

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова  
Российской академии наук

*На правах рукописи*

**ОЮН НАДЕЖДА ЮРЬЕВНА**

**ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЯКА (*BOS GRUNNIENS*)  
САЯНО-АЛТАЙСКОГО РЕГИОНА**

специальность 03.02.07 – генетика

**ДИССЕРТАЦИЯ**  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научный руководитель**  
доктор биологических наук,  
Столповский Ю.А.

МОСКВА – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Список сокращений                                                                                                       | 4  |
| ВВЕДЕНИЕ                                                                                                                | 5  |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ                                                                                               | 10 |
| 1.1. Общая характеристика <i>Bos grunniens</i>                                                                          | 10 |
| 1.1.1. Систематика <i>B. grunniens</i>                                                                                  | 10 |
| 1.1.2. Происхождение и доместикация яка                                                                                 | 12 |
| 1.1.3. Распространение <i>B. grunniens</i>                                                                              | 14 |
| 1.2. Исследования <i>B. grunniens</i> с использованием генетических маркеров                                            | 18 |
| 1.2.1. Филогенетические исследования яка на основе мтДНК                                                                | 19 |
| 1.2.2. Генетический полиморфизм на основе микросателлитных локусов                                                      | 24 |
| 1.2.3. Молекулярно-генетические основы адаптации яка к гипоксии<br>в условиях высокогорья                               | 27 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ                                                                                             | 31 |
| 2.1. Характеристика выборок                                                                                             | 31 |
| 2.2. Выделение ДНК                                                                                                      | 35 |
| 2.3. Электрофоретическое разделение и очистка ПЦР-продуктов                                                             | 36 |
| 2.4. Анализ нуклеотидного состава D-петли мтДНК                                                                         | 36 |
| 2.5. Микросателлитный анализ                                                                                            | 39 |
| 2.6. Генотипирование SNPs в гене <i>VEGF-A</i>                                                                          | 43 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ                                                                                        | 46 |
| 3.1. Генетическое разнообразие яка <i>B. grunniens</i> Саяно-Алтайского<br>региона на основе полиморфизма D-петли мтДНК | 46 |
| 3.1.1. Анализ гаплотипического разнообразия D-петли мтДНК яка <i>B. grunniens</i>                                       | 46 |
| 3.1.2. Филогенетический анализ яка <i>B. grunniens</i> на основе мтДНК                                                  | 51 |

|                                                                                                                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2. Генетическое разнообразие и генетическая структура популяций яка <i>B. grunniens</i> Саяно-Алтайского региона на основе полиморфизма микросателлитных локусов             | 57 |
| 3.2.1. Генетическая изменчивость микросателлитных локусов, использованных в работе                                                                                             | 59 |
| 3.2.2. Анализ генетического разнообразия популяций яка <i>B. grunniens</i> на основе полиморфизма микросателлитных локусов                                                     | 62 |
| 3.2.3. Анализ генетической структуры популяций яка <i>B. grunniens</i> на основе полиморфизма микросателлитных локусов                                                         | 66 |
| 3.3. Поиск ассоциаций гена <i>VEGF-A</i> , участвующего в генетической детерминации механизмов адаптации к гипоксии, с высотой горного рельефа у яков Саяно-Алтайского региона | 71 |
| 3.3.1. Выявление и анализ частоты SNP g.8430T>C в гене <i>VEGF-A</i>                                                                                                           | 71 |
| 3.3.2. Выявление и анализ частоты SNP g.14853G>A в гене <i>VEGF-A</i>                                                                                                          | 75 |
| 3.3.3 Поиск ассоциаций гена <i>VEGF-A</i> с высотой горного рельефа у яков Саяно-Алтайского региона                                                                            | 80 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ                                                                                                                                                                     | 85 |
| ВЫВОДЫ                                                                                                                                                                         | 88 |
| Благодарности                                                                                                                                                                  | 89 |
| Список литературы                                                                                                                                                              | 90 |

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

КРС – крупный рогатый скот

мтДНК – митохондриальная ДНК

ПДРФ - RFLP – restriction fragment length polymorphism – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПДРФ – полиморфизм длин рестрикционных фрагментов

AFLP – amplified fragment length polymorphism – полиморфизм длин амплифицированных фрагментов

DAD-IS – Domestic Animal Diversity Information System

EPAS1 - Endothelial PAS domain protein 1

FAO – Food and Agricultural Organization of United Nations

ISAG – International Society for Animal Genetics

MCTP1 – Multiple C2 and transmembrane domain containing protein 1

PIC – polymorphism information content – полиморфное информационное содержание

QTL – Quantitative Trait Loci – локусы количественных признаков

RAPD PCR (или AP-PCR - Arbitrarily Primed PCR) – random amplified polymorphic DNA, polymerase chain reaction – полимеразная цепная реакция со случайными праймерами

SNP - Single Nucleotide Polymorphism – однонуклеотидный полиморфизм

STR (или STMS - Sequence Tagged Microsatellite Site, SSR - simple sequence repeat) – short tandem repeat – короткие tandemные повторы, микросателлиты

VEGF-A - Vascular endothelial growth factor A – фактор роста эндотелия сосудов

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Як *Bos grunniens* L. является domesticiрованным животным, дикая форма которого обитает на территории Цинхай-Тибетского нагорья на рекордной высоте от 2500 до 6000 м над уровнем моря. Ареал обитания яка в высокогорных регионах располагается на высотах 2000-5000 метров над уровнем моря, где лимитирующими факторами для разведения животных являются температура, которая зимой может достигать – 50<sup>0</sup>С, и низкое содержание кислорода в атмосфере. Уникальная способность яка жить в суровых условиях, противостоя экстремально низкой температуре, высотной гипоксии и бескормице, большую часть года добывая скудный корм из-под снега, делает его важным модельным объектом для изучения молекулярно-генетических основ жизнеспособности и адаптации организма к условиям высокогорья.

Сложная и длительная история domestikации яка, а также разорванность современного ареала в силу физико-географических особенностей его местообитания, определяют генетическое разнообразие его современных популяций. Наибольшая численность одомашненного яка отмечена в районах Цинхай-Тибетского нагорья, Западного Китая, Монголии, в Саяно-Алтайском регионе России, а также странах, расположенных на территории Гималаев [Wiener, 2003]. В России яков разводят главным образом в Туве, а также на Алтае, в Бурятии и на Северном Кавказе. В России самое большое поголовье яка насчитывается в Туве, поскольку климатические и физико-географические особенности позволяют яководству развиваться сразу в нескольких высокогорных районах республики.

В настоящее время изучение *Bos grunniens* вызывает большой интерес во всем мире. Активно проводятся исследования дифференциации популяций, генетического разнообразия, геногеографии и филогенетических связей [Qi, 2010]. Необходимо отметить, однако, что большинство исследований генетического разнообразия яка проводилось на популяциях, обитающих на

территории других стран. Несмотря на то, что як в России является ценным животным, зачастую обеспечивающим существование населения целых районов страны, исследования генетического разнообразия яка, структуры его популяции и филогенетических связей практически не проводились. Научные изыскания в области генетики яка в России носили в основном фрагментарный характер и были связаны, как правило, с изучением гибридизации яка и крупного рогатого скота [Аль-Кейси, 2011; Столповский, 2013; Столповский, 2014; Давыдов, 1990; Лус, 1927; Иванова, 1956].

Ранее изучение полиморфизма мтДНК российских яков осуществлялось на единичных особях, при этом не было четкого обозначения конкретного района и местности обитания локальной популяции, что не позволяет использовать полученные результаты для создания целостной картины.

Популяции яков России упоминаются в работах зарубежных исследователей, однако являются крайне неполными [Xuebin, 2005; Qi, 2010; Bailey, 2002] и в связи с ограниченным объемом выборки с территории РФ поверхностно описывают генетическое разнообразие яка в России. Так, например, в рамках изучения генетического разнообразия и дифференциации 5 популяций яка Монголии на основе микросателлитных локусов в анализ в качестве внешней группы были включены особи из популяций Бурятии (n=40) [Xuebin, 2005].

Важно отметить, в то время как генетическое разнообразие популяций яка в нашей стране остается практически не изученным, численность поголовья за последние десятилетия резко сократилась, что делает абсолютно необходимым изучение генетической структуры и разнообразия популяций яков России для разработки мер поддержания численности и рационального разведения.

Як обитает в высокогорных районах, где экстремально низкие температуры и гипоксия являются лимитирующими факторами. В связи с этим, представляет интерес изучение яка как модельного объекта для понимания молекулярно-генетических основ адаптации к гипоксии в условиях высокогорья. В настоящее время известны гены-кандидаты, которые могут играть ключевую роль в высотной адаптации яка. Известно, что ген *VEGF-A* влияет на непосредственный

ответ организма на гипоксию, стимулируя образование новых кровяных телец и повышая проницаемость кровеносных сосудов. В связи с этим представляет интерес поиск ассоциаций гена *VEGF-A* в популяциях яка Саяно-Алтайского региона России и Монголии.

**Цель работы:** изучить генетическое разнообразие яка *Bos grunniens*, обитающего в высокогорных районах Саяно-Алтайского региона России и Монголии.

В соответствии с целью поставлены следующие **задачи**:

1. Выявить гаплотипическое разнообразие и филогенетические взаимоотношения между гаплотипами яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона на основе полиморфизма D-петли мтДНК.
2. Выявить генетическую изменчивость универсальных микросателлитных локусов, разработанных для КРС, для оценки их применимости в исследованиях *Bos grunniens*.
3. Выявить генетическое разнообразие и структуру популяции яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона на основе микросателлитных локусов.
4. Поиск ассоциаций гена *VEGF-A* с высотой горного рельефа у яков Саяно-Алтайского региона.

### **Научная новизна**

Впервые проведено комплексное изучение генетического разнообразия яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона на основе полиморфизма гипервариабельного района D-петли мтДНК, микросателлитных локусов и SNP-маркеров.

Впервые показано высокое гаплотипическое разнообразие D-петли мтДНК у яков России (Тувы, Алтая и Бурятии) и Монголии. Описано 4 новых гаплотипа.

Впервые проведен масштабный филогенетический анализ всех известных последовательностей D-петли мтДНК яка *Bos grunniens* (952 нуклеотидные

последовательности). Показано, что гаплотипы не ассоциированы ни с формой (дикая или одомашненная), ни с породной или географической принадлежностью яка.

Впервые изучено разнообразие и генетическая структура российских популяций яка на основе панели микросателлитных локусов. Впервые показано, что российские и монгольские популяции яка в целом характеризуются достаточно низким аллельным разнообразием микросателлитных локусов и невысоким уровнем генетических различий между популяциями. Впервые выявлена генетическая структура популяций яка Саяно-Алтайского региона России и Монголии, показана слабая дифференциация

Впервые показано, что универсальные микросателлитные локусы *CSSM66*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA53*, *CSRM60* и *BM2113*, разработанные для КРС, являются также информативными и пригодны для популяционных исследований яка *Bos grunniens*.

Впервые осуществлен поиск ассоциаций гена *VEGF-A* с высотой горного рельефа у яков. Впервые показана ассоциация гена *VEGF-A* с адаптацией к высокогорью, показана общая тенденция повышения частоты аллеля *A* в позиции *g.14853* гена *VEGF-A*, участвующего в механизмах адаптации к высокогорной гипоксии, с ростом высоты горного рельефа.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Работа посвящена комплексному изучению генетического разнообразия яка (*Bos grunniens*) России и Монголии, поддержание которого является условием сохранения данного вида в Саяно-Алтайском регионе.

В работе получены новые данные, которые устраняют «белое пятно» в общемировой картине генетического разнообразия и эволюционного развития яка как вида.

Впервые показано, что универсальные микросателлитные локусы *CSSM66*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA53*, *CSRM60* и *BM2113*, разработанные для КРС, являются



также информативными и пригодны для популяционных исследований яка *Bos grunniens*.

Впервые показана ассоциация гена *VEGF-A* с адаптацией к высокогорью у яка. Полученные результаты имеют важное фундаментальное значение для исследований связи полиморфизма гена *VEGF-A* и его функционального значения, поскольку использованные в работе SNP маркеры обнаружены также в гене *VEGF-A* человека.

Полученные данные микросателлитного анализа и способы оценок генетического разнообразия с использованием наиболее информативных и пригодных для популяционных исследований яка микросателлитных локусов предлагаются к использованию для контроля генетического разнообразия и сохранению генофондов яка в Саяно-Алтайском регионе.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Популяции яка Саяно-Алтайского региона характеризуются довольно высоким гаплотипическим разнообразием D-петли мтДНК вследствие распространения на данной территории гаплотипов из всех известных гаплогрупп, описанных в настоящее время.

Гаплотипы мтДНК яка *Bos grunniens* не ассоциированы ни с формой (дикая или одомашненная), ни с породной или географической принадлежностью яка.

2. Универсальные микросателлитные локусы, разработанные для КРС, в разной степени генетически изменчивы, в связи с чем некоторые локусы информативны и пригодны для популяционных исследований яка *Bos grunniens*.

3. Популяции яка России и Монголии генетически слабо дифференцированы и характеризуются невысоким аллельным разнообразием микросателлитных локусов.

4. С ростом высоты горного рельефа наблюдается общая тенденция повышения частоты аллеля *A* в позиции *g.14853* гена *VEGF-A*, участвующего в механизмах адаптации к высокогорной гипоксии.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Общая характеристика *Bos grunniens*

#### 1.1.1. Систематика *Bos grunniens*

В рамках современной классификации як принадлежит роду *Bos* трибы Bovini подсемейства Bovinae семейства Bovidae. Вместе с тем, существуют различные точки зрения касательно родовой принадлежности яка. Так, некоторые исследователи относят яка к роду *Bison* или выделяют в отдельный род *Poephagus* [Feng, 1986; Yang, 2006; Zhang, 2009].

Вместе с тем, включение яка в род *Bos* достаточно спорно, поскольку по анатомическим признакам (количество рёбер, грудных, поясничных и копчиковых позвонков) он сильно отличается от других его представителей [Olsen, 1990; Liu, 2007; Miram, 2012]. По морфологическим и анатомическим признакам як больше схож с бизоном *Bison bison*, чем с прочими представителями рода *Bos* [Leslie, Schaller, 2009]. Кроме того, филогенетические деревья, построенные с использованием последовательностей митохондриальной ДНК различных популяций яка и близких видов, указывают на близкое родство дикого и одомашнированного яка с бизоном *Bison bison*, в то время как остальные представители рода *Bos* образуют отдельный кластер [Guo, 2016; Zhong, 2015; Bao, 2016; Wu, 2016].

Наряду с этим ведутся дискуссии о выделении яка в отдельный род *Poephagus* [Gray, 1863; Feng, 1986; Yang, 2006; Liu, 2007; Zhang, 2009; Miram, 2012]. Так, в современной классификации GenBank NCBI яку присвоено латинское наименование *Bos grunniens*, с синонимом *Poephagus grunniens* [NCBI:txid30521].

В источниках встречается несколько вариантов латинских наименований яка. Дикого и одомашненного яков могут относить к разным видам или же

подвидам. На данный момент можно считать основным общепринятым названием *Bos grunniens* – для одомашненного яка, и *Bos mutus* – для дикого [Leslie, Schaller, 2009]. Необходимо отметить, что довольно спорным является вопрос присвоения видового статуса дикому яку и domesticiрованному. Между этими формами существуют морфологические, экстерьерные и не столь существенные генетические различия, связанные, прежде всего, с поведением и репродуктивной системой. В связи с этим диких и одомашненных яков именуют *Bos grunniens* [Schaller, Liu, 1996; Qi, 2008; Leslie, Schaller, 2009; Wang, 2014; Qiu, 2015; Shi, 2016; Zhang, 2016]. Одомашненные и дикие яки скрещиваются между собой и дают плодовитое потомство в отличие от скрещивания с крупным рогатым скотом, от которого получаются гибриды первого поколения, так называемые хайнаки, с эффектом гетерозиса, но бесплодные (стерильные) самцы. В результате гибридизации диких и одомашненных яков была создана порода Datong [Shi, 2016]. К тому же эффект доместикации яка заметен меньше, чем у прочих домашних животных [Qiu, 2015].

На основании результатов современных исследований определенная часть научного сообщества склоняется к классификации дикого и одомашненного яков как двух подвигов *Bos grunniens* L., рассматривая дикого яка в качестве предковой формы. В результате одомашненный як получил наименование *Bos grunniens grunniens*, а дикий як – *Bos grunniens mutus* [Wilson, Reeder, 2005; Ma, 2009; Zhang, 2009; Shi, 2016].

В настоящее время в связи со сложностями определения таксономического статуса яка относительно родовой и видовой принадлежности в базе данных NCBI в разделе «Таксономия» дикий як отнесен к *Bos mutus* (Przewalski, 1883), но имеет синонимичные наименования *Bos grunniens mutus* и *Poephagus mutus* [NCBI:id=72004].

### 1.1.2. Происхождение и domestикация яка

Согласно ископаемым данным, предок дикого яка был широко распространен в северо-восточной части Евразии в поздний третичный период (2,5 миллиона лет назад). Он является предшественником дикого яка, найденного в виде плейстоценовых окаменелостей в северном Китае, Внутренней Монголии (Китай), Восточной Сибири, северной части Средней Азии и на линии, соединяющей эти районы [Dyblor, 1957; Belyar, 1980; Flerow, 1980; Olsen, 1991]. Известно, что Гималаи поднялись до высоты более 4500 м лишь в позднем плейстоцене. Их рост затруднял прохождение теплого и влажного воздушного потока с юга, тем самым значительно меняя климат будущего Цинхай-Тибетского нагорья. В результате леса сменились альпийскими лугами, а дикий як мигрировал из северо-восточной Евразии и адаптировался к жизни на Тибетском плато [Wiener, 2003].

Предок современного дикого яка обитал на территории Китая, Непала, Сибири, Монголии и Аляски [Liu, 2007]. По-видимому, дикий як обитал в Сибири, Монголии и Казахстане до XIII-XVIII веков [Buzzard, Berger 2016; Shi, 2016]. В настоящее время дикие яки в основном встречаются в северо-западной и юго-западной частях Китая [Feng, 1986; Schaller, Liu, 1996; Shi, 2016] (рис. 1).

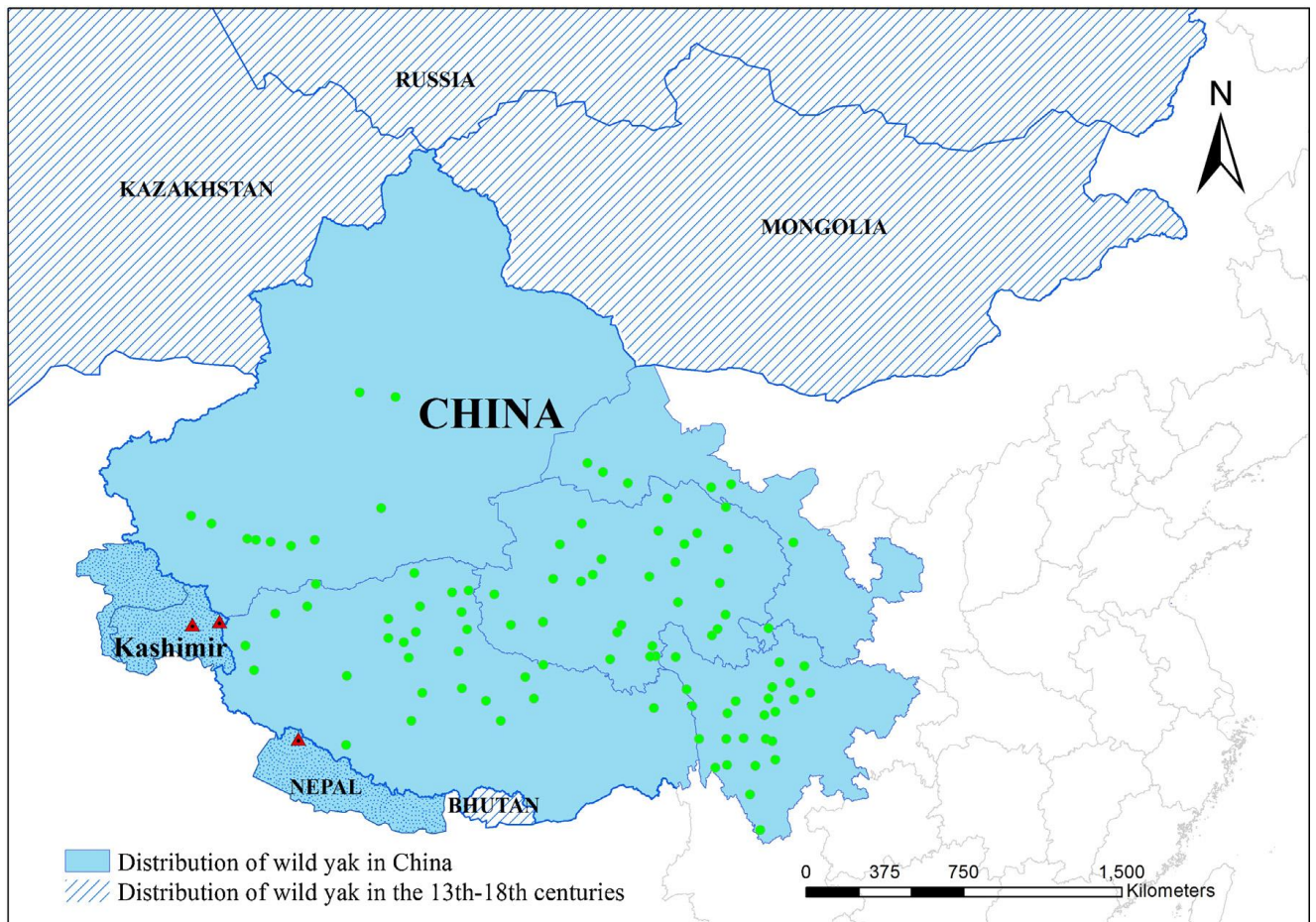


Рисунок 1. Распространение дикого яка [Shi, 2016]. Область голубого цвета – современный ареал дикого яка; Область заштрихованная – ареал дикого яка в XIII-XVIII вв.

Согласно сообщениям, к настоящему времени дикий як проник в северный Непал и порой встречается в области Ладакх в Индии [Fox, 1991; Miller, 1994].

Оценка генетического разнообразия современных популяций указывает на то, что одоместикация яка произошла на Цинхай-Тибетском нагорье [Wiener, 2003; Guo, 2006]. Время одомашнивания оценивается в пределах 10 тысяч лет тому назад. Однако после расшифровки полного генома яка эта дата была скорректирована до 7,3 тысяч лет тому назад [Qiu, 2015]. Не исключено также, что одоместикация могла произойти дважды [Guo, 2006]. Период одомашнивания 7,3 тысяч лет назад вполне соответствует времени расселения человека на Цинхай-Тибетском нагорье [Sanchez-Mazas, 2008; Qiu, 2015].

После одоместикации яка на территории Восточного Цинхай-Тибетского нагорья, последовали его миграции на запад через Гималаи и горные хребты

Кунылуны и на север через горы Южного Гоби и Алтайского Гоби в Монголию и Сибирь.

### 1.1.3. Распространение *Bos grunniens*

В настоящее время в мире насчитывается около 14 миллионов голов одомашненного яка. Наибольшая численность яка отмечена в Китае – 92% всего поголовья. На втором месте по численности поголовья – Монголия и Россия. Яков также разводят в Непале, Индии, Бутане, Киргизии, Казахстане, Пакистане, Афганистане, Таджикистане [Dorji, 2000; Fang, 2009; Gerald, 2003; Liu, Long, 2009; Zhang, 2009; Guo, 2006; Lu, 2007], в последние годы яков разводят на Аляске (США) и в Канаде [Goe, Stranzinger, 2002; Lu, 2007].

