анализ. Мы выложили консенсусные последовательности митохондриальных геномов древних лошадей в базу данных GenBank, значения среднего покрытия полученных геномов приведены в табл. 1.

На основе митохондриальных геномов 6 древних лошадей Бурятии и 83 современных лошадей из статьи Ачилли с соавторами (Achilli et al., 2012) построили филогенетическое древо (рис. 1). Все древние лошади Бурятии попали в гаплогруппу E, которая представлена гаплотипом 25, встречающимся среди современных лошадей породы мареммано в Италии, и соответственно они явля-

Таблица 1

Среднее покрытие митохондриальных геномов

Название образца	Среднее покрытие генома ± стандартное отклонение	Регистрационный номер в GenBank
Цар15	6.8 ± 4.5	KT985981
Цар16	204.8 ± 71.4	KT985982
Цар17	4.3 ± 3.1	KT985983
Цар19	86.8 ± 52.7	KT985982
Цар20	529.4 ± 37.3	KT985982
Цар25	12.7 ± 9.0	KT985984

ются родственной ветвью эволюции для бурятских лошадей.

На основе выравнивания последовательностей фрагмента 246 п. н. из гипервариабельного района I митохондриального генома древних лошадей Бурятии (Цар15, 16, 19, 20 и 25), древних и современных лошадей Монголии, Тывы и Бурятии из стран Чеслак и соавторов (Cieslak et al., 2010) и современных лошадей Бурятии (JQ936455—JQ936476) построили филогенетическую сеть (рис. 2).

Древние лошади Бурятии относятся к гаплотипу X3, который появился в Западной Сибири в медном веке (Cieslak et al., 2010). Как видно по сети, он является предко-

вым для остальных гаплотипов гаплогруппы X3, которые сейчас встречаются в Монголии, Тыве и Бурятии.

Определение масти древних лошадей Бурятии. Мы использовали 4 образца библиотек для определения масти древних лошадей Бурятии. Информация о наличии характерной мутации во фрагментах генов окраски приведена в табл. 2.

Гены основного цвета шерсти (*ASIP* и *MC1R*) являются комплементарными (Курская, 2012), а их мутантные аллели — рецессивными, поэтому мы делали вывод о базовой масти, если в образце присутствовали риды обоих этих генов. Лошадь Цар15 является гетерозиготной по гену *MC1R* и гомозиготной по доминантному аллелю гена *ASIP*, поэтому она имеет «дикий» фенотип — гнедую масть. Если у лошади Цар17 присутствует доминантный аллель гена *ASIP*, то она относится к гнедой масти, а если она является гомозиготной по мутантному аллелю, то имеет вороную масть. Аналогичным образом определили, что лошади Цар25 и Цар36 принадлежат соответственно гнедой и гнедой или вороной мастям. Мутантные аллели генов-модификаторов являются доминантными. Лошади Цар17 и Цар25 принадлежат серой масти, поскольку имеют доминантный аллель гена *STX17*. Можно сделать вывод о том, что уже в I в. до н. э. — I в. н. э. серая масть была распространена в популяциях бурятских лошадей, следовательно, по ней шел искусственный отбор.

