

Зоотехния и ветеринария

УДК 636.13.:575

DOI: 10.31857/S2500262724010099, EDN: CSHWZJ

ИЗУЧЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *ASIP* И *MC1R* У ЛОШАДЕЙ КАБАРДИНСКОЙ ПОРОДЫ

А. Д. Хаудов¹, научный сотрудник, М. Х. Жекамухов², кандидат сельскохозяйственных наук,
А. М. Зайцев³, кандидат сельскохозяйственных наук, З. Х. Амшокова², научный сотрудник,
Н. В. Бербекова², кандидат сельскохозяйственных наук, Х. К. Амшонов², старший научный сотрудник

¹Федеральный научный центр «Кабардино-Балкарский научный центр Российской академии наук»,
360002, Нальчик, ул. Балкарова, 2

²Институт сельского хозяйства – филиал ФНЦ «Кабардино-Балкарский научный центр РАН»,
360004, Нальчик, ул. Кирова, 224
E-mail: kbniish2007@yandex.ru

³Всероссийский научно-исследовательский институт коневодства,
391105, Рязанская обл., Рыбновский район, пос. Дивово, ВНИИ коневодства

Окрас шерсти лошадей представляет значительный интерес по причине его эстетической привлекательности и значимости для идентификации породы. Понимание генетических механизмов, лежащих в основе вариаций окраса шерсти, важно для коннозаводчиков и генетиков. Цель исследования – изучение влияния полиморфизма генов *MC1R* и *ASIP* на окрас шерсти кабардинских лошадей. По результатам генотипирования 127 лошадей кабардинской породы по генам *MC1R* и *ASIP* были определены частоты различных аллелей и генотипов, от которых зависит масть животных. Для определения взаимосвязи между ними был проведен статистический анализ. Для кабардинских лошадей характерен широкий спектр мастей, включая караковую, вороную, гнедую, темно-гнедую и серую. У большинства исследованных лошадей (96,9 %) выявлено наличие доминантного аллеля *E* гена *MC1R*, связанного с синтезом эумеланина и более темной окраской шерсти. Частота генотипа *A/A* гена *ASIP* увеличивалась по мере осветления окраса шерсти: вороной – 0,0 %, караковый – 9,5 %, темно-гнедой – 56,6 %, гнедой – 84,8 %. Частота мутантного аллеля *a* была равна 0,280. В целом он способствовал образованию черного окраса шерсти у кабардинских лошадей. Результаты исследования способствуют пониманию генетических механизмов, лежащих в основе вариаций окраса шерсти в популяциях лошадей.

STUDY OF *ASIP* AND *MC1R* GENE POLYMORPHISM HORSES OF THE KABARDIAN BREED

A. D. Khaudov¹, M. H. Zhekamukhov², A. M. Zaitsev³, Z. H. Amshokova²,
N. V. Berbekova², H. K. Amshokov²

¹Federal Scientific Center Kabardino-Balkar Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
360002, Nal'chik, ul. Balkarova, 2

²Institute of Agriculture – branch of the Kabardino-Balkarian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences,
360004, Nal'chik, ul. Kirova, 224,
E-mail: kbniish2007@yandex.ru

³All-Russian Research Institute of Horse Breeding,
391105, Rjazanskaja obl., Rybnovskij rajon, pos. Divovo, VNIИ konevodstva

