

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОССИЙСКИХ И БЕЛОРУССКОЙ ПОПУЛЯЦИЙ ЗУБРА (*BISON BONASUS*), СЕВЕРОАМЕРИКАНСКОГО БИЗОНА (*BISON BISON*) И КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (*BOS TAURUS*)

О.В. КОСТЮНИНА¹, М.Е. МИХАЙЛОВА², А.В. ДОЦЕВ¹, И.И. ЗЕМЛЯНКО³, В.В. ВОЛКОВА¹, М.С. ФОРНАРА¹, Н.А. АКОПЯН¹,
А.С. КРАМАРЕНКО⁴, И.М. ОХЛОПКОВ⁵, П.В. АКСЕНОВА^{6,8}, Е.Л. ЦИБИЗОВА⁷, Р.А. МНАЦЕКАНОВ⁸, Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹

¹ ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста»,
142132, пос. Дубровицы, Российская Федерация

² Институт генетики и цитологии НАН Беларуси, 220072, Минск, Республика Беларусь

³ ФГБУ «Приокско-Тerrasный государственный заповедник», 142200, Данки, Российская Федерация

⁴ Николаевский национальный аграрный университет, 54020, Николаев, Украина

⁵ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН,
677980, Якутск, Российская Федерация

⁶ Донской государственный технический университет (ДГТУ), 344000, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

⁷ ФГБУ «Окский государственный природный биосферный заповедник», 391072, Брыкин Бор, Российская Федерация

⁸ Всемирный фонд дикой природы (WWF России), 109240, Москва, Российская Федерация

E-mail: kostolan@yandex.ru, m.mikhailova@igc.by, arsendotsev@vij.ru, zemlyankoirina@yandex.ru, moonlit_elf@mail.ru,
margaretfornara@gmail.com, kssnail1990@gmail.com, imokhlopkov@yandex.ru, polinax-1@mail.ru, etzibizova@mail.ru,
RMnatsekanov@wwf.ru, n_zinovieva@mail.ru

*Выполнено сравнительное исследование аллелофонда и генетической структуры двух российских и одной белорусской популяций зубра *Bison bonasus* с представителями видов *Bison bison* и *Bos taurus*. Исследуемые популяции были представлены образцами Окского государственного природного биосферного заповедника ($n = 42$) и Приокско-Тerrasного государственного природного биосферного заповедника ($n = 69$), заповедника «Беловежская пуща» ($n = 42$), а в качестве групп сравнения были привлечены бизоны ($n = 8$) и крупный рогатый скот ($n = 55$). Анализ полиморфизма фрагмента D-петли мтДНК показал наличие единого для всех зубров гаплотипа, отличного от последовательностей бизона и крупного рогатого скота. Исследование 11 микросателлитных маркеров показало сниженное разнообразие зубра по сравнению с бизоном и крупным рогатым скотом. Анализ значений попарных генетических дистанций D_{Jost} позволил установить четкую генетическую дифференциацию зубра от групп сравнения. Полученные данные могут быть использованы при оценке популяционно-генетических параметров зубров, для выявления гибридных особей с целью исключения их из размножения, а также для разработки стратегии и мероприятий по сохранению и совершенствованию генетических ресурсов зубра.*

Ключевые слова: зубр, *Bison bonasus*, североамериканский бизон, крупный рогатый скот (КРС), мтДНК, микросателлиты, аллелофонд.

Введение. Проблема реинтродукции различных, практически истребленных представителей фауны, в частности зубра, привлекает пристальное внимание мирового сообщества. Исчезновение зубра в дикой природе было вызвано причинами антропогенного характера: уничтожением местообитаний (вырубка и выжигание лесов, преобразование лесных массивов в сельскохозяйственные угодья) и неограниченной охотой [1]. Восстановление популяции зубра до 7180 особей [2] – это результат эффективной международной деятельности, направленной на восстановление вида, истребленного в дикой природе. В настоящее время стратегически важным является сохранение зубра как биологического вида с максимально возможным генетическим разнообразием, функционирующего как естественный компонент природных экосистем.

Основателями беловежской линии разведения стали только 7 из 52 сохранившихся в западноевропейских зоопарках особей (4 самца и 3 самки) [3], основателями кавказско-беловежской линии стали 12 особей (5 самцов и 7 самок), включая самца кавказского зубра [4,

© О.В. КОСТЮНИНА, М.Е. МИХАЙЛОВА,
А.В. ДОЦЕВ, И.И. ЗЕМЛЯНКО, В.В. ВОЛКОВА,
М.С. ФОРНАРА, Н.А. АКОПЯН,
А.С. КРАМАРЕНКО, И.М. ОХЛОПКОВ,
П.В. АКСЕНОВА, Е.Л. ЦИБИЗОВА,
Р.А. МНАЦЕКАНОВ, Н.А. ЗИНОВЬЕВА, 2020

5]. Использование быка М 100 KAUKASUS в размножении позволило предотвратить полную утрату генов кавказского подвида зубра [4].

Восстановление зубра как биологического вида осуществлялось путем воспроизводства двух генетических линий: беловежской, включающей животных беловежского подвида, и кавказско-беловежской линии с особями смешанного происхождения [6, 7]. Наибольшее влияние в сформированных линиях оказали особи М 45 PLEBEJER и F 42 PLANTA. Их гены преобладают в обеих линиях, составляя более 80 % общего числа в беловежской линии, и 50 % в кавказско-беловежской линии [8]. Поскольку в восстановлении обеих линий участвовало очень ограниченное количество основателей, то у первых поколений зубров отмечалась очень высокая степень родства и, следовательно, степень инбридинга, которая в беловежской линии находится на уровне 44 %, а в кавказско-беловежской на уровне 26 % [4, 8].

Еще одной серьезной проблемой является наличие в беловежской линии только одной мужской линии, то есть все они наследуют Y-хромосому от М 45 PLEBEJER, в то время как в кавказско-беловежской линии основателями являются три быка М 45 PLEBEJER, М 100 KAUKASUS и М 15 BERGRBNDER [6, 9].