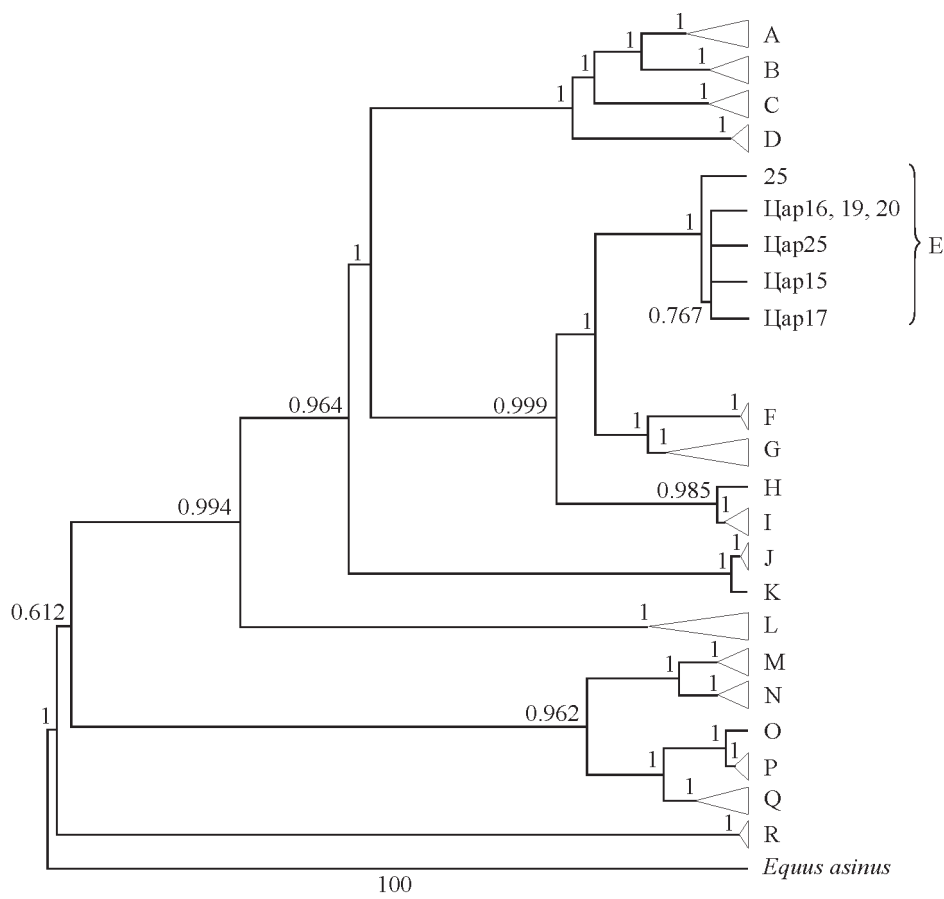


Рис. 1. Филогенетическое дерево современных лошадей из разных районов мира и древних лошадей Бурятии.

A—R — названия митохондриальных гаплогрупп по классификации Ачилли с соавторами (Achilli et al., 2012), 25 — название гаплотипа. Цифрами на ветвях дерева обозначена апостериорная вероятность топологии, полученная Байесовским методом. Серым цветом обозначены древние лошади Бурятии.

ram: a burial ground of the hsiung-nu elite in transbaikalia. *Archaeology, ethnology and anthropology of Eurasia*. 37(2) : 49—58.)

Tishkin A. A., Lukerina Y. E. 2011. Формирование базы данных о лошадях Сибири поздней древности и средневековья. В кн.: Комплексные исторические исследования в области изучения Западной и Южной Сибири с древнейших времен до современности. Барнаул: Изд-во Алтай. гос. ун-та. Т. I. 74—86. (Tishkin A. A., Lukerina Y. E. 2011. Formation of a database of the horses in Siberia late antiquity and the Middle Ages. In: Complex historical research in the study of Western and Southern Siberia, from ancient times to the present. Barnaul: Publ. Altai State Univ. Vol. I. 74—86.)

Achilli A., Olivieri A., Soares P., Lancioni H., Kashani B. H., Perego U. A., Nergadze S. G., Carossa V., Santagostino M., Capomaccio S., Felicetti M., Al-Achkar W., Penedo M. C. T., Verini-Supplizi A., Houshmand M., Woodward S. R., Semino O., Silvestrelli M., Giulotto E., Pereira L., Bandelt H. J., Torroni A. 2012. Mitochondrial genomes from modern horses reveal the major haplogroups that underwent domestication. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 109 : 2449—2454.

Bellone R. R., Forsyth G., Leeb T., Archer S., Sigurdsson S., Imstrand F., Mauceli E., Engensteiner M., Bailey E., Sandmeyer L., Grahn B., Lindblad-Toh K., Wade C. M. 2010. Fine-mapping and mutation analysis of TRPM1 : a candidate gene for leopard complex (LP) spotting and congenital stationary night blindness in horses. *Briefings in Functional Genomics*. 9 : 193—207.