The coat color of horses is of considerable interest due to its aesthetic appeal and significance in breed identification. Understanding the genetic mechanisms underlying coat color variation is important for horse breeders and geneticists. The purpose of the study is to study the influence of polymorphism of the *MC1R* and *ASIP* genes on the coat color of Kabardian horses, a unique domestic breed. The proposal is not agreed upon, the idea is not clear. Why was the research done? Based on the results of genotyping 127 horses of the Kabardian breed using the *MC1R* and *ASIP* genes, the frequencies of various alleles and genotypes on which the color of the animals depends were determined. Statistical analysis was carried out to determine the relationship between them. Kabardian horses are characterized by a wide range of colors, including karak, black, bay, dark bay and gray. The majority of the horses studied (96.9 %) were found to have a dominant allele *E* of the *MC1R* gene, associated with the synthesis of eumelanin and darker coat color. The frequency of the *A/A* genotype of the *ASIP* gene increased as the coat color lightened: black – 0.0 %, karak – 9.5 %, dark bay – 56.6 %, bay – 84.8 %. The frequency of the mutant allele *a* was 0.280. In general, it contributed to the formation of black coat color in Kabardian horses. The results of the study provide insight into the relationship of the *MC1R* and *ASIP* genes with the formation of coat colors in Kabardian horses. These results have practical implications for horse breeders when selecting individuals for crossbreeding and contribute to the understanding of the genetic mechanisms underlying variation in coat color within horse populations.

Ключевые слова: кабардинская порода, лошади, масть, полиморфизм, *MC1R*, *ASIP*.

Key words: Kabardian breed, horses, color, polymorphism, *MC1R*, *ASIP*.

Кабардинская порода лошадей одна из самых древних в России. Ее высоко ценят за выносливость и устойчивость к различным климатическим условиям табунного содержания в средне- и высокогорье. Благодаря прочности копыт кабардинские лошади надежны и безопасны для езды в горных условиях. Кроме того, они обладают высокой скоростной выносливостью и лег-

костью движения, что позволяет им быть успешными участниками различных соревнований.

На сегодняшний день существует несколько программ по улучшению и развитию породы, которые включают в себя подбор качественных жеребцов и кобыл для разведения, а также проведение специальных мероприятий для дальнейшего совершенствования

породы. Для их реализации необходимо определить характеристику породы на морфологическом и генетическом уровне, что служит первым шагом в разработке селекционной стратегии и установлении приоритетов развития породы.

Лошади относятся к числу самых разнообразных по окраске животных, которые существуют на нашей планете. При этом цвет шерсти имеет не только визуальную функцию, но и может служить индикатором здоровья, уровня стресса и даже способностей к выполнению определенных задач [1]. Наиболее известные варианты мастей лошадей – гнедая и ее оттенки, вороная, серая и рыжая. Как и у многих других видов животных, процесс формирования масти у лошадей довольно сложен [2].

Белок, кодируемый геном *MC1R*, находится на поверхности меланоцитов и активируется меланоцитарным стимулирующим гормоном (MSH), что приводит к образованию эумеланина, который представляет собой черный пигмент, обусловленный экспрессией гена дикого типа (аллель *E*). Мутация *MC1R* C901T приводит к образованию рецессивного аллеля *e*, влияние которого обуславливает образование в меланоцитах только феомеланина [3], который представляет собой красно-желтый пигмент. Меланоциты, гомозиготные по рецессивной мутации *e/e* в гене *MC1R*, не могут быть активированы MSH, что приводит к образованию только феомеланина [4, 5].

Ген *ASIP* кодирует сигнальный белок агути (аллель *A* – дикий тип). Этот белок – антагонист MSH и может блокировать функцию *MC1R*, что приводит к ингибированию синтеза эумеланина в меланоцитах лошади [2]. Мутация в виде делеции длиной 11 п. н. в экзоне 2, гена *ASIP*, которая соответствует аллелю *a*, приводит к потере функции сигнального белка агути и обуславливает черный окрас шерсти у лошадей [6].

Гены *MC1R* и *ASIP* полиморфны, то есть они имеют множество различных вариантов, которые могут влиять на окраску шерсти у лошадей [7]. Кроме того, их мутации могут взаимодействовать между собой, что приводит к более сложным вариантам окраски.

Также следует отметить, что на масть лошадей могут влиять и другие гены, например, отвечающие за формирование пятен, полос и других отметин на теле лошади [8]. Однако важность генов *MC1R* и *ASIP* в этом процессе неоспорима, и они остаются предметом активных исследований [9].