В Китае официально выделяют 12 пород яка: Jiulong и Maiwa (провинция Сычуань), Tianzhu White и Gannan (Ганьсу), Pali, Jiali (“Alpine”) и Sibü (Тибет), Huanhu и Plateau (Цинхай), Bazhou (Синьцзян) и Zhongdian (провинция Юньнань), а также “Long-hair-forehead yak” (Цинхай), которая не классифицирована, однако, отвечает всем критериям, используемым для определения породы яков. Кроме этого, путем гибридизации одомашненного и дикого яков выведена порода Datong, которая не обладает официальным статусом породы в связи с ограниченным количеством особей [Wiener, 2003].

В России яков разводят, главным образом, в Туве, а также на Алтае, в Бурятии и на Северном Кавказе. После резкого сокращения численности яка в России в конце XX в. (рис. 2) [Столповский и др., 2013], сегодня наблюдается существенный рост поголовья, например в республике Тува с 6.5 тыс. до 10 тыс. в 2015 г. [Кан-оол, 2016].

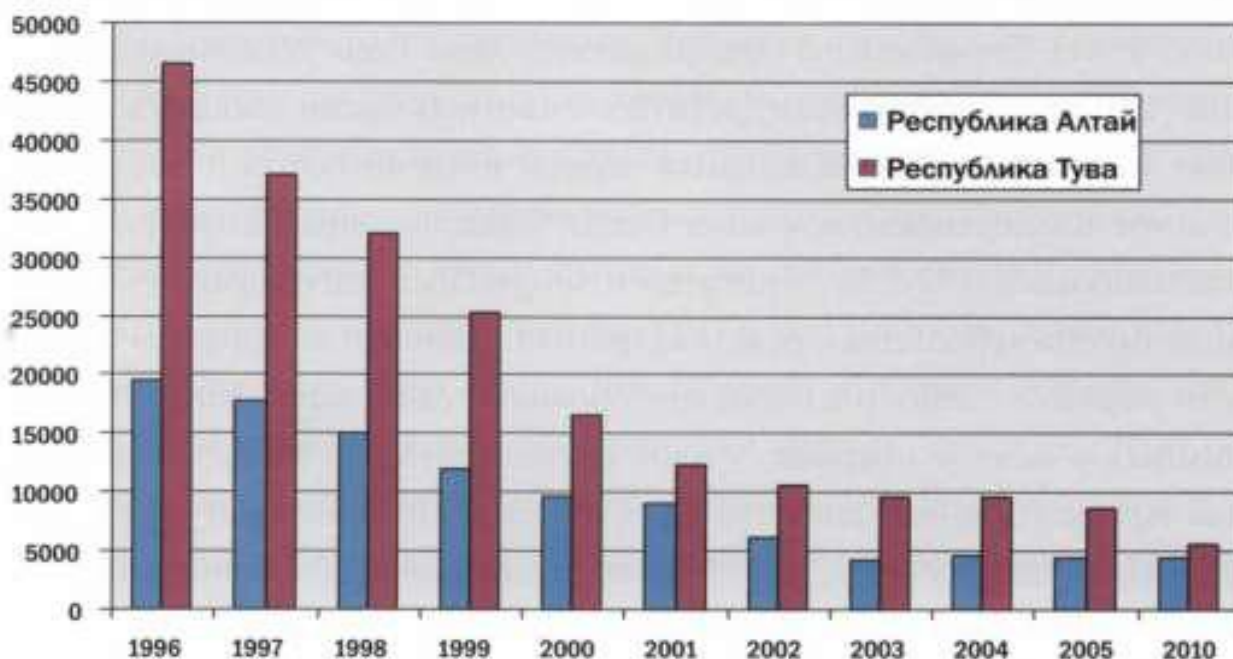


Рисунок 2. Динамика численности яка за период с 1996 по 2010 годы. [Столповский и др., 2013].

На территории России в Туве разводят породу сарлык (рис. 3, 4), а в Бурятии – окинскую породу (рис. 5). Описание пород представлено в табл.1 [Породы животных, 2015]. Яков из других стран обычно могут называть по местности, где их разводят, но в породы, как правило, не выделяют.



Рисунок 3. Як *Bos grunniens*. Порода сарлык. Самка с теленком.

<https://www.tuvaonline.ru/2015/04/30/produkciya-iz-moloka-i-myasa-sarlykov-na-rynke-sayzyral.html>





Рисунок 4. Як *Bos grunniens*. Порода сарлык. Самец.

<http://etosibir.ru/yak-sarly-k-mongun-tajginskij-rajon-respublika-ty-va-foto-herel-ochur/>



Рисунок 5. Як *Bos grunniens*. Окинская порода.

<https://burniish.ru/the-structure/departement-of-animal-husbandry-and-innovative-technologies/yak-breed-Okinskaya/>



Таблица 1. Характеристика пород яка в Российской Федерации

| Порода                                                                        | Характеристика                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|-------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p><b>Сарлык</b><br/>9811479<br/>включена<br/>в Госреестр<br/>в 2002 г.</p>   | <p>Одомашненная форма народной селекции. Разводится в Республике Тыва. По данным оригинатора, конституция животных крепкая. Голова массивная с высоким выпуклым лбом. Рога длинные, широко расставленные. Затылочный гребень толстый, выпуклый. Нос горбатый в переносице. Ухо округлое, коническое, небольшое. Верхняя губа тонкая, подвижная. Холка высокая, заостренная, в виде горба. Грудь широкая, глубокая. Спина крепкая, широкая. Круп короткий, широкий в маклоках, сужается в седалищных буграх. Конечности короткие, сухие, с подвижными суставами. Копыта имеют подковообразное роговое образование. Вымя небольшое. Хвост пышный, покрыт длинным волосом. Волосняной покров остью, переходный и пуховой, отличается теплоизоляционными свойствами. Масть белая, черная или пестрая. Разводят для получения мяса и молока. Кроме того, используют кожу, шерсть и пух. Животные приспособлены к суровому климату высокогорья и к использованию природных кормовых угодий</p> |
| <p><b>Окинская</b><br/>8755502<br/>Включена<br/>в Госреестр<br/>в 2013 г.</p> | <p>Создана методом отбора и подбора животных желательного типа при чистопородном разведении. По данным оригинатора, животные отличаются высокой приспособленностью к суровым природно-климатическим условиям региона разведения. Это универсальные животные, от них получают мясо, молоко, шерсть, кожу, а также используют как рабочий скот. Живая масса яка-производителя большая, ячхи - средняя. Голова средней длины, профиль прямой, рога отсутствуют. Лоб средней ширины. Затылочный гребень прямой. Шея с верхним вырезом. Высота в холке средняя. Ширина и глубина груди средняя. Туловище средней длины. Густота волос бахромы средняя. Кожа средней толщины. Обхват пясти средний. Основная окраска туловища черная. Имеется дополнительная окраска</p>                                                                                                                                                                                                                       |

[Породы животных. Госреестр селекционных достижений, допущенных к использованию. 2015. Том 2]

## 1.2. Исследования *Bos grunniens* с использованием генетических маркеров

Изучение *Bos grunniens* вызывает большой интерес во всем мире: проводятся исследования генетического разнообразия, дифференциации популяций, геногеографии, филогенетических связей между популяциями и систематического положения яка. Для решения этих задач в разное время исследователи использовали различные методические подходы.

Ранее работы, посвященные изучению межпопуляционных и межпородных связей, основывались на применении метода полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP). Так, была показана низкая степень генетической дифференциации 5 пород яка Цинхай-Тибетского нагорья [Tu, 1998].

На основе анализа AFLP (полиморфизм длин амплифицированных фрагментов) описана филогения яка в составе подсемейства Бычьи (Bovinae) [Buntjer, 2002].

На основе VNTR (тандемные повторы с переменной копийностью или локус с варьирующим числом тандемных повторов) показано сходство бизона, яка и зубра [Nijman, Lenstra, 2001].

На основе SSCP метода (анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма) в китайской популяции яка был обнаружен полиморфизм гена молочного белка CSN3. В ходе более детального анализа было показано, что нуклеотидные последовательности гена идентичны таковым зубра, что дало основание предполагать общие предковые корни [Prinzenberg, 2002].

Научным коллективом лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен РАН исследованы гибриды яка с крупным рогатым скотом. Анализ спектра межмикросателлитных повторов (ISSR) в популяциях яка и гибридов F1 по (AG)<sub>9</sub>C и (GA)<sub>9</sub>C маркерам выявил видоспецифичный для яка паттерн из восьми ISSR-фрагментов [Столповский и др. 2014].

На основе микросателлитного анализа был изучен аллелофонд яков и их гибридов с крупным рогатым скотом *Bos taurus*. Установлено высокое

генетическое разнообразие для гибридов F1 в сравнении с исходными видами [Аль-Кейси, 2011].

### 1.2.1. Филогенетические исследования яка на основе мтДНК

Гаплоидная ДНК митохондрий наследуется по материнской линии, не рекомбинирует и имеет высокую скорость мутации, поэтому является хорошим маркером в исследовании филогении. Темп эволюции при этом достаточно высокий –  $4,7 \times 10^{-8}$  замен на сайт в год у млекопитающих [Bailey, 2002]. Изучение полиморфизма наиболее изменчивой области митохондриального генома – D-петли широко применяется в популяционных исследованиях животных.

D-петля – некодирующий фрагмент митохондриальной ДНК между генами тРНК пролина и фенилаланина, вовлечённый в контроль репликации и транскрипции. Она эволюционирует в 5 раз быстрее остальной митохондриальной ДНК. Именно D-петля использовалась в качестве маркера в большинстве исследований филогении яка [Bailey, 2002].

Секвенированы полные митохондриальные геномы дикого яка [Zhong, 2015; Liang, 2016b] и многих популяций и пород одомашненного яка [Bao, 2016; Chu, 2014; Е, 2016; Guo, 2016; Wu, 2016a; Wu, 2016b]. Полный размер митохондриального генома составляет 16324 п.н., с нуклеотидным составом 33.72% А, 27.25% Т, 25.28% С и 13.20% G. Он содержит 13 белок-кодирующих генов, 22 tRNA гена, 2 гена rRNA и 1 некодирующий регион (D-петля). В частности, определён размер D-петли – 891 – 894 п.н.

Исследование цитохрома b и D-петли митохондриальной ДНК одомашненного яка выявило две гаплогруппы, которые дивергировали по крайней мере 100 000 лет назад [Guo, 2006; Lai, 2007]. Гаплотипы, характерные для обеих групп были найдены в одной небольшой популяции китайского яка.

Это указывает на то, что домашние яки, вероятно, имеют происхождение от одного дикого предка [Wang, 2010].

Для одомашненного яка, как и для некоторых других домашних копытных (крупного рогатого скота, овцы, свиньи, азиатского буйвола) характерно наличие двух основных линий D-петли митохондриальной ДНК. Данная картина наблюдается в различных исследованиях китайских популяций яка [Guo, 2006; Lai, 20017; Wang, 2010]. Аналогичные результаты показаны для диких яков на малой выборке (n=21) [Ma, 2010].

Исследование популяций яка разных стран (Бутан, Непал, Индия, Пакистан, Кыргызстан, Монголия и Россия) выявило 123 гаплотипа, которые можно разделить на 3 дивергентных линии (рис. 6, I, II, и III) [Wang, 2010].

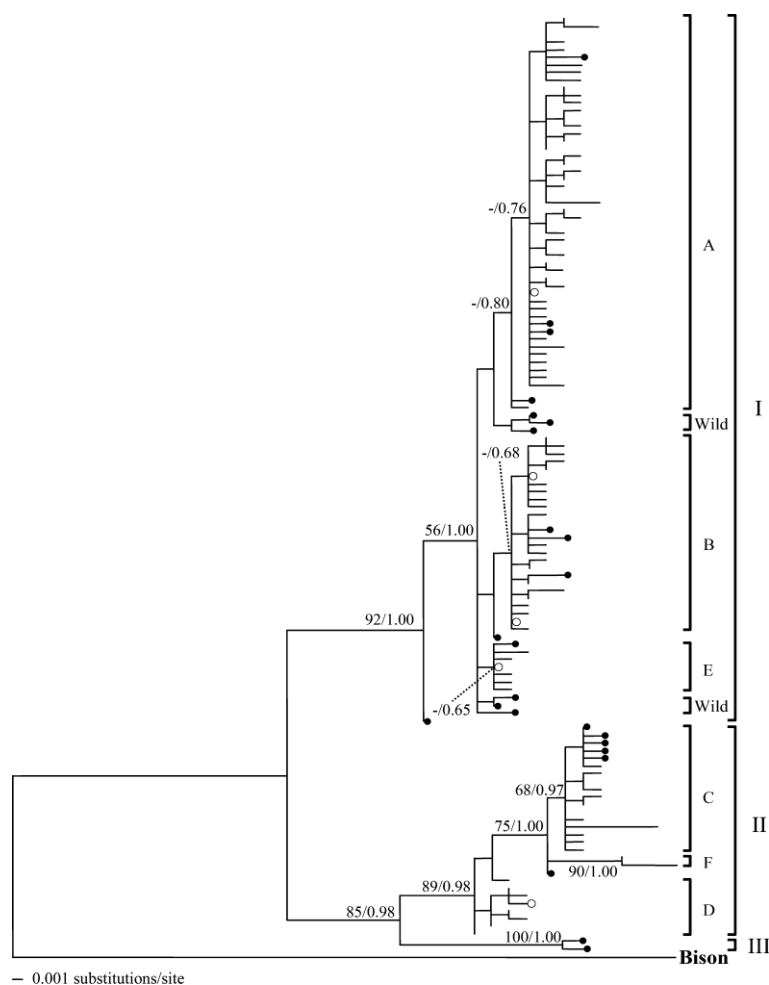


Рисунок 6. Филогенетическое дерево гаплотипов D-петли диких и одомашненных яков (*Bos grunniens*) с запада Китая (метод максимального правдоподобия) [Wang, 2010].

Третья дивергентная линия включала в себя два гаплотипа, встречающиеся у диких яков. Однако, более весомых доказательств в пользу существования третьей дивергентной линии в источниках не встречено.

Согласно расчетам, две обнаруженные линии разошлись около 131 000 – 109 000 лет назад (в зависимости от использованной модели изменения численности популяции) [Guo, 2006].

На основании данных полной митохондриальной ДНК, а не только D-петли, называют другие цифры: около 420 000 лет назад разделились две главные линии, а третья отделилась от них 580 000 лет назад (рис. 7) [Wang, 2010].

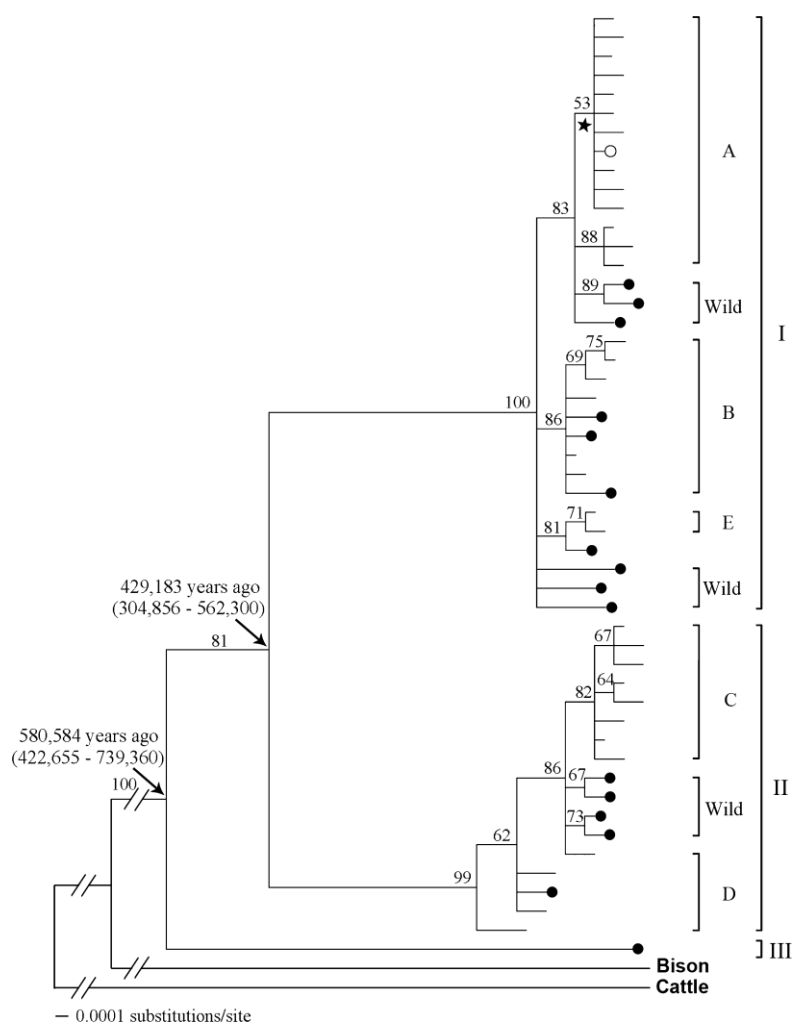


Рисунок 7. Дерево максимального правдоподобия для белок-кодирующих последовательностей митохондриального генома яков (*Bos grunniens*), бизона (*Bison bison*) и крупного рогатого скота (*Bos indicus*) [Wang, 2010].

В любом случае, приведенные выше данные говорят о том, что существующие ныне линии разделились задолго до одомашнивания яка, на что дополнительно указывает обнаружение данных гаплогрупп в дикой популяции.

Предложено два возможных объяснения наличия давно разделившихся линий. Первое предполагает очень высокую численность предковой популяции диких яков, от которых и произошли все современные дикие и домашние яки – 98 000 [Wang, 2010] или 300 000 [Guo, 2006] самок. Вторая версия – разделение предковой популяции ледником во время оледенения, в течение которого накапливались различия митохондриальной ДНК, и последующее объединение в одну популяцию в межледниковье [Guo, 2006; Wang, 2010].

Внутри двух основных клад выделяют несколько гаплогрупп А, В, С, D, Е. В работах, где выборка включала последовательности как одомашненных, так и диких яков, показано, что гаплотипы диких яков так же относятся к этим гаплогруппам [Wang, 2010; Guo, 2016].

В отличие от крупного рогатого скота, овец и других домашних копытных между гаплогруппами и породами (или географическим распределением популяций) не обнаружено связи, несмотря на то, что морфологические различия между породами присутствуют [Bailey, 2002; Guo, 2006; Wang, 2010]. Даже популяция Jinchuan, отличающаяся от прочих наличием дополнительной пары рёбер, не выделяется на филогенетическом древе [Miram, 2012]. Судя по всему, морфологические различия пород сформировались позже разделения клад.

Существует предположение, что гаплотипические клады сформировались ещё до одомашнивания [Guo, 2006]. Отсутствие связи с географическим распределением можно объяснить тем, что як используется в качестве транспортного животного и, следовательно, перемещается на большие расстояния, что размывает географические границы [Bailey, 2002].

Установлено, что среднее разнообразие гаплотипов у одомашненного яка ниже по сравнению с диким [Wang, 2010]. Ожидалось, что у одомашненных яков ближе к центру происхождения (в Китае и Тибете) разнообразие гаплотипов должно быть выше, однако, исследования показали приблизительно одинаковый

уровень во всех исследованных регионах. Предполагают, что это является следствием потока генов между популяциями после доместикации. Общее число гаплотипов и уникальных для региона гаплотипов, тем не менее, в этих регионах всё же выше [Guo, 2006; Wang, 2010]. Уровень нуклеотидного разнообразия домашнего яка сопоставим с европейскими породами крупного рогатого скота [Bailey, 2002].

Время одомашнивания оценивается в пределах 10000 лет. Есть предположение, что имели место два события доместикации, так как некоторые клады по митохондриальной ДНК распространились среди домашних яков раньше других клад. В любом случае, все одомашненные яки происходят из одного пула генов [Guo, 2006].

Предполагают, что одомашнивание яка привело к экспоненциальному росту его численности. На это указывают значимые значения  $F_u$ 's  $F_s$  теста [Guo, 2006] и характерная звездообразная картина распределения гаплотипов в пределах крупных клад: один наиболее распространённый гаплотип, окружённый множеством произошедших от него редких гаплотипов [Guo, 2006; Wang, 2010].

### 1.2.2. Генетический полиморфизм на основе микросателлитных локусов

В настоящее время во всем мире широко изучаются местные популяции яка на основе различных генетических маркеров. Последние два десятилетия популярными маркерами для популяционно-генетических исследований животных являются микросателлиты (microsatellites, SSRs) – последовательности, состоящие из большого количества коротких повторов и отличающиеся высоким уровнем аллельного полиморфизма. Микросателлиты, вне зависимости от вида, могут сохранять свои свойства высокополиморфных генетических маркеров. Частота мутаций (проскальзывания цепи ДНК при репликации) невелика – около  $10^{-4}$  –  $10^{-5}$ , что делает использование микросателлитных маркеров достаточно надёжным. Ещё одно достоинство микросателлитных маркеров – кодоминантность [Ashley, Dow, 1994].

Межвидовая амплификация 136 микросателлитных маркеров коровы показала высокую эффективность их применения для яка [Groeneveld, 2010]. Некоторые из данных маркеров были включены в список маркеров для изучения яка, рекомендованных ISAG/FAO [Food and Agriculture Organization of the United Nations <http://www.fao.org/docrep/006/ad347e/ad347e0y.html>].

В настоящее время на основе микросателлитного анализа наиболее полно исследованы популяции яка Китая и Тибетского нагорья [Minqiang, 2003; Xuebin, 2005; Zhong, 2006; Mao, 2007; Zhang, 2008; Mao, 2008; Li, 2013; Cai, 2014]. Исследованы популяции яка Бутана [Dorji, 2000], Швейцарии [Nguyen, 2005], Индии [Ramesha, 2012] и Монголии [Xuebin, 2005].

Создана библиотека микросателлитных маркеров для яка, всего выделено 298 микросателлитных локусов специфичных для яка. Данные локусы высокополиморфны и дают надёжную информацию о генетическом разнообразии [Li, 2004]. Однако в большинстве работ используются микросателлитные маркеры для КРС (*Bos taurus*), что не сказывается на наблюдаемом уровне генетического



полиморфизма, и анализ получается достаточно информативным [Xuebin, 2005; Zhang, 2008; Qi, 2010].

На данный момент с использованием микросателлитных маркеров исследованы популяции домашнего яка в Китае, Монголии, Бурятии [Xuebin, 2005; Zhang, 2008]. В первой из упомянутых работ были изучены монгольские популяции домашнего яка из пяти регионов (Хубсугул, Увс, Говь-Алтай, северный Хангай, Южный Гоби), а также популяция из Бурятии. Второе исследование было проведено на китайских яках девяти пород: Maiwa, Tianzhu White, Qinghai Plateau, Sibü, Zhongdian, Pali, Tibetan High Mountain, Jiulong и Xinjiang.

Как китайские, так и монгольские и бурятские популяции генетически различаются, на что указывают низкие, но значимые индексы  $F_{ST}$ . При этом уровень генетического разнообразия внутри популяций выше, чем между популяциями. Наибольшее генетическое разнообразие наблюдается у китайских пород. Однако даже самые далёкие от популяции Лхари (Jiali) с Цинхай-Тибетского нагорья монгольские и бурятские популяции демонстрируют сходный с ней уровень изменчивости, при этом поток генов между популяцией Лхари и остальными крайне низкий из-за географической удалённости. Поэтому предполагается, что монгольские и российские популяции произошли от популяции с большой эффективной численностью. Также не обнаружено эффекта бутылочного горлышка в недавнем прошлом монгольских и бурятских яков [Xuebin, 2005; Zhang, 2008].

Подробно охарактеризованы некоторые породы китайских яков. В частности, наибольшим генетическим разнообразием среди изученных пород отличается порода Zhongdian. Среди представителей породы Tianzhu наблюдается инбридинг вследствие селекции на белый окрас [Zhang, 2008].

Китайские породы, монгольские и бурятские популяции яка разделились относительно недавно, на что указывают низкие значения  $F_{ST}$  и отсутствие корреляции между географическим и генетическим расстояниями [Xuebin, 2005; Zhang, 2008].

