
СОДЕРЖАНИЕ

Том 58, номер 8, 2022

В НОМЕРЕ ПУБЛИКУЮТСЯ НОВЫЕ ДАННЫЕ ПО ГЕНЕТИКЕ ДОМЕСТИЦИРОВАННЫХ ВИДОВ

| | |
|--|-----|
| Новая система генотипирования крупного рогатого скота на основе технологии ДНК-микрочипов <i>Ю. А. Столповский, С. Б. Кузнецов, Е. В. Солоднева, И. Д. Шумов</i> | 857 |
| Молекулярно-генетические основы развития молочной железы на примере крупного рогатого скота и других видов животных. I. Эмбриональный и пубертатный периоды <i>Е. В. Солоднева, С. Б. Кузнецов, А. Е. Велиева, Ю. А. Столповский</i> | 872 |
| Новые сочетания аллелей в вариантах генов казеинового кластера крупного рогатого скота и ревизия их номенклатуры <i>С. Б. Кузнецов, Е. В. Солоднева, М. Т. Семина, С. В. Бекетов, И. С. Турбина, Ю. А. Столповский</i> | 889 |
| Оценка генетического разнообразия и структуры автохтонных пород лошадей России и Монголии с использованием ядерных и митохондриальных ДНК-маркеров <i>В. Н. Воронкова, Э. А. Николаева, А. К. Пискунов, О. В. Бабаян, М. Takasu, Т. Tozaki, Г. Р. Свищева, Ю. А. Столповский</i> | 902 |
| Генетическое разнообразие и филогенетические взаимосвязи пород свиней, разводимых в России, на основе анализа полиморфизма D-петли мтДНК <i>В. Р. Харзинова, Н. А. Акоюн, А. В. Доцев, Т. Е. Денискова, А. А. Сермягин, Т. В. Карпушкина, А. Д. Соловьева, Г. Брем, Н. А. Зиновьева</i> | 920 |
| Экспансия соболя (<i>Martes zibellina</i> L.) севера Среднесибирского плоскогорья в экосистемы тундры <i>С. Н. Каштанов, Е. С. Захаров, О. А. Беглецов, Г. Р. Свищева, С. Ю. Рычков, П. А. Филимонов, А. А. Онохов, Е. С. Левенкова, И. Г. Мещерский, В. В. Рожнов</i> | 933 |
| Изменчивость вторичного соотношения полов у американской норки (<i>Neovison vison</i>) <i>С. В. Бекетов</i> | 945 |
| Анализ генетического разнообразия и популяционной структуры ненецкой аборигенной породы северных оленей на основе микросателлитных маркеров <i>М. Т. Семина, С. Н. Каштанов, О. В. Бабаян, К. А. Лайшев, А. А. Южаков, В. Н. Воронкова, Э. А. Николаева, Г. Р. Свищёва</i> | 954 |
| Характеристика дагестанских локальных субпопуляций коз (<i>Capra hircus</i>) на основе анализа полиморфизма полных митогеномов <i>Т. Е. Денискова, А. В. Доцев, М. И. Селионова, М. Упадхайи, И. Медугорак, Н. А. Зиновьева</i> | 967 |

Contents

Vol. 58, No. 8, 2022

THIS ISSUE CONTAINS NEW DATA ON THE GENETICS OF DOMESTICATED SPECIES

| | |
|---|-----|
| New Cattle Genotyping System Based on DNA Microarray Technology <i>Yu. A. Stolpovsky, S. B. Kuznetsov, E. V. Solodneva, and I. D. Shumov</i> | 857 |
| Molecular-Genetic Bases of Mammary Gland Development on the Example of Cattle and Other Animal Species. I. Embryonic and Pubertal Developmental Stage <i>E. V. Solodneva, S. B. Kuznetsov, A. E. Velieva, and Yu. A. Stolpovsky</i> | 872 |
| New Combinations of Alleles in Variants of the Cattle Casein Cluster Genes and Revision of the Nomenclature of These Genes <i>S. B. Kuznetsov, E. V. Solodneva, M. T. Semina, S. V. Beketov, I. S. Turbina, and Yu. A. Stolpovsky</i> | 889 |
| Assessment of Genetic Diversity and Structure of Autochthonic Horses of Russia and Mongolia Using Nuclear and Mitochondrial DNA Markers <i>V. N. Voronkova, E. A. Nikolaeva, A. K. Piskunov, O. V. Babayan, M. Takasu, T. Tozaki, G. R. Svishcheva, and Yu. A. Stolpovsky</i> | 902 |
| Genetic Diversity and Phylogenetic relationship of Pig Breeds Bred in Russia Inferred from Mitochondrial DNA D-Loop Sequences <i>V. R. Kharzinova, N. A. Akopyan, A. V. Dotsev, T. E. Deniskova, A. A. Sermyagin, T. V. Karpushkina, A. D. Solovieva, G. Brem, and N. A. Zinovieva</i> | 920 |
| Expansion of the Sable (<i>Martes zibellina</i> L.) from the North of the Central Siberian Plateau into Tundra Ecosystems <i>S. N. Kashtanov, E. S. Zakharov, O. A. Begletsov, G. R. Svishcheva, S. Yu. Rychkov, P. A. Filimonov, A. A. Onokhov, E. S. Levenkova, I. G. Meschersky, and V. V. Rozhnov</i> | 933 |
| A Variation of Secondary Sex Ratio in American Mink (<i>Neovison vison</i>) <i>S. V. Beketov</i> | 945 |
| Analysis of the Genetic Diversity and Population Structure of the Nenets Native Breed of Reindeer Based on Microsatellite Markers <i>M. T. Semina, S. N. Kashtanov, O. V. Babayan, K. A. Layshev, A. A. Yuzhakov, V. N. Voronkova, E. A. Nikolaeva, and G. R. Svishcheva</i> | 954 |
| Characteristics of Dagestan Local Goat Subpopulations (<i>Capra hircus</i>) Based on the Analysis of the Complete Mitogenome Polymorphism <i>T. E. Deniskova, A. V. Dotsev, M. I. Selionova, M. Upadhyay, I. Medugorac, and N. A. Zinovieva</i> | 967 |

УДК 575.22:636

НОВАЯ СИСТЕМА ГЕНОТИПИРОВАНИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ДНК-МИКРОЧИПОВ

© 2022 г. Ю. А. Столповский¹, *, С. Б. Кузнецов¹, Е. В. Солоднева¹, И. Д. Шумов²¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия²Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича Российской академии наук, Москва, 119435 Россия

*e-mail stolpovsky@mail.ru

Поступила в редакцию 12.11.2021 г.

После доработки 25.02.2022 г.

Принята к публикации 01.03.2022 г.

Создан прототип тест-системы для выявления генетических маркеров продуктивности, определения чистопородности, моногенных заболеваний крупного рогатого скота в формате ДНК-микрочипа. Разработан метод иммобилизации олигонуклеотидов на полимерную основу, фиксации их при помощи ультрафиолетового облучения и гибридизации на них ДНК с последующим мечением и проявлением генотипов. Генотипирование двух генов, кодирующих казеины молока: *CSN3* – ген каппа-казеина и *CSN2* – ген бета-казеина, у абердин-ангусской породы с помощью реал-тайм ПЦР и созданного ДНК-микрочипа показало идентичные результаты. Рассматриваются потенциальные возможности использования технологии ДНК-микрочипов, ее принцип и возможности применения в животноводстве для генетико-селекционной работы: мониторинга, определения генетического потенциала и разнообразия в породах и популяциях крупного рогатого скота, агробиоразнообразия в целом.

Ключевые слова: ДНК-микрочип, крупный рогатый скот, гены-кандидаты, геномная селекция, генотипирование, генетическое разнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675822080094

Сегодня нет информации относительно истинного уровня генетической изменчивости среди большинства видов домашних животных, как нет понимания о количестве генов и их сочетаний, формирующих хозяйственно полезные признаки. Без знания уровня генетической изменчивости невозможно определять генетическую ценность многочисленных пород и популяций, а также принимать научно обоснованные решения по сохранению агробиоразнообразия. Без знания об аллельном разнообразии и взаимодействия генов, влияющих на тот или иной признак, невозможно создавать эффективные генетико-селекционные программы разведения. Сегодня генетика крупного рогатого скота (КРС), как и других доместивированных видов, находится на стадии накопления данных, причем как генотипов, так и фенотипов. Совершенно ясно, что за молочную и мясную продуктивности отвечают сотни, если не тысячи генов. В настоящее время у КРС описано около 200 генов, ответственных за формирование признаков с менделевским наследованием, включая хозяйственно значимые и ряд наследственных заболеваний (<https://omia.org/home>).

Достижения последних лет в молекулярно-биологических исследованиях сельскохозяйственных

видов животных включают: полное секвенирование геномов; разработку технологий оценок полиморфизма по локусам, распространенным по всему геному (например, методы определения однонуклеотидного полиморфизма SNP (single nucleotide polymorphism)); разработку технологий ДНК-биочипов – микроматриц в целях изучения профилей генной экспрессии в разных тканях и в связи с различными внешними воздействиями.

Для производственных селекционных систем поголовное полногеномное секвенирование пока не имеет смысла, дорого, да и с точки зрения селекции слишком много бесполезной информации. При этом существует практический интерес к использованию SNP в качестве генетических маркеров, который обусловлен их чрезвычайно широким распространением в геномах многих организмов, включая одомашненных видов. Внедряя в селекционную практику животноводства ДНК-маркеры данного типа, можно проводить точную идентификацию генотипов животных, несущих желательные фенотипические особенности, и на их основе вести селекцию.

Наиболее востребованы на данном этапе подходы (методы) геномной селекции, которые основаны на использовании плотных чипов, обра-

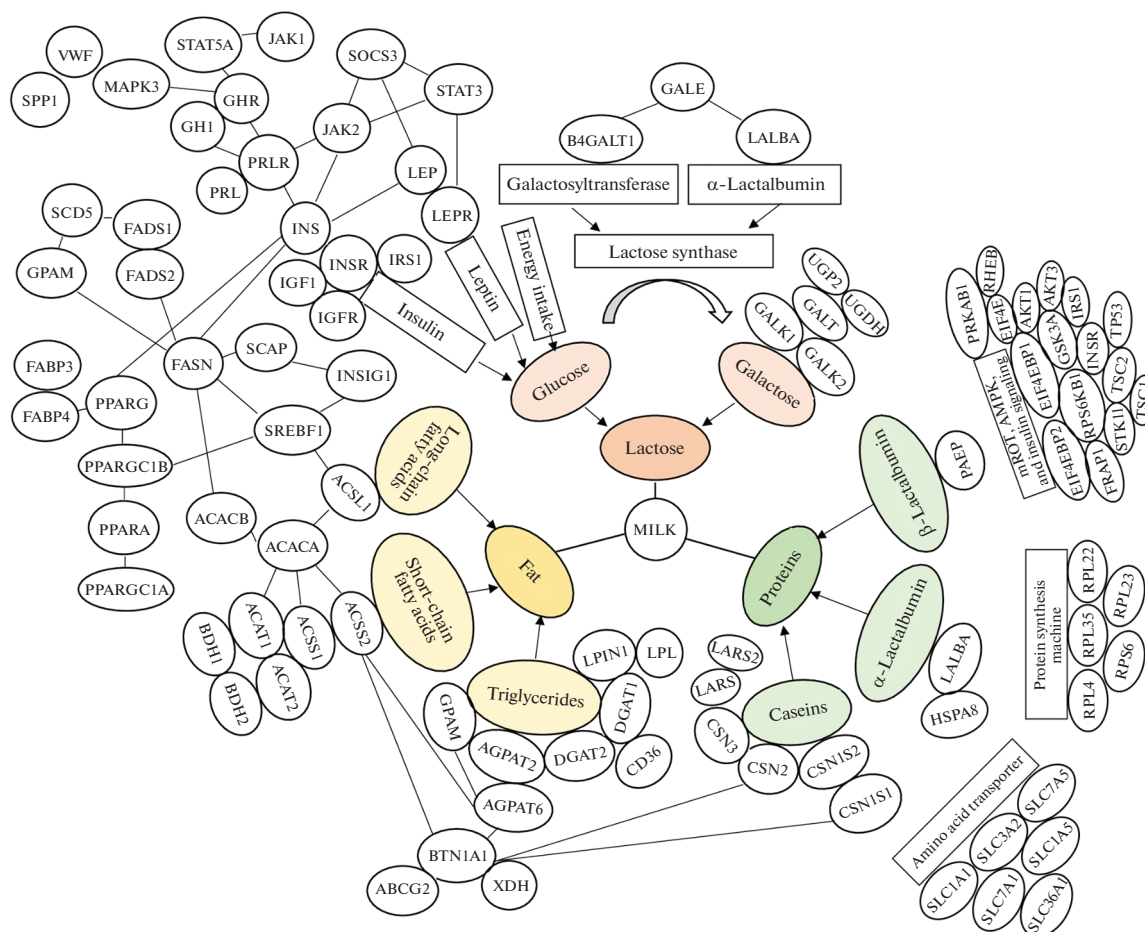


Рис. 1. Гены-кандидаты молочной продуктивности. Схема создана Е.В. Солодновой в программе diagrams.net. Ссылка на ресурс: <https://app.diagrams.net/>.

ботке больших массивов фенотипических и генотипических данных, например у КРС [1], овец [2], лошадей [3] и т.д. Плюсы и минусы геномной селекции подробно описаны [4, 5]. В настоящей статье отметим лишь один факт – для большинства SNP (сотни тысяч, миллионы), расположенных на плотном чипе, неизвестна их функция в геноме, по своей сути они, как правило, анонимны, и только после определенного биометрического анализа референсных выборок с “верными и точными фенотипами” можно сделать вывод об их корреляциях с каким-либо признаком. В настоящее время создаются более выгодные с точки зрения производства и интерпретации данных ДНК-микрочипы с низкой плотностью SNP [6–11].

До широкого внедрения геномной селекции основным фактором, сдерживающим улучшение генетических и продуктивных качеств животных, стала высокая стоимость генотипирования, которое было необходимо для создания эталонной популяции. И главным ограничивающим фактором на данном этапе стал сбор качественных феноти-

пических данных, многие из которых затратно и сложно оценить [12, 13].

Параллельно исследуются SNP в генах-кандидатах, которые связаны с проявлением полигенных признаков и, как правило, тестированием моногенных заболеваний. В данном случае об SNP известно не только место нахождения в геноме, но и функциональная значимость нуклеотидной замены для конкретного гена, большая часть SNP находится в его кодирующей зоне. Идеология геномной селекции основана на знаниях о генотипах, аллельном разнообразии, взаимодействии генов, связанных с хозяйственно полезными признаками, например такими как количественные и качественные показатели продуктивности, резистентности, адаптивности и т.д. На рис. 1 показаны некоторые гены-кандидаты, вовлеченные в формирование молочной продуктивности КРС.

Например, в России одними из первых начались исследования аллельного полиморфизма гена *CSN3* [14]. В Индии проводились работы по генотипированию местного скота по генам *DGAT1*

и *ABCG2* [15]. Также работы по генотипированию различных пород проводятся учеными других стран: Бельгии [16], Ирана [17], Словакии [18], Турции [19] и др. С помощью данного типа маркеров ведутся исследования широко распространенного заболевания КРС – комплексного порока позвоночника (CVM) и BLAD-синдрома КРС [20–22]. Изучаются ассоциации показателей качества мяса у различных сельскохозяйственных животных генами *RORC*, *SCD*, *GH*, *TG* [23–25]. Репродуктивные качества сельскохозяйственных животных оцениваются генотипированием по генам *ESR*, *FSHR*, *FSHB* и др. (см. рис. 1) [26, 27].

Технология ДНК-микрочипов весьма сходна с технологией Саузерн-блоттинга, где меченые фрагменты ДНК или РНК гибридизуют на иммобилизованную на носителе изучаемую ДНК. Впервые набор различных участков ДНК, объединенных в чип, был использован в 1987 г. для определения особенностей регуляции экспрессии генов интерферонами. Использование иммобилизованных на мембране фрагментов ДНК для определения особенностей экспрессии генов было осуществлено в 1995 г., а полногеномный микрочип дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*) был создан в 1997 г. [28–30]. Приоритетная российская публикация появилась в печати в журнале *DNA Seq* в 1991 г. [31].

Микрочипы играют важную роль в фундаментальных исследованиях и приобретают все большее значение для практического применения в животноводстве (геномная селекция), в диагностике и прогностике в медицине, например при определении мутаций и экспрессии генов в злокачественных опухолях молочной железы [32], сколиоза [33], генов устойчивости к антибиотикам и вирулентности золотистого стафилококка [34]. Технология ДНК-микрочипов оказала влияние на медицинскую микробиологию, включая обнаружение и идентификацию патогенов, определение устойчивости к противомикробным препаратам, эпидемиологическое типирование штаммов и определение факторов вирулентности [35], а также на анализ профилей экспрессии генов из клеток периферической крови и отделение пациентов с гипертонией от нормотоников [36]. И наконец, создан первый ДНК-микрочип *CovidArray* для выявления вирусных генов в мазках [37].

Сегодня доступны различные форматы микрочипов, режимы выявления и анализа результатов исследований, полученных с их помощью. ДНК-микрочипы стали предпочтительным инструментом для изучения экспрессии генов, секвенирования фрагментов ДНК и выявления в них мутаций. Тем не менее основные производители ДНК-микрочипов до сих пор предлагают на рынке свою продукцию, предназначенную только для исследовательских целей. На микрочипах

высокой плотности, как правило, размещено от нескольких десятков тысяч до нескольких миллионов олигонуклеотидных последовательностей, представляющих полный геном человека, мыши или некоторых домашних животных. В настоящее время применение микрочипов высокой плотности в селекционной практике в России затруднено по нескольким причинам. Дело в том, что такие микрочипы достаточно дороги для массового применения и обеспечивают информацию, превышающую на несколько порядков ту, что необходима для определения, например, племенной ценности животного. Выход из этой ситуации состоит в создании микрочипов низкой плотности (LD – Low density), т.е. специализированных тест-систем, предназначенных для диагностики и прогностики конкретных заболеваний, анализа хозяйственно значимых признаков. Такие ДНК-микрочипы не несут избыточной информации для интерпретации результатов. Однако в настоящее время микрочипы низкой плотности производятся (печатаются) в основном в медицине под каждую новую задачу, что делает дороже их производство и в конечном счете повышает цену анализа для потенциальных потребителей.

За последние десятилетия накопились данные по сотням генам, связанным с продуктивностью и здоровьем сельскохозяйственных животных. К сожалению, многочисленные генетические данные пока слабо систематизированы, слишком много “белых пятен”. Отечественные лаборатории, специализирующиеся на генотипировании домашних животных, способны исследовать небольшое количество генов по достаточно затратным по времени и материальным ресурсам технологиям.

В связи с вышесказанным возникла идея создать на основе методов молекулярной биологии эффективную, недорогую и простую в использовании тест-систему для выявления в геномах КРС функционально значимых SNP, которые являются маркерами известных моногенных заболеваний, а также хозяйственно значимых признаков у КРС. Объединить генотипирование всех известных значимых для селекции генов на одной платформе можно с помощью ДНК-микрочипов – эта технология позволяет определять мутации в сотнях генов одновременно, в том числе исследовать генетические причины аномалий, возникающих в функционировании организмов.

Поэтому в рамках предлагаемого проекта поставлена задача разработать универсальный ДНК-микрочип, пригодный для анализа мелких мутаций – однонуклеотидных замен, делеций, инверсий, инверсий у любых видов млекопитающих, у растений и человека. Пилотный проект ДНК-микрочипа был разработан на примере хозяйственно значимых признаков крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение ДНК

Из мышц абердин-ангусской породы КРС была выделена ДНК колоночным методом с помощью набора компании Евроген. Для определения количества и качества ДНК измеряли концентрацию общей ДНК и соотношение поглощения препарата при 260 нм и при 280 нм на приборе NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., США); концентрацию двухцепочечной ДНК измеряли на флуориметре Qubit™ (1.0) (Invitrogen, Life Technologies, США).

Реал-тайм ПЦР

Анализ ДНК методом реал-тайм ПЦР проводили на приборе LightCycler®96 SW 1.1 при условиях: 1 цикл – 3 мин при 95°C, 55 циклов: 95°C – 15 с, 55°C – 15 с, 72°C – 20 с, с последующим анализом пиков плавления полученных ампликонов. Генотипировали образцы с помощью праймеров к генетическим маркерам (мутациям) двух генов, кодирующих казеины молока: *CSN3* – ген каппа-казеина и *CSN2* – ген бета-казеина. Результаты генотипирования методом реал-тайм ПЦР использовали для верификации результатов генотипирования, полученных с помощью разрабатываемого ДНК-микрочипа.

Создание ДНК-чипа

Метод 1. ДНК-микрочип представляет из себя подложку из пластика ПЭТ-А (полиэтилентерефталат аморфный) стандартного размера (25 × 75 × 1 мм), обработанную 10%-ной щелочью для лучшей иммобилизации олигонуклеотидов. На поверхности каждой подложки формировали 16 массивов точек; каждый массив включал в себя 150 точек так, что каждый олигонуклеотид наносили не менее чем в трех повторах. Каждый массив включал также позитивный и негативный контроли.

Олигонуклеотиды, разведенные в карбонатном буфере, наносились на подложку в нанолитровых количествах при помощи роботизированной контактной печати на принтере SpotBot®3 от компании “Arrayit”, США. Последовательности олигонуклеотидов являются искусственными и разрабатывались с тем условием, чтобы они не имели 100% гомологии в геномах млекопитающих. Длина всех олигонуклеотидов – 22 нуклеотида, температура плавления 55°C, количество GC-пар – 50%. Аллель-специфичные праймеры для выделенных генетических маркеров содержали на 5'-конце последовательность, обратную комплементарную одному из олигонуклеотидов, напечатанных на пластиковой подложке. На 3'-конце кроме последнего аллель-специфичного нуклеотида был измененный третий нуклеотид с конца. Прайме-

ры были выровнены по температуре плавления и она составляла 59–60°C. При помощи этих праймеров производилось мечение ампликонов в полимеразной цепной реакции. В реакционную смесь добавлялся меченный биотином уридин. После ПЦР меченые ампликоны гибридизовались на микрочип, затем вносили раствор стрептавидина (имеющего большое сродство к биотину), конъюгированного с пероксидазой хрена и инкубировали 15 мин при 37°C, промывали несколько раз фосфатным буфером и добавляли ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид) – субстрат для пероксидазы хрена. Пероксидаза хрена катализирует окисление ТМБ и дает окрашивание от синего до черного цвета.

Метод 2. Массивы точек (спотов) формировали методом бесконтактного нанесения микрокапель растворов ДНК-олигонуклеотидов в 0.125 М карбонатном буферном растворе (рН 10.4) на поверхность подложек из ПММА (полиметилметакрилат) стандартного размера (25 × 75 × 1 мм) при помощи высокоточной комбинированной роботизированной системы (споттера) iONE-600, оснащенной пьезоэлектрическим дозатором (PD-MD) (M2-Automation GmbH, Берлин, Германия). Объем раствора олигонуклеотида, наносимого в одну точку, составлял ~1 нл. Всего использовали 48 искусственно синтезированных олигонуклеотидов, представлявших собой аллельные варианты генов *CSN2* (бета-казеин) и *CSN3* (каппа-казеин) крупного рогатого скота. На 5'-конце были добавлены 10Т и 10С в качестве якоря и спейсера соответственно. На поверхности каждой подложки формировали 16 массивов точек; каждый массив включал в себя 150 точек так, что каждый олигонуклеотид наносили не менее чем в трех повторах. Каждый массив включал также позитивный и негативный контроли. Расстояние между соседними спотами в одном массиве составляло 300 мкм, диаметр каждого спота составлял ~100 мкм. Расстояние между соседними массивами определялось автоматически с использованием программного обеспечения InDot (M2-Automation GmbH). На массив наносилась денатурированная при 95°C ДНК и гибридизовалась при 55°C в течение 30 мин при шейкировании. Затем вносилась реакционная смесь с нуклеотидами, включая меченный биотином уридин, и полимеразой и инкубировалась при 55°C от 5 до 15 мин. После чего массив промывали фосфатным буфером и проявляли стрептавидин-пероксидазой.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате работы с литературными и геномными базами данных сделан выбор хозяйственно значимых признаков КРС, представляющих интерес для заводчиков и исследователей, как промышленных, так и местных аборигенных пород.

Цель – проанализировать их генофонд при помощи создаваемого ДНК-микрочипа. Признаки разделены на три группы: молочная продуктивность и качество молока, мясная продуктивность и качество мяса, генетически обусловленные заболевания и генетически обусловленная устойчивость к заболеваниям.

Соответственно был разработан дизайн 400 аллель-специфичных праймеров для анализа молекулярных маркеров, ассоциированных с хозяйственно значимыми признаками. Параллельно разработан дизайн олигонуклеотидных последовательностей, выровненных по длине и температуре плавления, не встречающихся со 100%-ной гомологией в геномах млекопитающих, для иммобилизации их на микрочипе. Этого достаточно для создания микрочипа на 200 диаллельных молекулярных маркеров. Кроме того, в список признаков были включены молекулярные маркеры, позволяющие идентифицировать животных (так называемый генетический паспорт). Весь список отобранных признаков составляет на настоящее время 208 маркеров, представленных 81 геном (34 гена ассоциированы с молочной продуктивностью и 47 генов ассоциированы с моногенными заболеваниями). В него входят и 43 маркера для идентификации животных. Большинство молекулярных маркеров представляют из себя однонуклеотидные полиморфные локусы (SNP). Однако в списке есть и маркеры, являющиеся инсерциями и делециями от одного до нескольких сотен нуклеотидов. Практически все молекулярные маркеры двухаллельные, и список всех аллелей составляет 417.

Отобранные и созданные олигонуклеотиды предполагалось иммобилизовать на полимерном субстрате при производстве ДНК-микрочипа по методу 1. Обратные комплементарные этим последовательностям олигонуклеотиды включались в состав аллель-специфичных праймеров. На этом этапе отработки технологии были синтезированы комбинированные праймеры для 20 маркеров. Кроме того, были синтезированы аллель-специфичные праймеры без “якорных” олигонуклеотидов для использования их в реал-тайм ПЦР с целью верификации результатов, полученных на ДНК-микрочипах.

В методе 2 на подложку иммобилизовались сами аллель-специфичные праймеры, и реакция мечения биотином проводилась в формате твердофазной ПЦР.

В нашу задачу входило выбрать наиболее эффективный вариант ДНК-чипа из множества платформ микрочипов, включая напечатанные массивы двухцепочечной ДНК и олигонуклеотидов, массивы, синтезированные *in situ*, массивы гранул высокой плотности, электронные микроматрицы и массивы суспензионных гранул. В

связи с этим был проведен ряд экспериментов по отбору и подбору технических условий и молекулярно-генетических характеристик создаваемого ДНК-чипа.

Подбор полимерных материалов для подложки ДНК-чипа

В ходе эксперимента проведены испытания полимерных материалов с целью использования их в качестве субстрата для производства микрочипов. Испытаны два вида листового пластика – ПЭТ-А (полиэтилентерефталат аморфный) и ПЭТ-Г (полиэтилентерефталат модифицированный гликолем). Проведены пробные печати олигонуклеотидов, меченных биотином, на эти субстраты. Олигонуклеотиды разводились разными буферами: карбонатным, фосфатным, SSC, Трис-НСl. Тесты показали, что оба пластика хорошо связывают на своей поверхности олигонуклеотиды, разведенные в 0.125 М карбонатном буфере pH 10.5. Однако ПЭТ-А без предварительной обработки оказался достаточно гидрофобным и капли растворов олигонуклеотидов на его поверхности формировались плохо. ПЭТ-Г оказался более гидрофильным и капли растворов на его поверхности формировались вполне удовлетворительно. Для повышения гидрофильности подложки из ПЭТ-А были обработаны 10%-ном раствором NaOH, 1%-ным раствором H₂O₂, 0.1%-ным раствором SDS и 0.1%-ным раствором Tween-20. Время обработки составило от 15 мин до двух часов. После обработки субстраты промывали не менее 5 раз в дистиллированной воде, высушивались, и на них наносили одинаковый набор меченных биотином олигонуклеотидов. После печати микрочипы выдерживались не менее одного часа при комнатной температуре и влажности, затем проявлялись. Для этого микрочипы клеивались на двухсторонний скотч в кассеты из тефлона (рис. 2), имеющие ячейки объемом 300 мкл, в которые вносили раствор 2%-ного казеина и 1%-ной сахарозы для блокировки поверхности субстрата вне точек печати.

После инкубации в течение одного часа при комнатной температуре раствор удаляли и субстрат просушивали. Потом в ячейки вносили раствор стрептавидина (имеющего большое сродство к биотину), конъюгированного с пероксидазой хрена, и инкубировали 15 мин при 37°C, промывали несколько раз фосфатным буфером и добавляли ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорид) – субстрат для пероксидазы хрена. После инкубации при 37°C в течение 10 мин ячейки промывали водой и высушивали. Пероксидаза хрена катализирует окисление ТМБ и дает окрашивание от синего до черного цвета. Интенсивность окрашивания пятна зависит от количества олигонуклеотида и сте-

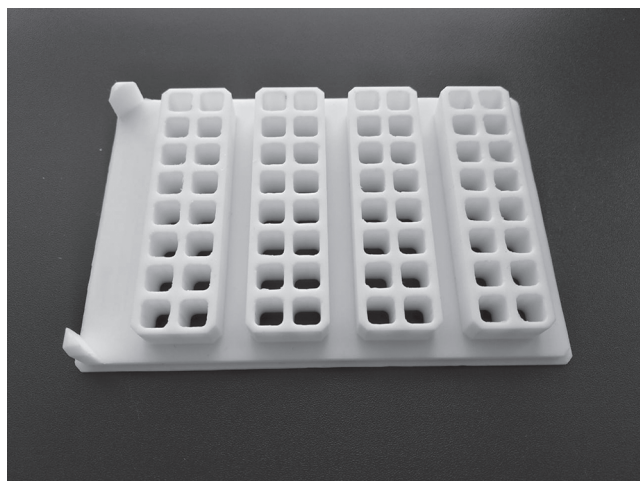


Рис. 2. Кассета для процессинга микрочипов.

пени связывания его с субстратом. На рис. 3 и 4 приведены результаты этих экспериментов.

По результатам проведенного эксперимента лучшие показатели были у субстрата из ПЭТ-А, обработанного 10%-ной щелочью в течение двух часов. Такая обработка давала более четкие пятна и обеспечивала лучшую стабильность печати от субстрата к субстрату. Добавление различных детергентов в буфер для печати также повышало гидрофильность субстрата из ПЭТ-А, но пятна неконтролируемо расплывались, и чтобы они не слились друг с другом приходилось увеличивать между ними расстояние, что увеличивало общий размер массива из точек.

Этот эксперимент показал, что выбранный метод детекции позволяет выявлять точки печати с концентрацией олигонуклеотидов равной 0.1 мМ. Лучшее качество печати, стабильность и размер пятен показал ПЭТ-А, обработанный 10% NaOH, при печати на нем олигонуклеотидов в 0.125 М карбонатном буфере рН 10.5 без добавления детергентов.

В методе 2 использовали подложку из ПММА (оргстекла) без какой-либо предварительной обработки, кроме промывки в воде для удаления пыли, олигонуклеотиды иммобилизовались луч-

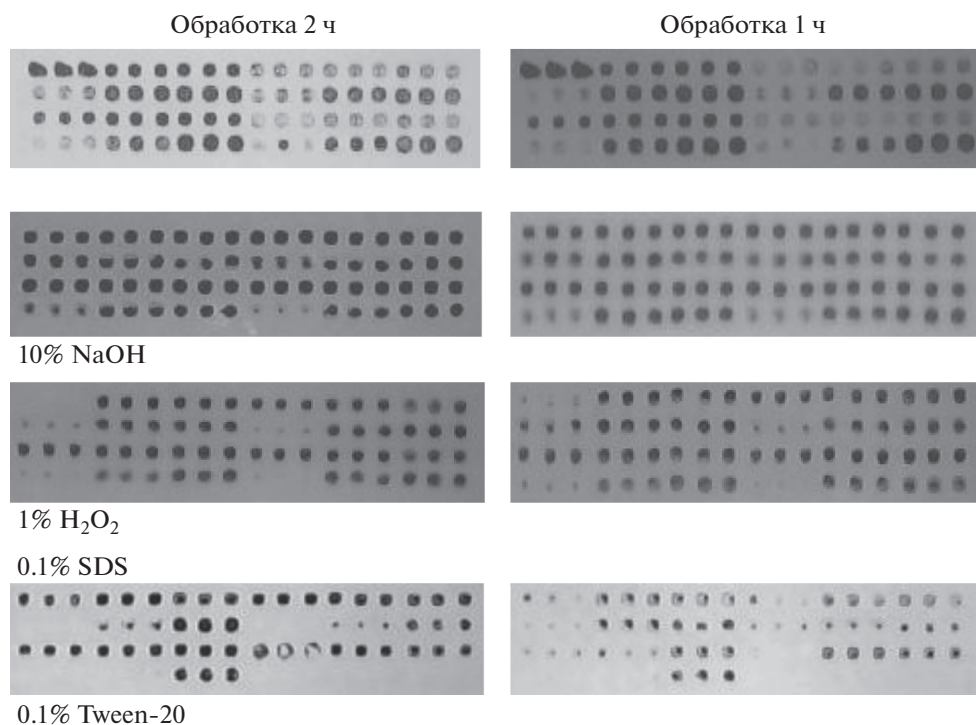


Рис. 3. Результаты обработки субстратов из ПЭТ-А для повышения гидрофильности и улучшения качества печати. Каждый образец напечатан в трех повторах (по 3 точки). Левые 9 столбцов – 10-микромольный олигонуклеотид, меченный биотином. Правые 9 столбцов – 2-микромольный олигонуклеотид, меченный биотином. Перед печатью растворы всех олигонуклеотидов были смешаны с буферами 1 : 1. Последовательность точек: первая линия: первые и четвертые три точки – 1 М карбонатный буфер рН 10.5, вторые и пятые три точки – 0.5 М карбонатный буфер рН 10.5; третьи и шестые три точки – 0.25 М карбонатный буфер рН 10.5; вторая линия: то же, что и в первой линии, но с добавлением во все буферы 0.1% SDS; третья линия: первые и четвертые три точки – 1 М карбонатный буфер рН 11.5, вторые и пятые три точки – 0.5 М карбонатный буфер рН 11.5, третьи и шестые три точки – 0.25 М карбонатный буфер рН 11.5; четвертая линия: то же, что и в третьей линии, но с добавлением во все буферы 0.1% SDS.

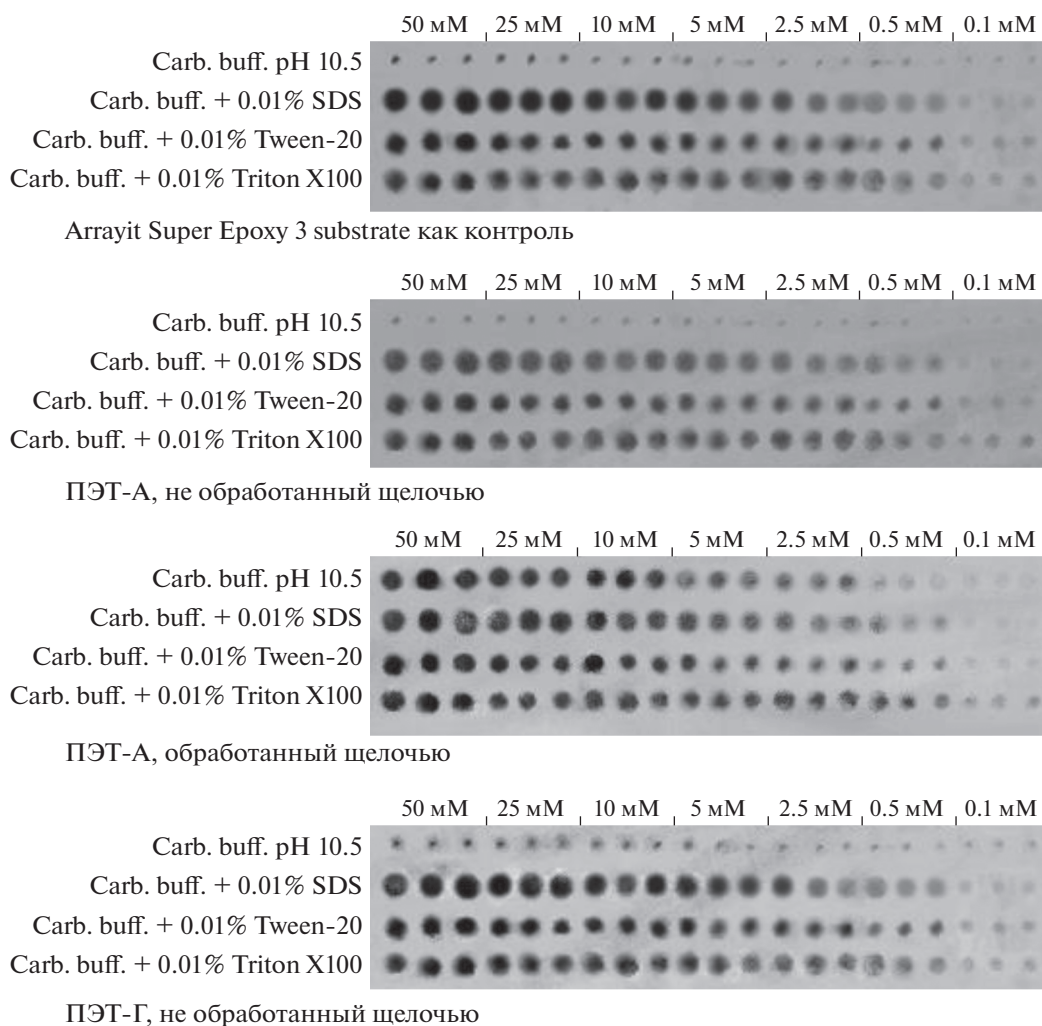


Рис. 4. Результаты эксперимента по чувствительности метода и влиянию различных детергентов на качество печати.

ше, поэтому был использован данный вид пластика толщиной 1 мм с дополнительной защитой от ультрафиолета и пластик толщиной 1.5 мм без таковой защиты. Также разработаны пластины из того же пластика толщиной 3 мм для формирования реакционных камер вокруг массивов из точек нанесения олигонуклеотидов. Опробованы разные методы скрепления подложек и пластин. При таком способе нанесения на одной подложке размером 25 × 75 × 1 мм можно уместить 16 массивов по 650 точек в каждом, что позволит анализировать примерно 110 маркеров. Внешний вид разрабатываемого ДНК-микрочипа представлен на рис. 5.

Полимеразная цепная реакция в методе 1

Для проверки результатов генотипирования при помощи микрочипа были разработаны и синтезированы меченые зонды для проведения TaqMan полимеразной цепной реакции. Эксперименты по

мечению ампликонов были проведены с использованием четырех различных ДНК-полимераз: Taq, Pfu, Tth, SNP-detect. Результаты оказались примерно одинаковыми. Дальнейшие эксперименты проводились с использованием только Taq полимеразы и традиционной реал-тайм ПЦР с Sybr-green в качестве красителя. При небольшом количестве анализируемых маркеров можно ставить моноплексные ПЦР для мечения, однако при большом количестве маркеров выход только в мультиплексных реакциях, т.е. одновременном внесении нескольких десятков аллель-специфичных праймеров в одну реакционную смесь. Проведена серия экспериментов по мечению биотином ампликонов в мультиплексных реакциях, однако в них наблюдалось неспецифическое мечение. В связи с этим дальнейшие эксперименты были направлены на подбор условий проведения мультиплексных реакций со строгой специфичностью мечения биотином.

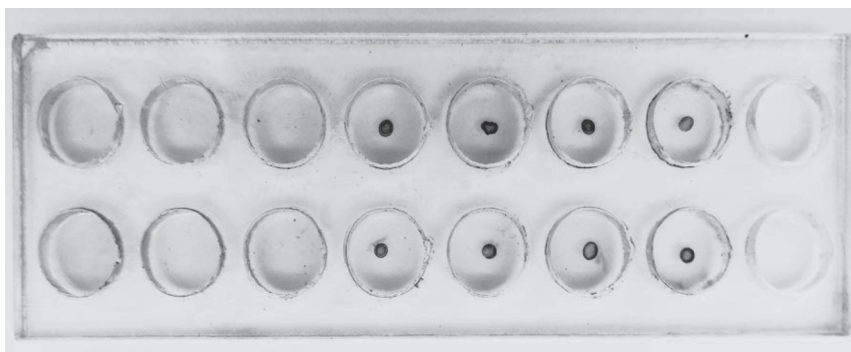


Рис. 5. Внешний вид разрабатываемого ДНК-микрочипа на этапе отработки технологии иммобилизации олигонуклеотидов, мечения и выявления продуктов реакции. Олигонуклеотиды наносились вручную микропипеткой.

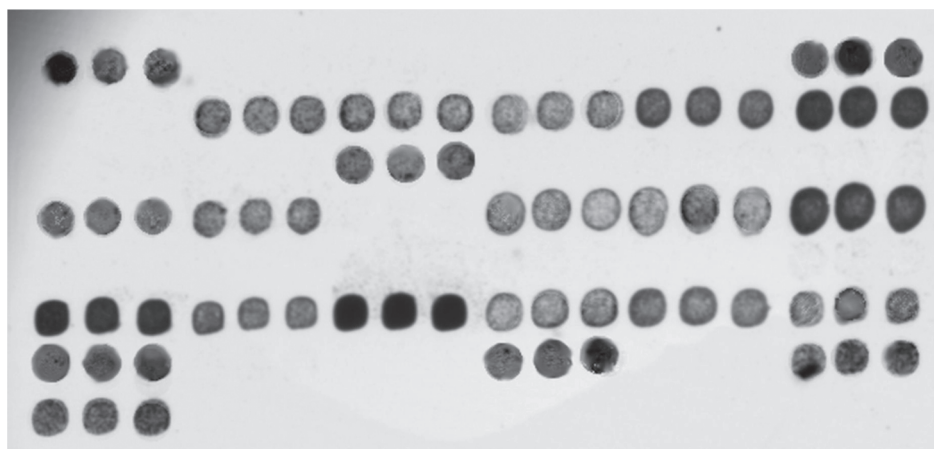


Рис. 6. Результаты мечения и гибридизации ампликонов с аллель-специфичных праймеров на ДНК-микрочип. Последние три точки в седьмом ряду и первые три в восьмом — положительные контроли на процесс окрашивания, предварительно меченные биотином последовательности из генома *E. coli*. Остальные точки в восьмом ряду — те же последовательности, не меченные биотином, они служили негативными контролями процессов гибридизации и окрашивания.

Мечение биотином

Проведены эксперименты по мечению биотинном фрагментов ДНК. Для этого в ПЦР использовали вместо стандартной смеси нуклеотидов смесь, содержащую по 100% аденина, гуанина, цитозина и 90% тимина + 10% меченного биотином уридина. Применяли асимметричную моноплексную ПЦР, т.е. с использованием только аллель-специфичных праймеров в отдельных пробирках. Полученные в результате реакции ампликоны гибридизовали на микрочипах. Для этого их смешивали и разводили в $2\times$ SSC буфере с добавлением 1% казеина, наносили на заблокированные микрочипы и инкубировали при 52°C в течение 30 мин. Далее отмывали в фосфатном буфере и выявляли описанным выше способом. На рис. 6 показаны результаты мечения биотином и гибридизации

полученных ампликонов с базовых и мутантных аллелей маркеров.

Результаты проведенных экспериментов показали, что мечение ампликонов в моноплексных ПЦР (реакция с каждым аллель-специфичным праймером проводится в отдельной пробирке) проходит адекватно, однако при мультиплексных реакциях, т.е. при одновременном внесении нескольких десятков аллель-специфичных праймеров в одну реакционную смесь, в них наблюдалось неспецифическое мечение. Причины этого, по-видимому, в неспецифичном отжиге праймеров друг на друга и ошибках ДНК-полимеразы. Нам не удалось подобрать условия реакции для мультиплексной ПЦР. При большом количестве анализируемых маркеров моноплексные ПЦР становятся трудо- и средствеозатратными.

*Иные способы мечения
ДНК фрагментов в методе 1*

В ходе эксперимента нами были опробованы и другие методы мечения аллель-специфичных олигонуклеотидов. Один из них – это получение меченых фрагментов ДНК при помощи ДНК-лигазной цепной реакции. В этом методе используется термостабильная ДНК-лигаза вместо ДНК-полимеразы и в дополнение в аллель-специфичному праймеру используется меченный биотином зонд, сравнимый по температуре плавления с праймерами. Зонд начинается сразу за последним аллель-специфичным нуклеотидом, и если этот нуклеотид комплементарен нуклеотиду на матрице, то происходит сшивание праймера с зондом. Далее процесс повторяется многократно. Если последний нуклеотид не комплементарен матричному, то сшивания праймера с меченым зондом не происходит. При этом такой метод мечения более специфичен, чем мечение ДНК-полимеразой в обычной ПЦР, потому что даже при ошибке ДНК-лигазы не происходит амплификации ошибочно меченого фрагмента, как при мечении ДНК-полимеразой. Подробно об этом методе можно прочитать в обзоре [38]. Данную реакцию можно проводить с использованием нескольких десятков аллель-специфичных праймеров и меченых зондов в одной пробирке, поскольку даже при неправильном отжиге праймеров или зондов не произойдет их сшивания и соответственно мечения. Далее процесс гибридизации на микрочип и проявление аналогичны описанному выше. Кроме отмеченных достоинств у этого метода есть и недостаток, который заключается в дороговизне используемых реактивов – термостабильной ДНК-лигазы и меченных биотином зондов по сравнению с обычной Taq полимеразой и меченым уридином.

В последние годы активно развиваются методы производства ДНК-микрочипов, которые существенно снижают их стоимость и упрощают их использование [38–42]. В этих статьях описываются методы иммобилизации олигонуклеотидов на необработанный пластик, фиксации их при помощи ультрафиолетового облучения и гибридизации на них меченых зондов с последующим проявлением. Наиболее перспективными (востребованными на практике) выглядят следующие параметры таких микрочипов: легкость, дешевизна производства и простота анализа. Проведя серию экспериментов, обобщив опубликованные результаты, адаптировав их под задачи генотипирования одомашненных видов животных, была предложена следующая схема производства микрочипов и анализа геномов КРС. Олигонуклеотиды, которые являются аллель-специфичными праймерами, должны иметь на 5'-конце “хвост” из 10Т и 10С. Они печатаются на роботизированном

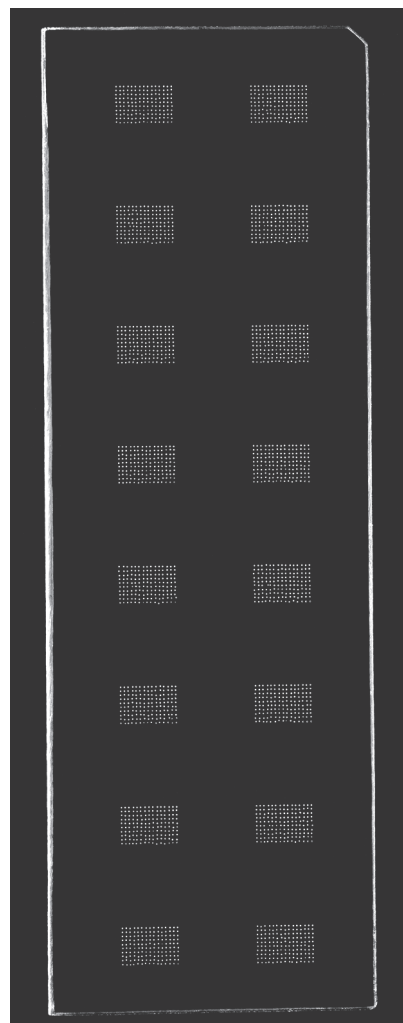


Рис. 7. Общий вид подложки с напечатанными 16 массивами по 150 спотов в каждом.

принтере на подложки из пластика (polymethyl methacrylate – PMMA), известного как оргстекло, толщиной 1 мм и после высыхания закрепляются на нем обработкой в ультрафиолетовой камере с излучением 254 нм и мощностью 3 мВ/см² в течение 10 мин (рис. 7 и 8).

Последовательность из 10Т надежно прикрепляется к подложке, а последовательность из 10С является спейсером между подложкой и собственно праймером. После этого микрочип обрабатывается в блокирующем буфере (можно использовать раствор бычьего сывороточного альбумина или молочного казеина) и промывается в фосфатном буфере. Далее микрочип вставляется в камеру с ячейками, в которые вносятся реакционная смесь для обычной ПЦР с меченым биотином тимином, но без ДНК матрицы и полимеразы. Камера помещается в термостат на 55°C на 5–10 мин прогрева. Это предоставляет возможность праймерам “распрямиться” в жидкой среде, оставаясь прикрепленными

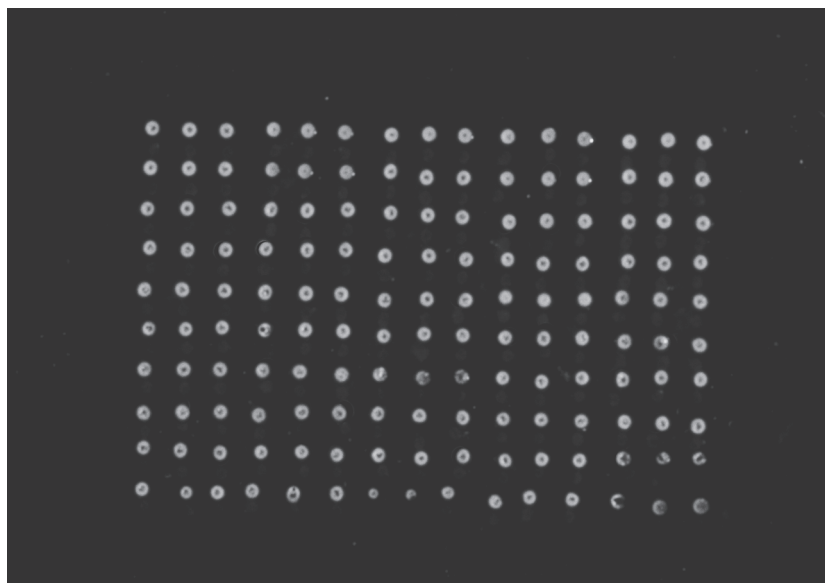


Рис. 8. Массив из 150 спотов после печати на бесконтактном споттере iONE-600.

ми к подложке через 10С спейсер. Тем временем ДНК, термоактивированная полимераза в части реакционной смеси прогреваются в другом термостате на 95°C в течение 5–10 мин и помещаются на лед. После чего эта смесь вносится в ячейки камеры и инкубируется при 55°C в течение 5–30 мин при легком перемешивании. За это время происходит процесс отжига ДНК матрицы на праймеры и элонгации цепи олигонуклеотида с одновременным мечением биотином. После этого ячейки с микрочипами споласкиваются в буфере и проявляются, как было описано выше. В этом методе совмещаются процессы гибридизации и мечения, что уменьшает время анализа. Одновременно все аллель-специфичные праймеры находятся в реакционной смеси, но они не могут взаимодействовать друг с другом как в мультиплексной ПЦР, поскольку иммобилизованы на подложке, а потому не дают неспецифического мечения. Поскольку сама реакция является одноциклической и изотермальной, не происходит умножения неспецифических ампликонов и ложного сигнала.

Разработка праймеров

Аллель-специфичные праймеры для выбранных генетических маркеров содержали на 3'-конце кроме последнего аллель-специфичного нуклеотида измененный третий нуклеотид с конца. Праймеры были выровнены по температуре плавления. Она составляла 59–60°C. Аллель-специфичные праймеры были иммобилизованы на поверхности подложки и методом ПЦР проводилось мечение синтезируемых последовательностей биотином. После чего включенный в ампликоны биотин выявлялся свя-

зыванием с комплексом стрептавидин–пероксидаза хрена и окрашиванием с субстратом для пероксидазы. Подбор некоторых характеристик осуществлялся в программе OligoCalc [43].

В настоящей работе для верификации данных (корректности работы чипа) был исследован полиморфизм двух генов, кодирующих казеины молока: *CSN3* – ген каппа-казеина и *CSN2* – ген бета-казеина у абердин-ангуса. В табл. 1 и 2 представлены генотипы аллелей казеинов согласно международной классификации (<https://www.icbf.com/>).

Количественные результаты ПЦР в реальном времени (рис. 9 и 10) соответствовали результатам данных, полученных с помощью ДНК-микрочипа (рис. 11). Таким образом можно сделать вывод, что разработанный прототип ДНК-чипа и условия для его печати и анализа генотипа соответствуют предъявляемым условиям для генотипирования КРС по известным SNP генов-кандидатов.

В России в начале 90-х гг. прошлого века насчитывалось более 20 млн голов крупного рогатого скота. В настоящее же время численность поголовья составляет около 8 млн (Единая Межведомственная Информационно-Статистическая Система, 2019) [44]. Таким образом, в течение последних двух десятилетий количество КРС уменьшилось более чем на порядок. Резкое снижение численности поголовья крупного рогатого скота (практически во всех видах сельскохозяйственных животных) в конце XX в. не могло не отразиться на уровне генетического разнообразия, в связи с чем необходимо использовать современные подходы для оценки и поддержания высокого уровня аллельного разнообразия известных генов, ассоциируемых с продуктивностью, жизнеспособностью, здоро-

Таблица 1. Реал-тайм ПЦР-анализ ДНК абердин-ангусской породы КРС по гену *CSN3*

| Позиция нуклеотида SNP | Аллельные варианты гена | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------------|----|---|----|---|---|---|----|----|----|---|---|---|
| | A | A1 | B | B2 | C | D | E | F1 | F2 | G1 | H | I | J |
| c.92 | G | | | | | | | | A | | | | |
| c.342 | T | | | C | | | | | | | | | |
| c.352 | C | | | | | | | | | T | | | |
| c.353 | G | | | | A | A | | | | | | | |
| c.373 | T | | | | | | | | | | | G | |
| c.467 | C | | | | | | | | | T | T | | |
| c.470 | C | | T | T | T | | | | | | | | T |
| c.498 | T | | | | | | | G | | | | | |
| c.506 | A | | C | C | C | | | T | | | | | C |
| c.513 | A | G | | | | | | | | | | | |
| c.521 | T | | | C | | | | | | | | | |
| c.526 | A | | | | | | G | | | | | | |
| c.564 | T | | | C | | | | | | | | | |
| c.567 | A | | G | G | G | | | | | | | | |

Красным выделены аллели, выявленные у конкретного животного.

Таблица 2. Реал-тайм ПЦР-анализ ДНК абердин-ангусской породы КРС по гену *CSN2*

| Позиция нуклеотида SNP | Аллельные варианты гена | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------------|----|----|---|---|---|---|---|----|----|---|
| | A1 | A2 | A3 | B | C | E | F | G | H1 | H2 | I |
| c.118 | C | | | | | | | | T | | |
| c.151 | G | | | | C | | | | | | |
| c.154 | G | | | | | A | | | | | |
| c.245 | A | C | C | | | C | | | | C | C |
| c.259 | C | | | | | | | | | G | |
| c.307 | C | | | | | | | | A | | |
| c.322 | A | | | | | | | | | C | C |
| c.363 | C | | A | | | | | | | | |
| c.411 | C | | | G | | | | | | | |
| c.500 | C | | | | | | T | | | | |

Красным выделены аллели, выявленные у конкретного животного.

вьем сельскохозяйственных животных. Информация о генетической структуре пород важна для разведения как в настоящее время, во избежание неблагоприятных последствий инбридинга, эпизоотий, так и в будущем при создании новых пород для различных условий разведения и содержания.

Вопросы изучения генетического потенциала, разнообразия, структуры отечественных пород сельскохозяйственных животных на основе информации, закодированной в их геномах, с целью

использования полученных данных в селекции поддержаны рядом государственных программ. Технология ДНК-микрочипов низкой плотности может стать эффективным инструментом, альтернативным подходом к традиционному пост-ПЦР-саузерн-блоттингу и одной из самых важных технологий последнего времени в отечественном животноводстве.

Новая универсальная система генотипирования крупного рогатого скота позволяет анализировать практически все известные и вновь откры-

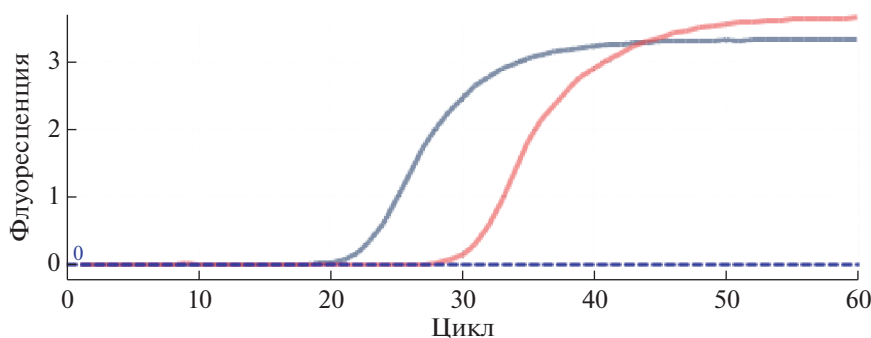


Рис. 9. Графики реал-тайм ПЦР-маркера *CSN3-513*. Серый — аллель G, красный — аллель A.

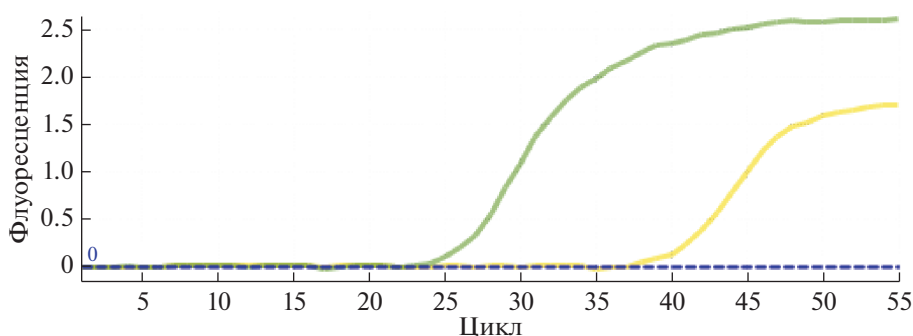


Рис. 10. Графики реал-тайм ПЦР-маркера *CSN2-245*. Зеленый — аллель C, желтый — аллель A.

ваемые SNP с известными функциями. То есть является быстрым, недорогим и эффективным инструментом для тестирования полиморфизма генов. С помощью технология ДНК-чипов открываются новые возможности для генетической паспортизации животных, пород и популяций, определения племенной ценности животных, корреляций между SNP генов и их взаимодействием.

Очевидно, что предлагаемая технология может быть использована на других видах животных, а также растений. Это инструмент для генетико-селекционных экспериментов, мониторинга и сохранения генетического разнообразия в породах, искусственного отбора и подбора пар для скрещивания и т.д. Безусловно, есть некоторые ограничения ДНК-микрочипов, связанные с кинетикой гибридизации, а также трудности при создании массивов для сильно изменчивых геномов.

Мультиплексная амплификация ДНК с аллель-специфичными праймерами с одновременным мечением биотином, гибридизация полученных меченых ампликонов с олигонуклеотидами, иммобилизованными на чип-слайде, и последующая ферментативная окраска гибридизовавшихся молекул с детекцией при помощи автоматического ридера позволят быстро и дешево генотипировать большие массивы животных. Информация о большом количестве генов, ассо-

циированных с различными фенотипическими признаками, потребует разработать программное обеспечение для анализа результатов и формирования селекционных рекомендаций для отечественного животноводства.

Биоинформатика, т.е. использование математических и статистических методов, играет решающую роль на завершающей стадии этой технологии, поскольку позволяет оценивать результаты генотипирования на микрочипах, а также анализировать полученные генотипы, их взаимодействия друг с другом и связь с фенотипами животных и формировать рекомендации для их дальнейшего использования.

Микромассивы олигонуклеотидов можно применять в качестве эффективного альтернативного или дополнительного параллельного подхода в геномной селекции, основанного на данных, полученных с помощью чипов высокой плотности.

В рамках проекта разработан чип-слайд для анализа мутаций в геномах любых видов млекопитающих, связанных с риском развития генетически обусловленных заболеваний, или определяющих хозяйственно значимые признаки на примере генома крупного рогатого скота, обладающий следующими преимуществами по сравнению с аналогами: время на проведение анализа — около трех часов, использование только хорошо изученных SNP —

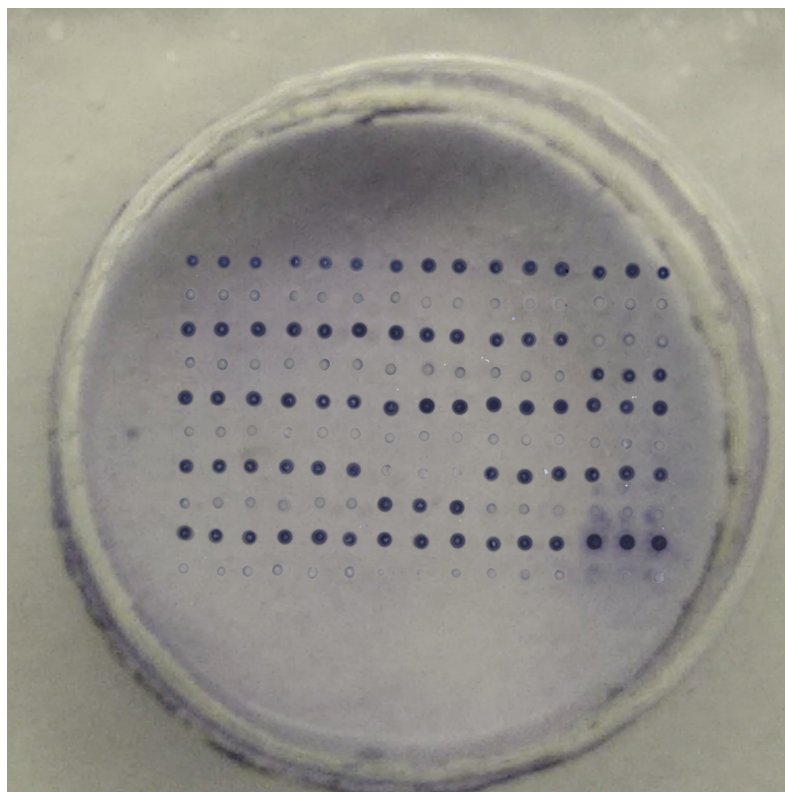


Рис. 11. Один из массивов после гибридизации с ДНК абердин-ангуса, мечения и проявки. В нечетных рядах – базовые аллели, в четных – мутантные аллели. Последние три точки в четвертом ряду – аллель G маркера *CSN3-513*; 7-я, 8-я и 9-я точки в восьмом ряду – аллель C маркера *CSN2-245*. Результат полностью соответствует результату реал-тайм ПЦР.

нет избыточной информации, как нет необходимости в использовании дорогих высокопроизводительных секвенаторов, для проведения анализа не нужен высококвалифицированный персонал – анализ может проводить лаборант. И наконец, созданные на основе анализа данных ДНК-чипа рекомендации помогут селекционерам, ветеринарам и владельцам животных принять правильное решение в диагностике и прогнозировании, разработать точные и эффективные стратегии разведения и сохранения отечественных животных.

Работа выполнена при поддержке гранта 19-76-20061 РФФИ (<http://rscf.ru>).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Matukumalli L.K., Lawley C.T., Schnabel R.D. et al.* Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 4. e5350. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005350>
2. *Kijas J.W., Townley D., Dalrymple B.P. et al.* A genome wide survey of SNP variation reveals the genetic structure of sheep breeds // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 3. e4668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004668>
3. *McCue M.E., Bannasch D.L., Petersen J.L. et al.* A high density SNP array for the domestic horse and extant *Perissodactyla*: utility for association mapping, genetic diversity, and phylogeny studies // *PLoS Genetics*. 2012. V. 8. № 1. e1002451. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002451>
4. *Столповский Ю.А., Пискунов А.К., Свищева Г.Р.* Геномная селекция. I. Последние тенденции и возможные пути развития // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 9. С. 1006–1017. <https://doi.org/10.31857/S0016675820090143>
5. *Столповский Ю.А., Свищева Г.Р., Пискунов А.К.* Геномная селекция. II. Перспективные направления // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 10. С. 1107–1114. <https://doi.org/10.31857/S0016675820100124>
6. *Boichard D., Chung H., Dasonneville R. et al.* Design of a bovine low-density SNP array optimized for imputation // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 3. e34130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034130>
7. *Bolormaa S., Gore K., van der Werf J.H.J. et al.* Design of a low-density SNP chip for the main Australian sheep breeds and its effect on imputation and genomic prediction accuracy // *Animal Genetics*. 2015. V. 46. № 5. P. 544–556. <https://doi.org/10.1111/age.12340>

8. *Aliloo H., Mrode R., Okeyo A.M. et al.* The feasibility of using low-density marker panels for genotype imputation and genomic prediction of crossbred dairy cattle of East Africa // *J. Dairy Sci.* 2018. V. 101. № 10. P. 9108–9127.
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14621>
9. *Шашкова Т.И., Мартынова Е.У., Аюпова А.Ф. и др.* Разработка панели низкой плотности для геномной селекции свиней в России // *Трансляционная наука о животных.* 2020. Т. 4. Вып. 1. С. 264–274.
<https://doi.org/10.1093/tas/txz182>
10. *Reverter A., Hudson N.J., McWilliam S. et al.* A low-density SNP genotyping panel for the accurate prediction of cattle breeds // *J. Animal Sci.* 2020. V. 98. № 11. skaa337.
<https://doi.org/10.1093/jas/skaa337>
11. *Alexandre P.A., Li Y., Hine B.C. et al.* Bias, dispersion, and accuracy of genomic predictions for feedlot and carcass traits in Australian Angus steers // *Genet. Sel. Evol.* 2021. V. 53. P. 77.
<https://doi.org/10.1186/s12711-021-00673-8>
12. *Coffey M.* Dairy cows: in the age of the genotype, phenotype-skipping // *Animal Frontiers.* 2020. V. 10. № 2. P. 19–22.
<https://doi.org/10.1093/af/vfaa004>
13. *Solodneva E.V., Piskunov A.K., Stolpovsky Y.A., Kuznetsov S.B.* Digital phenotyping technologies: an emerging tool in genomic selection and animal welfare science? // *E3S Web Conf. EDP Sciences.* 2021. V. 285. P. 04015.
<https://doi.org/10.1051/e3sconf/202128504015>
14. *Sulimova G.E., Sokolova S.S., Semikozova O.P. et al.* Analysis of DNA polymorphisms of clustered genes in cattle: Casein genes and genes of the major histocompatibility complex (BOLA) // *Tsitol. Genetika.* 1992. V. 26. P. 18–26.
15. *Tantia M.S., Vijh R.K., Mishra B.P. et al.* DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds // *BMC Vet. Res.* 2006. V. 2. № 1. P. 1–5.
<https://doi.org/10.1186/1746-6148-2-32>
16. *Grisart B., Farnir F., Karim L. et al.* Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition // *PNAS.* 2004. V. 101. № 8. P. 2398–2403.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0308518100>
17. *Mohammadabadi M.R., Torabi A., Tahmourespoor M. et al.* Analysis of bovine growth hormone gene polymorphism of local and Holstein cattle breeds in Kerman province of Iran using polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) // *African J. Biotechnol.* 2010. V. 9. № 41. P. 6848–6852.
<https://doi.org/10.5897/AJB10.799>
18. *Moravcikova N., Trakoviccka A., Hazuchova E., Bujko J.* Associations between polymorphisms in the leptin gene and milk production traits in Pinzgau and Slovak Spotted cattle // *Acta Agriculturae Slovenica.* 2012. V. 100. Suppl. 3. P. 259–263.
19. *Akad I.A.Ş., Mengi A., Öztapak K.Ö.* A determination of growth hormone receptor gene polymorphisms in East Anatolian Red cattle, South Anatolian Red cattle, and Turkish Grey cattle // *Turkish J. Vet. and Animal Sci.* 2012. V. 36. № 1. P. 27–33.
20. *Kanae Yu., Endoh D., Nagahata H. et al.* A method for detecting complex vertebral malformation in Holstein calves using polymerase chain reaction–primer introduced restriction analysis // *J. Vet. Diagnostic Invest.* 2005. V. 17. № 3. P. 258–262.
<https://doi.org/10.1177/104063870501700309>
21. *Thomsen B., Horn P., Panitz F. et al.* A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-N-acetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation // *Genome Res.* 2006. V. 16. № 1. P. 97–105.
<https://doi.org/10.1101/gr.3690506>
22. *Куйко Е., Кургузкин В., Саморуков Ю., Марзанов Н.* Оценка аллелофонда быков-производителей по каппа-казеину и BLAD-синдрому // *Вет. патология.* 2008. № 3. С. 38–40.
23. *Barendse W., Bunch R.J., Kijas J.W., Thomas M.B.* The effect of genetic variation of the retinoic acid receptor-related orphan receptor C gene on fatness in cattle // *Genetics.* 2007. V. 175. № 2. P. 843–853.
<https://doi.org/10.1534/genetics.106.064535>
24. *Matsushashi T., Maruyama S., Uemoto Y. et al.* Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle // *J. Animal Sci.* 2011. V. 89. № 1. P. 12–22.
<https://doi.org/10.2527/jas.2010-3121>
25. *Тюлькин С.В., Нургалиев Ф.М., Ахметов Т.М., Вафин Р.Р.* Идентификация мутаций генов *mstn* и *RyR1*, связанных с мясной продуктивностью животных // *Уч. зап. Казанской гос. академии вет. медицины им. Н.Э. Баумана.* 2012. Т. 212. № 4. С. 390–395.
26. *Szreder T., Zwierzchowski L.* Polymorphism within the bovine estrogen receptor-alpha gene 5'-region // *J. Applied Genet.* 2004. V. 45. № 2. P. 225–236.
27. *Костенко С.А., Сидоренко Е. В.* Влияние полиморфизма гена эстроген-рецептора на спермопродуктивность хряковразных пород // *Зоотехнич. наука Беларуси.* 2011. Т. 46. № 1. С. 105–112.
28. *Kulesh D.A., Clive D.R., Zarlenga D.S., Greene J.J.* Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences // *PNAS.* 1987. V. 84. P. 8453–8457.
<https://doi.org/10.1073/pnas.84.23.8453>
29. *Lashkari D.A., DeRisi J.L., McCusker J.H. et al.* Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis // *PNAS.* 1997. V. 94. P. 13057–13062.
<https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.13057>
30. *Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray // *Sci. J.* 1995. V. 270. P. 467–470.
<https://doi.org/10.1126/science.270.5235.467>
31. *Khrapko Yu.P., Lysov A.A., Khorlin I.B. et al.* A method for DNA sequencing by hybridization with oligonucleotide matrix // *DNA Seq.* 1991. V. 1. № 6. P. 375–388.
<https://doi.org/10.3109/10425179109020793>

32. Prasad A., Mohammad Abid Hasan S., Grouchy S., Gartia M.R. DNA microarray analysis using a smartphone to detect the BRCA-1 gene // *Analyst*. 2019. V. 144. P. 197–205.
<https://doi.org/10.1039/C8AN01020J>
33. Кузнецов С.Б., Михайловский М.В. Создание ДНК-микрочипа для выявления генетической предрасположенности к идиопатическому сколиозу // *Международ. журн. прикл. и фундамент. исследований*. 2018. № 11. С. 67–74.
34. Adebayo O. *Staphylococcus aureus* from Nigeria and South Africa // *PLoS One*. 2021. Publ. online: July 20.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237124>
35. Nsofor C.A. DNA microarrays and their applications in medical microbiology // *Biotechnol. and Mol. Biol. Rev.* 2014. V. 9. № 1. P. 1–11.
<https://doi.org/10.5897/BMBR2013.0216>
36. Korkor M.T., Meng F.B., Xing S.Y. et al. Microarray analysis of differential gene expression profile in peripheral blood cells of patients with human essential hypertension // *Int. J. Med. Sci.* 2011. V. 8. № 2. P. 168–179.
<https://doi.org/10.7150/ijms.8.168>
37. Damin F., Galbiati S., Gagliardi S. et al. CovidArray: A microarray-based assay with high sensitivity for the detection of Sars-Cov-2 in nasopharyngeal swabs // *Sensors*. 2021. V. 21. P. 2490.
<https://doi.org/10.3390/s21072490>
38. Gibriel A.A., Adel O. Advances in ligase chain reaction and ligation-based amplifications for genotyping assays: Detection and applications // *Mut. Res.* 2017. V. 773. P. 66–90.
<https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2017.05.001>
39. Dufva M. Fabrication of high quality microarrays // *Biomol. Engineering*. 2005. V. 22. № 5–6. P. 173–184.
<https://doi.org/10.1016/j.bioeng.2005.09.003>
40. Dufva M., Petersen J., Stoltenborg M. et al. Detection of mutations using microarrays of poly(C)10–poly(T)10 modified DNA probes immobilized on agarose films // *Analytical Biochemistry*. 2006. V. 352. P. 188–197.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.008>
41. Kimura N. One-step immobilization of poly(dT)-modified DNA onto non-modified plastic substrates by UV irradiation for microarrays // *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 2006. V. 347. P. 477–484.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.06.130>
42. Sun Y., Perch-Nielsen I., Dufva M. et al. Direct immobilization of DNA probes on non-modified plastics by UV irradiation and integration in microfluidic devices for rapid bioassay // *Anal. Bioanal. Chem.* 2012. V. 402. P. 741–748.
<https://doi.org/10.1007/s00216-011-5459-4>
43. Kibbe W.A. OligoCalc: An online oligonucleotide properties calculator // *Nuc. Ac. Res.* 2007. V. 35. № 2. P. W43–W46.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm234>
44. Фёдорова Е.В. Поголовье скота и птицы в хозяйствах всех категорий // *ЕМИСС. Гос. статистика (база данных)*. 2019.