Исходя из изложенного, гены *MC1R* и *ASIP* играют важную роль в формировании окраски шерсти у лошадей и могут быть использованы для прогнозирования масти в селекционной работе [10].

Масти в кабардинской породе разнообразны, но наибольшее распространение имеют гнедые, темно-гнедые, вороные и караковые лошади. Так, среди животных производящего состава, записанных в VIII том государственной племенной книги лошадей кабардинской породы [11], светло-гнедых был 0,1%, гнедых – 33,3%, темно-гнедых – 21,7%, вороных – 24,0%, караковых – 20,4%, серых – 0,5%.

Цель исследования – установить распределение аллелей генов пигментообразования *MC1R* и *ASIP* в существующей популяции кабардинской породы для определения ее характеристик по этим ДНК-маркерам.

Методика. Материалом для исследований послужили образцы крови от 127 взрослых лошадей кабардинской породы из хозяйств Кабардино-Балкарии, Краснодарского края, Адыгеи и Карачаево-Черкесии (Хабезский район). Образцы крови собирали в сте-

рильные вакуумные пробирки с антикоагулянтом (K3EDTA) объемом 6 мл. Сбор материала проводили квалифицированные специалисты в присутствии ветеринаров. При взятии проб строго соблюдались все пункты Федерального Закона от 27.12.2018 г. № 498-ФЗ об ответственном обращении с животными (справка № 1671 от 25.04.2022 г.).

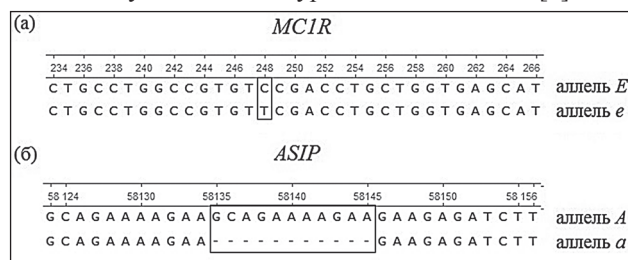
Геномную ДНК выделяли с использованием реагентов «ДНК-Экстрен-1» (СИНТОЛ, Россия). Амплификация фрагментов проводили на амплификаторе Biorad T100. Состав ПЦР смеси для обоих локусов, общим объемом 25 мкл включал: 1×ПЦР-буфер, 2,5 mM MgCl₂, смесь дНТФ по 0,2 mM каждого нуклеотида, 0,2 mM каждого праймера 0,5 ед. Taq ДНК-полимеразы («SibEnzyme», Россия) и 50 нг ДНК.

Генотипирование по SNP-маркеру 248C>T (см. рисунок, а) гена *MC1R* осуществляли методом PCR-RFLP согласно описанию L. Marklund с соавт. [12] с использованием опубликованных последовательностей праймеров: 5'-CCTCGGGCTGACCACCAACCAGACGGGGCC-3', 5'-CCATGGAGCCGCGAGATGAGCACAT-3'.

Амплификацию локуса *MC1R* проводили по следующей схеме: 10 мин при 95 °C; 30 с при 95 °C, 40 с при 60 °C, 1 мин 30 с при 72 °C (33 цикла); 10 мин при 72 °C (финальная элонгация). Детекцию полиморфизма 248C>T в амплифицированном фрагменте (317 п. н.) ДНК осуществляли с использованием эндонуклеазы рестрикции TaqI («SibEnzyme», Россия). Эта эндонуклеаза рестрикции распознает замену 248C>T, которая приводит к образованию однонуклеотидного полиморфизма в позиции 180 амплифицированного фрагмента. По окончании гидролиза нерестрицированный фрагмент длиной 317 п. н. соответствовал генотипу *E/E*, наличие трех фрагментов длиной 317, 180 и 137 п. н. – генотипу *E/e*, два фрагмента длиной 180 и 137 п. н. – генотипу *e/e*. Условия рестрикции соответствовали рекомендациям производителя, дальнейшее разделение полученных фрагментов проводили путем электрофореза в 2 %-ном агарозном геле.