Популяционно-генетические параметры беловежского и кавказско-беловежского зубра должны подвергаться пристальному изучению. Для оценки биоразнообразия и анализа популяционных характеристик зубра используют различные типы маркеров. Первые работы, посвященные изучению популяций зубра различного происхождения с целью оценки уровня гетерозиготности и степени инбридинга, базировались на анализе групп крови [10]. Так, изучение 16 полиморфных систем (22 локуса) биохимических маркеров крови в разных линиях зубра, позволило предположить наличие определенных процессов, препятствующих уменьшению генетического разнообразия популяции, а полученные оценки генетических расстояний между линиями зубра продемонстрировали тесную связь между ними [11].

Были проведены исследования вариабельности главного комплекса гистосовместимости (МНС) I класса зубра, показано наличие трех распространенных гаплотипов, относящихся к

1–3 классическим локусам класса I [12]. Исследование полиморфизма МНС-DRB3 в популяциях зубра показало низкую вариабельность, что является отражением эффекта «бутылочного горлышка» в начале 20-го века [13, 14]. Интерес исследователей был также обращен на поиск полиморфных вариантов по генам, кодирующим белки молока, например, каппа-казеина [15, 16].

Довольно обширны исследования полиморфизма мтДНК зубра [17–20]. Следует отметить, что рядом авторов выявлялось наличие гибридизации между зубром (*Bison bonasus* (L., 1758)) и крупным рогатым скотом (*Bos taurus* L., 1758). Т. Ward с соавт. [18] впервые обнаружили гаплотип крупного рогатого скота у одного из четырех исследованных зубров российской популяции. Степень генетической дифференциации зубра, несущего мтДНК КРС, от других исследованных зубров достигала $16,91 \pm 0,01$ %, в то время как различия с восемью исследованными породами КРС составили всего $0,87 \pm 0,44$ %. Н. Юдиным и соавт. [20] был определен как гаплотип мтДНК чистокровного зубра, так и мтДНК домашнего скота среди особей группировки зубров в Черге. Также было обнаружено, что одна гибридная самка со сложной родословной (*B. bonasus* × *B. bison* × *B. taurus*) была доставлена в Чергу в 1980-х годах (Yudin et al., 2012).

Для оценки популяционно-генетических параметров, в том числе и в популяциях зубра, находят свое применение микросателлиты ДНК [21–26].

В настоящее время для изучения биоразнообразия и демографических процессов различных популяций зубра все больше применяют SNP чипы, разработанные для крупного рогатого скота. Несомненный интерес представляют исследования К. Węsek и соавт. [27] с использованием данной технологии для изучения демографических процессов, произошедших до и после истребления зубра в дикой природе. В распоряжении исследователей имеется полная генетическая последовательность зубра, полученная с использованием полногеномного секвенирования [28].

Применение различных методов молекулярно-генетических исследований подтверждает низкий уровень генетической изменчи-

ности в популяциях зубра, а, следовательно, популяционно-генетические параметры (коэффициент инбридинга, генетическое разнообразие) должны находиться под постоянным контролем. Немаловажным является и выявление особей, в геноме которых присутствует ДНК крупного рогатого скота или североамериканского бизона. Целью настоящего исследования явилось определение популяционно-генетических параметров в трех группах зубров, локализованных в Приокско-Тerrasном заповеднике, Окском заповеднике и в Беловежской пушце (территория Беларуси) с использованием микросателлитных маркеров, определение гаплотипов контрольного региона D-петли мтДНК и проведение сравнительных исследований с популяциями североамериканского бизона и крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Материалом для исследований служили образцы биоматериала (образцы крови или кожи) зубров, содержащихся в Центральном зубровом питомнике Приокско-Тerrasного заповедника (PTZ, $n = 69$), в зубровом питомнике Окского заповедника (OKZ, $n = 42$), образцы зубра из заповедника Беловежская пушца (Беларусь) (BEL, $n = 42$). В качестве групп сравнения были привлечены североамериканские бизоны (BIS, $n = 8$) и крупный рогатый скот (BOS, $n = 55$, из которых 25 голов голштинской породы – HLST и 30 голов симментальской породы – SIMM).

Для выделения ДНК применялись колонки Nexttec (Nexttec Biotechnologie GmbH, Мюнхен, Германия) и набор «ДНК-Экстран-2» (ООО «Синтол», Россия). Для изучения полиморфизма контрольного региона использовались праймеры Beth Big F ACCCCCAAAGCTGAGTTCT и Beth 80r CAAGCATCCCCCAAAA-TAAA, предложенные G. Larson (цит. по [29]). Услуги по секвенированию оказывались ООО «Евроген» (Москва, Россия). Анализировался фрагмент длиной 630 п.н. Выравнивание последовательностей осуществлялось в программе Ugene 1.21.0. [30]. Построение медианной сети производилось с помощью программы PopART 1.7 [31].

Была проведена мультиплексная амплификация 11 STR локусов крупного рогатого скота (*TGLA227*, *BM2113*, *ETH10*, *SPS115*, *TGLA122*,

INRA023, *TGLA126*, *BM1818*, *ETH225*, *BM1824*, *TGLA53*). Реакции проводились в конечном объеме 10 мкл в ПЦР буфере, с 200 мкм dNTPs, 1,0 mM MgCl₂, 0,5 mM смеси праймеров, 1 ед. Taq-полимеразы («Диалат Лтд», Россия) и 50–100 нг геномной ДНК. После начальной денатурации (95 °C, 4 мин) проводилось 35 циклов в следующем температурно-временном режиме: 9 °C, 2 с; 63 °C, 3 с; 72 °C, 1 мин. Фрагментный анализ выполнен на генетическом анализаторе ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) с использованием программного обеспечения Gene Mapper v. 4 (Applied Biosystems, США). Длины аллелей микросателлитов были стандартизированы согласно стандартам ISAG.