New Cattle Genotyping System Based on DNA Microarray Technology

Yu. A. Stolpovsky^{a, *}, S. B. Kuznetsov^a, E. V. Solodneva^a, and I. D. Shumov^b

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bOrekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119435 Russia

*e-mail: stolpovsky@mail.ru

A prototype test system has been developed to identify genetic markers of productivity, to determine purebred breeding, monogenic diseases of cattle in the format of a DNA microarray. A method has been developed for immobilizing of oligonucleotides on a polymer base, fixing them using ultraviolet irradiation and hybridizing DNA on it, followed by labeling and determination of genotypes. Genotyping of two genes encoding milk caseins: *CSN3* – gene for kappa-casein and *CSN2* – gene for beta-casein of the Aberdeen Angus breed using a real-time PCR and a created DNA microarray showed identical results. Potential possibilities of using the technology of DNA microarrays, its principle and possibilities of application in animal husbandry for genetic selection work are considered: monitoring, determination of genetic potential and diversity in breeds and populations of cattle, and agrobiodiversity in general.

Keywords: DNA microarray, cattle, candidate genes, genomic selection, genotyping, genetic diversity.

УДК 636.082.12

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ РАЗВИТИЯ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НА ПРИМЕРЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И ДРУГИХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ. I. ЭМБРИОНАЛЬНЫЙ И ПУБЕРТАТНЫЙ ПЕРИОДЫ

© 2022 г. Е. В. Солоднева¹ *, С. Б. Кузнецов¹, А. Е. Велиева², Ю. А. Столповский¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Пенсильванский университет, Школа инженерии и прикладных наук, Филадельфия, Пенсильвания, 19104 США

*e-mail: eugenia.575.2012@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.03.2022 г.

После доработки 29.03.2022 г.

Принята к публикации 31.03.2022 г.

Растущий спрос общества на продукцию сельскохозяйственных животных обуславливает необходимость постоянной модернизации селекционных программ. В целях повышения точности геномной оценки племенной ценности в последнее время используются модели, позволяющие учитывать информацию о вкладе конкретных полиморфных локусов в формирование интересующих хозяйственно полезных признаков. Учет функциональной роли генов, ответственных за формирование молочной железы, важен для повышения достоверности прогноза молочной продуктивности. В настоящем обзоре описаны молекулярно-генетические основы развития молочной железы на эмбриональном, препубертатном и пубертатном этапах развития на примере крупного рогатого скота и некоторых других млекопитающих. Особое внимание в работе уделено эпигенетической регуляции. Приведены данные по генетике, морфофизиологии, эндокринологии и влиянию микроорганизмов на разных этапах развития молочной железы.

Ключевые слова: КРС, молочная железа, геномная селекция, эпигенетическая регуляция, морфогенез, аборигенные породы.

DOI: 10.31857/S0016675822080082

По предварительным оценкам ФАО в 2021 г. мировое производство молока достигло 9281 млн т [1], что на 2341 млн т выше показателей 2008 г. [2]. Молочная индустрия показывает впечатляющие результаты в повышении продуктивности крупного рогатого скота. Направленный отбор с учетом генетико-селекционных данных, улучшение кормов и условий содержания, эффективный менеджмент, все это способствовало наблюдаемому росту продукции. Однако спрос на молочные продукты не перестает расти, что обуславливает необходимость постоянной модернизации программ геномной селекции и содержания животных. Особую актуальность приобретает совершенствование стратегии разведения аборигенных пород крупного рогатого скота, ведь сохранение биоразнообразия является не менее важной задачей современного животноводства. Выведение геномной оценки племенной ценности (ГЕВ) у малочисленных пород имеет важную особенность – эталонная группа представлена лимитированным количеством особей, что сказывается на достоверности прогноза [3, 4]. При этом использование рефе-

ренсной выборки международных трансграничных пород крупного рогатого скота для оценки генетического потенциала местных пород в большинстве случаев не представляется возможным. Так, по имеющимся данным в межпородном прогнозе потенциала молочного скота наблюдается низкая точность геномной оценки племенной ценности [5]. В целях повышения точности выведения геномных индексов в последнее время используются модели (GFBLUP, BayesRCO), позволяющие учитывать информацию о вкладе конкретных полиморфных локусов в формирование интересующих хозяйственно полезных признаков [6, 7]. Учет функциональной роли генов, ответственных за формирование молочной железы, важен для повышения достоверности прогноза молочной продуктивности.

Процесс выработки молока, и как следствие молочная продуктивность, во многом зависит от развитости молочной железы. Хорошо сформированная железа с развитой структурой протоков, с обилием секреторных клеток, хорошим кровоснабжением и прочной соединительной тканью

будет долгое время сохранять высокую продуктивность [8]. В течение жизни самок млекопитающих их молочные железы претерпевают ряд морфологических преобразований, состоящих из шести основных периодов: внутриутробного, препубертатного, пубертатного, беременности, лактации и инволюции [9]. Каждый из этих периодов проходит под строгим контролем множества взаимосвязанных каскадов генов и их регуляторных элементов, находясь под влиянием самых разных факторов среды. Лучшее понимание механизмов взаимодействия участников морфогенеза молочной железы позволит точнее определить вклад конкретных молекул, что в свою очередь будет способствовать повышению эффективности программ геномной селекции и программ сохранения биоразнообразия.

В последнее время также обсуждается возможность учета данных эпигенетики для геномной селекции крупного рогатого скота [10]. Изменения генома, обусловленные мутациями, не могут объяснить всей фенотипической изменчивости признаков. Результаты тематических исследований свидетельствуют о существенном вкладе эпигенетической регуляции в этиологию болезней и формирование продуктивных признаков сельскохозяйственных животных [11]. Для учета эпигенетического вклада при оценке племенной ценности животных требуется подбор стабильных маркеров. Подобные стабильные эпигенетические маркеры уже предложены в качестве прогностических инструментов для некоторых фенотипических признаков у человека [12]. Профилирование эпигенетических меток в тканях крупного рогатого скота позволяет уже сейчас выявлять глобальные и тканеспецифические модели метилирования [13, 14]. В целях повышения эффективности поиска эпигенетических меток в последнее время широко используют алгоритмы машинного обучения [15]. Объединяя данные об эпигенетических регуляторах и уровнях экспрессии генов конкретной ткани, можно в какой-то мере автоматизировать процесс предсказания возможных физиологических состояний и диагнозов, в том числе у крупного рогатого скота [16]. Развитие технологий, позволяющих манипулировать конкретными эпигенетическими регуляторами, например основанные на системе CRISPR-Cas9, может предоставить мощные инструменты контроля генной экспрессии, включая гены, ответственные за развитие молочной железы [11, 17].

Возможности современной науки позволяют исследователям со всего мира активно пополнять базу знаний о молекулярно-генетических факторах развития молочной железы млекопитающих. Все больше участников самых разных генных каскадов, определяющих это развитие, становятся доступны для дальнейшего исследования. Отдельного внимания заслуживают данные о влия-

нии внешних факторов на раскрытие генетического потенциала животных.

Цель настоящего обзора – описание молекулярных основ формирования молочной железы на эмбриональном, препубертатном и пубертатном этапах развития на примере крупного рогатого скота и некоторых других млекопитающих. Особое внимание уделено эпигенетической регуляции как фактору развития молочной железы в целом, так и отдельно для каждого периода. Также приведены данные по генетике, морфофизиологии, эндокринологии и влиянию микроорганизмов.

УЧАСТНИКИ РЕГУЛЯЦИИ МОРФОГЕНЕЗА МОЛОЧНЫХ ЖЕЛЕЗ

Гормоны, факторы роста и их рецепторы

Каждая фаза лактационного цикла, среди которых маммогенез, лактогенез, галактопоз и инволюцию, проходит под строгим контролем со стороны эндокринной системы. Выделяют три основные группы гормонов:

1) половые, действующие непосредственно на молочную железу: окситоцин, прогестерон, эстроген, плацентарный лактоген и пролактин;

2) метаболические, контролирующие многие физиологические и метаболические процессы в организме: гормон роста, инсулин, кортикостероиды, гормоны желудочно-кишечного тракта и гормоны щитовидной железы;

3) местные: паратиреоидный гормон-родственный белок, гормон роста, лептин и пролактин [18].

Стероидные и пептидные гормоны участвуют в регуляции морфогенеза и ремоделировании молочных желез, контролируя экспрессию генов и эпигенетические изменения [19].

Некоторые гормоны и факторы роста участвуют в транспорте компонентов молока (пептид, родственный паратиреоидному гормону) [20], оказывают влияние на кровоток (вазопрессин, адреналин и норадреналин, ангиотензин II), а также играют важную роль в развитии системы кровеносных сосудов [21]. Кроме этого, гормоны могут влиять на синтез и секрецию друг друга. Действуя на гипофиз, эстрогены стимулируют синтез и секрецию пролактина [22]. Пролактин контролирует лютеиновое тело и, как следствие, синтез прогестерона [23]. Также пролактин регулирует экспрессию рецептора эстрогена альфа [24].

Эпигенетические регуляторы

Химические модификации хроматина или транскрибируемой ДНК, влияющие на генную экспрессию без изменения самой последовательности ДНК, являются предметом изучения эпигенетики [25]. В последние годы объем данных по

теме эпигенетической регуляции различных физиологических процессов, включая развитие молочной железы, продолжает расти. Определение роли конкретных регуляторных молекул помогает лучше понять особенности их взаимодействия с другими участниками сигнального каскада. Вместе с тем расширяется зона их возможного влияния, растет количество потенциальных мишеней, открываются новые уровни регуляции. В данном разделе рассмотрены три основных этапа эпигенетической регуляции: метилирование ДНК, модификация гистонов и влияние некодирующих РНК, применительно к этапам развития и функционирования молочной железы.

Метилирование ДНК

Метилирование ДНК – процесс присоединения метильной группы к углероду цитозина в положении 5, опосредованный ДНК-метилтрансферазами и ДНК-деметилазами [26]. Метилирование CpG-островка (цитозин и гуанин, соединенные через фосфатную группу) в зоне промотора может блокировать экспрессию гена [27], тогда как метилирование экзон-интронной области может способствовать активации транскрипции [28]. По оценкам некоторых авторов метилирование ДНК опосредованно влияет на пролиферацию и дифференцировку эпителиальных клеток молочной железы, образование терминальных протоковых единиц (TDE), удлинение протоков, развитие дольчато-альвеолярных структур и жировой подушечки. Также отмечено влияние данной эпигенетической модификации на показатели лактации [29]. В ответ на факторы внешней среды профили метилирования ДНК изменяются, влияя на профили экспрессии генов [30, 31]. Данные по метилированию ДНК у крупного рогатого скота недавно были обобщены в работе Халушковой и соавт. [32].

Модификации гистонов

Динамические модификации гистонов, в частности метилирование, ацетилирование, фосфорилирование, убиквитинирование и сумоилирование, могут регулировать экспрессию генов [33], влиять на структуру хроматина, участвовать в привлечении активаторов и супрессоров транскрипции [34]. Ремоделирование хроматина может быть опосредовано белками группы polycomb (PcG) – эпигенетические сайленсеры, участвующими в поддержании клеточной идентичности [35]. Присоединение и удаление ацетильной группы находятся под контролем, в том числе, гистоновых ацетилтрансфераз (HAT) и гистоновых деацетилаз (HDAC) соответственно. В этой связи особую актуальность приобретают исследования, посвященные поиску ингибиторов активности гистоновых ацетилтрансфераз и гистоновых де-

ацетилаз. В работе Сильвы и соавт. [36] дается оценка роли пропионата натрия и бутирата натрия как HDAC-зависимых регуляторов экспрессии воспалительных генов в эпителии молочной железы коров.

Некодирующие РНК

Некодирующие РНК, в числе которых микроРНК (miRNA), длинная некодирующая РНК (lncRNA), кольцевая (circRNA), малая интерферирующая РНК (siRNA), PIWI-взаимодействующая РНК (piRNA), малая ядрышковая РНК (snoRNA), представляют собой группу нетранслируемых молекул РНК, влияющих на экспрессию генов. Таким образом, они контролируют многие сигнальные пути, участвуя в самых разных биологических процессах, включая развитие молочной железы крупного рогатого скота [37, 38].

МикроРНК представляют собой небольшие последовательности около 21–24 нуклеотидов в длину [39]. Многие микроРНК являются высоко консервативными, что указывает на важность выполняемых ими функций [39]. Мишенью микроРНК часто становятся матричные РНК, связывание с которыми обуславливает репрессию трансляции [40]. По разным оценкам микроРНК могут контролировать активность от 30 [41] до 60% [42] всех генов. Известно также о взаимном регулировании микроРНК и гормонов. Так, пролактин может ингибировать экспрессию miR-183 [43], в то время как bta-miR-15a косвенно снижает секрецию молока путем блокирования экспрессии рецептора гормона роста [44]. Являясь важным галактопоэтическим гормоном, соматотропин запускает экспрессию казеина [45]. При изучении роли miR-29 в клетках молочной железы коров было установлено [46], что ингибирование данной молекулы вызывает глобальное гиперметилирование ДНК и снижает секрецию лактопротеина, триглицеридов (ТГ) и лактозы. Также авторы сообщают, что подавление miR-29 приводит к увеличению уровней метилирования промоторов генов, связанных с лактацией, в числе которых: *CSN1S1*, *EIF5*, *PPARγ*, *SREBP1*, *GLUT1*. В этой же работе предложен возможный механизм регуляции, из которого следует, что miR-29 контролирует уровень метилирования ДНК путем обратного нацеливания на DNMT3A и DNMT3B.

Участие микроРНК в регулировании функций молочных желез было определено путем выявления различий в профилях экспрессии этих молекул в зависимости от стадии лактации, режима питания и присутствия патогенов. Так, сравнивая паттерны экспрессии микроРНК в молочной железе крупного рогатого скота на разных стадиях лактации, авторы исследования [47] выявили 12 микроРНК с пониженной регуляцией (miR-10a, miR-15b, miR-16, miR-21, miR-33b, miR-145,

miR-146b, miR-155, miR-181a, miR-205, miR-221 и miR-223) в сухостойный период (30 дней до родов) по сравнению с ранним периодом лактации (7 дней после родов). На сегодняшний день в базе данных микроРНК MiRBase аннотировано более 1000 зрелых микроРНК крупного рогатого скота (редакция 22.1) [48]. В недавнем обзоре Дысина и коллег собраны современные исследования, посвященные определению роли микроРНК в развитии, здоровье и функционировании молочной железы крупного рогатого скота, коз и овец [49].

Длинные некодирующие РНК (днРНК) – это транскрипты длиной более 200 нуклеотидов. Одна днРНК может выполнять сразу несколько функций, среди которых участие в регуляции экспрессии генов путем привлечения ферментов, модифицирующих хроматин, и формирование комплексов рибонуклеопротеидов посредством привлечения белков [29]. В исследовании [50], посвященном выявлению роли длинных некодирующих РНК в регуляции генов в тканях молочной железы крупного рогатого скота, в качестве генов-мишеней были определены участники сигнальных путей, связанных с лактацией, включая клеточный цикл, JAK-STAT, клеточную адгезию и сигнальные пути PI3K-Akt. Также были предложены четыре днРНК (TCONS_00040268, TCONS_00137654, TCONS_00071659 и TCONS_00000352), которые, вероятно, играют важную роль в регуляции процесса лактации коров. Показана взаимосвязь между перечисленными днРНК, микроРНК (miR-221) и ее предполагаемой мишенью – рецепторной тирозинкиназой ErbB3 (ген *ERBB3*), которая, как было показано ранее [51], может влиять на выживание и дифференцировку клеток эпителия молочной железы во время беременности и лактации.

Кольцевые РНК (circRNA) представляют собой ковалентно замкнутые молекулы РНК, полученные в результате реакций обратного сплайсинга линейных РНК [52]. Кольцевые РНК в основном генерируются из экзонных или интронных последовательностей. Также в литературе имеются данные о возможной трансляции этих молекул [53]. У многоклеточных организмов замечена тканеспецифическая экспрессия кольцевых РНК [54]. В последние годы стали появляться данные о потенциальной способности кольцевых РНК выступать в роли губок для микроРНК [52]. Выступая в качестве регуляторов, они контролируют транскрипцию, сплайсинг пре-мРНК, трансляцию мРНК и функции белков [55]. Могут выступать модификаторами экспрессии родительских генов [52]. Все это указывает на важную роль кольцевых РНК в регуляции различных физиологических процессов, включая иммунные ответы и поведение. В работе Лю и соавт. [56] была продемонстрирована способность пролактин-чувствительной кольцевой РНК влиять на пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы коров.

Взаимодействие кольцевой РНК circ08409, микроРНК miR-133a и цитокина TGFB2 было продемонстрировано в работе по изучению механизмов иммунного ответа и апоптоза, вызванных влиянием кадмия на эпителий молочной железы крупного рогатого скота. Кольцевая РНК circ08409, связываясь с miR-133a, ослабляет опосредованное данной микроРНК ингибирование экспрессии *TGFB2* [57].

Данные по эпигенетическому регулированию развития молочной железы более подробно обобщены в недавнем обзоре Ивановой и соавт. “Эпигенетика: новый взгляд на биологию молочной железы” [29].

Микроорганизмы

Патогены способны влиять на экспрессию генов хозяина через эпигенетические механизмы его клеток, такие как метилирование ДНК, модификации гистонов, некодирующие РНК и факторы сплайсинга, что помогает им уклоняться от иммунного ответа [58]. Кроме этого, во время беременности бактериальные инфекции способны оказывать эпигенетическое влияние на гены, участвующие в эмбриональном развитии [59].

Эффективной стратегией считается модуляция ацетилирования гистонов. Продукты метаболизма патогенных микроорганизмов действуют на активность гистоновых ацетилтрансфераз (НАТ) и гистондеацетилаз (HDAC), подавляя экспрессию генов защиты хозяина [60]. В недавнем обзоре Гангули и Чакраборти, посвященном бактериальной эпигенетике, подробно описаны механизмы модуляции эпигенетической информации клеток-хозяев [59].

Одним из основных возбудителей мастита крупного рогатого скота является коагулазо-положительная бактерия *Staphylococcus aureus* (золотистый стафилококк). В недавно опубликованном исследовании дается оценка влияния данной бактерии на метилирование ДНК и экспрессию генов, связанных с аутофагией, апоптозом и липидным метаболизмом, в секреторной ткани молочной железы коровы [61]. Авторы еще одной работы описывают регуляторный механизм bta-miR-223, которая является преобладающей микроРНК, задействованной в заболевании маститом, вызванным *S. aureus*. Взаимодействуя с геном *CBLB* и ингибируя сигнальный путь PI3K/AKT/NF-κB, данная микроРНК, вероятно, смягчает прогрессирование воспаления [62]. Изучая влияние другого возбудителя мастита *Escherichia coli* (кишечная палочка) на экспрессию генов клеток молочной железы крупного рогатого скота, установили, что вызванное патогеном метилирование области, находящейся на расстоянии 10 тпн перед геном αS1-казеина (*CSN1S1*), приводит к конденсации хроматина и прекращению экспрессии этого гена [63].

Изучив профили микроРНК эпителиальных клеток молочной железы крупного рогатого скота, зараженных бактериями *E. coli* или *S. aureus*, авторы исследования [64] предложили использовать выявленные микроРНК в качестве биомаркеров для диагностики мастита. Четыре дифференциально экспрессируемые микроРНК (bta-miR-2339, miR-499, miR-23a и miR-99b) были уникальными для *S. aureus*, а пять других (bta-miR-184, miR-24-3p, miR-148, miR-486 и let-7a-5p) были уникальными для *E. coli*. Также были определены пять микроРНК, проявляющих временную дифференциальную регуляцию в незараженных клетках (bta-miR-193a-3p, miR-423-5p, miR-30b-5p, miR-29c и miR-un116). Полученные данные также могут свидетельствовать о содействии эпителиальных клеток молочной железы иммунному ответу на инфекционные патогены [64].

С подробным описанием молекулярных механизмов, используемых бактериями для изменения эпигенетических меток в клетках хозяина, можно ознакомиться в обзоре “Эпигенетика и бактериальные инфекции” [58].

РАЗВИТИЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПО ПЕРИОДАМ

В настоящее время в литературе собран обширный материал по теме развития молочной железы крупного рогатого скота на разных физиологических этапах. Объем накопленной информации выходит далеко за рамки обзора. Таким образом, целью данной главы стала систематизация и обобщение некоторых имеющихся данных о морфофизиологии, генетике, эпигенетической регуляции и влиянии микроорганизмов на развитие молочной железы в эмбриональном, препубертатном и пубертатном периодах, с целью демонстрации сложности и многоуровневой регуляции этого процесса.

Эмбриональный период

Эмбриональное развитие молочной железы млекопитающих протекает по схожему сценарию у большинства представителей этого класса. На сегодняшний день в литературе представлено относительно немного данных, описывающих молекулярные взаимодействия на этом этапе у представителей крупного рогатого скота, что затрудняет формирование общей картины процесса. В этой связи молекулярные механизмы данного этапа развития будут рассмотрены преимущественно на примере мыши. Стоит ожидать, что некоторые аспекты могут отличаться от таковых у крупного рогатого скота.

На этом этапе формируются эпителиальные и окружающие стромальные компартменты, дающие начало основным структурам молочной железы [65]. Продолжительность эмбрионального

периода у крупного рогатого скота составляет в среднем 285 дней (рис. 1).

Морфофизиологический аспект

Ранние структуры молочных желез начинают формироваться в процессе маммогенеза еще в утробе матери. Зародышевые экто- и мезодерма дают начало эпителиальным и окружающим их стромальным компартментам [66]. На 35-е сутки развития эмбриона крупного рогатого скота становятся заметны линии молочной железы, представленные утолщением эктодермы. Два гребня, возникающие на каждой линии, впоследствии дают начало “четвертям” вымени [67]. На стадии бугорка молочной железы пролиферативные эпителиальные зоны в гребнях округляются и погружаются в мезенхиму. Зачаток молочной железы формируется примерно на 40-й день [68]. Становится заметен половой диморфизм. Молочные зачатки у самцов больше, чем у самок. На 65-е сутки быстрый рост мезенхимы, окружающей каждый зачаток, поднимает его над плоскостью эпителия. Позже начинается пролиферация в продольном направлении и формируется твердое ядро эпителиальных клеток [67]. Первичный росток и сосок появляются к 80-мудню беременности, а к 90-му – ответвляются вторичные ростки, превращающиеся в крупные молочные протоки, впадающие в цистерну железы [67, 68]. Цистерны железы и сосков образуются в процессе канализации первичного и вторичных ростков за счет ремоделирования ткани и апоптоза на 100-й день эмбриогенеза.

Начиная с 7-го месяца развития, зачаток молочной железы самки крупного рогатого скота ускоряет свой рост, который сопровождается расширением жировой подушки молочной железы [67]. Таким образом, к моменту рождения у плода различимы сосок, цистерна соска и цистерна железы, жировая ткань разделена системой соединительной ткани, сформировались сосудистая и лимфатическая системы. Рядом с цистерной молочной железы имеется несколько клеток протока, но нет альвеол [69]. Эпителиальная ткань находится в зачаточном состоянии, при этом имеющиеся клетки способны к дальнейшей пролиферации и определенной специфичной для молочной железы дифференцировке [68].

Генетические факторы

Начало развития молочных желез регулируется сигнальными каскадами: BMP, Wnt, FGF, Neuregulin, Hedgehog. Активность некоторых участников данных путей регистрируется в разные периоды эмбриогенеза, а также после рождения животного. Протяженность и расположение линии молочных желез относительно переднезадней и дорсо-вентральной осей туловища, а также инициация

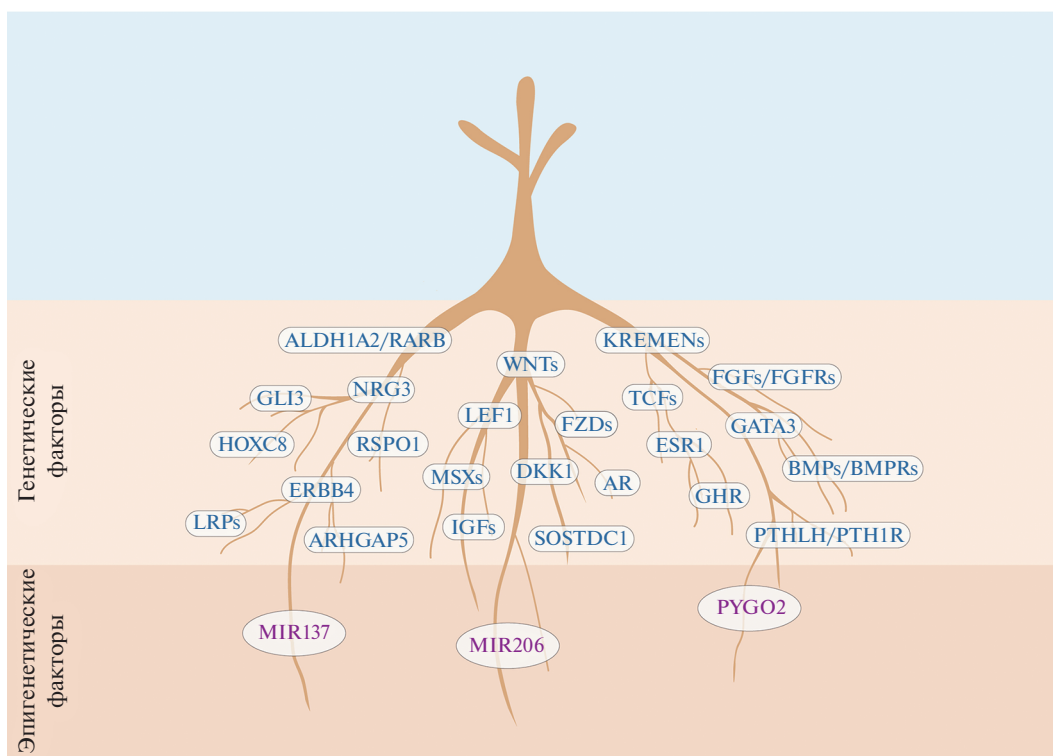


Рис. 1. Графическое представление эмбрионального периода развития молочной железы крупного рогатого скота. Крона дерева символизирует рудиментарную сеть протоков, сформированную к моменту рождения. Для рис. 1, 2: в области корней расположены аббревиатуры генов, принимающих участие в морфогенезе на данном этапе развития. Для лучшей визуализации некоторые гены были объединены в семейства с добавлением к аббревиатуре буквы “s”. Символьные обозначения генов соответствуют аббревиатурам рекомендованным: HGNC, VGNC, MGNC, NCBI и UniProt.

морфогенеза плакод находятся под контролем ряда факторов роста и транскрипционных факторов. Транскрипты генов семейства Wnt являются одними из самых ранних маркеров линии молочных желез [70]. Белки Wnt6, Wnt3a и Wnt10b регистрируются в эпидермисе и могут взаимодействовать с Fgf10, Tbx3, Vmp2, Vmp4 и Nrg3 [71, 72].

Экспрессия гена транскрипционного фактора *Tbx3* наблюдается в мезенхиме молочной железы, а в дальнейшем и в самих плакодах, и поддерживается участниками сигнальных путей FGF (через *FGFR1b*, *FGFR2c* и *FGF10*) и Wnt [73]. Взаимная регуляция дорсально экспрессирующегося *Tbx3* и детектируемого более вентрально *Vmp4* играет роль в позиционировании линии молочных желез [74, 75]. В то же время ретиноевая кислота способствует экспрессии *Tbx3*, а усиление ее сигнала ингибирует экспрессию фактора роста *Vmp4* и подавляет передачу сигналов Wnt. Ген *Raldh2*, который кодирует фермент, катализирующий синтез ретиноевой кислоты, и ген *Rarb*, кодирующий рецептор ретиноевой кислоты, участвующий в передаче сигнала, являются важными участниками этого каскада [76]. *Hoxc8* (транскрипционный фактор) положительно регулирует экспрессию *Tbx3*, *Fgf10* и передачу сигналов Wnt/ β -catenin

[72]. Член семейства эпидермальных факторов роста — фактор роста Neuregulin-3 (Nrg3) также играет роль в инициации плакод молочных желез, способствуя распространению сигнала FGF10 [74, 77]. Nrg3 связывает и активирует рецепторную тирозинкиназу ErbB4, регулирующую пролиферацию и дифференцировку клеток [74]. На активность *Fgf10* также влияет Gli3, фактор транскрипции, опосредующий каноническую передачу сигналов Hedgehog [78]. Полногеномный поиск ассоциаций по признаку наличия или отсутствия дополнительных сосков у коров выявил два пика на 17-й хромосоме в области генов *TBX3* и *TBX5*, что подчеркивает их важную роль в процессах формирования молочной железы [79]. Также для образования плакод необходим транскрипционный фактор из семейства белков, содержащих домен “цинковый палец”, Gata-3 [80].

С началом формирования плагоды молочных желез эпителиальные клетки начинают секретировать белок, родственной паратиреоидному гормону PTHrP (ген *Pthlh*) [81]. Ген его рецептора, *Pth1r*, экспрессируется в незрелых клетках мезенхимы, окружающей инвагинирующую почку молочной железы. Действуя на свой рецептор, PTHrP стимулирует мезодерму к формированию

мезенхимы молочной железы [82]. Мезенхима молочных желез состоит из трех–пяти концентрических слоев фибробластов, радиально уплотняющихся вокруг эпителиального зачатка. Взаимодействие между мезенхимой и эпителиальными клетками молочных желез способствует последующему удлинению зачатка и образованию отростка молочных желез [82]. Таким образом, РТНгР способствует разрастанию протоков и морфогенезу соска [83]. По мере роста протоков мезенхимальные клетки дифференцируются в связанную с соском строму.

Путь Wnt играет важную роль в развитии молочной железы, участвуя в дифференцировке, пролиферации и выживании клеток [71]. Канонический Wnt/ β -catenin путь активируется в конденсирующейся мезенхиме в период формирования зародышевых зачатков молочных желез. Один из возможных механизмов активации этого пути проходит через молекулы Rspo1 и Wnt11 и регулируется действием РТНгР [81]. Сигнал Wnt способствует стабилизации и накоплению цитоплазматического β -catenin, который перемещается в ядро, где взаимодействует с транскрипционными факторами Lef1 и Tcfs, регулируя экспрессию генов-мишеней Wnt [84]. Lef1 участвует в передаче сигналов Wnt от мезенхимных клеток к эпителиальным [85]. Сигнал модулируется посредством связывания белков Wnt с рецепторами семейств Frizzled и корецепторами семейства Lrp [81]. Lrp5 необходим для поддержания активности протоковых стволовых клеток [86]. Lrp4, связываясь с семейством белков Wise (ген *Sostdc1*), также участвует в регуляции передачи сигналов Wnt/ β -catenin [87]. Wise способен блокировать активность белков Wnt [88] и конкурировать с ними за связывание, например, с LRP6, экспрессия которого наблюдается и в базальном, и в просветном эпителии молочных желез. Также Wise может выступать в качестве ингибитора пути BMP [89]. Регулируя процесс развития молочной железы, описанный ранее, ген *SOSTDC1* влияет на молочную продуктивность коров и по данным работы Гургула и соавт. находится под влиянием отбора у аборигенной породы польского красного рогатого скота [90]. В качестве Wnt-ингибиторов выступают антагонисты dickkopf (Dkk) и kremen (Krm), препятствующие сборке комплексов лиганд–рецептор [81, 91, 92]. Связывание Dkk1 с Lrp6 блокирует передачу сигнала, предотвращая образование комплекса Wnt–Fz [92]. У млекопитающих присутствует множество различных белков Wnt и их рецепторов Frizzled (Fzd). Все они обеспечивают обширную сеть передачи сигналов, которая усиливается сигналами факторов роста [71].

Являясь одной из ключевых молекул стадии зачатка, РТНгР усиливает сигналы пути BMP между мезенхимой и эпителием молочных желез [82]. РТНгР активирует экспрессию BMPRIА в

мезенхиме, что повышает чувствительность этих клеток к BMP4. Передача сигналов BMP4 запускает разрастание эпителия и способствует началу экспрессии *Msx1* и *Msx2* [82, 93]. Важную роль в пролиферации клеток и разрастании протоков играют сигналы IGF и P190-B RhoGAP (ген *ARHGAP5*) [94]. Многие молекулы, участвующие в ранних этапах развития молочной железы, включая фактор транскрипции TBX, а также сигнальные пути Ectodysplasin/NF- κ B, РТНгР и BMP, необходимы и для морфогенеза ветвления [82].

Данные по экспрессии рецепторов некоторых гормонов в молочной железе плода крупного рогатого скота были отмечены в ряде работ. В частности, Кнабель и соавт. [95] фиксировали экспрессию рецептора гормона роста (Growth hormone receptor, GHR) с третьего по девятый месяц развития плода. Матричная РНК и белок GHR были выявлены в эпителии протоков, строме, эндотелиальных клетках сосудов и эпидермиса [95]. Индукция рецептора андрогенов (AR) является еще одним важным эффектом сигналов РТНгР, действующих на клетки мезенхимы молочной железы. Другим маркером мезенхимы молочной железы является рецептор эстрогена альфа 1. Некоторые авторы отмечают влияние материнских и плацентарных гормонов на развитие молочной железы эмбриона. В работе Сперони и соавт. [96] рассматривается влияние эстрогена на развитие молочных желез эмбриона мыши. Однако дефицит рецепторов гормонов не вызывает явного изменения в фенотипе молочной железы до полового созревания. На основании этих данных были сделаны выводы о том, что до полового созревания молочная железа самок развивается гормонально-независимым путем [97].

Эпигенетические факторы

Ядерный белок Pygo2, обнаруженный в эпителии плакод, зачатках молочных желез, а также в их мезенхимных клетках, участвует в регуляции популяции клеток-предшественников молочной железы. Связываясь с метилированным по лизину в 4-м положении гистонном H3 (H3K4me) и рекрутируя комплексы метилтрансферазы (HMT) данного гистона, Pygo2 способствует триметилированию H3K4me3. Таким образом, являясь фактором ремоделирования хроматина, Pygo2 контролирует экспрессию генов-мишеней пути Wnt/ β -catenin [98]. Авторы исследования, посвященного изучению сигнатур отбора среди популяций польского красного рогатого скота, обнаружили *PYGO2* среди генов, подвергшихся селекции по признаку молочной продуктивности [90].

Различные микроРНК, включая miR-206, входят в регуляторную сеть, ответственную за процесс образования мезенхимы молочных желез. Во время раннего развития молочных желез miR-206 детектируется в развивающейся мезенхиме мо-

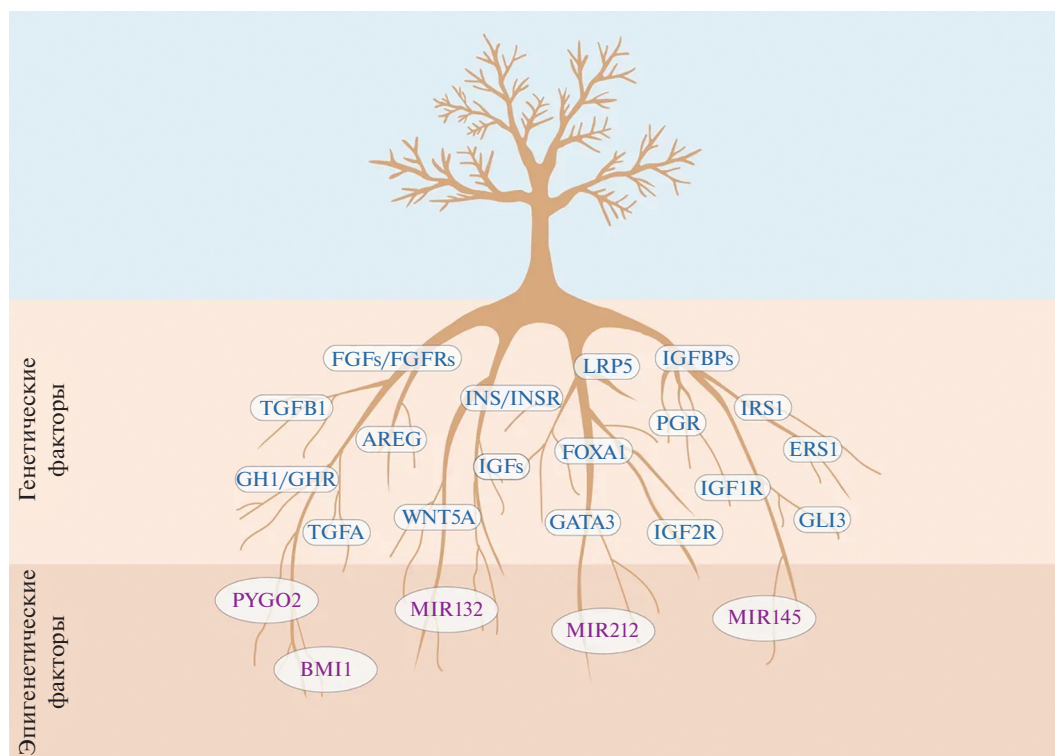


Рис. 2. Графическое представление пубертатного периода развития молочной железы крупного рогатого скота. Ветви дерева символизируют терминальные протоковые единицы (TDU).

лочных желез и жировой подушке. Сверхэкспрессия miR-206 влияет на экспрессию факторов роста Wnt и транскрипционных факторов *Tbx3* и *Lef1* [99]. МикроРНК miR-137 также участвует в эмбриональном маммогенезе. Сверхэкспрессия miR-137 способствует утолщению эпителия молочных желез [100].

Препубертатный, пубертатный и постпубертатный периоды

Развитие молочной железы крупного рогатого скота в препубертатный период (рис. 2) имеет важное значение для будущей продуктивности животного. На этом этапе происходит активный морфогенез. К 90-дневному возрасту масса паренхиматозной ткани увеличивается в десятки раз [68]. Факторы среды оказывают непосредственное влияние на процессы развития. Например, повышенное потребление питательных веществ в этом возрасте может оказывать негативное воздействие на развитие молочных желез, нарушая пролиферацию эпителиальных клеток. Некоторые авторы объясняют данный эффект снижением концентрации циркулирующего гормона роста [101]. Другие исследователи описывают изменения морфологии миоэпителиальных клеток, вызванные повышенной скоростью поступления питательных веществ [102]. Таким об-

разом, понимание роли различных стимулов, а также молекулярно-генетических основ развития молочной железы в раннем возрасте может стать ключом к раскрытию потенциала этого важнейшего органа [102].

Морфофизиологический аспект

У новорожденных телок паренхима молочной железы представлена рудиментарной сетью протоков, соединенных с небольшой цистернальной полостью, а жировая прослойка практически не пальпируется [9, 67].

В препубертатном периоде протоки молочных желез крупного рогатого скота имеют вид компактных древовидных структур, называемых терминальными протоковыми единицами (TDU) [103]. TDU представлены эпителиальными канатиками с 5–10 отходящими от них протоковыми выростами. Эпителиальные клетки канатика образуют базальный, средний и просветный слой. Клетки базального слоя прилегают к базальной мембране, клетки просветного контактируют с просветом протока. Средний слой расположен между базальным и просветным [103]. Слой базальных клеток, вероятнее всего, представлен недифференцированными клетками и предполагаемыми миоэпителиальными предшественниками [104]. Скоординированный рост, ветвление и рас-

ширение TDU, а также рост рыхлой соединительной ткани, окружающей их, способствуют удлинению протоков. Новые TDU образуются как выросты недавно сформированных протоков. Таким образом, постепенно формируется зрелая структура протоков [104].

Первые месяцы жизни железы растут примерно с той же скоростью, что и остальное тело, т.е. изометрически [105]. В это время наблюдается рост неэпителиальных тканей [69, 106]. В возрасте девять недель вес паренхимы молочной железы составляет примерно 2.5 г, а вес жировой подушки 80 г [107]. Примерно с трех месяцев рост становится аллометрическим, молочные железы начинают расти в 2–4 раза быстрее остальных частей тела, что связывают с постепенным созреванием яичников [21]. Происходит быстрый рост жировой подушки и растущих в нее протоков [69]. Такой темп сохраняется до наступления половой зрелости [108, 109]. Возраст достижения половой зрелости в среднем наблюдается в промежутке 6–9 мес., однако может широко варьировать у разных пород и зависит от факторов среды. Например, у телок крупных молочных пород половое созревание, как правило, наступает в возрасте 9–11 мес. при средней массе тела 250–280 кг [69]. Половое созревание у животных, обитающих в южных широтах, наступает раньше, чем в северных. Физиологическая зрелость достигается в возрасте 14–16 мес. Этот период считается наиболее подходящим для первого осеменения [110].

Гистологические срезы показали, что в период течки клетки молочной железы пролиферировали, просвет протоков был заполнен жидкостью и выстлан кубовидным эпителием. Однако часть вновь образованных клеток не наблюдалась во время последующих метэструса (2–4-й дни цикла) и диэструса (7–18-й дни цикла). В фазу диэструса просвет был выстлан столбчатыми клетками, не содержащими секрета и выглядел сморщенным [109]. Стоит отметить, что размер железы до зачатия составляет лишь часть того объема, которого железа достигает перед началом лактации [111].

Генетические факторы

Половое созревание инициирует морфогенез ветвления протоков молочной железы, удлинение которых происходит за счет роста и развития терминальных протоковых единиц (TDU) [9]. Этот процесс главным образом регулируется стероидными гормонами яичников, соматотропином, а также многочисленными факторами роста [105, 112]. Кроме этого, в литературе отмечена роль пролактина и стероидов надпочечников [113]. Строма и жировая ткань принимают непосредственное участие в пролиферации и дифференцировке эпителиальных клеток молочной железы, участвуя в пере-

даче гормональных сигналов и синтезируя факторы роста, обладающие митогенным действием [105].

У пубертатных и взрослых самок развитие молочных желез тесно связано с репродуктивными циклами. Средняя продолжительность цикла у телок 20 дней (18–22 дня), у коров 21 день (18–24 дня) [114]. Выделяют две основные фазы: фолликулярную (проэструс и эструс) и лютеиновую (метэструс и диэструс). Фолликулярная фаза характеризуется быстрым ростом фолликулов и последующей овуляцией. Растущие фолликулы вырабатывают эстрогены, необходимые для морфогенеза протоков молочных желез, а также для стимуляции выработки лютеинизирующего гормона [115]. Эти процессы вызывают высвобождение яйцеклетки, после чего начинается лютеиновая фаза, в течение которой происходит формирование, развитие и регресс желтого тела, секретирующего прогестерон [74]. Уровни последнего, по мнению некоторых авторов, положительно коррелируют с плотностью ткани, а также с апоптозом протоков [116]. Выделяют две основные формы рецептора эстрогена: ER α и ER β . ER α является преобладающей формой у телок препубертатного возраста [117]. Его экспрессия наблюдается в части эпителиальных клеток паренхимы молочной железы и примерно у трети фибробластов и адипоцитов жировой подушки [118]. В ряде работ отмечена связь морфогенеза протоков и рецептора эстрогена α [119]. Таким образом, гормоны яичников регулируют пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы, контролируя развитие ее паренхимы [105].

Процедура удаления яичников – овариэктомия долгое время оставалась одним из самых популярных способов демонстрации влияния половых гормонов на развитие молочных желез крупного рогатого скота и некоторых других domesticированных видов животных. В работе 1953 г. Уоллес одним из первых продемонстрировал эффект овариэктомии на развитие молочной железы коров в период полового созревания. Препубертатное удаление основного источника эстрадиола и прогестерона значительно влияло на маммогенез и влекло почти полное прекращение развития молочных желез [120]. В более поздних работах авторы получили похожий результат. В 1993 г. Пуруп и соавт. обнаружили, что у телок, прошедших процедуру овариэктомии до полового созревания, масса паренхимы была в 5 раз ниже, чем у интактных животных [121]. В статье 2003 г. Берри и соавт. продемонстрировали, что у самок крупного рогатого скота, подвергшихся овариэктомии в возрасте 2.5 мес., пролиферация клеток молочной железы в 10 раз ниже, чем у контрольной группы, и наблюдается сверхэкспрессия α -формы рецептора эстрадиола (ER α) [122]. Относительно недавно была выдвинута гипотеза, в которой эстроген рассматривает-

ся как негативный регулятор миоэпителиальной дифференцировки. Таким образом, в отсутствие эстрогена увеличенная популяция миоэпителиальных клеток может ограничивать пролиферацию эпителиальных клеток просвета [123].

В литературе также имеются данные, описывающие реакцию организма на введение различных гормонов после процедуры удаления яичников [67]. Так, введение комбинации эстрадиола и прогестерона способствовало нормальному развитию молочной железы [124], как и инъекция только эстрадиола, при этом инъекция одного лишь прогестерона не была эффективна [125]. 124 гена чувствительных к эстрогену были идентифицированы в клетках паренхимной ткани и жировой подушки препубертатной молочной железы крупного рогатого скота после соответствующей обработки эстрадиолом [126]. Положительный эффект на рост паренхимы молочной железы описан и при введении гормона роста [127], и при интрамармарной инфузии IGF-I [67, 128]. Большинство данных свидетельствуют о том, что многие эффекты соматотропина на молочную железу могут быть опосредованы инсулиноподобными факторами роста (IGF) [69, 129].

Роль пролактина как регулятора развития молочной железы у пубертатных самок крупного рогатого скота на данный момент остается не до конца изучена. Некоторые авторы демонстрируют связь положительного аллометрического роста молочной железы телок пубертатного возраста с высокими значениями пролактина [109]. В то же время другие исследователи отмечают отрицательную корреляцию между уровнями пролактина и скоростью роста железистой ткани в этот период [101].

Как было сказано ранее, регуляция развития молочных желез находится под контролем сложных взаимодействий гормонов и факторов роста. При этом существует баланс между регуляторами, ответственными за пролиферацию и ветвление, и регуляторами, ограничивающими и моделирующими эпителиальную сеть [106]. Члены семейств факторов роста IGF, EGF, а также FGF-1 рассматриваются как стимуляторы роста, тогда как FGF-2 и TGF- β 1 могут проявлять двойственный эффект [130].

Комплексная регуляция пути IGF играет важную роль в развитии молочных желез крупного рогатого скота [66]. Среди участников пути IGF можно выделить: три лиганда (IGF-I, IGF-II и INS) и их рецепторы (IGF-IR, IGF-IIR и IR), белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста (IGFBP 1–6) и их специфические протеазы [131]. Взаимодействие перечисленных молекул влияет на клеточную пролиферацию, миграцию и апоптоз [66]. Например, IGF1 способствует росту протоков [103]. IGFBP понижают активность IGF, препятствуя их связыванию с IGF-рецепто-

рами [130]. IGFBP также способны увеличивать IGF-активность, выступая в роли средств доставки к клеткам-мишеням [129]. Кроме этого, IGFBP могут проявлять IGF-независимую активность и разрушаться протеазами [66]. В некоторых работах продемонстрировано влияние гормонов на участниках пути IGF. В эксперименте по введению телкам эстрадиола последний увеличивал концентрацию IGF-1 как в паренхиме молочной железы, так и в жировой подушке и снижал количество IGFBP-3 в жировой подушке [132]. Повышенная экспрессия гена *IGF-I* сопровождалась увеличением пролиферации и значительным снижением экспрессии рецептора эстрогена α (ER α) в эпителиальных клетках молочной железы препубертатных телок [118].

Семейство эпидермальных факторов роста, в число которых входят EGF, TGF- α и AREG, участвует в пролиферации эпителиальных клеток молочной железы коров. Семейство трансформирующих факторов роста бета (TGF- β) также принимает участие в регуляции роста и развития молочных желез в период полового созревания [130]. Во время маммогенеза наблюдаются высокие уровни экспрессии TGF- α и TGF- β 1, что свидетельствует о значимой роли данных факторов роста в период пубертатного развития [133]. По данным исследований TGF- α стимулирует пролиферацию эпителиальных клеток молочных желез коров [133], в то время как TGF- β выступает в роли ингибитора развития протоков в период полового созревания [71]. Снижение экспрессии пролактина влечет за собой повышение содержания TGF- α [133]. Также показано, что IGF-связывающий белок (IGFBP)-3 может усиливать способность TGF- α стимулировать пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы крупного рогатого скота [134]. Высокие уровни концентрации TGF- β 1 замедляют митогенез, индуцированный факторами роста семейств EGF и IGF [130]. Также было показано, что для проявления ингибирующего действия TGF- β необходим Wnt5a. В отсутствие *Wnt5a* у мышей наблюдаются более крупные TEBs, рост инвазии протоков, усиление бокового ветвления. Таким образом, Wnt5a, действуя как негативный регулятор расширения и ветвления, может способствовать правильному формированию протокового дерева [71]. Другие участники Wnt-пути также принимают активное участие в регуляции развития молочных желез в период полового созревания. Например, снижение экспрессии *Lrp5* ведет к сокращению количества TEBs и замедлению проникновения протока через жировую подушку [71]. Еще один участник семейства эпидермальных факторов роста, AREG (амфигулин), является важным звеном в развитии молочных желез [103]. Амфигулин является лигандом EGFR. AREG выступает в качестве медиатора передачи сигналов эстрогена и также способствует разви-

тию протоков и образованию ТЕВ в молочных железах мышей [135].

По данным ряда исследований члены семейства факторов роста фибробластов FGF участвовали в изменении морфологических и функциональных свойств молочной железы крупного рогатого скота, проявляя различную митогенную активность. Так, FGF-1 выступал в качестве стимулятора, в то время как FGF-2 зависел от концентрации и в объеме 50 и 100 нг/мл играл роль ингибитора [130].

Транскрипционный фактор Gata-3, также необходимый для развития плакод на стадии эмбриогенеза, является важным регулятором развития молочной железы во время постнатального развития. Данная молекула выполняет роль регулятора пролиферации и дифференцировки клеток просвета [80]. В качестве мишени регуляторной сети GATA-3 выступает *FOXAI* [136].

Эпигенетические факторы

Эпигенетический сайленсер Bmi1 из группы поликомб белков (PcG), участвуя в пролиферации и дифференциации коммитированных клеток эпителия молочных желез, играет важную роль в постнатальном развитии молочных желез [137]. Экспрессия ранее описанного ядерного белка Puro2 наблюдается также и на этапе пубертатного развития молочных желез. Сигналы Puro2 регистрируются в некоторых кэп-клетках терминальных протоков молочных желез [98].

МикроРНК осуществляют посттранскрипционную регуляцию экспрессии своих генов-мишеней, являясь важным звеном молекулярных каскадов. МикроРНК bta-miR-145, действуя на IRS1, регулирует пролиферацию эпителиальных клеток молочной железы коров. Используя базу данных DAVID [138], группа исследователей обнаружила среди предполагаемых мишеней bta-miR-145 участников сигнального пути MAPK, в число которых входит IRS1. Было установлено, что сверхэкспрессия bta-miR-145 значительно снижала разрастание эпителия [139].

МикроРНК miR-212 и miR-132, экспрессирующиеся в строме молочных желез, по мнению авторов исследования [140] являются одними из основных регуляторов эпителиально-стромальных взаимодействий, необходимых для правильного пубертатного развития молочной железы у мыши. Данные молекулы контролируют разрастание эпителиальных протоков. Мишенью miR-212 и miR-132 является матриксная металлопротеиназа MMP-9. Металлопротеиназы обладают способностью разрушать коллаген. В отсутствие описанных микроРНК экспрессия MMP-9 увеличивается, что может препятствовать отложению коллагена и приводить к гиперактивации сигнального пути

TGF- β , тем самым нарушая отрастание протоков [140].

В работе, посвященной профилированию микроРНК в ткани молочной железы телок молочной и мясной пород, авторы исследования идентифицировали 54 дифференциально экспрессируемых микроРНК. Анализ генов-мишеней показал, что основные различия между экспрессией исследуемых микроРНК были связаны с активностью стволовых клеток молочных желез, а также с регуляцией сигнальных путей, TGF- β , инсулина и Wnt, играющих важную роль в развитии молочной железы. Полученные данные указывают на связь между специфическим паттерном микроРНК и высоким потенциалом развития молочной железы молочного скота [141].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Растущий спрос общества на продукцию сельскохозяйственных животных обуславливает необходимость постоянной модернизации селекционных программ. Повышение точности предсказания фенотипов хозяйственно значимых признаков является одной из главных задач отрасли. Особую актуальность приобретает разработка программ геномной селекции для отечественных пород крупного рогатого скота, учитывающих малую численность поголовья большинства местных пород. Рассмотренные в настоящем обзоре молекулярно-генетические механизмы развития и функционирования молочной железы крупного рогатого скота могут быть использованы в качестве априорной биологической информации для повышения точности геномной оценки племенной ценности.

Работа выполнена при поддержке Государственного задания. Номер регистрации темы "Оценка генетического потенциала национальных пород крупного рогатого скота" 122020800034-4.

Работа поддержана КНТП Минобрнауки РФ.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. FAO. 2021. Food Outlook – Biannual Report on Global Food Markets. Food Outlook, November 2021. Rome. <https://doi.org/10.4060/cb7491en>
2. FAO, 2010 г. Продовольственный прогноз. Отдел торговли и рынка FAO. Продовольственная и сельскохозяйственная Организация Объединен-

- ных Наций. Рим, Италия, 2010. <http://www.fao.org/3/a-ак349е.pdf>, по состоянию на 20 ноября 2021 г.
3. *Hayes B., Goddard M.* Genome-wide association and genomic selection in animal breeding // *Genome*. 2010. V. 53. № 11. P. 876–883. <https://doi.org/10.1139/G10-076>
 4. *Столповский Ю.А., Пискунов А.К., Свищева Г.Р.* Геномная селекция. I. Последние тенденции и возможные пути развития // *Генетика*. 2020. Т. 56. № 9. С. 1006–1017. <https://doi.org/10.31857/S0016675820090143>
 5. *De Roos A.P.W., Hayes B.J., Goddard M.E.* Reliability of genomic predictions across multiple populations // *Genetics*. 2009. V. 183. № 4. P. 1545–1553. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.104935>
 6. *Edwards S.M., Sørensen I.F., Sarup P. et al.* Genomic prediction for quantitative traits is improved by mapping variants to gene ontology categories in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2016. V. 203. № 4. P. 1871–1883. <https://doi.org/10.1534/genetics.116.187161>
 7. *Mollandin F., Gilbert H., Croiseau P., Rau A.* Accounting for overlapping annotations in genomic prediction models of complex traits // *Research Square*. 2022. February 22. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1366477/v1>
 8. *Strucken E.M., Laurenson Y.C.S.M., Brockmann G.A.* Go with the flow—biology and genetics of the lactation cycle // *Frontiers in Genet.* 2015. V. 6. P. 118. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00118>
 9. *Finot L., Chanut E., Dessauge F.* Bovine mammary gland development: New insights into the epithelial hierarchy // *BioRxiv*. 2018. P. 251637. <https://doi.org/10.1101/251637>
 10. *VanRaden P.M.* Symposium review: How to implement genomic selection // *J. Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 6. P. 5291–5301. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17684>
 11. *Ibeagha-Awemu E.M., Zhao X.* Epigenetic marks: Regulators of livestock phenotypes and conceivable sources of missing variation in livestock improvement programs // *Frontiers in Genet.* 2015. V. 6. P. 302. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00302>
 12. *Feinberg A.P., Irizarry R.A., Fradin D.* Personalized epigenomic signatures that are stable over time and covary with body mass index // *Sci. Transl. Med.* 2010. V. 2. № 49. P. 49–67. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001262>
 13. *Yang Z., Liu S., Hu Y. et al.* Comparative whole genome DNA methylation profiling of cattle tissues reveals global and tissue-specific methylation patterns // *BMC Biology*. 2020. V. 18. № 85. P. 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12915-020-00793-5>
 14. *Su J., Wang Y., Xing X. et al.* Genome-wide analysis of DNA methylation in bovine placentas // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. № 12. P. 1–11. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-12>
 15. *Park S., Min S., Choi H.S., Yoon S.* Deep recurrent neural network-based identification of precursor microRNAs // *Adv. Neural Inform. Proc. Systems*. 2017. V. 30. P. 1–10.
 16. *Liang M., Li Z., Chen T., Zeng J.* Integrative data analysis of multi-platform Cancer Data with a Multimodal Deep Learning Approach // *IEEE/ACM Transactions on Computational Biol. and Bioinformatics*. 2014. V. 12. № 4. P. 928–937. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2014.2377729>
 17. *Hilton I.B., D'Ippolito A.M., Vockley C.M. et al.* Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 5. P. 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>
 18. *Neville M.C., McFadden T.B., Forsyth I.* Hormonal regulation of mammary differentiation and milk secretion // *J. Mammary Gland Biol. and Neoplasia*. 2002. V. 7. № 1. P. 49–66. <https://doi.org/10.1023/A:1015770423167>
 19. *Monteiro F.L., Direito I., Helguero L.A.* Hormone signaling pathways in the postnatal mammary gland // *Tissue-Specific Cell Signaling*. Cham: Springer, 2020. P. 279–315. https://doi.org/10.1007/978-3-030-44436-5_10
 20. *VanHouten J., Dann P., McGeoch G. et al.* The calcium-sensing receptor regulates mammary gland parathyroid hormone-related protein production and calcium transport // *The J. Clin. Investigation*. 2004. V. 113. № 4. P. 598–608. <https://doi.org/10.1172/JCI18776>
 21. *Svennersten-Sjaunja K., Olsson K.* Endocrinology of milk production // *Domestic Animal Endocrinol.* 2005. V. 29. № 2. P. 241–258. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.03.006>
 22. *Scully K.M., Gleiberman A.S., Lindzey J. et al.* Role of estrogen receptor- α in the anterior pituitary gland // *Mol. Endocrinology*. 1997. V. 11. № 6. P. 674–681. <https://doi.org/10.1210/mend.11.6.0019>
 23. *Bachelot A., Binart N.* Reproductive role of prolactin // *Reproduction*. 2007. V. 133. № 2. P. 361–369. <https://doi.org/10.1530/REP-06-0299>
 24. *Frasor J., Gibori G.* Prolactin regulation of estrogen receptor expression // *Trends Endocrinology & Metabolism*. 2003. V. 14. № 3. P. 118–123. [https://doi.org/10.1016/S1043-2760\(03\)00030-4](https://doi.org/10.1016/S1043-2760(03)00030-4)
 25. *Banta J.A., Richards C.L.* Quantitative epigenetics and evolution // *Heredity*. 2018. V. 121. № 3. P. 210–224. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0114-x>
 26. *Holliday R., Pugh J.E.* DNA modification mechanisms and gene activity during development: Developmental clocks may depend on the enzymic modification of specific bases in repeated DNA sequences // *Science*. 1975. V. 187. № 4173. P. 226–232. <https://doi.org/10.1126/science.187.4173.226>
 27. *Chen C., Yang M.C.K., Yang T.P.* Evidence that silencing of the *HPRT* promoter by DNA methylation is mediated by critical CpG sites // *J. Biol. Chemistry*. 2001. V. 276. № 1. P. 320–328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007096200>
 28. *Laurent L., Wong E., Li G. et al.* Dynamic changes in the human methylome during differentiation // *Genome Research*. 2010. V. 20. № 3. P. 320–331. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.101907.109>
 29. *Ivanova E., Guillou S.L., Hue-Beauvais C., Provost F.L.* Epigenetics: New insights into mammary gland biology //

- Genes. 2021. V. 12. № 2. P. 231.
<https://doi.org/10.3390/genes12020231>
30. *Choi S.W., Friso S.* Epigenetics: A new bridge between nutrition and health // *Advances in Nutrition*. 2010. V. 1. № 1. P. 8–16.
<https://doi.org/10.3945/an.110.1004>
 31. *Jang H., Serra C.* Nutrition, epigenetics, and diseases // *Clin. Nutr. Res*. 2014. V. 3. № 1. P. 1–8.
<https://doi.org/10.7762/cnr.2014.3.1.1>
 32. *Halušková J., Holečková B., Staničová J.* DNA methylation studies in cattle // *J. Applied Genet*. 2021. V. 62. № 1. P. 121–136.
<https://doi.org/10.1007/s13353-020-00604-1>
 33. *Karlič R., Chung H.R., Lasserre J. et al.* Histone modification levels are predictive for gene expression // *PNAS*. 2010. V. 107. № 7. P. 2926–2931.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0909344107>
 34. *Shilatifard A.* Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression // *Annu. Rev. Biochem*. 2006. V. 75. P. 243–269.
<https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142422>
 35. *Sparmann A., van Lohuizen M.* Polycomb silencers control cell fate, development and cancer // *Nat. Reviews Cancer*. 2006. V. 6. № 11. P. 846–856.
<https://doi.org/10.1038/nrc1991>
 36. *Silva L.G., Ferguson B.S., Avila A.S., Faciola A.P.* Sodium propionate and sodium butyrate effects on histone deacetylase (HDAC) activity, histone acetylation, and inflammatory gene expression in bovine mammary epithelial cells // *J. Animal Sci*. 2018. V. 96. № 12. P. 5244–5252.
<https://doi.org/10.1093/jas/sky373>
 37. *Moran Y., Agron M., Praher D., Technau U.* The evolutionary origin of plant and animal microRNAs // *Nat. Ecol. Evol*. 2017. V. 1. № 0027. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s41559-016-002>
 38. *Do D.N., Ibeagha-Awemu E.M.* Non-coding RNA roles in ruminant mammary gland development and lactation // *Current Topics in Lactation*. 2017. V. 55.
<https://doi.org/10.5772/67194>
 39. *Silveri L., Tilly G., Vilotte J.L., Provost F.L.* MicroRNA involvement in mammary gland development and breast cancer // *Reproduction Nutrition Development*. 2006. V. 46. № 5. P. 549–556.
<https://doi.org/10.1051/rnd:2006026>
 40. *Wang X., Gu Z., Jiang H.* MicroRNAs in farm animals // *Animal*. 2013. V. 7. № 10. P. 1567–1575.
<https://doi.org/10.1017/S1751731113001183>
 41. *Filipowicz W., Bhattacharyya S.N., Sonenberg N.* Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? // *Nat. Reviews Genet*. 2008. V. 9. № 2. P. 102–114.
<https://doi.org/10.1038/nrg2290>
 42. *Bartel D.P.* MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function // *Cell*. 2004. V. 116. № 2. P. 281–297.
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
 43. *Jiao P., Yuan Y., Zhang M. et al.* PRL/microRNA-183/IRS1 pathway regulates milk fat metabolism in cow mammary epithelial cells // *Genes*. 2020. V. 11. № 2. P. 196.
<https://doi.org/10.3390/genes11020196>
 44. *Li H.M., Wang C.M., Li Q.Z., Li X.J.* MiR-15a decreases bovine mammary epithelial cell viability and lactation and regulates growth hormone receptor expression // *Molecules*. 2012. V. 17. № 10. P. 12037–12048.
<https://doi.org/10.3390/molecules171012037>
 45. *Sakamoto K., Komatsu T., Kobayashi T. et al.* Growth hormone acts on the synthesis and secretion of α -casein in bovine mammary epithelial cells // *J. Dairy Research*. 2005. V. 72. № 3. P. 264–270.
<https://doi.org/10.1017/S0022029905000889>
 46. *Bian Y., Lei Y., Wang C. et al.* Epigenetic regulation of miR-29s affects the lactation activity of dairy cow mammary epithelial cells // *J. Cellular Physiology*. 2015. V. 230. № 9. P. 2152–2163.
<https://doi.org/10.1002/jcp.24944>
 47. *Wang M., Moisés S., Khan M.J. et al.* MicroRNA expression patterns in the bovine mammary gland are affected by stage of lactation // *J. Dairy Sci*. 2012. V. 95. № 11. P. 6529–6535.
<https://doi.org/10.3168/jds.2012-5748>
 48. *Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S.* miRBase: from microRNA sequences to function // *Nucl. Acids Res*. 2019. V. 47. № D1. P. D155–D162.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
 49. *Dysin A.P., Barkova O.Y., Pozovnikova M.V.* The role of microRNAs in the mammary gland development, health, and function of cattle, goats, and sheep // *Non-Coding RNA*. 2021. V. 7. № 4. P. 78.
<https://doi.org/10.3390/nrna7040078>
 50. *Yang B., Jiao B., Ge W. et al.* Transcriptome sequencing to detect the potential role of long non-coding RNAs in bovine mammary gland during the dry and lactation period // *BMC Genomics*. 2018. V. 19. № 605. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s12864-018-4974-5>
 51. *Williams M.M., Vaught D.B., Joly M.M. et al.* ErbB3 drives mammary epithelial survival and differentiation during pregnancy and lactation // *Breast Cancer Res*. 2017. V. 19. № 105. P. 1–14.
<https://doi.org/10.1186/s13058-017-0893-7>
 52. *Qu S., Yang X., Li X. et al.* Circular RNA: A new star of noncoding RNAs // *Cancer Letters*. 2015. V. 365. № 2. P. 141–148.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.003>
 53. *Pamudurti N.R., Bartok O., Jens M. et al.* Translation of CircRNAs // *Mol. Cell*. 2017. V. 66. № 1. P. 9–21. E7.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.02.021>
 54. *Patop I.L., Wüst S., Kadener S.* Past, present, and future of circRNAs // *The EMBO J*. 2019. V. 38. № 16. P. e100836.
<https://doi.org/10.15252/embj.2018100836>
 55. *He T., Chen Q., Tian K. et al.* Functional role of circRNAs in the regulation of fetal development, muscle development, and lactation in livestock // *BioMed Research Int*. 2021. V. 2021.
<https://doi.org/10.1155/2021/5383210>
 56. *Liu J., Zhang M.L., Li D.W. et al.* Prolactin-responsive circular RNA circHIPK3 promotes proliferation of mammary epithelial cells from dairy cow // *Genes*.