Эта особенность отличает домашнего яка от других сельскохозяйственных животных – крупного рогатого скота, коз, свиней, для которых характерны более высокие средние значения  $F_{ST}$  и, следовательно, бóльшие генетические различия между породами [Хуебин, 2005].

Таким образом, имеющиеся данные говорят о высоком генетическом разнообразии одомашненного яка. По-видимому, современные популяции яка произошли от предковой популяции с большой эффективной численностью, а само разделение на породы и локальные популяции произошло относительно недавно по сравнению с крупным рогатым скотом и другими сельскохозяйственными животными.

### 1.2.3. Молекулярно-генетические основы адаптации яка к условиям высокогорья

Як *Bos grunniens* является уникальным domesticiрованным животным, дикая форма которого обитает, в том числе на территории Цинхай-Тибетского нагорья на рекордной высоте – 2500-6000 м над уровнем моря. Благодаря высокой степени адаптации к высокогорью, як может рассматриваться в качестве модельного объекта для понимания молекулярных основ адаптации к высотной гипоксии.

По сравнению с другими представителями рода *Bos* для яка характерны следующие физиологические особенности, связанные с адаптацией к гипоксии: больше красных кровяных клеток, повышенное содержание гемоглобина в крови, более развитая гладкая мускулатура в артериях легких [Li, 2006; Ma, 2011]. Помимо этого, клетки легочных артерий яка намного длиннее, шире и круглее [Wang, 2006].

Геномное сравнение яка и крупного рогатого скота выявило гены-кандидаты, которые могут играть ключевую роль в высотной адаптации яка. Данные гены кодируют белки, участвующие в сигнальном пути, активируемом в ответ на гипоксию (HIF signalling pathway) [Qiu, 2012].

Одним из важнейших генов данного сигнального пути является *VEGF-A* (Vascular endothelial growth factor-A) - фактор роста эндотелия сосудов. *VEGF-A* относится к семейству *VEGF*, которое также включает *VEGF-B*, *VEGF-C*, *VEGF-D*, *VEGF-E* и фактор плацентарного роста [Clauss, 2000]. Он был впервые идентифицирован в ходе изучения в фолликулярных клетках гипофиза гепарин-связывающего фактора, специфичного для сосудистых эндотелиальных клеток [Ferrara, Henzel, 1989]. *VEGF-A* участвует в таких процессах, как ангиогенез, васкулогенез и деление сосудистых эндотелиальных клеток, а также играет существенную роль при таких заболеваниях, как рак и диабет [Greb, 1999; Ferrara, 2003; Shibuya and Claesson-Welsh, 2006; Stringer, 2006; Thangarajaha, 2009].

Гипоксия тканей может регулировать ряд локальных факторов, которые способствуют ангиогенезу и росту новых капиллярных сосудов, которые увеличивают доставку как кислородных, так и энергетических субстратов, таких как глюкоза. Недавние исследования показали, что *VEGF-A* может играть важную роль в ответе на гипоксию. *VEGF-A* представляет собой ген, индуцированный гипоксией, продукт которого стимулирует формирование новых кровяных телец и повышает проницаемость кровеносных сосудов [Beall, 2007; Nagy, 2008; Кирова, 2016]. Гипоксия вызывает экспрессию *VEGF-A*, а также его рецепторов в человеческих клетках-эндотелиях и опухолях [Ferrara, 2003]. У людей *VEGF-A* увеличивает проницаемость сосудов в опухолях головного мозга [Machein, 1999] и участвует в патогенезе высокогорного отека головного мозга [Xu, Severinghaus, 1998]. У крыс экспрессия *VEGF-A* повышается в течение первой недели гипоксии мозга [Christou, 1998]. Гипоксия-индуцированная экспрессия *VEGF-A* и генов рецепторов его белкового продукта наблюдалась в легких крыс [Marti, 1998]. *VEGF-A* обеспечивает мощный митогенез сосудистых эндотелиальных клеток и клеток гладкой мускулатуры. Он может активировать синтазу оксида азота, что приводит к повышению уровня продукции оксида азота [Miquerol, 2000]. Оксид азота в свою очередь расслабляет кровеносные сосуды и увеличивает скорость кровотока, предотвращая легочную гипертензию [Kroll, Waltenberger, 1998].

Все эти данные свидетельствуют о том, что *VEGF-A* может быть геном-кандидатом для адаптации на высотах. *VEGF-A* является ключевым регулятором васкулогенеза, ангиогенеза, и, весьма вероятно, выполняет важную роль в адаптации к условиям высокогорья.

Коллективом авторов [Wu, 2013] выявлены SNPs в позициях *g.8430T>C* в 4 интроне гена *VEGF-A* и *g.14853G>A* в 3'-нетранслируемой области гена *VEGF-A*, ассоциированные с адаптацией у яков, обитающих на разных высотах Цинхай-Тибетского нагорья. Была показана тенденция увеличения частоты SNP *g.14853G>A* у пород яка, обитающих в высокогорье.

По сообщениям [Verma, 2018], HIF-путь и его регуляторные гены *VEGF-A*, *EPAS-1*, *NOS2*, *ECE-1*, *GLUT-1* и *HK2* на большой высоте являются важнейшими

компонентами адаптации крупного рогатого скота в Ладаха (Индия). Предполагается, что эти гены имеют решающее значение для поддержания клеточного гомеостаза у крупного рогатого скота, обитающего на большой высоте.

Исследование изменений в анатомической и микроскопической структуре сердца яка показало, что белки *HIF-1 $\alpha$*  и *VEGF* играют активную роль в физиологической адаптации в ответ на гипоксию и развитии сердца у яков [He, 2016].

*EPAS-1* (Endothelial PAS domain protein 1), также известный как *HIF-2 $\alpha$*  (Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ ), принадлежит HIF пути и играет главную роль в ответе на гипоксию [Qing, Simon, 2009]. *EPAS-1* вовлечен в процессы эритропоэза, гомеостаза железа, легочной гипертензии и сосудистой проницаемости [Maxwell, 2005; Van Patot, Gassmann, 2011]. Показано, что *EPAS-1* является мишенью отбора; были обнаружены варианты этого гена, которые связаны с различиями в концентрации гемоглобина у жителей Тибета [Beall, 2010, Xu, 2011]. При изучении тибетских мастифов и коренных собак, живущих на больших высотах, выявлено, что *EPAS-1* подвержен селективному отбору [Li, 2014; Gou, 2014]. Полиморфизм гена *EPAS-1* и его связь с гематологическими параметрами яка представлен в работе китайских авторов [Wu, 2015]. Анализ секвенированного фрагмента *EPAS-1* в тканях легких, где был выявлен наибольший уровень экспрессии этого гена, показал наличие 3 видов SNP в 8 интроне гена *EPAS-1*. В ходе сопоставления обнаруженных SNP с гематологическими параметрами в образцах (количество эритроцитов и содержание гемоглобина) была показана ассоциация каждого вида SNP с концентрацией гемоглобина.

Следы отбора обнаружены в генах регуляторов фактора *HIF-1 $\alpha$*  и его мишени [Qiu, 2012]. Возможно, адаптивное значение также имеет наличие у яка трёх вариантов лактатдегидрогеназы-1 по сравнению с одним вариантом у крупного рогатого скота [Kuang, 2010].

Гипоксия является не единственным агрессивным фактором в высокогорье. Так, у диких яков, обитающих на разной высоте, выявлена вариабельность в генах, связанных с иммунной защитой [Zhang, 2016]. Исследованы семейства генов Toll-подобных рецепторов [Lan, 2016] и МНС [Ge, 2016].

Показано, что состав молока различается у яков, обитающих на разной высоте: с увеличением высоты увеличиваются пищевая ценность молока и содержание жиров, и уменьшается содержание белка [Cui, 2016].

Таким образом, в процессе длительной эволюции в геноме яка отбирались генетические детерминанты механизма адаптации к условиям высокогорья. В связи с этим человечество стремилось получить гибриды яка и домашнего скота в целях повышения выносливости последнего. В сообщении Chen, [2018] показана историческая интрогрессия, в ходе которой домашний скот из южного Китая и Тибетского плато быстро достиг необходимого уровня адаптации, приобретая ~ 2.93% и ~ 1.22% геномов бантенга и яка, соответственно.

Более подвержены гибридизации с крупным рогатым скотом яки, обитающие на сравнительно небольшой высоте – в частности, порода Tianzhu [Yue, 2016].

Известны гибриды яка с крупным рогатым скотом *Bos taurus* и *Bos indicus* (зебу). Они крупнее, дают больше молока и лучше переносят более тёплый климат на меньшей высоте, чем яки. Среди гибридов F<sub>1</sub> самцы стерильны, но самки плодовиты, а через несколько поколений фертильность самцов восстанавливается [Qi, 2010]. Таким образом, интрогрессия крупного рогатого скота возможна. Частота интрогрессии по митохондриальным и микросателлитным маркерам в китайских популяциях яка оценивается в пределах 4-21% в зависимости от региона [Qi, 2010]. У домашних яков Монголии около 1,3% генома происходит от *Bos taurus*, в частности, у них обнаружена приобретённая от местной породы крупного рогатого скота мутация, связанная с комолостью [Medugorac, 2017]. Выявлен регион генома, связанный с комолостью, хотя конкретный ген установить не удалось. Предполагают, что этот признак определяется изменениями в экспрессии, а не в структуре белка [Liang, 2016a].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены в лаборатории сравнительной генетики животных Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН с 2015 по 2018 годы. На базе лаборатории осуществлялось выделение тотальной ДНК, амплификация исследуемых фрагментов, анализ полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, электрофоретическое разделение ПЦР-фрагментов в агарозном геле и очистка ПЦР-продуктов, статистическая обработка данных и анализ полученных результатов. Секвенирование нуклеотидных последовательностей проведено в ЗАО «Евроген». Амплификация микросателлитных локусов и фрагментный анализ проводились в ООО «Гордиз».

### 2.1. Характеристика выборок

Экспериментальный материал для молекулярно-генетических исследований был получен в ходе экспедиций сотрудников лаборатории сравнительной генетики животных Института общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН с 2008 по 2018 годы в Саяно-Алтайский регион России и Монголии.

Сбор крови проводился из ярёмной вены животных. Образцы крови, стабилизированные ЭДТА, хранили при температуре  $-20^{\circ}\text{C}$  до момента использования.

Исследуемая выборка включает четыре географические популяции: Тува, Алтай, Бурятия и Монголия (рис. 8).

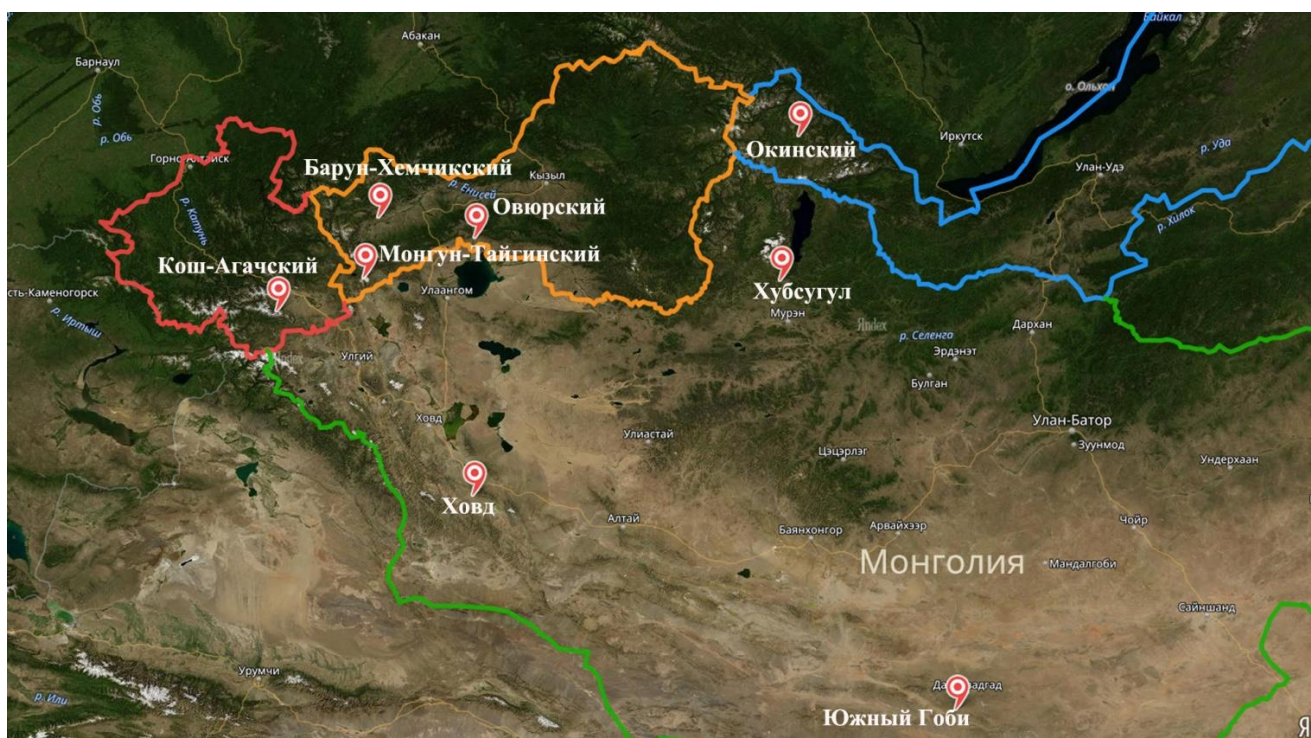


Рисунок 8. Районы исследования на карте России и Монголии.

Примечание. Красной линией обозначена территория республики Алтай, желтой линией – республики Тува, синей – республики Бурятия. Границы Монголии, не примыкающие к территории России, показаны зеленым цветом.

На территории Тувы сбор образцов проводился в яководческих хозяйствах в следующих высокогорных районах: в Монгун-Тайгинском (в 3 хозяйствах), в Овюрском (1), в Барун-Хемчикском (1). В республике Алтай проведен сбор в Кош-Агачском районе (1 хозяйство), в республике Бурятия в Окинском районе (1).

На территории Монголии образцы собраны в аймаках Хубсугул (1), Ховд (1) и Южный Гоби (1). Несмотря на то, что территория Южного Гоби Монголии не входит в зону Саяно-Алтайского региона, в целях более полного сравнительного анализа в исследование была привлечена выборка (Южный Гоби) с данной территории. В результате исследовано 504 особей из 10 выборок (яководческих хозяйств) (табл. 2).



Таблица 2. Характеристика исследованных выборок

| Регион   | Выборка     | Район             | Кол-во особей |
|----------|-------------|-------------------|---------------|
| Тува     | Арыг-Хем    | Барун-Хемчикский  | 60            |
|          | Адарган     | Овюрский          | 58            |
|          | Сайзырал    | Монгун-Тайгинский | 69            |
|          | Малчын      | Монгун-Тайгинский | 59            |
|          | Моген-Бурен | Монгун-Тайгинский | 58            |
| Алтай    | Алтай       | Кош-Агачский      | 34            |
| Бурятия  | Бурятия     | Окинский          | 46            |
| Монголия | Южный Гоби  | Южный Гоби        | 43            |
|          | Хубсугул    | Хубсугул          | 28            |
|          | Ховд        | Ховд              | 49            |
| Всего    |             |                   | 504           |

Примечание. Под выборкой понимаются особи из одного яководческого хозяйства.

Монгун-Тайгинский район находится на юго-западе Тувы, граничит с Овюрским, Бай-Тайгинским районами, а также с Алтайским краем и Монголией. Это высокогорный и труднодоступный район, окружен высокими горными хребтами со снежниками. Высота над уровнем моря составляет 3970 м, абсолютная нижняя отметка высоты превышает 2,5 тыс. м. Климат характеризуется экстремально низкими температурами – зима продолжительная, с октября по май, средняя температура в январе  $-29^{\circ}\text{C}$ . Зимой метели, высота снежного покрова достигает более полуметра. Лето очень холодное и короткое, средняя температура в июле  $+13^{\circ}\text{C}$ , часто выпадает снег. Лето, весна и осень в совокупности длятся не более 4 месяцев. В связи с этим Монгун-Тайгинский район приравнен к районам Крайнего Севера. На территории расположены многолетнемерзлые породы, тундра и луга высокогорного пояса. Основой экономики района является сарлыководство (яководство) и овцеводство.

Овюрский район расположен на юге республики и отделен хребтами Западный Танну-Ола, Восточный Танну-Ола, и является частью Убсу-Нурской котловины. Площадь территории – 4,4 тыс. км<sup>2</sup>. Средняя температура в январе – 31<sup>0</sup>С. Температурный минимум –49<sup>0</sup>С. Летом сухо, средняя температура +16,5<sup>0</sup>С, максимальная +34,2<sup>0</sup>С. Горный рельеф района определяет его главное производственное направление – животноводство.

Барун-Хемчикский район площадью 6300 км<sup>2</sup> на западе Тувы характеризуется резко континентальным климатом. Так, зимний температурный минимум –51<sup>0</sup>С, а летний максимум +37<sup>0</sup>С. Зима длится 180 дней, при этом в котловине скапливается холодный воздух, который влечёт за собой ещё большее выхолаживание. Лето жаркое и сухое. В связи с высокой вероятностью заморозков, резкими перепадами температур и малым количеством осадков данный район является зоной рискованного земледелия. Развито животноводство, главным образом преобладает овцеводство.

Кош-Агачский район площадью 19 845 км<sup>2</sup> расположен на юге Республики Алтай и является самым крупным. Он граничит с Улаганским, Усть-Коксинским, Онгудайским районами Алтая, а также с Монгун-Тайгинским районом Тувы, с Китаем, Монголией и Казахстаном. Кош-Агач приравнен к местностям Крайнего Севера. Среднегодовая температура воздуха -6<sup>0</sup>С, при этом резко-континентальный климат определяет малое количество осадков (до 250 мм в год) и резкие перепады температур в течение суток. В районе развито в основном мясное скотоводство.

Окинский район площадью 26 594 км<sup>2</sup> расположен на западе республики Бурятия. Поскольку климат здесь резко континентальный, зима продолжительная и малоснежная, район приравнен к районам Крайнего Севера. Окинский район расположен на западе республики в горной гряде Восточных Саян, на севере прилегает к Иркутской области, на западе примыкает к Тоджинскому району Тувы, на юго-западе граничит с Монголией. Рельеф резко расчленен, высота колеблется в пределах 700-3400 м над уровнем моря. В районе развито мясное скотоводство.

Хубсугульский аймак расположен на севере Монголии и граничит с Тувой. Площадь данного аймака составляет 100 600 км<sup>2</sup>. Климат резко континентальный, зимы малоснежные и суровые, средняя температура -28<sup>0</sup>С. Главной отраслью аймака является животноводство.

Ховд расположен на западе Монголии, граничит с Синьцзян-Уйгурским автономным районом КНР. Площадь аймака составляет 76 061 км<sup>2</sup>. Наивысшая точка 4204 м над уровнем моря. Климат характеризуется как резко континентальный, средняя температура января -16-26<sup>0</sup>С, июня +10-24<sup>0</sup>С, в год в среднем в горах выпадает 250-350мм осадков.

Южный Гоби (Умнуговь, Южно-Гобийский аймак) площадью 165 тыс. км<sup>2</sup> расположен восточнее аймака Ховд, на юге-западе Монголии и граничит с Китаем. Средняя температура января -14-17<sup>0</sup>С, июля +21-27<sup>0</sup>С, в среднем в год выпадает 70-180 мм осадков. Центральную часть аймака занимает Монгольский Алтай с высотами от 3000 до 4000 м. Южнее и вглубь до границы с Китаем простирается пустыня Гоби.

## 2.2. Выделение ДНК

Выделение суммарной геномной ДНК проводили стандартным гуанидинтиоцианатным методом, используя коммерческий набор Magna DNA Prep 200 (“Лаборатория Изоген”). В соответствии с инструкцией производителя на одну пробу брали 200 мкл стабилизированной цельной крови, добавляли 800 мкл лизирующего реагента и 40 мкл суспензии сорбента. Magnetic сорбент содержит намагниченные стеклянные шарики диаметром до 25 мкм, на поверхности которых абсорбируется ДНК. Перемешав на ротаторе в течение 5 мин, пробирки помещали в магнитный штатив и удаляли супернатант с помощью водоструйного насоса. Далее в пробирку вносили 400 мкл лизирующего реагента и 1 мл раствора солевого буфера, перемешивали на ротаторе. После удаления супернатанта дважды промывали сорбент раствором солевого буфера объёмом 1

мл. Осадок высушивали при температуре 65<sup>0</sup>С и растворяли в 70 мкл ТЕ буфера, переносили в чистую пробирку. Выход ДНК составил 8,5-9,5 мкг, чистота ( $A_{260}/A_{280}$ ) в среднем 1,7. Выделенную ДНК хранили при температуре –20<sup>0</sup>С.

### **2.3. Электрофоретическое разделение и очистка ПЦР-продуктов**

Успешность амплификации исследуемых фрагментов оценивали методом фракционирования в 1%-ном агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием (0.5 мг/мл) в 1× ТАЕ-буфере. Приготовление агарозного геля и ТАЕ-буфера проводили в соответствии со стандартной методикой [Маниатис и др., 1984].

Экстракцию и очистку ПЦР-продуктов из геля проводили с помощью набора Cleanup Mini («Евроген») в соответствии с инструкцией производителя. Очищенный ПЦР-продукт хранили при -20<sup>0</sup>С.

### **2.4. Анализ полиморфизма D-петли мтДНК**

#### **Амплификация фрагмента D-петли мтДНК**

Амплификацию фрагмента D-петли мтДНК проводили с использованием праймеров: YDF (5'-GTAAAGAGCCTCACCAGTAT-3') и YDR (5'-TCCTGTAGCCATTGACAT-3'). Условия реакции: первичная денатурация – 4 мин при 95<sup>0</sup>С; 35 циклов: денатурация при 95<sup>0</sup>С – 55 с, отжиг праймеров при 50<sup>0</sup>С – 55 с, синтез 72<sup>0</sup>С – 55 с; завершающий синтез при 72<sup>0</sup>С – 5 мин [Guo, 2006]. Для постановки полимеразной цепной реакции использовали коммерческий набор реагентов «GenPak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген», который содержит буферную систему, ингибированную Taq ДНК полимеразу, ДНТФ и хлорид

магния, конечная концентрация которых составила, соответственно, 1 и, 200  $\mu\text{M}$  и 2,5 mM. Объем ПЦР-смеси 20  $\mu\text{l}$ . Концентрация каждого праймера в реакции 0,5  $\mu\text{M}$ , количество ДНК около 50 ng.

### **Секвенирование последовательностей D-петли мтДНК**

Определение нуклеотидной последовательности исследуемого фрагмента по обеим цепям проводили с использованием прямого и обратного праймеров YDF и YDR методом автоматического секвенирования на ДНК-анализаторе ABI Prism 3130x1 (Applied Biosystems) с использованием набора Big Dye<sup>TM</sup> Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Работа по секвенированию осуществлялась в ЗАО «Евроген».

### **Филогенетический и популяционно-генетический анализ**

Расшифровку хроматограмм и анализ качества нуклеотидных последовательностей проводили в программе ChromasPro Technelysium Pty Ltd (version 1.6).

Выравнивание исследуемых последовательностей D-петли мтДНК проводилось в программе MUSCLE [Edgar, 2004].

Выявление и подсчёт частот гаплотипов проводили в R-пакете *pegas* [Paradis, 2010]. Филогенетический анализ выявленных гаплотипов проводился с помощью MrBayes v3.2.6 [Ronquist, 2012].

Для изучения вклада материнской генетической компоненты в формирование внутривидового и межвидового разнообразия D-петли мтДНК яка построено дерево гаплотипов *B. grunniens* и *B. mutus*. Все доступные последовательности D-петли мтДНК яка, как оригинальные, так и полученные из GenBank, были выравнены с помощью MAFFT v7.205 [Katoh, 2005].