Для расчета среднего числа аллелей на locus (N_a) и тестирования по сохранению генетического равновесия по Харди-Вайнбергу использовалась программа GenAlEx 6.5 [32]. Расчет показателей генетического разнообразия (H_o , H_e , A_r , F_{is} , uH_e , uF_{is}) и попарных дистанций D_{Jost} и F_{st} осуществлялся в R пакете «*diveRsy*» » [33–35]. Построение Neighbor-Net на основе Jost's D выполнено в программе Splitstree 4.14.6 [36].

Анализ главных компонент («Principal Component Analysis», PCA) был выполнен с помощью R пакета «*adegenet*» [37] и визуализирован в R пакете «*ggplot2*» [38].

Популяционная структура была оценена, используя Admixture-модель в программе Structure 2.3.4 [39]. Анализ проводили, используя следующие установки: длина burn-in периода – 100 000 и модель Марковских цепей Монте Карло (MCMC) – 100 000 повторов. Для каждого значения K выполняли 10 итераций. Визуализацию результатов кластеризации в Structure осуществляли в R пакете «*pophelper*» [40].

Результаты исследований. Анализ последовательностей фрагмента D-loop мтДНК длиной 630 п.н. показал, что в целом для всех исследованных зубров был характерен один гаплотип, идентичный последовательности KY055664 (NCBI – National Center for Biotechnology Information). Для выявления интрогрессии североамериканского бизона и крупного рогатого скота в популяциях зубра было произведено секвенирование фрагмента D-петли мтДНК исследуемых бизонов и группы КРС. Среди бизонов было выявлено пять различных

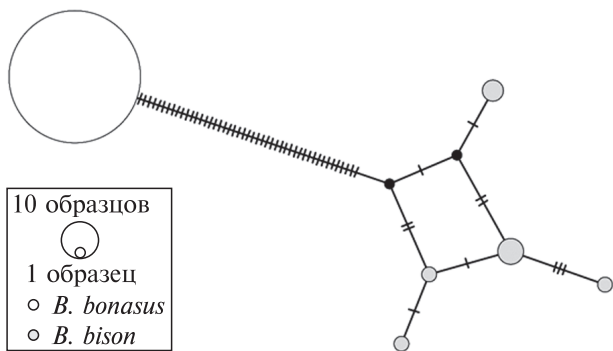


Рис. 1. Медианная сеть видов *B. bonasus* и *B. bison*

между собой последовательностей, идентичных депонированным в геномном банке сиквенсам *Bison bison* – JN632601, AY748700, AY748673, AY748477, AY748478.

Для группы животных, относящихся к КРС, были идентифицированы характерные для *Bos taurus* генетические профили. Таким образом, у зубров не было выявлено последовательностей, идентичных для бизона или крупного рогатого скота.

На рис. 1 приведена медианная сеть, построенная с использованием генетических про-

Таблица 1. Мономорфные и дефицитные по гетерозиготам локусы в исследуемых группах

Популяция	Локус	DF	χ^2	P
BIS	TGLA227	Мономорфный	–	–
BIS	INRA023	Мономорфный	–	–
BEL	TGLA227	Мономорфный	–	–
BEL	BM2113	Мономорфный	–	–
BEL	INRA023	Мономорфный	–	–
OKZ	TGLA227	1	9,476	0,002
OKZ	BM2113	Мономорфный	–	–
OKZ	BM1824	1	4,367	0,037
PTZ	TGLA227	Мономорфный	–	–
PTZ	BM2113	Мономорфный	–	–
PTZ	SPS115	3	9,421	0,024
PTZ	INRA023	Мономорфный	–	–
SIMM	TGLA227	21	50,265	<0,001
SIMM	TGLA126	10	34,309	<0,001
SIMM	TGLA53	28	89,799	<0,001

филей по мтДНК зубров и бизонов. Генетические профили крупного рогатого скота групп SIMM и HLST не включали в связи с их значительным разнообразием в сравнении с бизоном и зубром. Этот рисунок подтверждает наличие дифференциации зубров и бизонов, однако в связи с наличием единого для зубров гаплотипа определить принадлежность особей к бело-вежской либо кавказско-бело-вежской линии не представляется возможным.

Исследование полиморфизма 11 микросателлитных локусов позволило определить параметры популяционного разнообразия исследуемых групп животных. В табл. 1 представлены для каждой популяции локусы, по которым отмечен статистически значимый дефицит гетерозигот либо выявлены мономорфные локусы.

Во всех выборках зубра мономорфным являлся локус *BM2113* (табл. 1). В популяциях BIS, BEL и PTZ локусы *INRA023* и *TGLA227* были мономорфными, а в популяции OKZ по локусу *TGLA227* было отмечено смещение генотипического равновесия ($P < 0,01$) в сторону гомозигот. По локусу *SPS115* среди животных PTZ и по локусу *BM1824* среди животных OKZ было также отмечено отсутствие генотипического равновесия ($P < 0,05$). В обеих выборках КРС (HLST и SIMM) мономорфных локусов отмечено не было.

Расчет показателей генетического разнообразия исследованных выборок животных представлен в табл. 2. Наименьшими значениями показателей генетического разнообразия характеризовались зубры BEL, среди животных OKZ и PTZ данные значения были несколько выше и схожи между собой, за исключением большего числа «приватных» аллелей в выборке OKZ. Для животных BEL «приватные» аллели не выявлены. Популяция BIS характеризовалась более высоким уровнем разнообразия, нежели зубры, но уступала по всем параметрам обоим выборкам КРС (SIMM и HLST).

В целом представленные в табл. 2 данные демонстрируют снижение генетического разнообразия зубров по сравнению с бизонами и КРС.

С целью визуализации матрицы попарных генетических дистанций D_{Jost} , на их основе была построена дендрограмма, используя алгоритм «сети соседей» (NeighborNet) (рис. 2).

■ Сравнительная генетическая характеристика российских и белорусской популяций зубра (*Bison bonasus*) ■

Имеет место четкое разделение зубров, бизонов и крупного рогатого скота, при этом, выборки зубров значительно отдалены от бизона и крупного рогатого скота. Между самими выборками зубров оценки генетической дифференциации варьировали в пределах 0,030–0,084 (для F_{st}) и 0,002–0,008 (для D_{Jost}). Наиболее близки были популяции ОКЗ и РТЗ.