2020. V. 11. № 3. P. 336.
<https://doi.org/10.3390/genes11030336>
57. *Chen Z., Liang Y., Lu Q.Y. et al.* Cadmium promotes apoptosis and inflammation via the circ08409/miR-133a/TGFB2 axis in bovine mammary epithelial cells and mouse mammary gland // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2021. V. 222. P. 112477.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112477>
58. *Bierne H., Hamon M., Cossart P.* Epigenetics and bacterial infections // *Cold Spring Harbor Perspectives in Med.* 2012. V. 2. № 12. P. a010272.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010272>
59. *Ganguli S., Chakraborty R.* Bacterial epigenetics opens door to novel frontier in Infection Biology // *The Nucleus*. 2021. V. 64. № 3. P. 383–399.
<https://doi.org/10.1007/s13237-021-00375-y>
60. *Grabiec A.M., Potempa J.* Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases // *Critical Rev. in Microbiology*. 2018. V. 44. № 3. P. 336–350.
<https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1373063>
61. *Zabek T., Semik-Gurgul E., Ropka-Molik K. et al.* Locus-specific interrelations between gene expression and DNA methylation patterns in bovine mammary gland infected by coagulase-positive and coagulase-negative staphylococci // *J. Dairy Sci.* 2020. V. 103. № 11. P. 10689–10695.
<https://doi.org/10.3168/jds.2020-18404>
62. *Han S., Li X., Liu J. et al.* Bta-miR-223 targeting CBLB contributes to resistance to *Staphylococcus aureus* mastitis through the PI3K/AKT/NF- κ B pathway // *Frontiers in Veterinary Sci.* 2020. P. 529.
<https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00529>
63. *Vanselow J., Yang W., Herrmann J. et al.* DNA-remethylation around a STAT5-binding enhancer in the α S1-casein promoter is associated with abrupt shutdown of α S1-casein synthesis during acute mastitis // *J. Mol. Endocrinology*. 2006. V. 37. № 3. P. 463–477.
<https://doi.org/10.1677/jme.1.02131>
64. *Jin W., Ibeagha-Awemu E.M., Liang G. et al.* Transcriptome microRNA profiling of bovine mammary epithelial cells challenged with *Escherichia coli* or *Staphylococcus aureus* bacteria reveals pathogen directed microRNA expression profiles // *BMC Genomics*. 2014. V. 15. № 181. P. 1–16.
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-181>
65. *Pispa J., Thesleff I.* Mechanisms of ectodermal organogenesis // *Developmental Biol.* 2003. V. 262. № 2. P. 195–205.
[https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00325-7](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00325-7)
66. *Ha W.T., Jeong H.Y., Lee S.Y., Song H.* Effects of the insulin-like growth factor pathway on the regulation of mammary gland development // *Development & Reproduction*. 2016. V. 20. № 3. P. 179–185.
<https://doi.org/10.12717/DR.2016.20.3.179>
67. *Rowson A.R., Daniels K.M., Ellis S.E., Hovey R.C.* Growth and development of the mammary glands of livestock: A veritable barnyard of opportunities // *Seminars in Cell & Developmental Biol. Acad. Press*. 2012. V. 23. № 5. P. 557–566.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2012.03.018>
68. *Capuco A.V., Akers R.M.* Management and environmental influences on mammary gland development and milk production // *Managing the Prenatal Environment to Enhance Livestock Productivity*. Dordrecht: Springer, 2009. P. 259–292.
https://doi.org/10.1007/978-90-481-3135-8_9
69. *Sejrsen K.* Relationships between nutrition, puberty and mammary development in cattle // *Proc. Nutrition Society*. 1994. V. 53. № 1. P. 103–111.
<https://doi.org/10.1079/PNS19940014>
70. *Veltmaat J.M., Veelen W.V., Thiery J.P., Bellusci S.* Identification of the mammary line in mouse by *Wnt10b* expression // *Developmental Dynamics: An Official Publ. Am. Association of Anatomists*. 2004. V. 229. № 2. P. 349–356.
<https://doi.org/10.1002/dvdy.10441>
71. *Boras-Granic K., Wyslomerski J.J.* Wnt signaling in breast organogenesis // *Organogenesis*. 2008. V. 4. № 2. P. 116–122.
<https://doi.org/10.4161/org.4.2.5858>
72. *Carroll L.S., Capocchi M.R.* Hoxc8 initiates an ectopic mammary program by regulating *Fgf10* and *Tbx3* expression and Wnt/ β -catenin signaling // *Development*. 2015. V. 142. № 23. P. 4056–4067.
<https://doi.org/10.1242/dev.128298>
73. *Eblaghie M.C., Song S.J., Kim J.Y. et al.* Interactions between FGF and Wnt signals and *Tbx3* gene expression in mammary gland initiation in mouse embryos // *J. Anatomy*. 2004. V. 205. № 1. P. 1–13.
<https://doi.org/10.1111/j.0021-8782.2004.00309.x>
74. *Slepicka P.F., Somasundara A.V.H., Dos Santos C.O.* The molecular basis of mammary gland development and epithelial differentiation // *Seminars in Cell & Developmental Biol. Acad. Press*. 2021. V. 114. P. 93–112.
<https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.09.014>
75. *Cho K.W., Kim J.Y., Song S.J. et al.* Molecular interactions between *Tbx3* and *Bmp4* and a model for dorsoventral positioning of mammary gland development // *PNAS*. 2006. V. 103. № 45. P. 16788–16793.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0604645103>
76. *Cho K.W., Kwon H.J., Shin J.O. et al.* Retinoic acid signaling and the initiation of mammary gland development // *Developmental Biol.* 2012. V. 365. № 1. P. 259–266.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.02.020>
77. *Kogata N., Oliemuller E., Wansbury O., Howard B.A.* *Neuregulin-3* regulates epithelial progenitor cell positioning and specifies mammary phenotype // *Stem Cells and Development*. 2014. V. 23. № 22. P. 2758–2770.
<https://doi.org/10.1089/scd.2014.0082>
78. *Lee M.Y., Sun L., Veltmaat J.M.* Hedgehog and gli signaling in embryonic mammary gland development // *J. Mammary Gland Biol. and Neoplasia*. 2013. V. 18. № 2. P. 133–138.
<https://doi.org/10.1007/s10911-013-9291-7>
79. *Kazemi H.* Mining the genome of livestock species to identify markers associated with economically relevant morphological traits and breed-specific features // *Diss. Thesis*. 2021. 125 p.
<https://doi.org/10.48676/unibo/amsdottorato/9688>
80. *Asselin-Labat M.L., Sutherland K.D., Barker H. et al.* Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation // *Nat. Cell Biol.* 2007. V. 9. № 2. P. 201–209.
<https://doi.org/10.1038/ncb1530>

81. *Hiremath M., Dann P., Fischer J. et al.* Parathyroid hormone-related protein activates Wnt signaling to specify the embryonic mammary mesenchyme // *Development*. 2012. V. 139. № 22. P. 4239–4249. <https://doi.org/10.1242/dev.080671>
82. *Tickle C., Jung H.S.* Embryonic Mammary Gland Development Ltd. Chichester: John Wiley & Sons, 2016. 10 p. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0026057>
83. *Hiremath M., Wysolmerski J.* Role of PTHrP in mammary gland development and breast cancer // *Clin. Rev. in Bone and Mineral Metabolism*. 2014. V. 12. № 3. P. 178–189. <https://doi.org/10.1007/s12018-014-9170-9>
84. *Denicol A.C., Dobbs K.B., McLean K.M. et al.* Canonical WNT signaling regulates development of bovine embryos to the blastocyst stage // *Sci. Reports*. 2013. V. 3. № 1266. P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep01266>
85. *Boras-Granic K., Chang H., Grosschedl R., Hamel P.A.* Lef1 is required for the transition of Wnt signaling from mesenchymal to epithelial cells in the mouse embryonic mammary gland // *Developmental Biol*. 2006. V. 295. № 1. P. 219–231. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.03.030>
86. *Lindvall C., Zylstra C.R., Evans N. et al.* The Wnt co-receptor Lrp6 is required for normal mouse mammary gland development // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 6. P. e5813. <https://doi.org/10.1371/J..pone.0005813>
87. *Ahn Y., Sims C., Logue J.M. et al.* Lrp4 and Wise interplay controls the formation and patterning of mammary and other skin appendage placodes by modulating Wnt signaling // *Development*. 2013. V. 140. № 3. P. 583–593. <https://doi.org/10.1242/dev.085118>
88. *Yanagita M., Oka M., Watabe T. et al.* USAG-1: A bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney // *Biochem. Biophys. Res. Communications*. 2004. V. 316. № 2. P. 490–500. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.02.075>
89. *Itasaki N., Hoppler S.* Crosstalk between Wnt and bone morphogenetic protein signaling: A turbulent relationship // *Dev. Dynamics: An Official Publ. Am. Association Anatomists*. 2010. V. 239. № 1. P. 16–33. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22009>
90. *Gurgul A., Jasielczuk I., Semik-Gurgul E. et al.* Diverifying selection signatures among divergently selected subpopulations of Polish Red cattle // *J. Applied Genet*. 2019. V. 60. № 1. P. 87–95. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00484-0>
91. *Gordon M.D., Nusse R.* Wnt signaling: Multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors // *J. Biol. Chem*. 2006. V. 281. № 32. P. 22429–22433. <https://doi.org/10.1074/jbc.R600015200>
92. *Niehrs C.* Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators // *Oncogene*. 2006. V. 25. № 57. P. 7469–7481. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210054>
93. *Hens J., Dann P., Hiremath M. et al.* Analysis of gene expression in PTHrP–/– mammary buds supports a role for BMP signaling and MMP2 in the initiation of ductal morphogenesis // *Dev. Dynamics: An Official Publ. Am. Association Anatomists*. 2009. V. 238. № 11. P. 2713–2724. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22097>
94. *Heckman B.M., Chakravarty G., Vargo-Gogola T. et al.* Crosstalk between the p190-B RhoGAP and IGF signaling pathways is required for embryonic mammary bud development // *Developmental Biol*. 2007. V. 309. № 1. P. 137–149. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.07.002>
95. *Knabel M., Kölle S., Sinowatz F.* Expression of growth hormone receptor in the bovine mammary gland during prenatal development // *Anatomy and Embryology*. 1998. V. 198. № 2. P. 163–169. <https://doi.org/10.1007/s004290050174>
96. *Speroni L., Voutilainen M., Mikkola M.L. et al.* New insights into fetal mammary gland morphogenesis: differential effects of natural and environmental estrogens // *Sci. Rep*. 2017. V. 7. № 40806. P. 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep40806>
97. *Briskin C., O'Malley B.* Hormone action in the mammary gland // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biol*. 2010. V. 2. № 12. P. a003178. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003178>
98. *Gu B., Sun P., Yuan Y. et al.* Pygo2 expands mammary progenitor cells by facilitating histone H3 K4 methylation // *J. Cell Biol*. 2009. V. 185. № 5. P. 811–826. <https://doi.org/10.1083/jcb.200810133>
99. *Lee M.J., Yoon K.S., Cho K.W. et al.* Expression of miR-206 during the initiation of mammary gland development // *Cell and Tissue Res*. 2013. V. 353. № 3. P. 425–433. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1653-3>
100. *Lee J.M., Cho K.W., Kim E.J. et al.* A contrasting function for miR-137 in embryonic mammaryogenesis and adult breast carcinogenesis // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 26. P. 22048–22059. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4218>
101. *Sejrsen K., Huber J.T., Tucker H.A.* Influence of amount fed on hormone concentrations and their relationship to mammary growth in heifers // *J. Dairy Sci*. 1983. V. 66. № 4. P. 845–855. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81866-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81866-9)
102. *Geiger A.J.* The pre-pubertal bovine mammary gland: unlocking the potential of the future herd // *Animal*. 2019. V. 13. № S1. P. s4–s10. <https://doi.org/10.1017/S1751731119001204>
103. *Choudhary R.K.* Identification and Characterization of Presumptive Bovine Mammary Stem Cells. College Park, Univ. Maryland, 2011. 112 p.
104. *Capuco A.V., Ellis S.* Bovine mammary progenitor cells: Current concepts and future directions // *J. Mammary Gland Biol. and Neoplasia*. 2005. V. 10. № 1. P. 5–15. <https://doi.org/10.1007/s10911-005-2536-3>
105. *Yart L., Lollivier V., Marnet P.G., Dessauge F.* Role of ovarian secretions in mammary gland development and function in ruminants // *Animal*. 2014. V. 8. № 1. P. 72–85. <https://doi.org/10.1017/S1751731113001638>

106. *McNally S., Martin F.* Molecular regulators of pubertal mammary gland development // *Annals Med.* 2011. V. 43. № 3. P. 212–234.
<https://doi.org/10.3109/07853890.2011.554425>
107. *Daniels K.M., Capuco A.V., McGilliard M.L. et al.* Effects of milk replacer formulation on measures of mammary growth and composition in Holstein heifers // *J. Dairy Sci.* 2009. V. 92. № 12. P. 5937–5950.
<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1959>
108. *Hovey R.C., Trott J.F., Vonderhaar B.K.* Establishing a framework for the functional mammary gland: From endocrinology to morphology // *J. Mammary Gland Biol. and Neoplasia.* 2002. V. 7. № 1. P. 17–38.
<https://doi.org/10.1023/A:1015766322258>
109. *Sinha Y.N., Tucker H.A.* Mammary development and pituitary prolactin level of heifers from Birth through puberty and during the estrous cycle // *J. Dairy Sci.* 1969. V. 52. № 4. P. 507–512.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(69\)86595-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(69)86595-1)
110. *Костомахин Н., Самойленко Т.* Зависимость молочной продуктивности коров от их возраста и живой массы при первом осеменении // *Корма и кормление.* 2008. № 11. С. 15–18.
111. *Akers R.M.* Lactation and the Mammary Gland // *Protoplasma.* 2016. V. 159. P. 96–111.
<https://doi.org/10.1002/9781119264880>
112. *Howlin J., McBryan J., Martin F.* Pubertal mammary gland development: Insights from mouse models // *J. Mammary Gland Biol. and Neoplasia.* 2006. V. 11. № 3. P. 283–297.
<https://doi.org/10.1007/s10911-006-9024-2>
113. *Dahl G.E.* Physiology of lactation in dairy cattle—challenges to sustainable production // *Animal Agriculture.* Acad. Press, 2020. P. 121–129.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817052-6.00007-0>
114. *Кузьмич Р.Г., Рубанец Л.Н., Гарбузов А.А. Юшковский Е.А.* Болезни яичников и яйцеводов у коров // *Уч.-мет. пособие для студентов ф-та ветер. мед. и слушателей ФПК и ПК.* Витебск, 2017. 56 с.
115. *Mallepell S., Krust A., Chambon P., Briskin C.* Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor α is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland // *PNAS.* 2006. V. 103. № 7. P. 2196–2201.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0510974103>
116. *Fata J.E., Chaudhary V., Khokha R.* Cellular turnover in the mammary gland is correlated with systemic levels of progesterone and Not 17 β -Estradiol during the estrous cycle // *Biol. Reproduction.* 2001. V. 65. № 3. P. 680–688.
<https://doi.org/10.1095/biolreprod65.3.680>
117. *Capuco A.V., Ellis S., Wood D.L. et al.* Postnatal mammary ductal growth: three-dimensional imaging of cell proliferation, effects of estrogen treatment, and expression of steroid receptors in prepubertal calves // *Tissue and Cell.* 2002. V. 34. № 3. P. 143–154.
[https://doi.org/10.1016/S0040-8166\(02\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0040-8166(02)00024-1)
118. *Meyer M.J., Capuco A.V., Boisclair Y.R., Van Amburgh M.E.* Estrogen-dependent responses of the mammary fat pad in prepubertal dairy heifers // *J. Endocrinology.* 2006. V. 190. № 3. P. 819–827.
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06883>
119. *Connor E.E., Wood D.L., Sonstegard T.S. et al.* Chromosomal mapping and quantitative analysis of estrogen-related receptor alpha-1, estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptor in the bovine mammary gland // *J. Endocrinology.* 2005. V. 185. № 3. P. 593–603.
<https://doi.org/10.1677/joe.1.06139>
120. *Wallace C.* Observations on mammary development in calves and lambs // *The J. Agricultural Sci.* 1953. V. 43. № 4. P. 413–421.
<https://doi.org/10.1017/S0021859600057890>
121. *Purup S., Sejrnsen K., Foldager J., Akers R.M.* Effect of exogenous bovine growth hormone and ovariectomy on prepubertal mammary growth, serum hormones and acute *in vitro* proliferative response of mammary explants from Holstein heifers // *J. Endocrinology.* 1993. V. 139. № 1. P. 19–26.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1390019>
122. *Berry S.D.K., Jobst P.M., Ellis S.E. et al.* Mammary epithelial proliferation and estrogen receptor α expression in prepubertal heifers: Effects of ovariectomy and growth hormone // *J. Dairy Sci.* 2003. V. 86. № 6. P. 2098–2105.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)73799-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)73799-0)
123. *Ballagh S.D.K., Jobst P.M., Ellis S.E. et al.* Hot topic: Prepubertal ovariectomy alters the development of myoepithelial cells in the bovine mammary gland // *J. Dairy Sci.* 2008. V. 91. № 8. P. 2992–2995.
<https://doi.org/10.3168/jds.2008-1191>
124. *Sud S.C., Tucker H.A., Meites J.* Estrogen-progesterone requirements for udder development in ovariectomized heifers // *J. Dairy Sci.* 1968. V. 51. № 2. P. 210–214.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(68\)86954-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(68)86954-1)
125. *Woodward T.L., Beal W.E., Akers R.M.* Cell interactions in initiation of mammary epithelial proliferation by oestradion and progesterone in prepubertal heifers // *J. Endocrinology.* 1993. V. 136. № 1. P. 149–157.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1360149>
126. *Li R.W., Meyer M.J., Van Tassell C.P. et al.* Identification of estrogen-responsive genes in the parenchyma and fat pad of the bovine mammary gland by microarray analysis // *Physiol. Genomics.* 2006. V. 27. № 1. P. 42–53.
<https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00032.2006>
127. *Purup S., Sejrnsen K., Akers R.M.* Effect of bovine GH and ovariectomy on mammary tissue sensitivity to IGF-I in prepubertal heifers // *J. Endocrinology.* 1995. V. 144. № 1. P. 153–158.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1440153>
128. *Silva L.F.P., Liesman J.S., Etchebarne B.E. et al.* Intramammary infusion of IGF-I increases bromodeoxyuridine labeling in mammary epithelial cells of prepubertal heifers // *J. Dairy Sci.* 2005. V. 88. № 8. P. 2771–2773.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)72956-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)72956-8)
129. *Greenwood P.L., Bell A.W., Vercoe P.E., Viljoen G.J.* Managing the Prenatal Environment to Enhance Livestock Productivity. Netherlands: Springer, 2010. № 636.0824 GREM.
<https://doi.org/10.1007/978-90-481-3135-8>
130. *Purup S., Vestergaard M., Sejrnsen K.* Involvement of growth factors in the regulation of pubertal mammary growth in cattle // *Biol. Mammary Gland.* 2002.

- V. 480. P. 27–43.
https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_4
131. *Roith D.L.* The insulin-like growth factor system // *Exp. Diabetes Research*. 2003. V. 4. № 4. P. 205–212.
<https://doi.org/10.1155/EDR.2003.205>
132. *Berry S.D., McFadden T.B., Pearson R.E., Akers R.M.* A local increase in the mammary IGF-1: IGFBP-3 ratio mediates the mammogenic effects of estrogen and growth hormone // *Domestic Animal Endocrinol.* 2001. V. 21. № 1. P. 39–53.
[https://doi.org/10.1016/S0739-7240\(01\)00101-1](https://doi.org/10.1016/S0739-7240(01)00101-1)
133. *Plath A., Einspanier R., Peters F. et al.* Expression of transforming growth factors alpha and beta-1 messenger RNA in the bovine mammary gland during different stages of development and lactation // *J. Endocrinology*. 1997. V. 155. P. 501–511.
<https://doi.org/10.1677/joe.0.1550501>
134. *Sivaprasad U., Fleming J., Verma P.S. et al.* Stimulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 synthesis by IGF-I and transforming growth factor- α is mediated by both phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in mammary epithelial cells // *Endocrinology*. 2004. V. 145. № 9. P. 4213–4221.
<https://doi.org/10.1210/en.2003-1377>
135. *Booth B.W., Boulanger C.A., Anderson L.H. et al.* Amphiregulin mediates self-renewal in an immortal mammary epithelial cell line with stem cell characteristics // *Exp. Cell Res.* 2010. V. 316. № 3. P. 422–432.
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.11.006>
136. *Kouros-Mehr H., Slorach E.M., Sternlicht M.D., Werb Z.* GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland // *Cell*. 2006. V. 127. № 5. P. 1041–1055.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.048>
137. *Pietersen A.M., Evers B., Prasad A.A. et al.* Bmi1 regulates stem cells and proliferation and differentiation of committed cells in mammary epithelium // *Current Biol.* 2008. V. 18. № 14. P. 1094–1099.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.06.070>
138. *Huang D.W., Sherman B.T., Tan Q. et al.* DAVID Bioinformatics resources: Expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists // *Nucl. Acids. Res.* 2007. V. 35. Suppl. 2. P. W169–W175.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkm415>
139. *Li W., Li C., Lu J., Zhao W.* MiR-145 is involved in the proliferation of bovine mammary epithelial cells and regulates bovine insulin receptor substrate 1 // *Italian J. Animal Sci.* 2020. V. 19. № 1. P. 536–543.
<https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1732234>
140. *Ucar A., Vafaizadeh V., Jarry H. et al.* miR-212 and miR-132 are required for epithelial stromal interactions necessary for mouse mammary gland development // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 12. P. 1101–1108.
<https://doi.org/10.1038/ng.709>
141. *Wicik Z., Gajewska M., Majewska A. et al.* Characterization of microRNA profile in mammary tissue of dairy and beef breed heifers // *J. Animal Breeding and Genet.* 2016. V. 133. № 1. P. 31–42.
<https://doi.org/10.1111/jbg.12172>

Molecular-Genetic Bases of Mammary Gland Development on the Example of Cattle and Other Animal Species. I. Embryonic and Pubertal Developmental Stage

E. V. Solodneva^{a, *}, S. B. Kuznetsov^a, A. E. Velieva^b, and Yu. A. Stolpovsky^a

^a*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^b*University of Pennsylvania, School of Engineering and Applied Sciences, Philadelphia, PA, 19104 USA*

*e-mail: eugenia.575.2012@yandex.ru

The growing demand of society for the products of farm animals necessitates the constant modernization of breeding programs. In order to improve the accuracy of genomic assessment of breeding value, models that allow taking into account information on the contribution of specific polymorphic loci to the formation of economically useful traits of interest have been recently used. Taking into account the functional role of the genes responsible for the formation of the mammary gland is important to improve the reliability of the prognosis of milk production. This review describes the molecular genetic basis for the development of the mammary gland at the embryonic, prepubertal and pubertal stages of development using the example of cattle and some other mammals. Particular attention is paid to epigenetic regulation. Data on genetics, morphophysiology, endocrinology and the influence of microorganisms at different stages of mammary gland development are presented.

Keywords: cattle, mammary gland, genomic selection, epigenetic regulation, morphogenesis, local breeds.

УДК 636.01;599.735.31;575

НОВЫЕ СОЧЕТАНИЯ АЛЛЕЛЕЙ В ВАРИАНТАХ ГЕНОВ КАЗЕИНОВОГО КЛАСТЕРА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И РЕВИЗИЯ ИХ НОМЕНКЛАТУРЫ

© 2022 г. С. Б. Кузнецов¹*, Е. В. Солоднева¹, М. Т. Семина¹, С. В. Бекетов¹,
И. С. Турбина², Ю. А. Столповский¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²АО «Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных»,
Московская область, г. Подольск, п. Быково, 142143 Россия

*e-mail: sergei_kuznetsov@yahoo.com

Поступила в редакцию 01.03.2022 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

Проведен детальный анализ геномов крупного рогатого скота по четырем генам казеинового кластера, находящегося на шестой хромосоме крупного рогатого скота: *CSN1S1* – альфа-казеин S1, *CSN1S2* – альфа-казеин S2, *CSN2* – бета-казеин и *CSN3* – каппа-казеин. Исследованы генотипы 49 быков-производителей костромской, голштино-фризской пород и межпородных гибридов зебу с черно-пестрым скотом. Анализ проведен с помощью метода ПЦР в реальном времени, что позволило генотипировать образцы ДНК с предельной точностью. В процессе разработки праймеров была уточнена номенклатура всех четырех генов, которая приведена к единому принципу обозначения позиций аминокислот в белках, кодируемых вышеуказанными генами. Обнаружены новые сочетания маркеров (SNP) в общепризнанных аллелях у генов казеинов. Из всех исследованных животных нет ни одного, чей генотип полностью бы соответствовал гомозиготному или гетерозиготному вариантам общепринятой номенклатуры. В обнаруженных генотипах сочетаются аллели из более чем двух вариантов. Таким образом, данные генотипы невозможно описать как гомо- или гетерозиготные по выявленным аллельным вариантам. Обнаруженное явление вероятно не является уникальным, так как, как правило, при рутинном анализе генов казеинов тестируются несколько аллельных вариантов, связанных с сыропригодностью молока, и не учитывается в полном объеме имеющийся полиморфизм казеинового кластера, показанный в данном исследовании.

Ключевые слова: гены казеинового кластера, крупный рогатый скот, ПЦР в реальном времени, SNP.

DOI: 10.31857/S0016675822080057

Более 95% всех белков коровьего молока кодируются шестью высоко полиморфными генами, для которых описаны несинонимичные и синонимичные мутации, формирующие в итоге до 50 идентифицируемых вариантов белков. Эти варианты были использованы для генетико-селекционного анализа более 40 лет назад, что привело к выявлению кластера казеиновых генов, расположенного на шестой хромосоме крупного рогатого скота [1, 2]. Этот кластер, который называют CN-локус, состоит из четырех генов: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* и *CSN3*, кодирующих казеины коровьего молока: α 1-CN, β -CN, α 2-CN и κ -CN соответственно [3]. Среди жвачных животных гены молочных казеинов и их изменчивость наиболее тщательно изучены у крупного рогатого скота и коз. Важным фактом широкого генетического разнообразия является то, что различные вариан-

ты казеинов влияют на состав молока и его сыродельные свойства [3–5].

Исследования генетической изменчивости молочных белков начались более 50 лет назад после обнаружения основных вариантов белка бета-лактоглобулина (β -LG) крупного рогатого скота и продолжились в последующие годы после открытия полиморфизма в других молочных белках. В процессе накопления данных обнаружены и различия между одомашненными видами рода *Bos* и породами крупного рогатого скота [6]. Выявленные генетические варианты являются следствием однонуклеотидных замен (SNP), а также инсерций и делеций различной протяженности. В 2004 г. был сделан обзор полиморфизма молочных белков, где была предложена номенклатура мутаций в генах [7]. Для рода *Bos* в ней перечислены восемь аллелей α 1-CN (A, B, C, D, E, F, G,

Н), четыре аллеля α s2-CN (A, B, C, D), 12 аллелей β -CN (A1, A2, A3, B, C, D, E, F, G, H1, H2, I), 11 аллелей κ -CN (A, B, C, E, F1, F2, G1, G2, H, I, J), 11 аллелей β -LG (A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, W). Номенклатура унифицирована для четырех видов рода *Bos*, т.е. *Bos taurus* (домашняя корова), *Bos indicus* (зебу), *Bos grunniens* (як) и *Bos javanicus* (бантенг Бали). В данном обзоре рассматривается полиморфизм белков, а именно мутации в генах, изменяющие аминокислотные последовательности кодируемого белка. Однако в эти номенклатуры включены и некоторые мутации, которые не изменяют аминокислотную последовательность белков. В последующем номенклатуры, предложенные в обзоре, дополнялись и изменялись из-за открытия новых генетических вариантов в генах, кодирующих молочные белки. Так, в обзоре 2009 г. упоминаются девять аллельных вариантов для *CSN1S1* и 14 аллелей для *CSN3* [8]. Необходимо напомнить, что за каждым аллельным вариантом белка скрывается комбинация из однонуклеотидных замен или инсерций/делеций в кодирующей части гена этого белка. В гене *CSN3* описаны как значимые 14 однонуклеотидных замен, так и различные комбинации этих мутаций, которые составляют упомянутые 14 аллелей белка κ -казеина. Для гена *CSN1S2* описаны 10 мутаций, которые в различных сочетаниях определяют 12 аллельных вариантов белка β -казеина. Для остальных белков молока ситуация аналогична. Следует сказать, что большинство аллельных вариантов белков были описаны достаточно давно, и ученые, описавшие их, пользовались методами белкового анализа: электрофорез в крахмальном или полиакриламидном гелях, изоэлектрофокусирование, хроматография [9, 10]. Безусловно, методы анализа ДНК придали новый импульс исследованиям полиморфизма белков коровьего молока, что позволяет идентифицировать известные варианты белка на уровне генома различными методами, такими как ПЦР-ПДРФ для *CSN3* [11–13], непосредственное секвенирование *CSN3* [14], аллель-специфичная ПЦР для *CSN2* [15] и *CSN1S1* [16] и одноцепочечный ПЦР-конформационный полиморфизм *CSN2* [17]. Полиморфизм молочных белков, в частности казеинов, может предоставить полезную информацию для идентификации особи в официальной системе учета молока путем индивидуального молока с помощью IEF — изоэлектрофокусирования [18]. Эти мутации также можно использовать как генетические маркеры для установления проверки отцовства. Для последнего применимы методы высокопроизводительного анализа, один из которых ДНК-микрочиповая технология, которая может привести к широкомасштабному генотипированию животных по всем мутациям (SNP) в генах молочных белков [19].

Один из самых значимых эффектов полиморфизма молочных белков, связанных с экономиче-

ским интересом, — это его связь с сыродельными свойствами молока, этот эффект в основном исследовался на крупном рогатом скоте [5]. Исследования в основном сконцентрировались на влиянии вариантов каппа-казеина (κ -CN) на реологические свойства молока. Каппа-казеин располагает преимущественно на поверхности белковых мицелл в свежем молоке и является специфическим субстратом химозина (основного фермента сычужного комплекса ферментов), гидролитическая активность которого расщепляет κ -CN на нерастворимый пара- κ -CN (аминокислоты 1–105) и растворимый казеиномакропептид (CMP) — аминокислоты 106–171. Это важный процесс для производства сыра, а также для питания телят [20]. Хорошо известно, что молоко с аллельным вариантом *CSN3-B* быстрее реагирует с сычужным ферментом и время коагуляции молока значительно короче, чем у молока с вариантом *CSN3-A*, тогда как молоко от гетерозиготных коров *CSN3-AB* показывает промежуточное время коагуляции [21]. Различия в стабильности мицелл, которые возникают между двумя генетическими вариантами *CSN3-A* и *CSN3-B*, строго связаны с размером мицелл и степени гликозилирования самого белка [5]. Однако менее распространенные аллели *CSN3* также могут влиять на реологические свойства молока. Постоянный мониторинг вариаций молочного белка у разных пород крупного рогатого скота — важная практика в молочном животноводстве, направленная на то, чтобы избежать увеличения частоты аллельных вариантов с неблагоприятным влиянием на сыродельческие свойства молока. Хотя каппа-казеин является основным белком, определяющим сыропригодность молока, варианты бета-казеина *CSN2-B* и лактоглобулина *LGB-B* оказались также более благоприятными для сычужного фермента, коагуляции и сыропригодности молока [5]. Поэтому составные генотипы молочных казеинов CN [22, 23] также считаются важными в этом смысле из-за тесной генетической связи между генами, кодирующими все молочные казеины. Например, для времени свертывания и плотности сгустка лучшими составными генотипами *CSN2–CSN3* являются те, у которых есть хотя бы один аллель В в обоих локусах [23]. В обзоре [24] описаны варианты альфа-казеина *CSN1S1*, которые также оказывают влияние на реологические свойства молока, увеличение плотности сгустка при производстве сыра и увеличение общего количества этого белка в молоке.

В 2009 г. Нильсен с соавт. создали карту SNP высокого разрешения казеинового кластера крупного рогатого скота для изучения ассоциаций гаплотипов с качественными характеристиками молока у красной норвежской породы КРС и предложили разделить кластер казеинов на два блока гаплотипов, один из которых состоит из *CSN1S1*, *CSN2* и *CSN1S2*, а второй из *CSN3* [25]. В первом блоке

гаплотипов *CSN1S1*–*CSN2*–*CSN1S2* были обнаружены статистически значимые ассоциации как с качеством и количеством белков, так и с удоем. Напротив, значимой ассоциации с такими показателями в блоке *CSN3* обнаружено не было.

Исследования казеинового кластера на хромосоме 6 крупного рогатого скота подтверждают важность учета всего гаплотипа входящих в него генов для стратегий разведения. Эффекты мутаций или SNP в кластере казеиновых генов, определенные разными авторами у разных пород, иногда противоречат друг другу [25], подобно сканированию QTL хромосомы 6 [26]. Объяснение таких противоречивых результатов может заключаться в том, что гаплотип уравнивает каким-то до сих пор неизвестным образом ограничения, налагаемые естественным и/или искусственным отбором в области ДНК, несущей четыре гена казеинов, которые необходимы как для выживания новорожденных телят, так и для целей разведения. Будущее использование геномной селекции в молочном животноводстве должно будет учитывать не только информацию об отдельных SNP, но и определенные “горячие” зоны генома животных, такие как казеиновый кластер, в которых взаимодействия между кодирующими и не кодирующими последовательностями могут сильно влиять на общую экспрессию генов.

Общепринятая практика генотипирования молочного скота по казеиновым генам ограничивается анализом только *CSN2* и *CSN3* генов, а в них анализируют чаще всего только маркеры, различающие А- и В-аллели, поскольку считается, что аллель В в обоих генах делает молоко более сыропригодным. В гене бета-казеина таких маркеров три, в гене каппа-казеина – два основных и один дополнительный, чтобы различить аллель В и аллель J. Остальные маркеры и состоящие из них аллели считаются редкими, по крайней мере в европейских и американских промышленных породах КРС. В настоящей работе мы проанализировали гены *CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2* и *CSN3* по всем описанным для них однонуклеотидным заменам, для которых показано влияние на качество молока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе мы использовали образцы ДНК от 49 быков-производителей: костромской породы – 14 образцов, голштино-фризской породы – четыре образца и смешанной группы от скрещивания четырех пород зебу, черно-пестрого скота и голштино-фризов – 31 образец. Образцы спермы быков костромской и голштино-фризской породы были получены из Акционерного общества “Головной центр по воспроизводству сельскохозяйственных животных” (АО “ГЦВ”), п. Быково Московской области; образцы крови от быков смешанного происхождения были получены из

Государственного унитарного предприятия “Научно-экспериментальное хозяйство “Снегири” Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук.

Выделение ДНК и ПЦР

Из всех образцов ДНК выделяли колоночным методом с помощью наборов от компании “Евроген”, после выделения концентрацию и качество ДНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., США) и выравнивали концентрацию всех образцов.

Анализировали ДНК методом ПЦР в реальном времени на амплификаторе LightCycler®96 SW 1.1 (Roche) при условиях: один цикл – 3 мин при 95°C, 55 циклов: 95°C – 15 с, 55°C – 15 с, 72°C – 20 с, с последующим анализом пиков плавления полученных ампликонов. В реакционную смесь добавляли интеркалирующий краситель EvaGreen. Генотипировали образцы с помощью праймеров, подобранных к генетическим маркерам (мутациям) четырех генов, кодирующих казеины молока: *CSN1S1* – ген альфа-казеина S1, *CSN1S2* – ген альфа-казеина S2, *CSN2* – ген бета-казеина и *CSN3* – ген каппа-казеина. Образец считался гомозиготным по конкретному маркеру (SNP), если график одного из аллелей выходил не менее чем на пять циклов раньше графика второго аллеля или график второго аллеля вообще не выходил (рис. 1, в). Примеры других графиков показаны на рис. 1, а, б.

Образец считался гетерозиготным, если графики обоих аллелей выходили одновременно или с разницей в один цикл. Пример таких графиков показан на рис. 2. Все образцы были генотипированы 2 раза, а в некоторых спорных случаях 3 раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ген *CSN1S1*

В своем обзоре Фаррелл с соавт. [7], а вслед за ними и Кароли с соавт. [8] приводят аллельные варианты гена *CSN1S1*, которые можно увидеть в табл. 1. В обзоре Кароли приводится номер референсной последовательности этого гена – GenBank No. X59856. Поскольку номера нуклеотидных и аминокислотных замен в ее обзоре совпадают с таковыми у Фаррелла, он, вероятно, использовал ту же последовательность. И эта последовательность для В-аллеля (варианта) этого гена. В первом столбце табл. 1 приведены номера нуклеотидов полной последовательности гена, которые изменились в разных аллелях, и ниже – номера аминокислот белковой последовательности, которые были изменены. Когда мы стали сравнивать номера аминокислот в таблице с номерами в аминокислотной последовательности (рис. 3), то ами-

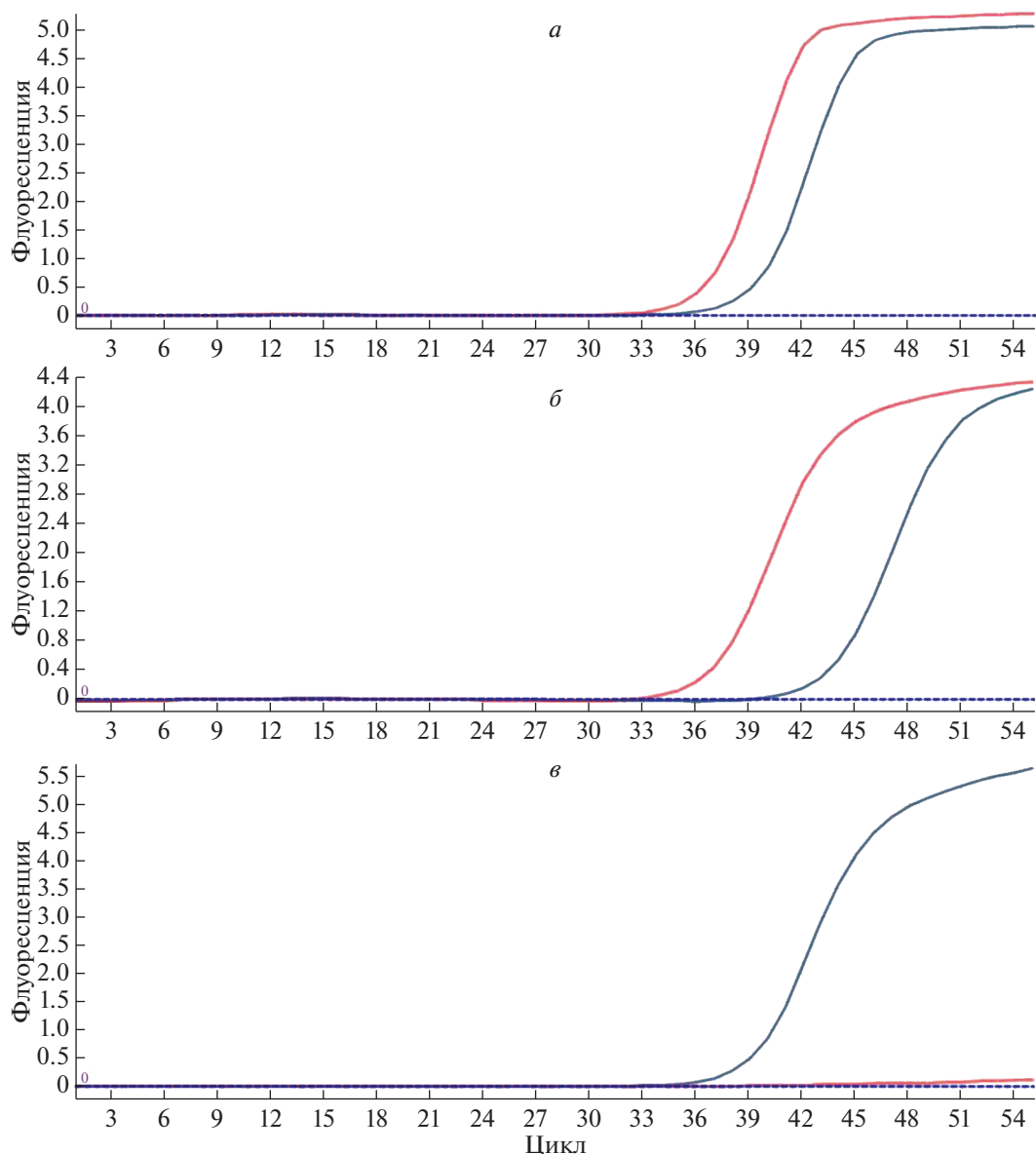


Рис. 1. Примеры графиков гомозиготных образцов ДНК по одному из маркеров. Объяснение в тексте.

нокислоты в таблице и в последовательности не совпадали, пока мы не выяснили, что авторы вели отсчет аминокислот не от метионина в 1-й позиции, а от аланина в 15-й позиции. Фаррелл и соавт. [7] в своем обзоре упоминают: “Сигнальный пептид α S1-CN состоит из 15 аминокислотных остатков, составляющих преформу α S1-CN 214 аминокислот в длину”, возможно поэтому они вели отсчет с 15-го аминокислотного остатка, хотя в абсолютном большинстве случаев нумерация аминокислот в современной литературе начинается от первого метионина. В своих работах по генотипированию различных признаков у КРС нам нередко приходилось сталкиваться с подобными разночтениями у разных авторов номеров аминокислот

одних и тех же белков, что вызывало определенные трудности при подборе аллель-специфичных праймеров для генотипирования. Поэтому мы приводим в таблицах с номенклатурами вариантов генов исправленные номера аминокислот.

Кроме того, и у Фаррелла, и у Кароли в таблицах аллельных вариантов гена *CSN1S1* не показана мутация для варианта G. Поле для этого аллеля осталось пустым без объяснений в тексте. Нам удалось найти оригинальную статью с описанием этого аллельного варианта. Рандо с соавт. описывают эту мутацию как инсерцию между 58-м и 59-м нуклеотидами 19-го экзона [27]. По референсной последовательности GenBank No. X59856 это нук-

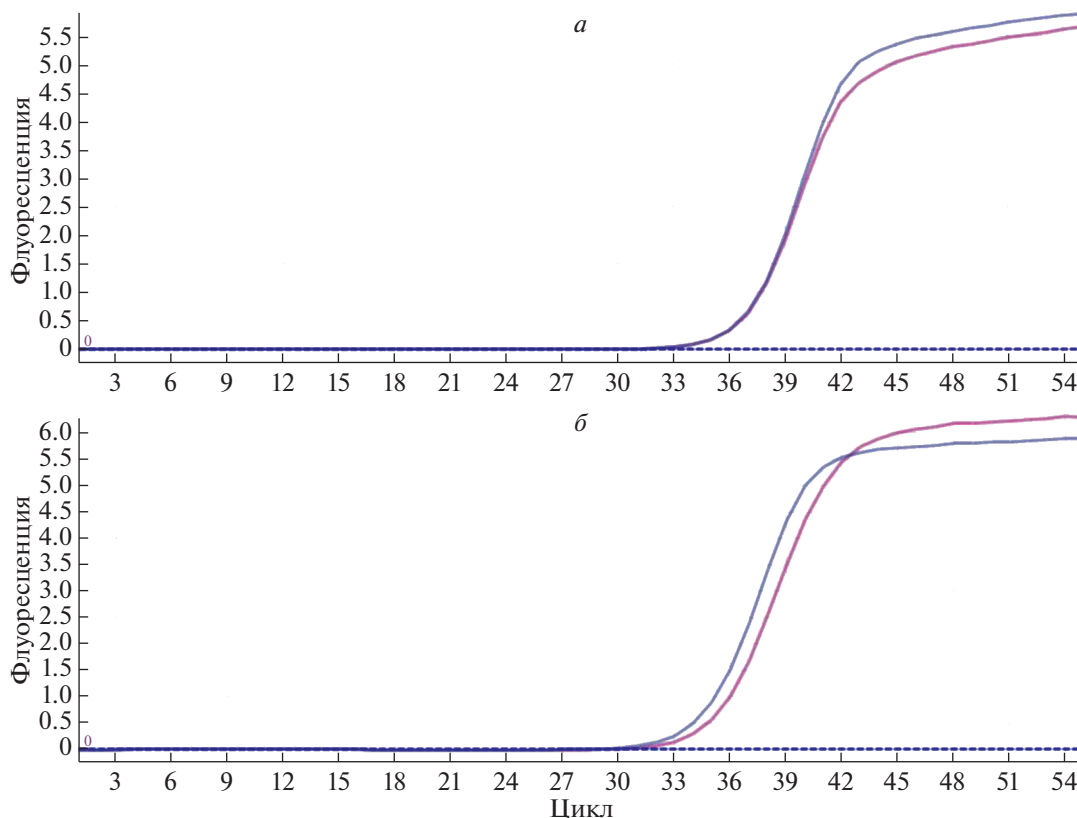


Рис. 2. Примеры графиков гетерозиготных образцов ДНК по одному из маркеров. Объяснение в тексте.

“MKLLILTCLVAVALRPKHPIKHQGLPQEVLNENLLRFFVAPFP
 EVFGKEKVNELSKDIGSESTEDQAMEDIKQMEAESISSSEEIVP
 NSVEQKHIQKEDVPSERYLGYLEQLLRLKKYKVPQLEIVPNSA
 EERLHSMKEGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFRQFYQLDA
 YPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEKTTMPLW”

Рис. 3. Пример аминокислотной последовательности белка, кодируемого геном *CSN1S1* (*Bos taurus CSN1S1* gene for alpha-S1-casein, GenBank: X59856.2). Красным выделен аланин в 15-й позиции. С другими генами казеинового кластера была аналогичная ситуация.

леотиды 27686 и 27687. Между ними выявлена инсерция в 371 нуклеотид длиной, характеризующая вариант G.

В обзоре Шевцовой с соавт. приводятся четыре однонуклеотидные замены в гене *CSN1S1*, влияющие на качество молока, три из которых не указаны в приведенной номенклатуре аллельных вариантов [24]. Одна замена — rs43703010 совпадает с мутацией в 26 181-м положении нуклеотида. Замена rs109817504 находится в промоторной зоне в положении 10331 (A>G) и влияет на параметры твердости сыра при производстве — аллель А уменьшает потенциальную твердость. Вторая замена rs110981354 находится в 15-м экзоне в поло-

жении 24287, Gln155His и связана с белково- и жирномолочностью, повышая данные показатели (аллель G). Третья замена находится в первой позиции интрона 6 (16059), где G заменяется на С. При этом инактивируется донорный сайт сплайсинга. Это приводит к потере экзона 6, кодирующего аминокислотные остатки в позициях 35–42, и негативно отражается на реологических свойствах молока, плотности творожного сгустка и выходе сыра. Мы добавили эти три однонуклеотидные замены в таблицу аллельных вариантов, однако пока не стали выделять их в отдельные варианты. Необходимо убедиться, что они не коррелируют с какими-либо аллелями в приведен-

Таблица 1. Аллельные варианты гена *CSN1S1*

| Номера нуклеотидов и аминокислот | B | A | C | D | E | F | G | H | I |
|----------------------------------|------|-----|-----|-----|-----|-----|---------|-----|-----|
| 14891–14929 | | | | | | | | | |
| 14–26/29–41 | N | Del | | | | | | | |
| 17383 | GCC | | | ACC | | | | | |
| 53/68 | Ala | | | Thr | | | | | |
| 17377–17400 | | | | | | | | | |
| 51–58/66–73 | N | | | | | | | Del | |
| 18901 | CAA | | | | AAA | | | | |
| 59/74 | Gln | | | | Lys | | | | |
| 18923 | TCG | | | | | TTG | | | |
| 66/81 | SerP | | | | | Leu | | | |
| 19836 | GAA | | | | | | | | GAT |
| 84/99 | Glu | | | | | | | | Asp |
| 26181 | GAA | | GGA | | GGA | | | | |
| 192/207 | Glu | | Gly | | Gly | | | | |
| Инсерция | N | | | | | | ins 371 | | |
| 27686–27687 | | | | | | | | | |
| 10331 A>G | | | | | | | | | |
| 16059 G>C | | | | | | | | | |
| 24287 G>C | | | | | | | | | |
| Gln155His | | | | | | | | | |

Примечание. В первом столбце красным шрифтом показаны номера аминокислот от метионина в первой позиции, номера нуклеотидов приведены по геномной последовательности GenBank No. X59856.

ной номенклатуре. В табл. 2 показаны примеры генотипирования двух быков по гену *CSN1S1*. Бык под номером 14 вполне мог бы быть определен как гетерозигота ВН, однако у него присутствует аллель Т в варианте I. Его также можно определить как гетерозиготу HI, но в этом случае появляется “лишний” аллель А (аминокислота 99) в варианте В. Кроме того, он также является гетерозиготным по маркеру 10331, но вариант для второго аллеля пока еще не определен. Бык под номером 20 вполне определяется как гетерозигота AF.

Ген *CSN1S2*

Этот ген считается слабо влияющим на свойства молока. В обзоре Шевцовой и соавт. прямо указано: “Для гена *CSN1S2*, кодирующего α S2-казеин, существенных данных о его положительной или отрицательной ассоциации с молочной продуктивностью обнаружено не было” [24]. Однако в обзорах Фаррелла и Кароли [7, 8] приведена номенклатура аллельных вариантов этого гена. Как и в случае с геном *CSN1S1* в их номенклатурах для гена *CSN1S2* номера аминокислот, в которых произошли замены, сдвинуты от первого метионина

на 15 позиций. Референсная последовательность, послужившая для этого, – GenBank: M94327.1. В табл. 3 мы приводим их обозначения, где красным цветом показываем позицию аминокислоты от первого метионина белковой последовательности.

Анализ ДНК быков трех породных групп выявил присутствие в генотипе дополнительных комбинаций маркеров, которые отсутствуют в приведенной номенклатуре аллельных вариантов. В табл. 4 показаны примеры генотипирования быков из исследованных нами выборок. Красным цветом выделены аллели, обнаруженные у конкретного животного. Так, бык под номером 4 является гомозиготой по аллелю С, а остальные представляют собой необычные сочетания аллелей в вариантах гена *CSN1S2*, иногда аллели из трех вариантов, как бык № 14, или даже четырех, как бык № 5.

Ген *CSN2*

Ген бета-казеина у крупного рогатого скота изучен достаточно хорошо и считается, что он оказывает значительное влияние на качество молока, особенно на его сыропригодные свойства.

Таблица 2. Примеры генотипов по гену *CSN1S1*

| Номера аминокислот | Аллельные варианты гена | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------|-----|---|---|---|---|-----|------------|----------|------------|------------|---|---|---|----------|-----|-----|---|
| | бык 14 з/в | | | | | | | | | бык 20 з/в | | | | | | | | |
| | B | A | C | D | E | F | G | H | I | B | A | C | D | E | F | G | H | I |
| 14–26/ 29–41 | N | Del | | | | | | | | N | Del | | | | | | | |
| 53/ 68 | G | | | A | | | | | | G | | | A | | G | | | |
| 51–58/ 66–73 | N | | | | | | | Del | | N | | | | | N | | Del | |
| 59/ 74 | C | | | | A | | | | | C | | | A | | C | | | |
| 66/ 81 | C | | | | | T | | | | C | | | | | T | | | |
| 84/ 99 | A | | | | | | | | T | A | | | | | A | | | T |
| 192/ 207 | A | | G | | G | | | | | A | | G | | G | A | | | |
| Инсерция в 19-м экзоне. 371 нуклеотид | N | | | | | | ins | | | N | | | | | N | ins | | |
| 10331 A>G | AG | | | | | | | | | G | | | | | | | | |
| 16059 G>C | G | | | | | | | | | G | | | | | | | | |
| 24285 G>C | G | | | | | | | | | G | | | | | | | | |
| Gln155His | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Примечание. Красным цветом выделены аллели, обнаруженные у этих животных; з/в – зебувидный скот.

Таблица 3. Аллельные варианты гена *CSN1S2*

| Номера нуклеотидов и аминокислот | A | B | C | D |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| 6227 | TCC | TTC | | |
| 8/ 23 | Ser | Phe | | |
| 7568 | GAG | | GGG | |
| 33/ 48 | Glu | | Gly | |
| 8401 | GCA | | ACA | |
| 47/ 62 | Ala | | Thr | |
| 8853–8879 | | | | |
| 51–59/ 66–74 | N | | | Del |
| 8879 | GAG | | | GAT |
| 59/ 74 | Glu | | | Asp |
| 11018 | ACC | | ATC | |
| 130/ 145 | Thr | | Ile | |

Примечание. В первом столбце красным шрифтом показаны номера аминокислот от метионина в первой позиции. Номера нуклеотидных позиций приведены по геномной последовательности гена GenBank: M94327.1.

Опять же считается, что аллельный вариант **B** положительно влияет на эти свойства, уменьшая время коагуляции и плотность сгустка, а аллель **A** является наиболее распространенным, по крайней мере в европейских и американских породах КРС. В номенклатурах Фаррелла [7] и Кароли [8] начало аминокислотной последовательности сдвинуто от первого метионина на 16 позиций. Однако в вышедшей позже брошюре для ирландских заводчиков КРС [28] номенклатура аллельных вариантов гена

CSN2 приведена уже с традиционным отсчетом аминокислот в белке от первого метионина, хотя и ссылка на статью Кароли тоже приведена. Не обошлось без ошибок и в этой брошюре. Так, для аргинина, который меняется на цистеин, указана позиция 41, хотя эта аминокислота находится на 40-й позиции. Кроме того, в вышеуказанных номенклатурных позициях перепутаны обозначения для нуклеотидных и аминокислотных замен.

Таблица 4. Различные варианты аллельных сочетаний, выявленных при генотипировании быков по гену *CSN1S2*

| Номера аминокислот | Аллельные варианты гена | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|------------|---|---|-----|-------------|---|---|-----|
| | бык 4, з/в | | | | бык 5, з/в | | | | бык 6, к/п | | | | бык 14, г-ф | | | |
| | A | B | C | D | A | B | C | D | A | B | C | D | A | B | C | D |
| 23 | C | T | C | | C | T | | | C | T | | | C | T | | |
| 48 | A | | G | | A | | G | | A | | G | | A | | G | |
| 62 | G | | A | | G | | A | | G | | A | | G | | A | |
| 66–74 | N | | N | Del | N | | | Del | N | | | Del | N | | | Del |
| 74 | G | | G | T | G | | | T | G | | | T | G | | | T |
| 145 | C | | T | | C | | T | | C | | T | | C | | T | |

Примечание. В первом столбце указаны номера аминокислот от первого метионина. Аллели в варианте А указаны полностью, в остальных вариантах указаны только аллели, отличающие их от варианта А. Красным шрифтом выделены аллели, обнаруженные у конкретного животного; з/в – зебувидный скот, к/п – костромская порода, г-ф – голштино-фризская порода.

Таблица 5. Аллельные варианты гена *CSN2*

| Номера аминокислоты и нуклеотида | A1 | A2 | A3 | B | C | E | F | G | H1 | H2 | I |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|-----|-----|
| p.40 | Arg | | | | | | | | Cys | | |
| c.118 | C | | | | | | | | T | | |
| p.51 | Glu | | | | Lys | | | | | | |
| c.151 | G | | | | A | | | | | | |
| p.54 | Glu | | | | | Lys | | | | | |
| c.15 | G | | | | | A | | | | | |
| p.82 | His | Pro | Pro | | | Pro | | | | Pro | Pro |
| c.245 | A | C | C | | | C | | | | C | C |
| p.87 | Gln | | | | | | | | | Glu | |
| c.259 | C | | | | | | | | | G | |
| p.103 | Leu | | | | | | | | He | | |
| c.307 | C | | | | | | | | A | | |
| p.108 | Met | | | | | | | | | Leu | Leu |
| c.322 | A | | | | | | | | | C | C |
| p.121 | His | | Gln | | | | | | | | |
| c.363 | C | | A | | | | | | | | |
| p.137 | Ser | | | Arg | | | | | | | |
| c.411 | C | | | G | | | | | | | |
| p.167 | Pro | | | | | | Leu | | | | |
| c.500 | C | | | | | | T | | | | |

Примечание. Для аллеля А приведен полный набор аллелей маркеров. В остальных вариантах указаны только те маркеры, где произошли изменения нуклеотидов и аминокислот. Номера нуклеотидных позиций приведены по кДНК гена.

Тем не менее мы исправили эти ошибки и приводим номенклатуру вариантов гена *CSN2* в табл. 5.

В настоящем исследовании генотипированы выборки быков по всем маркерам гена *CSN2*. При этом были выявлены новые сочетания аллелей, не описанные в приведенной номенклатуре. Не-

которые результаты такого генотипирования приведены в табл. 6. Следует упомянуть, что из 49 животных нет ни одного, чей генотип полностью соответствовал бы гомозиготному или гетерозиготному вариантам этой номенклатуры. Красным шрифтом выделены аллели, обнаруженные у кон-

Таблица 6. Примеры генотипов быков по гену *SCN2*

| Номер нуклеотида | Аллельные варианты гена | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|-------------------------|----|----|---|---|---|---|---|----|----|---|------------|----|----|---|---|---|---|---|----|----|---|
| | бык 20 з/в | | | | | | | | | | | бык 31 з/в | | | | | | | | | | |
| | A1 | A2 | A3 | B | C | E | F | G | H1 | H2 | I | A1 | A2 | A3 | B | C | E | F | G | H1 | H2 | I |
| c.118 | C | | | | | | | T | C | | | C | | | | | | | | T | | |
| c.151 | G | | | A | | | | | G | | | G | | | | C | | | | | | |
| c.154 | G | | | | A | | | | G | | | G | | | | A | | | | | | |
| c.245 | A | C | C | | | C | | | C | C | | A | C | C | | | C | | | | C | C |
| c.259 | C | | | | | | | | G | | | C | | | | | | | | | G | |
| c.307 | C | | | | | | | A | C | | | C | | | | | | | A | | | |
| c.322 | A | | | | | | | | C | C | | A | | | | | | | | | C | C |
| c.363 | C | | A | | | | | | C | | | C | | A | | | | | | | | |
| c.411 | C | | | G | | | | | C | | | C | | | G | | | | | | | |
| c.500 | C | | | | | T | | | C | | | C | | | | | T | | | | | |

Примечание. Для варианта A1 показаны все аллели маркеров, для остальных вариантов показаны аллели маркеров, где произошли мутации. Красным шрифтом выделены аллели, найденные у конкретного животного; з/в – зебувидный скот.

кретного животного. Как видно из приведенных примеров, в этих генотипах сочетаются аллели из более чем двух вариантов. Кроме того, такие генотипы невозможно описать как гомо- или гетерозиготные по каким-то аллельным вариантам. Так, бык № 20 (зебувидный скот) является гомозиготным по маркерам 118, 151, 154, 245, 259, 307, 363 варианта H2, гомозиготным по маркеру 500 варианта F и гетерозиготным по маркеру 411 между вариантами B и H1. Бык 31 определен как гомозиготный по маркерам 118, 154, 307, 322, 363, 500 варианта A1, маркерам 245 и 259 варианта H2, гетерозиготным по маркеру 151 (A1/C) и маркеру 411 (A1/B). В целом генотип быка № 20 можно отнести к варианту H2 по большинству маркеров, а быка 31 к варианту A1 также по большинству маркеров. Среди проанализированных быков костромской и голштино-фризской пород также отмечено подобное явление.

Ген *CSN3*

Ген каппа-казеина *CSN3* наиболее изучен с точки зрения его влияния на сыропригодные качества молока. Считается, что вариант B этого гена наиболее пригоден для приготовления сыров. Номенклатура вариантов гена *CSN3* пересматривалась чаще других генов этого семейства. Так, в номенклатуре гена каппа-казеина, опубликованной Кароли и соавт. [8], приводится эволюция этой номенклатуры. Необходимо упомянуть, что сотрудники лаборатории сравнительной генетики животных принимали активное участие в исследованиях этого гена и описали его новые варианты [12, 13]. В этом смысле наше исследование является продолжением традиций лаборатории.

Однако приведенные в статьях номенклатуры этого гена также указывают номера аминокислот, не совпадающие с номерами аминокислот в белковой последовательности. В брошюре [28], которая ссылается на таблицу из статьи Кароли и соавт. [8], номера аминокислот указаны уже в соответствии с приведенной последовательностью. У Фаррелла [7], а вслед за ним и у Кароли [8] указанная аминокислотная последовательность и нумерация аминокислот начинаются с 21-й аминокислоты референсной последовательности, а не от первого метионина. В сводной табл. 7 приведена номенклатура гена *CSN3*, опубликованная в этой брошюре.

Необходимо отметить, что из всего кластера казеиновых генов ген каппа-казеина единственный, в номенклатуре вариантов которого приведены мутации, не изменяющие аминокислоту. В табл. 7 аллели таких маркеров выделены красным цветом. Не совсем понятно, для чего нужно было вводить в номенклатуру новые варианты, если эти варианты не оказывают влияния на свойства белка. Тем не менее мы генотипировали наши выборки быков по всем маркерам и так же, как и в случаях с другими казеиновыми генам, обнаружили новые сочетания аллелей. Так, бык № 14 костромской породы (табл. 8), ранее типированный в другой лаборатории как BB, нами был типирован как CC с дополнительным аллелем A по маркеру 92 из варианта F2, аллелем G маркера 513 из варианта A1 и аллелем C маркера 521 из варианта B2. Второй бык № 12 костромской породы был ранее типирован, как AB, и наше типирование в целом подтвердило этот генотип. Однако он скорее A1B2 и также имеет дополнительный аллель – T по маркеру 352 из варианта G1. Если по

Таблица 7. Номенклатура аллельных вариантов гена *CSN3*

| Номера аминокислоты и нуклеотида | Аллельные варианты гена | | | | | | | | | | | | |
|----------------------------------|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | A | A1 | B | B2 | C | D | E | F1 | F2 | G1 | H | I | J |
| p.31 | Arg | | | | | | | | | His | | | |
| c.92 | G | | | | | | | | | A | | | |
| p.114 | Thr | | | | Thr | | | | | | | | |
| c.342 | T | | | | C | | | | | | | | |
| p.118 | Arg | | | | | | | | | Cys | | | |
| c.352 | C | | | | | | | | | T | | | |
| p.118 | Arg | | | | | His | His | | | | | | |
| c.353 | G | | | | | A | A | | | | | | |
| p.125 | Ser | | | | | | | | | | | Ala | |
| c.373 | T | | | | | | | | | | | G | |
| p.156 | Thr | | | | | | | | | Ile | Ile | | |
| c.467 | C | | | | | | | | | T | T | | |
| p.157 | Thr | | Ile | Ile | Ile | | | | | | | | Ile |
| c.470 | C | | T | T | T | | | | | | | | |
| p.166 | Thr | | | | | | | | Thr | | | | |
| c.498 | T | | | | | | | | G | | | | |
| p.169 | Asp | | Ala | Ala | Ala | | | | Val | | | | Ala |
| c.506 | A | | C | C | C | | | | T | | | | C |
| p.171 | Pro | Pro | | | | | | | | | | | |
| c.513 | A | G | | | | | | | | | | | |
| p.174 | Ile | | | Thr | | | | | | | | | |
| c.521 | T | | | C | | | | | | | | | |
| p.176 | Ser | | | | | | | Gly | | | | | |
| c.526 | A | | | | | | | G | | | | | |
| p.188 | Thr | | | | Thr | | | | | | | | |
| c.564 | T | | | | C | | | | | | | | |
| p.189 | Ala | | Ala | Ala | Ala | | | | | | | | |
| c.567 | A | | G | G | G | | | | | | | | |

Примечание. Красным цветом выделены нуклеотидные замены, не приводящие к изменению аминокислоты. Номера нуклеотидных позиций приведены по кДНК гена.

большинству маркеров он гетерозиготен, то по маркеру 564 бык № 12 оказался гомозиготен.

У быков зебувидного скота “примесей” аллелей из других вариантов заметно больше, чем у быков костромской и голштино-фризской пород. Это можно объяснить большей гомогенностью этих промышленных пород. В стадо скота, содержащееся в Научно-экспериментальном хозяйстве “Снегири” Главного ботанического сада им. Н.В. Цицина Российской академии наук, в котором встречались айрширские и джерсейские помеси, в свое время приливали кровь четырех пород зебу, а позже кровь черно-пестрого и голштино-фризского скота. По всей видимости, это

является причиной такого разнообразия генетических вариантов в нашей выборке по всем казеиновым генам, а не только по гену *CSN3*. Небольшое расхождение полученных нами результатов с известными (опубликованными ранее) результатами генотипирования быков костромской и голштино-фризской пород мы склонны объяснять тем, что обычно в лабораториях, где проводят генотипирование по казеиновым генам, ограничиваются только несколькими маркерами, считающимися основными. Так, по гену *CSN3* обычно делают анализ по трем маркерам: 470, 506 и 564 (иногда 567). Поскольку варианты В, В2, С и J относят к вариантам группы В, небольшая разница

Таблица 8. Примеры генотипов быков костромской породы по гену *CSN3*

| Номер нуклеотида | Аллельные варианты гена | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------------------------------|----|---|----|---|---|---|----|----|----|---|---|---|--------------------------------|----|---|----|---|---|---|----|----|----|---|---|
| | бык 14 к/п (предварительно ВВ) | | | | | | | | | | | | | бык 12 к/п (предварительно АВ) | | | | | | | | | | | |
| | A | A1 | B | B2 | C | D | E | F1 | F2 | G1 | H | I | J | A | A1 | B | B2 | C | D | E | F1 | F2 | G1 | H | I |
| c.92 | G | | | | G | | | | A | | | | | G | | | G | | | | A | | | | |
| c.342 | T | | | C | T | | | | | | | | | T | | | C | | | | | | | | |
| c.352 | C | | | | C | | | | | T | | | | C | | | C | | | | | T | | | |
| c.353 | G | | | | A | A | | | | | | | | G | | | G | A | A | | | | | | |
| c.373 | T | | | | T | | | | | | G | | | T | | | T | | | | | | G | | |
| c.467 | C | | | | C | | | | | T | T | | | C | | | C | | | | | T | T | | |
| c.470 | C | | T | T | T | | | | | | | | T | C | | T | T | T | | | | | | T | |
| c.498 | T | | | | T | | | G | | | | | | T | | | T | | | G | | | | | C |
| c.506 | A | | C | C | C | | | T | | | | | C | A | | C | C | C | | T | | | | | C |
| c.513 | A | G | | | | | | | | | | | | A | G | | | | | | | | | | |
| c.521 | T | | | C | T | | | | | | | | | T | | | C | | | | | | | | |
| c.526 | A | | | | A | | G | | | | | | | T | | | A | | | G | | | | | |
| c.564 | T | | | C | T | | | | | | | | | T | | | C | | | | | | | | |
| c.567 | A | | G | G | G | | | | | | | | | A | | G | G | G | | | | | | | |

Примечание. Красным цветом выделены аллели, найденные у конкретных животных; к/п – костромская порода.

в аллельном составе этих вариантов не учитывается, и часто по паре совпавших аллелей животное относят к варианту В, не проверяя остальные маркеры.

В настоящем исследовании трех пород крупного рогатого скота были обнаружены новые сочетания маркеров (SNP) в общепризнанных аллелях этих генов. С учетом полученных данных нами скорректирована номенклатура CN-локуса, а именно четырех генов: *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN1S2* и *CSN3*.

Такого детального анализа геномов крупного рогатого скота по генам казеинового кластера нам не приходилось встречать в научной литературе. Но обнаруженное явление, а именно сочетание нескольких аллельных вариантов в генотипе по казеиновым генам, явно не уникально. Комитет Американской научной ассоциации молочного животноводства по номенклатуре, классификации и методологии молочных белков публикует пересмотр номенклатуры молочных белков примерно каждые 5–10 лет, чтобы обобщить более поздние результаты и предложить изменения в номенклатуре, где это уместно. Возможно, что результаты, сходные с теми, что мы получили в нашем исследовании, появятся в других публикациях. С другой стороны, то разнообразие вариантов и те необычные сочетания аллелей, которые мы обнаружили вполне можно объяснить естественными процессами, происходящими в геноме. Кластер казеиновых генов достаточно протя-

женный и составляет около 250 тыс. пн, что допускает наличие кроссинговера в этом районе и обмен участками, приводящий к появлению новых вариантов сочетания аллелей. Возникновение мутаций *de novo* в этих генах также вносит вклад в биоразнообразии. Новые сочетания аллелей в казеиновых генах может придать молоку некие новые качества, как положительные, так и отрицательные. Это предмет будущих исследований, запланированных в нашей лаборатории. Кроме того, полученные данные по казеиновому кластеру позволяют проводить геномную селекцию с большим эффектом, что актуально не только для промышленных пород, но и для редких аборигенных пород крупного рогатого скота в целях изучения и сохранения биоразнообразия.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания ГБС РАН по плановой теме № 122020800034-4.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hayes H., Petit E., Bouniol C., Popescu C. Localisation of the alpha-S2-casein gene (CASAS2) to the homologous cattle, sheep and goat chromosome 4 by *in situ* hybridisation // Cytogenet. Cell Genet. 1993. V. 64. P. 282–285.