Детекцию делеции 11 п. н. (см. рисунок, б) в позиции 58135 локуса *ASIP* проводили методом, предложенным S. Rieder с соавт. [6], с использованием последовательностей праймеров: 5'-CTTTGTCTCTCTTTGAAGCATTTG-3', 5'-GAGAAGTCCAAGGCCTACC-TTG-3'. Режим амплификации: 10 мин при 95 °C; 30 с при 95 °C, 40 с при 55 °C, 1 мин 30 с при 72 °C (33 цикла); 10 мин при 72 °C (финальная элонгация). Полученные ампликоны размером 102 п. н. (аллель *A*) и 91 п. н. (аллель *a*) разделяли электрофорезом в 3 %-ном агарозном геле.

Обозначения аллельных вариантов исследуемых генов *MC1R* (*E* – доминантный аллель дикого типа, *e* – рецессивный (мутантный) аллель) и *ASIP* (*A* – доминантный аллель дикого типа, *a* – рецессивный (мутантный) аллель) соответствуют номенклатуре Л. В. Калинковой [1].



Вариации в генах *MC1R* и *ASIP*:
а) миссенс-мутация в гене *MC1R* обозначена рамкой;
б) позиция делеции 11 п. н. в гене *ASIP* обозначена рамкой (референсный геном *EquCab3.0*).

Масти лошадей классифицировали в соответствии с результатами ранее проведенных исследований [2, 6]. В исследованной выборке идентифицированы лошади с гнедой (33 гол.), темно-гнедой (23 гол.), вороной (33 гол.), караковой (21 гол.) и серой (17 гол.) мастью. Было установлено, что серые лошади рождаются с исходным окрасом шерсти (например, вороными или гнедыми) и постепенно теряют пигментацию шерсти с увеличением возраста, но сохраняют темную кожу. Для вороной масти характерен черный окрас шерсти на всех частях тела, хотя у некоторых есть белые отметины. Лошади с караковой мастью имеют черную шерсть на гриве, хвосте, ногах, а также почти по всему телу, но красноватые или коричневые пигменты вокруг глаз, морды и в паху. У животных с темно-гнедой мастью черная грива, хвост и ноги, шерсть на туловище черно-бурого или шоколадно-черного цвета при ярких черных подпалах на морде и ярко выраженном черном оплечье на холке. У гнедых лошадей коричневое или красноватое тело, черная грива, ноги и хвост.

Для популяционно-генетического анализа определяли частоту встречаемости аллелей и генотипов в исследуемой породе, а также наблюдаемую гетерозиготность (H_o), которую рассчитывали по формуле: $H_o = N/n$, где N – количество гетерозигот, n – объем выборки. Вычисление наблюдаемой гетерозиготности (H_o) проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2016.

Результаты и обсуждение. В процессе генотипирования кабардинских лошадей по гену *MC1R* установлено, что подавляющее большинство (96,9 %) исследованных животных были носителями доминантного аллеля *E*. Частота аллеля *e* в этом гене, который приводит к подавлению синтеза пигмента эумеланина, в группе исследованных лошадей составляет 0,280 (табл. 1).

Табл. 1. Частоты встречаемости аллелей генов *MC1R* и *ASIP*, детерминирующих пигментацию кожи и волос ($n = 127$)

Ген	Аллель	Частота	Наблюдаемая гетерозиготность
<i>MC1R</i>	<i>E</i>	0,720	0,417
	<i>e</i>	0,280	
<i>ASIP</i>	<i>A</i>	0,496	0,236
	<i>a</i>	0,504	

Частота генотипа *E/E* гена *MC1R* по мере изменения окраса шерсти с темного (вороного) на более светлый (гнедой) в целом снижается, в отличие от частоты генотипа *E/e*, которая в основном увеличивалась при переходе с вороной на гнедую масть (табл. 2). При этом генотип *E/e* был преимущественным у лошадей гнедой масти (81,8 %), у темно-гнедых лошадей частота генотипа *E/E* составляла 39,1 %, *E/e* – 60,9 %, большинство вороных (69,7 %) и караковых (71,4 %) лошадей имели генотип *E/E*. Генотип *e/e*, который характерен для рыжего окраса шерсти [2], обнаружен только у серых лошадей с частотой 23,5 %. Результаты теста χ^2 свидетельствуют, что фенотипы окрасов шерсти лошадей достоверно ($p < 0,001$) связаны с генотипами *MC1R*.