Данный факт подтверждается и результатами проведенным в разрезе отдельных популяций анализом главных компонент (РСА), которые свидетельствуют, что зубры имеют высокий уровень генетической дифференциации от групп сравнения – бизонов и КРС (рис 3).

В пространстве первых двух главных компонент (рассчитанных на основе матрицы генетических дистанций между всеми исследованными животными), отмечается существенная дифференциация популяций согласно их видовой принадлежности, однако внутри вида *Bison bonasus* в зависимости от популяционной принадлежности дифференциация не выражена (рис. 3).

Анализ структуры популяций (рис. 4) исследуемых животных показал четкую дифференциацию представителей рода *Bison*, от крупно-



Рис. 2. Дендрограмма на основании попарных генетических дистанций (D_{Jost}), построенная по алгоритму «сети соседей» (NeighborNet)

го рогатого скота, принадлежащего к роду *Bos*, при $K = 2$. При $K = 3$ наблюдается дифференциация бизонов от зубров. При $K = 4$ не происходит разделения групп BEL, ОКЗ, РТЗ между собой.

Обсуждение. Проведенные нами исследования позволили выявить уникальные аллели в отечественных группировках зубра ОКЗ и РТЗ, также показать несколько большее генетическое разнообразие зубров из ОКЗ и РТЗ в сравнении с животными из Беловежской пуши (BEL), что, по всей видимости, обусловлено принадлежностью российских группировок зубра к кавказско-беловежской линии и их пополнением животными из зарубежных центров

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия популяций зубров, бизонов и крупного рогатого скота по локусам микросателлитов ($M \pm m$)

Параметры ¹	Популяция					
	BEL	OKZ	PTZ	BIS	SIMM	HLST
<i>Na</i>	1,818 ± 0,182	2,182 ± 0,182	2,182 ± 0,296	3,364 ± 0,49	5,818 ± 0,444	6,000 ± 0,447
<i>Ne</i>	1,489 ± 0,129	1,565 ± 0,141	1,566 ± 0,163	2,439 ± 0,430	3,473 ± 0,393	3,750 ± 0,416
<i>Npr</i>	0	0,182 ± 0,122	0,091 ± 0,091	0,818 ± 0,263	0,909 ± 0,368	1,273 ± 0,488
<i>Ho</i>	0,281 ± 0,067	0,302 ± 0,081	0,281 ± 0,077	0,429 ± 0,093	0,653 ± 0,059	0,676 ± 0,039
<i>He</i>	0,277 ± 0,068	0,286 ± 0,069	0,275 ± 0,072	0,427 ± 0,095	0,652 ± 0,045	0,686 ± 0,032
<i>Fis</i> ²	-0,040	0,010	-0,011	-0,044	-0,002	0,013
	[-0,156; 0,076]	[-0,132; 0,152]	[-0,13; 0,108]	[-0,2; 0,112]	[-0,12; 0,116]	[-0,067; 0,093]
<i>Ar</i>	1,771 ± 0,194	1,864 ± 0,18	1,871 ± 0,22	3,1 ± 0,482	4,147 ± 0,343	4,364 ± 0,276
<i>uHe</i>	0,280 ± 0,069	0,289 ± 0,07	0,277 ± 0,073	0,459 ± 0,102	0,672 ± 0,046	0,700 ± 0,032
<i>uFis</i> ²	-0,026	0,020	-0,004	0,031	0,027	0,033
	[-0,14; 0,088]	[-0,12; 0,16]	[-0,122; 0,114]	[-0,113; 0,175]	[-0,087; 0,141]	[-0,045; 0,111]

Примечание. ¹*Na* – среднее число аллелей на локус; *Ne* – число эффективных аллелей; *Npr* – число «приватных» аллелей; *Ho* – наблюдаемая гетерозиготность, *He* – ожидаемая гетерозиготность, *Fis* – коэффициент инбридинга, *Ar* – аллельное разнообразие. ² Приведен 95 % доверительный интервал.

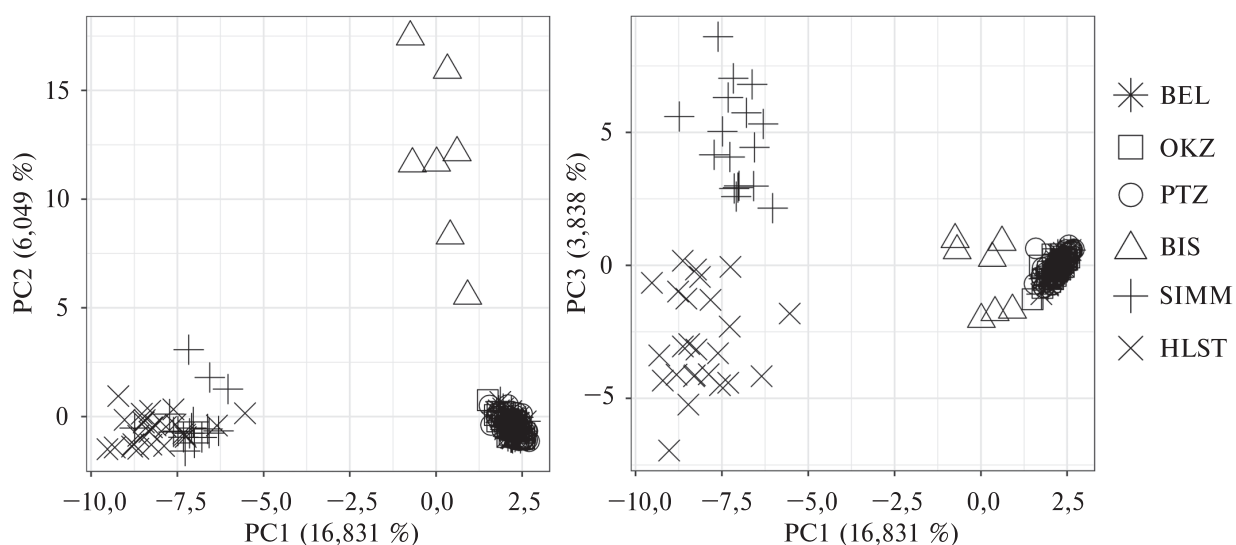


Рис. 3. Результаты анализа главных компонент (PCA), проведенного на основе генетических данных исследованных популяций зубра, бизона и КРС