2. *Popescu C., Long S., Riggs P. et al.* Standardization of cattle karyotype nomenclature: Report of the committee for the standardization of the cattle karyotype // *Cytogenet. Cell Genet.* 1996. V. 74. P. 259–261.
3. *Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L., Leroux C.* The impact of genetic polymorphisms on the protein composition of ruminants milks // *Reprod. Nutr. Dev.* 2002. V. 42. P. 433–459.
<https://doi.org/10.1051/rnd:2002036>
4. *Grosclaude F.* Le polymorphisme génétique des principales lactoprotéines bovines. Relations avec la quantité, la composition et les aptitudes fromagères du lait // *INRA Prod. Anim.* 1988. V. 1. P. 5–17.
5. *Di Stasio L., Mariani P.* The role of protein polymorphism in the genetic improvement of milk production // *Zoot. Nutr. Anim.* 2000. V. 26. P. 69–90.
6. *Formaggioni P., Summer A., Malacarne M., Mariani P.* Milk protein polymorphism: Detection and diffusion of the genetic variants in *Bos* genus // *Ann. Fac. Med. Vet. Un. Parma.* 1999. V. XIX. P. 127–165.
7. *Farrell H.M., Jimenez-Flores R., Bleck G.T. et al.* Nomenclature of the proteins of cows' milk—sixth revision // *J. Dairy Sci.* 2004. V. 87. № 6. P. 1641–1674.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(04\)73319-6](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(04)73319-6)
8. *Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J.* Invited review: Milk protein polymorphisms in cattle: Effect on animal breeding and human nutrition // *J. Dairy Sci.* 2009. V. 92. № 11. P. 5335–5352.
<https://doi.org/10.3168/jds.2009-2461>
9. *Erhardt G., Eggen A.* Untersuchungsmöglichkeiten der Milchproteine mittels Protein- und DNS-Analyse und deren Bedeutung bei züchterischen Fragestellungen // *Landwirtschaft Schweiz.* 1990. V. 3. P. 181–186.
10. *Erhardt G., Prinzenberg E.M., Buchberger J. et al.* Bovine κ -casein G detection, occurrence, molecular genetic characterization, genotyping and coagulation properties // *Proc. IDF "Milk Protein Polymorphism Seminar II."* Brussels: Intern. Dairy Federation, 1997. P. 328–329.
11. *Damiani G., Ferretti L., Rognoni G., Sgaramella V.* Restriction fragment length polymorphism analysis of the kappa-casein locus in cattle // *Anim. Genet.* 1990. V. 21. P. 107–114.
12. *Sulimova G.E., Sokolova S.S., Semikozova O.P. et al.* Analysis of DNA polymorphisms of clustered genes in cattle: Casein genes and genes of the major histocompatibility complex (BOLA) // *Tsitol. I Genetika.* 1992. V. 26. P. 18–26.
13. *Sulimova G.E., Badagueva I.N., Udina I.G.* Polymorphism of the κ -casein gene in subfamilies of the Bovidae // *Genetika.* 1996. V. 32. P. 1576–1582.
14. *Schlieben S., Erhardt G., Senft B.* Genotyping of bovine κ -casein (κ -CNA, κ -CNB, κ -CNC, κ -CNE) following DNA sequence amplification and direct sequencing of κ -CNE PCR product // *Anim. Genet.* 1991. V. 22. P. 333–342.
15. *Damiani G., Pilla F., Leone P., Cacciò S.* Direct sequencing and bidirectional allele specific polymerase chain reaction of the bovine beta-casein B variant // *Anim. Genet.* 1992. V. 23. P. 561–565.
16. *David V.A., Deutch A.H.* Detection of bovine α s1-casein genomic variants using the allele-specific polymerase chain reaction // *Anim. Genet.* 1992. V. 23. P. 425–429.
17. *Barroso A., Dunner S., Canon J.* A multiplex PCR-SSCP test to genotype bovine beta-casein alleles A1, A2, A3, B, and C // *Anim. Genet.* 1999. V. 30. P. 322–323.
18. *Erhardt G., Senft B.* Nutzungsmöglichkeiten der genetisch bedingten Varianten der Rindermilch im Rahmen der Milchleistungsprüfung // *Performance Recording of Animals: State of the Art / Eds Gaillon P. and Chabert Y.* Pudoc: Springer Netherlands, Wageningen, 1990. P. 20–22.
19. *Chessa S., Chiatti F., Ceriotti G. et al.* Development of a SNP genotyping microarray platform for the identification of bovine milk protein genetic polymorphisms // *J. Dairy Sci.* 2007. V. 90. P. 451–464.
[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)72647-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)72647-4)
20. *Mercier J.-C., Chobert J.M., Addeo F.* Comparative analysis of the amino acid sequences of caseinomacropptides from seven species // *FEBS Lett.* 1976. V. 72. P. 208–214.
21. *Losi G., Castagnetti G.B., Grazia L. et al.* Influenza delle varianti genetiche della caseina κ sulla formazione e sulle caratteristiche della cagliata // *Sci. Tech. Alim.* 1973. V. 3. P. 373–374.
22. *Aleandri R., Buttazzoni L.G., Schneider J.C. et al.* The effects of milk protein polymorphisms on milk components and cheese-producing ability // *J. Dairy Sci.* 1990. V. 73. P. 241–255.
23. *Comin A., Cassandro M., Chessa S. et al.* Effects of composite β - and κ -casein genotypes on milk coagulation, quality, and yield traits in Italian Holstein cows // *J. Dairy Sci.* 2008. V. 91. P. 4022–4027.
<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0546>
24. *Шевцова А.А., Климов Е.А., Ковальчук С.Н.* Обзор variability генов, связанных с молочной продуктивностью крупного рогатого скота // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2018. № 11. Вып. 1. С. 194–200.
<https://doi.org/10.17513/mjpf.12475>
25. *Nilsen H., Olsen H.G., Hayes B. et al.* Casein haplotypes and their association with milk production traits in Norwegian Red cattle // *Genet. Sel. Evol.* 2009. V. 41. P. 24.
<https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-24>
26. *Olsen H.G., Lien S., Gautier M. et al.* Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6 // *Genetics.* 2005. V. 169. P. 275–283.
<https://doi.org/10.1534/genetics.104.031559>
27. *Rando A., Di Gregorio P., Ramunno L. et al.* Characterization of the CSN1AG allele of the bovine α s1-casein locus by the insertion of a relict of a long interspersed element // *J. Dairy Sci.* 1998. V. 81. P. 1735–1742.
28. *McClure M., McClure J.* Genetic Disease and Trait Information for IDB Genotyped Animals in Ireland. Shinnagh, Bandon: Highfield House Co Publ., 2016. 89 p.

New Combinations of Alleles in Variants of the Cattle Casein Cluster Genes and Revision of the Nomenclature of These Genes

S. B. Kuznetsov^{a, *}, E. V. Solodneva^a, M. T. Semina^a,
S. V. Beketov^a, I. S. Turbina^b, and Yu. A. Stolpovsky^a

^a*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^b*Joint-Stock Company "Head Center for the Reproduction of Farm Animals",
Moscow oblast, Podolsk, Bykovo, 142143 Russia*

**e-mail: sergei_kuznetsov@yahoo.com*

A detailed analysis of bovine genomes was carried out for 4 genes of the casein cluster located on the sixth chromosome of cattle: *CSNIS1* – S1 alpha-casein, *CSNIS2* – S2 alpha-casein, *CSN2* – beta-casein and *CSN3* – kappa-casein. The genotypes of 49 sires of Kostroma, Holstein-Friesian breeds and interbred hybrids of zebu with black-and-white cattle were studied. The analysis was carried out using the real-time PCR method, which made it possible to genotype DNA samples with the utmost accuracy. During the selection of primers, the nomenclature of all four genes was refined, which was brought to a single principle for designating amino acid positions in proteins encoded by the above genes. New combinations of markers (SNPs) have been found in generally recognized alleles in casein genes. Of all the animals studied, there is not one whose genotype would fully correspond to the homozygous or heterozygous variants of the generally accepted nomenclature. The discovered genotypes combine alleles from more than two variants. Thus, these genotypes cannot be described as homozygous or heterozygous for the identified allelic variants. The discovered phenomenon is probably not unique, since, as a rule, during the routine analysis of casein genes, several allelic variants associated with the cheese suitability of milk are tested, and the existing casein cluster polymorphism shown in this study is not fully taken into account.

Keywords: casein cluster genes, cattle, real-time PCR, SNP.

УДК 575.174.015.3

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И СТРУКТУРЫ АВТОХТОННЫХ ПОРОД ЛОШАДЕЙ РОССИИ И МОНГОЛИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЯДЕРНЫХ И МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ДНК-МАРКЕРОВ

© 2022 г. В. Н. Воронкова^{1, *}, Э. А. Николаева¹, А. К. Пискунов¹, О. В. Бабаян², М. Takasu³,
Т. Tozaki⁴, Г. Р. Свищева^{1, 5}, Ю. А. Столповский¹

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²ООО “Гордиз”, Москва, 121205 Россия

³Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu, Japan

⁴Genetic Analysis Department, Laboratory of Racing Chemistry, Tochigi, Japan

⁵Федеральный исследовательский центр, Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: valery.voronkova@gmail.com

Поступила в редакцию 01.03.2022 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

С использованием микросателлитного анализа по 17 локусам исследовано 866 лошадей из девяти пород: алтайской, тувинской, кушумской, печорской, мезенской, забайкальской, бурятской, русской верховой и монгольской. Уровень наблюдаемой гетерозиготности исследованных пород находится на высоком, не вызывающем опасения уровне (от 0.699 до 0.798). Суммарно было выявлено 183 аллеля, в том числе 15 частных. У монгольских лошадей породы Тэс в локусе АНТ4 обнаружен редкий аллель D, а также ранее неописанный аллель. Показаны филогенетические взаимоотношения, структура и взаимное влияние генофондов лошадей Монголии и России. Анализ полиморфизма контрольного региона D-петли мтДНК у 142 лошадей позволил выявить 16 гаплотипов, из них четыре, обнаруженные у монгольской, бурятской, забайкальской и тувинской пород, встречались прежде только в образцах древних лошадей Европы и Азии. Наиболее распространенными среди изученных пород оказались гаплотипы X2 и D3. Подтверждена гипотеза о том, что большинство гаплотипов мтДНК не привязаны к определенной породе или географической области. В популяциях лошадей различаются лишь набор и частоты гаплотипов. Вероятно, это связано с многократными событиями доместикиации, благодаря которым мтДНК лошадей так высокополиморфна, а также с активным перемещением лошадей в мире и их селекционной историей.

Ключевые слова: лошади, *Equus caballus*, аборигенная порода, сохранение биоразнообразия, генетический мониторинг, микросателлитный анализ, генетическое разнообразие, филогенетические отношения, D-петля, мтДНК.

DOI: 10.31857/S0016675822080100

На территории Российской Федерации сохранилось всего 16 аборигенных пород лошадей, созданных в течение столетий методами народной селекции под прессом давления суровых геоклиматических условий самых разных регионов нашей страны [1]. Синтез искусственного и естественного отбора позволил получить животных универсального назначения (мясного, молочного и пользовательского), хорошо адаптированных к круглогодичному пастбищному и культурно-табунному содержанию в лесных, горных и степных ландшафтах. Однако в настоящее время многие из них оказались близки к исчезновению и под-

держиваются лишь усилиями энтузиастов и местных жителей, сохраняющих традиционный уклад жизни.

Алтайская лошадь прекрасно приспособлена к горным условиям обитания. У нее прочные копыта, более сухие и крепкие конечности, чем у степных пород. Масти встречаются разнообразные (гнедая, рыжая, чубарая, серая, вороная, пегая) [1]. Тувинская лошадь, разводимая веками в условиях резко континентального климата при табунном содержании, приобрела ряд существенных внутренних биологических адаптивных качеств. К числу этих особенностей следует отнести хорошую плодови-

тость, способность лошадей к наживровке, хорошую мясность, выжеребку кобыл в оптимальные сроки [2]. Характерными чертами экстерьера тувинских лошадей являются длинное туловище, короткие костистые ноги, массивная голова. Преобладают масти гнедая, рыжая разных оттенков, серая, саврасая, пегая.

Типичным представителем степных лошадей России, родственной монгольской породе, является бурятская лошадь. Бурятская лошадь относится к самым низкорослым лошадям Сибири (высота в холке 130–133 см), но отличается массивным телосложением. Масти бурятских лошадей чаще всего гнедая, рыжая, серая, саврасая. Бурятская лошадь хорошо приспособлена к пастбищному содержанию на скудном травостое в течение года в условиях резко континентального климата Забайкалья, где морозы достигают -50°C .

Забайкальская лошадь отлично приспособлена к местным суровым природно-климатическим условиям, хорошо использует пастбища, быстро набирает подкожные запасы жира, в холодное время года обрастает обильным волосным покровом. Современная взрослая забайкальская лошадь имеет высоту в холке 135–140 см. Масти – в основном буланая, гнедая, рыжая, мышастая, саврасая, серая, пегая, чубарая.

Печорская лошадь относится к лесному типу, приспособлена к морозам и глубоким сугробам. Благодаря густому шерстному покрову и плотной коже устойчива к гнусу. Масти встречаются в основном темные: рыжая, гнедая, вороная, караковая, редко серая и буланая. Находится в критическом состоянии из-за низкой численности (<100 конематок) и отсутствия племенной работы [1].

Мезенская – местная порода лошадей северного лесного типа. Создана в Архангельской области. Животные хорошо переносят холод, прекрасно ориентируются в ненастье, неприхотливы к условиям кормления и содержания, не боятся гнуса, отличаются хорошими нагульными качествами. Свободно передвигаются по глубокому снегу и вязкой почве. Масти: гнедая, вороная, рыжая, серая, мышастая, чалая, соловая. У большинства встречается темный ремень по спине [3]. Благодаря активной племенной работе находится вне риска исчезновения [4].

Старинная вятская порода лошадей, известная своими упряжными тройками, была дважды за XX век практически утрачена, но большая работа по сохранению данной породы позволила сохранить их уникальный генофонд [1]. Вятская лошадь также относится к северному лесному типу, имеет крепкую конституцию и рост в холке до 150 см. Масти характерны в основном саврасые: гнедо-саврасая, мышастая, каурая, булано-саврасая. Типичны темный ремень вдоль позвоночника и потемнения на

шее, холке и плечах, встречается зеброидность на конечностях.

Кушумская порода обладает высокой мясо-молочной продуктивностью и хорошей приспособленностью к кругло-годовому пастбищно-тебеневочному содержанию. Масти преимущественно гнедая, рыжая, бурая, вороная, редко буланая и соловая [1].

Русские верховые лошади относятся к заводским породам спортивного направления. Для русской верховой характерны сухая, крепкая конституция и вороная, караковая, темно-гнедая, гнедая и рыжая масти. Большинство жеребцов-производителей основного центра репродукции – Старожиловского конного завода – имеют рост около 170 см и выше, кобылы маточного состава в среднем 166 см [5].

Монгольские лошади Тэс разводятся в аймаках Увс, Хубсугул и Завхан Монголии. Порода хорошо приспособлена к холодному климату и круглогодичному пастбищному содержанию. Большинство животных имеют гнедую, рыжую и бурую масти. От других пород ее отличают темная густая длинная грива и хвост. У лошадей Тэс сильно развиты грудь и ноги. Они сильны, выносливы и быстры, главное умеют тебеневать. Любопытный факт: в критические моменты гололедицы и джута лошади нередко спасают от гибели стада овец и КРС [6].

Лошади Дархат разводятся одноименной породностью в районе аймака Хубсугул. Дархатская порода отлично приспособлена к условиям высокогорной тайги с экстремальными перепадами температур в течение года. Масть преимущественно серая [6].

В настоящее время во всем мире для сохранения пород лошадей, изучения их происхождения и поддержания высокого уровня генетического разнообразия внутри популяций широко используются микросателлиты (STR) и маркеры, основанные на нуклеотидном полиморфизме различных участков геномной ДНК и мтДНК. Отечественные породы лошадей, особенно аборигенные, недостаточно изучены с использованием молекулярно-генетических подходов, однако именно они сильнее всего нуждаются в оценке уровня генетического разнообразия, степени инбридинга и других параметров, отражающих генетическое благополучие породы и позволяющих определить статус и риски.

Микросателлитные повторы и некодирующие участки митохондриальной ДНК хорошо зарекомендовали себя как маркеры в изучении генетического разнообразия. Они вариабельны, не несут функциональной нагрузки, их комбинации содержат много уникальных сочетаний, которые позволяют устанавливать филогенетические отношения и рассчитывать стандартные популяционно-генетические параметры (число и частоты аллелей, уровни наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, индекс фиксации и др.). Поскольку

статистические методы для анализа маркерных данных основаны на сравнении вероятностных моделей, их интерпретация возможна только в контексте сравнения имеющихся баз данных. Ниже мы приводим результаты анализа опубликованных ранее исследований полиморфизма микросателлитных локусов у различных пород лошадей.

С помощью микросателлитных маркеров были исследованы породы лошадей по всему миру. Использование пересекающихся наборов маркеров позволяет численно сравнивать рассчитываемые параметры генетических оценок между популяциями. Было показано, что наблюдаемая гетерозиготность у четырех аборигенных испанских пород лошадей (0.736 ± 0.025) выше, чем у 10 заводских американских пород (0.694 ± 0.032) и четырех норвежских (0.641 ± 0.060) [7]. В целом для испанских пород отмечен высокий уровень H_o (от 0.700 до 0.752) [8]. Уровень наблюдаемой гетерозиготности у португальской породы пони гаррано составил 0.732 [9], у породы соррайа – 0.506 [10].

Исследование генетического разнообразия 11 средиземноморских пород лошадей по 12 микросателлитным локусам показало, что уровень гетерозиготности колеблется от 0.690 до 0.795. Самый низкий уровень гетерозиготности наблюдался у испанской чистокровной, португальской лузитано и сицилийских популяций лошадей [11].

Самый высокий уровень наблюдаемой гетерозиготности при изучении 20 микросателлитных локусов азиатских пород был получен в популяциях монгольских лошадей (от 0.750 до 0.770). Напротив, японские аборигенные породы отличались низким уровнем генетического разнообразия, по-видимому связанным с малым числом особей в популяциях. Все аллели, обнаруженные у японских пород, встречаются у монгольской лошади. Это позволило авторам работы [12] выдвинуть гипотезу о происхождении японских пород от монгольской лошади. Исследование семи японских аборигенных пород другой группой ученых [13] также выявило низкий уровень полиморфизма по сравнению с другими породами. Были изучены 318 местных и иностранных пород с использованием микросателлитных маркеров и мтДНК. Среди аборигенных пород уровень наблюдаемой гетерозиготности колебался от 0.437 до 0.682. Это значительно ниже значений, полученных для монгольской (0.794), чистокровной верховой (0.711), бретонской (0.735) и першерона (0.688). Низкий уровень разнообразия аборигенных японских пород ученые связывают со значительным снижением численности популяции, произошедшим в XIX в. [13–15].

В России с помощью 17 микросателлитных локусов у лошадей 12 местных пород было протестировано 184 STR-маркера. Число аллелей в микросателлитных локусах варьировало от двух

(HTG6 у печорской лошади) до 14 (ASB17 у алтайской лошади) и в среднем составило 6.82 на локус. Вариабельность общего числа аллелей, определенных в STR-локусах, менялась от 93 до 141, соответственно бурятская и башкирская породы. Число частных микросателлитных аллелей в популяциях варьировало от нуля (бурятская, забайкальская, тувинская и хакасская лошади) до четырех (башкирская лошадь). При этом уникальные STR-аллели были зарегистрированы у лошадей большинства местных пород, включая башкирскую, мезенскую, алтайскую, вятскую, якутскую, печорскую, а также монгольских лошадей и шетлендских пони [16].

Анализ мтДНК является ценным источником информации о происхождении и эволюции видов и популяций. Небольшой размер при консервативности структуры делают анализ мтДНК весьма эффективным методом установления филогенетических отношений [17]. Высокий уровень разнообразия гаплотипов мтДНК лошадей объясняется теорией о неоднократном одомашнивании разных материнских линий лошадей [18]. Согласно модели одомашнивания, предложенной Клаттон-Брок [19], дикие предки, от которых произошли все породы домашних животных, обитали на равнинах Южной России от Украины до Туркестана. Самые ранние прирученные лошади распространились из этой области, образовав в результате искусственного отбора разнообразные типы и породы лошадей [20]. Впоследствии были получены данные, свидетельствующие о том, что распределение гаплотипов мтДНК не связано с географическим ареалом и породной принадлежностью [13]. Однако другой группой ученых была высказана противоположная гипотеза: среди 25 азиатских и европейских пород лошадей выявлено 97 митотипов, сгруппированных в 17 филогенетических кластеров, некоторые из которых соответствовали определенному ареалу обитания или породе [21]. Филогенетическое дерево, построенное на основе анализа гаплогрупп мтДНК лошадей из трех обширных географических регионов (Дальний Восток, Ближний Восток и Европа) [22], позволило выявить пять кластеров, схожих с полученными в работе [18]. Анализ молекулярного разнообразия (AMOVA) нуклеотидных последовательностей лошадей, разделенных на две группы (западную и азиатскую), позволил выявить значимые различия ($P = 0.00782$) между данными группами, а также внутри азиатской группы, что соответствовало географическому распределению выборок. Авторы работы [23] считают, что более детальное изучение азиатских пород лошадей, которые не испытывали на себе воздействия селекции и прилития крови других пород, может пролить свет на происхождение, формирование генетической структуры и собственно процесс доместикировки лошади.

Таблица 1. Описание исследованных популяций

| Название породы | Название популяции | Код | Число особей |
|------------------|--------------------|----------|--------------|
| Алтайская | Чингиз | AltChin | 40 |
| Тувинская | Ирбис | TuvaIrb | 60 |
| | Байлак | BaiLak | 60 |
| | Байдаг | Baidag | 60 |
| | Кошкорлыг | Koshkor | 40 |
| | Арыг-Хем | Aryghem | 60 |
| Кушумская | Итиль | KushItil | 21 |
| Печорская | Печорская | Pechor | 19 |
| Мезенская | Мезенская | Mesen | 124 |
| Забайкальская | Забайкальская | BayBur | 40 |
| Бурятская | Бурятская | Buryat | 51 |
| Монгольская | Дархат | MoDark | 48 |
| | Тэс | MonTes | 50 |
| | Гоби | Gobi | 40 |
| Русская верховая | Русская верховая | RusVer | 153 |
| | | Vcero | 866 |

С целью изучения материнской наследственности японской породы лошадей кисо [24], находящейся на грани вымирания (150 особей), был проведен анализ D-петли мтДНК и выявлено семь гаплотипов (K1–K7). Число гаплотипов породы кисо ниже, чем у пород лузитано (27), липицианской (37), арабской (27), но выше, чем у многих иберийских, южно- и североамериканских пород (2–6 гаплотипа, в среднем 3.8). Небольшое число гаплотипов авторы работы [24] объясняют низкой численностью и эффектом “бутылочного горлышка”, который порода пережила в 1970 г. В породе йонагуни были обнаружены два гаплотипа [14], а у островной породы мийако – всего один гаплотип; идентичный гаплотип встречается в породах токара и йонагуни [15].

Цель нашего исследования состояла в проведении сравнительного анализа генетического разнообразия отечественных и монгольских пород лошадей с использованием ядерных и митохондриальных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Биологический материал для данной работы был получен в ходе экспедиций на Алтай и в Монголию, а также из крио-банка образцов лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен им. Н.И. Вавилова РАН. С соблюдением этических и ветеринарных норм была собрана коллек-

ция цельной крови в пробирках с K3 ЭДТА Vacuette (Greiner Bio-One, Австрия) от 15 выборок лошадей из девяти пород (алтайская, тувинская, кушумская, печорская, мезенская, бурятская, забайкальская, русская верховая и монгольская). Выделение ДНК осуществлялось с использованием набора Magnaprep 200 (Изоген, Москва) в соответствии с инструкцией изготовителя. Всего было получено 866 образцов ДНК. Названия исследованных выборок соответствуют породе, географическому расположению или названию предоставившего материал фермерского хозяйства. Описание выборок представлено в табл. 1.

Оценка концентрации ДНК проводилась с использованием прибора ImplenNanoPhotometerNP80 и в среднем составляла 73.7 нг/мкл для полученных образцов.

Мультиплексный анализ проведен с помощью панели, которая состоит из 17 STR-локусов (АНТ4, АНТ5, ASB2, ASB17, ASB23, CA425, HMS1, HMS2, HMS3, HMS6, HMS7, НТГ4, НТГ6, НТГ7, НТГ10, LEX3 и VHL20). Использована микросателлитная панель, созданная компанией “Гордиз” (Москва), на основе одобренных в ISAG (International Society for Animal Genetics) локусов. Для определения длин аллелей микросателлитов использован генетический анализатор ABI3130xl (Applied Biosystems, США) и программное обеспечение GeneMapper v 4.0 (Applied Biosystems).

Таблица 2. Число аллелей в исследованных популяциях

| AltChin | TuvaIrb | BaiLak | Baidag | Koshkor | Aryghem | KushItil | Pechor |
|---------|---------|--------|--------|---------|---------|----------|--------|
| 126 | 140 | 131 | 144 | 133 | 138 | 119 | 100 |
| Mesen | BayBur | Buryat | MoDark | MonTes | Gobi | RusVer | Всего |
| 126 | 131 | 123 | 122 | 152 | 136 | 118 | 183 |

Для амплификации гипервариабельного участка контрольного региона мтДНК использовали праймеры Eq1F (CCCTGAAGAAAGAACCAGATG) и Eq1R (GAGTCCCTGTAGTATATCGCA). Амплификацию проводили в следующем режиме: начальная денатурация – 2 мин при 95°C, денатурация 30 с при 95°C, отжиг 30 с при 58°C, синтез 1 мин при 72°C. Финальный синтез 10 мин при 72°C. Число циклов – 35.

Для очистки продуктов ПЦР контрольного региона мтДНК их фракционировали в 1%-ном агарозном геле (смесь 1 : 1 легко- и тугоплавкой агарозы) с использованием в качестве маркера молекулярных масс 1kb DNA LadderPlus (GeneRuler™). Экстракцию продуктов ПЦР из геля проводили с использованием набора Get Quick Gel Extraction Spin Kit/250 (Genomed™) по методике фирмы изготовителя.

Определение нуклеотидной последовательности в исследуемом фрагменте проводили методом автоматического секвенирования на генетическом анализаторе ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США) с использованием наборов BigDye™ Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystem). При секвенировании каждая последовательность считывалась с обоих концов. Длина амплифицированного участка составляет 516 пн (в области 15341–15857 пн D-петли мтДНК). После обработки длина полученных нуклеотидных последовательностей составила 398 пн (15399–15797 пн, нумерация соответствует референтной последовательности мтДНК NC_001640, GenBank). Полученные нами нуклеотидные последовательности зарегистрированы в базе данных GenBank под номерами JQ936335–JQ936476.

Для оценки уровня генетического разнообразия в программе GenAlEx [25] были рассчитаны следующие показатели: наблюдаемая (H_o), ожидаемая (H_e) и несмещенная ожидаемая гетерозиготность (uH_e) (Nei, 1978), среднее число аллелей на локус (N_a), число эффективных аллелей на локус (N_e) и индекс фиксации (F_{is}). Генетические расстояния между популяционными выборками вычисляли как парные значения Jost's D [26], с помощью функции pairwise_D() из R-пакета mmod [27].

Выравнивание последовательностей гипервариабельного района мтДНК осуществляли при помощи программы ClustalW с использованием

программы ChromasPro Technelysium Pty Ltd (version 1.34). Для обработки данных нуклеотидных последовательностей использовали также программный пакет DNASTAR Lasergene (version 7.0.0). Для статистической обработки была использована программа Arlequin (version 3.5.1.2). Построение дендрограммы и частичная статистическая обработка данных были осуществлены в программе MEGA (version 5.05). Дендрограмма генетического сходства была построена методом ближайшего соседа (neighbour-joining) по числу различий (number of differences). Построение сети Neighbor-Net осуществлялось в программе SplitsTree 4.10 по генетическим расстояниям Jukes & Cantor. Для построения медианной сети была использована программа Network 4.6.1.0 и DNA Alignment 1.3.1.1 (Fluxus Technology Ltd, Великобритания) для создания выравнивания в rdf-формате.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для 15 исследованных выборок девяти пород лошадей ($n = 866$) с использованием стандартной микросателлитной панели из 17 локусов было выявлено 183 аллеля, которые представлены в табл. 2.

Для всех исследованных популяций характерна высокая представленность различных аллелей (от 100 до 152 у печорской и монгольской Тэс соответственно). Данная информация подтверждает общепризнанный факт, что локальные породы обладают повышенным генетическим разнообразием при достаточной для нормального разведения численности (табл. 2). Например, у заводской русской верховой породы число аллелей (118) невелико относительно размера выборки (153), что косвенно свидетельствует о снижении разнообразия вследствие давления селекции. Для сравнения среди 34 пород лошадей, разводимых во Франции, число аллелей для разных выборок варьировало от 119 до 255 [28].

Наибольшее число аллелей было обнаружено для локусов ASB17 (21) и ASB23 (15), а наименьшее – для локуса HTG7 (6) (табл. 3).

Выявлено 15 частных аллелей для следующих выборок и пород: монгольские Тэс, Гоби и Дархат; тувинские Байдаг, Арыг-хем, Ирбис, Кошкорлыг; алтайская Чингиз; кушумская Итиль; мезенская. Наибольшее число частных аллелей (породо-специфичных) было выявлено среди лошадей ту-

Таблица 3. Число аллелей на локус

| VHL20 | HTG4 | АНТ4 | HMS7 | HTG6 | АНТ5 | HMS6 | ASB23 | CA425 |
|-------|-------|------|------|------|-------|------|-------|-------|
| 11 | 7 | 12 | 8 | 10 | 11 | 7 | 15 | 10 |
| ASB2 | HTG10 | HTG7 | HMS3 | HMS2 | ASB17 | LEX3 | HMS1 | Всего |
| 12 | 12 | 6 | 9 | 12 | 21 | 13 | 7 | 183 |

винской (6), монгольской (5) и алтайской (2) пород. Не было обнаружено частных аллелей для представителей русской верховой, печорской, бурятской и забайкальской пород, что может свидетельствовать о снижении генетического разнообразия или являться следствием небольшого размера выборки (кроме русской верховой).

Следует отметить, что в монгольской популяции лошадей породы Тэс в локусе АНТ4 был выявлен редкий аллель D, а также впервые обнаружен аллель длиной в два повтора или с возможной делецией вне области повтора. Его размер составил 124 пн.

В табл. 4 представлены популяционно-генетические параметры для исследуемых выборок лошадей. Наиболее низкое число различных аллелей было отмечено у печорской (5.882) и русской верховой (6.941). Численность конематок печорской породы на данный момент ниже 100 голов, что отражается в относительно невысоком числе аллелей, а также в относительно низком значении индекса Шеннона (1.489). Уровень наблюдаемой гетерозиготности у всех исследуемых выборок оказался сравнительно высоким, в том числе у печорской (0.700) и русской верховой пород (0.699). Однако в работе 2008 г. Храбровой и Зайцева значение данного параметра для печорской породы было выше (0.726) [16]. Это может свидетельствовать о негативных процессах, происходящих в породе, таких как снижение численности поголовья и уровня генетического разнообразия. Уровни наиболее высокой наблюдаемой гетерозиготности среди всех изученных пород зафиксированы в тувинской выборке Кошкорлыг (0.798) и у забайкальской породы (0.767). Сравнение полученных нами данных с результатами предыдущих исследований [16] позволяет оценить изменения параметров в динамике. По результатам мониторинга уровень наблюдаемой гетерозиготности тувинской и забайкальской пород возрос (0.748 и 0.732 соответственно), так же как у мезенской (от 0.693 до 0.703) и бурятской (от 0.694 до 0.735). Несмотря на одинаковый метод анализа, данная оценка уровней наблюдаемой гетерозиготности может варьировать в связи с различным объемом выборок и репрезентативностью генеральной совокупности, в данном случае породы.

Наибольшие значения индекса фиксации F (0.055) были получены для монгольской популя-

ции Тэс, наименьшие – для тувинской Кошкорлыг (–0.033). При схожем типе содержания данных двух выборок, по-видимому, существуют факторы, которые приводят к снижению числа гетерозигот в первом случае и увеличению во втором, возможно связанные с особенностью среды обитания или отбором.

Более половины (51%) различий генетического разнообразия среди исследуемых выборок был обеспечен на уровне особей, вклад различий между индивидами и между популяциями находился на уровне 25 и 24% соответственно (табл. 5).

Наибольшие значения коэффициентов инбридинга (F_{mean} , рис. 1) были получены для русской верховой и кушумской Итиль, что свидетельствует о снижении уровня генетического разнообразия в этих породах. Небольшие значения коэффициентов инбридинга у тувинской породы лошадей (выборки Байдаг, Кошкорлыг и Арыг-Хем), а также у алтайской и забайкальской пород отражают благополучную селекционную ситуацию и высокий уровень генетического разнообразия.

Наибольшие генетические расстояния (рис. 2) выявлены между русской верховой и монгольской Дархат (0.31), а наименьшие расстояния – между монгольскими Тэс и Гоби (0.05), а также между монгольской Тэс и тувинской Ирбис (0.05). Мезенская и русская верховая породы в целом отличаются наибольшим генетическим расстоянием от других пород.

Исследуемые выборки лошадей разводят в различных географических и климатических областях России и Монголии, где они используются в качестве рабочих и верховых лошадей, а также для получения молока и мяса. Различные условия обитания и цели использования отражаются в особенностях группировки популяций по кладам дендрограммы (рис. 3). Среди исследованных пород русская верховая – единственная выведенная человеком специально для верховой езды порода. Ее объединение в общую кладу с тувинской Арыг-Хем может свидетельствовать об общих предках применявшихся в СССР пород улучшателей. Хорошо известно, что для улучшения верховых качеств и резвости повсеместно применялись скрещивание верховых пород с местными лошадьми. Мезенская порода лошадей с высоким уровнем достоверности оказалась близкой бурятской по-

Таблица 4. Популяционно-генетические показатели для исследуемых выборок

| Популяция | N_a | N_e | I | H_o | H_e | F |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| AltChin | 7.412 | 4.543 | 1.650 | 0.756 | 0.761 | 0.009 |
| | 0.462 | 0.312 | 0.066 | 0.032 | 0.019 | 0.030 |
| TuvaIrb | 8.235 | 4.579 | 1.663 | 0.755 | 0.754 | -0.005 |
| | 0.572 | 0.381 | 0.079 | 0.020 | 0.021 | 0.022 |
| KushItil | 7.000 | 4.441 | 1.613 | 0.725 | 0.753 | 0.032 |
| | 0.402 | 0.335 | 0.070 | 0.028 | 0.019 | 0.036 |
| Pechor | 5.882 | 4.124 | 1.489 | 0.700 | 0.723 | 0.026 |
| | 0.445 | 0.369 | 0.088 | 0.047 | 0.026 | 0.056 |
| BayBur | 7.706 | 4.654 | 1.682 | 0.767 | 0.769 | 0.005 |
| | 0.554 | 0.320 | 0.066 | 0.029 | 0.016 | 0.028 |
| Gobi | 8.000 | 4.650 | 1.701 | 0.737 | 0.765 | 0.036 |
| | 0.582 | 0.329 | 0.073 | 0.026 | 0.018 | 0.028 |
| Mesen | 7.412 | 4.037 | 1.534 | 0.703 | 0.722 | 0.025 |
| | 0.536 | 0.278 | 0.081 | 0.033 | 0.030 | 0.022 |
| Buryat | 7.235 | 4.196 | 1.583 | 0.735 | 0.746 | 0.012 |
| | 0.450 | 0.259 | 0.060 | 0.022 | 0.017 | 0.028 |
| MoDark | 7.176 | 4.253 | 1.567 | 0.718 | 0.738 | 0.023 |
| | 0.472 | 0.381 | 0.071 | 0.034 | 0.020 | 0.040 |
| BaiLak | 7.412 | 4.422 | 1.566 | 0.725 | 0.717 | -0.012 |
| | 0.728 | 0.440 | 0.128 | 0.050 | 0.050 | 0.017 |
| Baidag | 8.059 | 4.159 | 1.567 | 0.719 | 0.709 | -0.013 |
| | 0.774 | 0.396 | 0.118 | 0.049 | 0.048 | 0.013 |
| MonTes | 8.941 | 5.031 | 1.769 | 0.728 | 0.771 | 0.055 |
| | 0.745 | 0.448 | 0.087 | 0.057 | 0.025 | 0.064 |
| RusVer | 6.941 | 3.857 | 1.463 | 0.699 | 0.709 | 0.009 |
| | 0.496 | 0.292 | 0.079 | 0.031 | 0.027 | 0.031 |
| Koshkor | 7.824 | 4.683 | 1.707 | 0.798 | 0.773 | -0.033 |
| | 0.404 | 0.285 | 0.054 | 0.021 | 0.014 | 0.021 |
| Aryghem | 8.118 | 4.768 | 1.687 | 0.752 | 0.760 | 0.009 |
| | 0.737 | 0.429 | 0.090 | 0.027 | 0.023 | 0.021 |

Примечание. N_a – число различных аллелей, N_e – число эффективных аллелей, I – информационный индекс Шеннона, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации. Верхняя строка – среднее значение, нижняя строка – стандартная ошибка.

роде возможно по причине схожих условий обитания на севере страны. Монгольские Тэс и Дархат разместились в общем кластере дерева, что свидетельствует об их родстве, как и тувинских Байдаг, Байлак и Ирбис между собой. Забайкальская, тувинская Кошкорлыг и монгольская Гоби с невысоким значением бутстреп-поддержки оказались в общей кладе дерева, что скорее отражает отсутствие других близкородственных популяций нежели их фактическое родство.

Для определения структуры популяций был использован байесовский анализ на основе метода Марковских цепей Монте-Карло (MCMC) в программе STRUCTURE (рис. 4). Для определе-

ния оптимального числа кластеров (K) была рассчитана статистика ΔK от 2 до 7. Наиболее достоверное разделение было продемонстрировано при $K = 2$, при котором выборки разделялись на кластеры: 1) русская верховая и 2) все остальные. При $K = 3$ выделены кластеры: 1) русская верховая, 2) мезенская и 3) остальные популяции. При $K = 5$ выделялись в отдельные кластеры следующие популяции: 1) русская верховая, 2) мезенская, 3) тувинские Байлак и Байдаг, 4) бурятская, монгольская Дархат и тувинская Арыг-Хем, 5) остальные.

Мезенская и печорская лошади ожидаемо оказались изолированы генетически от остальных пород, расположенных южнее, как видно из

Таблица 5. Генетическое разнообразие исследуемых пород лошадей на основе анализа молекулярной дисперсии (AMOVA) микросателлитных локусов

| Изменчивость | <i>d.f.</i> | SS | MS | % |
|----------------------|-------------|------------|----------|-----|
| Между популяциями | 14 | 88616.947 | 6329.782 | 24 |
| Между особями | 851 | 193511.877 | 227.394 | 25 |
| Внутрииндивидуальная | 866 | 100099.500 | 115.588 | 51 |
| Всего | 1731 | 382228.324 | | 100 |

Примечание. *d.f.* – число степеней свободы, SS – сумма квадратов, MS – средние квадраты, % – процент изменчивости.

представленной миграционной сети (рис. 5). Бурятская является донором аллелей для тувинской Кошкорлыг, алтайская – для забайкальской, монгольская Дархат – для монгольской Тэс, а русская верховая – для забайкальской и тувинской Арыг-Хем. Между остальными представлен-

ными выборками осуществляется интенсивный обмен генетическим материалом в различных направлениях, наиболее интенсивно между тувинскими Ирбис, Кошкорлыг, Байлаг и Байдаг, монгольскими Гоби и Тэс. Подобный активный обмен аллелями и относительно высокий уровень

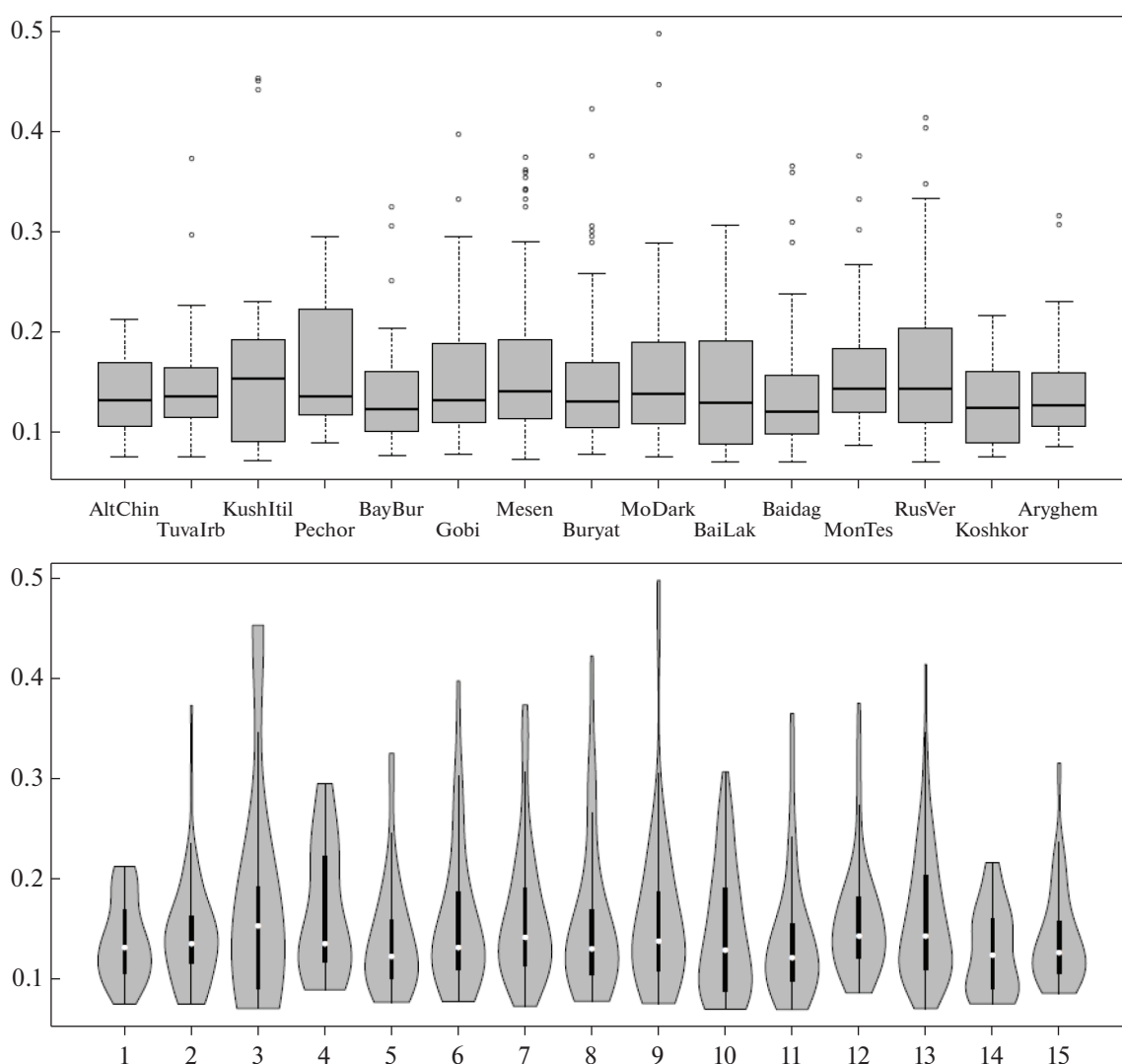


Рис. 1. Вертикальные графики плотностей распределения коэффициентов инбридинга лошадей для 15 исследуемых популяций. Внутри каждой диаграммы белые точки указывают медиану, а черный отрезок – межквартильный диапазон.

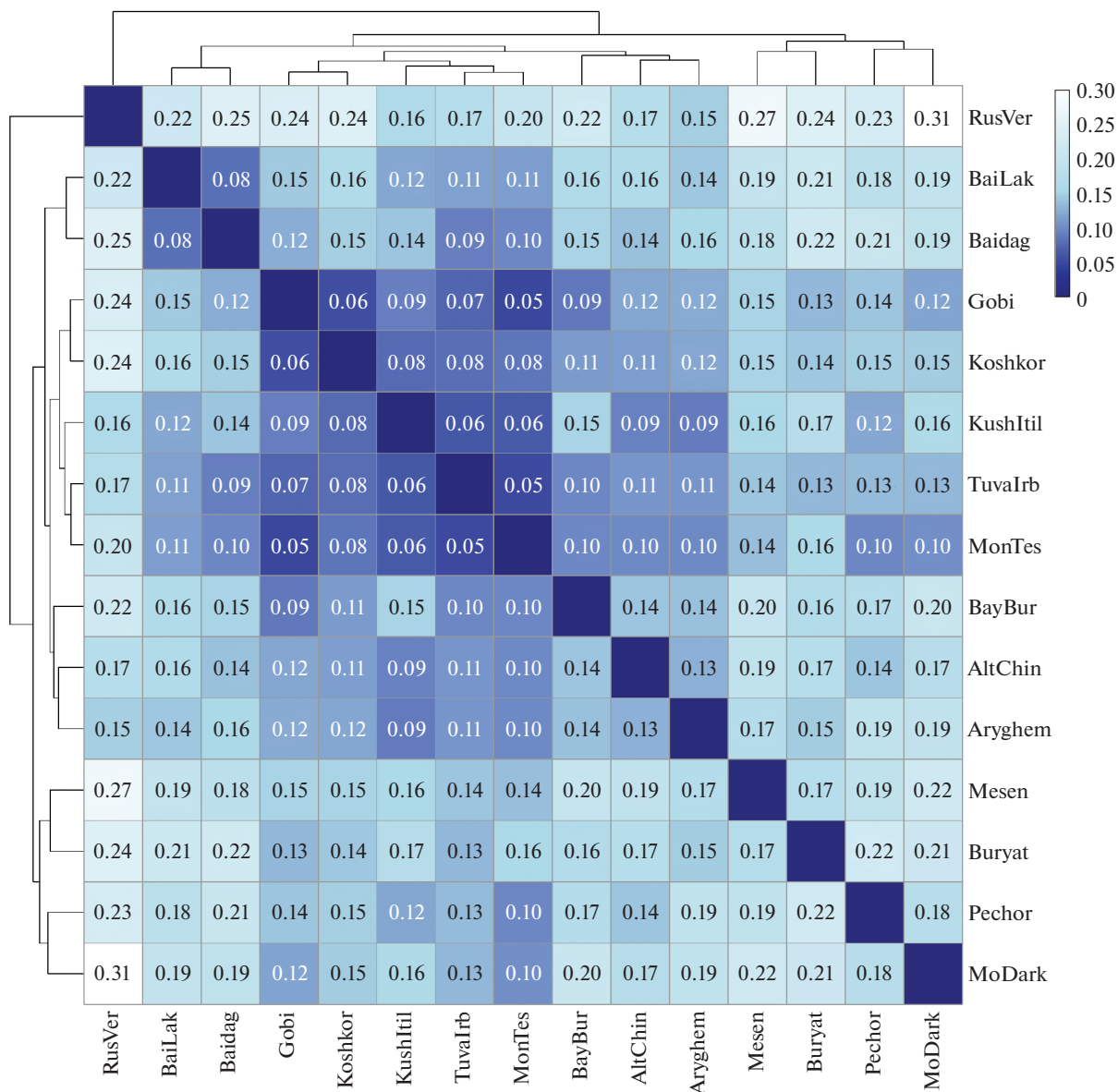


Рис. 2. Визуализация попарных генетических дистанций (по Jost) между исследуемыми выборками. Интенсивность цвета квадрата пропорциональна генетическому расстоянию.

генетического разнообразия могут отражать не только благополучие пород, но свидетельствовать о снижении чистопородности и потенциальной метизации (межпородной гибридизации) тувинских и монгольских лошадей.

В настоящей работе наиболее информативными (по значениям PIC, рис. 6) для микросателлитного анализа исследуемых популяций лошадей оказались локусы VHL20, ASB17, АНТ4 и ASB23. Наименьший информационный вклад внесли локусы НТG4, НТG6, НТG7 и НMS1. При этом уровень информативности каждого локуса различается от популяции к популяции.

Определены нуклеотидные последовательности контрольного региона D-петли мтДНК для 142 образцов из шести выборок (трех монгольских: из пустыни Гоби, Центральной и Северной Монголии; тувинской Арыг-Хем, забайкальской и бурятской). Полученные результаты даны в табл. 6.

В табл. 6 представлены сводные данные по числу замен, транзиций, трансверсий и нуклеотидному разнообразию для полученных нуклеотидных последовательностей контрольного региона мтДНК и для последовательностей из базы данных GenBank. Для анализа из 1756 последовательностей современных лошадей было отобрано

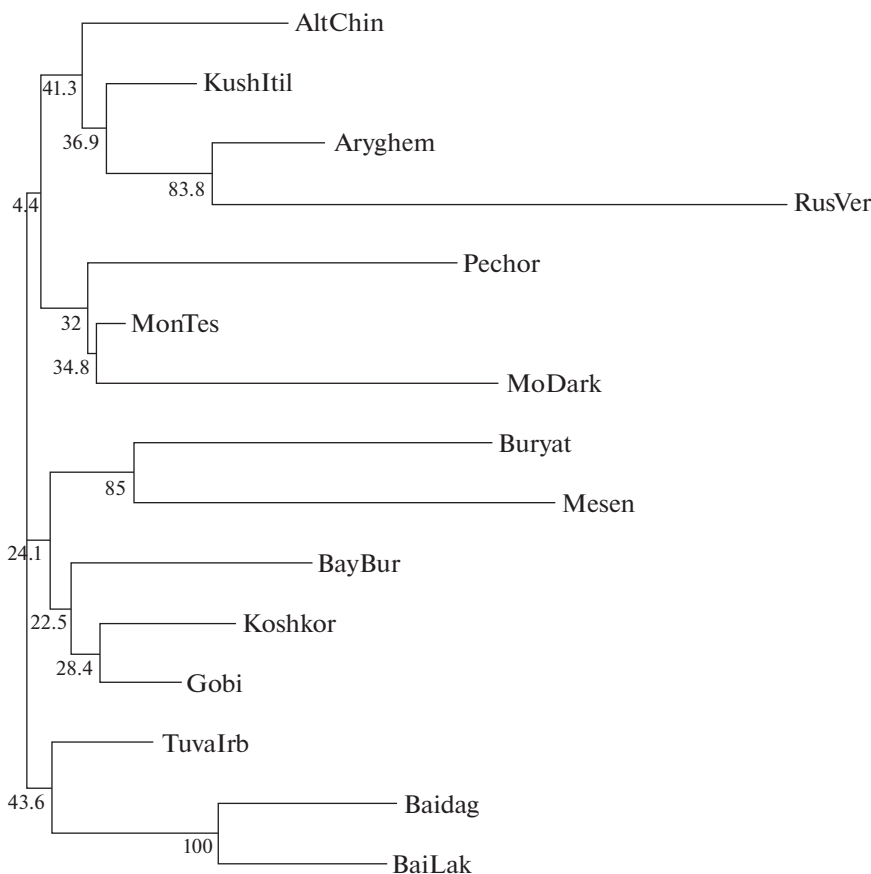


Рис. 3. Дендрограмма, построенная методом NJ (Neighbor-Joining) с бутстрэп-поддержкой (1000 итераций) на основе генетических расстояний Нея, для исследуемых популяций лошадей.

267, среди которых представлены все показанные авторами [29] гаплотипы и разнообразные породы. Наибольшее число замен было получено для монгольской популяции из пустыни Гоби и тувинской Арыг-Хем, наименьшее — для лошади Пржевальского, что может быть связано с небольшим числом исследуемых образцов и инбредной депрессией. Сайты с уникальными заменами были обнаружены в арабской, вятской, корейской чейю, китайской дебао, эксмур, польский коник, дуэлменер, лузитано, поттока и сицилийской выборках. Наибольшие значения нуклеотидного разнообразия были получены для сицилийской (0.030) выборки и лузитано (0.031), наименьшие — для лошади Пржевальского (0.000) и породы соррайя (0.007), которая находится на грани вымирания. Нуклеотидное разнообразие изучаемых популяций Саяно-Алтайского региона находится на высоком уровне (0.021–0.028). Обнаружены четыре горячие точки мутаций (15585, 15597, 15650 и 15604), которые были описаны в предыдущих работах [21, 29].

На основе полученных нуклеотидных последовательностей была построена дендрограмма методом Neighbor-Joining [30] в программе

MEGA 5.05 (рис. 7). В качестве корня была использована нуклеотидная последовательность D-петли осла (*Equus asinus*) как близкородственного вида лошади домашней, дивергенция которого от общего предка произошла около двух млн лет назад. Оценка надежности ветвей филогенетического дерева проведена с использованием бутстрэп-анализа [31] с использованием 1000 случайных выборок.

На дендрограмме (рис. 7) выделяется кластер северных пород — тувинской, забайкальской, северомонгольской и бурятской популяций. Промежуточное положение занимает центральномонгольская популяция и отдельно кластеризуется монгольская популяция из Гоби. Использование другого типа молекулярных маркеров, так же как и использование микросателлитного анализа, позволило выделить монгольскую лошадь из пустыни Гоби в отдельную от других монгольских породную группу.

Метод построения филогенетических сетей Neighbor-Net [32] основан на расчете генетических расстояний и усовершенствованном алгоритме ближайшего соседа (Neighbor-Joining). Neighbor-

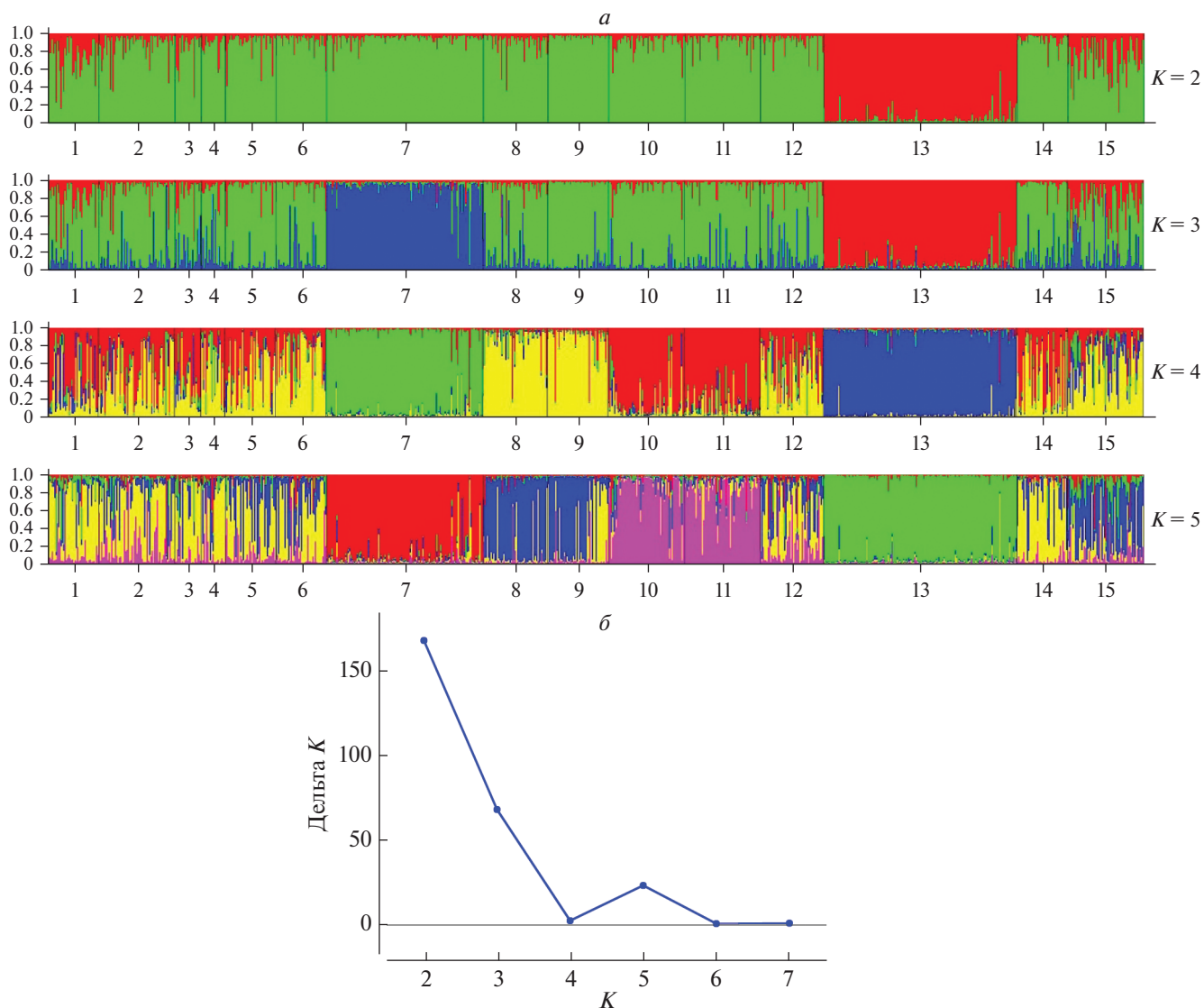


Рис. 4. Результаты анализа STRUCTURE на основе микросателлитных данных исследуемых популяций лошадей. *a* – цветное деление столбца отражает принадлежность каждого животного к одному из заданного числа кластеров K ($K = 2-5$). Нумерация популяций: 1 – алтайская Чингиз, 2 – тувинская Ирбис, 3 – кушумская Итиль, 4 – печорская, 5 – забайкальская, 6 – монгольская Гоби, 7 – мезенская, 8 – бурятская, 9 – монгольская Дархат, 10 – тувинская Байлак, 11 – тувинская Байдаг, 12 – монгольская Тэс, 13 – русская верховая, 14 – тувинская Кошкорлыг, 15 – тувинская Арыг-Хем; *b* – значения дельта K , рассчитанные по методу Evanno для $K = 2-7$.

Net позволяет получить характеристику данных для детального анализа и выявить связи между более чем двумя образцами. В отличие от метода ближайшего соседа Neighbor-Net при построении дихотомии дерева позволяет отобразить конфликт в имеющихся данных независимо от его происхождения (ошибка эксперимента или рекомбинация).

Для построения сети Neighbor-Net в программе SplitsTree 4.10 были использованы полученные нами нуклеотидные последовательности D-петли, а также последовательности 1754 современных лошадей, полученные из базы данных GenBank в соответ-

ствии с работой [29]. При этом были убраны идентичные нуклеотидные последовательности и имеющие большое число ошибок секвенирования, таким образом для анализа были использованы 228 последовательностей, из которых 142 получены в процессе нашей работы и отмечены разноцветными точками (рис. 8). Как мы можем наблюдать, полученные нами нуклеотидные последовательности расположены практически во всех кластерах сети, что свидетельствует о высоком уровне генетического разнообразия аборигенных лошадей России и Монголии. Нуклеотидные последовательности монгольской лошади из

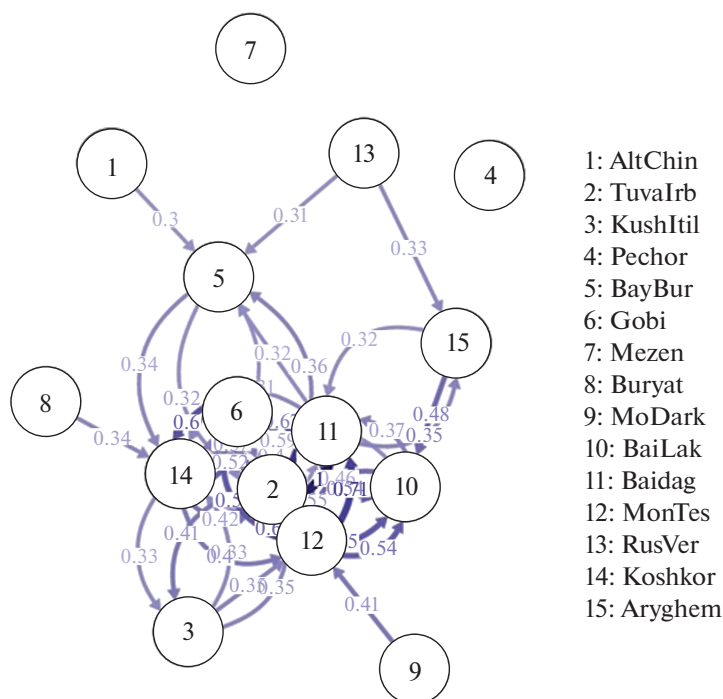


Рис. 5. Миграционная сеть исследуемых пород лошадей.

Гоби и тувинской породы присутствуют во всех ветвях сети, к тому же тувинская популяция образует уникальный кластер IV, где отсутствуют образцы из других выборок кроме тувинской и монгольской Гоби (один образец). Северомонгольская выборка встречается преимущественно в I кластере (14 образцов из 26), почти отсутствует в V и VI, полностью отсутствует в II и IV. Центральномонгольская выборка располагается преимущественно в V и VI, отсутствует в I, IV и VII. Большинство образцов забайкальской породы локализуется в VII кластере (11 из 25) и присутствуют во всех кластерах кроме IV. Последовательности из бурятской выборки преимущественно обнаруживаются в VI и II кластерах и полностью отсутствуют в IV и V.

В I кластере преимущественно встречаются образцы из северомонгольской, из пустыни Гоби и бурятской выборок, а также примитивные породы (дебао, чейю, монгольская, якутская и норвежская фьордовая) и восточные породы лошадей (арабская, берберийская, ахалтекинская). Во II кластере выявлены все изученные нами выборки, кроме северомонгольской, и примитивные породы (чейю, исландская, якутская) и восточные (арабская, берберийская, ахалтекинская). В III кластере обнаружены образцы из всех изученных нами выборок, а также восточные породы (ахалтекинская, фулани) и примитивные (чейю, дебао). Единственными породами, обнаруженными в IV кластере, оказались тувинская и мон-

гольская Гоби. Преимущественно европейские породы (лузитано, поттока, дуэлменер) были обнаружены в V кластере вместе с изученными нами породами (кроме бурятской). В VI кластере встречаются все исследуемые нами выборки и европейские породы лошадей (сицилийская местная, шетлендский пони, лузитано). В последнем VII кластере выявлены образцы из всех изученных нами популяций (кроме центральномонгольской), а также локальные лошади (якутская, дебао, чейю и лошадь Пржевальского) и европейские породы (польский коник, лузитано, соррайа).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высоком уровне полиморфизма последовательностей D-петли мтДНК лошадей тувинской породы и монгольской Гоби, обнаруженных во всех кластерах сети и даже образующих отдельную группу, где не встречаются образцы других пород.

На основе объединения полученных нами и представленных в базе данных нуклеотидных последовательностей 409 современных лошадей из 28 выборок и 207 древних была построена медианная сеть в программе Network методом MJ (Median-Joining) [33] и алгоритма MP [34], позволяющего убрать избыточные медианные векторы и связи. Все настройки были стандартными за исключением опции "frequency>1", при использовании которой отражаются только гаплотипы, которые встречаются в выборке более одного раза.

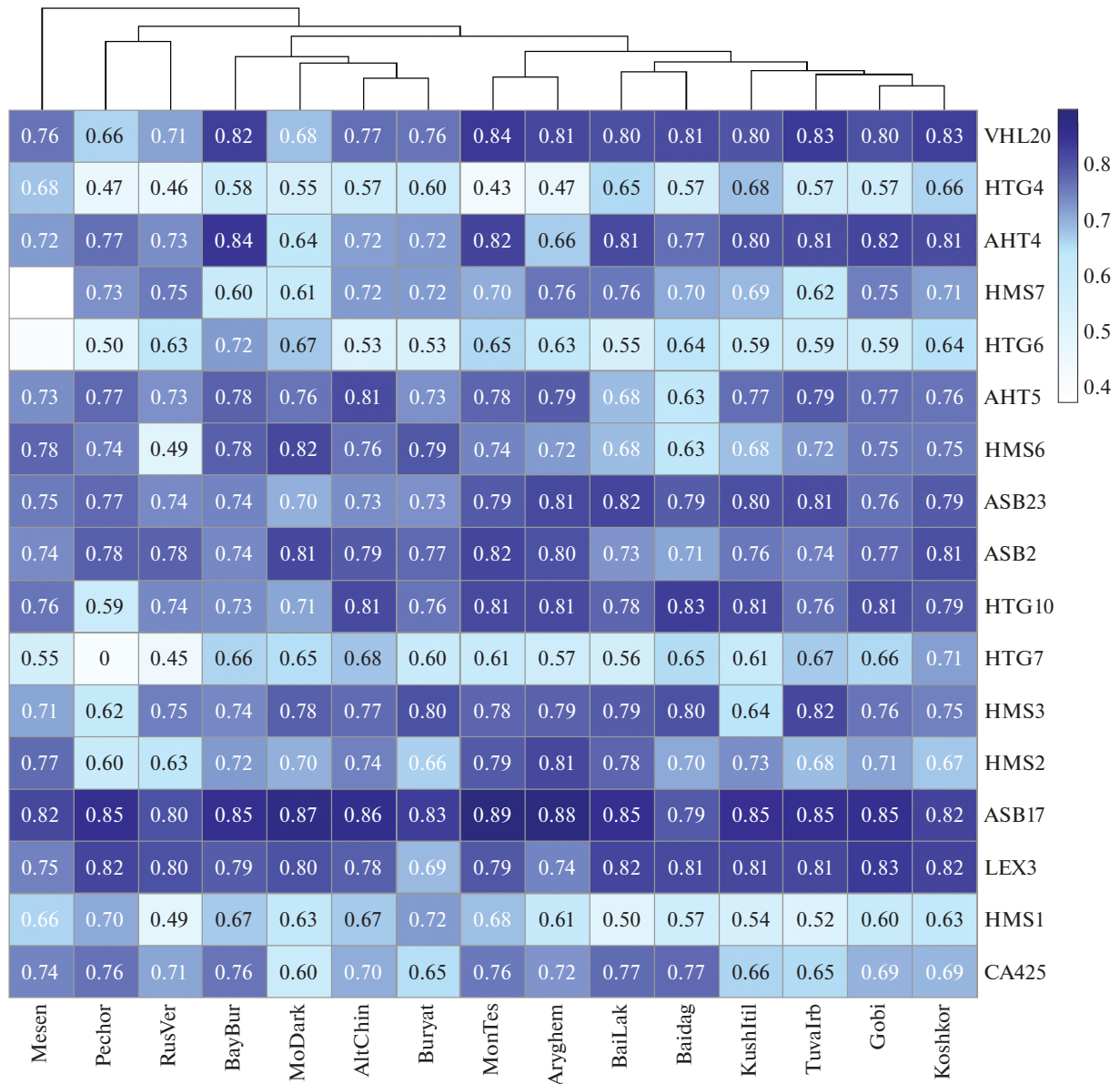


Рис. 6. Величина информационного полиморфизма (polymorphism information content, PIC) для исследуемых выборок и локусов. Интенсивность цвета клетки пропорциональна значению PIC.

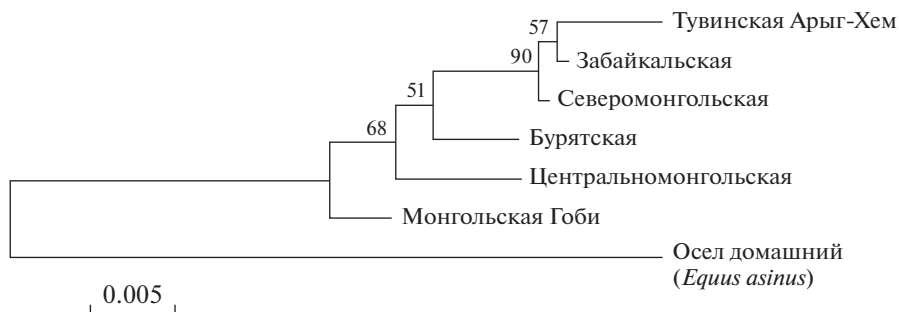


Рис. 7. Дендрограмма, построенная методом Neighbor-Joining в программе MEGA 4.3 по данным нуклеотидных последовательностей для шести популяций лошадей. Над ветвями указаны значения бутстрэп-поддержки >50.