С помощью программы DnaSP v6.10.03 [Rozas, 2017] выявлены полиморфные сайты, а также гаплотипы, которые в дальнейшем были использованы для построения деревьев в программах MrBayes v3.2.6 с использованием библиотеки BEAGLE [Ayres, 2012] и RAxML v8.2.11 [Stamatakis, 2014]. Выбор модели молекулярной эволюции проводили с помощью PartitionFinder v1.1.1 [Lanfear, 2012]. Филогенетический и статистический анализы проводились совместно с Коновым Е.А. и Артюшиным И.В. (лаборатория сравнительной генетики животных ИОГен).

## 2.5. Микросателлитный анализ

### Микросателлитные локусы

Микросателлитный анализ проводили на основе мультиплексной панели 15 высокополиморфных микросателлитных локусов крупного рогатого скота «COrDIS Cattle» («Гордиз»). Все локусы представляют собой тандемные динуклеотидные повторы (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика микросателлитных локусов в составе мультиплексной панели

| Локус    | Хромосомная локализация | Тип повтора | Структура единицы повтора |
|----------|-------------------------|-------------|---------------------------|
| BM1824   | D1S34                   | простой     | (GT)n                     |
| BM2113   | D2S26                   | простой     | (CA)n                     |
| CSRM60   | D10S5                   | простой     | (AC)n                     |
| CSSM66   | D14S31                  | простой     | (AC)n                     |
| ETH3     | D19S2                   | сложный     | (GT)nAC(GT)6              |
| ETH10    | D5S3                    | простой     | (AC)n                     |
| ETH225   | D9S2                    | сложный     | (TG)4CG(TG)(CA)n          |
| ILSTS006 | D7S8                    | простой     | (GT)n                     |
| SPS115   | D15                     | сложный     | (CA)nTA(CA)6              |
| INRA023  | D3S10                   | простой     | (AC)n                     |
| TGLA53   | D16S3                   | сложный     | (TG)6CG(TG)4(TA)n         |
| TGLA122  | D21S6                   | сложный     | (AC)n(AT)n                |
| TGLA126  | D20S1                   | простой     | (TG)n                     |
| TGLA227  | D18S1                   | простой     | (TG)n                     |
| BM1818   | D23S21                  | простой     | (TG)n                     |

### Амплификация и фрагментный анализ

Праймеры для мультиплексной панели подобраны с учетом проведения амплификации всех 15-ти локусов в одной пробирке. Размер всех ПЦР продуктов составляет менее 300 п.н. (табл. 4).

Таблица 4. Праймеры к микросателлитным локусам

| N  | Название | Праймеры                                                     | Т<br>отжига<br>(°C) | Размеры<br>аллелей (п.н.) |
|----|----------|--------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------|
| 1  | ETH10    | F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA<br>R: CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC     | 55-65               | 207-231                   |
| 2  | CSSM66   | F: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA<br>R: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG   | 55-65               | 171-209                   |
| 3  | ETH3     | F: GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG<br>R: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG       | 55-65               | 103-133                   |
| 4  | BM2113   | F: GCTGCCTTCTACCAAATACCC<br>R: CTTCTGAGAGAAGCAACACC          | 55-60               | 122-156                   |
| 5  | BM1824   | F: GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC<br>R: CATCTCCAACCTGCTTCCTTG         | 55-60               | 176-197                   |
| 6  | ILSTS006 | F: TGTCTGTATTTCTGCTGTGG<br>R: ACACGGAAGCGATCTAAACG           | 55                  | 277-309                   |
| 7  | CSRM60   | F: AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA<br>R: AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG   | 55-65               | 79-115                    |
| 8  | BM1818   | F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG<br>R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC          | 57                  | 253-272                   |
| 9  | TGLA227  | F: CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT<br>R: ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA   | 55-56               | 75-105                    |
| 10 | TGLA126  | F: CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT<br>R: TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC | 55-58               | 115-131                   |
| 11 | TGLA53   | F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA<br>R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA   | 55                  | 143-191                   |
| 12 | SPS115   | F: AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG<br>R: AACGAGTGTCTTAGTTTGGCTGTG   | 55-60               | 234-258                   |
| 13 | ETH225   | F: GATCACCTTGCCACTATTTCT<br>R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT         | 55-65               | 131-159                   |
| 14 | TGLA122  | F: CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC<br>R: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC     | 55-58               | 136-184                   |
| 15 | INRA023  | F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC<br>R: TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC  | 55                  | 195-225                   |



Условия амплификации: первичная денатурация – 3 мин при 98°C; 4 цикла: денатурация при 98°C – 30 с, отжиг праймеров при 59°C – 120 с, синтез 72°C – 90 с; 6 циклов: 94°C – 30 с, 59°C – 120 с, 72°C – 90 с; 20 циклов: 90°C – 30 с, 59°C – 120 с, 72°C – 75 с; завершающий синтез 68°C – 30 мин, 15°C – ∞.

Анализ продуктов амплификации проводили методом капиллярного электрофореза на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems). Размеры аллелей определяли на основании набора фрагментов ДНК, длиной от 76 п.н. до 556 п.н. с шагом в 24 п.н., используя программное обеспечение GeneMapper v.4.1. Работа осуществлялась в ООО «Гордиз».

### **Популяционно-генетический и математико-статистический анализ**

Анализ аллельного и генетического разнообразия, расчёт индексов фиксации и инбридинга производились в GenAlEx 6.503 [Peakall, Smouse, 2006], а также с помощью R-пакетов hierfstat [Goudet, 2005] и pegas [Paradis, 2010]. Оценка частот нуль-аллелей и поправки на них показателей разнообразия и индексов фиксации проведены в программе FreeNa [Chapuis, Estoup, 2006] (табл. 5).

Анализ генетической структуры проводился в программе Structure v. 2.3.4 [Pritchard, 2000] при следующих параметрах: Length of Burnin Period: 5000, Number of MCMC Reps after Burnin: 50000, Use Admixture Model, Use Sampling Location Information, Allele frequencies independent, 30 iterations, K: 1 – 13.

Количество генетических кластеров K определяли с помощью Structure Harvester v.0.6.94 [Earl, vonHoldt, 2012].

Графическое представление распределения аллелей среди выборок с помощью кругов Эйлера-Венна выполнено с помощью gplots 2.7.4 в среде R [Warnes, 2016].

Математическая модель возможных миграций между локальными популяциями на основе числа мигрантов на поколение ( $N_m$ ) реализована в среде R с помощью пакета divMigrate-online [Alcala, 2014; Sundqvist, 2016].

(Bootstrap=5000, filter threshold=0.0) [Sundqvist, 2016]. В качестве меры генетической дифференциации использовали эффективное число мигрантов на поколение,  $Nm$  [Slatkin, 1993].

Популяционно-генетический и математико-статистический анализ проводился совместно с Коновым Е.А., Артюшиным И.В., Свищёвой Г.Р.

Таблица 5. Оценка частот нуль-аллелей

|                 | Гоби           | Хубсугул       | Алтай          | Арыг-Х.        | Адарган        | Сайзырал       | Малчын         | Моген-Б. |
|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------|
| <b>Eth3</b>     | 0.00000        | 0.00000        | 0.00000        | 0.00282        | 0.01531        | <b>0.05701</b> | <b>0.09681</b> | 0.00001  |
| <b>Cssm66</b>   | 0.00000        | 0.03083        | 0.00000        | 0.01739        | 0.00002        | 0.02936        | 0.03361        | 0.02558  |
| <b>Inra023</b>  | 0.04238        | 0.00000        | 0.00000        | 0.00000        | 0.01405        | 0.00002        | 0.03261        | 0.00001  |
| <b>BM1818</b>   | <b>0.09743</b> | 0.00001        | 0.02788        | 0.00003        | 0.00004        | 0.04250        | 0.00001        | 0.00011  |
| <b>Ilsts006</b> | <b>0.07165</b> | <b>0.05819</b> | 0.00000        | 0.00004        | <b>0.05442</b> | 0.00002        | 0.00006        | 0.00001  |
| <b>Tgla227</b>  | 0.00000        | 0.00000        | <b>0.11667</b> | 0.00654        | 0.00000        | 0.08097        | 0.00000        | 0.04493  |
| <b>Tgla126</b>  | 0.00000        | 0.04188        | 0.01589        | 0.04386        | 0.00001        | <b>0.05377</b> | 0.02297        | 0.02838  |
| <b>Tgla122</b>  | 0.00003        | 0.00000        | 0.02347        | 0.00001        | 0.00002        | <b>0.09053</b> | <b>0.14991</b> | 0.00000  |
| <b>Sps115</b>   | 0.00000        | 0.00000        | 0.00077        | 0.01523        | 0.00001        | 0.00061        | 0.00000        | 0.01251  |
| <b>Eth225</b>   | <b>0.05282</b> | <b>0.06827</b> | <b>0.13020</b> | <b>0.16397</b> | <b>0.05380</b> | <b>0.15639</b> | 0.03602        | 0.00002  |
| <b>Tgla53</b>   | 0.00000        | 0.00728        | 0.00002        | 0.00000        | 0.00003        | 0.00000        | 0.01440        | 0.00000  |
| <b>Csrm60</b>   | 0.00000        | 0.03313        | <b>0.07026</b> | 0.00000        | 0.00000        | 0.00001        | 0.00002        | 0.00003  |
| <b>Bm2113</b>   | 0.00000        | 0.00000        | 0.00000        | 0.00001        | 0.01517        | <b>0.10948</b> | 0.06599        | 0.03128  |
| <b>Bm1824</b>   | 0.00000        | <b>0.06733</b> | 0.00000        | <b>0.06266</b> | 0.04858        | 0.00004        | <b>0.06966</b> | 0.00000  |
| <b>Eth10</b>    | 0.00000        | 0.00000        | 0.00001        | 0.00001        | 0.04122        | 0.00001        | 0.00801        | 0.03882  |

\*на основе ЕМ алгоритма [Dempster, 1977] в FreeNa. Красным цветом показаны  $p > 0.05$ .

## 2.6. Генотипирование SNP g.8430T>C и g.14853G>A в гене VEGF-A

### Амплификация целевых фрагментов гена VEGF-A

Для типирования SNP g.8430T>C и g.14853G>A в гене VEGF-A амплифицированы фрагменты VEGF-A\_1 и VEGF-A\_2 с использованием следующих пар праймеров [Wu, 2013]:

VEGF-A\_1: F: 5'-TCACCATCTGAACGCCTCT-3'

R: 5'-CTCCATCCCAGTGCTGCTA-3'

VEGF-A\_2: F: 5'-TGGAGGCTAGGACTGTGCTTT-3'

R 5'-GCGGCTATGGGTAGTTCTGTG-3'

Для постановки полимеразной цепной реакции использовали коммерческий набор реагентов «GenPak PCR Core» ООО «Лаборатория Изоген», который содержит буферную систему, ингибированную *Taq* ДНК полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями, соответственно, 1  $\mu$ l, 200  $\mu$ M и 2.5 mM. Конечный объем ПЦР-смеси 20  $\mu$ l. Конечная концентрация каждого праймера в реакции 0.5  $\mu$ M, количество ДНК 20-50 ng.

Условия амплификации фрагмента VEGF-A\_1: первичная денатурация при 95°C – 4 мин; 35 циклов: денатурация при 95°C – 40 с, отжиг праймеров при 59.8°C – 30 с, синтез 72°C – 1 мин; завершающий синтез при 72°C – 10 мин.

Условия амплификации фрагмента VEGF-A\_2: первичная денатурация при 95°C – 4 мин; 35 циклов: денатурация при 95°C – 40 с, отжиг праймеров при 61.6°C – 30 с, синтез 72°C – 1 мин; завершающий синтез при 72°C – 10 мин (Wu, 2013).

## **Секвенирование целевых фрагментов гена *VEGF-A***

Секвенирование по обеим цепям проводили методом автоматического секвенирования на ДНК-анализаторе ABI Prism 3130x1 (Applied Biosystems) с использованием набора Big Dye™ Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Работа по секвенированию осуществлялась в ЗАО «Евроген».

Расшифровка хроматограмм и анализ качества нуклеотидных последовательностей проводились в программе ChromasPro Technelysium Pty Ltd (version 1.6).

### **Типирование SNP методом ПДРФ**

Для выявления SNP g.8430T>C и g.14853G>A гена *VEGF-A* использовали метод ПЦР-ПДРФ. Результаты рестрикции визуализировали методом электрофоретического разделения в 3% агарозном геле в 1х TAE-буфере.

#### **Типирование T>C в g.8430**

Для рестрикции ПЦР-фрагмента *VEGF-A\_1* применяли эндонуклеазу Fat I («СибЭнзим») с сайтом узнавания 5'- ↓CATG -3'. Протокол рестрикции: 10х SE-Буфер G - 2 µl, эндонуклеаза Fat I – 0,5 µl (1 U), ПЦР-продукт – 3 µl, деионизированная вода – 14,5 µl. Объем реакции - 20 µl. В соответствии с инструкцией производителя инкубацию проводили в течение 3 часов при температуре 55°C.

#### **Типирование G>A в g.14853**

Для фрагмента *VEGF-A\_2* применяли Erh I («СибЭнзим») с сайтом узнавания 5'- C↓CWWGG -3'. Протокол рестрикции: 10х SE-Буфер 2W - 2 µl, BSA (100 mg/ml) – 0,2 µl, эндонуклеаза Erh I – 0,1 µl (2 U), ПЦР-продукт – 3 µl,

деионизированная вода – 14,7  $\mu\text{l}$ . Объем реакции - 20  $\mu\text{l}$ . В соответствии с инструкцией производителя инкубацию проводили в течение 3 часов при температуре 37<sup>0</sup>C.

### **Статистический анализ данных**

Подсчёт показателей гетерозиготности, индексов фиксации и инбридинга, тест на дифференциацию, а также тест на нейтральность Эванса-Ваттермана проводились в программе Arlequin 3.5.2.2 [Excoffier, 2005]. Поиск ассоциаций и корреляций SNP маркеров проводили в R- среде.

Математико-статистический анализ проводился совместно со Свищёвой Г.Р. и Коновым Е.А.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1. Генетическое разнообразие яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона на основе полиморфизма D-петли мтДНК

##### 3.1.1. Анализ гаплотипического разнообразия мтДНК яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона

На основе нуклеотидной последовательности D-петли мтДНК проведен анализ гаплотипического разнообразия у яков Саяно-Алтайского региона России (Алтай, Бурятия, Тува: хозяйства Арыг-Хем, Адарган, Малчын, Моген-Бурен, Сайзырал) и Монголии (аймаки Хубсугул, Ховд, Южный Гоби). Для этого из каждой выборки случайным образом отбирали по 10 особей. В результате был амплифицирован фрагмент D-петли мтДНК 100 яков.

Длина амплифицированного фрагмента составила 700 п.н., что соответствует с 27 по 726 позициям референсной последовательности митохондриального генома дикого яка в GenBank NCBI: FJ548841. Длина анализируемого фрагмента D-петли мтДНК составила 632 п.н., что соответствует позициям 76–707 референса. Нуклеотидные последовательности депонированы в базу данных GenBank NCBI под номерами KY807427–KY807506, MH834630–MH834649.

Для сравнительного анализа гаплотипов из базы данных GenBank NCBI были использованы последовательности D-петли мтДНК дикого яка (KM280683–KM280687, FJ548840–FJ548845), одомашненного яка *Bos grunniens* пород Tianzhu (AY521149–AY521157), Jiulong (AY521138–AY521143), Maiwa (AY521144–AY521148, DQ007213, DQ007214, DQ856603, DQ856604) и Jinchuan (JQ811490–JQ811498).

Анализ полиморфных сайтов в гипервариабельном фрагменте D-петли мтДНК в выборках из России и Монголии выявил 17 гаплотипов, на их основе построено дерево гаплотипов (рис. 9).

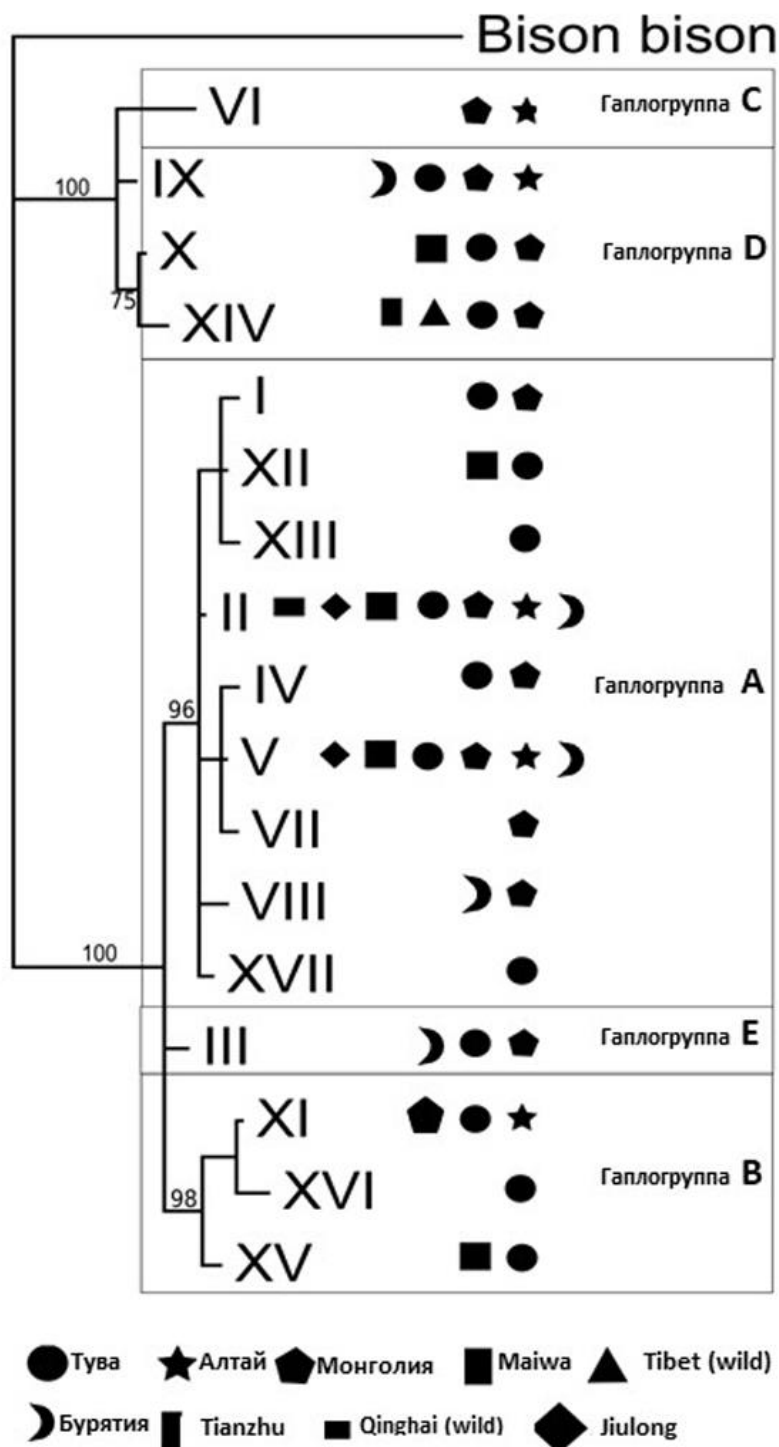


Рисунок 9. Байесово дерево гаплотипов в выборках Тувы, Алтая, Бурятии и Монголии.

Римскими цифрами обозначены номера гаплотипов.

Для укоренения дерева использована последовательность *Bison bison* (U12864), поскольку последние филогенетические исследования указывают на более близкое родство яка *Bos grunniens* с *Bison bison* нежели с остальными представителями *Bos* [Guo, 2016; Zhong, 2015; Bao, 2016; Wu, 2016].

Выделенные нами гаплогруппы, в соответствии с недавно предложенной буквенной классификацией китайских исследователей обозначены как А, В, С, D, Е [Guo, 2006]. В связи с тем, что в настоящее время не существует единой номенклатуры гаплотипов мтДНК яка, в данной работе все гаплотипы обозначались цифрами с указанием принадлежности к определенной гаплогруппе (рис. 9).

В результате анализа гаплотипов определена встречаемость гаплогрупп в каждой выборке (рис. 10).

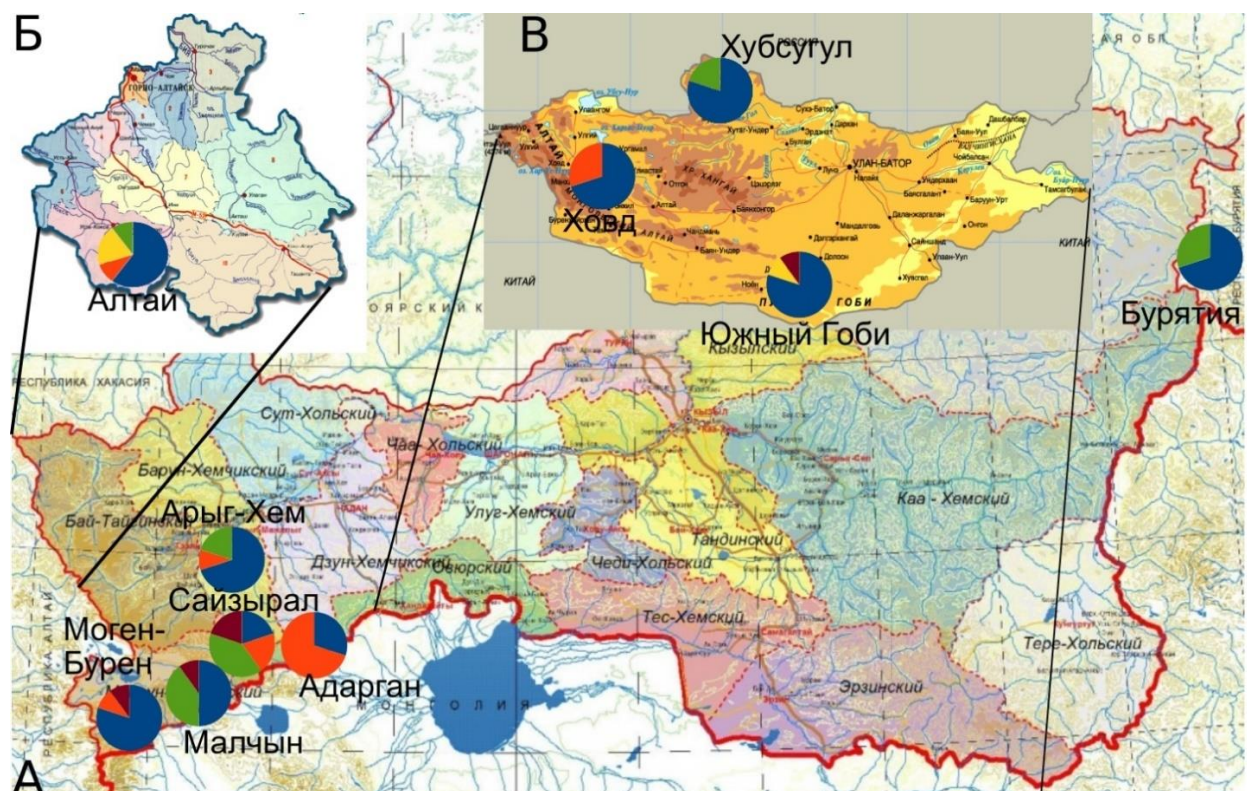


Рисунок 10. Положение исследованных выборок на карте и частота гаплогрупп. Карта А – Тува и Бурятия, Б – Алтай, В – Монголия. В круговых диаграммах частота каждой гаплогруппы в выборках обозначена цветом: А – синий, В – оранжевый, С – желтый, D – зеленый, Е – коричневый.