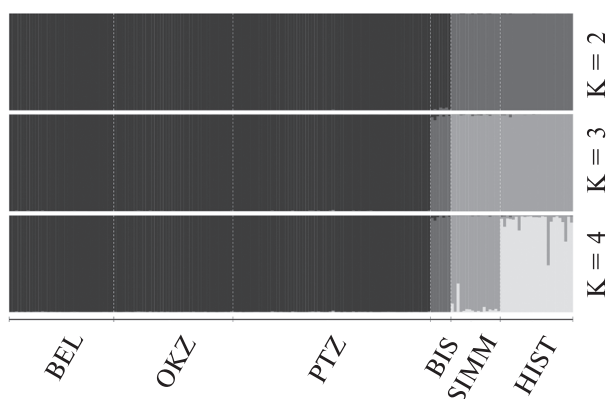


Рис. 4. Популяционная принадлежность зубров, бизонов и крупного рогатого скота, оцененная с помощью программы Structure 2.3.4

разведения. Это подтверждается исследованиями зарубежных авторов. Так, W. Olech [8] наблюдала почти в половину меньший уровень инбридинга в кавказско-беловежской линии (примерно 26 % против почти 50 % в линии беловежской линии). Но, несмотря на более высокий генетический потенциал кавказско-беловежской линии, имеется информация о симптомах инбредной депрессии, влияющих на параметры воспроизводства и здоровья особей кавказско-беловежской линии. Это, вероятно, объясняется тем фактом, что анализ осуществлялся на основе племенного поголовья живот-

ных российских питомников, тогда как образцы беловежской линии разведения получены из природных группировок, где мутационный процесс выше. Относительно более высокая приспособленность животных беловежской линии, вероятно, является следствием случайно выбранных высококачественных геномов семи ее основателей. Предполагаемый пониженный фитнес кавказско-беловежской линии, по всей видимости, это результатом неудачных генетических сочетаний, унаследованных от одного или нескольких беловежских основателей, или может быть следствием аутбредной депрессии между беловежскими и кавказским основателями [7]. В целом, популяции зубра уступают по значениям генетического разнообразия бизону, и тем более крупному рогатому скоту, поскольку в восстановлении зубра участвовало очень ограниченное количество основателей.

Стратегия сохранения зубра в мире предусматривает соблюдение чистоты данного вида и исключения интрогрессии. Интрогрессивная гибридизация представляет собой одну из основных угроз сохранению видов и часто вызывается влиянием человека на естественную среду обитания видов диких животных. Способность точно идентифицировать интрогрессию имеет решающее значение для понимания ее важности в эволюции и эффективном

управлении сохранением видов [41]. Довольно обширные исследования были проведены на североамериканском бизоне. М. Gronin и соавт. [42] с использованием 30 микросателлитных локусов показали дифференциацию *Bison bison* от *Bos taurus taurus* и *Bos taurus indicus*, но не смогли точно дифференцировать *Bison bison bison* от *Bison bison athabascae*. По мнению N. Halbert и соавт. [41], использование одного типа маркеров не позволяет сделать однозначный вывод о наличии интрогрессии, так анализ по микросателлитам в 5 из 12 групп бизонов позволил выявить наличие интрогрессии, а исследование мтДНК в тех же группах показали наличие интрогрессии в 7 из 12 групп.

В отличие от североамериканского бизона, следы интрогрессии у зубра исследованы в меньшей степени. В России эксперименты по гибридизации зубра с крупным рогатым скотом и бизонами проводились во второй половине XX века, что показывают результаты некоторых исследователей, обнаруживших с использованием мтДНК свидетельства интрогрессии [18, 20]. Предпринимались попытки использовать различные типы маркеров для изучения генетических взаимоотношений видов семейства бычьих на примере *B. taurus*, *B. bonasus* и *B. bison*, так В.И. Глазко и соавт. [43] изучая полиморфизм белков и анонимных последовательностей ДНК, провели сравнительный анализ генетических структур групп зубров, бизонов и крупного рогатого скота, и обнаружили существенные отличия оценок сходства между видами в зависимости от используемых маркеров. Но, как показано на примере североамериканского бизона, наиболее успешным является исследование по ядерным и мтДНК маркерам.

Наши исследования также продемонстрировали успешное использование данных методов для видовой идентификации зубров, бизонов и крупного рогатого скота, показана их четкая дифференциация друг от друга.

Таким образом, использование молекулярных методов исследования позволяет как контролировать популяционно-генетические параметры, так и идентифицировать видовую принадлежность, что может быть использовано при разработке программ и мероприятий по увеличению уровня генетического разнообразия зубра и снижению степени инбридинга, иден-

тификации гибридных форм. Своевременное выявление гибридных животных в контролируемых группировках, в первую очередь в специализированных питомниках, позволит исключить гибридные формы из размножения и их реинтродукцию в природу. Генетические исследования всего племенного поголовья зубров в центрах разведения Европы позволит оценить современными методами популяционно-генетические параметры зубра как биологического вида, скорректировать действия по его восстановлению в природе.

Соответствие этическим стандартам. Все необходимые международные и национальные рекомендации по уходу и использованию животных были соблюдены.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование работы. Исследования были выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18-516-00008 и Белорусского Республиканского Фонда Фундаментальных исследований, проект № Б18Р-165 от 30 мая 2018 г.