Таблица 6. Характеристики полученных нуклеотидных последовательностей в области D-петли мтДНК

| Порода | Число | | | | | Нуклеотидное разнообразие |
|-----------------------|----------|-----------|-------------|-------|-------------------------------|---------------------------|
| | образцов | транзиций | трансверсий | замен | сайтов с уникальными заменами | |
| Монгольская из Гоби | 25 | 27 | 2 | 29 | 0 | 0.025 ± 0.014 |
| Северомонгольская | 26 | 17 | 2 | 19 | 0 | 0.021 ± 0.012 |
| Центральномонгольская | 20 | 16 | 0 | 16 | 0 | 0.024 ± 0.014 |
| Тувинская | 25 | 26 | 1 | 27 | 0 | 0.028 ± 0.015 |
| Забайкальская | 24 | 21 | 0 | 21 | 0 | 0.024 ± 0.013 |
| Бурятская | 22 | 25 | 2 | 27 | 0 | 0.025 ± 0.014 |
| Фулани | 9 | 13 | 0 | 13 | 2 | 0.026 ± 0.015 |
| Ахалтекинская | 19 | 13 | 0 | 13 | 0 | 0.017 ± 0.009 |
| Анатолийская | 17 | 17 | 0 | 17 | 0 | 0.021 ± 0.012 |
| Арабская | 21 | 17 | 0 | 17 | 2 | 0.013 ± 0.008 |
| Берберийская | 21 | 22 | 0 | 22 | 0 | 0.022 ± 0.012 |
| Норв. фьордовая | 9 | 18 | 0 | 18 | 0 | 0.024 ± 0.014 |
| Якутская | 15 | 20 | 0 | 20 | 2 | 0.022 ± 0.012 |
| Вятская | 15 | 15 | 0 | 15 | 1 | 0.018 ± 0.011 |
| Исландская | 7 | 16 | 0 | 16 | 0 | 0.025 ± 0.015 |
| Корейская чейю | 21 | 19 | 0 | 19 | 1 | 0.020 ± 0.011 |
| Китайская дебао | 21 | 24 | 0 | 24 | 6 | 0.024 ± 0.013 |
| Эксмурский пони | 12 | 20 | 0 | 20 | 3 | 0.024 ± 0.014 |
| Польский коник | 5 | 11 | 0 | 11 | 1 | 0.025 ± 0.016 |
| Шетлендский пони | 15 | 21 | 0 | 21 | 0 | 0.028 ± 0.015 |
| Дуэлменер | 9 | 10 | 1 | 11 | 1 | 0.011 ± 0.007 |
| Лузитано | 10 | 20 | 0 | 20 | 1 | 0.031 ± 0.018 |
| Соррайа | 10 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0.007 ± 0.005 |
| Гаррано | 5 | 16 | 0 | 16 | 0 | 0.027 ± 0.018 |
| Марисмено | 11 | 12 | 0 | 12 | 0 | 0.023 ± 0.013 |
| Сицилийская | 11 | 24 | 0 | 24 | 1 | 0.030 ± 0.017 |
| Поттока | 3 | 10 | 0 | 10 | 1 | 0.027 ± 0.022 |
| Лошадь Пржевальского | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.000 ± 0.000 |

Обозначения гаплотипов соответствуют приведенным в работе Cieslak et al. [29]. Всего авторами было выявлено 87 гаплотипов мтДНК лошадей, из которых 48 встречались только у древних лошадей и не обнаружены у современных. Среди полученных нами образцов было выявлено 16 гаплотипов (A, B, B1, D, D2, D3, I, Gx4, K2, K2b, K2b1, X2, X2b, X3, X3c1, X4a). Самыми распространенными гаплотипами являются X2 и D3.

Как видно из представленной медианной сети (рис. 9), большинство забайкальских образцов имеют гаплотипы X3c1, X2 и D2. Для тувинских лошадей характерны гаплотипы X2b, D3 и A. У бурятских лошадей чаще встречаются гаплотипы I, D и D3; у монгольских Гоби – A, X2b, и X3; у цен-

тральномонгольских – X2b, A и B1; у северомонгольских – D2, D3 и K2. Среди монгольской, бурятской, забайкальской и тувинской пород были выявлены гаплотипы, идентичные гаплотипам древних лошадей Европы и Азии (A, D2, D3, группы X2). Как было показано ранее, большинство гаплотипов не привязано к определенной породе или географической области, в различных популяциях различаются лишь набор и частоты гаплотипов [29]. Вероятно, это связано с многократными событиями доместикации, благодаря которым мтДНК лошадей так высокополиморфна, а также с активным перемещением лошадей в мире, различными типами скрещиваний и селек-

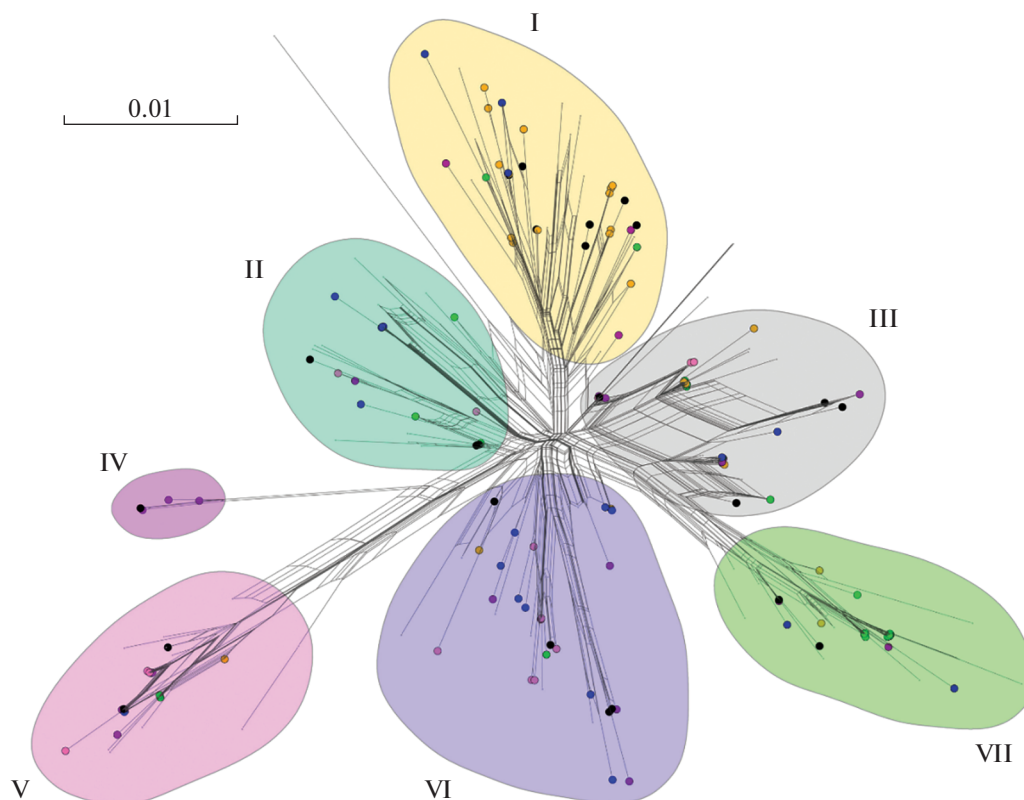


Рис. 8. Сеть Neighbor-Net, построенная по генетическим расстояниям Jukes & Cantor по данным нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК лошадей. Различными цветами точек обозначены полученные нами последовательности: черным – монгольская Гоби, оранжевым – северомонгольская, розовым – центральномонгольская, сиреневым – тувинская, зеленым – забайкальская, синим – бурятская. I–VII – объяснение в тексте.

ционной историей, во многом связанной с человеком.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наблюдаемая гетерозиготность среди исследуемых выборок находится на высоком, не вызывающем опасения уровне, даже наиболее низкие значения. Значения H_o для печорской (0.700) и русской верховой (0.699) пород не вызывают опасений, хотя вышеуказанные породы малочисленны. Наибольшие значения наблюдаемой гетерозиготности были обнаружены для выборок тувинской Кошкорлыг (0.798) и забайкальской породы (0.767), что совместно с минимальным уровнем инбридинга свидетельствует о благополучии данных пород и низких генетических рисках, связанных с селекцией и снижением численности. Мониторинг уровня наблюдаемой гетерозиготности (в сравнении с данными ВНИИК от 2008 г. [16]) позволил выявить положительный тренд к росту данного показателя для тувинской, забайкальской, мезенской и бурятской пород. Лишь у печорской породы наблюдается снижение уровня H_o , что вызывает озабоченность статусом породы

и требует активных действий по увеличению численности племенного ядра, подбору оптимальных пар и динамической оценке генетического разнообразия.

Наиболее генетически близкородственными оказались монгольские лошади Тэс и из пустыни Гоби совместно с тувинской Ирбис. Родство двух монгольских выборок не вызывает вопросов, в то время как тувинская популяция Ирбис находится в центре миграционной сети и принимает активное участие в обмене аллелями с другими исследованными выборками, что свидетельствует в пользу ее метизации.

Анализ структуры популяций позволил выделить в отдельные кластеры мезенскую и русскую верховую породы, которые также отличаются наибольшими генетическими дистанциями от остальных исследованных выборок, остальные выборки не демонстрировали четкого разделения при увеличении числа кластеров (K), что совместно с анализом миграционных сетей свидетельствует о панмиксии местных пород лошадей, обитающих в близких к естественным условиям на табунном выпасе (традиционное животноводство), и ин-

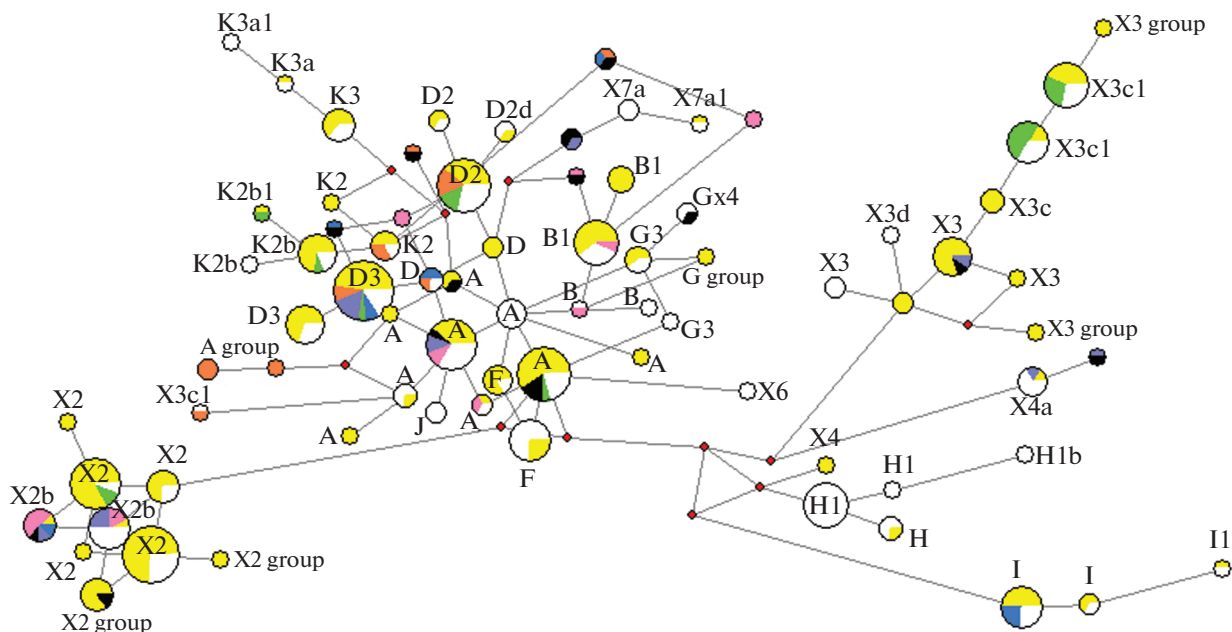


Рис. 9. Медианная сеть на основе 409 нуклеотидных последовательностей D-петли мтДНК современных лошадей и 207 древних. Гаплотипы указаны рядом или внутри кругов. Цветами обозначены различные выборки: желтым – образцы из базы данных, белым – древние, черным – монгольская выборка из Гоби, оранжевым – северомонгольская, розовым – центральномонгольская, сиреневым – тувинская, зеленым – забайкальская, синим – бурятская.

тенсивном генетическом обмене между тувинскими и монгольскими популяциями.

Выявлены гаплотипы мтДНК, идентичные древним гаплотипам лошадей Европы и Азии среди монгольской, забайкальской, бурятской и тувинской пород лошадей при анализе нуклеотидной последовательности гиперварибельного контрольного региона мтДНК (D-петли). Последние исследования в области палеогенетики лошадей свидетельствуют о том, что предком всех современных пород являлись одомашненные лошади в степях между Днепром и Уралом [35]. Таким образом, на территории нашей страны находится один из основных центров доместикации лошадей. Данный факт может объяснять присутствие редких и считавшихся исчезнувшими гаплотипов мтДНК в местных популяциях лошадей России и Монголии. В целом стоит отметить высокий уровень полиморфизма изученных нуклеотидных последовательностей при сравнении с ранее изученными образцами (база данных GenBank).

Продемонстрирована высокая степень генетического отличия монгольской популяции из Гоби от остальных исследуемых популяций по совокупным данным анализа последовательностей D-петли мтДНК и STR-анализа, которая может являться результатом изоляции, искусственного и естественного отбора на фоне специфических условий обитания.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белоусова Н.Ф. Местные (аборигенные) породы лошадей России. Дивово: Изд-во ВНИИ коневодства, 2018. 148 с.
2. Ооржак Р.Т., Монгуш С.Д. Нагульные качества лошадей тувинской породы, разводимой в разных природно-климатических зонах Республики Тыва // Вестник Тувинского гос. ун-та. Естественные и сельскохозяйств. науки. 2014. № 2. С. 148.
3. Дунин И.М., Данкверт А.Г., Ерохин А.С. и др. Справочник пород и типов сельскохозяйственных животных, разводимых в РФ. М.: ЦБГНУ ВНИИПлем, 2013. 554 с.
4. Юрьева И.Б., Вдовина Н.В. Генофонд отечественного коневодства: мезенская порода лошадей // Farm Animals. 2012. № 1. С. 44–48.
5. Парфенов В.А., Рябова Е.В. Комплексная оценка производящего состава лошадей русской верховой породы Старожиловского конного завода // Коневодство и конный спорт. 2010. № 5. С. 9–10.
6. Столповский Ю.А., Цэндсурен Ц., Кол Н.В. и др. Генофонды домашних животных Монголии / Под ред. Захарова И.А. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2013. 275 с.

7. *Solis A., Jugo B.M., Meriaux J.C. et al.* Genetic diversity within and among four south European native horse breeds based on microsatellite DNA analysis: Implications for conservation // *J. Heredity*. 2005. V. 96. № 6. P. 670–678.
8. *Canon J., Checa M.L., Carleos C. et al.* The genetic structure of Spanish Celtic horse breeds inferred from microsatellite data // *Animal Genet.* 2000. V. 31. № 1. P. 39–48.
9. *Morais J., Oom M.M., Malta-Vacas J., Luis C.* Genetic structure of an endangered Portuguese semiferal pony breed, the Garrano // *Biochem. Genet.* 2005. V. 43. № 7/8. P. 347–364.
10. *Luis C., Cothran E.G., Oom Mdo M.* Inbreeding and genetic structure in the endangered Sorraia horse breed: implications for its conservation and management // *J. Heredity*. 2007. V. 98. P. 232–237. <https://doi.org/10.1093/jhered/esm009>
11. *Marletta D., Tupac-Yupanqui I., Bordonaro S. et al.* Analysis of genetic diversity and the determination of relationships among western Mediterranean horse breeds using microsatellite markers // *J. Anim. Breed. Genet.* 2006. V. 123. P. 315–325. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2006.00603.x>
12. *Tozaki T., Takezaki N., Hasegawa T. et al.* Microsatellite variation in Japanese and Asian horses and their phylogenetic relationship using a European horse outgroup // *J. Heredity*. 2003. V. 94. № 5. P. 374–380.
13. *Kakoi H., Tozaki T., Gawahara H.* Molecular analysis using mitochondrial DNA and microsatellites to infer the formation process of Japanese native horse populations // *Biochem. Genet.* 2007. V. 45. № 3–4. P. 375–395.
14. *Senju N., Tozaki T., Kakoi H. et al.* Genetic diversity of the Yonaguni horse based on polymorphisms in microsatellites and mitochondrial DNA // *J. Vet. Med. Sci.* 2017. V. 79. № 2. P. 425–431. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0040>
15. *Senju N., Tozaki T., Kakoi H. et al.* Genetic characterization of the Miyako horse based on polymorphisms of microsatellites and mitochondrial DNA // *J. Vet. Med. Sci.* 2017. V. 79. № 1. P. 218–223. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0111>
16. *Храброва Л.А., Зайцев А.М.* Особенности аллелофонда местных пород лошадей // *Коневодство и конный спорт*. 2008. № 3. С. 9–10.
17. *Лукашов В.В.* Молекулярная эволюция и филогенетический анализ. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. 256 с.
18. *Vila C., Leonard J.A., Gotherstrom A. et al.* Widespread origins of domestic horse lineages // *Science*. 2001. V. 291. № 5503. P. 474–477.
19. *Clutton-Brock J.* The process of domestication // *Mammal Review*. 1992. V. 22. P. 79–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1992.tb00122.x>
20. *Kavar T., Brem G., Habe F. et al.* History of Lipizzan horse maternal lines as revealed by mtDNA analysis // *Genet. Sel. Evol.* 2002. V. 34. № 5. P. 635–648.
21. *Jansen T., Forster P., Levine M. et al.* Mitochondrial DNA and the origins of the domestic horse // *PNAS*. 2002. V. 99. № 16. P. 10905–10910.
22. *Hill E.W., Bradley D.G., Al-Barody M. et al.* History and integrity of thoroughbred dam lines revealed in equine mtDNA variation // *Animal Genet.* 2002. V. 33. № 4. P. 287–294.
23. *McGahern A., Bower A.M., Edwards C.J. et al.* Evidence for biogeographic patterning of mitochondrial DNA sequences in Eastern horse populations // *Animal Genet.* 2006. V. 37. № 5. P. 494–497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2006.01495.x>
24. *Takasu M., Ishihara N., Tozaki T. et al.* Genetic diversity of maternal lineage in the endangered kiso horse based on polymorphism of the mitochondrial DNA D-loop region // *J. Vet. Med. Sci.* 2014. V. 76. № 11. P. 1451–1456. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0231>
25. *Peakall R., Smouse P.E.* GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. P. 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
26. *Jost L.* GST and its relatives do not measure differentiation // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. P. 4015–4026.
27. *Winter D.J.* MMod: an R library for the calculation of population differentiation statistics // *Mol. Ecol. Resour.* 2012. V. 12. P. 1158–1160.
28. *Leroy G., Callède L., Verrier E. et al.* Genetic diversity of a large set of horse breeds raised in France assessed by microsatellite polymorphism // *Genet. Sel. Evol.* 2009. V. 41. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-41-5>
29. *Cieslak M., Pruvost M., Benecke N. et al.* Origin and history of mitochondrial DNA lineages in domestic horses // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 12. e15311.
30. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* 1987. V. 4. P. 406–425.
31. *Zharkikh A., Li W.H.* Estimation of confidence in phylogeny: the complete-and-partial bootstrap technique // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1995. V. 4. P. 44–63.
32. *Bryant D., Moulton V.* Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 21. P. 255–265.
33. *Bandelt H.J., Forster P., Rohlf A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.
34. *Polzin T., Daneschmand S.* On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs // *Operations Res. Letters*. 2003. V. 31. P. 12–20.
35. *Librado P., Khan N., Fages A. et al.* The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes // *Nature*. 2021. V. 598. P. 634–640. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04018-9>

Assessment of Genetic Diversity and Structure of Autochthonic Horses of Russia and Mongolia Using Nuclear and Mitochondrial DNA Markers

V. N. Voronkova^{a, *}, E. A. Nikolaeva^a, A. K. Piskunov^a, O. V. Babayan^b, M. Takasu^c, T. Tozaki^d, G. R. Svishcheva^{a, e}, and Yu. A. Stolpovsky^a

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^b"GORDIZ LLC", Moscow, 121205 Russia

^cDepartment of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Gifu, Japan

^dGenetic Analysis Department, Laboratory of Racing Chemistry, Tochigi, Japan

^eFederal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

*e-mail: valery.voronkova@gmail.com

In this work, using microsatellite analysis for 17 loci, 866 horses from 9 breeds were studied: Altai, Tuva, Kushum, Pechora, Mezen, Transbaikal, Buryat, Russian riding and Mongolian. The level of observed heterozygosity of the studied breeds is at a high level that does not cause concern (from 0.699 to 0.798). A total of 183 alleles were identified, including 15 private ones. For the first time, the D allele of the AHT4 locus was found in Mongolian horses Tes with a length of about 124 bp with a putative deletion outside the repeat region. The phylogenetic relationships, structure and mutual influence of the gene pools of Mongolian and Russian horses are shown. Analysis of the polymorphism of the control region of the mtDNA D-loop in 142 horses made it possible to identify 16 haplotypes, of which four, found in the Mongolian, Buryat, Transbaikal, and Tuva breeds, were previously found only in samples of ancient horses in Europe and Asia. Haplotypes X2 and D3 turned out to be the most common among the studied breeds. The hypothesis that the majority of mtDNA haplotypes is not tied to a particular breed or geographic area has been confirmed. In horse populations, only the set and frequencies of haplotypes differ. This is probably due to the multiple domestication events that make horse mtDNA so highly polymorphic, as well as the active movement of horses in the world and their breeding history.

Keywords: horses, *Equus caballus*, native breed, biodiversity conservation, genetic monitoring, microsatellite analysis, genetic diversity, phylogenetic relationships, D-loop, mtDNA.

УДК 575.174

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ПОРОД СВИНЕЙ, РАЗВОДИМЫХ В РОССИИ, НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА D-ПЕТЛИ мтДНК

© 2022 г. В. Р. Харзинова¹, *, Н. А. Акопян¹, А. В. Доцев¹, Т. Е. Денискова¹, А. А. Сермягин¹,
Т. В. Карпушкина¹, А. Д. Соловьева¹, Г. Брем², Н. А. Зиновьева¹, **

¹Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
городской округ Подольск, пос. Дубровицы, 142132 Россия

²Институт животноводства и генетики, Университет ветеринарной
медицины (VMU), Вена, А-1210 Австрия

*e-mail: veronika0784@mail.ru

**e-mail: n_zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию 28.03.2022 г.

После доработки 03.04.2022 г.

Принята к публикации 04.04.2022 г.

Снижение уровня генетического разнообразия – одна из основных генетических проблем в мировом свиноводстве. В России некоторые локальные породы находятся под угрозой исчезновения из-за низкой численности. В трансграничных породах, подверженных сильному направленному отбору, также может наблюдаться снижение разнообразия. В связи с этим, целью нашего исследования явилось проведение оценки генетического разнообразия и установление филогенетических связей для девяти пород свиней, разводимых в России, на основании анализа последовательностей D-петли митохондриальной (мт) ДНК. Нами было выполнено секвенирование нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК 273 свиней следующих пород: брейтовской, кемеровской, ливенской, муромской, уржумской, мангалица, крупной белой, ландрас и дюрок. Во всей выборке было обнаружено 104 переменных сайта и выявлено 84 гаплотипа, в том числе 55 – у локальных пород и 29 – у трансграничных пород. Локальные породы характеризовались меньшим средним числом нуклеотидных различий между гаплотипами, по сравнению с трансграничными породами ($K = 6.272$ и $K = 9.934$). 78.8% исследованных свиней принадлежали к гаплогруппе E, в то время как гаплогруппы D (20,5%) и A (0,7%) встречались реже. Анализ AMOVA показал, что 43.88% общей генетической изменчивости приходилось на различия между изучаемыми породами. Анализ структуры медианной сети показал, что кемеровская порода была наиболее дифференцированной среди локальных пород, а мангалица вошла в кластер трансграничных пород благодаря своему европейскому происхождению. Полученные результаты могут быть полезны для мониторинга генетического разнообразия в трансграничных породах, а также для разработки научно обоснованных программ сохранения локальных пород свиней.

Ключевые слова: D-петля мтДНК, свиньи, локальные породы, трансграничные породы, гаплотипическое разнообразие, демографическая история, дифференциация.

DOI: 10.31857/S0016675822080045

Домашние свиньи (*Sus scrofa*) – это один из важнейших видов сельскохозяйственных животных, производящий значительное количество мяса во всем мире [1, 2]. Выведение высокопродуктивных пород, селекционированных на максимальную продуктивность, позволило производить свинину с возрастающей эффективностью [3]. Такие трансграничные породы характеризуются пониженным генетическим разнообразием, поскольку они были отобраны по нескольким экономически важным признакам. Кроме того, глобальное использование трансграничных пород оказывает

огромное влияние на местные породы, которые были либо в значительной степени заменены трансграничными породами, либо скрещены с ними [4, 5]. Хорошо известно, что на протяжении веков разнообразные местные популяции свиней подвергались независимому отбору по морфологическим и поведенческим признакам и хорошо адаптировались к условиям окружающей среды, в которых они выращивались [6].

В России было выведено и усовершенствовано большое число разнообразных пород свиней для удовлетворения спроса на востребованную про-

дукцию в конкретных регионах. Формирование пород началось во второй половине XIX в., крупномасштабно продолжалось с 1930-х по 1950-е гг. и продолжается до сих пор. Методика создания отечественных пород была основана на скрещивании аборигенных малопродуктивных свиней с высокопродуктивными европейскими породами (крупной белой и ландрас) и последующем закреплении ценных качеств у потомства путем селекции в течение нескольких поколений [7, 8].

В результате проведенной селекции в Советском Союзе было зарегистрировано 22 местные породы, отличающиеся высокой жизнеспособностью, крепкой конституцией, устойчивостью к болезням. Кроме того, создание такого количества пород было обусловлено разнообразием природно-климатических зон, а также необходимостью иметь в каждом регионе несколько контрастных пород для товарного скрещивания [7–9]. Например, брейтовская порода, выведенная в Ярославской области путем комплексного скрещивания крупной белой, датского ландраса, литовской, латвийской и белорусской полесской пород, использует местные корма, побочные продукты маслодельных и сыроваренных заводов, с добавлением небольшого количества фуражного зерна. В 1949 г. в Орловской области путем скрещивания аборигенных вислоухих свиней с хряками крупной белой, беркширской и польско-китайской пород была получена ливенская порода, отличавшаяся замечательной приспособленностью к погодным и кормовым условиям и характеризующаяся высокими мясными качествами. В 1961 г. с целью успешного разведения в суровых климатических условиях Сибири и юго-восточной зоны России была официально утверждена кемеровская порода свиней.

Современная свиноводческая отрасль в России включает десять пород и, как и в других странах, в основном базируется на ограниченном количестве трансграничных пород с постным мясом, которые широко используются для породного улучшения. Это, очевидно, привело к уменьшению численности местных пород, поставив их под угрозу исчезновения, согласно данным о популяциях, предоставленным Информационной системой по разнообразию домашних животных (DAD-IS) [10].

Согласно Amills и др. [4], даже трансграничные породы с большой численностью в последние десятилетия страдают от сильной генетической эрозии. Генетическое разнообразие трансграничных пород может быть довольно низким, поскольку отбирается небольшое количество производителей для получения многочисленного потомства [11–14]. В связи с этим в сложившихся обстоятельствах возрастает важность установления генетического разнообразия как местных, так и трансграничных пород.

Благодаря своей специфической структуре и функциям митохондриальная ДНК (мтДНК) — это генетический маркер для оценки молекулярной эволюции, классификации и идентификации взаимоотношений между популяциями животных [15]. D-петля представляет собой некодирующую область мтДНК, которая содержит регуляторные последовательности, контролирующие репликацию и транскрипцию мтДНК [14]. На основе исследований варибельности мтДНК свиней были изучены аспекты одомашнивания [16–19], оценено генетическое разнообразие [4, 19–22] и изучена миграционная история [18]. Тем не менее отсутствуют данные о полиморфизме последовательности D-петли мтДНК местных и трансграничных пород свиней, выращиваемых в России. В связи с этим мы провели исследование для решения этих вопросов.

Цель нашего исследования — оценка генетического разнообразия и установление филогенетических взаимоотношений между шестью местными, отнесенными к группе риска из-за малочисленности популяции, и тремя высокопродуктивными трансграничными породами, разводимыми в России, путем анализа полиморфизма в области D-петли мтДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследований послужил биологический материал свиней, сохраняемый в УНУ “Банк генетического материала домашних и диких видов животных и птицы” ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста. Выборка для исследования включала 273 образца свиней, принадлежащих к трем трансграничным ($n = 97$) и к шести местным породам ($n = 176$). Трансграничные породы были представлены крупной белой (LW, $n = 59$), ландрасом (L, $n = 22$) и дюрксом (D, $n = 16$). К местным породам относились животные брейтовской (BR, $n = 23$), кемеровской (КЕМ, $n = 33$), ливенской (LIV, $n = 11$), муромской (MUR, $n = 36$), уржумской (URJ, $n = 46$) и мангалица (MANG, $n = 27$). Из-за промышленного скрещивания ливенской породы с ландрасом в выборку были включены только чистопородные особи с достоверной родословной. Мангалица — порода венгерского происхождения с исключительными качествами производимого сырого мяса была включена в наше исследование в связи с растущим спросом на нее со стороны частных владельцев и мелких фермеров в России. Таким образом, официальных сведений о численности популяции мангалицы нет, но, по-видимому, она невелика.

Геномную ДНК выделяли из ушного выщипа с использованием колонок Nexttec (Nexttec Biotechnologie GmbH, Лейверкузен, Германия) в соответствии с инструкциями производителя. Область D-петли размером 992 пн амплифицировали с

помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием SimpliAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific, Уилмингтон, Делавэр, США). Праймеры (прямой: 5'-CGT ATG CAA ACC AAA ACG C-3' и обратный: 5'-GTT TTT GGG GTT TGG CAA G -3') были подобраны с использованием Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [23] на основе данных митохондриального генома *S. scrofa* (GenBank: NC_000845.1). Полученные ПЦР продукты были очищены из агарозного геля с помощью набора Cleanup Standard (ОАО "Евроген", Москва, Россия) и затем секвенированы в ЗАО "Евроген" (Москва, Россия) по технологии Сэнгера.

Редактирование и выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли на основе алгоритма MUSCLE [24], реализованного в программе MEGA 7.0.26 [25] по референсной последовательности (NCBI № AJ002189). Сомнительные области выравнивания были удалены с помощью программы Gblocks 0.91b [26]. Во всех последовательностях длина выравнивания была уменьшена до 705 пн в диапазоне от 15 535 до 16 064 пн и использовалась для дальнейшего анализа.

Все последовательности D-петли мтДНК были отнесены к известным гаплогруппам с использованием программного обеспечения MitoToolPy [27].

Индикаторы генетического разнообразия, включая количество полиморфных сайтов (S), среднее количество нуклеотидных различий (K), количество гаплотипов (H), гаплотипическое разнообразие (h), нуклеотидное разнообразие (π), а также индексы нейтральности Таджимы (Tajima's, D) [28] и Фу (Fu's, F_s) [29] были вычислены в DnaSP 6.12.01 [30].

Для комплексной оценки генетического разнообразия изучаемых пород свиней в программе STATISTICA 10 были рассчитаны корреляционная матрица и проведен анализ главных компонент (АГК) для параметров K , h и π методом уменьшения размерности. Синтезированная оценка (F_z) была рассчитана путем анализа главных компонент.

Демографическая история пород свиней была изучена с помощью анализа распределения несоответствий [31] в DnaSP 6.12.01 с визуализацией с помощью R-пакета ggplot2 [32].

Для установления доли общей генетической изменчивости между и внутри популяциями был выполнен анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) с использованием пакета ARLEQUIN v3.5.2.2 [33].

Для анализа эволюционных взаимосвязей была построена медианная сеть [34] в программном обеспечении PopART 1.7 [35].

Лучшие модели эволюции были определены в PartitionFinder2 [36] с использованием информационного скорректированного критерия Акаике (AICc) [37]. Эволюционная модель НКУ+I+G оказалась оптимальной.

Генетические различия между девятью породами свиней попарно оценивали по индексу фиксации (F_{ST}) с использованием ARLEQUIN 3.5. Далее на основе этих дистанций было построено филогенетическое дерево Neighbor-Net в программе SplitsTree 4.14.6 [38].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследования генетического статуса и разнообразия пород свиней в России либо ограничивались несколькими породами, либо были сосредоточены исключительно на ядерном геноме [9, 39–41]. Так, используя микросателлитные маркеры, Kharzina и Zinovieva [39] изучили популяционную структуру и генетические связи местных пород из России, Украины и Республики Беларусь с трансграничными породами импортного происхождения отечественной репродукции. Другое исследование [42] подтвердило наличие различий в генетической структуре популяций местных пород, разводимых в России. Trasnov и др. [9] провели первое генетическое исследование пород свиней из России, Белоруссии, Казахстана и Украины с использованием ДНК-чипов и установили, что многие из 13 изучаемых пород свиней сохранили уникальные особенности и отличаются от основных трансграничных пород (крупная белая и ландрас). Данные по митохондриальной ДНК свиней в России были описаны по D-петле мтДНК у свиней крупной белой породы различных типов селекции, разводимых в Российской Федерации с 2000 по 2019 г. [43].

В настоящем исследовании мы расширили анализ митохондриальной генетической изменчивости не только на две другие популярные трансграничные породы, но и на шесть местных пород свиней, для чего были секвенированы и проанализированы 273 последовательности D-петли мтДНК, в том числе 97 последовательностей трансграничных пород и 176 шести местных пород.

Было установлено, что 78.8% свиней принадлежали к гаплогруппе E, 20.5% – к гаплогруппе D и 0.7% – к гаплогруппе A. Свины изучаемых пород, входивших в гаплогруппу E, следующим образом распределялись по породам: L = 7.9% (17 особей из 23), D = 6.5% (35 особей из 36), BR = 8.8% (19 особей из 23), LIV = 5.1% (все особи), MUR = 16.2% (35 особей из 36), KEM = 15.4 (все особи), MANG = 12.5% (все особи) и URZ = 18.7% (40 особей из 46). Исключение было отмечено для крупной белой породы: 71.4% (40 особей из 59) относились к гаплогруппе D, в которую также входили 3.57% дюрков, 8.93% ландрасов, 7.14% уржумской и брейтовской и 1.79% муромской пород. Примечательно, что четыре образца уржумской породы были отнесены к гаплогруппе D и только два образца – к гаплогруппе A.

Таблица 1. Результаты AMOVA для изучаемых пород свиней на основе анализа полиморфизма D-петли мтДНК

| Источник вариаций | Степени свободы, <i>d.f.</i> | Сумма квадратов, SS | Компоненты дисперсии, VC | Процент вариации, V% |
|-------------------------|------------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------|
| Межпородные различия | 8 | 528.564 | 2.14661 | 43.88 |
| Внутрипородные различия | 264 | 724.766 | 2.74533 | 56.12 |
| Общий | 272 | 1253.330 | 4.89194 | 43.88 |

Таблица 2. Попарные значения F_{ST} и генетические дистанции изученных пород свиней на основе анализа полиморфизма D-петли мтДНК

| Породы | LW | L | D | BR | KEM | LIV | MUR | URJ | MANG |
|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|------|
| LW | * | | | | | | | | |
| L | 0.22945 | * | | | | | | | |
| D | 0.32717 | 0.06151 | * | | | | | | |
| BR | 0.37619 | 0.12257 | 0.11748 | * | | | | | |
| KEM | 0.54498 | 0.28962 | 0.43284 | 0.36632 | * | | | | |
| LIV | 0.45488 | 0.13138 | 0.18153 | 0.03548 | 0.45829 | * | | | |
| MUR | 0.52152 | 0.26331 | 0.30093 | 0.23537 | 0.47470 | 0.19474 | * | | |
| URJ | 0.49466 | 0.23417 | 0.26305 | 0.20348 | 0.41721 | 0.17261 | 0.04429 | * | |
| MANG | 0.61838 | 0.49375 | 0.54355 | 0.44829 | 0.69267 | 0.50791 | 0.62698 | 0.61414 | * |

Примечание. LW – крупная белая, L – ландрас, D – дюрок, BR – брейтовская, KEM – кемеровская, LIV – ливенская, MUR – муромская, URJ – уржумская, MANG – мангалица.

Анализ AMOVA (табл. 1) показал, что 56.12% общей генетической изменчивости приходится на различия внутри пород свиней. На долю межпородных различий приходилось 43.88% вариации, что свидетельствует об общности генетической закономерности материнского происхождения изучаемых пород. Характер распределения генетической изменчивости внутри и между изучаемыми местными и трансграничными породами свиней согласуется с данными, о которых сообщают Wang и др. [44], Ramirez и др. [45], Ji и др. [21], Ajibike и др. [46].

Мы обнаружили, что значения F_{ST} (табл. 2) между трансграничными породами были ниже по сравнению с аналогичными, рассчитанными между местными популяциями свиней: LW_L/D (0.229/0.327) и L/D (0.061). Среди местных пород ближе всего к трансграничным свиным оказалась группа брейтовской породы (LW – 0.376, L – 0.122 и D – 0.117). Кроме того, самые низкие значения F_{ST} наблюдались для пар BR/LIV (0.035) и MUR/URJ (0.044), что указывает на их общее происхождение. При этом порода мангалица была наиболее дифференцированной от других пород со значениями F_{ST} от 0.448 (BR) до 0.692 (KEM). Кемеровская порода была отмечена как вторая по отдаленности порода от всех остальных.

Результаты, полученные при анализе генетического дерева Neighbor-Net, позволили нам выделить три кластера (рис. 1). Четыре местные породы (BR, LIV, MUR и URJ) объединялись в один кластер, в котором BR располагалась наиболее близко к трансграничным породам, тогда как MUR и URJ располагались крайне близко друг к другу. Выявленное более близкое расположение брейтовской породы к трансграничным свиным можно объяснить историей ее создания. Сложное воспроизводительное скрещивание с привлечением местных свиней, датского ландраса и крупной белой породы позволило создать первых представителей этой породы. Далее, как видно из наших данных, все три трансграничные породы образовали параллельный кластер, с присоединением ветви MANG, доказывающей ее европейское происхождение. Между тем свины кемеровской породы формировали отдельную ветвь на дереве, что можно объяснить сохранившейся генетической составляющей сибирской северной породы, принимавшей участие в ее создании и отличающей породу от других.

В структуре медианной сети, построенной в нашем исследовании, было выявлено два кластера (рис. 2). Один кластер объединил большинство представителей местных свиней с подкластером

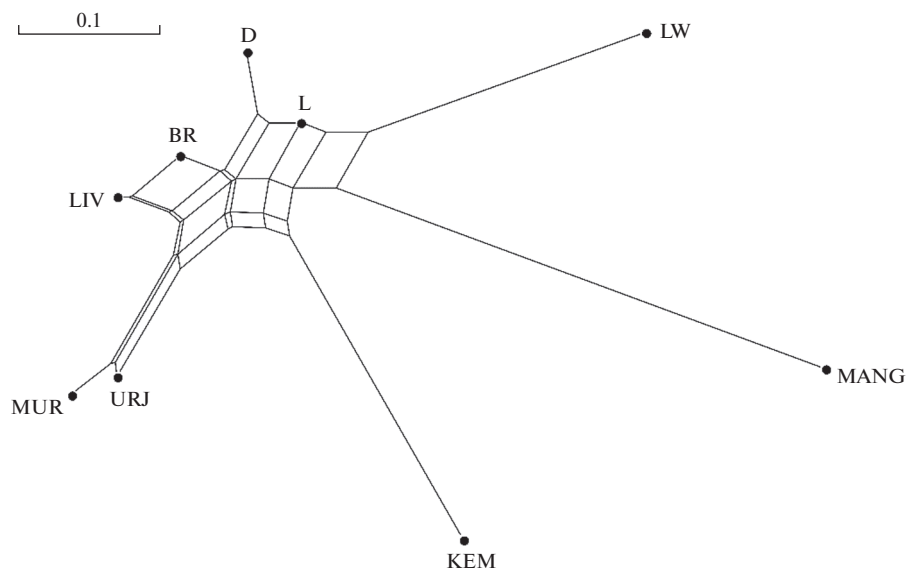


Рис. 1. Филогенетическое дерево Neighbor-Net, построенное на основе генетических дистанций F_{ST} для изучаемых пород свиней. Породы (для рис. 1–3): LW – крупная белая, L – ландрас, D – дюрок, BR – брейтовская, КЕМ – кемеровская, LIV – ливенская, MUR – муромская, URJ – уржумская, MANG – мангалица.



Рис. 2. Медианная сеть, характеризующая гаплотипические связи между изучаемыми породами свиней, на основе анализа полиморфизма в D-петле мтДНК.

Таблица 3. Корреляционная матрица между показателями генетического разнообразия исследуемых пород свиней

| Параметр | π | K | h |
|----------|--------------------|--------------------|--------------------|
| π | 1 | 1.000*** | 0.639 ^a |
| K | 1.000*** | 1 | 0.639 ^a |
| h | 0.639 ^a | 0.639 ^a | 1 |

Примечание. π – нуклеотидное разнообразие; K – среднее количество нуклеотидных различий; h – гаплотипическое разнообразие; *** $p < 0.001$, ^a $p < 0.05$.

породы мангалица. Исключение составили особи брейтовской породы, чьи гаплотипы встраивались во второй кластер. В свою очередь, второй кластер был представлен приватными гаплотипами свиней крупной белой и ландрас, а промежуточное положение занимали два приватных гаплотипа породы дюрок, а также три приватных гаплотипа брейтовской породы.

Согласно Goodall-Copestake и др. [47], для оценки разнообразия на уровне популяций используется несколько показателей: среднее количество нуклеотидных различий (K), гаплотипическое разнообразие (h) (также известное как разнообразие генов) и нуклеотидное разнообразие (π). h – это мера уникальности определенного гаплотипа в данной популяции [48], которая отражает распространенность гаплотипа в популяции, тогда как π и K отображают степень мутации гаплотипа в популяции [49, 50]. В нашем исследо-

вании описанные выше параметры были обнаружены в положительной корреляции друг с другом (табл. 3), что подтверждает их влияние на высокий уровень генетического разнообразия в изучаемых породах свиней.

Кроме того, уровень генетического разнообразия был изучен с помощью анализа главных компонент на основе синтезированного оценочного балла (Fz), рассчитанного на основе матрицы показателей h , π и K (рис. 3, табл. 4). Было выявлено (рис. 3), что 84.41% генетической изменчивости можно объяснить первым основным компонентом (Fz (F1)), который отражает генетическое разнообразие исследуемых пород свиней.

Результаты, представленные в табл. 4, показали, что среди трансграничных пород свиней самый высокий уровень генетического разнообразия выявлен у крупной белой ($Fz(F1) = 1.59$), самый низкий – у дюрок ($Fz(F1) = 0.10$), а свиньи породы ландрас занимали промежуточное положение ($Fz(F1) = 1.38$). При рассмотрении распределения значений балла Fz у свиней местных пород наибольшее генетическое разнообразие было найдено в группе свиней брейтовской породы, а наименьшее – у особей кемеровской породы: ($Fz(F1) = 2.04$ и $Fz(F1) = -3.01$ соответственно).

Как следует из данных табл. 5, у всех исследованных пород свиней выявлено 84 гаплотипа и 104 варибельных сайта. Согласно Tsai и др. [51], анализ последовательностей D-петли австралийских коммерческих свиней выявил пять гаплотипов. Однако авторы подчеркивают, что полученные данные не включают популяцию австралийских диких свиней, которая может содержать другие генотипы мтДНК, завезенные на континент во время колонизации. Интересно, что анализ последовательностей D-петли аборигенных свиней и диких кабанов из Китая позволил идентифицировать 40 варибельных сайтов, которые приводят к формированию 67 гаплотипов [44].

В настоящем исследовании, несмотря на то что наибольшее количество гаплотипов наблюдалось у свиней крупной белой породы ($H = 19$), местные свиньи суммарно превосходили трансграничных по этому показателю: 55 гаплотипов против 29. Этот результат согласовался с данными исследования Collingbourne [52], в котором аборигенные британские породы свиней демонстрировали наибольшую вариацию гаплотипов по сравнению с трансграничными. Низкое число гаплотипов в группе трансграничных пород можно объяснить родством особей в популяциях крупной белой и ландраса [53].

Объединив трансграничные и местные образцы свиней, мы обнаружили меньшую среднюю

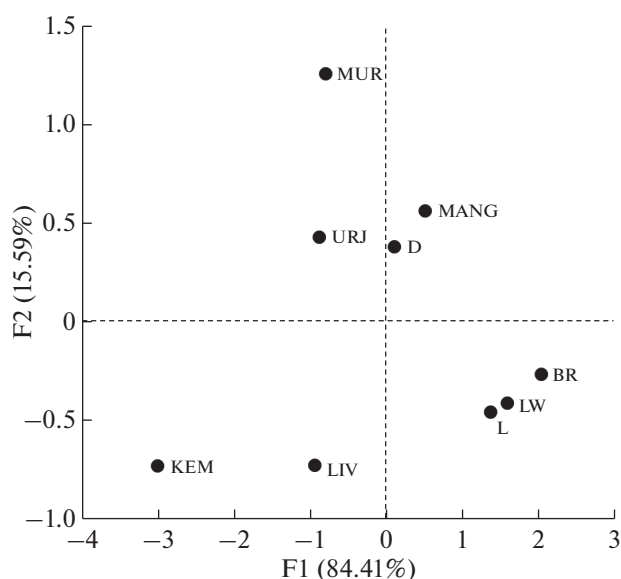


Рис. 3. Анализ главных компонент, проведенный для изучаемых пород свиней на основе полиморфизма в D-петле мтДНК.

Таблица 4. Общие баллы основных компонент и ранг изучаемых пород свиней

| Порода | F_z (F1) | Ранг |
|--------|------------|------|
| LW | 1.59226 | 2 |
| L | 1.38022 | 3 |
| D | 0.10601 | 5 |
| BR | 2.04168 | 1 |
| KEM | -3.01218 | 9 |
| LIV | -0.93915 | 8 |
| MUR | -0.80077 | 6 |
| URJ | -0.88233 | 7 |
| MANG | 0.51425 | 4 |

Примечание. LW – крупная белая, L – ландрас, D – дюрок, BR – брейтовская, KEM – кемеровская, LIV – ливенская, MUR – муромская, URJ – уржумская, MANG – мангалица.

величину нуклеотидных различий между гаплотипами для местных пород, чем для трансграничных ($K = 6.272$ и $K = 9.934$) (табл. 5). Кроме того, у местных свиней наблюдался более низкий уровень нуклеотидного разнообразия и почти равный уровень гаплотипического разнообразия.

Таблица 5. Показатели генетического разнообразия изучаемых пород свиней, рассчитанные на основе анализа полиморфизма D-петли мтДНК

| Порода | n | S | H | K | h ($\pm SD$) | π ($\pm SD$) |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|-------|-------------------|--------------------|
| LW | 59 | 37 | 19 | 9.023 | 0.881 ± 0.026 | 0.013 ± 0.001 |
| L | 22 | 32 | 8 | 8.667 | 0.873 ± 0.048 | 0.012 ± 0.002 |
| D | 16 | 20 | 8 | 5.267 | 0.867 ± 0.060 | 0.007 ± 0.001 |
| В целом по трансграничным породам | 97 | 50 | 29 | 9.934 | 0.921 ± 0.014 | 0.014 ± 0.001 |
| BR | 23 | 28 | 14 | 9.723 | 0.949 ± 0.026 | 0.014 ± 0.001 |
| KEM | 33 | 5 | 6 | 0.527 | 0.379 ± 0.105 | 0.001 ± 0.001 |
| LIV | 11 | 13 | 3 | 4.509 | 0.582 ± 0.142 | 0.006 ± 0.002 |
| MUR | 36 | 17 | 17 | 2.527 | 0.924 ± 0.025 | 0.004 ± 0.001 |
| URJ | 46 | 17 | 14 | 3.309 | 0.779 ± 0.060 | 0.005 ± 0.001 |
| MANG | 27 | 17 | 13 | 5.846 | 0.937 ± 0.022 | 0.008 ± 0.001 |
| В целом по местным породам | 176 | 54 | 55 | 6.272 | 0.937 ± 0.010 | 0.008 ± 0.001 |

Примечание. n – число голов в группе; S – число полиморфных сайтов; H – число гаплотипов; K – среднее количество нуклеотидных различий; h – гаплотипическое разнообразие; π – нуклеотидное разнообразие; SD – стандартное отклонение.

Обнаруженные закономерности распределения значений параметров генетического разнообразия могут указывать на то, что популяции местных свиней пережили стремительный демографический рост после “бутылочного горлышка” или под влиянием эффекта основателя, тем самым мутация привела к накоплению h , в то время как нуклеотидное разнообразие еще не аккумулировалось [19, 54].

Вторая интерпретация более низких значений почти всех показателей генетического разнообразия у местных свиней может быть объяснена коммерческой гибридизацией. Местные свиньи имеют низкую скорость роста, поэтому трансграничных свиней использовали для скрещивания с ними для улучшения их продуктивности. Полученные данные согласовывались с результатами других исследований, показывающих, что аборигенные свиньи имеют более низкий уровень генетического разнообразия [50, 55–57].

У трансграничных пород свиней среднее число нуклеотидных различий варьировало от 5.267 до 9.023, гаплотипическое разнообразие – от 0.873 до 0.881 и нуклеотидное разнообразие – от 0.007 до 0.013. Показатели гаплотипического и нуклеотидного разнообразия были самыми высокими у крупной белой породы, а самыми низкими у свиней породы дюрок.

Таблица 6. Результаты проверки гипотезы селективной нейтральности по индексам D Таджимы и F_s Фу в изучаемых породах свиней

| Порода | n | Tajima's, D | Fu's, F_s |
|-----------------------------------|-----|---------------|-------------|
| LW | 59 | 0.44019 ns | 0.055 ns |
| L | 22 | -0.04902 ns | 3.298 ns |
| D | 16 | -0.50765 ns | 0.196 ns |
| В целом по трансграничным породам | 97 | 0.07201 ns | -1.960 ns |
| BR | 23 | 1.06616 ns | -0.990 ns |
| KEM | 33 | -1.52517 ns | -3.613* |
| LIV | 11 | -0.24963 ns | 4.823 ns |
| MUR | 36 | -1.39046 ns | -9.846* |
| URJ | 46 | -0.61247 ns | -2.938 ns |
| MANG | 27 | 1.13783 ns | -1.449 ns |
| В целом по местным породам | 176 | -1.04437 ns | -29.670*** |

Примечание. n – число голов в группе; * $p < 0.05$. *** $p < 0.001$.

Полученные результаты можно объяснить наличием большего числа семей разного происхождения внутри этих пород и наличием более интенсивного горизонтального потока генов между ними. Кроме того, применяемая в свиноводстве методика прилития крови также может влиять на повышение уровня разнообразия.

Значения всех трех индексов разнообразия были самыми высокими у брейтовской породы ($K = 9.723$, $h = 0.949$, $\pi = 0.014$) и мангалицы ($K = 5.846$, $h = 0.937$, $\pi = 0.008$), что предположительно может свидетельствовать о смешанном происхождении обеих групп.

Высокий уровень гаплотипического разнообразия выявлен у муромской и уржумской пород (0.924 и 0.779 соответственно) при относительно низком уровне нуклеотидного разнообразия (0.004 и 0.005) (табл. 5). Подобное сочетание параметров может быть вызвано быстрым демографическим приростом от небольшого эффективного размера популяции, если предположить, что имеется достаточно времени для увеличения количества гаплотипов за счет мутаций, но недостаточно для накопления больших различий последовательностей [58]. Ливенская порода характеризовалась относительно низкими значениями индексов разнообразия, но превышала значения аналогичных индексов у кемеровской породы.

Для проверки гипотез селективной нейтральности и изучения демографической истории по-

род свиней, были рассчитаны два статистических критерия: D Таджимы и F_s Фу (табл. 6). У трансграничных пород свиней наблюдалось смещение в сторону аллелей, встречающихся со средней частотой, в то время как у местных пород с высокой частотой встречались редкие аллели. Это предположение было сделано на основе анализа суммарных значений D -индекса Таджимы: положительный для всех трансграничных пород и отрицательный для всех местных пород: $D_{\text{total commercial}} = 0.07201$ и $D_{\text{total local}} = -1.04437$.

Присутствие редких аллелей с высокой частотой, как утверждают Stajich и Hahn [59], может быть вызвано увеличением размера популяции или результатом селекционного давления. Интересно, что значения критерия F_s Фу, рассчитанные для обеих групп свиней, были отрицательными ($F_{s \text{ total commercial}} = -1.960$ и $F_{s \text{ total local}} = -29.670$) и указывали на избыток редких гаплотипов по сравнению с нейтральной эволюционной моделью, что также предполагает произошедший демографический рост популяции [52, 60]. Примечательно, что достоверные значения вышеуказанного показателя наблюдались только у местных пород ($p < 0.001$). Среди всех трех трансграничных пород значения индексов нейтральности D и F_s , рассчитанные с помощью тестов Таджимы и Фу, были недостоверными, что свидетельствует о нулевой гипотезе, предполагающей отклонение от нейтральной модели эволюции и указывающей на недавний

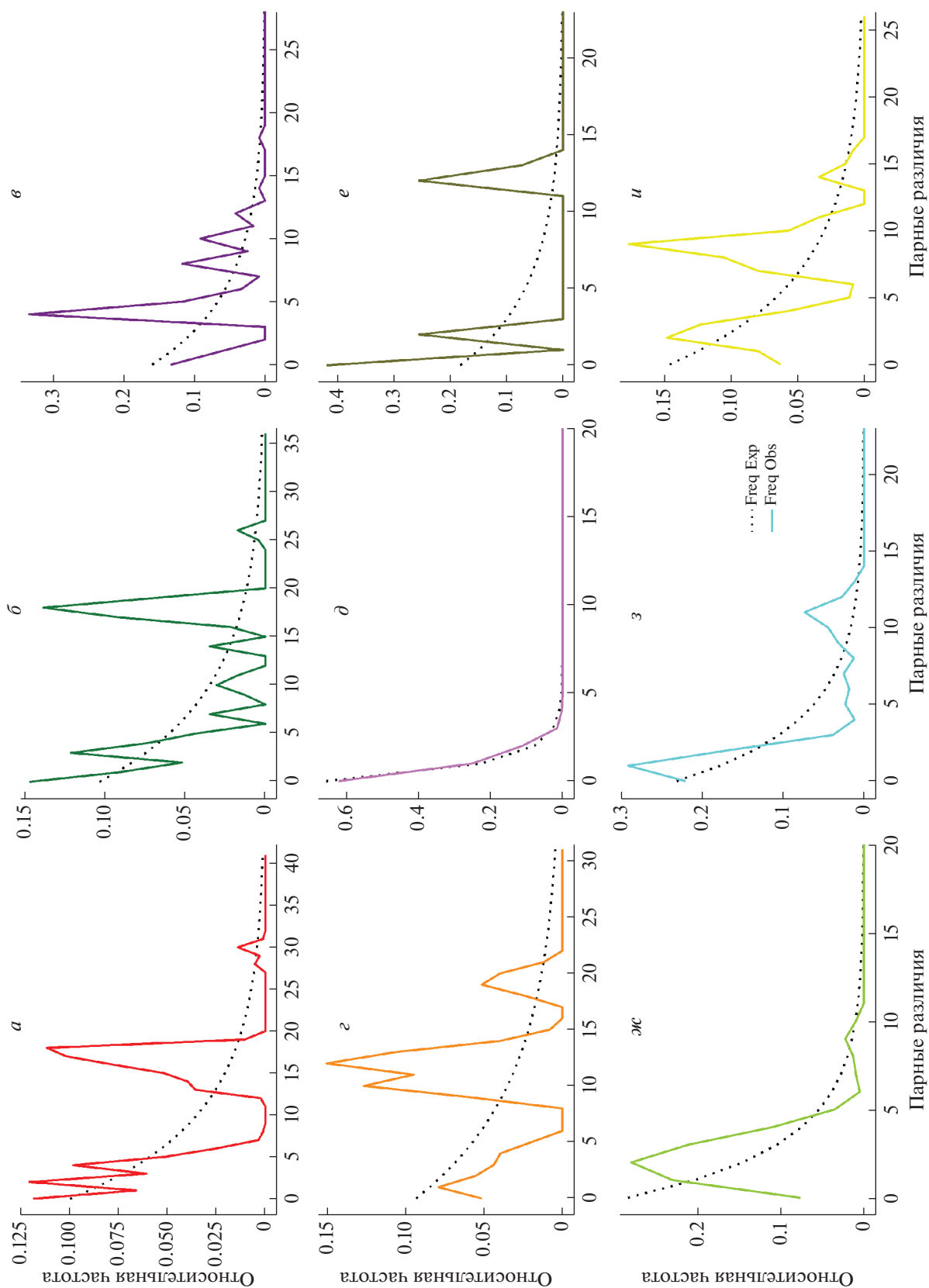


Рис. 4. Графики распределения частот значений парных различий между гаплотипами анализируемой последовательности D-панели мтДНК для изучаемых пород свиней. Пунктирная линия представляет ожидаемое распределение в рамках модели постоянного размера популяции, а сплошная линия – наблюдаемое попарное различие. *a*: LW – крупная белая, *б*: L – ландрас, *в*: D – дюррок, *г*: BR – брейтовская, *д*: KEM – кемеровская, *е*: LJV – ливенская, *ж*: MUR – муромская, *з*: URJ – уржумская, *и*: MANG – мангалица.

рост численности популяции. Однако положительные значения обоих показателей в группе свиней крупной белой породы — это признаки балансирующей селекции.

Среди всех местных пород КЕМ, MUR и URJ характеризовались отрицательными значениями обоих показателей, что указывает на избыток гаплотипов с редкими мутациями, тем самым отвергая гипотезу о нейтральной эволюции этих пород.

Однако выявленный избыток был достоверным для теста F_s Фу и недостоверным для теста D Таджимы. Некоторые авторы предположили, что тест F_s Фу — это более чувствительный индикатор, указывающий на недавний рост размеров популяции и селекционное давление, чем D Таджимы [52, 61].

Для изучения демографической истории пород свиней дополнительно проводился анализ распределения частот значений парных различий между гаплотипами (рис. 4). В нашем исследовании график распределения частот значений парных различий для большинства пород был мультимодальным за исключением свиней кемеровских пород. Наблюдаемая кривая в КЕМ соответствовала ожидаемой модели постоянного размера популяции и указывала на то, что эта популяция произошла от ограниченного числа родоначальниц и эволюционировала без заметного притока генов извне. Аналогичным образом для муромской и уржумской пород отмечено развитие породы от генетически родственных особей без значительного влияния потока генов.

Таким образом, в нашем исследовании была предпринята первая попытка по изучению происхождения и анализа материнского генетического разнообразия шести местных пород и трех трансграничных пород, выращиваемых в России. Несмотря на то что по нашим данным генетическое разнообразие местных пород не претерпело критического снижения, дальнейший мониторинг местных пород важен для рационального использования в будущем. Кроме того, дальнейший анализ большего количества особей свиней с использованием митохондриальных и ядерных генетических маркеров будет информативен для углубленного понимания демографической истории, аспектов происхождения и взаимоотношений между породами.

Финансирование работы проводилось за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1037 (внутр. № 15.БРК.21.0001). При проведении исследований использовано оборудование ЦКП “Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных” ФИЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Song R., Wang Yu., Wang Ya., Zhao J. Base editing in pigs for precision breeding // *Front. Agr. Sci. Eng.* 2020. V. 7. № 2. P. 161–170. <https://doi.org/10.15302/J-FASE-2019308>
2. Park H.-S., Min B., Oh S.-H. Research trends in outdoor pig production — a review // *Asian-Australas. J. Animal Sci.* 2017. V. 30. № 9. P. 1207–1214. <https://doi.org/10.5713/ajas.17.0330>
3. Tai L., Huyen T., Roessler R. et al. Impact of the use of exotic compared to local pig breeds on socio-economic development and biodiversity in Vietnam. Stuttgart: Verlag Grauer. Beuren, 2005.
4. Amills M., Clop A., Ramírez O., Pérez-Enciso M. Origin and genetic diversity of pig breeds // *Encyclopedia of Life Sciences. Ltd.* Chichester: John Wiley & Sons, 2010. P. 1–10. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022884>
5. Biscarini F., Nicolazzi E.L., Stella A. et al. Challenges and opportunities in genetic improvement of local livestock breeds // *Front. Genet.* 2015. V. 6. № 33. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00033>
6. Poklukar K., Čandek-Potokar M., Batorek Lukač N. et al. Lipid deposition and metabolism in local and modern pig breeds: a review // *Animals.* 2020. V. 10. P. 424. <https://doi.org/10.3390/ani10030424>
7. Ernst L.K., Dmitriev N.G., Paronyan I.A. Genetic resources of farm animals in Russia and neighboring countries // *VNIIGRZH.* 1994. P. 469.
8. Koziner A.B., Shtakelberg E.R. Animal genetic resources of the USSR // Rome. FAO and UNEP. 1989.
9. Traspov A., Deng W., Kostyunina O. et al. Population structure and genome characterization of local pig breeds in Russia, Belorussia, Kazakhstan and Ukraine // *Genet. Sel. Evol.* 2016. V. 16. <https://doi.org/10.1186/s12711-016-0196-y>
10. FAO. Available online: <http://www.fao.org/dad-is/data/ru/> (accessed on 02 November 2021)
11. Fang M., Andersson L. Mitochondrial diversity in European and Chinese pigs is consistent with population expansions that occurred prior to domestication // *Proc. Biol. Sci.* 2006. V. 273. P. 1803–1810. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3514>
12. Hammond K., Leitch H.W. Genetic resources and the global programme for their management // *The Genetics of the Pig* / Eds Rothschild M.F., Ruvinsky A. Wallingford: CABI Publ., 1998. P. 405–425.

13. *Woelders H., Zuidberg C.A., Hiemstra S.J.* Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective // *Poultry Science*. 2005. V. 85. P. 216–222.
<https://doi.org/10.1093/ps/85.2.216>
14. *Zhang J., Jiao T., Zhao S.* Genetic diversity in the mitochondrial DNA D-loop region of global swine (*Sus scrofa*) populations // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 473. P. 814–820.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.125>
15. *Nguyen H.D., Bui T.A., Nguyen P.T. et al.* The complete mitochondrial genome sequence of the indigenous I pig (*Sus scrofa*) in Vietnam // *Asian-Australas. J. Animal Sci.* 2017. V. 30. № 7. P. 930–937.
<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0608>
16. *Giuffra E., Kijas J.M., Amarger V. et al.* The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression // *Genetics*. 2000. V. 154. P. 1785–1791.
<https://doi.org/10.1093/genetics/154.4.1785>
17. *Larson G., Dobney K., Albarella U. et al.* Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication // *Science*. 2005. V. 307. P. 1618–1621.
<https://doi.org/10.1126/science.1106927>
18. *Wu G.S., Yao Y.G., Qu K.X. et al.* Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia // *Genome Biol.* 2007. V. 8. № 11. P. 245.
<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-11-r245>
19. *Ge Q., Gao C., Cai Y. et al.* Evaluating genetic diversity and identifying priority conservation for seven Tibetan pig populations in China based on the mtDNA D-loop // *Asian-Australas. J. Animal. Sci.* 2020. V. 33. № 12. P. 1905–1911.
<https://doi.org/10.5713/ajas.19.0752>
20. *Laval G., Iannuccelli N., Legault C. et al.* Genetic diversity of eleven European pig breeds // *Genet. Sel. Evol.* 2000. V. 32. № 2. P. 187–203.
<https://doi.org/10.1186/1297-9686-32-2-187>
21. *Ji Y.-Q., Wu D.-D., Wu G.-S. et al.* Multi-locus analysis reveals a different pattern of genetic diversity for mitochondrial and nuclear DNA between wild and domestic pigs in East Asia // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 10. P. 26416.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026416>
22. *Quan J., Gao C., Cai Y. et al.* Population genetics assessment model reveals priority protection of genetic resources in native pig breeds in China // *Global Ecol. and Conservation*. 2020. V. 21.
<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00829>
23. BLAST. Available online: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (accessed on 01 March 2021).
24. *Edgar R.C.* MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
25. *Kumar S., Stecher G., Tamura K.* MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33 № 7. P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
26. *Castresana J.* Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis // *Mol. Biol. Evol.* 2000. V. 17. P. 540–552.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026334>
27. *Peng M.-S., Fan L., Shi N.-N. et al.* DomeTree: A canonical toolkit for mitochondrial DNA analyses in domesticated animals // *Mol. Ecol. Resour.* 2015. V. 15.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12386>
28. *Tajima F.* Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. 1989. V. 123. P. 585–595.
<https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
29. *Fu Y.-X.* Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // *Genet. Society America*. 1997. V. 147. P. 915–925.
<https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
30. *Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C. et al.* DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. P. 3299–3302.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
31. *Rogers A.R., Harpending H.* Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences // *Mol. Biol. Evol.* 1992. V. 9. P. 552–569.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040727>
32. *Wickham H.* Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. N.Y.: Springer, 2009. 213 p.
33. *Excoffier L., Lischer H.E.L.* Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
34. *Bandelt H.J., Forster P., Rohl A.* Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
35. *Leigh N., Georgiev I., Boeker T. et al.* Nuclear star cluster formation in energy-space // *MNRAS*. 2015.
36. *Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M. et al.* Partition-Finder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. P. 772–773.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
37. *Akaike H.* A new look at statistical model identification // *IEEE Trans Auto Control*. 1974. V. 19. P. 716–723.
<https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
38. *Huson D., Klopper T.* Beyond galled trees – decomposition and computation of galled networks // 11th Annual Intern. Conf. RECOMB 2007. Oakland. CA.

- USA. April 21–25. 2007.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-71681-5_15
39. *Kharzinova V.R., Zinovieva N.A.* The pattern of genetic diversity of different breeds of pigs based on microsatellite analysis // *Vavilov J. Genetics and Breeding*. 2020. V. 24. № 7. P. 747–754.
<https://doi.org/10.18699/VJ20.669>
 40. *Kharzinova V.R., Kostyunina O.V., Karpushkina T.V. et al.* The study of the population structure and genetic diversity of hungarian mangalica breed of pigs based on microsatellites analysis // *Agrarian Bull. Urale*. 2019. V. 186. № 7. P. 77–81.
https://doi.org/10.32417/article_5d52b081b3e348.43320197
 41. *Balatsky V.N., Saienko A.M., Pena R.N. et al.* Genetic diversity of pig breeds on ten production quantitative traits loci // *Cytol. Genet.* 2015. V. 49. P. 299–307.
<https://doi.org/10.3103/S0095452715050023>
 42. *Kharzinova V.R., Kostyunina O.V., Zinovieva N.A.* Comparative characterization of the allele pool of local pig breeds based on microsatellite analysis // *Pig Breeding. Russian*. 2017. V. 1. P. 5–7.
 43. *Getmantseva L., Bakoev S., Bakoev N. et al.* Mitochondrial DNA diversity in Large White pigs in Russia // *Animals*. 2020. V. 10. P. 1365.
<https://doi.org/10.3390/ani10081365>
 44. *Wang C., Chen Y., Han J. et al.* Mitochondrial DNA diversity and origin of indigenous pigs in South China and their contribution to western modern pig breeds // *J. Integrative Agriculture*. 2019. V. 18. № 10. P. 2338–2350.
[https://doi.org/10.1016/s2095-3119\(19\)62731-0](https://doi.org/10.1016/s2095-3119(19)62731-0)
 45. *Ramírez O., Ojeda A., Tomàs A. et al.* Integrating Y-chromosome, mitochondrial, and autosomal data to analyze the origin of pig breeds // *Mol. Biol. Evol.* 2009. V. 26. № 9. P. 2061–2072.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msp118>
 46. *Ajibike A.B., Ilori B.M., Akinola O. et al.* Assessing the genetic diversity of South-western Nigerian Indigenous Pig (*Sus scrofa*) using mitochondrial DNA D-loop sequence // *Nigerian J. Animal Sci.* 2020. V. 22. P. 1–9.
 47. *Goodall-Copestake W., Tarling G., Murphy E.* On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: A case study using the gene *cox1* in animals // *Heredity*. 2012. V. 109. P. 50–56.
<https://doi.org/10.1038/hdy.2012.12>
 48. *Nei M., Tajima F.* DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases // *Genetics*. 1981. V. 97. P. 145.
<https://doi.org/10.1093/genetics/97.1.145>
 49. *Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F. et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools // *Nucl. Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4876–4882.
<https://doi.org/10.1093/NAR/25.24.4876>
 50. *Zhang J., Yang B., Wen X., Sun G.* Genetic variation and relationships in the mitochondrial DNA D-loop region of Qinghai indigenous and commercial pig breeds // *Cell Mol. Biol. Lett.* 2018. V. 3. P. 23–31.
<https://doi.org/10.1186/s11658-018-0097-x>
 51. *Tsai T.S., Rajasekar S., John J.S.St.* The relationship between mitochondrial DNA haplotype and the reproductive capacity of domestic pigs (*Sus scrofa domestica*) // *BMC Genetics*. 2016. V. 17. P. 67.
<https://doi.org/10.1186/s12863-016-0375-4>
 52. *Collingbourne S.J.* Conservation genetics of traditional and commercial pig breeds, and evaluation of their cross-breeding potential for productivity improvement // PhD thesis. Univ. Essex Available. 2019.
 53. *Moon K.-H., Nakanishi M., Futagami Y., Kashiwadani H.* Studies on cambodian species of Graphidaceae (Ostropales, Ascomycota) (II) // *The J. Japanese Botany*. 2015. V. 90. № 2. P. 98–102.
 54. *Avise J.C.* Phylogeography the History and Formation of Species. Cambridge. MA. USA; London. England. Harvard Univ. Press, 2000.
<https://doi.org/10.5860/choice.37-5647>
 55. *Kim T.H., Kim K.S., Choi B.H.* Genetic structure of pig breeds from Korea and China using microsatellite loci analysis // *J. Anim. Sci.* 2005. V. 83. P. 2255–2263.
<https://doi.org/10.2527/2005.83102255X>
 56. *Kim K.S., Yeo J.S., Kim J.W.* Assessment of genetic diversity of Korean native pig (*Sus scrofa*) using AFLP markers // *Gen. Genet. Syst.* 2002. V. 77. P. 361–368.
<https://doi.org/10.1266/GGS.77.361>
 57. *Li K.Y., Chen C., Moran B.F. et al.* Analysis of diversity and genetic relationships between four Chinese indigenous pig breeds and one Australian commercial pig breed // *Anim. Genet.* 2000. V. 31. P. 322–325.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2052.2000.00649.x>
 58. *Sundari S., Chanthran D., Lim P.-E. et al.* Genetic diversity and population structure of *Terapon jarbua* (Forskål, 1775) (Teleostei, Terapontidae) in Malaysian waters // *ZooKeys*. 2020. V. 911. P. 139–160.
<https://doi.org/10.3897/zookeys.911.39222>
 59. *Stajich J., Hahn M.W.* Disentangling the effects of demography and selection in human history // *Mol. Biol. Evol.* 2004. V. 22. P. 63–73.
<https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSH252>
 60. *Alexandrino J., Arntzen J.W., Ferrand N.* Nested clade analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela) // *Heredity*. 2002. V. 88. P. 66–74.
<https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800010>
 61. *Li D., Wei H., Zhang Z. et al.* Oriental reed warbler (*Acrocephalus orientalis*) nest defence behaviour towards brood parasites and nest predators // *Behaviour*. 2015.
<https://doi.org/10.1163/1568539X-00003295>

Genetic Diversity and Phylogenetic relationship of Pig Breeds Bred in Russia Inferred from Mitochondrial DNA D-Loop Sequences

V. R. Kharzinova^{a, *}, N. A. Akopyan^a, A. V. Dotsev^a, T. E. Deniskova^a, A. A. Sermyagin^a,
T. V. Karpushkina^a, A. D. Solovieva^a, G. Brem^b, and N. A. Zinovieva^{a, **}

^aErnst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podolsk District, Dubrovitsy settlement, 142132 Russia

^bDepartment of Animal Breeding and Genetics, University of Veterinary Medicine (VMU), Vienna, A-1210, Austria

*e-mail: veronika0784@mail.ru

**e-mail: n_zinovieva@mail.ru

Decreasing genetic diversity is one of the major genetic concerns in pig breeding worldwide. In Russia, several native breeds are endangered because of their low census and commercial breeds may be losing diversity because of the strong directional selection. In this study, we aimed to assess genetic diversity and phylogenetic relationships within nine pig breeds raised in Russia by analyzing D-loop mtDNA sequences. We obtained a total of 273 D-loop sequences of pigs from breeds including Breitov, Kemerovo, Liven, Murom, Urzhum, Mangalitsa, Large White, Landrace, and Duroc. In total, we identified 104 variable sites and detected 84 haplotypes, including 55 haplotypes in local and 29 in commercial breeds, and 104 variable sites were detected in all pig breeds. Local breeds had lower average number of nucleotide difference between haplotypes comparing to commercial one ($K=6.272$ and $K=9.934$, respectively). 78.8% of the studied pigs belonged to haplogroup E; haplogroup D (20.5%) and A (0.7%) were less frequent. The AMOVA showed that 43.88% of the total genetic variability was accounted for differences among the studied groups. Network analysis showed that the Kemerovo breed was the most differentiated within local breeds and Mangalitsa joined the cluster of commercial breeds due to its European origin. Our findings will be useful to moderate ongoing breeding policy of transboundary breeds as well as to develop the accurate preservation programs of the local breeds.