Как видно из диаграмм на рисунке 10, наибольшей частотой в популяциях характеризуется гаплогруппа А (синий сектор), далее следуют гаплогруппы В (оранжевый сектор) и D (зеленый сектор) соответственно. Высокая частота данных гаплогрупп отчасти определяется разнообразием гаплотипов в их составе. Так, на гаплогруппу А приходится 9 гаплотипов из 17 выявленных, на гаплогруппы В и D – по 3 гаплотипа, на гаплогруппы С и Е – по 1 гаплотипу. Помимо разнообразия гаплотипов в составе гаплогруппы важное значение имеет представленность конкретного гаплотипа в отдельно взятой выборке (табл. 6).

Таблица 6. Представленность гаплотипов мтДНК в исследуемых выборках

| Выборка     | Гаплотипы |    |   |    |   |   |    |    |    |    |    |    |   |    |    |    |   |
|-------------|-----------|----|---|----|---|---|----|----|----|----|----|----|---|----|----|----|---|
|             | 1         | 2  | 4 | 5  | 7 | 8 | 12 | 13 | 17 | 11 | 15 | 16 | 6 | 9  | 10 | 14 | 3 |
|             | А         |    |   |    |   |   |    |    |    | В  |    |    | С | D  |    |    | Е |
| Моген-Бурен |           | 4  | 1 | 1  |   |   | 1  | 1  |    | 1  |    |    |   |    |    |    | 1 |
| Арыг-Хем    | 1         | 1  |   | 3  |   |   | 2  |    |    | 1  |    |    |   | 1  |    | 1  |   |
| Адарган     | 1         |    |   | 2  |   |   |    |    |    | 2  | 5  |    |   |    |    |    |   |
| Сайзырал    |           | 1  |   |    |   |   |    |    | 1  | 1  |    | 1  |   | 3  | 1  |    | 2 |
| Малчын      | 1         | 2  |   | 1  |   |   |    | 1  |    |    |    |    |   | 4  |    |    | 1 |
| Алтай       |           | 4  |   | 2  |   |   |    |    |    | 1  |    |    | 2 | 1  |    |    |   |
| Бурятия     |           | 2  |   | 2  |   | 2 |    |    |    |    |    |    |   | 3  |    |    | 1 |
| Гоби        | 2         | 2  | 1 | 3  |   |   |    |    |    |    |    |    | 1 |    |    |    | 1 |
| Хубсугул    | 3         | 2  |   | 1  | 1 | 1 |    |    |    |    |    |    |   | 1  | 1  |    |   |
| Ховд        |           | 4  |   | 2  |   | 1 |    |    |    | 3  |    |    |   |    |    |    |   |
| Всего       | 8         | 22 | 2 | 17 | 1 | 1 | 3  | 2  | 1  | 9  | 5  | 1  | 3 | 13 | 2  | 1  | 6 |

А, В, С, D, Е – гаплогруппы; серым полем показаны гаплотипы, описанные впервые; цифрами показано количество особей с соответствующим гаплотипом.

Так, в исследованных нами выборках широко распространенные гаплотипы – это гаплотипы A2 и A5, поскольку они были выявлены практически во всех выборках и характеризовались самой высокой частотой. К широко распространенным гаплотипам также можно отнести A1, B11, D9.

Стоит отметить, что в ходе исследования обнаружено четыре новых гаплотипа: A4, A13, D9 и E3. В таблице 5 данные гаплотипы выделены серым полем. При этом гаплотипы A4, D9 и E3 обнаружены как в российских, так и в монгольских выборках. Гаплотипы A12, A13, A17, B15, B16, D14 были обнаружены только в выборках Тувы.

В выборках из Тувы суммарно выявлено 14 гаплотипов, входящих в состав гаплогрупп A, B, D, E. В хозяйстве из Бурятии обнаружено 5 гаплотипов в составе A, E и D гаплогрупп. В выборке из Алтая выявлено 5 гаплотипов из гаплогрупп A, B, C, D. Исследование яков с территории Монголии выявило 11 гаплотипов из всех пяти гаплогрупп – A, B, C, D, E.

На основании проведенного исследования можно сделать вывод о довольно высоком гаплотипическом разнообразии мтДНК яка Саяно-Алтайского региона России и Монголии. Отчасти наблюдаемую картину можно объяснить особенностями разведения яка в хозяйствах.

При разведении других типов домашнего скота (КРС, МРС, лошадей) племенное ядро, как правило, подвержено интенсивной селекции и выбраковке, что ведет к снижению генетического разнообразия в стаде. Поскольку яководство является типичным примером отгонного скотоводства, то основная часть стада перегоняется на сезонные пастбища, находясь на полусвободном выпасе, и содержится далеко от хозяйства. Все это может способствовать свободному скрещиванию особей и отсутствию направленного искусственного отбора, а, следовательно, поддержанию генетического разнообразия.

### 3.1.2. Филогенетический анализ яка *Bos grunniens* на основе мтДНК

Для изучения вклада материнской генетической компоненты в формирование внутривидового и межвидового разнообразия яка были заимствованы из базы данных GenBank все доступные последовательности Д-петли мтДНК дикого и одомашненного яков.

Последовательности мтДНК, включая 100 сиквенсов, полученных нами при исследовании яков Саяно-Алтайского региона России и Монголии, были выравнены с помощью программы MAFFT v.7.205. В результате проанализировано 952 последовательности мтДНК яка, длина выравненных фрагментов составила 673 п.н.

На основе полученного множественного выравнивания, с помощью программы DnaSP v.6.10.03, было выявлено 124 полиморфных сайта, а также 178 гаплотипов, которые были использованы для построения дерева гаплотипов одомашненного яка и дикого (рис. 7) в программах RAxML v.8.2.11 и MrBayes v.3.2.6 с привлечением библиотеки BEAGLE. Для укоренения дерева использована последовательность *Bison bison*.

Изучение вклада материнской генетической компоненты в формирование разнообразия мтДНК яка выявило наличие двух крупных клад с bootstrap значением = 100, содержащих гаплогруппы А, В, С, D, Е, что, несомненно, представляет интерес для будущих сравнительных исследований генофонда и филогении яка. При этом первая клада включает в себя гаплогруппы С и D, а вторая клада представлена гаплогруппами А, В, Е. Отметим, что ранее лишь в одной работе [Wang, 2010] было показано наличие гаплогруппы F, представленной двумя гаплотипами дикого яка. По нашим данным, при исследовании 952 последовательностей мтДНК яка гаплогруппа F не выявлена.

В ходе сравнительного анализа последовательностей из GenBank яков России, Монголии, Китая и диких яков Цинхай-Тибетского нагорья были

обнаружены гаплогруппы, соответствующие выделенным нами в ходе исследования (рис. 9), однако, с более обширным набором гаплотипов (рис. 11).

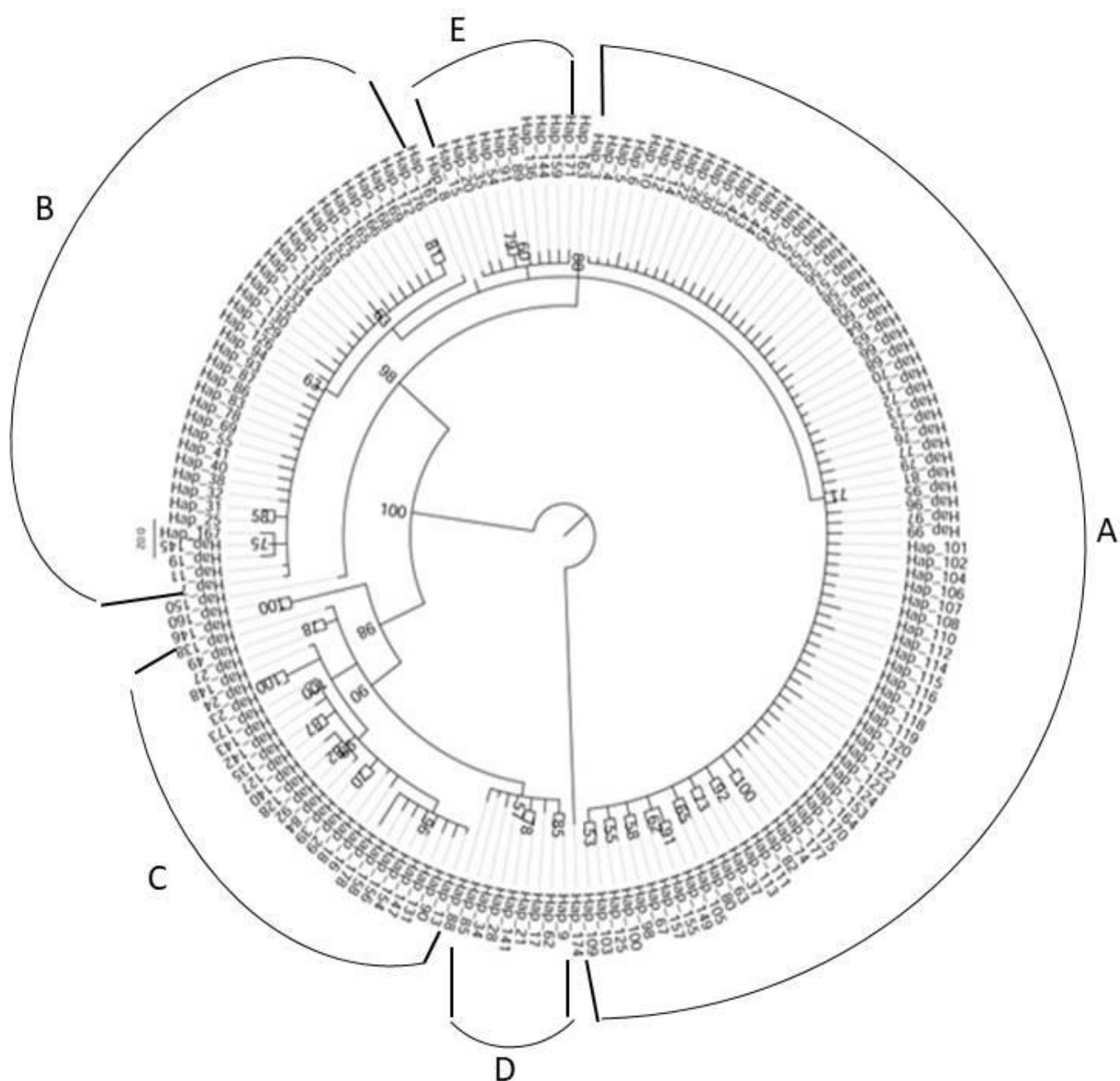


Рисунок 11. Дерево гаплотипов мтДНК *Bos grunniens*.

Примечание. 170 гаплотипов в составе 5 гаплогрупп. 8 гаплотипов не входят ни в одну гаплогруппу, поскольку данные последовательности мтДНК принадлежат гибридам *Bos grunniens* и *Bos taurus*.

В составе гаплогрупп А, В, С, D, Е выявлено в общей сложности 170 гаплотипов (рис. 7). Филогенетический анализ показал, что обнаруженные нами 13 гаплотипов у яков России и Монголии встречаются как у диких яков из высокогорных районов Цинхай-Тибетского нагорья, так и у различных пород яка из Китая.

Необходимо отметить, что 8 гаплотипов не вошли в состав ни одной из гаплогрупп. В результате проверки принадлежащих им последовательностей в системе BLAST NCBI выявлена 100% идентичность последовательностям (и гаплотипам) D-петли мтДНК *Bos taurus*. Следовательно, в базу данных GenBank были внесены последовательности D-петли мтДНК, принадлежащие гибридам *Bos grunniens* и *Bos taurus*, и зарегистрированы как представитель *Bos grunniens*. Стоит отметить, что получение гибридов яка и коровы является достаточно распространенным явлением в равнинных земледельческих районах Китая. Это обусловлено тем, что як *Bos grunniens* сильное и выносливое животное, однако, адаптировано к обитанию в условиях высокогорья и не способно выживать на равнине. Получаемые гибриды сильные и выносливые, но, в отличие от яка, хорошо адаптированы к обитанию в условиях равнины.

На дереве видно, что в отличие от других домашних копытных, гаплотипы диких и одомашненных яков различных пород и географических популяций встречаются во всех гаплогруппах. Стоит отметить, что гаплотипы диких яков так же не образуют своих отдельных клад, а расположены на филогенетическом дереве вместе с гаплотипами одомашненных яков. Кроме того, подавляющее большинство гаплотипов встречаются как у диких, так и у одомашненных яков. В связи с этим, можно предположить, что для предка дикого и одомашненного яков было характерно изначально высокое гаплотипическое разнообразие, которое поддерживается до настоящего времени.

Характер кластеризации гаплотипов в гаплогруппах не коррелирует ни с породной, ни с географической принадлежностью яков. В результате можно предположить, что, несмотря на морфологические различия между породами

дифференциации гаплотипического разнообразия не наблюдается. Судя по всему, гаплотипические клады сформировались ещё до одомашнивания [Guo, 2006].

Отсутствие связи гаплотипов с географическим распределением можно объяснить и тем, что як используется в качестве транспортного животного и, следовательно, перемещается на большие расстояния, что размывает географические границы [Bailey, 2002].

В ходе построения филогенетического дерева было замечено, что разнообразие гаплотипов в гаплогруппах различается. В связи с этим, дана оценка частоты гаплогрупп в породах и географических изолятах Тувы, Монголии и Китая (Рис. 12).



Рисунок 12. Встречаемость гаплогрупп мтДНК в породах и географических популяциях яка *Bos grunniens* России, Монголии и Китая.

Обозначение. Частота каждой гаплогруппы показана цветным сектором. А – зеленый, В – фиолетовый, С – голубой, D – желтый, Е – красный.



Для оценки частоты гаплогрупп в каждой породе и географическом изоляте проведен подсчет количества всех последовательностей, принадлежащих к той или иной гаплогруппе. Значимость отличий между породами и изолятами по частотам гаплогрупп проверяли с использованием точного теста Фишера.

По нашим данным, значимо отличаются по частоте гаплогрупп яки породы Сарлык и Тяньчжу (точный тест Фишера). Отметим, что в породе сарлык не обнаружена гаплогруппа С. Вероятно, это связано в первую очередь с ограниченным объемом исследованной выборки. Привлечение большего объема выборки позволит делать выводы о наличии или отсутствии данной гаплогруппы у яков Тувы.

В целом отмечена тенденция преобладания гаплогруппы А, В, D во всех 6 исследованных выборках.

По результатам подсчета частоты гаплогрупп китайских исследователей, в целом наблюдается схожая картина (рис. 13).

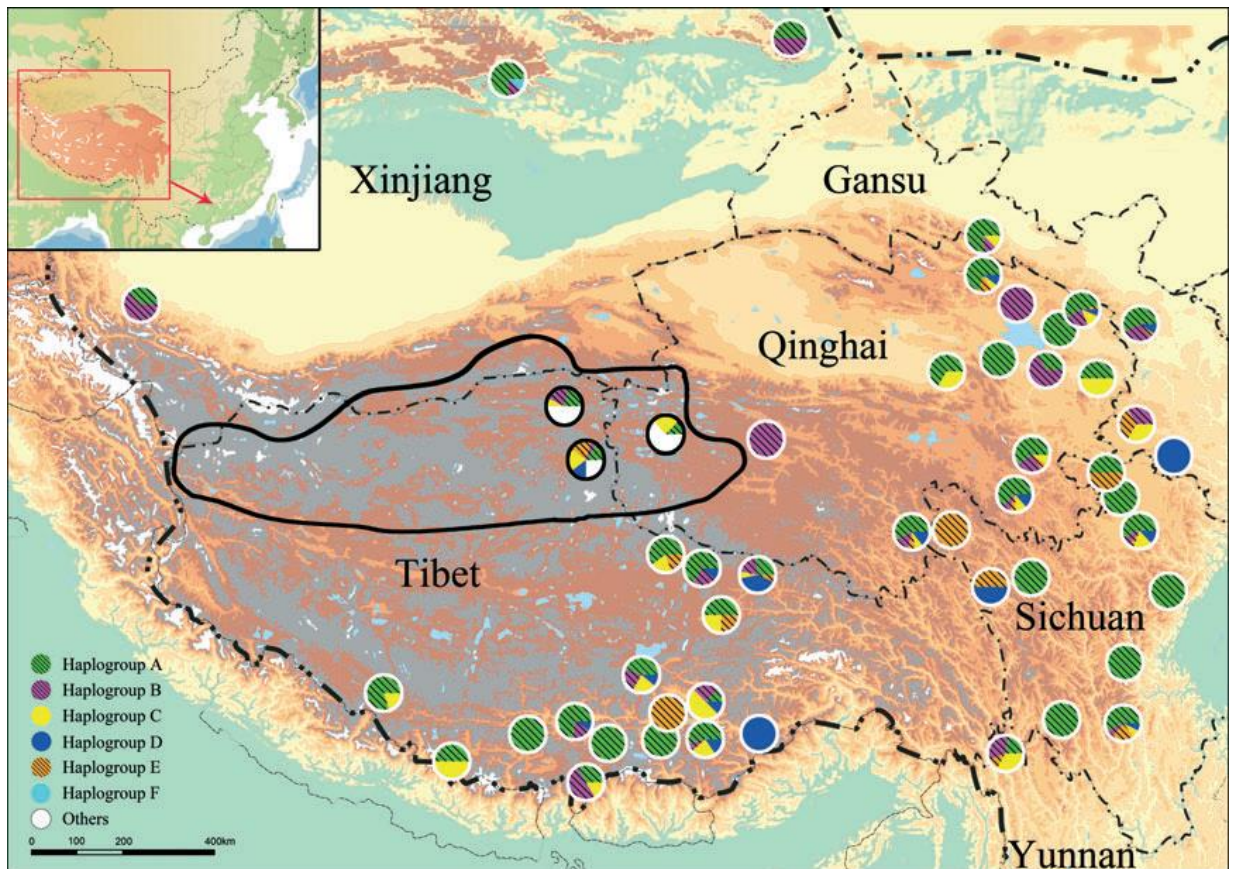


Рисунок 13. Географическое распространение гаплогрупп D-петли яка *Bos grunniens* на западе Китая [Wang, 2010].

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, не противоречат данным, полученным ранее другими авторами на меньшем объёме выборки и меньшем количестве гаплотипов [Guo, 2006; Lai, 2007; Wang, 2010].

По-видимому, для диких яков Цинхай-Тибетского нагорья изначально было характерно высокое гаплотипическое разнообразие, включавшее множество гаплотипов в составе двух крупных клад. В связи с этим можно предположить, что источником для одомашнивания была достаточно большая по численности предковая популяция, в которой уже сформировались основные гаплогруппы мтДНК. Вследствие этого популяции домашнего яка унаследовали столь высокое гаплотипическое разнообразие мтДНК, которое поддерживается до настоящего времени.

Вероятно, этому способствовало и то, что в ходе одомашнивания яка условия его обитания почти не менялись. В результате наблюдается генетический эффект trade-off, позволяющий якам выживать как на суровой высоте, так и в условиях высокогорных пастбищ [Qiu, 2015]. Этот эффект, безусловно, влияет на эволюционное развитие и доместикацию яка в целом.



### 3.2. Генетическое разнообразие и генетическая структура популяций яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона на основе полиморфизма микросателлитных локусов

Анализ генетической структуры *B. grunniens* Саяно-Алтайского региона проводили с использованием мультиплексной панели «COrDIS Cattle» на основе полиморфизма 15 микросателлитных локусов. В наборе 12 локусов (*ETH3*, *INRA023*, *TGLA227*, *TGLA126*, *TGLA122*, *SPS115*, *ETH225*, *TGLA53*, *BM2113*, *BM1824*, *ETH10*, *BM1818*) составляют стандартную панель маркеров, рекомендованную Международным Обществом Генетики Животных (ISAG), а также 3 дополнительных высокополиморфных микросателлитных локуса: *CSSM66*, *ILSTS006* и *CSRM60*.

Выбор мультиплексной панели «COrDIS Cattle» в рамках исследования определялся тем, что все вышеперечисленные локусы рекомендованы FAO в рамках системы DAD-IS [FAO [www.fao.org/...](http://www.fao.org/...)], для изучения генетического разнообразия у КРС, а также ранее применялись разными авторами в популяционных исследованиях яка [Zhang, 2008; Qi, 2010; Minqiang, 2003].

Кроме того, для многих микросателлитных локусов известно их расположение на хромосомах КРС, согласно сборке генома *Bos taurus* UMD3.1, (табл. 7), а некоторые из них могут быть локализованы в пределах локусов количественных признаков QTL, ассоциированных с мраморностью мяса, показателями жирности и другими признаками у КРС (табл. 8). Гипотетически, в геноме *Bos grunniens* возможно наличие подобные районов QTL. В связи с этим исследование популяций яка с использованием данных микросателлитных локусов, возможно, имело бы в будущем практическое значение.

Таблица 7. Маркеры и ближайшие к ним гены (геном *Bos taurus* UMD3.1)

| Маркер   | ID GenBank | Хромо сома | Начало    | Конец     | Ближайшие гены  |             |          |
|----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------------|-------------|----------|
| BM2113   | M97162.1   | chr2       | 132508978 | 132509138 | <b>HP1, BP3</b> | SH2D5, IF17 | EIF4G3   |
| ETH3     | Z22744.1   | chr19      | 57309962  | 57310105  | <b>RAB37</b>    | CD300LF     | SLC9A3R1 |
| ETH10    | Z22739.1   | chr5       | 60551773  | 60551375  | <b>SNRPF</b>    | CCDC38      | AMDHD1   |
| ILSTS006 | L23482.1   | chr7       | 96709489  | 96709239  | <b>MCTP1</b>    |             |          |
| INRA023  | X67830.1   | chr3       | 33011203  | 33010842  | <b>KCNA2</b>    | KCNA3       | KCNA10   |
| SPS115   | X16451.1   | chr15      | 24164977  | 24165753  | <b>NCAM1</b>    |             |          |
| TGLA122  | -          | chr21      | 57640855  | 57640996  | <b>SLC24A4</b>  | MIR2284F    | RIN3     |
| TGLA53   | -          | chr16      | 25789387  | 25789466  | <b>HLX</b>      |             | DUSP10   |

Примечание. Жирным шрифтом выделены самые близкие к локусам гены

Таблица 8. Локусы количественных признаков (QTL) *Bos taurus*, в пределах которых локализованы маркеры

| Маркер         | QTL ID | Признаки, ассоциированные с QTL                      |   |
|----------------|--------|------------------------------------------------------|---|
| <b>BM2113</b>  | 424    | Масса парной туши                                    |   |
|                | 432    | Индекс мраморности мяса                              |   |
|                | 450    | Индекс мраморности мяса                              |   |
|                | 467    | Индекс мраморности мяса                              |   |
|                | 827    | Индекс мраморности мяса                              |   |
| <b>ETH3</b>    | 72     | Уровень овуляции                                     | * |
|                | 936    | Устойчивость к бычьей губчатой энцефалопатии         | * |
| <b>ETH10</b>   | 10     | Убойный выход                                        | * |
|                | 11     | Жировая прослойка на уровне ребра                    |   |
|                | 12     | Вес при рождении                                     |   |
|                | 54     | Убойный выход                                        | * |
|                | 55     | Жировая прослойка на уровне ребра                    |   |
|                | 112    | Вес при рождении                                     |   |
|                | 115    | Масса в годовалом возрасте                           |   |
|                | 129    | Масса в годовалом возрасте                           |   |
|                | 215    | Вес при рождении                                     | * |
|                | 216    | Площадь длиннейшей мышцы                             | * |
|                | 217    | Выход жира                                           |   |
|                | 828    | Ожидаемая ценность породы по толщине хребтового жира | * |
|                | 840    | Ожидаемая ценность породы по толщине хребтового жира | * |
|                | 886    | Концентрация фолликулостимулирующего гормона         | * |
| <b>INRA023</b> | 1      | Индекс мраморности мяса                              | * |
|                | 194    | Толщина шпика                                        |   |
|                | 195    | Вес при рождении                                     |   |
|                | 367    | Выход молока                                         | * |
|                | 781    | Процентное содержание жира                           | * |
|                | 783    | Выход молока                                         | * |
| <b>TGLA126</b> | 116    | Процентное содержание жира                           | * |
| <b>TGLA53</b>  | 215    | Индекс мраморности мяса                              |   |

\*показана значимость ассоциации

### 3.2.1. Генетическая изменчивость микросателлитных локусов, использованных в работе

Для оценки изменчивости используемых в работе 15 микросателлитных локусов проведен анализ аллельного и генетического разнообразия, индексов полиморфности, фиксации и инбридинга для каждого локуса (табл. 9).