COMPARATIVE GENETIC CHARACTERISTICS OF THE RUSSIAN AND BELARUSIAN POPULATIONS OF WISENT (*BISON BONASUS*), NORTH AMERICAN BISON (*BISON BISON*) AND CATTLE (*BOS TAURUS*)

O.V. Kostyunina, M.E. Mikhailova, A.V. Dotsev, I.I. Zemlyanko, V.V. Volkova, M.S. Fornara, N.A. Akopyan, A.S. Kramarenko, I.M. Okhlopkov, P.V. Aksenova, E.L. Tsbizova, R.A. Mnatekanov, N.A. Zinovieva

Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, 142132, Dubrovitsy, Russian Federation

The Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, 220072, Minsk, Belarus
Prioksko-Terrasny State Reserve, 142200, Danki, Russian Federation

Mykolayiv National Agrarian University, 54020, Mykolayiv, Ukraine

Institute for Biological Problems of Cryolithozone Siberian Branch of RAS, 677980, Yakutsk, Russian Federation

Don State Technical University (DSTU), 344000, Rostov-on-Don, Russian Federation

Federal State Institution «Oksky State Natural Biosphere Reserve», 391072, Brykin Bor, Russian Federation

World Wide Fund for Nature (WWF Russia) 109240, Moscow, Russian Federation

E-mail: kostolan@yandex.ru, m.mikhailova@igc.by, arsendotsev@vij.ru, zemlyankoirina@yandex.ru, moonlit_elf@mail.ru, margaretfornara@gmail.com, kssnail1990@gmail.com, imokhlopkov@yandex.ru, polinax-1@mail.ru, etzibizova@mail.ru, RMnatsekanov@wwf.ru, n_zinovieva@mail.ru

A comparative study of the allele pool and the genetic structure of two Russian and one Belarusian populations of the wisent *Bison bonasus* against the representatives of the species of *Bison bison* and the genus *Bos taurus* was carried out. Russian populations were represented by samples of the Oka State Natural Biosphere Reserve ($n = 42$) and the Prioksko-Terrasny Nature Biosphere Reserve ($n = 69$), the Belarusian population was represented by samples of the Reserve «Belovezhskaya Pushcha» ($n = 42$), bison samples ($n = 8$) and cattle ($n = 55$) were used as an outgroup. The analysis of the mtDNA D-loop 630 bp fragment polymorphism for the presence of bison and cattle haplotypes, was performed. It was shown that there was a single haplotype for all wisent (*Bison bonasus*) which was different from the sequences of bison (*Bison bison*) and cattle. The analysis of population genetic parameters, calculated using 11 microsatellite markers, showed reduced diversity in wisent (*Bison bonasus*) groups compared to bison (*Bison bison*) and cattle. The largest number of monomorphic loci as well as the absence of private alleles were found in the group of Belarusian wisent. The analysis of the D_{Jost} pairwise genetic distances allowed us to establish clear genetic differentiation of the wisent from the outgroups. This fact was also confirmed by PCA analysis, carried out in the context of population identity and the analysis of population structure which demonstrated some proximity of bison (*Bison bison*) to wisent (*Bison bonasus*), which is due to their belonging to the same genus. The data obtained from this study showed differentiation between wisent (*Bison bonasus*) from bison (*Bison bison*) and cattle. It can be used in assessing the population genetic parameters of wisent, identifying and eliminating hybrid individuals. It also can be used in developing strategies and measures for the preservation and improvement of the wisent genetic resources.

ПОРІВНЯЛЬНА ГЕНЕТИЧНА
ХАРАКТЕРИСТИКА РОСІЙСЬКИХ
І БІЛОРУСЬКОЇ ПОПУЛЯЦІЙ
ЗУБРА (*BISON BONASUS*),
ПІВНІЧНОАМЕРИКАНСЬКОГО БІЗОНА
(*BISON BISON*) І ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ
(*BOS TAURUS*)

О.В. Костюнина, М.Е. Михайлова, А.В. Доцев,
І.І. Землянко, В.В. Волкова, М.С. Форнара,

Н.А. Акоюн, О.С. Крамаренко, І.М. Охлопков,
П.В. Аксьонова, К.Л. Цібізова,
Р.А. Мнацеканов, Н.А. Зінов'єва

Виконано порівняльне дослідження алофонду і генетичної структури двох російських і однієї білоруської популяцій зубра *Bison bonasus* з представниками видів *Bison bison* і *Bos taurus*. Досліджувані популяції були представлені зразками Окського державного природного біосферного заповідника ($n = 42$) і Приоксько-терасного заповідника ($n = 69$), заповідника «Біловезька пуща» ($n = 42$), а в якості груп порівняння були залучені бізони ($n = 8$) і велика рогата худоба ($n = 55$). Аналіз поліморфізму фрагмента D-петлі мтДНК показав наявність єдиного для всіх зубрів гаплотипу, відмінного від послідовностей бізона і великої рогатої худоби. Дослідження 11 мікросателітних маркерів показало знижену різноманітність зубра в порівнянні з бізоном і великою рогатою худобою. Аналіз значень попарних генетичних дистанцій D_{Jost} дозволив встановити чітку генетичну диференціацію зубра від груп порівняння. Отримані дані можуть бути використані при оцінці популяційно-генетичних параметрів зубрів, для виявлення та елімінації гібридних особин, а також для розробки стратегії і заходів щодо збереження та вдосконалення генетичних ресурсів зубра.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Flint, V.E., Belousova, I.P., Pererva, V.I., Kazmin, E.G., Kiseleva, V.D., Kudryavtsev, I.V., Pirozhkov, N.V., and Sipko, T.G., Bison conservation strategy in Russia. World Wide Fund for Nature (WWF), Moscow, Russia, 2002 (in Russian). <https://wwf.ru/upload/iblock/1d0/zubr.pdf>.
2. Raczynski, J. (ed.), European Bison Pedigree Book, Białowieża, 2017, 140 p.
3. Slatis, M.A., An analysis of inbreeding in the European bison, *Genetics*, 1960, vol. 45, pp. 275–87. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1210050/pdf/275.pdf>.
4. Pucek, Z., Bielousova, I.P., Krasicska, M., Krasicski, Z.A., and Olech, W., European bison. Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Bison Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, 2004, p. 54. <https://portals.iucn.org/library/efiles/documents/1contants.pdf>.
5. Kozlo, P., Nikiforov, M., Road map for the Białowieża bison, *Science and Innovation*, 2013, vol. 4, no. 122, pp. 12–6. (in Russian).
6. Krasieńska, M., Krasieński, Z.A., European bison: The nature monograph, 2013, 380 p. doi: 10.1007/978-3-642-36555-3.
7. Tokarska, M., Bunevich, A.N., Demontis, D., Sipko T., Perzanowski, K., Baryshnikov, G., Kowalczyk, R., Voi-