Keywords: D-loop mtDNA, pigs, local breeds, cosmopolitan breeds, haplotype diversity, demographic history, differentiation.

УДК 575.174.015.3:599.742.4

ЭКСПАНСИЯ СОБОЛЯ (*Martes zibellina* L.) СЕВЕРА СРЕДНЕСИБИРСКОГО ПЛОСКОГОРЬЯ В ЭКОСИСТЕМЫ ТУНДРЫ

© 2022 г. С. Н. Каштанов^{1, *}, Е. С. Захаров², О. А. Беглецов³, Г. Р. Свищева^{1, 4}, С. Ю. Рычков¹, П. А. Филимонов¹, А. А. Онохов¹, Е. С. Левенкова⁵, И. Г. Мещерский⁵, В. В. Рожнов⁵

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук, Якутск, 677890 Россия

³ФГБУ “Заповедники Таймыра”, Норильск, 663305 Россия

⁴Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

⁵Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: snkashtanov@mail.ru

Поступила в редакцию 28.02.2022 г.

После доработки 14.03.2022 г.

Принята к публикации 15.03.2022 г.

С помощью 16 STR-маркеров исследовалась генетическая структура популяций соболя севера Среднесибирского плоскогорья и правобережья р. Лена. Из типичных для данного вида таежных мест обитаний и нетипичных тундровых, непосредственно примыкающих к побережью Северного Ледовитого океана. В настоящее время вид находится в стадии расселения, за последние годы соболю глубоко проник в зону тундры. С 2000 гг. в указанном регионе фиксируется увеличение численности соболя и повышение миграционной активности, в связи с этим исследовался уровень дифференциации между “историческими” популяциями соболя. Данные географического распределения генотипов соболей показывают, что в тундровой зоне обитают группы, родственные популяции “оленёкский соболю”. Выявлены свидетельства формирования субпопуляционной структуры соболя в новой среде обитания. Другой вывод: “исторические” популяции Среднесибирского плоскогорья не подверглись перестройке генетической структуры под действием миграционных потоков и значимо генетически дифференцированы. Появление соболей в тундре свидетельствует об активном освоении новых территорий ранее не типичных для вида.

Ключевые слова: географические популяции соболя, микросателлитные локусы, филогенетический анализ, генетическая структура.

DOI: 10.31857/S0016675822080033

Обширный ареал соболя (*Martes zibellina* L.) простирается от Предуралья до Дальнего Востока, на котором отдельные крупные популяции чередуются с относительно мелкими. Большая часть популяций соболя к середине XX в. была восстановлена после значительного снижения численности, вызванного воздействием нерегулируемого промысла.

Центральная часть ареала вида – Среднесибирское плоскогорье. Здесь сформировалось несколько крупных региональных популяций, в пределах которых были выделены: саянский, тунгусский, илимпийский, баргузинский, витимский и якутский подвиды [1–3]. Среднесибирское плоскогорье является основным регионом, из которого в прошлом веке брали соболей для искусственного расселения в других регионах.

Всего было изъято для интродукции более 18500 животных [4]. Плотность заселения Среднесибирского плоскогорья соболями – неравномерная: она увеличивается с севера на юг от 0.1 до 4.0 особей на 1000 га при протяженности этой территории около 3000 км [2].

Стоит отметить, что северная часть Среднесибирского плоскогорья заселена популяциями соболя, различающимися по фенотипическим признакам. Тунгусский соболю распространён на гористом правобережье р. Енисей, на высокогорном плато Путорана, где вид населяет озёрные и речные долины, в которых сохраняется более мягкий микроклимат. В начале прошлого столетия соболю здесь встречался в виде небольших разрозненных групп, особенно в верховьях рек Кето, Хантайка, Хотэ, Аякли, Котуйи Мойеро [1, 5]. Это позволя-

ет предположить существование в этом горном массиве аборигенной популяции. Оленёкский соболь населяет обширные пространства северо-запада Якутии, ограниченные с востока р. Леной, с юга – р. Вилюй, с севера – морем Лаптевых [6]. Наиболее активно вид на территории Якутии изучался в период восстановления его запасов в 1950–1960-х гг. [7–11]. Современные научные исследования в данном регионе немногочисленны и посвящены некоторым аспектам экологии и географической изменчивости [6, 12, 13].

В последние десятилетия на Среднесибирском плоскогорье отмечаются рост численности соболя и повышенная миграционная активность животных, что может быть следствием благоприятных климатических факторов, значительно улучшивших кормовую базу вида [14]. Почти по всему ареалу здесь зафиксировано широкое естественное расселение соболя, освоение новых ранее малозаселенных территорий; наблюдается проникновение животных в тундровую зону. Особенно заметны эти процессы в последние десятилетия [15]. Современная активизация процесса колонизации под действием климатических факторов выявлена и у других видов из семейства куньих: каменной куницы (*Martes foina*), обитающей в Северо-Восточной Европе [16] и американской куницы (*Martes americana*), продвигающейся на Аляску [17].

Настоящая работа является первым исследованием генетической структуры популяций соболя севера Среднесибирского плоскогорья, где не проводилось широкомасштабных интродукционных работ, вид восстановил свою численность за счет сохранившихся очагов нативной формы [1, 5, 18]. Совершенно по-другому, за счет интенсивных интродукций, проводившихся в середине прошлого века, восстанавливались популяции, обитающие к востоку от р. Лены [4, 9, 19]. Генетическая структура популяций соболя этого региона остается неизученной, и вопрос объединения генофонда нативного соболя и интродуцентов остается открытым. Цель работы – определить происхождение новых популяций в тундровой зоне и оценить влияние активизации миграционных процессов на уровень дифференциации исторических популяций соболя Среднесибирского плоскогорья.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор биологического материала

Территория сбора биологического материала включала северную часть Среднесибирского плоскогорья, правобережные притоки р. Лены, бассейны рек Яна и Колыма. Образцы тканей получали от соболей, добытых лицензионным промыслом из типичных для вида таежных местобитаний и нетипичных тундровых (рис. 1, табл. 1). Всего исследовано

десять выборок вида *Martes zibellina* L., собранных на территории, расположенной между 60° и 72° с.ш. (табл. 1) с представленностью трех природных зон: тайга, лесотундра (Среднесибирское плоскогорье) и тундра (Северо-Сибирская низменность, непосредственно примыкающая к побережью Северного Ледовитого океана). Самыми северными являются три выборки: из низовья р. Оленёк (выборка “Таймылыр”), долины р. Анабар (“Анабар”) и нижней части р. Лены (“Усть–Лена”). К северным популяциям соболя также относятся выборки “Путорана”, “Оленёк”, “Яна” и “Колыма” (табл. 1). Для проведения сравнительного анализа с северными выборками в анализ были включены три выборки из центральной части ареала: “Тура” (бассейн р. Нижняя Тунгуска), “Нюрба” (среднее течение р. Вилюй) и восточная выборка “Усть–Мая” (среднее течение р. Алдан).

Популяции соболя, обитающие на Среднесибирском плоскогорье, являются нативными, в отличие от популяций, населяющих районы правобережья р. Лены и бассейнов рек Яны, Индигирки и Колымы, куда зверьки были интродуцированы из Прибайкалья, бассейна р. Буряя и п-ова Камчатка [4].

Места обитания исследуемых северных популяций характеризуются резко континентальным климатом с большими амплитудами температур теплого и холодного сезонов года. Эти места обитания – одни из самых холодных территорий Северного полушария, находящиеся в зоне вечной мерзлоты, где зимой температура воздуха может опускаться до минус 62°С (табл. 1).

Микросателлитный анализ

Биологическим материалом являлись невыделанные шкуры животных. Выделение ДНК, проведение полимеразной цепной реакции со специфическими праймерами, а также идентификация аллелей восьми микросателлитных локусов ядерной ДНК (*Ma1*, *Ma3*, *Ma8*, *Ma15*, *Ma18*, *Ma19*, *Mvis072* и *Mer041*) [20, 21] проводили методами, описанными нами ранее в работах [22, 23]. Используемые микросателлиты уже показали высокую эффективность для исследования генетической структуры популяций соболя. Для данного исследования нами дополнительно выбрано еще восемь микросателлитов: один тетра- и семь динуклеотидных локусов (*Mf3.7*, *Mar08*, *Mar21*, *Mar36*, *Mar43*, *Mar53*, *Mar58* и *Mar64*), описанных в работах по исследованию каменной куницы (*Martes foina*) [24] и лесной куницы (*Martes martes*) [25]. Эти локусы были протестированы на эффективность специфичной амплификации и полиморфизм получаемых продуктов.

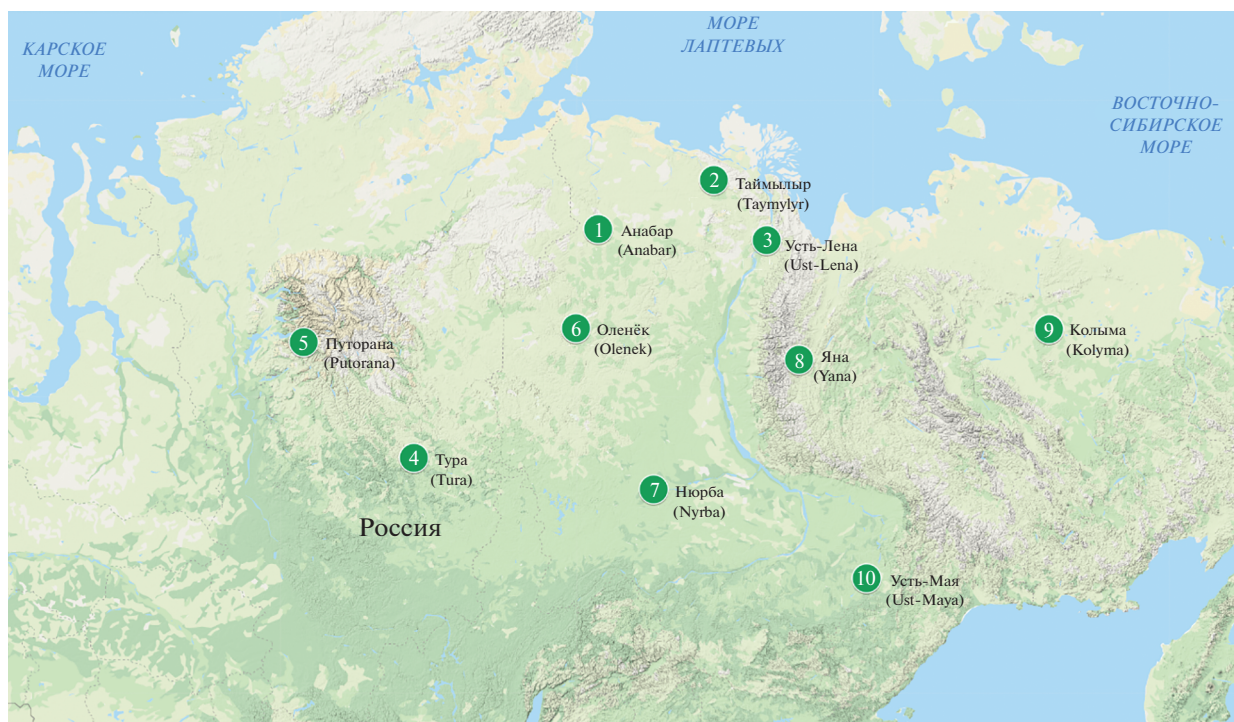


Рис. 1. Места сбора биологического материала. 1 – Анабар (Anabar), 2 – Таймылыр (Taimylyr), 3 – Усть-Лена (Ust-Lena), 4 – Тура (Tura), 5 – Путорана (Putorana), 6 – Оленёк (Olenek), 7 – Нюрба (Nyrba), 8 – Яна (Yana), 9 – Колыма (Kolyma), 10 – Усть-Мая (Ust-Maya). Названия выборки даны также на английском (так, как на рис. 2 и 3).

Популяционно-статистический анализ

Статистический анализ микросателлитных данных выполнен в программной среде R [26]. Основные популяционно-генетические показатели вы-

числены с помощью R-пакета *diveRsity* [27]. Индекс информационного полиморфизма (PIC) для каждой комбинации “локус–выборка” вычислен по формуле, предложенной в [28], на основе частот

Таблица 1. Районы сбора биологического материала

| Природная зона | n | Название выборки | Место сбора биоматериала | Координаты | | Температура воздуха в январе (°C) | |
|----------------|----|------------------|---|------------|---------|-----------------------------------|-------|
| | | | | с.ш. | в.д. | ср. | мин. |
| Тундра | 1 | Анабар | Северо-Сибирская низменность | 71.10° | 114.09° | –26.8 | –64.7 |
| | 2 | Таймылыр | | 72.27° | 122.84° | –35 | –61 |
| | 3 | Усть-Лена | | 70.82° | 126.88° | –35 | –61 |
| Тайга | 4 | Тура | Северо-западная часть Среднесибирского плоскогорья | 64.50° | 100.22° | –36.2 | –58.9 |
| | 5 | Путорана | | 68.08° | 91.80° | –35 | –61 |
| | 6 | Оленёк | Северо-восточная часть Среднесибирского плоскогорья | 68.50° | 112.45° | –36.1 | –62.9 |
| | 7 | Нюрба | | 63.55° | 118.33° | –35.1 | –61 |
| | 8 | Яна | Правый берег р. Лены, бассейн рек Яны, Индигирки и Колымы | 67.60° | 129.39° | –35 | –61 |
| | 9 | Колыма | | 68.45° | 148.37° | –35 | –61 |
| | 10 | Усть-Мая | | 60.38° | 134.45° | –37.4 | –60.2 |

Примечание. ср. – средняя температура за январь, мин. – минимальная температура января.

Таблица 2. Популяционно-генетическая характеристика выборок соболя Среднесибирского плоскогорья

| Выборка | <i>N</i> | <i>A</i> | % | <i>Ar</i> | <i>H_o</i> | <i>H_e</i> | <i>HWE</i> |
|-----------|----------|----------|-------|-----------|----------------------|----------------------|------------|
| Анабар | 5 | 64 | 39.92 | 3.29 | 0.61 | 0.6 | 0.811 |
| Таймылыр | 5 | 67 | 39.65 | 3.41 | 0.68 | 0.6 | 0.9189 |
| Усть-Лена | 18 | 100 | 61.39 | 3.98 | 0.69 | 0.68 | 0.9238 |
| Тура | 22 | 109 | 65.29 | 4.13 | 0.69 | 0.68 | 0.0206 |
| Путорана | 28 | 104 | 62.5 | 4.12 | 0.7 | 0.69 | 0.0727 |
| Оленёк | 24 | 105 | 62.03 | 4.17 | 0.68 | 0.7 | 0.8597 |
| Нюрба | 21 | 118 | 71.94 | 4.28 | 0.69 | 0.72 | 0.3986 |
| Яна | 5 | 73 | 45.06 | 3.74 | 0.76 | 0.67 | 0.2841 |
| Колыма | 12 | 98 | 62.37 | 4.23 | 0.72 | 0.72 | 0.0199 |
| Усть-Мая | 28 | 123 | 74.46 | 4.38 | 0.74 | 0.74 | 0.8792 |

Примечание. *N* – размер выборки, *A* – количество аллелей в выборке, % – средний процент общих аллелей, *Ar* – аллельное богатство, *H_o* – наблюдаемая гетерозиготность, *H_e* – ожидаемая гетерозиготность, *HWE* – равновесие Харди–Вайнберга.

ты аллелей в локусе с помощью R-пакета *polysat* [29]. Тест на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (*HWE*) для каждой комбинации “выборка–локус” выполнен с использованием поправки Бонферрони, где номинальный уровень значимости $\alpha = (0.05/160) = 3.1 \times 10^{-4}$ (PopGenReport) [30]. Поиск собственных, т.е. присущих только одной популяции аллелей (приват-аллелей), осуществляли с помощью того же пакета PopGenReport. Филогенетическое дерево построено методом UPGMA на генетических расстояниях Нея [31] с бутстреп-поддержкой 20000 повторов с помощью R-пакета *pprrg* [32].

Для оценки популяционной структуры соболя выполнили кластеризацию популяций Байесовским методом, основанным на моделировании цепи Маркова методом Монте-Карло (MCMC), реализованным в программе STRUCTURE v. 2.3.4 [33]. Моделирование проводилось с использованием модели Admixture с коррелированными частотами аллелей при 1000000 итераций (MCMC), выжиганием 100000 и 50 независимых прогонов для каждого значения *K* (предполагаемого количества популяций), *K* = 1–6. Оптимальное количество кластеров определено с использованием метода Эванно [34], основанного на специальной статистике Delta*K*, и программ Structure Harvester и Clumpak [35, 36].

Карты географического распространения особей, носителей аллелей микросателлитных локусов, построены с помощью метода анализа главных компонент (PCA principal component analysis), описанного в работе [37]. Парные статистики *Jost's D* [38] и соответствующие *p-values* вычисляли с помощью DEMETICS R-package [39]. Необходимо отметить, что мера генетической дифференциации *Jost's D* имеет преимущество перед *F_{st}* заключается в том, что ее максимальные значения независимы от субпопуляционной гетерозиготности [40] и

лучше отражают генетическую дифференциацию в полиморфных локусах с более чем двумя аллелями.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Генетическая изменчивость

Всего исследовано 168 соболей из десяти выборок, генотипированных по 16 микросателлитным локусам; общее число аллелей составило 158. Число аллелей на локус, оцененное по всем выборкам, варьировало от трех (*Ma3*) до 20 (*Ma18*), среднее количество аллелей на локус составило 9.9. Средние значения PIC для 16 полиморфных локусов варьировались от 0.19 (*Ma3*) до 0.83 (*Ma18*). Сравнительно невысокие значения PIC получены для локусов *Ma3* и *Mf37*.

Максимальное количество аллелей выявлено в популяциях “Усть-Мая” (*A* = 123 при *n* = 28) и “Нюрба” (*A* = 118 при *n* = 21), расположенных в центральной части исследуемого ареала. В этих популяциях выявлена и максимальная доля общих, т.е. присутствующих во всех десяти популяциях, аллелей среди исследованных выборок (табл. 2). Выборки северной и восточной частей исследуемого ареала отличались меньшим аллельным разнообразием (табл. 2). Нарушений *HWE* не было выявлено ни для одной из комбинаций “выборка–локус”. В десяти выборках выявили 18 приват-аллелей; максимальное их количество обнаружено в выборке “Усть-Мая” (6), в самой восточной выборке “Колыма” (4) и в самой западной “Путорана” (3). Для первых двух выборок это можно объяснить влиянием миграций из смежных неисследованных регионов, а для выборки “Путорана” – ее изолированностью.

Результаты оценки уровня генетической дифференциации между выборками представлены в табл. 3. Максимальная дифференциация (*D* =

Таблица 3. Парные значения генетической дифференциации (D) и соответствующие p -значения между исследуемыми выборками Среднесибирского плоскогорья и правого берега р. Лены

| | Анабар | Таймыльыр | Усть-Лена | Тура | Путорана | Оленёк | Нюрба | Яна | Колыма | Усть-Мая |
|-----------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| Анабар | | 0.686 | 0.587 | 0.056 | 0.062 | 0.628 | 0.572 | 0.001 | 0.002 | 0.001 |
| Таймыльыр | 0.000 | | 0.707 | 0.050 | 0.009 | 0.869 | 0.634 | 0.008 | 0.003 | 0.001 |
| Усть-Лена | 0.000 | 0.000 | | 0.001 | 0.001 | 0.341 | 0.002 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| Тура | 0.046 | 0.047 | 0.064 | | 0.013 | 0.001 | 0.003 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| Путорана | 0.049 | 0.083 | 0.094 | 0.033 | | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| Оленёк | 0.000 | 0.000 | 0.004 | 0.068 | 0.083 | | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 |
| Нюрба | 0.013 | 0.000 | 0.067 | 0.058 | 0.073 | 0.061 | | 0.085 | 0.016 | 0.034 |
| Яна | 0.215 | 0.114 | 0.189 | 0.195 | 0.172 | 0.176 | 0.044 | | 0.004 | 0.058 |
| Колыма | 0.129 | 0.107 | 0.134 | 0.125 | 0.133 | 0.169 | 0.058 | 0.115 | | 0.005 |
| Усть-Мая | 0.200 | 0.111 | 0.168 | 0.127 | 0.148 | 0.198 | 0.029 | 0.046 | 0.054 | |

Примечание. Нижняя часть таблицы – $Jost D$, верхняя – соответствующие p -значения, значимые различия выделены жирным ($p \leq 0.05$).

= 0.129–0.215) выявлена между выборками из зоны тундры и тайги левого берега р. Лена (“Анабар”, “Усть-Лена” и “Оленёк”) и выборками из зоны тайги правого берега (“Колыма”, “Яна” и “Усть-Мая”). Сходные коэффициенты дифференциации ($D = 0.125–0.195$) обнаружены между выборками западной части Среднесибирского плоскогорья (“Тура” и “Путорана”) и выборками правого берега р. Лены (“Колыма”, “Яна”, “Усть-Мая”). Между выборками левого берега р. Лены (“Нюрба”) и правого (“Яна”) значимой дифференциации не обнаружено ($D = 0.044$, $p = 0.085$).

Популяции правого берега р. Лены между собой оказались генетически дифференцированы. Максимальные значения наблюдали у пар выборок “Колыма–Яна” ($D = 0.115$, $p = 0.004$) и “Колыма–Усть-Мая” ($D = 0.054$, $p = 0.005$). Выборка “Оленёк” значимо не дифференцирована с тремя выборками соболя из зоны тундры (“Анабар”, “Усть-Лена” и “Таймыльыр”). Вероятно соболи в этих районах являются мигрантами из популяции “Оленёк”, обитающей в зоне тайги. С расположенной южнее выборкой “Нюрба” различия значимы ($D = 0.061$, $p = 0.001$). Между северными выборками “Путорана” и “Оленёк”, локализованными на одной широте, также выявлены значимые различия: $D = 0.083$ ($p = 0.001$). Еще большие различия имеет выборка “Путорана” с тундровой выборкой “Усть-Лена” ($D = 0.094$, $p = 0.001$).

Филогенетический анализ

Анализ, основанный на генетических расстояниях Нея, продемонстрировал высокую степень

сходства между двумя выборками северо-западной части Среднесибирского плоскогорья “Путорана” и “Тура” (тунгусский соболь), между двумя выборками зоны тундра “Усть-Лена” и “Оленёк” (оленёкский соболь), а также двумя выборками из восточной части исследуемого ареала – “Нюрба” и “Усть-Мая”. Отношение этих выборок к другим выборкам из зоны тундры (“Таймыльыр” и “Анабар”) и с правобережья Лены (“Колыма” и “Яна”) остается неопределенным (рис. 2).

Анализ популяционной структуры

Для байесовской кластеризации мы выбрали Admixture – модель с коррелированными частотами аллелей, которая предполагает, что животное может иметь смешанное происхождение. Используя метод Дж. Эванно с соавт., основанный на специальной статистике DeltaK, оптимальное количество кластеров равно двум (табл. 4). Первый кластер состоит из выборок севера Средне-Сибирского плоскогорья, как исторических (“Тура”, “Путорана” и “Оленёк”), так и новых тундровых (“Анабар”, “Таймыльыр” и “Усть-Лена”). Второй кластер состоит из выборок с правобережья р. Лены (“Яна”, “Колыма”, “Усть-Мая”) (рис. 3).

При оценке популяционной структуры с использованием функции максимального правдоподобия ($L(K)$) оптимальное количество кластеров равно трем (рис. 4, табл. 4). Первый состоит из западных выборок Среднесибирского плоскогорья “Тура” и “Путорана”, второй включает “Оленёк” и тундровые выборки (“Анабар”, “Таймыльыр” и “Усть-Лена”). Третий объединяет по-

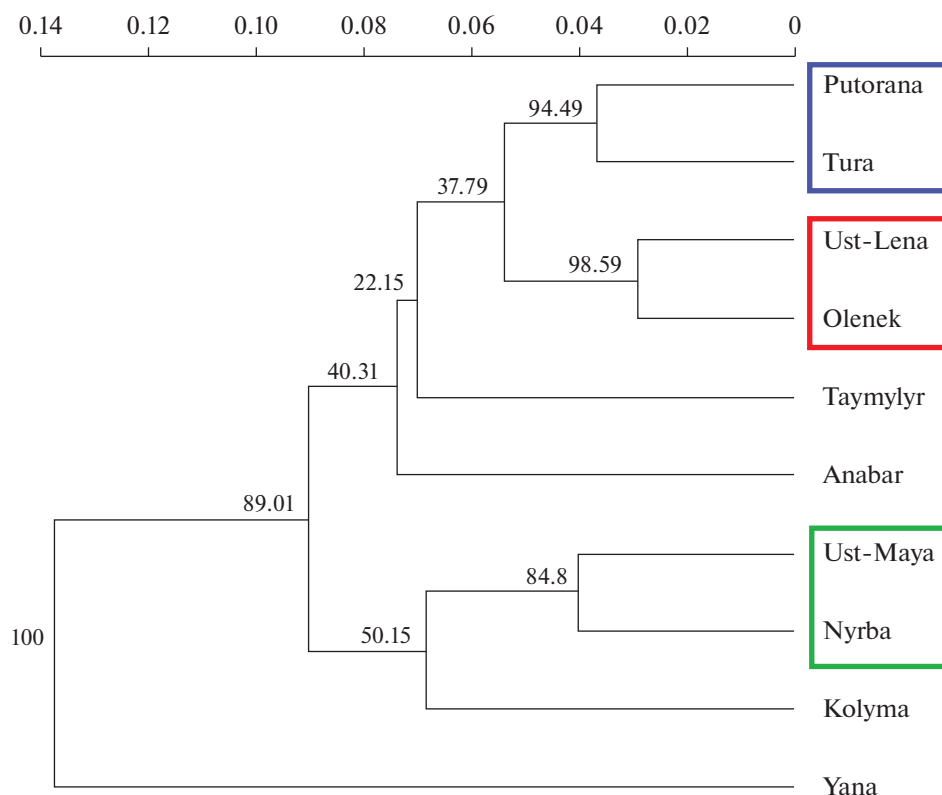


Рис. 2. Кластеризация выборок соболя северной и центральной частей Среднесибирского плоскогорья с помощью метода UPGMA. Значения бутстрепа, приведены в узлах ветвления и, показывают частоту появления связанной ветки при бутстреп-поддержке 20000.

пуляции правобережья р. Лены (“Яна”, “Колыма” и “Усть-Мая”) (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Современное популяционно-генетическое разнообразие соболя, обитающего на Среднесибирском плоскогорье, сложилось вследствие естествен-

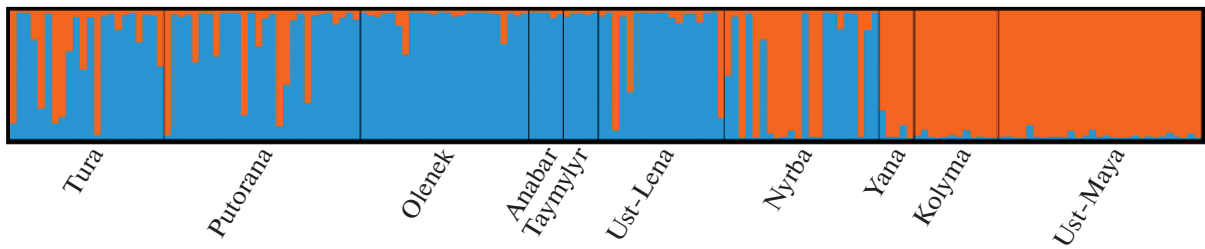
но-эволюционных процессов и антропогенного влияния. В XVII–XIX вв. нерегулируемый промысел и лесные пожары привели к глубокой депрессии численности вида и сильной фрагментации ареала [5, 41]. В XX в. ресурсы соболя были восстановлены; в 1961 г. лицензионный промысел был введен повсеместно. По данным административных структур региона Республики Саха

Таблица 4. Результаты обработки данных анализа STRUCTURE методом Эванно для определения оптимального количества кластеров популяций соболя

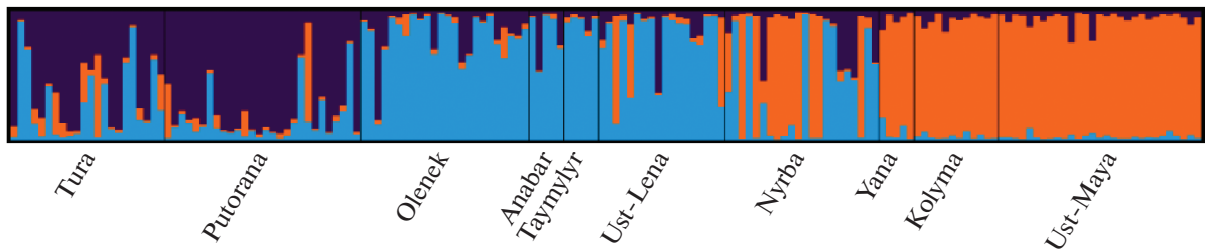
| K | Reps | MeanLn(K) | StdevLn(K) | Ln'(K) | Ln''(K) | DeltaK |
|-----|------|---------------------|----------------|-------------|-------------|------------------|
| 1 | 50 | -9142.983824 | 0.549249 | — | — | — |
| 2 | 50 | -8829.268852 | 6.006234 | 313.714971 | 249.991431 | 41.621993 |
| 3 | 50 | -8765.545313 | 151.681066 | 63.723540 | 186.288227 | 1.228157 |
| 4 | 50 | -8888.110000 | 38.019432 | -122.564688 | 446.725312 | 11.749921 |
| 5 | 50 | -9457.400000 | 153.101902 | -569.290000 | 792.590000 | 5.176879 |
| 6 | 50 | -9234.100000 | 87.921451 | 223.300000 | — | — |

Примечание. K – количество кластеров, Reps – количество повторных запусков, MeanLn(K) и StdevLn(K) – среднее значение и стандартное отклонение функции правдоподобия Ln(K) по всем повторным запускам для каждого K соответственно, Ln'(K) – средняя скорость изменения распределения правдоподобия, рассчитанное как: Ln(K) – Ln(K – 1), |Ln''(K)| – абсолютное значение второго порядка скорости изменения распределения правдоподобия, рассчитанное как: |Ln'(K + 1) – Ln'(K)|, DeltaK – hoc-статистика, рассчитанная как: |Ln''(K)|/StdevLn(K). Жирным выделены значения статистик, соответствующие оптимальному числу кластеров согласно критерию максимального правдоподобия и критерию DeltaK.

$K = 2$



$K = 3$



$K = 4$

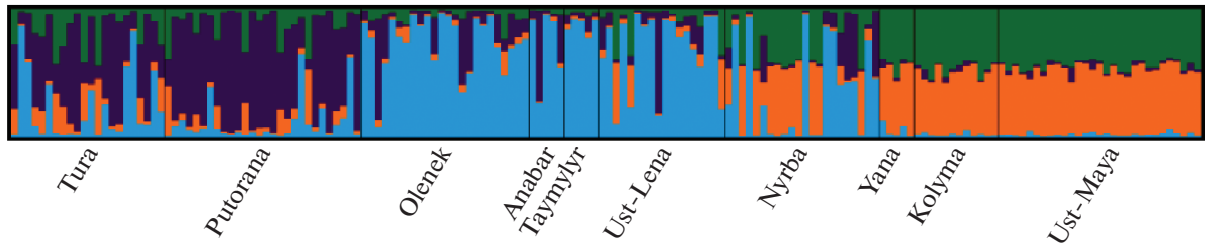


Рис. 3. Байесовская кластеризация методом Монте-Карло (MCMC).

(Якутия) к концу 1980-х гг. объемы добычи соболя составляли 56.4–56.7 тыс. особей в год. В последние десятилетия наблюдается рост объемов добычи, превысивший прежний уровень 1980-х гг., до 65 тыс. особей к 2011 г.

Современная возрастная структура популяций соболя в Якутии характеризуется высокой долей молодняка (60–70%) [14], что свидетельствует об увеличении сезонной миграционной активности. Ранее, в 1958–1960 гг., молодые зверьки составляли 19–37% [11], а в 1973–1984 гг. – 47% [42]. Рост численности соболя приводит к повышенной территориальной конкуренции. Молодняк текущего года увеличивает сезонный миграционный пробег в поисках собственных участков обитания. Исследования миграционных возможностей вида показывают, что дальность сезонных миграций (расселение молодняка) может превысить 200 км [43]. Эти расстояния близки к миграционным возможностям американской куницы (*Martes americana*) [44–46]. Повышение численности вследствие изменений климатических условий и активизация миграционных процессов могут привести к стиранию генетических различий между историческими популяциями этого региона.

Северную часть Среднесибирского плоскогорья, включающую бассейны рек Енисея и Хатанги, населяют нативные популяции, в разной степени изолированные от основного ареала вида.

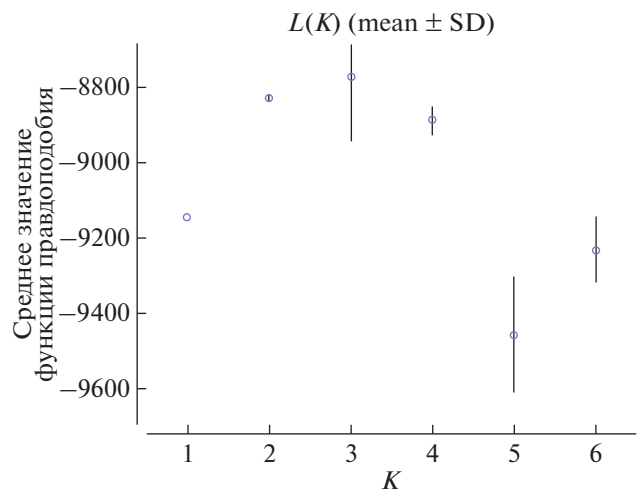


Рис. 4. График функции правдоподобия от количества кластеров $L(K)$.

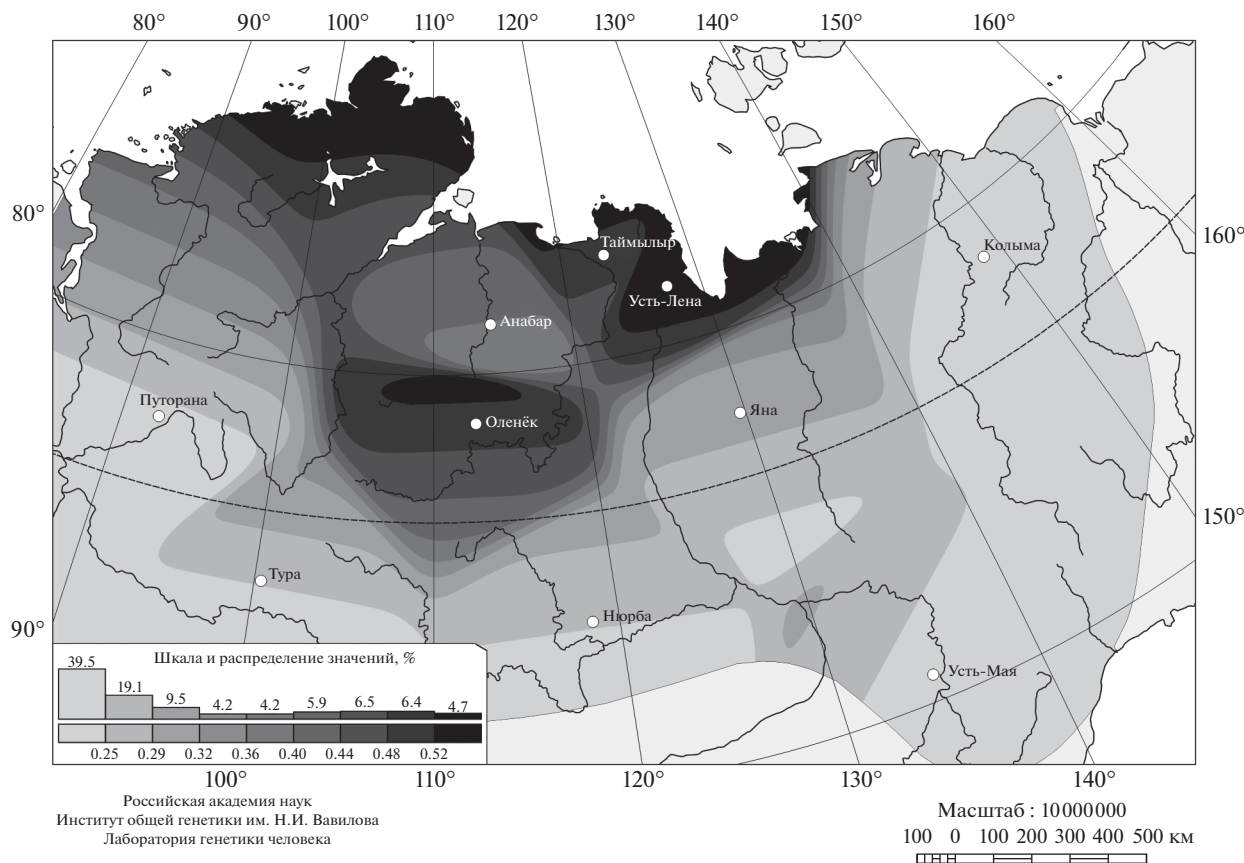


Рис. 5. Карта распределения особей выборки зоны тундры, носителей аллеля 162 (локус *Mer041*), показывает что, в тундровой зоне обитают родственные группы, о чем свидетельствует повышенная (по сравнению с сопредельными выборками) частота ряда локусов и проявление эффекта основателя (черный цвет – максимальная частота аллеля, серый – минимальные значения).

Известно, что эти популяционные группировки вида восстановились естественным расселением из отдельных сохранившихся очагов. Наиболее крупные очаги соболя сохранялись в горной части правобережья р. Енисей (“Путорана” и “Тура”), откуда и происходило расселение. Несмотря на сравнительно небольшое географическое расстояние между локациями выборок “Путорана” и “Тура” (530 км), выборки оказались, хотя и слабо, но статистически значимо дифференцированы ($D = 0.033$, $p = 0.013$). Помимо этого мы наблюдали значимые отличия выборки “Путорана” с восточной выборкой “Оленёк” (850 км, $D = 0.083$, $p = 0.001$). Следовательно, популяция плато Путорана сохраняет изоляцию от генных потоков из популяций центральной и восточной частей Среднесибирского плоскогорья. Кроме того, существуют некоторые морфологические особенности путоранского соболя по сравнению с тунгусским соболем [1].

В северо-восточной части Среднесибирского плоскогорья и в равнинных лесах левобережья р. Лены обитает популяция оленёкского соболя, которая морфологически достаточно сильно от-

личается от популяций соседних регионов [6, 10, 15]. В этом исследовании мы обнаружили, что выборка “Оленёк” из популяции оленёкского соболя значимо генетически дифференцирована как от выборок запада Среднесибирского плоскогорья (“Путорана” и “Тура”), так и от более южной выборки “Нюрба” (табл. 3). Необходимо отметить, что в районе сбора “нюрбинских” проб проходит зона контакта (“гибридизации”) оленёкского соболя с обитающим южнее витимским соболем [15]. Оленёкский соболь распространён вплоть до притундровых лесов.

Отдельные особи встречаются глубоко в тундровой зоне, проникая по долинам рек, здесь в современной северной периферии ареала собраны три выборки “Анабар”, “Таймыр” и “Усть-Лена”, которые показали отсутствие генетической дифференциации с исторической популяцией “Оленёк”, что позволяет предположить их относительно недавнее происхождение за счет миграций с юга (табл. 3, рис. 5).

Данные карт географического распределения генотипов особей, носителей аллелей, показывают

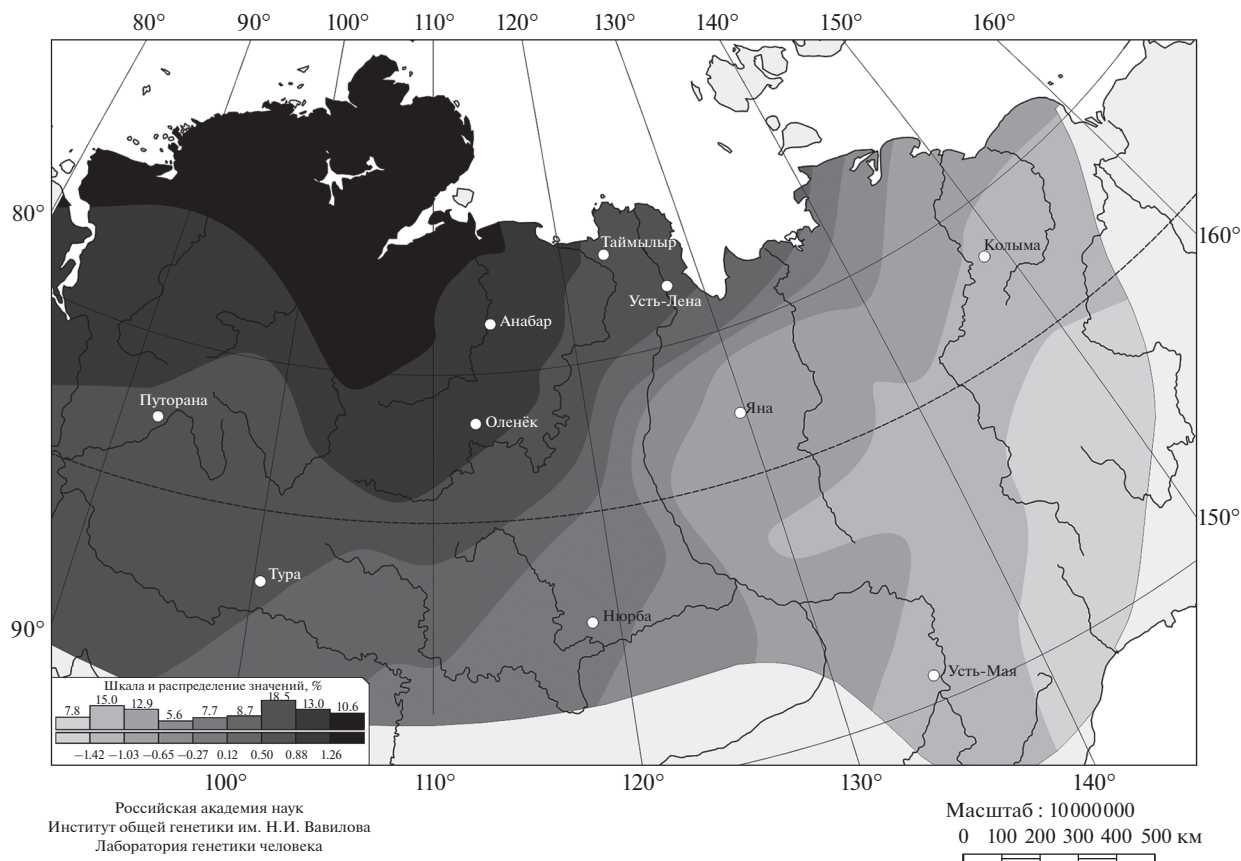


Рис. 6. География генетического разнообразия по первой главной компоненте (PCA 9Pc1) – 35.22% разнообразия 158 аллелей 16 микросателлитных локусов. Основные тенденции расселения соболя в новой зоне обитания – тундра. Выборки Анабар, Таймылыр и Усть-Лена являются мигрантами исторической популяции Оленёк. Р. Лена является препятствием для миграционных потоков с юго-восточной части ареала.

что, в тундровой зоне обитают группы, родственные оленёкскому соболю, о чем свидетельствует повышенная по сравнению с сопредельными выборками частота ряда аллелей определенных локусов и проявление эффекта основателя (рис. 5). Частоты аллелей в выборках, отклоняющиеся от средних характерных для популяций исследуемого региона, свидетельствуют о формировании субпопуляционной структуры в зоне тундры. Это проявляется как по отдельным локусам, так и по данным анализа первой главной компоненты, объединяющей 30% от генетической дисперсии выявленного пула аллелей (рис. 5–7).

Выборки из новой для соболя зоны обитания – тундры (“Анабар”, “Таймылыр” и “Усть-Лена”), не дифференцированы между собой (табл. 3), что позволяет провести объединение в одну группу, состоящую из 28 особей. В этой группе обнаружено высокое аллельное разнообразие ($A = 104$), что сопоставимо с данными аллельного разнообразия исторических популяций севера среднесибирского плоскогорья (“Туря”, “Путорана”, “Оленёк”, табл. 2). Это позволяет предположить не только существование постоянных миграционных пото-

ков из более южных популяций, но существование меридиональных миграций в зоне тундры (рис. 7).

Анализ значений дифференциации популяции левого берега р. Лены “Оленёк” с популяциями, обитающими восточнее р. Лены, выявил максимальные различия с выборками “Усть-Мая” ($D = 0.198, p = 0.001$), “Яна” ($D = 0.176, p = 0.001$) и “Колыма” ($D = 0.169, p = 0.001$) (табл. 3). Эти данные позволяют сделать вывод, что миграционные возможности популяции “Оленёк” ограничиваются северными территориями, северо-восточнее р. Лены миграционные потоки из этой популяции пока не распространяются (рис. 6). Согласно карте географического распределения генных потоков (рис. 6), построенной по объединенным данным 158 аллелей 16-ти локусов, генные потоки, идущие с юго-восточной части ареала на запад, ограничены р. Леной и Верхоянским хребтом. Это одна из причин высоких значений коэффициента дифференциации ($Jost's D$). Другая причина – в истории восстановления правобережной части ареала вида. Известно, что восточнее р. Лены (Верхоянский хребет, хребет Черского и Колым-

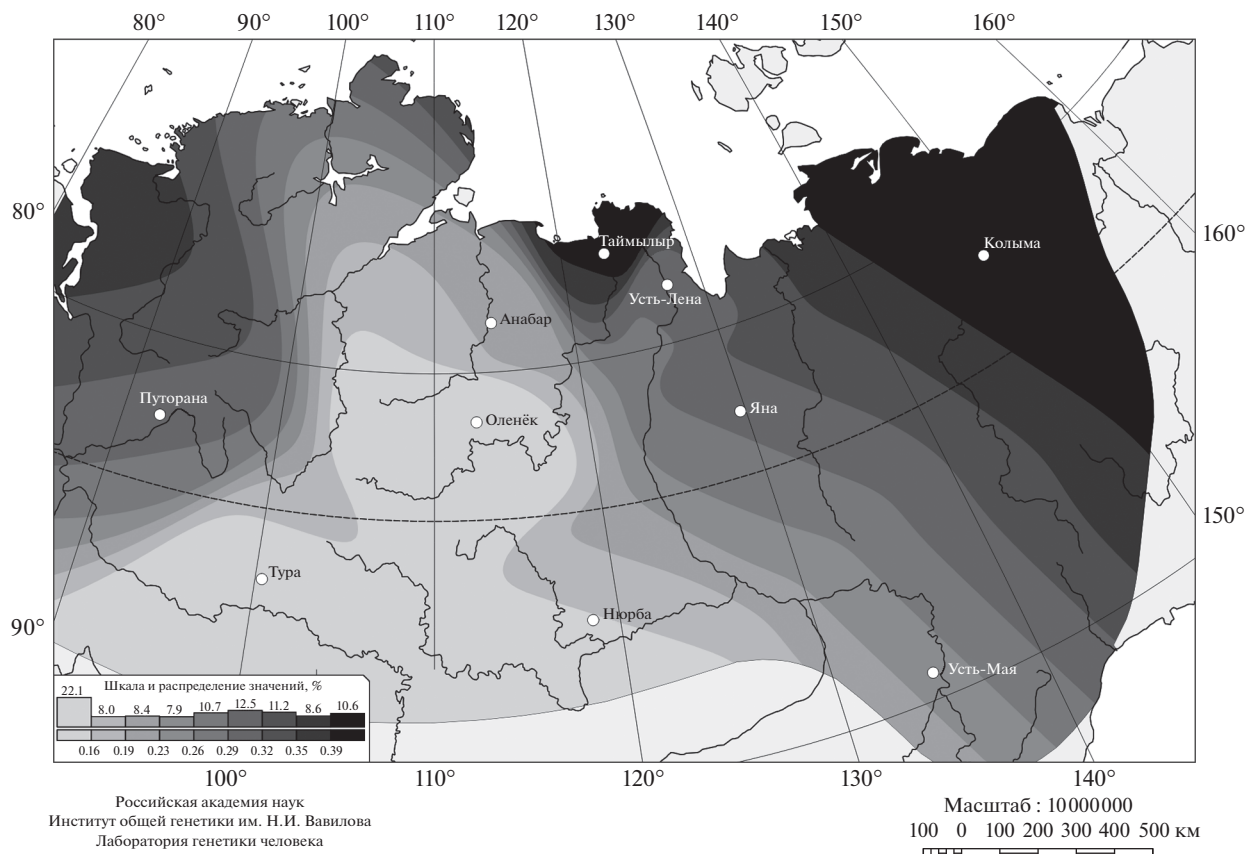


Рис. 7. Карта распределения особей носителей аллеля 214 (локус *Ma19*) в популяциях зоны тундры. Это – наглядное подтверждение меридианальных миграций в зоне тундры (черный цвет – максимальная частота, серый цвет – минимальные значения частот аллеля 214).

ская низменность) восстановление численности проходило за счет интродукций из нескольких регионов [4]. Результаты настоящего исследования показывают, что на правом берегу р. Лены выборки “Яна”, “Колыма” и “Усть-Мая” достаточно изолированы от основного региона обитания нативных популяций Среднесибирского плоскогорья.

Наиболее важные результаты настоящего исследования – это вывод о том, что популяции, как находящиеся на Среднесибирском плоскогорье, так и на правом берегу р. Лены, не подверглись перестройке генетической структуры под действием миграционных потоков и значимо генетически дифференцированы (табл. 3). Применяемые методы кластеризации указывают на существование на исследуемом ареале нескольких кластеров, определяющим фактором создания которых являются ландшафтные препятствия и географические расстояния между популяциями (рис. 2–4, табл. 4).

В настоящее время вид находится в стадии расселения. За последние годы соболь глубоко проник в зону тундры, где он вступает в межвидовые отношения с основным по численности хищником

тундровой экосистемы – песцом (*Alopex lagopus* L.). Появление соболя далеко за пределами типичных мест обитания может свидетельствовать об активном освоении новых территорий, что подтверждает благополучное состояние северных притундровых популяций вида. В тундровой зоне животные предпочитают держаться пойменных участков с кустарниковой растительностью, где защитные условия более благоприятные. Характер межвидовых отношений соболя с песцом, численность которого подвержена резким колебаниям в зависимости от обилия кормов, не ясен, а основу питания обоих видов составляют мелкие грызуны, в частности лемминг (*Arvicolinae*). С появлением в тундровой экологической системе нового хищника–соболя, устойчивое состояние биоценоза этой системы может оказаться под угрозой.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тимофеев В.В., Надеев В.Н. Соболь. Москва: Заготиздат, 1955. 403 с.
2. Монахов Г.И., Бакеев Н.Н. Соболь. 2-е изд. Москва: Лесная промышленность, 1981. 240 с.
3. Зырянов А. Соболь Средней Сибири / Под ред. Смирнова М.Н. Красноярск: Сибирские промыслы, 2009. 256 с.
4. Павлов М.П., Корсакова И.Б., Тимофеев В.В. Акклиматизация охотничье-промысловых зверей и птиц в СССР. Киров: Волго-Вят. кн. изд-во, 1973. 536 с.
5. Романов А.А. Пушные звери Ленско-Хатангского края и их промысел / Под ред. Доппельмайра Г.Г. Ленинград: Изд-во Главсевморпути, 1941. 140 с.
6. Zakharov E.S., Safronov V.M. Ecology of sable of North-Western Yakutian native population // Russ. J. Theriol. 2017. V. 16. № 1. P. 74–85. <https://doi.org/10.15298/rusjtheriol.16.1.07>
7. Тавровский В.А. Соболь Северо-Западной Якутии и пути восстановления его промысла // Восстановление промысловых запасов соболя в Якутии. Тр. ин-та биол. Якутск. ф-ла СО АН СССР. М.: Изд-во АН СССР, 1958. № 4. С. 50–142.
8. Тавровский В.А., Шитаев И.С. Материалы по питанию соболя Северо-Западной Якутии // Зоол. журн. 1957. Т. XXI. № 4. С. 608–616.
9. Тавровский В.А. О прошлом распространении и численности соболя в Якутии // Исследования по промысловой зоологии. Тр. ин-та биол. Якут. ф-ла СО АН СССР. 1959. № 6. С. 47–75.
10. Тавровский В.А. Некоторые вопросы географической изменчивости соболя и систематическое положение соболей Якутии // Исследования по промысловой зоологии. Тр. ин-та биол. Якут. ф-ла СО АН СССР. 1959. № 6. С. 76–96.
11. Тавровский В.А., Егоров О.В., Кривашев В.Г. и др. Млекопитающие Якутии. Москва: Наука, 1971. 660 с.
12. Монахов В.Г. Динамика размерной и фенетической структуры соболя в ареале. Екатеринбург: НИСО УрО, 2006. 202 с.
13. Захаров Е.С., Сафронов В.М., Павлова А.И. Зимнее питание соболя (*Martes zibellina* L.) в Якутии // Достижения науки и техники АПК. 2016. Т. 30. № 11. С. 82–87.
14. Сафронов В.М. Изменение климата и млекопитающие Якутии // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 12. С. 1459–1474. <https://doi.org/10.7868/S004451341612014X>
15. Захаров Е.С., Сафронов В.М. Экология соболя (*Martes zibellina* L.) в западной Якутии // Вестник Томского гос. ун-та. Биология. 2012. Т. 1. № 17. С. 73–84.
16. Wereszczuk A., Leblois R., Zalewski A. Genetic diversity and structure related to expansion history and habitat isolation: Stone marten populating rural-urban habitats // BMC Ecol. 2017. V. 17. <https://doi.org/10.1186/s12898-017-0156-6>
17. Baltensperger A.P., Morton J.M., Huettmann F. Expansion of American marten (*Martes americana*) distribution in response to climate and landscape change on the Kenai Peninsula, Alaska // J. Mammal. 2017. V. 98. № 3. P. 703–714. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx011>
18. Бельк В.И. О распространении соболя в Якутии // Природа. 1948. № 6. С. 64–65.
19. Грязнухин А.Н. Результаты реакклиматизации соболя в Якутии // Фауна и экология наземных позвоночных таежной Якутии. 1980. С. 43–78.
20. Davis C.S., Strobeck C. Isolation, variability, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite loci in the family mustelidae // Mol. Ecol. 1998. P. 1776–1778. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1998.00515.x>
21. Fleming M.A., Ostrander E.A., Cook J.A. Microsatellite markers for American mink (*Mustela vison*) and ermine (*Mustela erminea*) // Mol. Ecol. 1999. V. 8. № 8. P. 1352–1355. https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.1999.00701_2.x
22. Каушанов С.Н., Свищева Г.Р., Лазебный О.Е. и др. Влияние антропогенных факторов на генетическое разнообразие вида соболя (*Martes zibellina* L.) // Мол. биология. 2015. Т. 49. № 3. С. 449–454.
23. Каушанов С.Н., Столповский Ю.А., Мецкерский И.Г. и др. Таксономический статус и генетическая идентификация соболя Алтая (*Martes zibellina* averini Bazhanov, 1943) // Генетика. 2018. Т. 54. № 11. С. 1327–1337. <https://doi.org/10.1134/S0016675818110073>
24. Basto M.P., Rodrigues M., Santos-Reis M. et al. Isolation and characterization of 13 tetranucleotide microsatellite loci in the Stone marten (*Martes foina*) // Conserv. Genet. Resour. 2010. V. 2. P. 317–319. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9217-2>
25. Natali C., Banchi E., Ciofi C. et al. Characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in the European pine marten *Martes martes* // Conserv. Genet. Resour. 2010. V. 2. P. 397–399. <https://doi.org/10.1007/s12686-010-9282-6>
26. R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing // R Foundation for Statistical Computing. Austria: Vienna, 2014.
27. Kevin Keenan, Philip McGinnity, Tom F. Cross et al. DiveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors // Methods Ecol. Evol. 2013. V. 4. P. 782–788. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
28. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314–331.
29. Clark L.V., Jasieniuk M. POLYSAT: An R package for polyploid microsatellite analysis // Mol. Ecol. Resour. 2011. V. 11. P. 562–566. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x>
30. Adamack A.T., Gruber B. PopGenReport: Simplifying basic population genetic analyses in R // Methods Ecol. Evol. 2014. V. 5. P. 384–387. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
31. Nei M. Genetic distance between populations // The Am. Nat. 1972. V. 106. № 949. P. 283–292. <https://doi.org/10.1086/282771>

32. *Kamvar Z.N., Tabima J.F., Grünwald N.J.* Poppr: An R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction // *Peer J*. 2014. V. 2. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
33. *Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P.* Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics*. 2000. V. 155. № 2. P. 945–959. <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
34. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. № 8. P. 2611–2620.
35. *Earl D.A., VonHoldt B.M.* STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Conservation Genet. Resources*. 2012. V. 4. № 2. P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
36. *Kopelman N.M., Mayzel J., Jakobsson M. et al.* Clumpak: A program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K // *Mol. Ecol. Resources*. 2015. V. 15(5). P. 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
37. Генофонд и геногеография народонаселения // Под ред. Рычкова Ю.Г.: Том II. Генофонд населения России и сопредельных стран. СПб.: Наука, 2003. 671 с.
38. *Jost L.* GST and its relatives do not measure differentiation // *Mol. Ecol.* 2008. V. 17. № 18. P. 4015–4026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03887.x>
39. *Jueterbock A., Kraemer P., Gerlach G. et al.* Package “DEMEtics” // *Mol. Ecol.* 2012. P. 3845–3852.
40. *Alcala N., Rosenberg N.A.* GST, Jost’s D, and FST are similarly constrained by allele frequencies: A mathematical, simulation, and empirical study // *Mol. Ecol.* 2019. V. 28. № 7. <https://doi.org/10.1111/mec.15000>
41. *Мухель Н.М.* Промысловые звери Северо-Восточной Якутии. Л.: Изд-во Главсевморпути, 1938. 96 с.
42. *Ревин Ю.В., Сафронов В.М., Вольперт Я.Л. и др.* Экология и динамика численности млекопитающих Предверхоянья. Новосибирск: Наука, 1988. 200 с.
43. *Черников Е.М.* Экология соболя (*Martes zibellina* Lunneus, 1758) в Баргузинском заповеднике. Улан-Удэ: Изд-во Бурятского гос. ун-та, 2006. 266 с.
44. *Thompson I.D., Colgan P.W.* Numerical responses of martens to a food shortage in Northcentral Ontario // *J. Wildl. Manage.* 1987. V. 51. № 4. P. 824–835. <https://doi.org/10.2307/3801748>
45. *Slough B.G.* Movements and habitat use by transplanted marten in the Yukon Territory // *J. Wildl. Manage.* 1989. V. 53. № 4. P. 991–997. <https://doi.org/10.2307/3809600>
46. *Fecske D.M., Jenks J.A., Smith V.J.* Field evaluation of a habitat-relation model for the American marten // *Wildl. Soc. Bull.* 2002. V. 30. № 3. P. 775–782.

Expansion of the Sable (*Martes zibellina* L.) from the North of the Central Siberian Plateau into Tundra Ecosystems

S. N. Kashtanov^{a, *}, E. S. Zakharov^b, O. A. Begletsov^c, G. R. Svishcheva^{a, d}, S. Yu. Rychkov^a, P. A. Filimonov^a, A. A. Onokhov^a, E. S. Levenkova^e, I. G. Meschersky^e, and V. V. Rozhnov^e

^aVavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

^bInstitute of Biological Problems of Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677890 Russia

^cFederal State Budgetary Institution “United Directorate of Reserves of Taimyr” Norilsk, 663305 Russia

^dFederal Research Center Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia

^eSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: snkashtanov@mail.ru

Using 16 STR markers, the genetic structure of sable populations in the north of the Central Siberian Plateau and the right bank of the Lena River was studied. From typical taiga habitats and atypical tundra habitats directly adjacent to the coast of the Arctic Ocean. At present, the species is in the stage of settlement; in recent years, the sable has deeply penetrated into the tundra zone. Since 2000, an increase in the number of sable and an increase in migratory activity have been recorded in this region, in connection with this, the level of differentiation between the “historical” sable populations was studied. Data on the geographical distribution of sable genotypes show that groups related to the Olenek sable population inhabit the tundra zone. Evidence of the formation of a sable subpopulation structure in a new habitat has been revealed. Another conclusion: the “historical” populations of the Central Siberian Plateau did not undergo a restructuring of the genetic structure under the influence of migration flows and are significantly genetically differentiated. The appearance of sables in the tundra indicates the active development of new territories that were not previously typical for the species.

Keywords: geographic populations of sable, population increase, microsatellite loci, phylogenetic analysis, genetic structure.

УДК 575.18:599.742.4

ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВТОРИЧНОГО СООТНОШЕНИЯ ПОЛОВ У АМЕРИКАНСКОЙ НОРКИ (*Neovison vison*)

© 2022 г. С. В. Бекетов^{1, 2, *}¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия²Московская государственная академия ветеринарной медицины
и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина, Москва, 109472 Россия

*e-mail: svbeketov@gmail.com

Поступила в редакцию 24.02.2022 г.

После доработки 18.03.2022 г.

Принята к публикации 22.03.2022 г.

Проведен статистический анализ вторичного (при рождении) соотношения полов в промышленной популяции американской норки (*Neovison vison* Schr.) породы стандартная темно-коричневая. Исследование выполнено на материалах Пушкинского племенного звероводческого хозяйства Московской обл. по данным журналов “Отбраковка молодняка”. Всего было проанализировано 1550 щенений 999 самки норки. Общий объем выборки за пять лет составил 10372 щенка. По результатам анализа в рассматриваемой популяции итоговая частота рождения самцов составила 0.492 ± 0.0067 с 95% доверительным интервалом $0.473 \leq P(A) \leq 0.511$. В отличие от других основных видов пушных зверей клеточного разведения: лисиц, песцов и соболей, у американской норки вторичный половой состав характеризуется непостоянством и неоднородностью с переменным преобладанием самок или самцов в потомстве в зависимости от паратипических факторов (возраст матери и размер помета). При этом, по мере старения матерей отклонение соотношения полов смещается в сторону преобладания в потомстве самцов, а при увеличении размера помета – в сторону увеличения количества самок.

Ключевые слова: пушные звери, американская норка, вторичное соотношение полов, изменчивость, возраст матери, размер помета.

DOI: 10.31857/S0016675822080021

В динамике половой структуры популяции, наряду с первичным, важное значение имеет вторичное (при рождении) соотношение полов, которое в соответствии с хромосомной теорией определения пола у подавляющего большинства млекопитающих близко к 1 : 1 или, если считать относительно числа родившихся самцов, равно 0.5 (50%) [1, 2]. Согласно Р. Фишеру соотношение полов 1 : 1 является эволюционно устойчивым, если энергетические затраты родителей на воспроизводство одинаковы и не зависят от пола потомков, гибель которых от образования зиготы до окончания периода родительской заботы – равновероятна [1].

Однако эти условия могут нарушаться. Действительно фактическое соотношение самцов и самок, определяемое сегрегацией мужских и женских детерминантов в мейозе у гетерогаметного пола, может поддерживаться за счет популяционно-генетических механизмов, и в первую очередь благодаря отбору генов, функционирующих в организме родителей и участвующих в контроле за соотношением полов у потомков [3]. В частности, у некоторых млекопитающих существуют генетические ме-

ханизмы (аберрантная система определения пола и мейотический драйв), обеспечивающие первично неравное соотношение полов. Также теоретически весьма вероятна как избирательность яйцеклеток к X-, Y-сперматозоидам, так и их способность к оплодотворению. Возможна и разная частота имплантации XX и XY-зигот [4, 5]. Еще чаще в научной литературе встречаются указания на зависимость вторичного соотношения полов от различных негенетических факторов: физиологического состояния матерей, их социально-иерархического статуса, возраста обоих или одного из родителей и т.д. [6–13].

При этом проводить оценку вторичного соотношения полов у млекопитающих в живой природе крайне затруднительно. В то время как в условиях животноводческих предприятий есть возможность получения наиболее точных сведений о соотношении самцов и самок среди новорожденных потомков, что особенно важно с учетом предпочтительного получения особей одного пола. Например в животноводстве для расширенного воспроизводства стада или молока требуется больше самок, а

для получения мяса и шерсти – самцов. Аналогично и в звероводстве: одним из эффективных способов увеличения размера шкурки пушных зверей без ухудшения их качественных показателей является преобладающее рождение в потомстве самцов. Поэтому изучению изменчивости вторичного соотношения полов у пушных зверей в условиях звероферм посвящено большое число научных работ. Подобные исследования проводились на песцах [14–20], лисицах [21, 22], соболе [23–25] и американских норках [26–28]. Однако несмотря на столь очевидную значимость проблемы, половой состав новорожденных и механизмы его регуляции у млекопитающих, в том числе и у пушных зверей, изучены еще недостаточно, а имеющиеся данные зачастую противоречивы. Это утверждение в полной мере относится и к американской норке – самому многочисленному объекту мирового звероводства. Например в 2015 г. было произведено около 80 млн шкурки норки [29].