Campana M. G., Whitten C. M., Edwards C. J., Stock F., Murphy A. M., Binns M. M., Barker G. W. W., Bower M. A. 2010. Accurate determination of phenotypic information from historic thoroughbred horses by single base extension. *PLoS ONE*. 5 : e15172.

Cieslak M., Pruvost M., Benecke N., Hofreiter M., Morales A., Reissmann M., Ludwig A. 2010. Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses. *PLoS ONE*. 5 : e15311.

Hauswirth R., Haase B., Blatter M., Brooks S. A., Burger D., Drogemuller C., Gerber V., Henke D., Janda J., Jude R., Magdesian K. G., Matthews J. M., Poncet P. A., Leeb T. 2012. Mutations in MITF and PAX3 cause «splashed white» and other white spotting phenotypes in horses. *PLoS Genet*. 8 : e1002653.

Kotárómy A. M., Rowlan J. S., La Croix N. C., Mangan B. G. 2011. Equine multiple congenital ocular anomalies (MCOA) syndrome in PMEL17 (Silver) mutant ponies: five cases. *Veterinary Ophthalmol*. 14 : 313—320.

Ludwig A., Pruvost M., Reissmann M., Benecke N., Brockmann G. A., Castanos P., Cieslak M., Lippold S., Llorente L., Malaspina A. S., Slatkin M., Hofreiter M. 2009. Coat color variation at the beginning of horse domestication. *Science*. 324 : 485—485.

Marklund L., Moller M. J., Sandberg K., Andersson L. 1996. A missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses. *Mammalian Genome*. 7 : 895—899.

Pielberg G. R., 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., Hedin C. H., Sölkner J., Andersson L. 2008. A cis-acting regulatory mutation causes premature hair graying and susceptibility to melanoma in the horse. *Nature Genet*. 40 : 1004—1009.

Rieder S., Taourit S., Mariat D., Langlois B., Gue'rin G. 2001. 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*. 12 : 450—455.

Rohland N. 2012. DNA extraction of ancient animal hard tissue samples via adsorption to silica particles. *Methods Mol. Biol*. 840 : 21—28.

Willerslev E., Cooper A. 2005. *Ancient DNA*. Proc. Royal Soc. London B: Biol. Sci. 272 : 3—16.

Поступила 1 XII 2015

GENOTYPING AND COAT COLOUR DETECTION OF ANCIENT HORSES FROM BURYATIA

M. A. Kusliy,^{1,*} A. S. Druzhkova,^{1,3} K. O. Popova,^{1,3} N. V. Vorobieva,^{1,3} A. I. Makunin,¹
A. A. Yurlova,¹ A. A. Tishkin,⁴ S. S. Minyaev,⁵ V. A. Trifonov,^{1,3} A. S. Graphodatsky,¹
M. A. Dymova,² M. L. Filipenko²

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090,

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, 630090,

³ Novosibirsk State University, 630090,

⁴ Department of archeology, ethnography and museology Altai State University, Barnaul, 656049, and

⁵ Altai State University, Institute for the History of Material Culture RAS, St. Petersburg, 191186;

* e-mail: kusliy.maria@mcb.nsc.ru

From genetic point of view, differences between ancient and modern horses can be reconstructed by using the phylogeographic analysis of mitochondrial genomes and by studying phenotypically important nuclear loci. The variety of modern horse coat colors resulted from artificial selection indicates a high degree of domestication. We have conducted the phylogenetic analysis of mitochondrial DNA extracted from bone samples of six ancient horses from Tsaramburial in the Republic of Buryatia, and established that they belong to a haplogroup E by Achilli's classification. This haplogroup is found among modern horses of the Maremmano breed from Italy. Gray coat color different from wild type have been detected in two ancient horses, which demonstrates a sufficiently high domestication level of Buryat horses during the period I century BC to I century AD. The analysis of the mitochondrial genome hypervariable region fragments revealed that ancient Buryat horses belong to a haplotype X3 by Cieslak's classification, which is ancestral to the haplogroup X3 of modern horses in Mongolia, Tuva, and Buryatia.

Key words: phylogeographic analysis, ancient DNA, Buryat horses.