- tukhovskaya, Y., Wycik, J. M., Marczuk, B., Ruczyńska, I., and Pertoldi, C., Genes of the extinct Caucasian bison still roam the Białowieża Forest and are the source of genetic discrepancies between Polish and Belarusian populations of the European bison, *Bison bonasus*, Biol. J. Linn. Soc., 2015, vol. 114, no. 4, pp. 752-763. doi: 10.1111/bij.12470.
8. Olech, W., Influence of individual inbred and mother's inbred on calves survival in European bison (*Bison bonasus*), Rozpr. Nauk. Mon., Wyd SGGW. Warszawa, 2003.
 9. Tokarska, M., Pertoldi, C., Kowalczyk, R., Perzanowski, K., Genetic status of the European bison *Bison bonasus* after extinction in the wild and subsequent recovery, Mammal Review, 2011, vol. 41, no. 2, pp. 151-62. doi: 10.1111/j.1365-2907.2010.00178.x.
 10. Gasparski, J.M., Investigations on the Blood Groups of Wisents (*Bison Bonasus*) and Hybrids in Comparison with the Blood Groups of Cattle. In: Матюшек J. (eds) Blood Groups of Animals. Springer, Dordrecht, 1965, pp. 93-7. https://doi.org/10.1007/978-94-017-4453-9_12.
 11. Sipko, T.P., Rautian, G.S., Udina, I.G., and Takitskaia, T.A., Polymorphism of biochemical markers in European bison (*Bison bonasus*), Genetika, 1996, vol. 32, no. 3, pp. 400-5 (in Russian).
 12. Babik, W., Kawalko, A., Wycik, J.M., and Radwan, J., Low major histocompatibility complex class I (MHC I) variation in the European bison (*Bison bonasus*), J. Heredity, 2012, vol. 103, no. 3, pp. 349-59. doi: 10.1093/jhered/ess005.
 13. Udina, I.G., Shaikhaev, G.O., Restriction fragment length polymorphism (RFLP) of exon 2 of the *MhcBibo-DRB3* gene in European bison *Bison bonasus*, Acta Theriologica, 1998, suppl. 5, pp. 75-82.
 14. Radwan, J., Kawalko, A., Wojcik, J.M., and Babik, W., MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*, Mol. Ecol., 2007, vol. 16, no. 3, pp. 531-40. doi: 10.1111/j.1365-294X.2006.03179.x.
 15. Burzynska, B., Topczewski, J., Genotyping of *Bison bonasus* kappa-casein gene following DNA sequence amplification, Anim. Genet., 1995, vol. 26, no. 5, pp. 335-6. doi: 10.1111/j.1365-2052.1995.tb02669.x.
 16. Udina, I.G., Badagueva, I.N., Sulimova, G.E., and Zakharov-Gezekhus, I.A., Distribution of the kappa-casein gene alleles in the bison (*Bison bonasus*) population, Genetika, 1996, vol. 31, no. 12, pp. 1704-6 (in Russian).
 17. Burzyńska, B., Olech, W., and Topczewski, J., Phylogeny and genetic variation of the European bison *Bison bonasus* based on mitochondrial DNA D-loop sequences, Acta Theriologica, 1999, vol. 44, no. 3, pp. 253-62. <https://pdfs.semanticscholar.org/698d/92ff8f4c43d0985b87218cf4f265fc9dd940.pdf>.
 18. Ward, T.J., Bielawski, J.P., Davis, S.K., Templeton, J.W., and Derr, J.N., Identification of domestic cattle hybrids in wild cattle and bison species: a general approach using mtDNA markers and the parametric bootstrap, Anim. Conserv., 1999, vol. 2, pp. 51-7. doi: 10.1111/j.1469-1795.1999.tb00048.x.
 19. Wycik, J.M., Kawalko, A., Tokarska, M., Jaarola, M., Vallenback, P., and Pertoldi, C., Post-bottleneck mtDNA diversity in a free-living population of European bison *Bison bonasus*. Implications for conservation, J. Zoology, 2008, vol. 277, pp. 81-7. doi: 10.1111/j.1469-7998.2008.00515.x.
 20. Yudin, N.S., Kulikov, I.V., Gunbin, K.V., Aitnazarov, R.B., Kushnir, A.V., Sipko, T.P., and Moshkin, M.P., Detection of mitochondrial DNA from domestic cattle in European bison (*Bison bonasus*) from the Altai Republic in Russia, Anim. Genet., 2012, vol. 43, no. 3, p. 362. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02261.x.
 21. Tiedemann, R., Nadlinger, K., Pucek, Z., Mitochondrial DNA-RFLP analysis reveals low levels of genetic variation in European bison *Bison bonasus*, Acta Theriologica, 1998, vol. 5, pp. 83-7. http://rcin.org.pl/Content/12827/B1002_2613_Cz-40-2_Acta-T42-Supp5-83-87_o.pdf.
 22. Wilson, G.A., Strobeck, C., The isolation and characterization of microsatellite loci in bison, and their usefulness in other artiodactyls, Anim. Genet., 1999, vol. 30, pp. 225-44. doi: /10.1046/j.1365-2052.1999.00404-1.x.
 23. Tokarska, M., Kawalko A., Wycik J.M., and Pertoldi C., Genetic variability in the European bison (*Bison bonasus*) population from Białowieża forest over 50 years, Biol. J. Linn. Soc., 2009, vol. 97, no. 4, pp. 801-9. doi: 10.1111/j.1095-8312.2009.01203.x.
 24. Luenser, K., Fickel, J., Lehnen, A., and Speck, S., Low level of genetic variability in European bison (*Bison bonasus*) from the Białowieża National Park in Poland, Eur. J. Wild life Res., 2005, vol. 51, pp. 84-7. <https://doi.org/10.1007/s10344-005-0081-4>.
 25. Gralak, B., Krasinska, M., Niemczewski, C., Krasinski, Z.A., Zurkowski, M., Polymorphism of bovine microsatellite DNA sequences in the lowland European bison, Acta Theriologica, 2004, vol. 49, pp. 449-56. <https://doi.org/10.1007/BF03192589>.
 26. Dotsev, A.V., Volkova, V.V., Kharzinova, V.R., Kostyunina, O.V., Zinovieva, N.A., Aksenova, P.V., and Mnatsekanov, R.A., Study of allele pool and genetic structure of Russian population of lowland-caucasian line of european bison (*Bison bonasus*), Rus. J. Genet.: Appl. Res., 2018, vol. 8, no. 1, pp. 31-6. doi: 10.1134/S2079059718010057.
 27. Węcek, K., Hartmann, S., Pajmans, J. L. A., Taron, U., Xenikoudakis, G., Cahill, J. A., Heintzman, P.D., Shapiro, B., Baryshnikov, G., Bunevich, A.N., Crees, J.J., Dobosz, R., Manaserian, N., Okarma, H.,