Анализ аллельного разнообразия показал, что многие локусы имеют низкую эффективную численность аллелей  $Mean N_E$ , которая варьирует в пределах 1.277 – 4.072, а средняя составляет  $2.67 \pm 0.211$ . Показано, что наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность по всем локусам не отличаются. В среднем по всем локусам наблюдается довольно высокий поток генов (в среднем по локусу  $5.706 \pm 0.428$ ). Индекс фиксации достаточно низкий почти по всем локусам (в среднем по всем  $0.044 \pm 0.003$ )

По локусам *BM1818*, *ILSTS006*, *TGLA122*, *ETH225*, *CSRM60*, *ETH10* наблюдается инбридинг как внутри выборок ( $F_{IS}$ ), так и между ними ( $F_{IT}$ ). При этом для локусов *BM1818* и *Eth225* отмечены самые высокие коэффициенты инбридинга.

Особый интерес вызывает исследование локуса *ILSTS006*, который локализован в районе гена *MCTP1*. Ранее было показано, что этот ген ассоциирован с нежностью мяса у коров [Peripolli, 2016], а также с реакцией на термический стресс [Srikanth, 2017]. В связи с этим, локус *ILSTS006* можно рассматривать в качестве генетического маркера для исследования показателей мясной продуктивности.

Стоит отметить, что локусы *CSSM66*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA53*, *CSRM60*, *BM2113* характеризуются наиболее высокими значениями средней эффективной численности, потока генов и индекса полиморфности  $PIC$ , в связи с чем являются наиболее пригодными для популяционных исследований яка.

Таблица 9. Показатели аллельного и генетического разнообразия, индексы полиморфности, фиксации и инбридинга, рассчитанные для каждого микросателлитного локуса

| Локус           | <i>N</i> | <i>Mean Na</i>   | <i>Mean N<sub>E</sub></i> | <i>Mean H<sub>O</sub></i> | <i>H<sub>E</sub></i> | <i>F<sub>IS</sub></i> | <i>F<sub>IT</sub></i> | <i>F<sub>ST</sub></i> | <i>Nm</i>        | <i>PIC</i>   |
|-----------------|----------|------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|--------------|
| <b>Eth3</b>     | 361      | 3.000            | 2.012                     | 0.538                     | 0.499                | -0.079                | -0.052                | 0.025                 | 9.719            | 0.512        |
| <b>Cssm66</b>   | 363      | 5.500            | <b>3.349</b>              | 0.693                     | 0.687                | -0.009                | 0.043                 | 0.052                 | <b>4.570</b>     | <b>0.724</b> |
| <b>Inra023</b>  | 363      | 5.625            | <b>3.304</b>              | 0.715                     | 0.688                | -0.039                | -0.001                | 0.036                 | <b>6.609</b>     | <b>0.714</b> |
| <b>BM1818</b>   | 364      | 2.875            | 1.277                     | 0.153                     | 0.183                | 0.167                 | 0.223                 | 0.067                 | 3.462            | 0.197        |
| <b>Ilsts006</b> | 364      | 2.250            | 1.791                     | 0.428                     | 0.435                | 0.015                 | 0.069                 | 0.055                 | 4.266            | 0.460        |
| <b>Tgla227</b>  | 364      | 2.750            | 1.947                     | 0.525                     | 0.485                | -0.082                | -0.043                | 0.036                 | 6.695            | 0.503        |
| <b>Tgla126</b>  | 361      | 3.250            | 1.988                     | 0.471                     | 0.463                | -0.018                | 0.041                 | 0.058                 | 4.075            | 0.492        |
| <b>Tgla122</b>  | 360      | 7.000            | 3.716                     | 0.670                     | 0.714                | 0.061                 | 0.117                 | 0.059                 | 3.968            | 0.759        |
| <b>Sps115</b>   | 364      | 5.750            | <b>2.886</b>              | 0.665                     | 0.643                | -0.035                | 0.000                 | 0.033                 | <b>7.272</b>     | <b>0.665</b> |
| <b>Eth225</b>   | 361      | 4.625            | 2.961                     | 0.538                     | 0.652                | 0.175                 | 0.222                 | 0.057                 | 4.162            | 0.691        |
| <b>Tgla53</b>   | 360      | 7.250            | <b>4.072</b>              | 0.813                     | 0.752                | -0.081                | -0.039                | 0.039                 | <b>6.112</b>     | <b>0.783</b> |
| <b>Csrm60</b>   | 364      | 4.625            | <b>3.525</b>              | 0.710                     | 0.714                | 0.005                 | 0.046                 | 0.041                 | <b>5.844</b>     | <b>0.744</b> |
| <b>Bm2113</b>   | 360      | 4.000            | <b>2.895</b>              | 0.649                     | 0.649                | -0.001                | 0.035                 | 0.035                 | <b>6.794</b>     | <b>0.673</b> |
| <b>Bm1824</b>   | 363      | 4.375            | 2.267                     | 0.548                     | 0.548                | -0.001                | 0.039                 | 0.040                 | 6.037            | 0.570        |
| <b>Eth10</b>    | 364      | 3.625            | 2.177                     | 0.528                     | 0.529                | 0.003                 | 0.042                 | 0.040                 | 6.010            | 0.551        |
| <b>Bcero</b>    | 362.4    | 4.433<br>± 0.398 | 2.67<br>± 0.211           | 0.57<br>± 0.041           | 0.576<br>± 0.039     | -0.001<br>± 0.019     | 0.049<br>± 0.021      | 0.044<br>± 0.003      | 5.706<br>± 0.428 |              |

Обозначение. *N* – объём выборки, *Mean Na* – среднее эффективное число аллелей, *Mean N<sub>E</sub>* – средняя эффективная численность, *Mean H<sub>O</sub>* – средняя наблюдаемая гетерозиготность, *H<sub>E</sub>* – ожидаемая гетерозиготность, *F<sub>IS</sub>* – коэффициент инбридинга особей в субпопуляциях, *F<sub>IT</sub>* – коэффициент инбридинга особей в популяции в целом, *F<sub>ST</sub>* – коэффициент инбридинга субпопуляций относительно всей популяции, *Nm* – поток генов, *PIC* – показатель полиморфного информационного содержания. Наиболее высокие значения *Mean N<sub>E</sub>*, *Nm*, *PIC* показаны синим цветом.

Таким образом, в результате анализа генетической изменчивости 15 универсальных для КРС микросателлитных локусов было показано, что не все локусы пригодны для исследования популяций яка *Bos grunniens*.

Наименее информативными для подобного применения являются *BM1818* и *Eth225*. Применение подобных локусов с низким значением *PIC* нежелательно, поскольку в случае избыточного количества подобных локусов теряется информативность в микросателлитной панели и даже может наблюдаться некое усреднение получаемых результатов.

Локус *ILSTS006* характеризуется низким значением *PIC*, однако, его можно рассматривать в качестве генетического маркера для исследования показателей мясной продуктивности.

Наиболее информативными для популяционных исследований яка являются локусы *CSSM66*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA53*, *CSRM60*, *BM2113*, которые характеризуются наиболее высокими значениями средней эффективной численности, потока генов и индекса полиморфности *PIC*.

### 3.2.2. Анализ генетического разнообразия яка *Bos grunniens* на основе полиморфизма микросателлитных локусов

На основе 15 микросателлитных локусов исследовано генетическое разнообразие в популяциях яка Тувы, Алтая и Монголии. Общий объем выборки составил 364 особи из 8 яководческих хозяйств (табл. 10).

Таблица 10. Характеристика исследованных выборок

| Регион   | Выборка     | Район             | Кол-во особей |
|----------|-------------|-------------------|---------------|
| Тува     | Арыг-Хем    | Барун-Хемчикский  | 60            |
|          | Адарган     | Овюрский          | 58            |
|          | Сайзырал    | Монгун-Тайгинский | 69            |
|          | Малчын      | Монгун-Тайгинский | 59            |
|          | Моген-Бурен | Монгун-Тайгинский | 58            |
| Алтай    | Алтай       | Кош-Агачский      | 20            |
| Монголия | Хубсугул    | Хубсугул          | 20            |
|          | Южный Гоби  | Южный Гоби        | 20            |
| Всего    |             |                   | 364           |

Было установлено, что во всех популяциях довольно низкое эффективное число аллелей (табл. 11). Среднее число уникальных аллелей в тувинских выборках существенно ниже, чем в алтайской и монгольских популяциях. Показатель гетерозиготности довольно низкий, в пределах 0.53-0.63 и значимо не отличается между выборками. В хозяйстве Сайзырал отмечен самый высокий коэффициент инбридинга и самое низкое значение гетерозиготности, а в выборке Малчын – самый низкий коэффициент инбридинга и самое высокое значение гетерозиготности. При этом в стаде хозяйства Малчын не было выявлено уникальных аллелей, и наблюдалось отклонение от равновесия Харди-Вайнберга.

Таблица 11. Объем выборок, эффективное число аллелей и число уникальных аллелей

| Выборка     | $N$ | $N_a$             | $N_e$               | $Mean\ N\ Private\ Alleles$ | $H_o$               | $H_e$               | $F_{IT}$             | $F_{IS}$ | $p\ значение\ отклонения\ от\ HWE$ |
|-------------|-----|-------------------|---------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|----------------------|----------|------------------------------------|
| Арыг-Хем    | 60  | 4.6<br>$\pm 0.58$ | 2.68<br>$\pm 0.257$ | 0.07<br>$\pm 0.067$         | 0.56<br>$\pm 0.056$ | 0.57<br>$\pm 0.050$ | 0.01<br>$\pm .033$   | 0.124    | 0.0601                             |
| Адарган     | 58  | 3.9<br>$\pm 0.41$ | 2.57<br>$\pm 0.272$ | 0.00<br>$\pm 0.000$         | 0.53<br>$\pm 0.051$ | 0.55<br>$\pm 0.050$ | 0.02<br>$\pm 0.024$  | 0.033    | 0.3124                             |
| Сайзырал    | 69  | 4.8<br>$\pm 0.57$ | 2.86<br>$\pm 0.290$ | 0.27<br>$\pm 0.153$         | 0.53<br>$\pm 0.051$ | 0.59<br>$\pm 0.048$ | 0.10<br>$\pm 0.037$  | 0.137    | 0.0567                             |
| Малчын      | 59  | 3.9<br>$\pm 0.34$ | 2.67<br>$\pm 0.196$ | 0.00<br>$\pm 0.000$         | 0.63<br>$\pm 0.049$ | 0.59<br>$\pm 0.039$ | -0.08<br>$\pm 0.060$ | -0.052   | 0.0000                             |
| Моген-Бурен | 58  | 4.3<br>$\pm 0.53$ | 2.61<br>$\pm 0.201$ | 0.13<br>$\pm 0.133$         | 0.58<br>$\pm 0.049$ | 0.57<br>$\pm 0.046$ | -0.01<br>$\pm 0.023$ | 0.160    | 0.0000                             |
| Гоби        | 20  | 4.9<br>$\pm 0.36$ | 2.54<br>$\pm 0.199$ | 0.47<br>$\pm 0.165$         | 0.60<br>$\pm 0.050$ | 0.57<br>$\pm 0.034$ | -0.03<br>$\pm 0.047$ | -0.021   | 0.3851                             |
| Хубсугул    | 20  | 5.1<br>$\pm 0.44$ | 2.84<br>$\pm 0.297$ | 0.40<br>$\pm 0.163$         | 0.59<br>$\pm 0.053$ | 0.58<br>$\pm 0.046$ | -0.01<br>$\pm .040$  | 0.008    | 0.1371                             |
| Алтай       | 20  | 4.1<br>$\pm 0.33$ | 2.67<br>$\pm 0.195$ | 0.20<br>$\pm 0.107$         | 0.59<br>$\pm 0.035$ | 0.60<br>$\pm 0.030$ | -0.01<br>$\pm 0.051$ | 0.030    | 0.2552                             |
| Всего       | 364 | 4.4<br>$\pm 0.16$ | 2.68<br>$\pm 0.084$ |                             | 0.58<br>$\pm 0.017$ | 0.58<br>$\pm 0.015$ |                      |          |                                    |

Обозначения:  $N$  – объем выборки,  $N_a$  – эффективное число аллелей,  $N_e$  – эффективная численность,  $Mean\ N\ Private\ Alleles$  – среднее число уникальных аллелей,  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $H_e$  – ожидаемая гетерозиготность,  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга особей в субпопуляциях,  $F_{IT}$  – коэффициент инбридинга особей в популяции в целом.

Графическое представление распределения аллелей в выборках позволяет визуализировать уникальные и общие аллели (рис. 14). На рис. 14,  $A$  каждый овал соответствует конкретной выборке. В определенную область вписаны числа: верхние из них обозначают четырехзначный код выборки, а нижние – количество уникальных аллелей.





на краю ареала вида (*Bos grunniens*), так и резким сокращением численности в конце XX в. То, что этот эффект не был замечен на материале D-петли мтДНК, мы склонны объяснять низким объемом выборки и достаточно низкой силой самого эффекта trade-off. Однако отсутствие снижения аллельного разнообразия у яков Алтая по микросателлитным локусам требует отдельного изучения.

### 3.2.3. Анализ генетической структуры популяций яка *Bos grunniens* на основе полиморфизма микросателлитных локусов

Анализ генетической структуры популяций яка на основе 15 микросателлитных локусов выявил наличие трех генетических кластеров  $K=3$  (рис. 15). На рисунке 16 вероятность принадлежности особи к определенному кластеру показана соответствующим цветом. Для проверки корректности полученных результатов были произведены аналогичные расчеты с исключением микросателлитных локусов для которых была показана повышенная частота нуль-аллелей (см. раздел Материалы и методы, табл. 5). В результате, принципиальных изменений в кластеризации не выявлено.

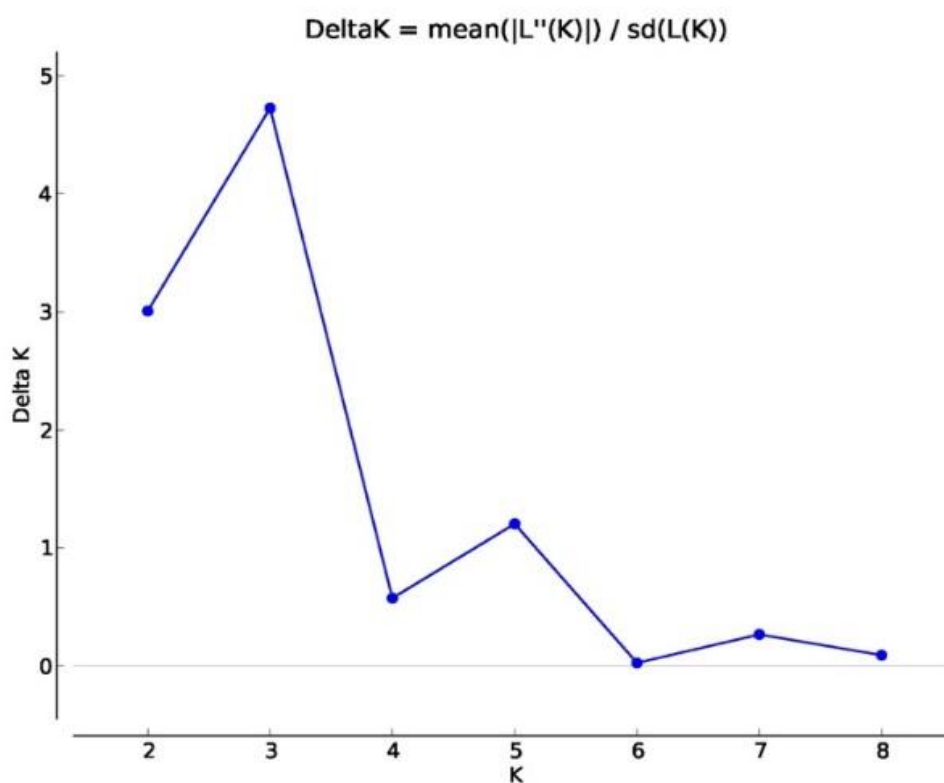


Рисунок15. Значение параметра K

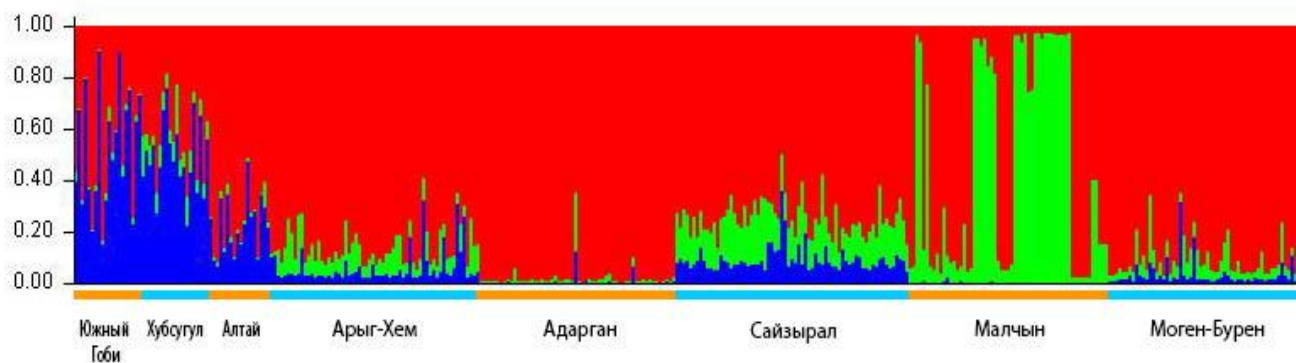


Рисунок 16. Генетическая структура популяций яка Монголии и России

Как видно на рисунке 16, четкого разделения на субпопуляции не наблюдается. Генетическая структура популяций яка России и Монголии не выражена.

Выборки из Тувы характеризуются единой генетической общностью, при этом в хозяйстве Малчын у части особей проявляется второй генетический кластер. Возможно, данная выборка несет в себе следы гибридизации с популяцией, не охваченной в данном исследовании. Структура популяций яка Алтая и Монголии не выражена, поскольку часть особей отнесены к красному кластеру, а другая часть – к синему. В связи с этим невозможно определить точную принадлежность к конкретной генетической группе.

Определены генетические различия между популяциями (табл. 12) по индексу  $F_{ST}$  и генетические дистанции Нея. Все значения невелики и статистически значимы ( $p < 0.05$ ).  $F_{ST}$  и генетические дистанции показывают, что выборки генетически дифференцированы друг от друга слабо, при этом относительно далекими от остальных являются выборки Гоби и Алтай.

Таблица 12.  $F_{ST}$  между популяциями и время в поколениях (выше диагонали), рассчитанное через дистанции Нея

|             | Гоби  | Хубс  | Алтай | Арыг  | Адарган | Сайз  | Малчын | Моген |
|-------------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|--------|-------|
| Гоби        | -     | 32    | 46    | 37    | 43      | 37    | 36     | 43    |
| Хубсугул    | 0.027 | -     | 40    | 22    | 27      | 25    | 36     | 37    |
| Алтай       | 0.046 | 0.036 | -     | 27    | 28      | 33    | 41     | 31    |
| Арыг-Хем    | 0.044 | 0.020 | 0.027 | -     | 19      | 19    | 30     | 20    |
| Адарган     | 0.057 | 0.032 | 0.033 | 0.025 | -       | 18    | 36     | 21    |
| Сайзырал    | 0.042 | 0.022 | 0.033 | 0.025 | 0.023   | -     | 26     | 25    |
| Малчын      | 0.041 | 0.038 | 0.044 | 0.040 | 0.051   | 0.032 | -      | 31    |
| Моген-Бурен | 0.052 | 0.043 | 0.033 | 0.025 | 0.030   | 0.032 | 0.041  | -     |

На основе числа мигрантов на поколение ( $Nm$ ) построена модель направленных относительных миграций (рис. 17). Для построения модели проводится определение гипотетического пула мигрантов для всех пар популяций и оценка  $Nm$  между каждой из двух популяций и гипотетическим пулом. Далее проводится оценка уровней относительной миграции между двумя популяциями на основе направленной генетической дифференциации.

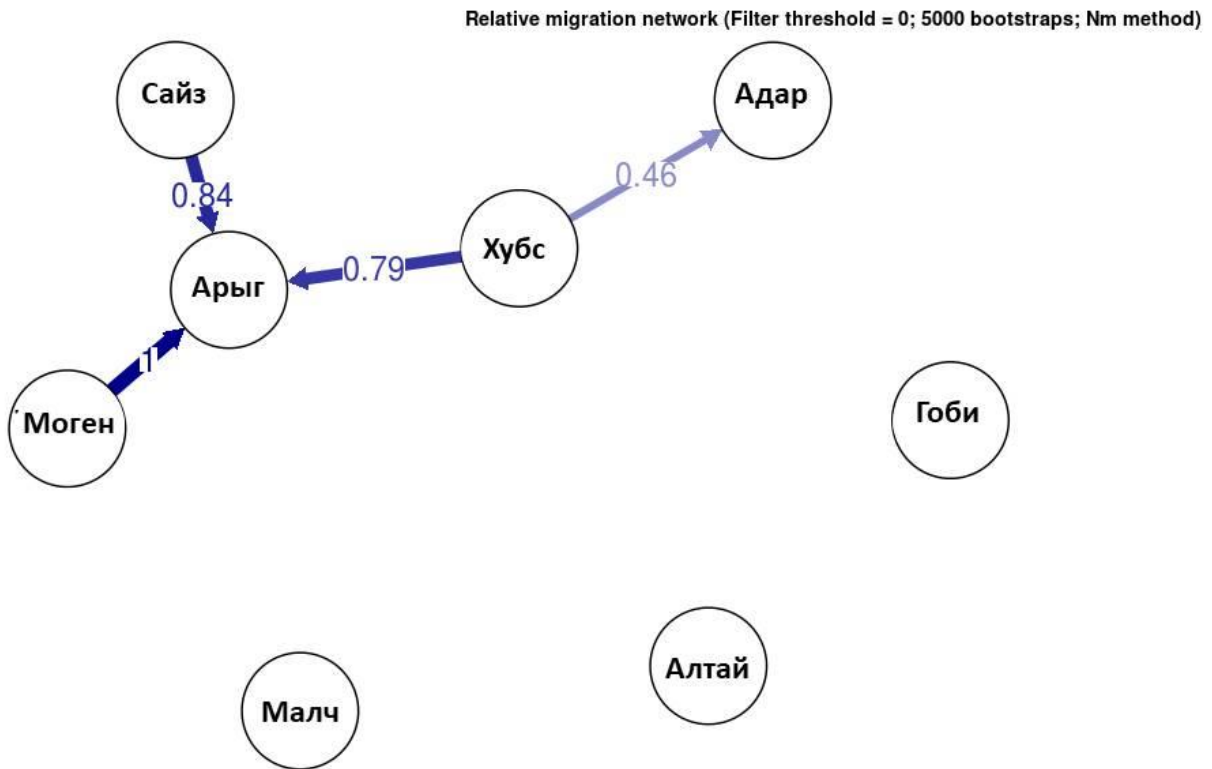


Рисунок 17. Модель направленных относительных миграций между выборками. Обозначения. Арыг – Арыг-Хем, Адар – Адарган, Сайз – Сайзырал, Малч – Малчын, Моген – Моген-Бурен, Хубс – Хубсугул. Цифры над стрелками обозначают уровень относительной миграции.