Табл. 2. Распределение генотипов *MC1R* и *ASIP* по мастям, %

Ген	Генотип	Масть					Значение χ^2
		гнедая	темно-гнедая	вороная	караковая	серая	
<i>MC1R</i>	<i>E/E</i>	18,2	39,1	69,7	71,4	41,2	$\chi^2 = 34,56$ $p < 0,001$
	<i>E/e</i>	81,8	60,9	30,3	28,6	35,3	
	<i>e/e</i>	0	0	0	0	23,5	
<i>ASIP</i>	<i>A/A</i>	84,8	56,6	0	9,5	29,4	$\chi^2 = 98,6$ $p < 0,001$
	<i>A/a</i>	15,2	39,1	0	47,6	35,3	
	<i>a/a</i>	0	4,3	100	42,9	35,3	

Частота мутантного аллеля *a* гена *ASIP* в популяции кабардинской породы составила 0,504 (см. табл. 1), в том

числе 49 особей были его гомозиготными носителями. Ранее Rieder S. с соавторами установили, что генотип *a/a* встречается только у вороных, караковых и серых лошадей [6]. Однако в нашем исследовании его отмечали у темно-гнедых особей с частотой 4,3 %. От темных (караковых) до светлых (гнедых) мастей частота генотипа *A/a* постепенно снижалась, а генотипа *A/A* увеличивалась (см. табл. 2). Генотипы *A/a* и *a/a* у лошадей караковой масти отмечали примерно с одинаковой частотой (47,6 % и 42,9 % соответственно). У гнедых и темно-гнедых лошадей преимущественный генотип изменился на *A/A* (от 84,8 % для гнедых до 56,6 % для темно-гнедых). Все животные вороной масти имели генотип *a/a*, как было отмечено и в предыдущих исследованиях [2]. Результаты теста χ^2 показывают, что окрасы шерсти лошадей были достоверно связаны с генотипами *ASIP* ($p < 0,001$).

В исследованиях, проведенных на людях и других млекопитающих, было показано, что ген *MC1R* играет важную роль в определении цвета волос и шерсти [13, 14, 15].

Выводы. У лошадей кабардинской породы, окрас шерсти меняется преимущественно в зависимости от генотипа *MC1R*, от более темного при более высокой частоте аллеля *E*, на светлый при увеличении частоты аллеля *e*.

Анализ распределения полиморфизмов гена *ASIP* по мастям показал, что генотип *A/a* связан с темным окрасом шерсти (например, темно-гнедой и караковой), *A/A* – с более светлым (например, гнедой).

Полученные результаты могут быть полезны при составлении программ для совершенствования и усилий по сохранению кабардинской породы, а также обеспечат молекулярную основу для дальнейших исследований механизма окраса шерсти лошадей и других млекопитающих.

Литература.