- Tokarska, M., Turvey, S.T., Wyjcik, J.M., Żyła, W., Szymura, J.M., Hofreiter, M., and Barlow, A., Complex Admixture Preceded and Followed the Extinction of Wisent in the Wild, *Mol. Biol. Evol.*, 2017, vol. 34, no. 3, pp. 598–612. doi: 10.1093/molbev/msw254.
28. Wang, K., Wang, L., Lenstra, J.A., Jian J., Yang, Y., Hu, Q., Lai, D., Qiu, Q., Ma, T., Du, Z., Abbott, R., and Liu, J., The genome sequence of the wisent (*Bison bonasus*), *Gigascience*, 2017, vol. 6, no. 4, pp. 1–5. doi: 10.1093/gigascience/gix016.
29. Camilla, M.U., Investigating genetic variability within specific indigenous Indonesian cattle breeds, Other thesis, SLU, 2008, 26 p. https://stud.epsilon.slu.se/11092/1/mannich_c_170929.pdf.
30. Okonechnikov, K., Golosova, O., and Fursov, M., Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit, *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, p. 1166–7. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091.
31. Leigh, J.W., Bryant, D., PopART: Full-feature software for haplotype network construction, *Methods in Ecol. Evol.*, 2015, vol. 6, no. 9, pp. 1110–6. doi: 10.1111/2041-210X.12410.
32. Peakall, R., Smouse, P.E., GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update, *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, pp. 2537–9. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
33. Keenan, K., McGinnity, P., Cross, T.F., Crozier, W.W., and Prodöhl, P.A., diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors, *Methods in Ecol. Evol.*, 2013, vol. 4, pp. 782–8. doi: 10.1111/2041-210X.12067.
34. Weir, B.S., Cockerham, C.C., Estimating F-statistics for the analysis of population structure, *Evolution*, 1984, vol. 38, pp. 1358–70. doi: 10.1111/j.1558-5646.1984.tb05657.x.
35. Jost, L., GST and its relatives do not measure differentiation, *Mol. Ecol.*, 2008, vol. 17, pp. 4015–26. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x.
36. Huson, D.H., Bryant, D., Application of phylogenetic networks in evolutionary studies, *Mol. Biol. Evol.*, 2006, vol. 23, pp. 254–67. doi: 10.1093/molbev/msj030.
37. Jombart, T., *adeigenet*: a R package for the multivariate analysis of genetic markers, *Bioinformatics*, 2008, vol. 24, pp. 1403–05. doi: 10.1093/bioinformatics/btn129.
38. Wickham, H., *ggplot2*: Elegant graphics for data analysis, *New York, NY: Springer-Verlag*, 2009, 260 p. doi: 10.1007/978-0-387-98141-3.
39. Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P., Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 2000, vol. 155, no. 2, pp. 945–59. <https://www.genetics.org/content/155/2/945>.
40. Francis, R.M., *pophelper*: An R package and web app to analyse and visualize population structure, *Mol. Ecol. Res.*, 2017, vol. 17, pp. 27–32. doi: 10.1111/1755-0998.12509.
41. Halbert, N.D., Ward, T.J., Schnabel, R.D., Taylor, J.F., and Derr, J.N., Conservation genomics: disequilibrium mapping of domestic cattle chromosomal segments in North American bison populations, *Mol. Ecol.*, 2005, vol. 14, pp. 2343–62. doi: /10.1111/j.1365-294x.2005.02591.x.
42. Cronin, M.A., MacNeil, M.D., Vu, N., Leesburg, V., Blackburn, H.D., and Derr, J.N., Genetic Variation and Differentiation of Bison (*Bison bison*) Subspecies and Cattle (*Bos taurus*) Breeds and Subspecies, *J. Heredity*, 2013, vol. 104, no. 4, pp. 500–9, doi: 10.1093/jhered/est030.
43. Glazko, V.I., Zhelonkina, G.M., Sipko, TP, Kushnir, A.V., and Glazko, T.T., Genetic relationships of bovine species using the example of *Bos taurus*, *Bison bonasus* and *Bison bison*, *Izvestiya Timiryazevskoy sel'skokhozyaystvennoy akademii* (Proceedings of the Timiryazev Agricultural Academy), 2009, vol. 3, pp. 174–80 (in Russian). https://elibrary.ru/download/elibrary_12886565_70233590.pdf.

Поступила в редакцию 23.06.19
После доработки 01.11.19
Принята к публикации 18.03.20