Согласно представленной модели, в выборку Арыг-Хем в одностороннем порядке происходят миграции из хозяйств Моген-Бурен, Сайзырал и Хубсугул. При этом наиболее высокий уровень относительной миграции с вероятностью 1 наблюдается из популяции Моген-Бурен. Отметим, что данный показатель в целом согласуется с генетической структурой Моген-Бурен и Арыг-Хем, которая демонстрирует наибольшее сходство данных популяций (рис. 16). Кроме этого, в Арыг-Хем отмечаются миграции из выборок Сайзырал и Хубсугул с вероятностью 0.84 и 0.79 соответственно. Наряду с этим, согласно рассматриваемой модели, из популяции Хубсугул с вероятностью 0.46 происходит миграция в Адарган. Сопоставление модели направленных

относительных миграций и генетической структуры популяций показывает, что вслед за снижением вероятности миграций между конкретными выборками наблюдается уменьшение их сходства в генетической структуре.

В связи с этим можно полагать, что модель направленных относительных миграций между выборками в целом согласуется и в определенной мере объясняет наблюдаемую генетическую структуру популяций (рис. 16, 17).

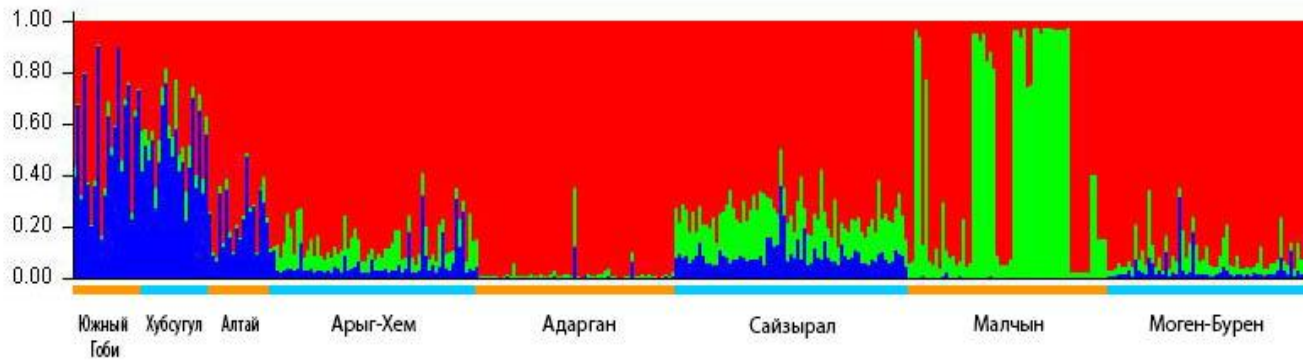


Рисунок 16. Генетическая структура популяций яка Монголии и России

Таким образом, генетическая структура популяций яка России и Монголии слабо дифференцирована. По своей структуре выборки из Тувы ближе друг к другу, чем к популяциям Алтая и Монголии. Популяция Алтай по структуре имеет больше сходства с монгольскими выборками. При этом все выборки слабо дифференцированы, на что указывают низкие значения  $F_{ST}$ .

Согласно сообщениям, китайские породы, монгольские и бурятские популяции яка разделились относительно недавно, на что указывают низкие значения  $F_{ST}$ , отсутствие корреляции между географическим и генетическим расстояниями [Xuebin, 2005; Zhang, 2008].

Эта особенность отличает домашнего яка от других сельскохозяйственных животных – крупного рогатого скота, коз, свиней, для которых характерны более высокие средние значения  $F_{ST}$  и, следовательно, большие генетические различия между породами [Xuebin, 2005].

### 3.3. Поиск ассоциаций гена *VEGF-A*, участвующего в генетической детерминации механизмов адаптации к гипоксии, с высотой горного рельефа у яков Саяно-Алтайского региона

#### 3.3.1. Выявление и анализ частоты SNP *g.8430T>C* в гене *VEGF-A* у яков Саяно-Алтайского региона

С целью выявления SNP *g.8430T>C* в 4 интроне гена *VEGF-A* амплифицирован фрагмент *VEGF-A\_1*. Размер ПЦР-фрагмента составил 244 п.н., что соответствует позициям 8217-8461 референсной последовательности NC\_007324 [Elsik, 2009].

Для последующей верификации проведено определение нуклеотидного состава полученных фрагментов методом секвенирования по двум цепям с использованием прямого и обратного праймеров (рис. 18А).

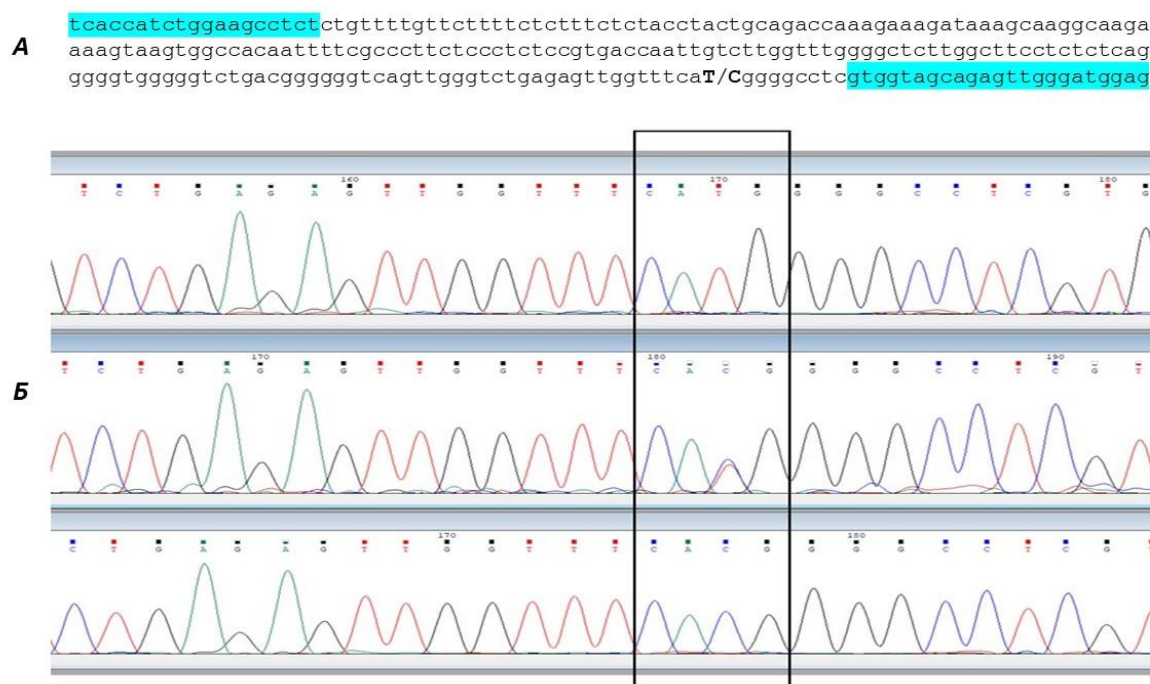


Рисунок 18. Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента *VEGF-A\_1*.

А. Нуклеотидная последовательность *VEGF-A\_1*.

Б. Хроматограмма результатов секвенирования.

Примечание. Т/С – варианты аллелей в последовательности. Последовательности, соответствующие праймерам, выделены цветом.

В результате секвенированы последовательности *VEGF-A\_1* 24 яков, выбранные в случайном порядке. Размер расшифрованной последовательности *VEGF-A\_1* составил 244 п.н., включая праймеры. В ходе анализа выявлены аллели *T/C* в позиции 213 (рис. 18А), что соответствует SNP *g.8430T>C* в 4 интроне гена *VEGF-A*. Генотипы *TT*, *CC* и *TC* наглядно отражены на хроматограмме (Рис. 18Б). На хроматограмме генотип *TC* детектируется как наложение двух пиков.

Поскольку исследуемый аллельный вариант *T* находится в области сайта рестрикции 5'- ↓*CATG* -3' (рис. 19), является возможным типирование SNP *g.8430T>C* методом ПДРФ с использованием эндонуклеазы рестрикции *Fat I*. В случае замены *T* в *g.8430* эндонуклеаза распознает сайт 5'- ↓*CATG* -3' и вносит односторонний разрыв в ПЦР-фрагменте *VEGF-A\_1*. В результате фрагмент 244 п.н. разрезается на два более коротких, длиной 210 п.н. и 34 п.н. (рис.19). В связи с этим, генотипирование SNP *g.8430T>C* в исследуемых выборках проводилось методом ПДРФ с использованием рестриктазы *Fat I*.

tcaccatctggaagcctctctgttttgttcttttctcttttctctacctaactgcagaccaaagaaagataaagcaaggcaagaa  
aagtaagtggccacaattttcgcccttctccctctccgtgaccaattgtcttgggttgggctcttggcttcctctctcaggg  
ggtaggggtctgacgggggtcagttgggtctgagagttggttt↓CATGGgggcctcgtggtagcagagttgggatggag

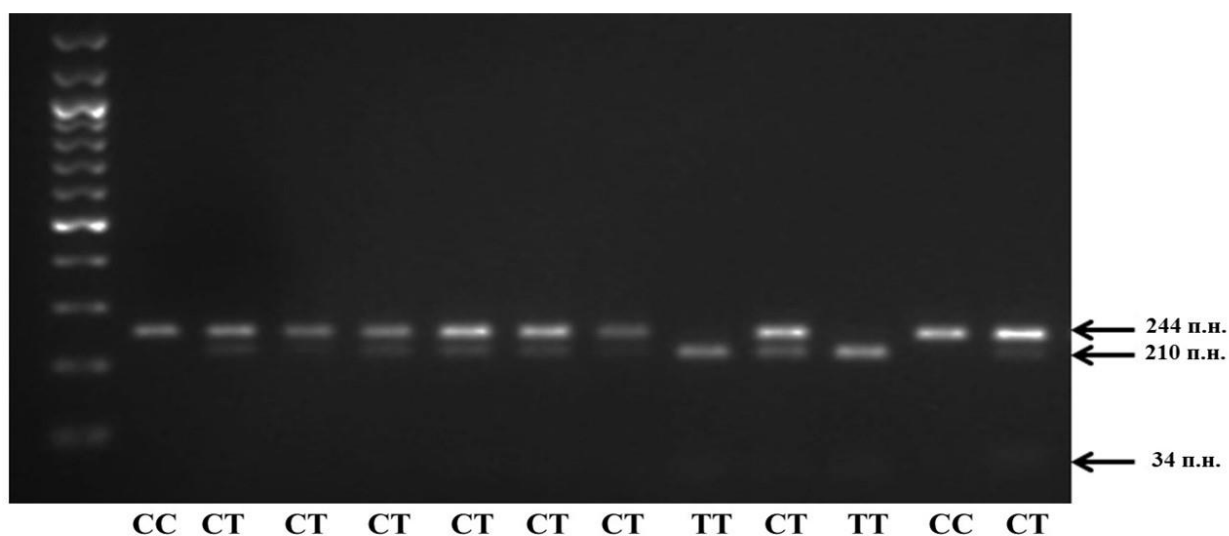


Рисунок 19. Последовательность *VEGF-A\_1*, содержащая сайт рестрикции и результат генотипирования SNP *g.8430T>C* методом ПЦР-ПДРФ.

В результате проведено генотипирование 477 яков (357 особей из России и 120 из Монголии), на основе которого выявлены частоты генотипов и аллелей в



позиции *g.8430* в гене *VEGF-A*, а также показатели генетического разнообразия яка Саяно-Алтайского региона (табл. 13).

Таблица 13. Встречаемость генотипов, аллелей в позиции *g.8430* в гене *VEGF-A* и показатели генетического разнообразия яка Саяно-Алтайского региона

| Выборка                    | Генотипы (%) |           |           | Аллели (%) |          | $H_E$ | $H_O$ | $HWE$    | $F_{IS}$ | Тест Эванса-Ваттерсона |
|----------------------------|--------------|-----------|-----------|------------|----------|-------|-------|----------|----------|------------------------|
|                            | <i>CC</i>    | <i>CT</i> | <i>TT</i> | <i>C</i>   | <i>T</i> |       |       |          |          |                        |
| <b>Гоби</b><br>N=43        | 0.21         | 0.35      | 0.44      | 0.38       | 0.62     | 0.35  | 0.48  | $p>0.05$ | 0.27     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Хубсугул</b><br>N=28    | 0.25         | 0.39      | 0.36      | 0.45       | 0.55     | 0.39  | 0.5   | $p>0.05$ | 0.22     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Ховд</b><br>N=49        | 0.29         | 0.61      | 0.1       | 0.59       | 0.41     | 0.61  | 0.49  | $p>0.05$ | -0.26    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Монголия</b><br>N=120   | 0.25         | 0.47      | 0.28      | 0.48       | 0.52     | 0.47  | 0.5   | $p>0.05$ | 0.07     | 0.019                  |
| <b>Алтай</b><br>N=34       | 0.24         | 0.5       | 0.26      | 0.49       | 0.51     | 0.5   | 0.51  | $p>0.05$ | 0.01     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Бурятия</b><br>N=46     | 0.46         | 0.48      | 0.06      | 0.7        | 0.3      | 0.48  | 0.43  | $p>0.05$ | -0.12    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Арыг-Хем</b><br>N=60    | 0.17         | 0.56      | 0.27      | 0.45       | 0.55     | 0.57  | 0.5   | $p>0.05$ | -0.14    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Адарган</b><br>N=51     | 0.29         | 0.57      | 0.14      | 0.58       | 0.42     | 0.57  | 0.5   | $p>0.05$ | -0.16    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Малчын</b><br>N=45      | 0.2          | 0.42      | 0.38      | 0.41       | 0.59     | 0.33  | 0.66  | 0.03     | 0.29     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Моген-Бурен</b><br>N=58 | 0.36         | 0.38      | 0.26      | 0.55       | 0.45     | 0.38  | 0.5   | $p>0.05$ | 0.24     | 0.021                  |
| <b>Сайзырал</b><br>N=63    | 0.33         | 0.45      | 0.22      | 0.56       | 0.44     | 0.44  | 0.5   | $p>0.05$ | 0.11     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Россия</b><br>N=357     | 0.29         | 0.48      | 0.23      | 0.53       | 0.47     | 0.46  | 0.5   | $p>0.05$ | 0.08     | 0.006                  |

где  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность,  $H_O$  – наблюдаемая гетерозиготность,  $HWE$  – отклонение от равновесия Харди-Вайнберга,  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга.

По нашим данным, соотношение генотипов в популяциях яка Монголии и России значимо не отличается. Так, в монгольских выборках в среднем генотипов  $CC - 0.25$ ,  $CT - 0.47$ ,  $TT - 0.28$ , в российской популяции  $CC - 0.29$ ,  $CT - 0.48$ ,  $TT - 0.23$ . Вместе с тем, при сравнении выборок относительно друг друга наблюдаются отличия в соотношении генотипов. Например, в монгольских выборках частота генотипа  $CC$  колеблется от 0.21 до 0.29, а в российских выборках частота  $CC$  генотипа от 0.17 до 0.47. В связи с этим, усредненные параметры не могут отображать в полной мере тенденцию соотношения генотипов.

В ходе анализа было установлено, что частоты аллелей  $C$  и  $T$  значимо не отличаются: в монгольских выборках в среднем доля  $C$  составляет 0.48,  $T - 0.52$ , в российских  $C - 0.53$ ,  $T - 0.47$ . Представляет интерес выборка Бурятия, где соотношение аллелей  $C$  и  $T$  равно 0.70 и 0.30 соответственно, при этом ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность значимо не отличаются, инбридинг и отклонение от равновесия Харди-Вайнберга не выявлены. Отметим, что в выборке Малчын наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность различаются в 2 раза, а также выявлен инбридинг и существенное отклонение от генетического равновесия. В выборках Хубсугул и Моген-Бурен наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность значимо отличаются. При этом в российских и монгольских выборках в целом отмечены инбридинг (0.08 и 0.07 соответственно) и вероятное действие отбора.

Таким образом, в результате исследования SNP  $g.8430T>C$  в гене  $VEGF-A$  у яков России и Монголии показано, что частоты аллелей  $T$  и  $C$  в исследованных выборках значимо не отличаются. Суммарное соотношение генотипов  $CC$  и  $TT$  в среднем почти равное, отмечается преобладание гетерозигот  $CT$ . В работе зарубежных авторов [Wu, 2013] при исследовании трёх пород яка, обитающих на разных высотах Цинхай-Тибетского нагорья, было показано, что частоты  $T$  и  $C$ -аллелей значимо не различаются.

### 3.3.2. Выявление и анализ частоты SNP g.14853G>A в гене *VEGF-A* у яков Саяно-Алтайского региона

Для выявления SNP *g.14853G>A* в 3'-некодируемой области гена *VEGF-A* проведена амплификация фрагмента длиной 240 п.н. в соответствии с позициями 14709-14949 референсной последовательности NC\_007324 [Elsik, 2009]. С целью верификации полученный ПЦР-фрагмент *VEGF-A\_2* был секвенирован в количестве 6 последовательностей.

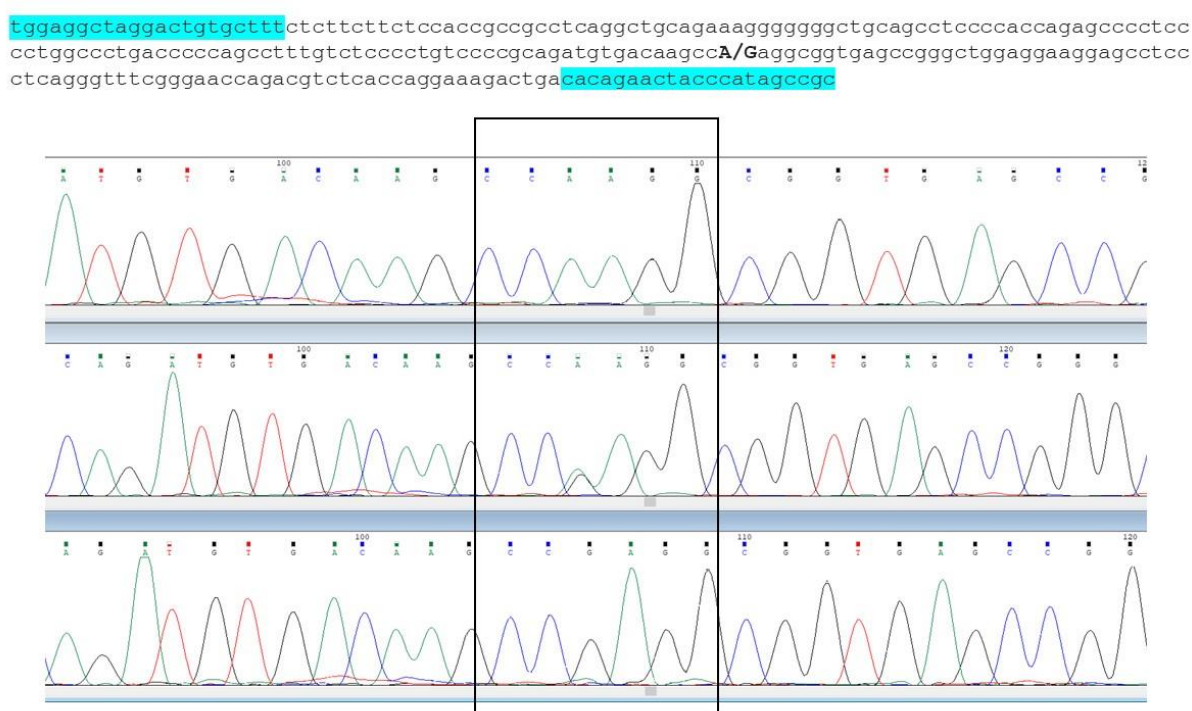


Рисунок 20. Анализ нуклеотидной последовательности фрагмента *VEGF-A\_2*.

А. Нуклеотидная последовательность *VEGF-A\_2*.

Б. Хроматограмма результатов секвенирования.

Примечание. А/Г — варианты аллелей в последовательности. Последовательности, соответствующие праймерам, выделены цветом.

Размер секвенированного фрагмента *VEGF-A\_2* составил 240 п.н., включая праймеры. Анализ нуклеотидного состава показал наличие замен *G>A* в позиции 145 (рис. 20А). Это соответствует SNP *g.14853 G>A* в гене *VEGF-A*. Генотипы АА,

GG, AG отражены на хроматограмме (Рис. 20Б), при этом AG детектируется наложением двух пиков.

В случае замены  $G>A$  в исследуемой позиции эндонуклеаза *Erh I* распознает сайт 5'- C↓CWWGG -3' и вносит односторонний разрыв, тем самым разрезая VEGF-A\_2 размером 240 п.н. на фрагменты длиной 143 и 97 п.н. (рис. 21). В связи с этим генотипирование SNP  $g.14853G>A$  в исследуемых выборках проводилось методом ПДРФ с использованием рестриктазы *Erh I*.

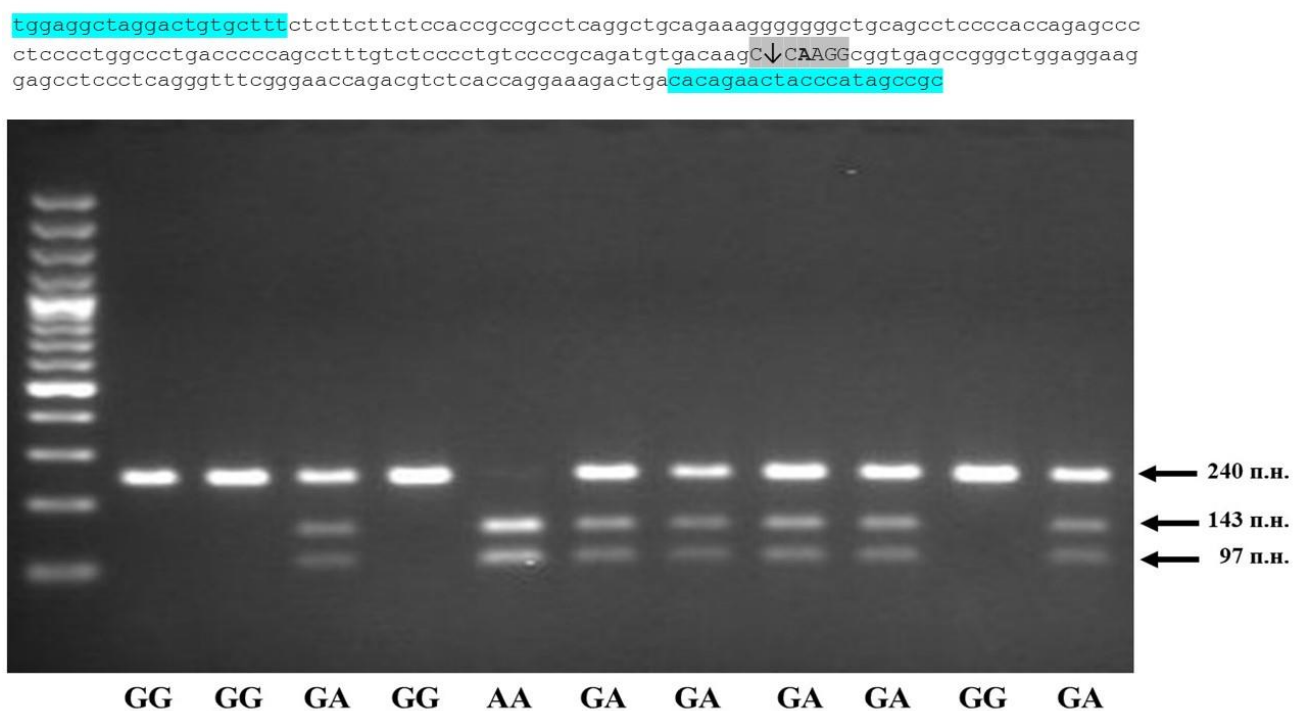


Рисунок 21. Последовательность VEGF-A\_2, содержащая сайт рестрикции и результат генотипирования SNP  $g.14853G>A$  методом ПДРФ.