1. Калинкова Л. В., Зайцев А. М., Иванов Р. В. Генетическая структура локальной популяции лошадей якутской породы по генам *MC1R*, *ASIP*, *DMRT3* и *MSTN* // *Сельскохозяйственная биология*. 2022. Т. 57. № 2. С. 272–282. doi 10.15389/agrobiology.2022.2.272rus.
2. Synergy between *MC1R* and *ASIP* for coat color in horses (*Equus caballus*) / S. Shang, Y. Yu, Y. Zhao, et al. // *Journal of Animal Science*. 2019. Vol. 97. No. 4. P. 1578–1585. doi 10.1093/jas/skz071.
3. Reißmann M. Die Farben der Pferde: Genetik – Klassifizierung – Charakteristik. München: Cadmos, 2009. 272 p.
4. Genetic characterization of kushum horses in kazakhstan based on haplotypes of mtDNA and y chromosome, and genes associated with important traits of the horses / T. B. Nguyen, R. C. Paul, Y. Okuda et al. // *Journal of Equine Science*. 2020. Vol. 31. No. 3. P. 35–43. doi: 10.1294/jes.31.35.
5. The *MC1R* and *ASIP* coat color loci may impact behavior in the horse / L. N. Jacobs, E. A. Staiger, J. D. Albright, et al. // *Journal of Heredity*. 2016. Vol. 107. No. 3. P. 214–219. doi 10.1093/jhered/esw007.
6. Mutations in the agouti (*ASIP*), the extension (*MC1R*), and the brown (*TYRP1*) loci and their association to coat color phenotypes in horses (*Equus caballus*) / S. Rieder, S. Taourit, D. Mariat, et al. *Mammalian Genome*. 2001. Vol. 12. No. 6. P. 450–455. doi: 10.1007/s003350020017.
7. Brooks S. A., Bailey E. Exon skipping in the *KIT* gene causes a Sabino spotting pattern in horses // *Mammalian Genome*. 2005. Vol. 16. No. 11. P. 893–902. doi: 10.1007/s00335-005-2472-y.

8. *Regulatory mutations in TBX3 disrupt asymmetric hair pigmentation that underlies Dun camouflage color in horses* / F. Imstrand, K. McGowan, C.-J. Rubin, et al. // *Nature Genetics*. 2016. Vol. 48. No. 2. P. 152–158. doi: 10.1038/ng.3475.
9. *Genetic Background of the Polish Primitive Horse (Konik) Coat Color Variation – New Insight into Dun Dilution Phenotypic Effect* / J. Cieslak, L. Wodas, A. Borowska, et al. // *Journal of Heredity*. 2021. Vol. 112. No. 5. P. 436–442. doi 10.1093/jhered/esab034.
10. Liu X., Ma Y., Jiang L. *Genomic regions under selection for important traits in domestic horse breeds* // *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*. 2017. Vol. 4. No. 3. P. 289–294. doi 10.15302/J-FASE-2017155.
11. Амшников Х. К., Тарчокова Т. М., Халилов Р. А. Государственная книга племенных лошадей кабардинской породы. Дивово: изд. ФГБНУ «ВНИИ коневодства», 2019. Т. VIII. 724 с.
12. *Missense mutation in the gene for melanocyte-stimulating hormone receptor (MC1R) is associated with the chestnut coat color in horses* / L. Marklund, Johansson M. Moller, K. Sandberg, et al. // *Mammalian Genome*. 1996. Vol. 7. No. 12. P. 895–899. doi: 10.1007/s003359900264.
13. *Melanocortin 1 receptor variants and their association with phenotypic characteristics and sporadic multiple primary melanomas in a cohort of 402 Spanish subjects* / D. Vírveda-González, P. Lázaro-Ochaita, G. Ribas-Despuig, et al. // *Experimental Dermatology*. 2023. Vol. 32 No. 5. P. 678–683. doi: 10.1111/exd.14739.
14. *Mutations in ASIP and MC1R: dominant black and recessive black alleles segregate in native Swedish sheep populations* / C. M. Rochus, K. Westberg Sunesson, E. Jonas, et al. // *Animal Genetics*. 2019. Vol. 50. No. 6. P. 712–717. doi: 10.1111/age.12837.
15. *Genetic Variation in Coat Colour Genes MC1R and ASIP Provides Insights Into Domestication and Management of South American Camelids* // J. C. Marín, R. Rivera, J. Cortés, et al. // *Frontiers in Genetics*. 2018. Vol. 9. URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00487/full> (дата обращения: 29.08.2023). doi: 10.3389/fgene.2018.00487.

Поступила в редакцию 11.09.2023

После доработки 01.10.2023

Принята к публикации 07.11.2023