Цель нашего исследования – изучение изменчивости вторичного соотношения полов у американской норки, в т.ч. в сравнении с основными видами пушных зверей, и оценкой действия тех факторов, которые наиболее часто рассматриваются как влияющие на соотношение полов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на материалах Пушкинского племенного звероводческого хозяйства Московской обл. (ФГУП “Русский соболь”) по данным журналов “Отбраковка молодняка” за период с 1984 по 1988 гг. Объектом исследования была стандартная темно-коричневая норка. Всего было проанализировано 1550 щенений 999 самок. Общий объем выборки за пять лет составил 10372 щенка. При этом важно отметить, что указанные первичные данные представляют существенный интерес, т.к. в рассматриваемый период времени самок норки основного стада в российских зверохозяйствах использовали до четырехлетнего возраста, затем, начиная примерно с 2000-х гг., только до двух лет.

Статистический анализ данных проводили по методике Н.Н. Хромова-Борисова [30]. Биометрическая обработка дискретных случайных величин (данные по вторичному соотношению полов у пушных зверей) сводилась к решению вероятностной модели, удовлетворяющей следующим двум предположениям: 1) вероятность рождения самца $P(A)$ есть величина постоянная, 2) пол новорожденного не зависит от всех предыдущих или последующих актов рождения.

Анализ адекватности модели, помимо оценивания ее параметров, включал проверку статистических гипотез о постулатах модели или вытекаю-

щих из них следствий, в т.ч. проверку согласия с теоретически ожидаемым соотношением полов 1 : 1 как для отдельных выборок – $\chi^2_{1:1}$, так и для суммарных численностей – χ^2_T ; обобщенную проверку согласия с соотношением 1 : 1 – χ^2_S ; проверку согласия с наблюдаемым соотношением суммарных численностей полов – $\chi^2_{\{A : B\}}$, где A – число самцов и B – число самок; проверку однородности выборочных распределений – χ^2_H . Для статистической характеристики вероятности рождения самцов использовали точечные и интервальные оценки параметра $P(A)$.

Дополнительно была проведена оценка действия тех факторов, которые чаще всего рассматриваются как влияющие на вторичное соотношение полов – это возраст родителей (без учета возраста самцов) и величина помета. Алгоритм проведения семейного анализа по вторичному соотношению полов состоял из двух последовательных статистических тестов. Предварительно в ходе индивидуального исследования всего потомства одного из родителей с использованием статистической таблицы, предложенной Н.Н. Хромовым-Борисовым для малых выборок [31], выявлялись выдающиеся отцы и матери, дававшие в помете достоверное отклонение от ожидаемого расщепления полов 1 : 1, как в сторону преобладания самцов, так и самок. После чего проводился анализ родословных. При этом из статистического исследования исключали потомство тех родителей, которые имели менее трех спариваний, а также пометы с мертворожденными или неопределенными по полу щенками, т.е. соблюдался принцип случайности, поскольку особи (независимо от изучаемого признака) имели равную вероятность попадания в анализируемую выборку. Все расчеты, включая оценку значимости критерия, получены с помощью программы STATISTICA [32–34].

РЕЗУЛЬТАТЫ

По результатам анализа щенений американской норки в Пушкинском зверохозяйстве частота рождения самцов как по отдельным годам, так и суммарно за весь рассматриваемый пятилетний период 1984–1988 гг., не отклонялась от теоретически ожидаемого соотношения 1 : 1. Общая доля потомков мужского пола составила 49.2% ($\chi^2_T = 2.62$, $p = 0.1052$), с колебанием частот появления самцов в популяции от 0.481 (48.1%) в 1984 г. до 0.516 (51.6%) в 1988 г. (рис. 1, табл. 1). При этом отмечали статистически высоко значимую неоднородность расщепления по полу в анализируемой популяции ($\chi^2_H = 19.78403$, $P = 0.0006$).

Последующий популяционный анализ был направлен на изучение возможной связи возраста

самки и размера помета с изменчивостью вторичного соотношения полов. Было установлено, что у молодых однолетних матерей преимущественно рождались самки (частота рождения самцов – 0.478), а у взрослых матерей (возраст – 2 и 3 года) – самцы (соответственно 0.534 и 0.538) при высоко достоверном отклонении от 1 : 1 для суммарных выборок $\chi^2_{S(v=4)} = 28.145877$ ($p = 1.2 \times 10^{-5}$) и случайно для суммарных численностей $\chi^2_{T(v=1)} = 2.624602$ ($p = 0.0596$) (табл. 2).

При анализе совокупной выборки, сгруппированной по величине помета, в небольших по размеру выводках – 3, 4 и 5 щенков, наблюдалось достоверное преобладание в потомстве самцов с соответствующей частотой рождения 0.598, 0.557 и 0.563. Напротив, в крупных по размеру пометах (9 и 11 щенков) доля самцов в потомстве достоверно снижалась (соответственно, 46.9 и 42.3%) при этом значения статистических критериев, как и в случае возраста матерей, оказались высоко значимы для $\chi^2_{S(v=9)} = 71.77253$ ($p = 1 \times 10^{-8}$) и недостоверны для $\chi^2_{T(v=1)} = 3.1583$ ($p = 0.0755$) (табл. 3).

Проверка однородности выборочных распределений в обоих исследованиях свидетельствует о статистически высоко значимой гетерогенности расщепления по полу – по данным рассматриваемых сводных выборочных данных $\chi^2_{H(v=9)} = 13.19885$ ($p = 4.2 \times 10^{-3}$) (табл. 2) и $\chi^2_{H(v=8)} = 42.16961$ ($p = 7.8 \times 10^{-7}$) (табл. 3).

Большой научный и практический интерес представляет изучение роли генетических факторов в регуляции вторичного соотношения полов. Из научных публикаций известно, что на изменчивость соотношения полов в приплоде сельско-

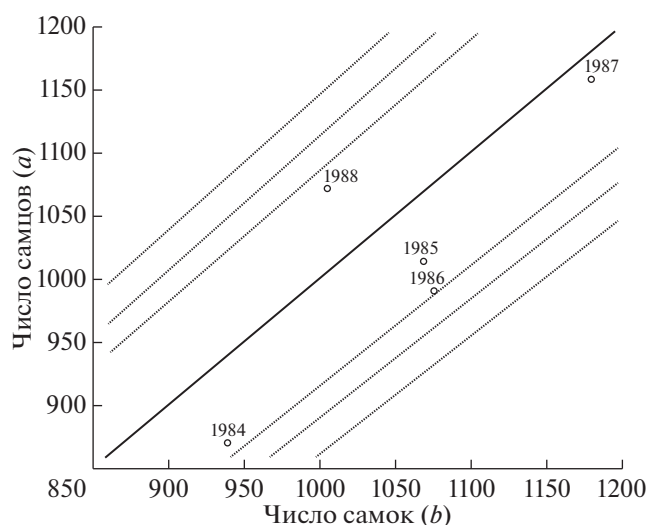


Рис. 1. Изменчивость вторичного соотношения полов у норки (1984–1988 гг.). Точки с координатами (a_i ; b_i) – наблюдаемое вторичное соотношение полов по годам. Сплошная линия соответствует геометрическому месту точек для ожидаемого соотношения полов 1 : 1. Символом о – обозначены расщепления по полу в потомстве с недостоверным отклонением от теоретически ожидаемого соотношения полов 1 : 1.

хозяйственных животных может оказывать влияние происхождение матери и отца. В рассматриваемой популяции американской норки оценку отдельных животных (родительские формы) проводили по их способности давать в потомстве преимущественно щенков мужского или женского пола.

Были исследованы семьи по каждому из 361 самцов и каждой из 999 самок. Всего по итогам тестирования было выявлено шесть отцов с до-

Таблица 1. Сводные результаты статистического анализа данных о вторичном соотношении полов у норки (Пушкинское зверохозяйство)

| Год | Номер выборки | Наблюдаемые численности | | | Частоты рождения самцов, p_i | Вычисленные значения частных статистик | | | |
|----------------------------|---------------|--|--------------|--------------|--------------------------------|---|-------------|---|-------------|
| | | самцов, a_i | самок, b_i | всего, n_i | | $\chi^2_{i\{1:1\}}$ | $P_{[1:1]}$ | $\chi^2_{i\{A:B\}}$ | $P_{[A:B]}$ |
| 1984 | 1 | 870 | 939 | 1808 | 0.481 | 2.6318 | 0.1047 | 8.1282 | 0.0870 |
| 1985 | 2 | 1014 | 1069 | 2083 | 0.487 | 1.4522 | 0.2281 | 2.7657 | 0.5978 |
| 1986 | 3 | 990 | 1076 | 2067 | 0.479 | 3.5781 | 0.0585 | 1.6207 | 0.8051 |
| 1987 | 4 | 1158 | 1180 | 2337 | 0.496 | 0.2071 | 0.6490 | 1.4974 | 0.8271 |
| 1988 | 5 | 1072 | 1005 | 2077 | 0.516 | 2.1613 | 0.1415 | 5.7721 | 0.2168 |
| Всего | $r = 5$ | A = 5104 | B = 5269 | N = 10372 | $S_p = 2.459$ | | | | |
| Значения сводных статистик | | $\chi^2_T = 2.6246$ $v = 1$ $p = 0.1052$ | | | | $\chi^2_S = 10.0306$ $v = 5$ $p = 0.0744$ | | $\chi^2_H = 19.7840^{***}$ $v = 4$ $p = 5.5 \times 10^{-4}$ | |

Примечание. *** $p < 0.001$.

Таблица 2. Сводные результаты статистического анализа данных о вторичном соотношении полов у норки в зависимости от возраста матерей (Пушкинское зверохозяйство)

| Возраст матерей (лет) | Номер выборки | Наблюдаемые численности | | | Частоты рождения самцов, p_i | Вычисленные значения частных статистик | | | |
|----------------------------|---------------|--|--------------|--------------|--------------------------------|--|-------------|--|-------------|
| | | самцов, a_i | самок, b_i | всего, n_i | | $\chi^2_{1:1}$ | $P_{[1:1]}$ | $\chi^2_{A:B}$ | $P_{[A:B]}$ |
| 1 | 1 | 1964 | 2146 | 4110 | 0.478 | 8.059367** | 0.004527 | 6.55375* | 0.010466 |
| 2 | 2 | 1934 | 1765 | 3699 | 0.523 | 7.721276** | 0.005437 | 1.16970 | 0.279463 |
| 3 | 3 | 1279 | 1114 | 2393 | 0.534 | 11.376930*** | 0.000744 | 1.00471 | 0.316174 |
| 4 | 4 | 92 | 79 | 171 | 0.538 | 0.988304 | 0.320157 | 4.47069* | 0.034481 |
| Всего | $r = 4$ | A = 5269 | B = 5104 | $N = 10373$ | $S_p = 2.073$ | | | | |
| Значения сводных статистик | | $\chi^2_T = 2.624602$ $v = 1$ $p = 0.0596$ | | | | $\chi^2_S = 28.145877***$ $v = 4$ $p = 1.2 \times 10^{-5}$ | | $\chi^2_H = 13.19885**$ $v = 3$ $p = 4.2 \times 10^{-3}$ | |

Примечание. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Таблица 3. Сводные результаты статистического анализа данных о вторичном соотношении полов у норки в зависимости от величины помета (Пушкинское зверохозяйство)

| Размер помета (щенков) | Номер выборки | Наблюдаемые численности | | | Частоты рождения самцов, p_i | Вычисленные значения частных статистик | | | |
|----------------------------|---------------|--|--------------|--------------|--------------------------------|---|-------------|---|-------------|
| | | самцов, a_i | самок, b_i | всего, n_i | | $\chi^2_{1:1}$ | $P_{[1:1]}$ | $\chi^2_{A:B}$ | $P_{[A:B]}$ |
| 3 | 1 | 102 | 78 | 180 | 0.567 | 3.2 | 0.073638 | 7.49** | 0.006204 |
| 4 | 2 | 256 | 172 | 428 | 0.598 | 16.49*** | 0.000049 | 4.58* | 0.032347 |
| 5 | 3 | 415 | 330 | 745 | 0.557 | 9.70** | 0.001843 | 2.11 | 0.146339 |
| 6 | 4 | 828 | 643 | 1471 | 0.563 | 23.27*** | 0.000001 | 5.30* | 0.021325 |
| 7 | 5 | 1289 | 1237 | 2526 | 0.510 | 1.07 | 0.300945 | 6.01* | 0.014225 |
| 8 | 6 | 1094 | 1195 | 2289 | 0.478 | 4.46* | 0.034697 | 2.25 | 0.133614 |
| 9 | 7 | 730 | 827 | 1557 | 0.469 | 6.04* | 0.013985 | 2.52 | 0.112411 |
| 10 | 8 | 313 | 317 | 630 | 0.497 | 0.03 | 0.862490 | 9.71** | 0.001833 |
| 11 | 9 | 135 | 184 | 319 | 0.423 | 7.53** | 0.006068 | 2.19 | 0.138990 |
| Всего | $r = 9$ | A = 5162 | B = 4983 | $N = 10145$ | $S_p = 4.662$ | | | | |
| Значения сводных статистик | | $\chi^2_T = 3.158305$ $v = 1$ $p = 0.0755$ | | | | $\chi^2_S = 71.77253***$ $v = 9$ $p = 1 \times 10^{-8}$ | | $\chi^2_H = 42.16961***$ $v = 8$ $p = 7.8 \times 10^{-7}$ | |

Примечание. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

стоверным отклонением от соотношения полов 1 : 1 в сторону увеличения самок и один отец с достоверным превышением доли самцов в потомстве. Среди самок основного стада в рассматриваемой популяции только у двух из них значимо преобладали сыновья при рождении.

Таким образом, в изучаемой популяции американской норки только у 1.9% отцов и примерно 0.2% матерей наблюдались достоверные отклонения от ожидаемого соотношения 1 : 1 ($p < 0.05$) в потомстве, причем в ходе анализа родословных не удалось установить наследственную передачу рассматриваемого признака.

С учетом всего вышесказанного дополнительный интерес представляет сравнение результатов анализа вторичного соотношения полов у норки с ранее полученными нами данными на песце, лисице и соболе. Сводные результаты проведенного сравнительного анализа изменчивости вторичного соотношения полов по годам представлены в табл. 4, где можно видеть, что наибольшим отклонением от соотношения полов 1 : 1 в сторону преобладания самцов характеризуется песец (55.1%), далее по мере убывания — лисица (53.6%), соболь (52.7%) и норка (49.2%), у которой суммарно самцов рождается меньше, чем самок. При этом наиболее узкими доверительными интервалами ха-

Таблица 4. Изменчивость вторичного соотношения полов в популяциях пушных зверей с оценкой статистических критериев по уровню значимости (Пушкинское зверохозяйство)

| Годы | Вид животного, порода и породный тип | <i>n</i> | Частота рождения самца $P(A) \pm m_{P(A)}$ | Двусторонний доверительный интервал для $P(A)$ с уровнем надежности 95% | Отклонения n_i , % | | Уровень значимости | | |
|-----------|--------------------------------------|----------|--|---|----------------------|---------------------|--------------------|------------|------------|
| | | | | | $\chi^2_{i\{1:1\}}$ | $\chi^2_{i\{A:B\}}$ | χ^2_S | χ^2_T | χ^2_H |
| 1984–1988 | Вуалевый песец | 15396 | 0.551 ± 0.0040 | $0.543 \leq P(A) \leq 0.559$ | 100 | Нет | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p > 0.05$ |
| 1980–1989 | Серебристо-черная лисица | 17285 | 0.536 ± 0.0095 | $0.515 \leq P(A) \leq 0.558$ | 70 | 20 | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ |
| 1982–1987 | Черный соболь | 5714 | 0.527 ± 0.0066 | $0.513 \leq P(A) \leq 0.541$ | 33.3 | Нет | $p < 0.05$ | $p < 0.05$ | $p > 0.05$ |
| 1984–1988 | Стандартная темно-коричневая норка | 10372 | 0.492 ± 0.0067 | $0.473 \leq P(A) \leq 0.511$ | Нет | Нет | $p > 0.05$ | $p > 0.05$ | $p < 0.05$ |

Примечание. $P(A)$ – вероятность рождения самца; $m_{P(A)}$ – ошибка; $\chi^2_{i\{1:1\}}$ – проверка согласия с соотношением 1 : 1 для отдельных выборок; $\chi^2_{i\{A:B\}}$ – проверка согласия с соотношением суммарных численностей полов, где A – число самцов и B – число самок; χ^2_S – обобщенная проверка согласия с соотношением 1 : 1; χ^2_T – проверка согласия с соотношением 1 : 1 для суммарных численностей; χ^2_H – проверка однородности выборочных распределений.

рактируются средние частоты рождения самцов у песца и соболя, а наиболее широкими у норки и лисицы.

Можно также видеть, что в популяции песца во все рассматриваемые годы самцов появлялось больше, чем самок со статистически высоко значимым отклонением от ожидаемого соотношения 1 : 1 (100%), у лисицы по семи из десяти лет (70%), у соболя только по двум годам из шести (33.3%), а у норки вообще ни по одному (табл. 4).

У песца, соболя и норки все выборки по годам полностью согласовались с суммарным соотношением $A : B$ (отсутствие отклонений), в то время как у лисицы значимо отклонялись 20% выборок, хотя для статистически однородного материала на уровне значимости 0.05 допустимо только 5% отклонений. При этом, в отличие от норки, оценочные значения статистики χ^2_S у песца, лисицы и соболя усиливают вывод о неслучайности преобладания самцов среди новорожденных. Причем в популяциях этих трех видов пушных зверей значение статистики χ^2_S почти равно сумме значений статистик χ^2_T и χ^2_H . Следовательно, в совокупное отклонение от соотношения 1 : 1 у них вносят

вклад два компонента изменчивости: отклонение от 1 : 1 для суммарных численностей полов $A : B$ и отклонение выборочных распределений от однородности.

Таким образом, согласно результатам, представленным в табл. 4, вероятность рождения самцов у песца и соболя превышает 1/2 и постоянна. Подобное постоянство и однородность отклонений у этих двух видов очевидно обусловлены присутствием в популяции “выдающихся” родительских форм, передающих этот признак по наследству. У лисицы также не исключается влияние генетического фактора на отклонение в соотношении полов при рождении, но, скорее всего, присутствие таких “выдающихся” животных в популяции лисицы количественно ограничено, что и отражается в непостоянстве подобных отклонений, в то время как у норки определяющим в смещении соотношения полов является влияние паратипических факторов (возраста и размера помета).

ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам проведенного анализа частота рождения самцов в потомстве норки составила 0.492 ± 0.0067 с 95%-ным доверительным интер-

валом, $0.473 \leq P(A) \leq 0.511$, что согласуются с данными В.Н. Большакова и Б.С. Кубанцева [16], полученными на Светлоярской звероферме (Волгоградская обл.), где самцы составляли суммарно 48.2% приплода стандартной норки. В то же время, согласно И.Г. Зенову [26], в Пушкинском зверохозяйстве в 1964–1967 гг. в ходе анализа потомства разных пород норок (10754 щенков) доля самцов в среднем составила 50.8%.

При рассмотрении других представителей семейства Mustelidae можно видеть, что у соболя, по наблюдениям К.Д. Нумерова в зверосовхозе “Соболевский” (Красноярский край), при рождении 1116 щенков самцов было в среднем 53.6% [23], а в Салтыковском зверохозяйстве (Московская обл.) в период с 1959 по 1964 гг. самцы в приплоде составляли 52.7% [24].

Что касается вторичного соотношения полов у диких кунных, то у горноста (*Mustela erminea* L.) и колонка (*Mustela sibirica* Pall.), как и у соболя, почти всегда наблюдалось превышение числа самцов над самками в потомстве [16]. В этом отношении американская норка представляет собой исключение, что отчасти можно считать дополнительным аргументом в пользу ее выделения в самостоятельный род *Neovison* Baryshnikov et Abramov, 1997 [35, 36], куда был отнесен также вымерший вид – морская норка (*Mustela macrodon* †, Prentiss, 1903), или в новой номенклатуре – *Neovison macrodon* † [37].

Следует отметить, что для представителей семейства Canidae (кроме одомашненных лисицы и песца) у диких животных наиболее полно вторичное соотношение полов изучено у обыкновенной лисицы (*Vulpes vulpes*), волка (*Canis lupus*) и енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*) [16]. Так, при исследовании изолированной дикой популяции лисицы в районе г. Магдебурга (бывшая ГДР) среди новорожденных животных в 33 выводках (153 щенка) доля самцов составила 56.4% [38]. Сходные результаты были получены при анализе полового состава лисиц в районе г. Берна (Швейцария) [39].

У волка (*Canis lupus*) так же как у песца и лисицы число самцов во вторичном соотношении полов превышало число самок. Например в Северо-Западном Причерноморье среди 474 щенков волка из 93 помётов самцов было 54.6% [40]. Близкое к вышеприведенному значению вторичное соотношение полов наблюдали у волков в Красноярском крае, Новосибирской обл., в Беловежской пуше и Туве [16]. При содержании волков в неволе отмечено преимущественное рождение самцов (52.7%) в 316 выводках, но имеются сведения, что в дикой природе при низкой плотности населения волка вторичное соотношение полов примерно одинаковое, либо преобладают самки [41]. Так, в Витебской обл. (Белоруссия) у волков доля

самок среди щенков достигала 70% в популяции с низкой плотностью и снижалась до 40–50% в популяции с высокой плотностью [42]. По данным В.Г. Гептнера с соавт. [43] у дикой енотовидной собаки (*Nyctereutes procyonoides*) число самцов в помётах превосходит число самок. Непосредственно при разведении в зверохозяйствах число особей мужского пола среди новорожденных щенков енотовидной собаки в среднем было на 4% больше, чем самок [16].

То есть, за исключением американской норки, у остальных хищных пушных зверей, разводимых в зверохозяйствах (песцов, лисиц, соболей, енотовидных собак), достаточно устойчиво прослеживается преобладание самцов в потомстве при рождении, что может быть обусловлено генетическими факторами.

В связи с этим показательное исследование Л.Н. Трут [44], проведенное на лисице. По ее данным соотношение полов у потомства доместизируемой популяции серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes* L.) составляло 0.52 ($p < 0.05$). Однако при спаривании носителей гена *S* (белая отметина на лбу или “звездочка”) или стандартных родителей, в потомстве которых *de novo* возникает “звездочка”, этот сдвиг был выше. Особенно высокое численное превосходство самцов наблюдалось среди *SS*-гомозигот (от 0.62 ± 0.08 до 0.86 ± 0.13) и несколько менее выражено оно было у *Ss*-потомков (от 0.50 ± 0.02 до 0.65 ± 0.05).

Было выдвинуто предположение, что изменения гена, регулирующего развитие (результатом действия которого является пегость), коррелируют с генетическими изменениями поведения в процессе доместикации и способствуют отбору либо *Y*-несущих спермиев, либо зигот мужского пола [44, 45].

В свою очередь, семейный анализ, проведенный на популяции песца, показал, что 8% самцов (23 из 287) и 1% самок (10 из 906) имели в своем потомстве достоверное отклонение от теоретического соотношения полов 1 : 1 с преимущественным рождением потомков мужского пола [20]. У лисицы соответствующие показатели составили примерно 2.6% семей по самцам и 1.3% семей по самкам относительно совокупной родительской популяции, или всего 15 “выдающихся” отцов и 13 “выдающихся” самок с достоверным отклонением от соотношения полов 1 : 1 в сторону увеличения доли сыновей ($p < 0.05$) и три самки с достоверным преобладанием дочерей ($p < 0.05$) [22].

Последующий генеалогический анализ показал, что во всех случаях, когда в родословной присутствовало два или более “выдающихся” самца, дававших достоверное отклонение полов в потомстве от 1 : 1, они оказывались родственниками по мужской линии. Правда, признак этот проявлялся не у всего мужского потомства “выдающегося” сам-

ца, поэтому можно говорить о неполной пенетрантности соответствующего генетического фактора [20, 22].

Несмотря на то, что у соболя около 3.6% семей по самцам и примерно 2.4% семей по самкам значимо отклонялись от ожидаемого соотношения 1 : 1 в сторону преобладания самцов наследование этого признака установить не удалось [25]. Тем не менее, с учетом того, что случаи резорбции эмбрионов у соболей очень редки, то дифференцированная по полу эмбриональная смертность, даже если она и имела место, не может быть причиной подобного сдвига полов [16] и, скорее всего, устойчивая величина вторичного соотношения полов у соболя связана с рядом его генетических и адаптивных особенностей. Однако у американской норки не установлено влияние генотипических факторов на изменчивость вторичного соотношения полов.

Среди множества негенетических факторов возраст в известной степени является показателем определенного физиологического состояния организма, которое может оказывать влияние на выражение у потомства различных свойств и признаков родителей, в том числе — на соотношения по полу. В первую очередь на изменение вторичного соотношения полов в потомстве разных видов млекопитающих влияет возраст матери. Так, согласно сведениям [15, 17, 18] у голубых песцов клеточного разведения доля самцов при рождении уменьшалась по мере старения матерей. Напротив, по данным С.Б. Жегалова [21] самки серебристо-черных лисиц в четырехлетнем возрасте давали в потомстве в среднем 49.0% самцов со значительным повышением этого показателя у старых матерей (8–9 лет), который составлял 60.1%.

В этом контексте представляют интерес данные по соотношению полов в потомстве собак. Например, у немецкой овчарки преобладание в помете щенков мужского пола было характерно для старых самок при спаривании с молодыми самцами и молодых самок со старыми, а также для молодых самок, дающих большие пометы и старых — малоплодовитых. В противоположных случаях в пометах отмечали увеличение доли самок [46]. У гиеновидных собак (*Lycan pictus*) возраст не влиял на долю самцов в помете, но в потомстве первородящих самок соотношение полов было сильно смещено в пользу сыновей (63%), а при повторных рождениях преобладали дочери (64%) [47].

Что касается американской норки, то по нашим наблюдениям доля самцов в потомстве стандартной темно-коричневой норки увеличивалась по мере старения матерей. Однако по данным других научных источников мы не можем подтвердить эту закономерность, поскольку измен-

чивость вторичного соотношения полов в зависимости от возраста самок у норок ранее никем не исследовалась. Косвенно влияние возраста самок норок на вторичное соотношение полов прослеживается в исследовании польских авторов, установивших, что более продолжительная беременность, сравнительно поздние сроки спаривания и больший интервал между первым и вторым коитусом с достоверностью позволяют прогнозировать отклонение соотношения полов у новорожденных в сторону преобладания самок [28].

Кроме возрастных отличий на вторичное соотношение полов заметное влияние оказывает также величина помета. По данным Э.В. Ивантера [14], большие пометы существенно отклоняют средний показатель вторичного соотношения полов в пользу самцов, С.Б. Жегалов у лисиц также наблюдал увеличение удельного веса мужского пола в больших пометах [21].

По сведениям Н.В. Граковой и Н.Н. Гракова [27] известно, что среди пометов у норки с одним щенком отклонение в сторону преобладания самцов было больше, чем в многоплодных пометах. При этом полученные в настоящей работе результаты полностью подтвердили указанную закономерность.

Таким образом, в отличие от других основных видов пушных зверей клеточного разведения, у американской норки вторичный половой состав характеризуется существенной неоднородностью и ограничен изменчивостью в пределах 50% с переменным преобладанием самок или самцов в потомстве в зависимости от таких паратипических факторов как возраст матери и размер помета. С учетом полученных результатов и того, что контролировать размер помета сложнее, чем возраст, в практике звероводства для преимущественного получения у американской норки потомства мужского пола в структуре самок основного стада достаточно увеличить долю взрослых двухлетних матерей.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fisher R.A. The Genetical Theory of Natural Selection. Oxford: Oxford Univer. Press, 1930. 196 p.
2. Macke E., Magalhães S., Bach F., Olivieri I. Experimental evolution of reduced sex ratio adjustment under local mate competition // Science. 2011. V. 334. P. 1127–1129. <https://doi.org/10.1126/science.1212177>
3. Ryu D., Ryu J., Lee C. Genome-wide association study reveals sex-specific selection signals against autosomal nucleotide variants // J. Hum. Genet. 2016. V. 61.

- P. 423–426.
<https://doi.org/10.1038/jhg.2015.169>
4. Kirby D.R., McWhitter K.G., Teitelbaum M.S., Darlington C.D. A possible immunological influence of sex ratio // *Lancet*. 1967. V. 15. № 2(7507). P. 139–140.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(67\)92971-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(67)92971-6)
 5. Бекетов С.В. Вторичное соотношение полов у млекопитающих // *Усп. совр. биологии*. 2001. Т. 121. № 4. С. 357–377.
 6. Clutton-Brock T.H., Iason G.R. Sex ratio variation in mammals // *Q. Rev. Biol.* 1986. V. 61. № 3. P. 339–374.
 7. James W.H. Are there preconceptional determinants of mammalian sex? A response to boklage // *Hum. Reprod.* 2005. V. 21. № 10. P. 2486–2490.
<https://doi.org/10.1093/humrep/del226>
 8. Chason R.J., McLain A.C., Sundaram R. et al. Preconception stress and the secondary sex ratio: A prospective cohort study // *Fertil. Steril.* 2012. V. 98. № 4. P. 937–941.
<https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.037>
 9. Stubblefield J.W., Orzack S.H. Resource transfers and evolution: Helpful offspring and sex allocation // *Theor. Popul. Biol.* 2013. V. 83. P. 64–81.
<https://doi.org/10.1016/j.tpb.2012.09.004>
 10. Orzack S.H., Stubblefield J.W., Akmaev V.R. et al. The human sex ratio from conception to birth // *PNAS*. 2015. V. 112. № 16. P. E2102–2111.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1416546112>
 11. Gellatly C., Petrie M. Prenatal sex selection and female infant mortality are more common in India after first born and second born daughters // *J. Epidemiol. Comm. Health.* 2017. V. 71. P. 269–274.
<https://doi.org/10.1136/jech-2016-207489>
 12. Page A.E., Myers S., Dyble M., Migliano A. Why so many agta boys? Explaining. “Extreme” sex ratios in Philippine foragers // *Evol. Hum. Sci.* 2019. № 1. P. e1.
<https://doi.org/10.1017/ehs.2019.4>
 13. Gellatly C. The global male-bias in sex ratio at Birth is sustained by the sex ratio genotypes of replacement offspring // *Genetica*. 2019. V. 147. P. 249–258.
<https://doi.org/10.1007/s10709-019-00074-2>
 14. Ивантер Э.В. К вопросу о соотношении полов в потомстве голубых песцов // *Вопр. экологии. Вопр. экол. наземных позвоночных*. Киев: Высшая школа, 1962. Т. 6. С. 64–65.
 15. Maciejowski J. Genetycz no-populacyjne badania nad rozrodem Lisow Polarnich // *Ann. Univ. M. Curie-Sklodowska. Sektio E*. 1972. V. 27. № 23. P. 359–381.
 16. Большаков В.Н., Кубанцев Б.С. Половая структура популяций и ее динамика. М.: Наука, 1984. 232 с.
 17. Łabecka S. Wpływ wieku samic na długość okresu Ciąży, Liczebność Miotu i Stosunek Plsi u lisow polarnich Niebieskich (*Alopex lagopus* L.) // *Zootechnika*. 1985. V. 21. № 114. P. 43–56.
 18. Kuzniewicz J. Kształtowanie się liczebności szczeniat w Miotach i Proporcji Płci potomstwa lisow polarnych Niebieskich w zależności od wieku samic // *Zootechnika*. 1986. V. 29. P. 169–176.
 19. Бекетов С.В., Каштанов С.Н. Изменчивость вторичного соотношения полов у песца (*Alopex lagopus* L.) // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 10. С. 1417–1421.
 20. Бекетов С.В., Каштанов С.Н. Влияние наследственных свойств самцов песца (*Alopex lagopus* L.) на воспроизводительные способности потомства // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 3. С. 422–426.
 21. Жегалов С.Б. Закономерности наследования пола у животных // *Успехи современной биологии*. 1950. Т. 30. Вып. 1. № 4. С. 30–35.
 22. Каштанов С.Н., Бекетов С.В., Лазебный О.Е. Анализ вторичного соотношения полов у лисицы (*Vulpes vulpes* L.) // *Генетика*. 2007. Т. 43. № 2. С. 240–244.
 23. Нумеров К.Д. О половом, возрастном составе и размножении соболя в енисейской Сибири // *Зоол. журн*. 1966. Т. 45. Вып. 3. С. 421–429.
 24. Монахов Г.И. Изменчивость и стабильность соотношения полов в популяциях соболя // *Бюл. МОИП. Отд. биол.* 1975. Т. 80. № 4. С. 61–67.
 25. Бекетов С.В., Каштанов С.Н. Статистический анализ изменчивости вторичного соотношения полов у соболя (*Martes zibellina* L.) // *Генетика*. 2002. Т. 38. № 2. С. 15–16.
 26. Зенов И.Г. Взаиморегуляция между соотношением полов в потомстве и плодовитостью у животных // *Генетика*. 1969. Т. 5. № 2. С. 92–96.
 27. Гракова Н.В., Граков Н.Н. Особенности полового состава в пометах американской норки в эмбриональный период и при рождении // *Тез. докл. 3-ей Всесоюз. науч. конф. “Биология и патология пушных зверей”*. Петрозаводск. 1981. С. 128–130.
 28. Felska-Błaszczak L., Ławrów N., Lasota B. et al. The sex ratio in farmed american mink (*Neovision vison*) // *Arch. Anim. Breed.* 2018. V. 61. P. 359–363.
<https://doi.org/10.5194/aab-61-359-2018>
 29. Паркалов И.В. Инновационные подходы к повышению эффективности клеточного звероводства в современных условиях: Дис. ... д-ра с.-х. наук. М.: ИФ им. К.И. Скрябина, 2021. 300 с.
 30. Хромов-Борисов Н.Н. Биометрические аспекты популяционной генетики // *Генетика популяций*. М.: Высшая школа, 1996. С. 251–303.
 31. Захаров И.А., Горячева И.И. Половые соотношения в популяциях *Adalia bipunctata* и популяционно-генетическое значение явления бессамцовости // *Генетика*. 1998. Т. 34. № 12. С. 1630–1638.
 32. Joaquim P. Marques de sa applied statistics using Spss, Statistica, Matlab and R. Berlin: Springer, 2007. 505 p.
 33. Afifi A., May S., Clark V.A. Computer-Aided Multivariate Analysis. N.Y.: Chapman and Hall/CRC, 2003. 512 p.
 34. Murtaugh P.A. In defense of P values // *Ecology*. 2014. V. 95. № 3. P. 611–617.
 35. Абрамов А.В. Систематика рода *Mustela* (Carnivora, Mustelidae) мировой фауны: Дис. ... канд. биол. наук, Санкт-Петербург: ЗИН РАН, 1999. 200 с.
 36. Абрамов А.В., Хляп Л.А. Отряд Carnivora // *Млекопитающие России: систематико-географический справочник*. М.: Т-во науч. изданий КМК, 2012. Т. 52. С. 313–382.
 37. Wozencraft W.C. Order Carnivora. Mammal Species of the World / Eds Wilson D.E., Reeder D.M. Baltimore: J. Hopkins Univ. Press, 2005. P. 532–628.

38. *Stubbe M.* Zur Populationsbiologie des Rotfuchses *Vulpes vulpes* (L.) // *Hercinia*. 1967. В. 4. № 1. С. 1–10.
39. *Wandeler A.* Einige Daten über den Berischen Fuchsbestand // *Rev. Suisse Zool.* 1968. V. 75. № 4. P. 1071–1075.
40. *Гурский И.Г.* Волк в Северо-Западном Причерноморье (участок обитания, структура популяции, размножение) // *Бюлл. МОИП. Отд. биол.* 1978. Т. 83. Вып. 3. С. 29–38.
41. *Mech L.D.* Disproportionate sex ratios of wolf pups // *J. Wildlife Manag.* 1975. V. 39. № 4. P. 737–740.
42. *Sidorovich V.E., Stolyarov V.P., Vorobei N.N. et al.* Litter size, sex ratio, and age structure of gray wolves, *Canis lupus*, in relation to population fluctuations in northern Belarus // *Canadian J. Zool.* 2007. V. 85. P. 295–300. <https://doi.org/10.1139/Z07-001>
43. *Гентнер В.Г., Наумов Н.П., Юргенсон П.Б. и др.* Млекопитающие Советского Союза. М.: Высшая школа, 1967. Т. 2. 1004 с.
44. *Трум Л.Н.* Некоторые аспекты генетики пегостей серебристо-черных лисиц (*Vulpes vulpes* L.) и взаимоотношения вектора отбора и направления изменчивости // Сб. науч. тр. ин-та цитол. и генетики “Проблемы генетики и теории эволюции”. Новосибирск: Наука, 1991. С. 67–84.
45. *Trut L.N.* Sex ratio in silver foxes: Effects of domestication and the star gene // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. P. 109–115. <https://doi.org/10.1007/BF00222959>
46. *Lopes Martins A.C., Vaz M.A., Macedo M.M. et al.* Maternal age, paternal age, and litter size interact to affect the offspring sex ratio of german shepherd dogs // *Theriogenology*. 2019. V. 135. P. 169–173. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.022>
47. *Creel S., Creel N.M., Monfort S.L.* Birth order, estrogen and sex-ratio adaptation in african wild dogs (*Lycyaon pictus*) // *Anim. Reprod. Sci.* 1998. V. 53. № 1–4. P. 315–20. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(98\)00121-3](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(98)00121-3)

A Variation of Secondary Sex Ratio in American Mink (*Neovison vison*)

S. V. Beketov^{a, b, *}

^a*Vavilov Institute of General Genetics of Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^b*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA by K.I. Seryabin, Moscow, 109472 Russia*

**e-mail: svbeketov@gmail.com*

A statistical analysis of the secondary (at birth) sex ratio in the farming population of the american mink (*Neovison vison* Schr.) of the standard dark brown breed was carried out. The study was done on the materials of the Pushkin breeding farm of the Moscow region according to the pedigree books. A total of 1550 puppies of 999 mink females were analyzed. The total sample size for 5 years was 10372 puppies. Based on the results of the analysis in the expected population, the birth rate of males is estimated to be $0.492 + 0.0067$ with a 95% confidence interval of $0.473 \leq P(A) \leq 0.511$. Unlike other main species of farming fur-bearing animals of: arctic foxes, foxes and sables, in the american mink, the secondary sex ratio is characterized by inconstancy and heterogeneity with a variable predominance of females or males in the offspring, depending on paratypic factors (mother's age and litter size). At the same time, as mothers age, the deviation of the sex ratio shifts towards the predominance of males in the offspring and, with an increase in the size of the litter, towards an increase in the number of females.

Keywords: fur-bearing animals, american mink, secondary sex ratio, variation, maternal age, litter size.

УДК 575.22:599.735.3

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ И ПОПУЛЯЦИОННОЙ СТРУКТУРЫ НЕНЕЦКОЙ АБОРИГЕННОЙ ПОРОДЫ СЕВЕРНЫХ ОЛЕНЕЙ НА ОСНОВЕ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ

© 2022 г. М. Т. Семина¹, *, С. Н. Каштанов¹, О. В. Бабаян², К. А. Лайшев³,
А. А. Южаков³, В. Н. Воронкова¹, Э. А. Николаева¹, Г. Р. Свищёва^{1,4}

¹Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

²ООО “ГОРДИЗ”, Москва, 121205 Россия

³Санкт-Петербургский федеральный исследовательский центр Российской академии наук,
Санкт-Петербург, 196608 Россия

⁴Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: magdalena.semina@gmail.com

Поступила в редакцию 01.03.2022 г.

После доработки 15.03.2022 г.

Принята к публикации 22.03.2022 г.

Северное оленеводство – основа культурно-хозяйственного комплекса коренных малочисленных народов и этнических групп севера России. Исследование пород и внутривидовых типов домашних северных оленей и их генетической структуры в значительной степени помогает решить проблему поддержки традиционного уклада жизни этой части населения нашей страны. Для изучения генетической дифференциации и филогении популяций ненецкой породы северного оленя (*Rangifer tarandus* L.) была использована тест-система, основанная на мультиплексном ПЦР-анализе 16 высокополиморфных STR-маркеров: Rt6, BMS1788, Rt30, Rt1, Rt9, FCB193, Rt7, BMS745, C143, Rt24, OheQ, C217, C32, NVHRT16, T40 и C276. С помощью разработанной тест-системы на базе Лаборатории сравнительной генетики животных Института общей генетики были исследованы 228 животных из четырех выборок одной породы из разных хозяйств РФ. Для 16 микросателлитных локусов идентифицировано 132 аллеля, от двух аллелей (локус C217) до 16 аллелей (локус OheQ). Среднее число аллелей на локус по всем выборкам составило 8.25. Для комбинаций “выборка–локус” значимых отклонений от равновесия Харди–Вайнберга (p -значение $< 7.8 \times 10^{-4}$ с поправкой Бонферрони) не наблюдалось. Для четырех популяций ненецкой породы северных оленей 85 аллелей по микросателлитным локусам являются общими. Всего обнаружено 16 уникальных аллелей: ХМАО–Югра, Белоярский р-н, дер. Нунто (Nen.HMAO) – 7; ЯНАО, Салехард и Приуральский район (Nen.YamSHOS) – 4; ЯНАО, верховье р. Ханмей (Nen.YaNAO) – 3; НАО, западная часть Большеземельной тундры (Nen.NAO) – 2. Анализ микросателлитной изменчивости позволил выявить уровни мультилокусной гетерозиготности и аллельного разнообразия, а также степени инбридинга. По показателю аллельного разнообразия (A_r) выделяются олени из Ямальской опытной станции со значением 6.25, в то же время у животных из СПК ЕРВ значение составило 5.85. В целом, несмотря на наличие инбредных животных в выборках, можно говорить о низком уровне инбредной депрессии в изучаемых популяциях северных оленей ненецкой породы.

Ключевые слова: *Rangifer tarandus* L., ненецкая порода северного оленя, генетическое разнообразие, пространственно-генетическая структура популяций, филогения, STR-маркеры, микросателлиты, биоразнообразие.

DOI: 10.31857/S0016675822080069

Россия обладает самым большим стадом домашних северных оленей, которое составляет 2/3 мирового одомашнированного поголовья этого вида. Северное оленеводство – уникальная отрасль отечественного животноводства, основа существования и традиционного уклада жизни коренных малочисленных народов Севера, Сибири

и Дальнего Востока [1, 2]. Ненецкая аборигенная порода северных оленей – самая большая в мире по численности, ареалу и используемой пастбищной территории.

Вследствие многочисленных экономических и идеологических реформ в сельском хозяйстве, интенсивного промышленного освоения терри-

тории Крайнего Севера многие коренные народы Севера резко сократили поголовье оленьих стад [3]. Согласно статистическим и историческим данным только ненцы смогли сохранить оленеводство в полном объеме. Ненцы ведут свое происхождение от самодийских племен, оленеводство которым было знакомо еще до нашей эры [4].

Процессы пороодообразования в северном оленеводстве имеют много общего с происхождением пород других видов животных. В основе их породной спецификации лежит народная, традиционно сложившаяся система селекции и отсутствие коммерческой основы, свойственной выведению заводских пород. В то же время в становлении пород северного оленя имеются свои особенности [5].

Генетические исследования северного оленя (молекулярно-генетические маркеры митохондриальной и ядерной ДНК) затрагивают фундаментальные вопросы эволюции и филогенеза, процессов доместикиации [6–17].

Историю оленеводства можно условно разделить на три периода [18].

1. Период мелкостадного охотничье-оленеводческого хозяйства с преобладанием охоты на дикого оленя: конец первого тысячелетия н.э.—до начала XVIII в.

С конца первого тысячелетия нашей эры до начала XVIII в. предки ненцев со стадами оленей мигрировали в тундровую зону Западной Сибири и Европейского Севера, где завершилось их формирование как этнической единицы — в таежной зоне между реками Обь и Таз. Об использовании оленей ненцами до начала XVIII в. известно немного. Большинство источников, содержащих какие-либо сведения о ненцах и их хозяйстве, относятся к летописям и путевым заметкам людей далеких от науки. Сверяя эти заметки с данными археологических открытий и фольклорных источников, современные исследователи высказали предположение, что оленеводство у самодийцев длительное время было не основным видом хозяйственной деятельности [19–21]. Освоение самодийцами упряжного использования оленей произошло в период заселения тундры, хотя выючно-верховое у лесных ненцев, как полагают, сохранялось вплоть до конца XIX в. [22]. Более мелкие размеры тундровых оленей способствовали переходу на упряжной тип ездового оленеводства.

2. Период крупностадного оленеводческо-промыслового хозяйства с зимней добычей песца и летним промыслом рыбы: начало XVII—середина XX в.

Одной из причин роста стад домашних оленей стало сокращение добычи диких оленей. Важной стадией явилось и развитие торговых связей, повышение спроса на продукты оленеводства, которые поставлялись на рынки Нижнего Новгорода, Москвы и даже за границу.

Большинство исследователей оленеводства Северной Европы отмечают особую роль народов коми, а точнее коми-ижемской субэтнической группы, в рыночной реализации продуктов этой отрасли. Данный период можно охарактеризовать как вытеснение и замену промыслово-оленеводческого хозяйственного комплекса оленеводческим с включением охотничьего и рыболовного. При этом оленеводство помогало сохранять значительную степень автономности кочующего хозяйства от иноэтнических факторов. В целом конкуренция российской экономики и ненецкой оленеводческой системы в тундре начала XX в. выглядела уравновешенно [23].

3. Новейший период вытеснения этно-оленеводства коммерческим и государственно-коммерческим оленеводством или их совмещения: середина XX—начало XXI в.

Современное развитие оленеводства ненцев следует рассматривать в контексте социально-политических процессов, происходивших на Крайнем Севере в XX в. Их основой служила концепция “некапиталистического пути развития ранее отсталых народов”. Принудительная коллективизация и “социалистическая реконструкция” положили начало цепи разрушительных для традиционного уклада жизни реформ. Оленеводство кочевников тундры и тайги было охарактеризовано как “экстенсивное”, “отсталое”, “малопродуктивное”, “неустойчивое”. Финансово-экономическая система поддерживала исключительно государственную форму собственности на оленей в виде совхозов и производную от нее колхозно-кооперативную. Коллективизация стала началом разделения государственного и частного оленеводства и началом сосуществования этих форм оленеводства на Крайнем Севере. В 1985 г. ненецкая порода в числе других пород северных оленей была занесена в Государственный реестр пород сельскохозяйственных животных СССР. Только ненецкая порода оленей выпасается сразу в двух частях света — в Европе и в Азии.

Сегодня по данным Министерства сельского хозяйства большая часть поголовья домашних оленей сосредоточена в Ямало-Ненецком, Ненецком и Чукотском автономных округах, Якутии и Красноярском крае [24]. В сумме на эти регионы приходится около 83.3% поголовья. В 2020 г. численность животных составила около 1.6 млн [24].

От животных ненецкой породы получают оленину — высокоценное диетическое мясо, являющееся источником незаменимых аминокислот, витаминов и других биологически активных веществ для жителей Арктики. Традиционное транспортное использование северных оленей ненцами является самым древним и технологически самым совершенным среди других форм оленеводства [18]. Одежда и обувь, изготовленные из оленьих

Таблица 1. Исследованные популяционные выборки ненецкой породы северного оленя (*Rangifer tarandus*)

| Выборка | Число образцов | Координаты/расположение | Природные условия | Форма хозяйствования |
|--------------|----------------|---|---|--|
| Nen. YaNAO | 51 | 67.62, 65.70/ЯНАО, предгорья и долины рек Полярного Урала | Субарктическая горная тундра. Летние кочевки по р. Кара до побережья Байдарацкой губы | Частное хозяйство, кочевой образ жизни |
| Nen. NAO | 47 | 67.83, 53.59/НАО, западная часть Большеземельной тундры | Субарктическая тундра, снежный покров от 230 до 260 дней в году | Кооперативная, сочетание семейно-родовых и производственных методов, кочевой образ жизни |
| Nen. HMAO | 30 | 63.51, 71.35/ХМАО–Югра, Белоярский р-н, дер. Нумто | Северо-таежная зона, географически изолированный регион | Частное хозяйство, полукочевой образ жизни |
| Nen. YamSHOS | 100 | 66.52, 66.66/ЯНАО, Салехард и Приуральский район | Лесотундра, пойма рек Обь и Большой Ханмей | Опытное стадо северных оленей для проведения научной работы, кочевой образ жизни |

шкур, остаются непревзойденными по теплоизоляционным качествам для коренного и старожильческого населения Крайнего Севера [25]. Ежегодно в депрессивные оленеводческие регионы из Ямало-Ненецкого АО перегоняются и перевозятся авиатранспортом до тысячи оленей ненецкой породы, что позволяет местному коренному населению снижать уровень безработицы и сохранять аутентичное оленеводство.

У дикой формы вида *Rangifer tarandus* L. географическая изменчивость генофонда носит адаптивный характер. Географическая изменчивость также способна отражать исторические аспекты приспособления, поскольку может быть наследственно детерминирована при условии, что субпопуляция находится в изоляции. Так, например, две островные субпопуляции тундровой формы *R. t. platyrhynchus* и *R. t. pearsoni* получили подвидовой статус. Однако дифференциация между тундровой и таежной материковыми формами не обеспечила этим формам подвидовой статус [26].

При этом генетические маркеры в полной мере отражают популяционную структуру вида, и географические дистанции пропорционально коррелируют с географическими.

Домашняя форма вида *R. tarandus* является результатом domestikации и целенаправленного искусственного отбора животных на фоне постоянного корректирующего влияния отбора естественного, который элиминировал генотипы, неспособные адаптироваться к жестким условиям круглогодичного пастбищного содержания.

В начале 90-х гг. прошлого века на основе углубленного изучения фенотипических и биохимических

данных было установлено наличие в ненецкой породе пяти экогеографических типов: печорский, ямальский, уральский, казымский и гыдано-таймырский [27].

Цель настоящего исследования – с помощью новой панели микросателлитных маркеров провести сравнительное исследование генетического разнообразия четырех популяций ненецкой породы северного оленя (*Rangifer tarandus tarandus*), изучить генетическую структуру, определить эффективную численность популяций, коэффициент инбридинга, степень генетической дифференциации между популяциями и оценить уровень интрогрессии генов диких сородичей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Описание выборок и сбор биологического материала

Сбор биологического материала проводился с 2016 по 2021 г. Выборки Nen.YaNAO и Nen.YamSHOS собраны на территории запада Ямало-Ненецкого автономного округа. Ненецкий автономный округ представлен выборкой Nen.NAO, биологический материал собран в северной части НАО. Ханты-Мансийский автономный округ представлен выборкой Nen.YamSHOS. (табл. 1, рис. 1).

Ямальская СХОС (Nen.YamSHOS) была организована в 1957 г. как опытная станция НИИ сельского хозяйства Крайнего Севера ВАСХНИЛ для исследований по северному оленеводству, охотпромыслу и полярному земледелию. Находится в Ямало-Ненецком автономном округе, в городе Салехард. Опытная станция занимается

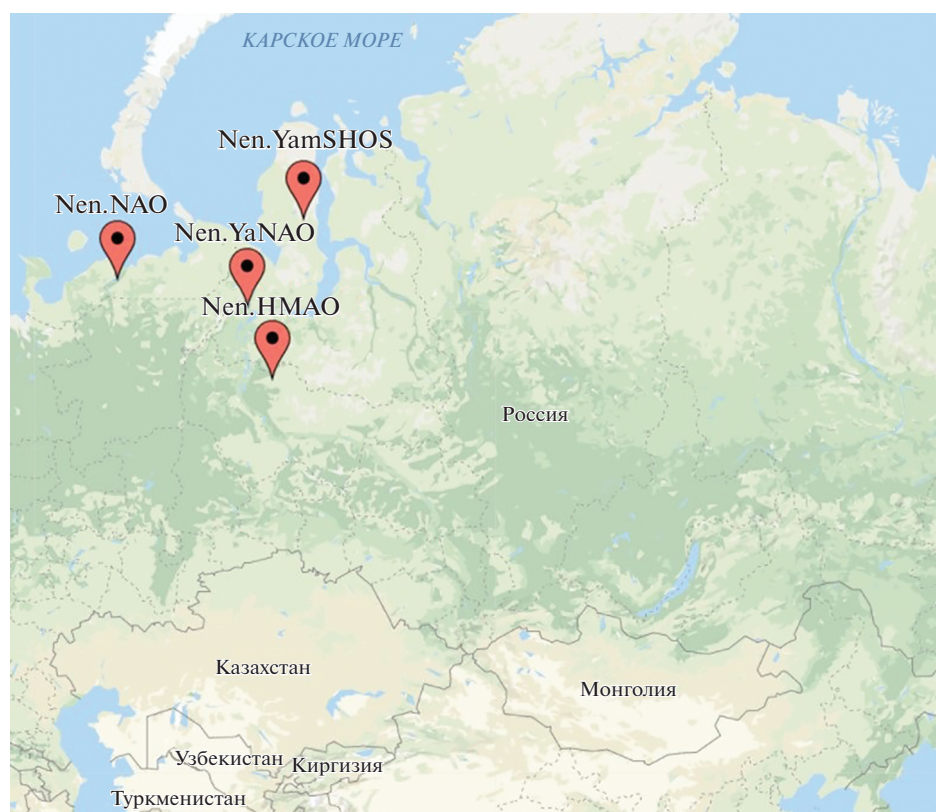


Рис. 1. Локализация выборок оленя.

поисками методов борьбы с болезнями северных оленей, изучением и сохранением генофонда ненецкой породы, исследованием пастбищ северных оленей и внедрением эффективных экономических моделей производства. На станции были изучены морфо-биологические и экстерьерные особенности ненецкой породы оленей. Ямальская СХОС имеет собственное опытное стадо северных оленей – несколькими поколениями ученых здесь собраны многолетние данные о происхождении и фенотипе животных, что особенно важно для генетической работы.

Выборка Nen.HMAO находится в Ханта-Мансийском автономном округе, оленеводством занимается «Союз оленеводов ХМАО–Югра», благодаря которому удалось снизить падение численности оленей в регионе: с 2014 г. поголовье выросло с 7208 до 8170 животных. Ханты и манси на территории округа занимаются оленеводством с XIII–XV вв., их олени отнесены к северотаежному (казымскому) экологическому типу ненецкой породы.

Nen.NAO – олени принадлежат кооперативному семейно-родовому хозяйству «ЕРВ», что переводится с ненецкого как «хозяин». Популяция была сформирована в 1991 г. из 730 животных, выданных 83 оленеводам, которые подали заявления об изъятии своих паев из колхоза «Харп» и после объединились в союз оленеводов. Форма

хозяйствования в этой популяции интересна: она сочетает в себе традиционные семейно-родовые методы хозяйствования с новыми формами организации. Выпас осуществляют шесть оленеводческих бригад, сформировавшихся по принципу традиционного соседства семей и родовых связей. Образ жизни оленеводов кочевой. При этом хозяин по желанию может выйти из кооператива и забрать своих животных. Из числа собственников избираются бригадиры, которые организуют постоянное передвижение стад оленей по семейным угодьям. К 2021 г. поголовье оленей составило 12.2 тыс. животных. Хозяйство находится на территории площадью 846 тыс. га, в числе которой пастбища площадью 721 тыс. га, находящиеся в Большеземельной тундре, к востоку от р. Печора. В хозяйстве разработан перспективный план по племенной работе, который предусматривает проведение генетической экспертизы для оценки племенной ценности животных. В 2008 г. «ЕРВ» первым в Ненецком автономном округе получил статус племенного репродуктора по разведению северных оленей ненецкой породы. Олени отнесены к печорскому экологическому типу ненецкой породы.

Nen.YaNAO – выборка из частного оленеводческого хозяйства Полярного Урала, расположенного в верховье рек Большой Ханмей и Кара. В стаде на-

считывается около тысячи голов оленей, относящихся к уральскому экологическому типу ненецкой породы.

Выделение ДНК и фрагментный анализ

Выделение ДНК из пантов, мышц, кожи и ушных выщипов проводили с помощью набора DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя.

Для генотипирования образцов ДНК использовали набор COrDIS Reindeer для мультиплексного анализа 16 микросателлитных маркеров северного оленя (ООО “ГОРДИЗ”), с последующей детекцией флуоресцентно меченных фрагментов методом капиллярного электрофореза.

ПЦР проводили на амплификаторах Applied Biosystems в условиях, рекомендуемых производителем. Разделение продуктов ПЦР выполняли методом капиллярного электрофореза с использованием автоматического генетического анализатора ABI 3130 (Applied Biosystems). Для анализа полученных данных и определения аллельных вариантов образцов по каждому маркеру использовалась программа GeneMapper ID-X 1.4 (Applied Biosystems). Качество генотипирования контролировали используя стандартный образец, поставляемый в составе набора (табл. 2).

Статистический анализ

С помощью R-пакета adegenet были вычислены основные популяционно-генетические характеристики, включающие наблюдаемое количество аллелей, количество аллелей на локус и количество аллелей на выборку [28]. Распределение аллелей по локусам и выборкам было рассчитано с использованием R-пакета diveRsity [29]. Тестирование распределения генотипов на равновесие Харди–Вайнберга для каждой комбинации “локус–выборка” было выполнено с использованием R-пакета PopGenReport [30, 31]. Используя тот же пакет, были вычислены индексы генетической изменчивости, такие как аллельное разнообразие, частота аллелей и число уникальных аллелей. Используя формулу, предложенную Ботшейном и соавт. [32], оценивали значения информационного полиморфизма для каждой комбинации “локус–выборка” на основе количества и частоты аллелей в локусе с помощью R-пакета POLYSAT [33]. Для каждой выборки животных были рассчитаны наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность, коэффициент инбридинга и p -значение для теста равновесия Харди–Вайнберга с использованием R-пакета diveRsity. Парные значения F_{st} рассчитывали с использованием R-пакета adegenet. Анализ генетической структуры был выполнен с использованием байесовского кластерного подхода, реализованного в пакете STRUCTURE v2.3.4 при следующих параметрах: длина

периода отжига 100000, число МСМС-повторов после отжига 1000000, применение смешанной модели, использование информации о локализации выборки, аллельные частоты независимы, 50 итераций [34]. Оптимальное количество кластеров было определено с использованием метода, предложенного в [35], и программы StructureHarvestNen.NAO.0.6.94 [36]. Филогенетическое дерево, основанное на генетических расстояниях Нея [37], было построено с помощью R-пакета poppr [38]. Графическое представление распределения аллелей среди выборок с помощью кругов Эйлера–Венна выполнено с помощью R-пакета gplots 2.7.4 [39]. Вероятностная модель возможных направленных миграций между выборками на основе эффективного числа мигрантов на поколение N_m реализована с помощью веб-приложения divMigrate-online (с бутстреп-поддержкой 5000) [40].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для 16 локусов было обнаружено 132 аллеля: от двух аллелей (в локусе C217) до 16 аллелей (в локусе OheQ) на локус. Среднее число аллелей на локус по всем выборкам составило 8.25.

Популяционно-генетический анализ

Исследованы следующие показатели генетической изменчивости: число аллелей (A), аллельное разнообразие (A_r), наблюдаемая (H_o) и ожидаемая (H_e) гетерозиготность и p -значения для хи-квадрат теста на отклонение от равновесия Харди–Вайнберга (HWE) (табл. 3). Наиболее информативным оказался маркер OheQ, по которому наблюдается наибольшее число аллелей для всех четырех выборок – от 9 до 13 аллелей; аллельное богатство, нивелирующее различие в объеме выборок, также выше по этому маркеру. Также высокой полиморфностью отличаются маркеры BMS1788 и Rt6. Наименее полиморфен локус C217, по которому выявлено всего два аллеля.

Наибольший процент общих аллелей был обнаружен у выборки Nen.YamSHOS – 92.34%, она же характеризуется наибольшим индексом аллельного богатства (A_r) по всем локусам, который у животных Ямальской опытной станции составил 6.35, в то время как у остальных популяций индекс аллельного богатства варьировал в пределах от 5.85 до 6.17. Наименьшее количество аллелей (A) наблюдалось в выборке Югры (ХМАО) и Коопхоза ЕВР (Ненецкий АО) – по 103 аллеля, а наибольшее – у животных Ямальской опытной станции – 119 (табл. 3).

Далее с помощью кругов Эйлера визуализировали распределение аллелей микросателлитов в исследованных выборках (рис. 2).

Таблица 2. Характеристика STR-маркеров

| Название маркера | Референсный аллель | Структура повтора |
|------------------|--------------------|--|
| Rt6 | 19 | (CA) ₁₉ |
| BMS1788 | 17 | (AC) ₁₇ |
| Rt30 | 15 | (AC) ₁₅ |
| Rt1 | 19 | (AC) ₁₄ AT(AC) ₄ |
| Rt9 | 21 | (AC) ₂₁ |
| FCB193 | 13 | (AC) ₁₃ |
| Rt7 | 11 | (AC) ₁₃ |
| BMS745 | 13 | (AC) ₁₃ |
| C143 | 7 | (ATGG) ₇ |
| Rt24 | 21 | (AC) ₂₁ |
| OheQ | 20.3 | (TATC) ₁₇ ATC TATC TATT TATC |
| C217 | 9 | CATC(CATG) ₅ (CATC) ₃ |
| C32 | 14 | (ATCC) ₄ (ACCT) ₂ (ATCC) ₇ |
| NVHRT16 | 25 | (AC) ₅ AT (AC) ₄ ATGCGC (AC) ₁₂ |
| T40 | 13 | (ATCT) ₄ ACCT ATCT (ATCT) ₄ ACTG ACCT ATCT |
| C276 | 53 | (TCCA) ₅ TCCTTCCATACG (TCCA) ₃ TCCTTCCATCTG (TCCA) ₄ TCCG (TCCA) ₅ TCCTTCCATCCG (TCCA) ₃ (TCCG) ₂ TGCA (TCCA) ₂ TCCGTCCA |

Таблица 3. Популяционно-генетические параметры популяций

| Выборка | <i>N</i> | <i>A</i> | % | <i>A_r</i> | <i>H_o</i> | <i>H_e</i> | HWE |
|--------------|----------|----------|-------|----------------------|----------------------|----------------------|--------|
| Nen. YaNAO | 51 | 112 | 86.25 | 6.17 | 0.65 | 0.66 | 0.9527 |
| Nen. NAO | 47 | 103 | 79.66 | 5.85 | 0.62 | 0.63 | 0.1217 |
| Nen. HMAO | 30 | 103 | 79.87 | 5.89 | 0.67 | 0.66 | 1e-04 |
| Nen. YamSHOS | 100 | 119 | 92.34 | 6.35 | 0.64 | 0.65 | 0.5601 |

Примечание. *N* – среднее число животных, генотипированных по локусу; *A* – количество аллелей на выборку; % – средний процент от общего числа аллелей, наблюдаемых в локусе; *A_r* – аллельное богатство, усредненное по всем локусам; *H_o* и *H_e* – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно; HWE – *p*-значение для теста хи-квадрат, проверяющего равновесие Харди–Вайнберга.

На рис. 2 видно, что 85 аллелей в ненецкой породе северных оленей являются общими для всех выборок; наибольшее число уникальных аллелей выявлено в выборке ХМАО–Югра, Белоярский р-н, дер. Нунто (Nen. HMAO) – 7; в выборке ЯНАО (Nen. YamSHOS) – 4; ЯНАО, верховье р. Ханмей (Nen. YaNAO) – 3; НАО, западная часть Большеземельной тундры (Nen. NAO) – 2 (табл. 4).

Для комбинаций “выборка–локус” значимых отклонений от равновесия Харди–Вайнберга (*p*-значение $< 7.8 \times 10^{-4}$ с поправкой Бонферрони) не наблюдалось (табл. 5).

При сравнении дендрограмм и географии выборок видно, что наиболее генетически близки выборки Nen. NAO и Nen. YaNAO. Наиболее дифференцирована от остальных выборка Nen. YamSHOS.

Генетическая дифференциация

Анализ уровня генетической дифференциации выполняли по парным значениям F_{st} , являющимся мерой генетических расстояний между выборками; и соответствующие *p*-значения, объясняющие их статистическую значимость, были рассчитаны для оценки сходства популяций по каждому микросателлитному локусу (табл. 6). В данной работе не выявлены значимые дифференциации между Nen. YamSHOS и Nen. YaNAO, а также между Nen. YamSHOS и Nen. NAO (*p* > 0.01).

Филогенетический анализ по методу невзвешенных парно-групповых средних значений (UPGMA) определил наибольшую вероятность существования двух близких кластеров. Выборки YamSHOS и Nen. HMAO наиболее удалены друг

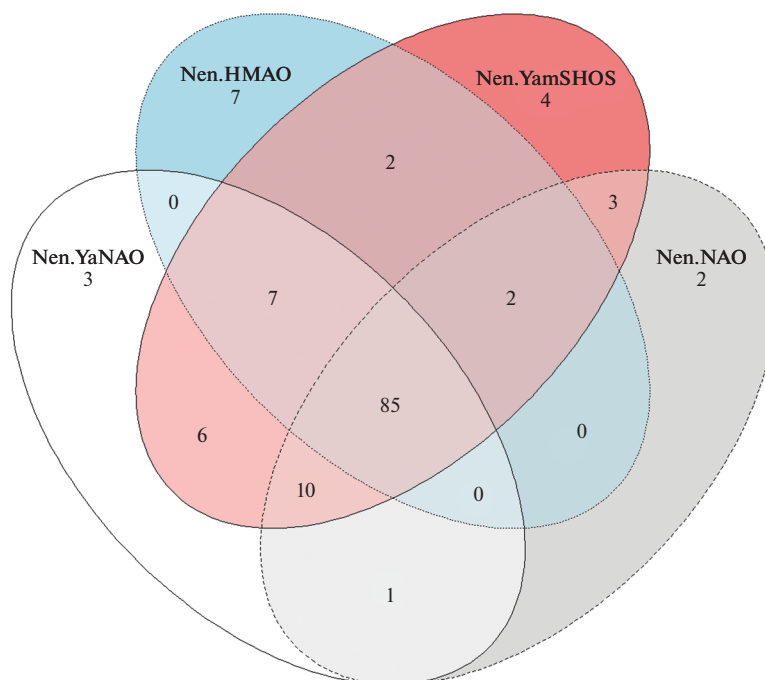


Рис. 2. Графическое представление распределения аллелей среди выборок с помощью эллипсов Эйлера–Венна выполнено с помощью R-пакета gplots 2.7.4 [39]. Числа на пересечении фигур соответствуют общему для выборок числу аллелей.

от друга. Это соответствует их географическому ареалу.

Анализируя данные, представленные на рис. 3 (проверка чистоты популяции), можно сделать вывод, что северные олени ненецкой породы из четырех выборок имеют достаточно схожую генетическую структуру. Каждый столбик на рис. 4 представляет одно животное. Практически в каждой группе есть животные с похожим генофондом, как и во всех четырех группах. Большой вклад в породу вносят выборка Nen.YaNAO, выделенная красным цветом на рисунке, которая присутствует практически в каждой выборке, и Nen.YamSHOS – фиолетовый цвет. Nen.NAO и Nen.HMAO дифференцируются от остальных – зеленый и голубой цвет, выделяется породная принадлежность к ненецкой породе северных оленей. Хорошо видно, что с одной стороны существуют различия между оленями из ХМАО (бирюзовый цвет) и Ненецкого АО (зеленый цвет), с другой – общая структура для оленей Ямало-Ненецкого округа (фиолетовые и красные цвета).

Инбридинг

Для каждой выборки было построено распределение коэффициентов инбридинга f , вычисленных для каждой особи в отдельности (рис. 4) с помощью метода максимума функции правдопо-

добия как вероятностей того, что животное наследует два одинаковых аллеля от одного родителя. Поскольку высокие значения инбридинга f указывают на снижение гетерозиготности отдельных геномов в выборках, можно предположить

Таблица 4. Выявленные приват-аллели в четырех исследуемых выборках

| Лocus | Выборка | Число аллелей |
|---------|-------------|---------------|
| BMS1788 | Nen.YaNAO | 148 |
| BMS1788 | Nen.YamSHOS | 150 |
| BMS1788 | Nen.HMAO | 153 |
| OheQ | Nen.HMAO | 295 |
| OheQ | Nen.HMAO | 298 |
| OheQ | Nen.YamSHOS | 299 |
| OheQ | Nen.YaNAO | 214 |
| FCB193 | Nen.HMAO | 130 |
| FCB193 | Nen.HMAO | 134 |
| FCB193 | Nen.NAO | 150 |
| Rt24 | Nen.YaNAO | 234 |
| Rt24 | Nen.NAO | 254 |
| C32 | Nen.YamSHOS | 310 |
| C32 | Nen.HMAO | 326 |
| BMS745 | Nen.YamSHOS | 142 |
| NVHRT16 | Nen.HMAO | 218 |

Таблица 5. *p*-Значения для хи-квадрат теста HWE для каждой комбинации “выборка—локус”

| Локус | Nen.YaNAO | Nen.NAO | Nen.HMAO | Nen.YamSHOS |
|---------|-----------|---------|----------|-------------|
| BMS1788 | 0.367 | 0.759 | 0.395 | 0.203 |
| Rt30 | 0.162 | 0.312 | 0.301 | 0.880 |
| Rt1 | 0.296 | 0.087 | 0.022 | 0.308 |
| Rt9 | 0.914 | 0.675 | 0.468 | 0.607 |
| C143 | 0.428 | 0.416 | 0.013 | 0.446 |
| Rt7 | 0.402 | 0.365 | 0.335 | 0.841 |
| OheQ | 0.781 | 0.482 | 0.000 | 0.902 |
| FCB193 | 0.150 | 0.164 | 0.064 | 0.316 |
| Rt6 | 0.134 | 0.146 | 0.449 | 0.195 |
| C217 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| Rt24 | 0.235 | 0.119 | 0.241 | 0.038 |
| C32 | 0.851 | 0.652 | 0.711 | 0.190 |
| BMS745 | 0.551 | 0.441 | 0.205 | 0.485 |
| NVHRT16 | 0.606 | 0.675 | 0.187 | 0.775 |
| T40 | 0.841 | 0.869 | 0.008 | 0.138 |
| C276 | 0.240 | 0.939 | 0.360 | 0.037 |

Таблица 6. Парные значения Nei' F_{st} между выборками северного оленя

| Выборки | Nen.YaNAO | Nen.NAO | Nen.HMAO | Nen.YamSHOS |
|-------------|-----------|---------|----------|-------------|
| Nen.YaNAO | — | 0.0010 | 0.0010 | 0.9041 |
| Nen.NAO | 0.0118 | — | 0.0010 | 0.0519 |
| Nen.HMAO | 0.0119 | 0.0217 | — | 0.0300 |
| Nen.YamSHOS | 0.0029 | 0.0080 | 0.0088 | — |

Примечание. Верхний треугольник показывает *p*-значения, а нижний — попарные значения F_{st} . Расчеты проводились с использованием функции pairwise.fst из R-пакета hierfstатc 1000 повторами для вычисления *p*-значений.

Таблица 7. Параметры распределения инбридинга (*f*) в выборках оленей ненецкой породы из разных хозяйств

| Выборка | Среднее значение инбридинга | Стандартное отклонение инбридинга |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| Nen.YaNAO | 0.1606836 | 0.008179241 |
| Nen.NAO | 0.1711926 | 0.008646584 |
| Nen.HMAO | 0.1502064 | 0.010807895 |
| Nen.YamSHOS | 0.1645331 | 0.006804070 |

наличие инбридинга во всех выборках. Общий коэффициент инбридинга *f* по отношению к каждой выборке популяции представлен в табл. 7.

В целом, несмотря на наличие инбредных животных в выборках, можно говорить о слабой инбредной депрессии в популяциях. На рис. 5 для каждой выборки отображена плотность распределения с зеркальным вертикальным отражением и определены медиана (белая точка внутри “скрипки”), диапазон данных без “выбросов” (тонкая черная линия внутри “скрипки”) и диа-

пазон данных между нижней и верхней квартилями (толстая черная линия внутри “скрипки”).

Сеть миграционных путей

Для оценки характера миграции и потока генов была создана сеть направленных миграционных путей с помощью критерия N_m (рис. 6). Эта сеть показывает направления потоков генов между выборками и вероятности этих событий, P_m . В модели наблюдается высокая миграция между

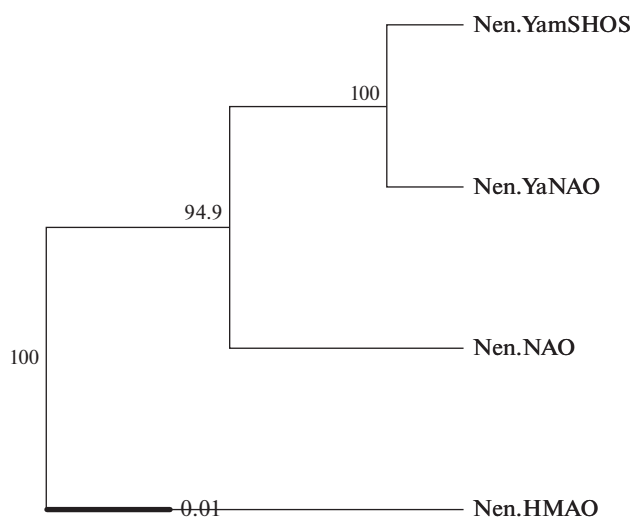


Рис. 3. Филогенетический анализ методом UPGMA с бутстреп-поддержкой 1000.

двумя выборками ненецкой породы ($P_m \geq 0.97$): первая выборка (1) – Nen.YaNAO и четвертая (4) – Nen.YamSHOS.

Миграционная сеть (рис. 6) показывает направления потоков генов между выборками северного оленя и вероятности этих событий. Здесь ярко выделяется обмен животными между выборками Nen.YaNAO и Nen.YamSHOS, что позволяет нам говорить об обмене генами между этими двумя выборками.

Был также исследован показатель информативного полиморфизма (PIC), который интерпретируется как мера объема информации, которая может быть извлечена из генетического маркера. Для каждой пары “локус–выборка” значения PIC были оценены на основе количества и частоты аллелей в локусе. Среднее значение PIC оказалось относительно низким – 0.613 ± 0.049 . Самые высокие уровни полиморфизма были получены для трех локусов: Rt9 (PIC = 0.906), OheQ (PIC = 0.913) и Rt1 (PIC = 0.920) (рис. 7). Надо отметить, что все изучаемые выборки оказались схожи по значениям PIC, вычисленным по каждому локусу.

ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью тест-системы, основанной на мультиплексном ПЦР-анализе 16 высокополиморфных STR-маркеров: Rt6, BMS1788, Rt30, Rt1, Rt9, FCB193, Rt7, BMS745, C143, Rt24, OheQ, C217, C32, NVHRT16, T40 и C276, нами был выполнен анализ генетической структуры популяционных выборок вида *Rangifer tarandus* L. Исследованы четыре популяции ненецкой породы (табл. 1). Для 16 микросателлитных локусов обнаружено 132 аллеля, от двух аллелей (в локусе C217) до 16 аллелей (в локусе OheQ) на локус. Среднее число аллелей на локус по всем выборкам составило 8.25. Наименьшее количество аллелей на выборку (4) наблюдалось в выборке северных оленей из Югры и Коопхоз ЕВР – по 103 аллеля, а наибольшее – у северных оленей из Ямальской опытной станции (119).

Ненецкая порода северного оленя, заселяющая западную часть евразийского ареала, заметно отличается по экстерьерным и конституционным признакам от других пород. Эта порода является самой мелкой; живая масса самцов перед гоним составляет 130–135 кг, а самок – 90–95 кг [41].

Важно отметить, что ареал животных ненецкой породы разнообразен по экологическим условиям. Он включает в себя арктические, типичные и южные тундры, Кольский полуостров, п-ов Ямал, лесотундру, горные пастбища полярного и приполярного Урала, а также таежные районы Приуралья и Западной Сибири. Анализ уровня генетической дифференциации ненецкой породы (табл. 6) не выявил значимых дифференциаций между Nen.YamSHOS и Nen.YaNAO, а также между Nen.YamSHOS и Nen.NAO ($p > 0.01$). Следовательно, несмотря на огромный ареал, ненецкая порода консолидирована и между географическими группами этой породы существуют устойчивые миграционные связи.

В табл. 7 представлен общий коэффициент инбридинга f по отношению к каждой выборке популяции. Высокие значения f указывают на снижение гетерозиготности отдельных геномов в выборках вследствие инбридинга, можно предположить наличие инбридинга во всех выборках. Это может

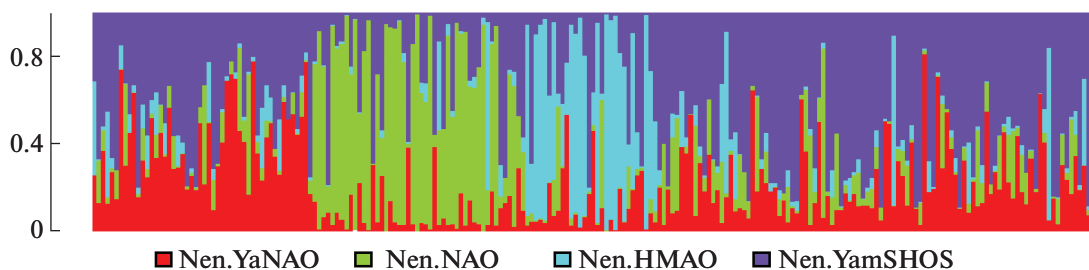


Рис. 4. Принадлежность каждого животного в выборке.

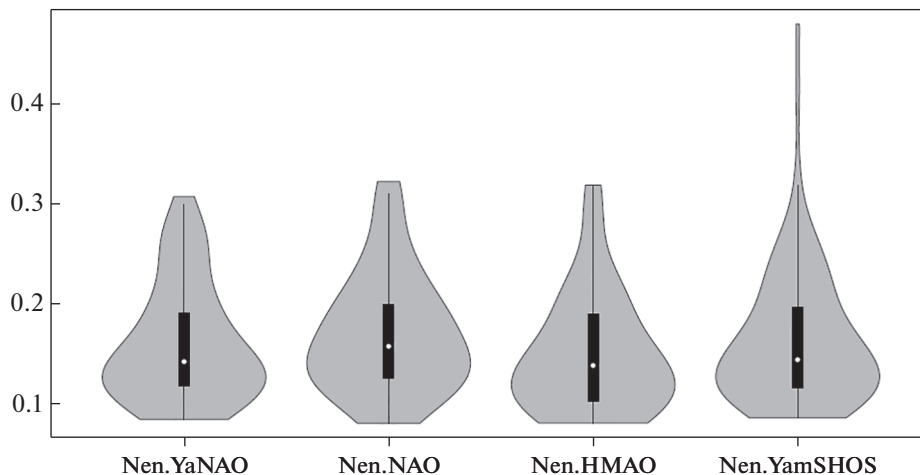


Рис. 5. Визуализация распределений индивидуальных коэффициентов инбридинга f для четырех популяционных выборок северного оленя с помощью диаграмм вида “скрипка”.

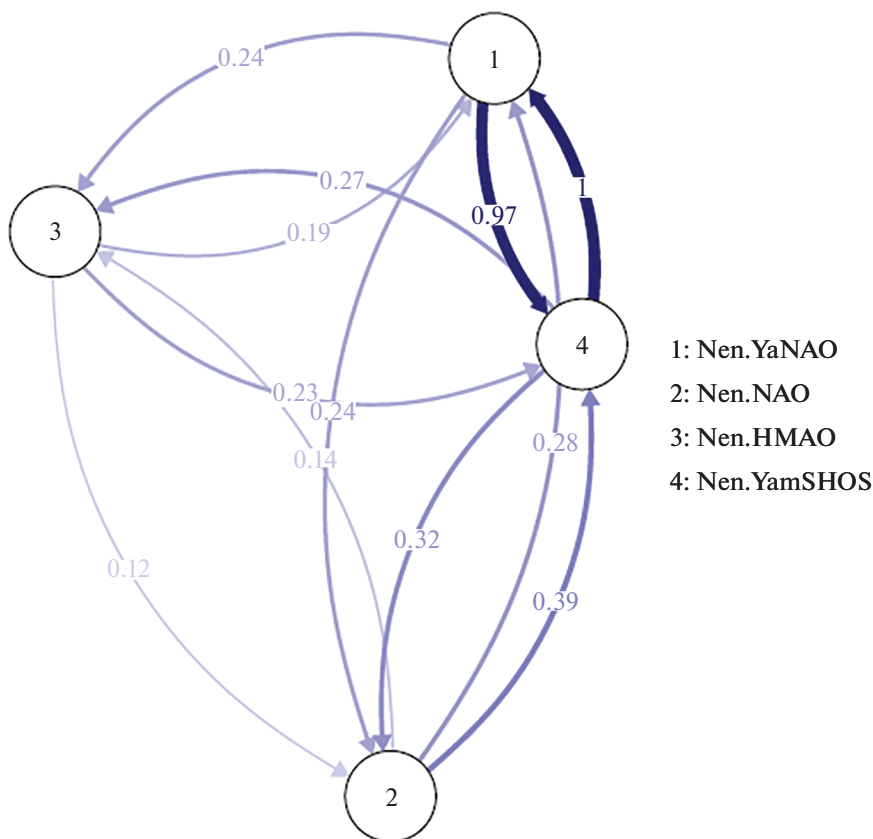


Рис. 6. Сеть направленных миграционных путей с бутстреп-реализацией 1000 (N_m).

быть объяснено как географической изолированностью, так и проводимой племенной работой.

Межпопуляционный обмен генов возникает при скрещивании особей, принадлежащих разным популяциям. В процессе обмена генами можно выделить популяцию, из которой происходят ми-

гранты, и популяцию (аборигены), в которой эти мигранты находят партнера для скрещивания. В миграционной сети (рис. 6) ярко выделяется обмен животными между выборками Nen.YaNAO (частное хозяйство из Ямало-ненецкого округа) и Nen.YamSHOS (опытное стадо Ямальской опыт-

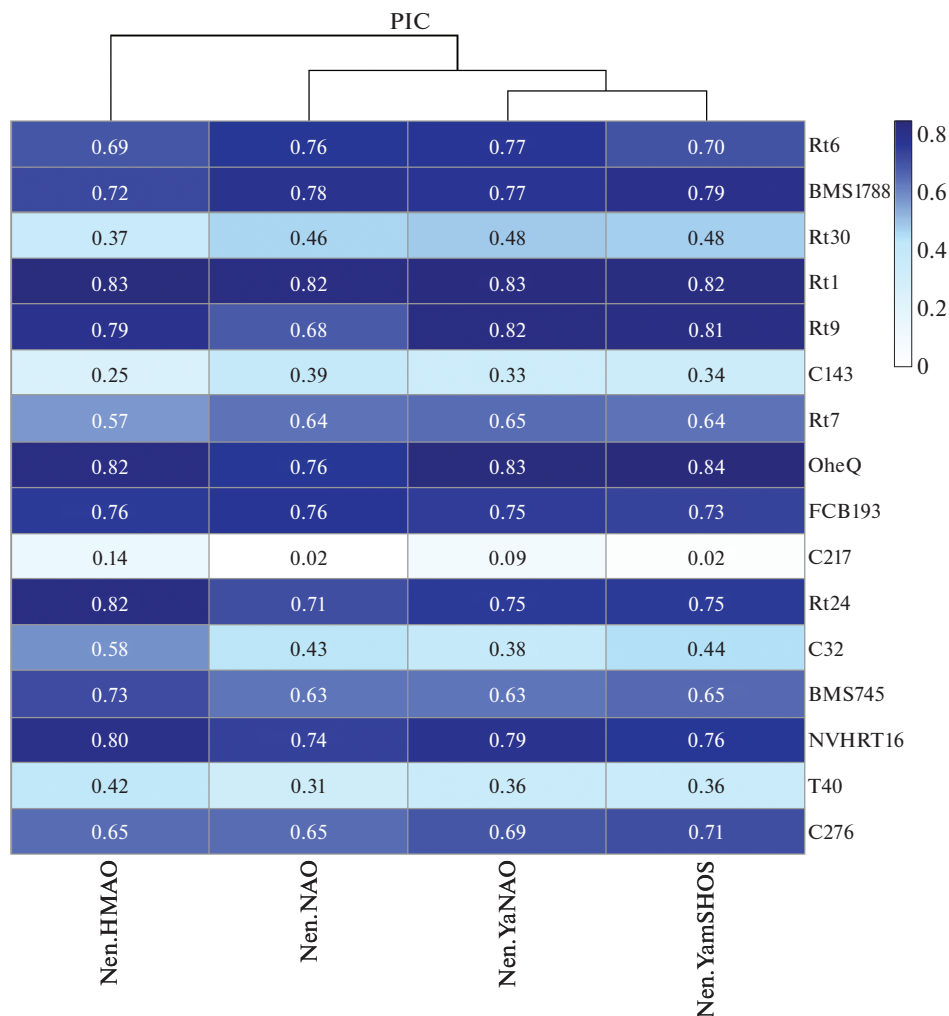


Рис. 7. Кластеризация четырех выборок северного оленя методом k -средних по уровню информационного полиморфизма, вычисленных для 16 микросателлитов.

ной станции), что позволяет нам говорить об обмене генами между этими двумя популяциями.

Показатели информационного полиморфизма (PIC) для каждой пары “локус–выборка” были оценены на основе количества и частоты аллелей в локусе. Среднее значение PIC оказалось относительно низким – 0.613 ± 0.049 . Самые высокие уровни полиморфизма были получены для трех локусов: Rt9 (PIC = 0.906), OheQ (PIC = 0.913) и Rt1 (PIC = 0.920) (рис. 7). Надо отметить, что все изучаемые выборки оказались схожи по значениям PIC, вычисленным по каждому локусу.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 22-16-00062.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Север и северяне. Современное положение коренных малочисленных народов Севера, Сибири и Дальнего Востока России / Под ред. Новиковой Н.И., Функа Д.А. М.: ИЭА РАН, 2012. 204 с.
2. Василевич Г.М., Левин М.Г. Типы оленеводства и их происхождение // Сов. этнография. 1951. № 1. С. 63–87.
3. Головнёв А.В., Гарин Н.П., Куканов Д.А. Оленеводы Ямала (материалы к Атласу кочевых технологий). Екатеринбург: УрО РАН, 2016. 152 с.
4. Вайнштейн С.И. Проблема происхождения оленеводства в Евразии. Саянский очаг одомашнивания оленя // Сов. этнография. 1970. № 6. С. 3–14.
5. Крупник И.И. Становление крупнотабунного оленеводства у тундровых ненцев // Сов. этнография. 1976. № 2. С. 57–69.
6. Столтовский Ю.А., Бабаян О.В., Каштанов С.Н. и др. Генетическая оценка пород северного оленя (*Rangifer tarandus*) и их дикого предка с помощью новой

- панели STR-маркеров // Генетика, 2020. Т. 56. № 12. С. 1409–1425.
<https://doi.org/10.31857/S0016675820120139>
7. Røed K.H., Flagstad O., Nieminen M. et al. Genetic analyses reveal independent domestication origins of Eurasian reindeer // Proc. Biol. Sci. 2008. V. 275. № 1645. P. 1849–1855.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0332>
 8. Cronin M.A., Macneil M.D., Patton J.C. Mitochondrial DNA and microsatellite DNA variation in domestic reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and relationships with wild caribou (*Rangifer tarandus granti*, *Rangifer tarandus groenlandicus*, and *Rangifer tarandus caribou*) // J. Hered. 2006. V. 97. № 5. P. 525–530.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esl012>
 9. Bjørnstad G., Flagstad Ø., Hufthammer A.K., Røed K.H. Ancient DNA reveals a major genetic change during the transition from hunting economy to reindeer husbandry in northern Scandinavia // J. Archaeol. Sci. 2012. V. 39. P. 102–108.
<https://doi.org/10.1016/j.jas.2011.09.006>
 10. Баранова А.И., Холодова М.В., Давыдов А.В., Рожков Ю.И. Полиморфизм контрольного региона мтДНК диких северных оленей европейской части России *Rangifer tarandus* (Mammalia: Artiodactyla) // Генетика. 2012. Т. 48. № 9. С. 1098–1104.
 11. Баранова А.И., Холодова М.В., Сипко Т.П. и др. Степень влияния домашнего северного оленя (*Rangifer tarandus*) на генетическое разнообразие дикого: анализ полиморфизма контрольного региона мтДНК // Материалы Межд. совещ. “Териофауна России и сопредельных территорий”. М., 2016. С. 33.
 12. Холодова М.В., Баранова А.И., Мизин И.А. и др. Свообразие генетической структуры новоземельского северного оленя (*Rangifer tarandus*): анализ полиморфизма маркеров ядерной и митохондриальной ДНК // Материалы Межд. совещ. “Териофауна России и сопредельных территорий”. М., 2016. С. 445.
 13. Королёв А.Н., Мамонтов В.Н., Холодова М.В. и др. Полиморфизм контрольного региона мтДНК северных оленей (*Rangifer tarandus*) материковой части Северо-Востока России // Зоол. журн. 2017. Т. 96. № 1. С. 106–118.
 14. Zhai J.-C., Liu W.-S., Yin Y.-J. et al. Analysis on genetic diversity of reindeer (*Rangifer tarandus*) in the Greater Khingan Mountains using microsatellite markers // Zool. Studies. 2017. V. 56. P. 11.
<https://doi.org/10.6620/ZS.2017.56-11>
 15. Anderson D.G., Kvie K.S., Davydov V.N., Røed K.H. Maintaining genetic integrity of coexisting wild and domestic populations: Genetic differentiation between wild and domestic *Rangifer* with long traditions of intentional interbreeding // Ecol. Evol. 2017. V. 7. № 17. P. 6790–6802.
<https://doi.org/10.1002/ece3.3230>
 16. Ju Y., Liu H., Rong M. et al. Genetic diversity and population genetic structure of the only population of Aoluguya Reindeer (*Rangifer tarandus*) in China // Mitochondrial DNA. Part A. 2019. V. 30. № 1. P. 24–29.
<https://doi.org/10.1080/24701394.2018.1448081>
 17. Røed K.H., Bjørklund I., Olsen B.J. From wild to domestic reindeer – Genetic evidence of a non-native origin of reindeer pastoralism in northern Fennoscandia // J. Archaeol. Sci.: Reports. 2018. V. 19. № 8. P. 279–286.
<https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.02.048>
 18. Южаков А.А., Мухачев А.Д. Этническое оленеводство Западной Сибири: ненецкий тип. Новосибирск, 2001. 112 с.
 19. Хлобыстин Л.П., Грачёва Г.Н. Исследования в центральной части Таймыра // Археологические открытия 1969 года. М., 1970. 456 с.
 20. Крупник И.И. Арктическая этноэкология. Северная Евразия. М.: Наука, 1989. 272 с.
 21. Головнев А.В. Говорящие культуры: традиции самодийцев и угров. Екатеринбург: УрО РАН, 1995. 607 с.
 22. Вербов Г.Д. Лесные ненцы // СЭ. 1935. № 2. С. 57–70.
 23. Головнев А.В. Кочевники тундры: ненцы и их фольклор. Екатеринбург: УрО РАН, 2004. 344 с.
 24. <https://rosstat.gov.ru/statistic>
 25. Друри И.В. Оленеводство. М.: Сельхозгиз, 1963. 244 с.
 26. Интеграция археологических и этнографических исследований: Сборник науч. трудов. Т. 1. Иркутск: Иркутский нац. исследов. техн. ун-т, 2013. 334 с.
 27. Южаков А.А., Мухачев А.А., Шубин П.Н. Хозяйственное использование и экотипы северных оленей ненецкой породы // Сиб. вестн. с.-х. науки. 1994. № 1–2. С. 53–58.
 28. Jombart T. ADEGENET: a R package for the multivariate analysis of genetic markers // Bioinformatics. 2008. V. 24. № 11. P. 1403–1405.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
 29. Keenan K., McGinnity P., Cross T.F. et al. diveRsity: An R package for the estimation and exploration of population genetics parameters and their associated errors // Methods Ecol. Evol. 2013. V. 4. P. 782–788.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12067>
 30. Adamack A.T., Gruber B. PopGenReport: simplifying basic population genetic analyses in R // Methods Ecol. Evol. 2014. V. 5. P. 384–387.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12158>
 31. Gruber B., Adamack A.T. Landgenreport: A new R function to simplify landscape genetic analysis using resistance surface layers // Mol. Ecol. Resour. 2015. V. 15. P. 1172–1178.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12381>
 32. Botstein D., White R.L., Skolnick M., Davis R.W. Construction of a genetic-linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // Am. J. Hum. Genet. 1980. V. 32. P. 314–331.
 33. Clark L.V., Jasieniuk M. POLYSAT: an R package for polyploid microsatellite analysis // Mol. Ecol. Resour. 2011. V. 11. P. 562–566.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x>
 34. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.

35. *Evanno G., Regnaut S., Goudet J.* Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study // *Mol. Ecol.* 2005. V. 14. P. 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
36. *Earl D.A., Vonholdt B.M.* STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // *Cons-Nen.NAO. Genet. Resour.* 2012. V. 4. P. 359–361. <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
37. *Nei M.* *Molecular Evolutionary Genetics.* N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
38. *Kamvar Z.N., Tabima J.F., Grunwald N.J.* Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction // *Peer J.* 2014. V. 2. (publ. online). <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
39. *Warnes G.R., Bolker B., Bonebakker L.* Gplots: various R programming tools for plotting data, 2014. <http://CRAN.R-project.org/package=gplots>
40. *Sundqvist L., Keenan K., Zackrisson M. et al.* Directional genetic differentiation and relative migration // *Ecol. Evol.* 2016. V. 6. P. 3461–3475. <https://doi.org/10.1002/ece3.2096>
41. *Мухачев А.Д.* Породы северных оленей и дальнейшая работа с ними // *Совершенствование технологии и повышение экономической эффективности северного оленеводства.* Новосибирск, 1989. С. 35–45.

Analysis of the Genetic Diversity and Population Structure of the Nenets Native Breed of Reindeer Based on Microsatellite Markers

M. T. Semina^{a,*}, S. N. Kashtanov^a, O. V. Babayan^b, K. A. Layshev^c, A. A. Yuzhakov^c,
V. N. Voronkova^a, E. A. Nikolaeva^a, and G. R. Svishcheva^{a,d}

^a*Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

^b*LTD “GORDIZ”, Moscow, 121205 Russia*

^c*St. Petersburg Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, 196608 Russia*

^d*Federal Research Center, Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: magdalena.semina@gmail.com*

Northern reindeer breeding is the basis of the cultural and economic complex of the indigenous peoples and ethnic groups of the north of Russia. The study of breeds and intrabreed types of domestic reindeer and their genetic structure to a large extent helps to solve the problem of supporting the traditional way of life of this part of the population of our country. To study the genetic differentiation and phylogeny of populations of the Nenets breed of reindeer (*Rangifer tarandus* L.), we used a test system based on multiplex PCR analysis of 16 highly polymorphic STR markers: Rt6, BMS1788, Rt30, Rt1, Rt9, FCB193, Rt7, BMS745, C143, Rt24, OheQ, C217, C32, NVHRT16, T40 and C276. Using the developed test system based on the Laboratory of Comparative Animal Genetics of the Institute of General Genetics, 228 animals from 4 samples of the same breed from different farms of the Russian Federation were examined. 132 alleles were identified for 16 microsatellite loci, ranging from 2 alleles (locus C217) to 16 alleles (locus OheQ). The average number of alleles per locus for all samples was 8.25. No significant deviations from the Hardy–Weinberg equilibrium (p -value $< 7.8 \times 10^{-4}$ with Bonferroni correction) were observed for the “sample–locus” combinations. For 4 populations of the Nenets breed of reindeer, 85 alleles for microsatellite loci are common. In total, 16 unique alleles were found: KhMAO–Yugra, Beloyarsk district, village. Nunto (Nen.HMAO) – 7, YaNAO, Salekhard and Priuralsky district (Nen.YamSHOS) – 4, YaNAO. The upper reaches of the Hanmei River (Nen.YaNAO) – 3, NAO, the Western part of the Bolshezemel'naya Tundra (Nen.NAO) – 2. The analysis of microsatellite variability revealed the levels of multilocus heterozygosity and allelic diversity, as well as the degree of inbreeding. According to the indicator of allelic diversity (A_r), deer from the Yamal experimental station stand out with a value of 6.25, while in animals from the SPK ERV, the value was 5.85. In general, despite the presence of inbred animals in the samples, we can talk about a low level of inbreeding depression in the studied populations of Nenets reindeer.

Keywords: *Rangifer tarandus* L., nenets reindeer breed, genetic diversity, spatial and genetic structure of populations, phylogeny, STR markers, microsatellites, biodiversity.

ХАРАКТЕРИСТИКА ДАГЕСТАНСКИХ ЛОКАЛЬНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ КОЗ (*Capra hircus*) НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ПОЛНЫХ МИТОГЕНОМОВ

© 2022 г. Т. Е. Денискова¹, *, А. В. Доцев¹, М. И. Селионова², М. Упадхайи³,
И. Медугорак³, Н. А. Зиновьева¹, **

¹Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
Московская обл., пос. Дубровицы, 142132 Россия

²Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, Москва, 127434 Россия

³Университет Людвиг–Максимилиана Мюнхена, департамент ветеринарных наук (LMU),
Мюнхен, 80539 Германия

*e-mail: horarka@yandex.ru

**e-mail: n_zinovieva@mail.ru

Поступила в редакцию 28.11.2021 г.

После доработки 14.12.2021 г.

Принята к публикации 28.12.2021 г.

Впервые проведен анализ полиморфизма полных митохондриальных геномов у трех дагестанских локальных популяций коз ($n = 37$), которые характеризовались высоким генетическим и гаплотипическим разнообразием. Было показано, что 90.88% общей генетической изменчивости приходилось на внутригрупповые различия и 4.86% – на межгрупповые различия. Для исследуемой выборки коз были рассчитаны достоверные отрицательные значения индексов нейтральности Таджимы и Фу ($P < 0.05$). Проведен филогенетический анализ с привлечением нуклеотидных последовательностей домашних коз и безоаровых козлов, принадлежащих к различным гаплогруппам. Было установлено, что все исследуемые образцы дагестанских локальных коз принадлежали к гаплогруппе А, наиболее часто встречающейся у домашних коз.

Ключевые слова: домашняя коза, *Capra hircus*, митохондриальный геном, генетическое разнообразие, локальные породы.

DOI: 10.31857/S0016675822050046

Домашняя коза (*Capra hircus*) – это один из первых одомашненных видов сельскохозяйственных животных, обладающий такими ценными качествами как способность производить продукты питания (молоко, мясо) и сырье (шерсть, пух), неприхотливость к условиям кормления и содержания, умеренный темперамент, высокая биологическая пластичность. Благодаря своим особенностям козы широко распространились от центра одомашнивания в большинство стран мира.

В России помимо известных отечественных (оренбургская пуховая, горноалтайская пуховая, советская шерстная) и иностранных пород (зааненская, нубиан, мурсиана гранадина) [1] разводятся локальные популяции коз [2], которые особенно популярны в регионах, где разведение иных сельскохозяйственных животных неэффективно. Специфический горный рельеф с труднодоступными засоренными камнями пастбищами способствовал развитию козоводства в Республике Дагестан [3], где издревле разводились вынос-

ливые и неприхотливые аборигенные популяции коз, которые различались по типу рогов, профилю головы, размеру и форме ушей [4]. Первые официальные данные по численности коз в Республике Дагестан, которая составила 247 403 голов, датируются 1933 г. [4].

Для повышения объемов получаемой продукции началось улучшение аборигенных коз с использованием генетического материала высокопродуктивных пород. Так, дагестанская пуховая порода, официально утвержденная в 1993 г., была создана методом поглотительного скрещивания местных козоматок с производителями советской шерстной породы [1]. Дагестанская шерстная порода – это аборигенная порода, современный генофонд которой также сформирован под сильным влиянием советской шерстной породы [1]. Кроме того, на основе аборигенных коз создаются поместные молочные стада с участием зааненской породы [3]. Несмотря на ряд преимуществ получения новых высокопродуктивных типов животных,

следует отметить, что массовое поглощение генофонда аборигенных коз может привести к невосполнимой утрате их уникальных генетических компонентов. В связи с этим необходимо проведение генетического мониторинга с использованием ДНК-маркеров для оценки генетического статуса дагестанских локальных популяций коз.

Для характеристики аллелофонда пород и популяций коз находят применение различные типы ДНК-маркеров, включая ПДРФ-маркеры [5, 6], полиморфизм митохондриальной ДНК (мтДНК) [7–12], микросателлиты [13–16], а в последнее время – однонуклеотидный полиморфизм (SNP) [17–20].

Несмотря на развитие высокопроизводительных методов генотипирования, мтДНК остается одним из широко используемых инструментов для оценки генетического разнообразия, установления филогенетических взаимосвязей между популяциями и уточнения происхождения по материнской линии [7]. Так, на основе анализа полиморфизма D-петли мтДНК было изучено гаплотипическое и генетическое разнообразие, а также показана низкая дифференциация тувинских и монгольских локальных пород коз [12], а также было показано отсутствие филогеографической структуры в эфиопских популяциях коз [10]. Анализ молекулярной дисперсии, проведенный на основе митохондриального полиморфизма, выявил наличие значительного географического структурирования в китайских породах коз [8].

Кроме того, мтДНК позволяет изучить демографическую историю групп животных, что особенно актуально для локальных и малочисленных популяций, которые могут находиться в состоянии прохождения через “бутылочное горлышко”. Например, индексы селективной нейтральности, рассчитанные на основе анализа мтДНК, позволили установить наличие большого числа низкочастотных гаплотипов в популяциях индийских локальных пород коз, что свидетельствует о их недавней демографической экспансии [11].

До недавнего времени подавляющее большинство исследований мтДНК коз проводилось на основании анализа части последовательности, включая D-петлю контрольного региона [7, 12, 13, 21, 22] и цитохром Б [23].

Развитие методов высокопроизводительного секвенирования сделало возможным определение полной последовательности мтДНК животных при относительно невысоких материальных затратах. Использование для оценки биоразнообразия данных о полных митохондриальных геномах может существенно повысить информативность и достоверность результатов проводимых популяционно-генетических исследований.

Цель настоящей работы – изучение генетического разнообразия, демографической истории и

установление гаплотипических взаимосвязей между тремя группами дагестанских локальных коз на основе анализа полиморфизма полных митохондриальных геномов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выборка для исследования включала образцы дагестанской пуховой (DAGF, $n = 13$) и дагестанской шерстной (DAGCW, $n = 12$) пород, а также популяции дагестанских молочных коз (DAGM, $n = 12$).

Выделение ДНК осуществляли с использованием наборов “ДНК-Экстран-2” (ЗАО “Синтол”, Россия). Секвенирование мтДНК было выполнено с использованием технологии NGS на приборе HiSeq 1500 (Illumina). Полученные прочтения (риды) были собраны с помощью программного обеспечения Bowtie 2 [24] и утилиты VCFtools [25]. В качестве референса для сборки полных геномов была выбрана последовательность генома *Capra hircus* (номер NC_005044.2) [26]. Для аннотирования митохондриальных геномов использовали MITOS WebServer [27]. Редактирование и выравнивание последовательностей проводили с использованием алгоритма MUSCLE [28], реализованного в программе MEGA 7.0.26 [29].

Параметры, характеризующие генетическое разнообразие исследуемых популяций, в том числе: количество гаплотипов (H), гаплотипическое (H_d) разнообразие, нуклеотидное разнообразие (π), среднее количество нуклеотидных различий (k), а также индексы нейтральности Таджимы (Tajima’s D) [30] и F_u (Fu’s F_s) [31], были рассчитаны в программе DnaSP 6.12.01 [32]. Для установления доли общей генетической изменчивости между и внутри популяций выполняли анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) с использованием пакета Arlequin v3.5.2.2 [33].

Определение лучших моделей эволюции было проведено в программном обеспечении Partition-Finder 2 [34] с использованием скорректированного информационного критерия Акайке (AICc) [35]. Для *ma12S*, *ma16S* лучшей моделью эволюции была GTR + I (General Time-Reversible model), для *cytb*, *nd3*, *nd5*, *nd4* – GTR + G, для *nd6* – HKY + I (Hasegawa–Kishino–Yano model), для всех остальных генов мтДНК – HKY + G.

Для построения медианной сети [36] было использовано программное обеспечение PopART 1.7 [37]. Филогенетический анализ, основанный на применении байесовского алгоритма, был проведен в MrBayes 3.2.6 [38] с последующей визуализацией в FigTree 1.4.3 [39].

Для изучения филогенетических связей и определения принадлежности к гаплогруппе изучаемых популяций коз были дополнительно привлечены полные нуклеотидные последовательно-

Таблица 1. Показатели генетического разнообразия популяций локальных дагестанских коз (*Capra hircus*)

| Группа | <i>n</i> | <i>S</i> | <i>k</i> | <i>H</i> | <i>Hd</i> ± <i>sd</i> | π ± <i>sd</i> |
|-------------------------|----------|----------|----------|----------|-----------------------|-------------------|
| DAGCW | 12 | 22 | 8.712 | 5 | 0.833 ± 0.069 | 0.00065 ± 0.00005 |
| DAGM | 12 | 39 | 8.394 | 10 | 0.970 ± 0.044 | 0.00062 ± 0.00007 |
| DAGF | 13 | 39 | 9.359 | 10 | 0.962 ± 0.041 | 0.00069 ± 0.00005 |
| В целом по всей выборке | 37 | 82 | 9.444 | 23 | 0.967 ± 0.014 | 0.00070 ± 0.00003 |

Примечание. *n* – число голов в группе, *S* – число полиморфных сайтов, *H* – число гаплотипов, *Hd* – гаплотипическое разнообразие, *k* – среднее количество нуклеотидных замен на сайт, π – нуклеотидное разнообразие.

Таблица 2. Результаты AMOVA в популяциях локальных дагестанских коз (*Capra hircus*)

| Источник вариаций | Степень свободы, <i>d.f.</i> | Сумма квадратов, <i>SS</i> | Компонент дисперсии, <i>VC</i> | Процент вариации, <i>V%</i> |
|--------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Межгрупповые различия | 2 | 19.763 | 0.44324 | 4.86 |
| Внутригрупповые различия | 34 | 150.237 | 4.41874 | 90.88 |
| Общие | 36 | 170.000 | 4.86198 | |

сти мтДНК домашних коз и безоаровых козлов (*C. aegagrus*), относящиеся к разным гаплогруппам [9]. Последовательности домашних коз включали таковые представителей турецких пород, в том числе ангорской (гаплогруппа А – KR059200, KR059201, KR059202; гаплогруппа G – KR059214), абаза (гаплогруппа A1a – KR059151; гаплогруппа A6 – KR059178 и KR059179; гаплогруппа А – KR059186 и KR059199) и шерстной (гаплогруппа A2 – KR059152; гаплогруппа A2a1 – KR059158; гаплогруппа А – KR059204; гаплогруппа G – KR059215), иранской породы керманшах (гаплогруппа А – KR059189, KR059207, KR059208; гаплогруппа G – KR059213) и референса (гаплогруппа B1 – NC_005044.2). Безоаровые козлы были представлены особями из Ирана, принадлежащими к гаплогруппам В (KR059219), С (KR059221), С1 (KR059222), D (KR059210) и F (KR059226). В качестве аутгруппы были использованы соответствующие последовательности представителей диких видов коз, в том числе кавказского тура *C. caucasica* (NC_020683), мархура *C. falconeri* (NC_020622) и пиренейского козерога *C. pyrenaica* (NC_020625) [40].

Все расчеты и построение медианной сети и филогенетического дерева были выполнены по наборам данных, содержащих два гена рРНК и 13 протеин-кодирующих генов (PCG).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ параметров генетического разнообразия изучаемых популяций дагестанских коз (табл. 1) показал наличие 23 разных гаплотипов. Среди изучаемых групп наименьшее число гаплотипов и, следовательно, меньшее гаплотипическое разнообразие были выявлены в дагестанской шерст-

ной породе ($H = 5$ и $Hd = 0.833$ соответственно). Самый высокий уровень гаплотипического разнообразия был выявлен в группе дагестанских молочных коз ($Hd = 0.970$). Уровни нуклеотидного разнообразия в изучаемых группах коз существенно не различались и варьировали от 0.00062 в дагестанской молочной до 0.00069 в дагестанской пуховой популяции. Наибольшее число полиморфных сайтов было выявлено в группах дагестанских молочных и дагестанских пуховых коз (по 39 в каждой). Среднее количество нуклеотидных замен варьировало от 8.394 в группе дагестанских молочных коз до 9.359 в выборке дагестанской пуховой породы.

Анализ молекулярной дисперсии (AMOVA) позволил установить, что 90.88% общей генетической изменчивости приходилось на внутригрупповые различия, а 4.86% – на долю межгрупповых различий (табл. 2).

Результаты проверки гипотез селективной нейтральности в изучаемых популяциях коз представлены в табл. 3. Для общей выборки коз были получены достоверные отрицательные значения индексов нейтральности Таджимы ($Tajima's D = 1.91033$, $P < 0.05$) и Фу ($Fu's F_s = -5.216$, $P < 0.05$). Отрицательные значения обоих индексов наблюдались также в группах дагестанских молочных и дагестанских пуховых коз, но только значение индекса Таджимы было достоверным у дагестанских молочных коз ($Tajima's D = -1.59279$ при $P < 0.05$).

Характер распределения частот попарных различий между гаплотипами (рис. 1) во всей изучаемой выборке и в трех группах по отдельности был близок к унимодальному. Во всех исследованных популяциях коз отмечалось наличие притока генов извне, который носил наиболее массо-

Таблица 3. Результаты проверки гипотезы селективной нейтральности в популяциях локальных дагестанских коз (*Capra hircus*)

| Группа | <i>n</i> | Tajima's <i>D</i> | Fu's <i>F_s</i> |
|-------------------------|----------|-------------------|---------------------------|
| DAGCW | 12 | 0.86597 | 4.163 |
| DAGM | 12 | -1.59279* | -1.930 |
| DAGF | 13 | -1.13334 | -1.044 |
| В целом по всей выборке | 37 | -1.91033* | -5.216* |

Примечание. Tajima's *D* – индекс нейтральности Таджимы [30], Fu's *F_s* – индекс нейтральности Фу [31].

Таблица 4. Генетические дистанции между изучаемыми группами локальных дагестанских коз (*Capra hircus*), рассчитанные по *F_{ST}*

| Группы коз | DAGM | DAGCW | DAGF |
|------------|-------|-------|-------|
| DAGM | 0.000 | | |
| DAGCW | 0.105 | 0.000 | |
| DAGF | 0.038 | 0.127 | 0.000 |

вый характер в популяциях дагестанских молочных и дагестанских пуховых коз.

Анализ попарных генетических дистанций, рассчитанных по *F_{ST}* (табл. 4), показал наибольшую дифференциацию между группами дагестанских шерстных и дагестанских пуховых коз (*F_{ST}* = 0.127). Наименьшая степень дифференциации наблюдалась между группами дагестанских пуховых и дагестанских молочных коз (*F_{ST}* = 0.038).

Анализ медианной сети (рис. 2) показывает, что 21 из 23 гаплотипов, идентифицированных в выборке дагестанских коз, являлись породоспецифичными. Их двух остальных гаплотипов один был общим для дагестанских пуховых и дагестанских молочных коз, второй – для дагестанских шерстных и дагестанских молочных коз. В целом структура медианной сети не носила породозависимого характера.

Анализ структуры филогенетического дерева (рис. 3), построенного для изучаемых популяций коз и представителей различных гаплогрупп, показал, что все изучаемые дагестанские козы принадлежат к гаплогруппе А. При этом четыре гаплотипа, идентифицированных в дагестанской пуховой и дагестанской молочной группах, входили в подгруппу с представителем гаплогруппы А1а (турецкая порода абаза). Два гаплотипа, идентифицированных в дагестанской пуховой и дагестанской молочной группах, кластеризовались с особями-носителями гаплогрупп А2 и А2а1 (турецкая шерстная порода).

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы наметился расцвет в генетических исследованиях российских локальных пород и популяций коз. Генетическое и аллельное разнообразие дагестанской пуховой и дагестанской шерстной пород было изучено с использованием микросателлитных маркеров [15]. С использованием ДНК-чипов была проанализирована популяционная структура и установлено генетическое влияние советской шерстной породы на генофонды дагестанской пуховой и дагестанской шерстной пород [20].

Однако использование только ядерных маркеров не позволяет в полной мере оценить исходные генетические элементы, свойственные аборигенным козам до того, как они были улучшены другими культурными породами. Кроме того, о происхождении дагестанских аборигенных коз практически ничего не известно. В этом аспекте анализ полиморфизма митохондриального генома может способствовать углубленному пониманию генетических особенностей дагестанских локальных популяций, их демографической истории и гаплотипических взаимосвязей.

Для изучения демографической истории дагестанских локальных коз были проведены тесты на нейтральность Таджимы и Фу. Отрицательные достоверные значения обоих индексов, полученные для всей анализируемой выборки, могут свидетельствовать об избыточном количестве редких аллелей и гаплотипов у коз региона по сравнению с тем, что можно было бы ожидать при нейтрально эволюционирующей модели популяции, и о росте численности после периода “бутылочного горлышка” [30, 31]. Последние официальные статистические данные по численности дагестанских пород коз доступны на конец 2010 г. (19.5 тыс. голов дагестанской пуховой и 19.6 тыс. голов дагестанской шерстной) [1]. В связи с этим соотношение полученных нами результатов с демографическими показателями популяций коз не представляется возможным. Тем не менее Diwedi и др. [11] продемонстрировали четкую связь демографических показателей индийских популяций коз и достоверных отрицательных значений индекса нейтральности Фу, что, вероятно, дает основания для интерполяции наших данных.

При этом если рассматривать отдельно каждую группу коз, то заметно, что популяция дагестанской шерстной породы имеет тенденцию к обратной ситуации – к дефициту редких аллелей и возможному приближению к “бутылочному горлышку”. Значения индексов для этой группы были недостоверными, и выборка породы представлена менее 30 головами, поэтому выводы имеют дискуссионный характер. Интересно, что подобная генетическая картина наблюдалась и в популяциях индийского буйвола из штата Уттар

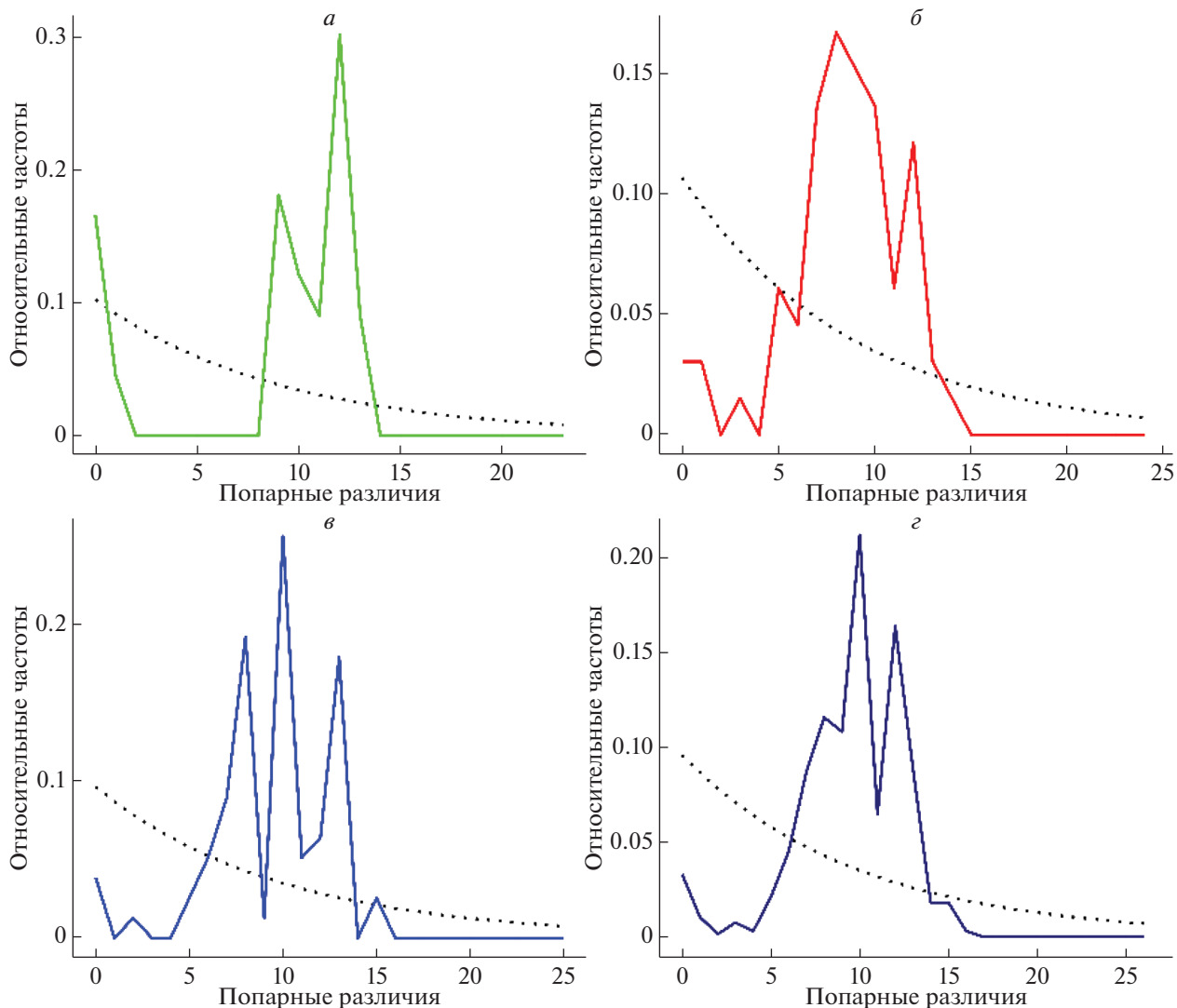


Рис. 1. Графики распределения частот значений попарных различий между гаплотипами анализируемой последовательности мтДНК (два рРНК и 13 протеин-кодирующих генов) популяций дагестанских коз. *a* – дагестанская шерстная порода; *б* – дагестанская молочная популяция; *в* – дагестанская пуховая порода; *г* – вся выборка. Пунктирная линия представляет ожидаемое распределение в рамках модели постоянного размера популяции, а сплошная линия – наблюдаемое попарное различие.

Прадеш: в целом по выборке региона наблюдались отрицательные значения индексов Таджимы и Φ_u , а внутри выборки одна группа демонстрировала положительные значения обоих показателей [40].

Унимодальный паттерн распределения частот значений парных различий между гаплотипами во всей изучаемой выборке указывает на недавнюю демографическую экспансию [41], что согласуется с достоверными негативными значениями индексов Таджимы и Φ_u .

Результаты анализа молекулярной дисперсии показали, что доля изменчивости, наблюдаемая между изучаемыми популяциями дагестанских коз, составляет 4.86%, что превышает значения

этого показателя у монгольских и тувинских коз (1%) [12] и эфиопских коз (2.63%) [10].

Между группами дагестанской пуховой и дагестанской шерстной пород была обнаружена умеренная дифференциация ($F_{ST} = 0.127$). Интересно то, что по данным SNP-генотипирования генетическая дифференциация между теми же животными дагестанской пуховой и дагестанской шерстной пород, что были проанализированы в настоящей работе, была значительно ниже ($F_{ST} = 0.011$) [20]. Возможно, это объясняется наличием нескольких различных материнских линий в генофонде этих групп.

В целом генетическая дифференциация между изучаемыми группами дагестанских локальных

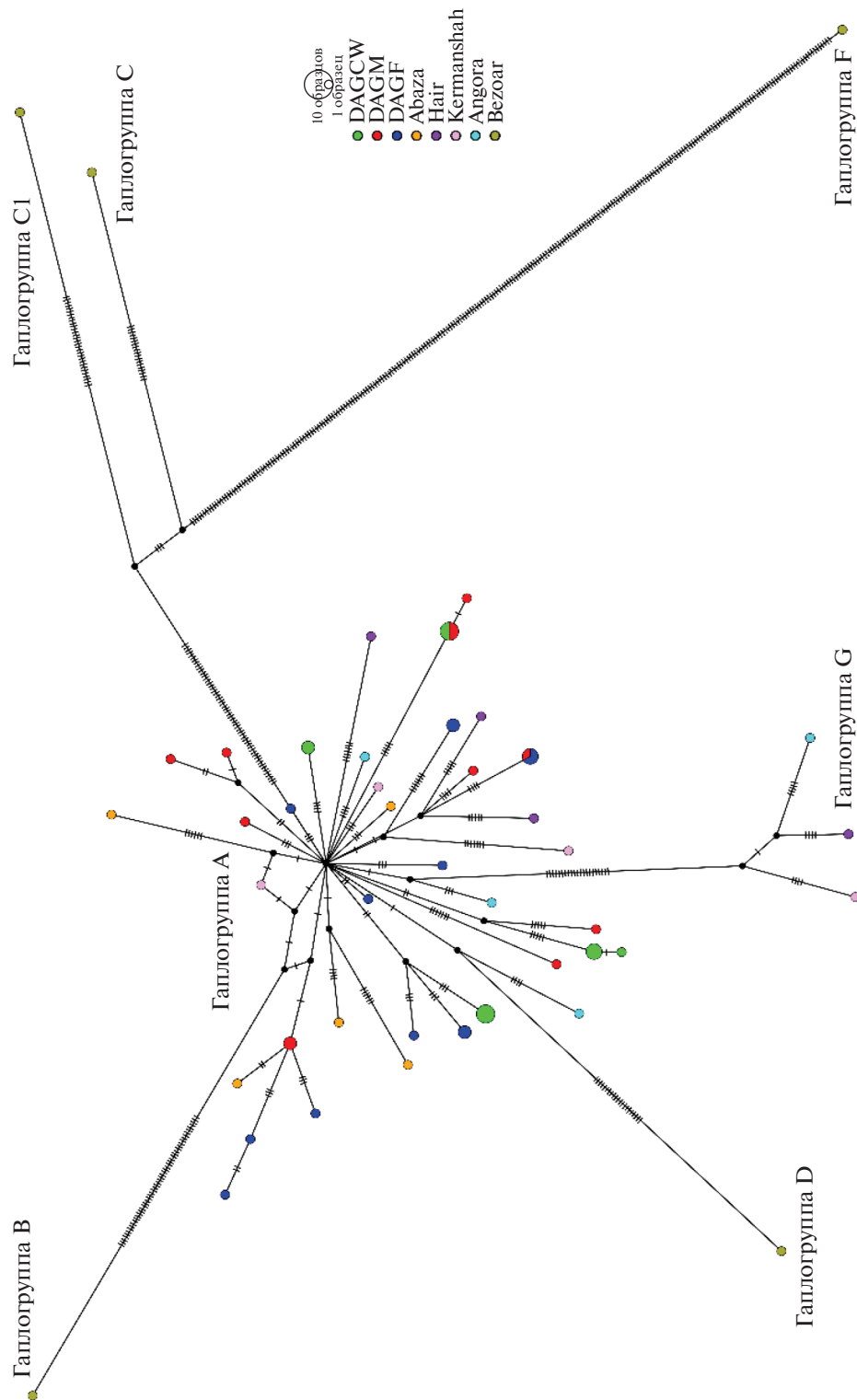


Рис. 2. Медианная сеть, характеризующая гаплогипотетические связи между изучаемыми популяциями локальных дагестанских коз (*Scapra hircus*) и представителями различных гаплогрупп.

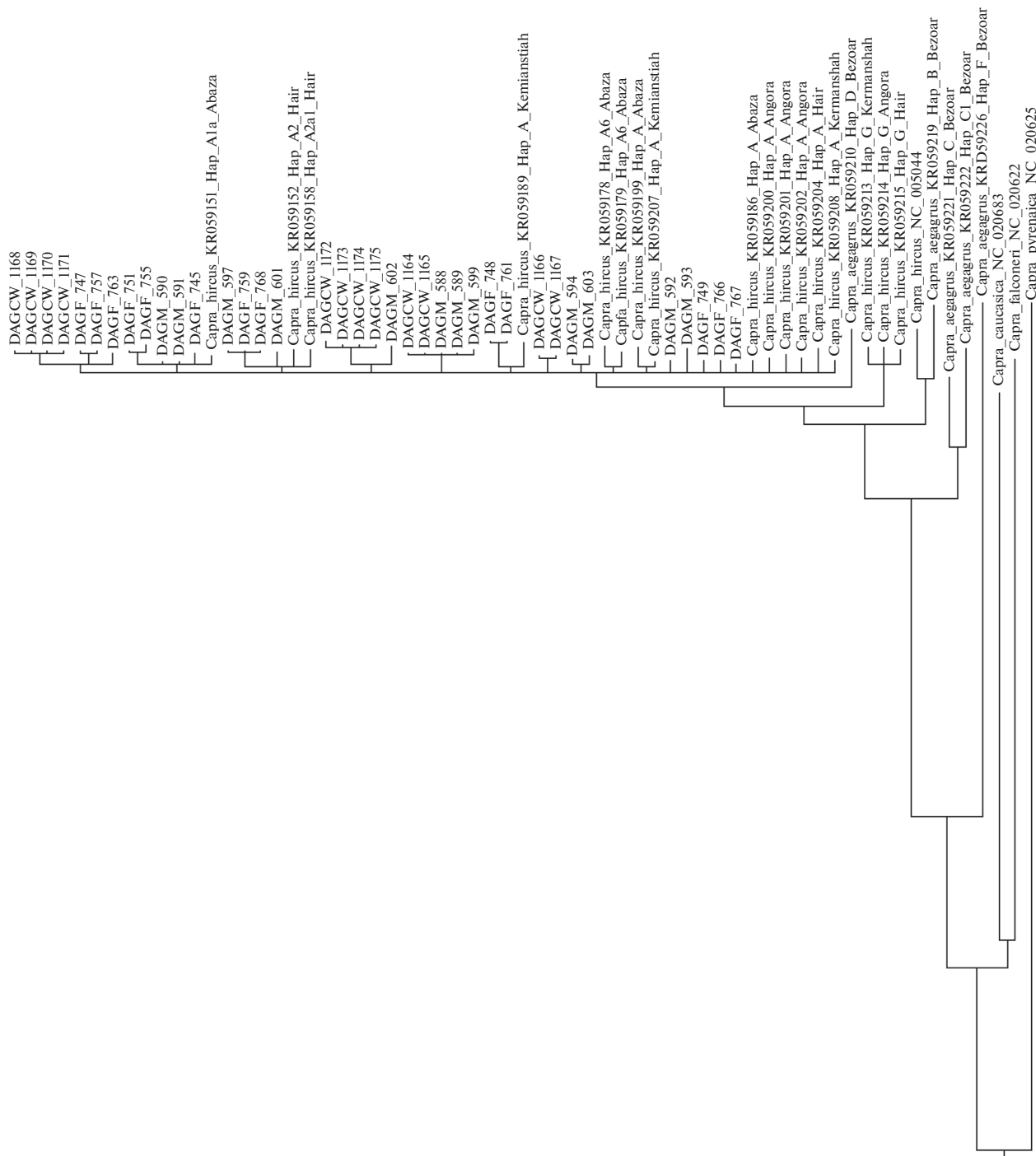


Рис. 3. Байесовское филогенетическое дерево, демонстрирующее принадлежность изучаемых дагестанских коз к общепринятым гаплогруппам.

коз была выше, чем между тувинскими и монгольскими породами (F_{ST} от 0 до 0.080) [12], и сопоставима со значениями, рассчитанными в индийских породах (F_{ST} от 0.013 до 0.112) [11].

Для проведения филогенетического анализа к последовательностям дагестанских коз мы добавили аналогичные секвенированные последова-

тельности митогеномов носителей различных гаплогрупп [9]. В связи с тем, что ранее было установлено, что российские локальные породы, включая дагестанскую шерстную и дагестанскую пуховую, входят в один кластер с турецкими породами коз на филогенетическом дереве [20], дополнительно в анализ были включены представители

турецких пород, в том числе ангорской, абаза и турецкой шерстной. Тем не менее все исследуемые образцы дагестанских коз относились к гаплогруппе А, что согласуется с результатами, полученными ранее на основе анализа полиморфизма Д-петли [42]. Гаплогруппа А наиболее часто встречается среди домашних коз, так как для мировых популяций коз характерна слабая филогеография [9], которая, вероятно, является следствием опосредованных человеком многочисленных миграций [10].

Таким образом, дагестанские локальные популяции коз характеризуются высоким гаплотипическим разнообразием по мтДНК и относительно хорошо выраженной дифференциацией. Оценка демографических параметров путем анализа селективной нейтральности модели эволюции указывает по крайней мере на одну демографическую экспансию, которую пережили исследуемые популяции коз. Однако для более глубокого понимания этих процессов необходимо проведение дальнейших исследований на расширенной выборке.

Финансирование проводилось за счет средств Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, грант № 075-15-2021-1037 (внутренний № 15. БРК.21.0001).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Новопашина С.И., Санников М.Ю., Хатамаев С.А. и др.* Состояние и перспективные направления улучшения генетического потенциала мелкого рогатого скота: науч. аналит. обзор. М.: ФГБНУ "Росинформагротех", 2019. 80 с.
2. *Хайитов А.Х., Станишевская О.Н., Сафаров Т.С.* Биологические и хозяйственные признаки местных коз // Изв. Санкт-Петербургского гос. аграрного ун-та. 2016. № 45. С. 139–145.
3. *Мусалаев Х.Х.* Состояние и перспективы развития козоводства в Дагестане // Горное сельское хозяйство. 2015. № 1. С. 118–123.
4. *Лебель Л.Д., Зеленский Ю.Г.* Козоводство и козы Дагестана. Пятигорск: Севкавказиздат (типо-лит. им. Анджиевского), 1936. 59 с.
5. *Kumar A., Rout P.K., Mandal A., Roy R.* Identification of the CSN1S1 allele in Indian goats by the PCR-RFLP method // *Animal: An Intern. J. Animal Biosci.* 2007. V. 1. № 8. P. 1099–1104. <https://doi.org/10.1017/S1751731107000444>
6. *Li M.J., Zhang C.M., Lan X.Y. et al.* Analysis of POU1F1 gene DdeI polymorphism in Chinese goats // *GMR.* 2016. V. 15. № 1. P. 15017747. <https://doi.org/10.4238/gmr.15017747>
7. *Naderi S., Rezaei H.-R., Taberlet P. et al.* Large-scale mitochondrial DNA analysis of the domestic goat reveals six haplogroups with high diversity // *PLoS One.* 2007. № 2. P. e1012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001012>
8. *Zhao Y., Zhao R., Zhao Z. et al.* Genetic diversity and molecular phylogeography of Chinese domestic goats by large-scale mitochondrial DNA analysis // *Mol. Biol. Rep.* 2014. V. 41. № 6. P. 3695–3704. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3234-2>
9. *Colli L., Lancioni H., Cardinali I. et al.* Whole mitochondrial genomes unveil the impact of domestication on goat matrilineal variability // *BMC Genomics.* 2015. № 16. P. 1115. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2342-2>
10. *Tarekegn G.M., Tesfaye K., Mwai O.A. et al.* Mitochondrial DNA variation reveals maternal origins and demographic dynamics of Ethiopian indigenous goats // *Ecol. Evol.* 2018. V. 8. № 3. P. 1543–1553. <https://doi.org/10.1002/ece3.3710>
11. *Diwedi J., Singh A.W., Ahlawat S. et al.* Comprehensive analysis of mitochondrial DNA based genetic diversity in Indian goats // *Gene.* 2020. № 756. P. 144910. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144910>
12. *Воронкова В.Н., Пискунов А.К., Николаева Э.А. и др.* Гаплотипическое разнообразие монгольских и тувинских пород коз (*Capra hircus*) на основе полиморфизма мтДНК и Y-хромосомы // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 10. С. 1164–1173. <https://doi.org/10.31857/S0016675821100155>
13. *Wang G.Z., Chen S.S., Chao T.L. et al.* Analysis of genetic diversity of Chinese dairy goats via microsatellite markers // *J. Anim. Sci.* 2017. V. 95. № 5. P. 2304–2313. <https://doi.org/10.2527/jas.2016.1029>
14. *Menezes M., Martinez A.M., Filho E. et al.* Diversity analysis and genetic relationships among local Brazilian goat breeds using SSR markers // *Animals.* 2020. V. 10. № 10. P. 1842. <https://doi.org/10.3390/ani10101842>
15. *Selionova M.I., Aibazov M.M., Mamontova T.V. et al.* Genetic differentiation of Russian goats and wild relatives based on microsatellite loci // *J. Anim. Sci.* 2020. V. 98. Suppl. 4. P. 19–20. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa278.037>
16. *Бекетов С.В., Пискунов А.К., Воронкова В.Н. и др.* Генетическое разнообразие и филогения пуховых коз Центральной и Средней Азии // *Генетика.* 2021. Т. 57. № 7. С. 810–819. <https://doi.org/10.31857/S0016675821070031>
17. *Brito L.F., Kijas J.W., Ventura R.V. et al.* Genetic diversity and signatures of selection in various goat breeds revealed by genome-wide SNP markers // *BMC Genomics.* 2017. V. 18. № 1. P. 229. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3610-0>
18. *Burren A., Neuditschko M., Signer-Hasler H. et al.* Genetic diversity analyses reveal first insights into breed-specific selection signatures within Swiss goat breeds // *Anim. Genet.* 2016. V. 47. № 6. P. 727–739. <https://doi.org/10.1111/age.12476>

19. Colli L., Milanese M., Talenti A. et al. Genome-wide SNP profiling of worldwide goat populations reveals strong partitioning of diversity and highlights post-domestication migration routes // *GSE*. 2018. V. 50. № 1. P. 58.
<https://doi.org/10.1186/s12711-018-0422-x>
20. Deniskova T.E., Dotsev A.V., Selionova M.I. et al. SNP-based genotyping provides insight into the West Asian origin of Russian local goats // *Front. Genet.* 2021. № 12. P. 708740.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2021.708740>
21. Piras D., Doro M.G., Casu G. et al. Haplotype affinities resolve a major component of goat (*Capra hircus*) MtDNA D-loop diversity and reveal specific features of the Sardinian stock // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 2. P. e30785.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030785>
22. Tabata R., Kawaguchi F., Sasazaki S. et al. The Eurasian Steppe is an important goat propagation route: A phylogeographic analysis using mitochondrial DNA and Y-chromosome sequences of Kazakhstani goats // *Animal Science J.* 2019. V. 90. № 3. P. 317–322.
<https://doi.org/10.1111/asj.13144>
23. Fernández H., Hughes S., Vigne J.-D. et al. Divergent mtDNA lineages of goats in an Early Neolithic site, far from the initial domestication areas // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 42. P. 15375–15379.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0602753103>
24. Langmead B., Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nat. Methods*. 2012. № 9. P. 357–359.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>
25. Danecek P., Bonfield J.K., Liddle J. et al. Twelve years of SAMtools and BCFtools // *Giga Science*. 2021. V. 10. № 2. P. giab008.
<https://doi.org/10.1093/gigascience/giab008>
26. Hassanin A., Bonillo C., Nguyen B.X., Cruaud C. Comparisons between mitochondrial genomes of domestic goat (*Capra hircus*) reveal the presence of numts and multiple sequencing errors // *Mitochondrial DNA*. 2010. V. 21. № 3–4. P. 68–76.
<https://doi.org/10.3109/19401736.2010.490583>
27. Bernt M., Donath A., Jühling F. et al. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation // *Mol. Phylogenetics. Evol.* 2013. V. 69. № 2. P. 313–319.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>
28. Edgar R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 5. P. 1792–1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
29. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // *Mol. Biol. Evol.* 2016. V. 33. № 7. P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
30. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism // *Genetics*. 1989. V. 123. P. 585–595.
<https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
31. Fu Y.-X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection // *Genetics*. 1997. V. 147. P. 915–925.
<https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
32. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C. et al. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism analysis of large data sets // *Mol. Biol. Evol.* 2017. № 34. P. 3299–3302.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>
33. Excoffier L., Lischer H.E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // *Mol. Ecol. Resour.* 2010. V. 10. № 3. P. 564–567.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
34. Lanfear R., Frandsen P.B., Wright A.M. et al. Partition-Finder 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. № 3. P. 772–773.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw260>
35. Akaike H. A new look at the statistical model identification // *IEEE Trans Auto Control*. 1974. № 19. P. 716–723.
<https://doi.org/10.1109/TAC.1974.1100705>
36. Bandelt H.J., Forster P., Röhl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. № 1. P. 37–48.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
37. Leigh J.W., Bryant D. Popart: Full-feature software for haplotype network construction // *Methods Ecol. Evol.* 2015. V. 6. № 9. P. 1110–1116.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>
38. Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P. et al. MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space // *Syst. Biol.* 2012. V. 61. № 3. P. 539–542.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
39. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
40. Hassanin A., Ropiquet A., Couloux A., Cruaud C. Evolution of the mitochondrial genome in mammals living at high altitude: new insights from a study of the tribe Caprini (Bovidae, Antilopinae) // *J. Mol. Evol.* 2009. V. 68. № 4. P. 293–310.
<https://doi.org/10.1007/s00239-009-9208-7>
41. Md Naim D., Kamal N., Mahboob S. Population structure and genetic diversity of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Penang as revealed by mitochondrial DNA cytochrome oxidase I // *Saudi J. Biol. Sci.* 2020. V. 27. № 3. P. 953–967.
<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.01.021>
42. Deniskova T., Bakoev N., Dotsev A. et al. Maternal origins and haplotype diversity of seven Russian goat populations based on the D-loop sequence variability // *Animals*. 2020. V. 10. № 9. P. 1603.
<https://doi.org/10.3390/ani10091603>

Characteristics of Dagestan Local Goat Subpopulations (*Capra hircus*) Based on the Analysis of the Complete Mitogenome Polymorphism

T. E. Deniskova^{a, *}, A. V. Dotsev^a, M. I. Selionova^b,
M. Upadhyay^c, I. Medugorac^c, and N. A. Zinovieva^{a, **}

^aErnst Federal Research Center for Animal Husbandry, Podolsk District, Dubrovitsy settlement, 142132 Russia

^bRussian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy, Moscow, 127434 Russia

^cLudwig Maximilian University Munich, Department of Veterinary Sciences (LMU), Munich, 80539 Germany

*e-mail: horarka@yandex.ru

**e-mail: n_zinovieva@mail.ru

For the first time, the analysis of complete mitochondrial genomes polymorphism was performed in three Dagestan local goat populations ($n = 37$), which were characterized by high genetic and haplotype diversity. We found that 90.88% of the total genetic variability was accounted for intragroup differences and 4.86% was accounted for withingroup differences. For the studied sample of goats, significant negative values of the Tajima's D and Fu's F_s neutrality indices were calculated ($P < 0.05$). We performed a phylogenetic analysis using the nucleotide sequences of domestic goats and bezoars belonging to different Haplogroups. Our study revealed that all studied samples of Dagestan local goats belonged to Haplogroup A, which is the most frequent one in domestic goats.

Keywords: domestic goat, *Capra hircus*, mitochondrial genome, genetic diversity, local breeds.