В ходе типирования 477 яков из России и Монголии было показано наличие SNP  $g.14853G>A$  в гене VEGF-A. По нашим данным, во всех исследованных выборках частота аллеля *G* по отношению к *A*-аллелю существенно выше (табл. 14). Так, в монгольских выборках на долю *G*-аллеля в среднем приходится 0.69, в российских – 0.61. Вместе с тем, в хозяйстве из Бурятии отмечено существенное повышение частоты *G* (0.76), вероятно, вследствие инбридинга ( $F_{IS}$  0.18). В большинстве выборок, за исключением Адарган и Малчын, наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность значимо не отличаются.

Таблица 14. Встречаемость генотипов, аллелей в позиции *g.14853* в гене *VEGF-A* и показатели генетического разнообразия яка Саяно-Алтайского региона

| Выборка                    | Генотипы (%) |           |           | Аллели (%) |          | $H_E$ | $H_O$ | $HWE$    | $F_{IS}$ | Тест Эванса-Ваттерсона |
|----------------------------|--------------|-----------|-----------|------------|----------|-------|-------|----------|----------|------------------------|
|                            | <i>GG</i>    | <i>GA</i> | <i>AA</i> | <i>G</i>   | <i>A</i> |       |       |          |          |                        |
| <b>Гоби</b><br>N=43        | 0.49         | 0.42      | 0.09      | 0.7        | 0.3      | 0.42  | 0.43  | $p>0.05$ | 0.02     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Хубсугул</b><br>N=28    | 0.43         | 0.39      | 0.18      | 0.63       | 0.37     | 0.39  | 0.48  | $p>0.05$ | 0.18     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Ховд</b><br>N=49        | 0.47         | 0.49      | 0.04      | 0.71       | 0.29     | 0.49  | 0.41  | $p>0.05$ | -0.19    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Монголия</b><br>N=120   | 0.47         | 0.44      | 0.09      | 0.69       | 0.31     | 0.44  | 0.43  | $p>0.05$ | -0.02    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Алтай</b><br>N=34       | 0.2          | 0.65      | 0.15      | 0.53       | 0.47     | 0.65  | 0.51  | $p>0.05$ | -0.28    | 0.02                   |
| <b>Бурятия</b><br>N=46     | 0.61         | 0.3       | 0.09      | 0.76       | 0.24     | 0.3   | 0.37  | $p>0.05$ | 0.18     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Арыг-Хем</b><br>N=60    | 0.42         | 0.48      | 0.1       | 0.66       | 0.34     | 0.48  | 0.45  | $p>0.05$ | -0.07    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Адарган</b><br>N=51     | 0.35         | 0.61      | 0.04      | 0.66       | 0.34     | 0.61  | 0.46  | 0.02     | -0.34    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Малчын</b><br>N=45      | 0.40         | 0.33      | 0.27      | 0.51       | 0.43     | 0.24  | 0.43  | 0        | 0.64     | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Моген-Бурен</b><br>N=58 | 0.24         | 0.59      | 0.17      | 0.53       | 0.47     | 0.59  | 0.5   | $p>0.05$ | -0.17    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Сайзырал</b><br>N=63    | 0.29         | 0.54      | 0.17      | 0.56       | 0.44     | 0.54  | 0.5   | $p>0.05$ | -0.08    | $0.025<p<0.975$        |
| <b>Россия</b><br>N=357     | 0.36         | 0.50      | 0.14      | 0.61       | 0.39     | 0.48  | 0.52  | 0        | 0.09     | $0.025<p<0.975$        |

где  $H_E$  – ожидаемая гетерозиготность.  $H_O$  – наблюдаемая гетерозиготность.  $HWE$  – отклонение от Харди-Вайнберга.  $F_{IS}$  – коэффициент инбридинга.

Установлено следующее соотношение генотипов. В выборках из Монголии на долю гомозигот  $GG$  и  $AA$  приходится 0.47 и 0.09 соответственно, доля генотипа  $GA$  составляет 0.44. В российских популяциях в целом наблюдается тенденция преобладания генотипа  $GA$  (0.50), при этом на  $GG$  приходится 0.36, на  $AA$  – 0.14. Исключением являются выборки Бурятия ( $GG$  – 0.61,  $GA$  – 0.30,  $AA$  – 0.09), в которой отмечен инбридинг ( $F_{IS}$  0.18), а также Малчын ( $GG$  – 0.40,  $GA$  – 0.33,  $AA$  – 0.27). В хозяйстве Малчын отмечены сильный инбридинг ( $F_{IS}$  0.64) и отклонение от равновесия Харди-Вайнберга, что указывает на действие отбора на  $A$ -аллель. В выборке Адарган отмечено отклонение от равновесия Харди-Вайнберга. В популяции Алтай, согласно тесту Эванса-Ваттерсона, действует отбор. Однако, учитывая то, что данный тест малый по мощности, необходимо учитывать показатели  $HWE$  и  $F_{IS}$ . Так, отличия ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности значимы и невелики, коэффициент инбридинга  $F_{IS}$  -0.28.

Таким образом, в ходе исследования SNP  $g.14853G>A$  в гене  $VEGF$ -А было показано, что частота аллеля  $A$  в российских выборках в среднем значимо выше (0.39), чем в монгольских (0.31). На территории России преобладает генотип  $GA$  (0.50), в то время как в монгольской популяции наиболее распространен генотип  $GG$  (0.47). Кроме того, частота генотипа  $AA$  в популяции яка России (0.14) почти в полтора раза выше по сравнению с яками Монголии, где данный показатель составляет 0.09. Различия частот аллелей и генотипов России и Монголии значимы согласно точному тесту Фишера.

Известно, что гипоксия также индуцирует факторы, которые регулируют стабильность мРНК  $VEGF$  путем связывания с последовательностями, расположенными в 3'-нетранслируемой области  $VEGF$  у человека (Claffey, 1998). Стабилизация мРНК  $VEGF$ -А может приводить к значительному увеличению периода полураспада в норме короткоживущих транскриптов этого гена (Misquitta, 2001). По сообщениям, (Wu, 2013) SNP  $g.14853$  у яка находится в 3'-нетранслируемой области гена  $VEGF$ -А. Хотя прямых доказательств в настоящее время не существует, можно предположить, что нуклеотид в данной позиции ассоциирован со стабильностью мРНК этого гена у яка. Вероятно, замещение

$G>A$  в *VEGF-A* обеспечивает лучшую защиту от гипоксии. Поскольку як обитает на большой высоте с пониженным содержанием кислорода в атмосфере, высокая степень адаптации к гипоксии носителей  $A$ -аллеля и выбор гипоксической среды в течение длительного периода может привести к увеличению частоты аллеля  $A$  в популяции высокогорного яка (Wu, 2013).

### 3.3.3 Поиск ассоциаций гена *VEGF-A* с высотой горного рельефа у яков Саяно-Алтайского региона

Известно, что *VEGF-A* представляет собой ген, индуцированный гипоксией, продукт которого стимулирует формирование новых кровяных телец и повышает проницаемость кровеносных сосудов, участвует в патогенезе высокогорного отека головного мозга, обеспечивает мощный митогенез сосудистых эндотелиальных клеток и клеток гладкой мускулатуры, расслабляет кровеносные сосуды и увеличивает скорость кровотока, предотвращая легочную гипертензию [Christou, 1998; Kroll, Waltenberger, 1998; Marti, 1998; Xu, Severinghaus, 1998; Machein, 1999; Miquerol, 2000; Beall, 2007; Nagy, 2008; Кирова, 2016].

Все эти данные свидетельствуют о том, что *VEGF-A* может играть важную роль в адаптации яка к условиям высокогорья.

На территории Саяно-Алтайского региона России як обитает в районах, высота горного рельефа которых достигает до 3800 м над уровнем моря. В Монголии яка разводят на высоте до 3000 м над уровнем моря [Столповский и др., 2013].

По результатам исследований SNP маркера в позиции *g.8430T>C* в гене *VEGF-A* значимых различий частот аллелей и генотипов между исследуемыми популяциями не выявлено. Однако, при исследовании SNP маркера в позиции *g.14853G>A* в гене *VEGF-A* было показано, что различия частот аллелей и генотипов между российскими и монгольскими популяциями значимы согласно точному тесту Фишера. В связи с этим для анализа генетических основ детерминации механизмов адаптации к высотной гипоксии представляет интерес поиск ассоциаций гена *VEGF-A* с высотой горного рельефа у яков Саяно-Алтайского региона.

Для анализа были использованы генотипы двух SNP маркеров (*g.8430T>C* и *g.14853G>A*) и географические высоты местности разведения, *h* (м над уровнем моря). В анализе участвовало 477 яков из 10 выборок. Пример анализируемых данных отображен в табл. 15.



Таблица 15. Высота горного рельефа и генотипы SNP маркеров

| <b>Выборка</b> | <b><math>h</math></b> | <b><math>G_1</math></b> | <b><math>G_2</math></b> |
|----------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|
| Гоби_1         | 1417                  | 1                       | 0                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Адарган_1      | 1550                  | 2                       | 2                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Хубсугул_1     | 1715                  | 0                       | 0                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Ховд_1         | 1848                  | 1                       | 2                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Арыг-Хем_1     | 1958                  | 2                       | 2                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Бурятия_1      | 2231                  | 1                       | 2                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Моген-Бурен_1  | 2600                  | 0                       | 2                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Сайзырал_1     | 2600                  | 1                       | 1                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Малчын_1       | 2600                  | 1                       | 2                       |
| ...            |                       |                         |                         |
| Алтай_1        | 3005                  | 2                       | 0                       |
| ...            |                       |                         |                         |

Примечание:  $G_1$  – ( $n \times 1$ ) вектор генотипов  $SNP_1$  (TT=0, TC=1, CC=2), измеренных у всех особей;  
 $G_2$  – ( $n \times 1$ ) вектор генотипов  $SNP_2$  (GG=0, GA=1, AA=2), измеренных у всех особей.

Для анализа ассоциаций между высотой над уровнем моря и генотипами SNP маркеров была применена линейная регрессионная модель с фиксированными эффектами:

$$h = e\mu + G_1\beta_1 + G_2\beta_2 + G_1 * G_2\beta_3 + \varepsilon, \quad (1)$$

где  $n$  – общий объём выборки;  $e$  –  $(n \times 1)$  вектор единиц;  $\mu$  – интерсепт (скаляр);  $h$  –  $(n \times 1)$  вектор значений высоты над уровнем моря, назначенных для всех особей;  $G_1$  –  $(n \times 1)$  вектор генотипов SNP<sub>1</sub> (TT=0, TC=1, CC=2), измеренных у всех особей;  $G_2$  –  $(n \times 1)$  вектор генотипов SNP<sub>2</sub> (GG=0, GA=1, AA=2), измеренных у всех особей;  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  и  $\beta_3$  – регрессионные коэффициенты, характеризующие обратные эффекты высоты над уровнем моря на генотипы  $G_1$  и  $G_2$  и их взаимодействие, соответственно;  $\varepsilon$  –  $(n \times 1)$  вектор случайных значений, имеющий стандартное нормальное распределение с нулевым вектором матожиданий и единичной ковариационной матрицей,  $N(0, I)$ .

Параметрами интереса модели (1) являются регрессионные коэффициенты  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  и  $\beta_3$ , относительно которых было проведено тестирование нулевой гипотезы об отсутствии каких-либо ассоциаций,  $H_0 (\beta = 0)$ , против альтернативной гипотезы  $H_1 (\beta \neq 0)$ .

Тестирование гипотез было выполнено с помощью критерия Фишера, основанного на F-статистике, имеющей F-распределение со степенями свободы  $df_1=n-m-1$  и  $df_2=m$ :

$$F = \frac{R^2(n-m-1)}{(1-R^2)m},$$

где  $m$  – число регрессионных коэффициентов;  $R^2 = \frac{\tilde{h}^T \tilde{G} (\tilde{G}^T \tilde{G})^{-1} \tilde{G}^T \tilde{h}}{n}$  – коэффициент детерминации (здесь « $\sim$ » обозначает стандартизованные значения).

С использованием встроенных функций *anova()* и *cor.test()* из стандартных библиотек R-среды показаны значимая ассоциация между SNP<sub>2</sub> и высотой над уровнем моря (рис. 22) и значимая корреляция между тем же маркером и высотой над уровнем моря (рис. 23).

```
> fit <- glm(h ~ G1 + G2 + G1*G2, family = "gaussian")
> anova(fit, test = 'F')
Analysis of Deviance Table
Model: gaussian, link: identity
Response: h
Terms added sequentially (first to last)
```

|       | Df | Deviance | Resid. Df | Resid. Dev | F              | Pr(>F)               |
|-------|----|----------|-----------|------------|----------------|----------------------|
| NULL  |    |          | 476       | 112115014  |                |                      |
| G1    | 1  | 93768    | 475       | 112021246  | 0.4091         | 0.5227364            |
| G2    | 1  | 3251028  | 474       | 108770218  | <b>14.1839</b> | <b>0.0001867 ***</b> |
| G1*G2 | 1  | 355698   | 473       | 108414520  | 1.5519         | 0.2134767            |
| ---   |    |          |           |            |                |                      |

```
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

Рисунок 22. Результаты *anova()*.

Красным цветом выделено р-значение, показывающее значимую ассоциацию между SNP g.14853G>A и высотой над уровнем моря.

```
> cor.test(h,G2) #SNP2
Pearson's product-moment correlation
data: h and G2
t = -3.6535, df = 475, p-value = 0.0002874
alternative hypothesis: true correlation is not equal to 0
95 percent confidence interval:
-0.25137967 -0.07668589
sample estimates:
cor
-0.1653293
```

Рисунок 23. Результаты *cor.test()*.

Красным цветом выделено р-значение, показывающее значимую корреляцию (<0.05) между SNP g.14853G>A и высотой над уровнем моря.

Таким образом, были выявлены ассоциация и корреляция между высотой горного рельефа и генотипом SNP *g.14853G>A* гена *VEGF-A* у яков Саяно-Алтайского региона России и Монголии.

Ранее, при исследовании трёх пород яка, обитающих на разных высотах Цинхай-Тибетского нагорья, была отмечена тенденция – с повышением высоты наблюдался рост частоты аллеля *A* в позиции *g.14853* гена *VEGF-A* (Wu, 2013). Так, у породы Gannan (*h*=3600 м) частота данного аллеля составила 0.303, у породы Datong (*h*=3100 м) – 0.266, а у породы Tianzhu (*h*=2700 м) – 0.146. Однако, в данной работе поиск ассоциаций и корреляций генотипов SNP маркеров с высотой рельефа не проводился.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование полиморфизма D-петли мтДНК яка Саяно-Алтайского региона России и Монголии показало довольно высокое гаплотипическое разнообразие. Несмотря на сравнительно малый объём выборки, выявлено в общей сложности 17 гаплотипов из гаплогрупп А, В, С, D и Е. Самое высокое разнообразие отмечено в тувинской популяции. Так, в результате исследования 50 особей выявлено 14 гаплотипов. В ходе работы обнаружено четыре новых гаплотипа: А4, А13, D9 и Е3.

Изучение вклада материнской генетической компоненты в формирование внутривидового и межвидового разнообразия мтДНК яка на основе 952 последовательностей выявило наличие двух крупных клад, которые включают в себя гаплогруппы А, В, Е и С, D. Показано, что гаплотипы, описанные у дикого яка и различных пород и географических популяций одомашненного яка, присутствуют во всех гаплогруппах. Кроме того, продемонстрировано, что гаплотипы диких яков не выделяются в отдельные клады, а расположены вместе с гаплотипами одомашненных яков. Также необходимо отметить, что подавляющее большинство описанных гаплотипов встречается как у диких, так и у одомашненных яков. В связи с этим, можно предположить, что дикий и домашний яки унаследовали от предка изначально высокое гаплотипическое разнообразие, которое сохранилось до настоящего времени. Гаплотипы не ассоциированы ни с породной, ни с географической принадлежностью яка. Судя по всему, гаплотипы и их группы сформировались ещё до одомашнивания.

В результате анализа генетической изменчивости 15 универсальных микросателлитных локусов, разработанных для КРС, было показано, что наиболее информативными для популяционных исследований яка являются локусы *CSSM66*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA53*, *CSRM60*, *BM2113*, которые характеризуются наиболее высокими значениями средней эффективной численности, потока генов и индекса полиморфности *PI*C.

На основе 15 микросателлитных локусов показано, что аллельное разнообразие в тувинских популяциях в значительной степени ниже, чем в алтайской и монгольских. Это можно объяснить как их положением на краю ареала вида, так и резким сокращением поголовья конце XX в.

Анализ генетической структуры с использованием микросателлитных локусов показал, что популяции яка России и Монголии слабо дифференцированы. Выборки из Тувы по структуре более сходны друг с другом, чем с другими популяциями. Популяция Алтай по своей структуре ближе к монгольским. Все выборки слабо дифференцированы, на что указывают низкие значения  $F_{ST}$  и генетические дистанции. Полученные результаты согласуются с мировыми. Для китайских, монгольских и бурятских популяций яка показаны низкие значения  $F_{ST}$  и отсутствие корреляции между географическим и генетическим расстояниями. Эта особенность отличает домашнего яка от других сельскохозяйственных животных, для которых характерны более высокие средние значения  $F_{ST}$  и, следовательно, большие генетические различия между породами.

В рамках поиска ассоциаций гена *VEGF-A*, участвующего в генетической детерминации механизмов адаптации к гипоксии, с высотой горного рельефа, впервые у яков России и Монголии выявлены частоты аллелей SNP  $g.8430T>C$  и SNP  $g.14853G>A$ . Показано, что частоты аллелей  $T$  и  $C$  в позиции  $g.8430$  в исследованных выборках значимо не отличаются. Соотношение генотипов  $CC$  и  $TT$  в среднем почти равное, отмечается преобладание гетерозигот  $CT$ . Показано, что частота аллеля  $A$  в  $g.14853$  в российских выборках в среднем значимо выше (0.39), чем в монгольских (0.31). На территории России преобладает генотип  $GA$  (0.50), в то время как в монгольской популяции наиболее распространен генотип  $GG$  (0.47). Частота генотипа  $AA$  в популяции яка России (0.14) почти в полтора раза выше по сравнению с яками Монголии (0.09).

В результате сопоставления географической высоты районов разведения яка с генотипами SNP маркеров выявлена ассоциация и корреляция географической высоты с SNP  $g.14853G>A$ . Таким образом, впервые показано, что ген *VEGF-A* ассоциирован с адаптацией к условиям высокогорья. В целом наблюдается

тенденция повышения частоты аллеля  $A$  с увеличением высоты исследуемого района.

## ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что популяции яка *Bos grunniens* Саяно-Алтайского региона России и Монголии характеризуются высоким гаплотипическим разнообразием мтДНК. Из 17 выявленных нами гаплотипов у яков России и Монголии 4 гаплотипа описаны впервые.

2. Филогенетический анализ D-петли мтДНК выявил, что подавляющее большинство гаплотипов встречается как у одомашненных яков различных пород и географических популяций, так и у диких яков. Кроме этого, гаплогруппы образованы гаплотипами, выявленными у одомашненных и диких яков. Таким образом, гаплотипы не ассоциированы ни с формой (дикая или одомашненная), ни с породной или географической принадлежностью яка.

3. Впервые показано, что универсальные микросателлитные локусы *CSSM66*, *INRA023*, *SPS115*, *TGLA53*, *CSRM60* и *BM2113*, разработанные для КРС, являются также информативными и пригодны для популяционных исследований яка *Bos grunniens*.

4. Впервые показано, что российские и монгольские популяции яка в целом характеризуются достаточно низким аллельным разнообразием микросателлитных локусов и невысоким уровнем генетических различий между популяциями. Генетическая структура яка Саяно-Алтайского региона России и Монголии указывает на слабую дифференциацию данных популяций.

5. Показана общая тенденция повышения частоты аллеля *A* в позиции *g.14853* гена *VEGF-A*, участвующего в механизмах адаптации к высокогорной гипоксии, с ростом высоты горного рельефа.



## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность за ценные советы, наставничество и колоссальную помощь в биоинформатической и математико-статистической обработке полученных результатов сотрудникам лаборатории сравнительной генетики животных ИОГен РАН к.б.н., в.н.с. **Гульнаре Рустамовне Свищёвой**, к.б.н., с.н.с. **Евгению Андреевичу Конорову**, к.б.н., н.с. **Илье Витальевичу Артюшину**.

Автор выражает благодарность и **Анне Вадимовне Урум** (МГУ имени М.В.Ломоносова) за сотрудничество на разных этапах исследований.

Автор выражает сердечную благодарность к.б.н., с.н.с **Елене Уразовне Мартыновой** (ИОГен РАН) и к.б.н. **Марии Николаевне Рузиной** (Институт медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Сеченовского университета) за ценные замечания и постоянную поддержку.

## Список литературы

1. Alcala, N. On the transition of genetic differentiation from isolation to panmixia: What we can learn from GST and D / N. Alcala, J. Goudet, S. Vuilleumier // Theor. Pop. Biol. – 2014. – V. 93. – P. 75-84.
2. Ashley, M. The use of microsatellite analysis in population biology: background. methods and potential applications / M. Ashley, B. Dow // Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications. – 1994. – V. 69. – P. 185-201.
3. Ayres, D. L. BEAGLE: an application programming interface for statistical phylogenetics / Ayres D.L., D. J. Darling, P. Zwickl // Syst. Biol. – 2012. – V. 61. – P. 170-173.
4. Bailey, J. Genetic variation of mitochondrial DNA within domestic yak populations / J. Bailey, B. Healy, H. Jianlin // In Proceedings of the Third International Congress on Yak held in Lhasa. – 2002. – P. 181-189.
5. Bao, P. Complete mitogenome sequencing and phylogenetic analysis of PaLi yak (*Bos grunniens*) / P. Bao, X. Guo, J. Pei // Mitochondrial DNA. – 2016. – Part A. 1394. – P.1-2.
6. Beall, C. M. Detecting natural selection in high-altitude human populations / C. M. Beall // Respir. Physiol. Neurobiol. – 2007. – V. 158. – P. 161-171.
7. Beall, C. M. Natural selection on EPAS1 (*HIF2 $\alpha$* ) associated with low hemoglobin concentration in Tibetan highlanders / C. M. Beall, G. L. Cavalleri, L. Deng // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2010. – V. 107. – P. 11459-11464.
8. Belyar, D. K. Domestication of Yakutsk / D. K. Belyar // Siberian Publication House. – 1980. – 241 pp.
9. Buntjer, J. B. Phylogeny of bovine species based on AFLP fingerprinting / J. B. Buntjer, M. Otsen, I. J. Nijman // Heredity. – 2002. – V. 88. – P. 46-51.

10. Buzzard, P. *Bos mutus* / P. Buzzard, J. Berger // The IUCN Red List of Threatened Species. – 2016. – doi:10.2305/IUCN.UK.20162.RLTS.T2892A101293528
11. Cai, X. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the genome of Yak (*Bos grunniens*) / X. Cai, T. Mipam, T. Zhao, L. Sun // Molecular Biology Rep. – 2014. – V. 41. – № 6. – P. 3829-3837.
12. Chapuis, M. P. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation / M. P. Chapuis, A. Estoup // Mol. Biol. Evol. – 2006. – V. 24. – № 3. – P. 621-631.
13. Chen, N. Whole-genome resequencing reveals world-wide ancestry and adaptive introgression events of domesticated cattle in East Asia / N. Chen, Y. Cai, Q. Chen // Nature Communications. – 2018. – V. 9. – № 2337. DOI: [10.1038/s41467-018-04737-0](https://doi.org/10.1038/s41467-018-04737-0)
14. Christou, H. Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension / H. Christou, A. Yoshida, V. Arthur // Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. – 1998. – V. 18. – P. 768-776.
15. Chu, M. The complete sequence of mitochondrial genome of polled yak (*Bos grunniens*) / M. Chu, X. Wu, C. Liang, J. Pei, X. Ding, X. Guo, P. Bao, P. Yan // Mitochondrial DNA. – 2014. – V. 27. – № 3. – P. 1-2.
16. Claffey, K. P. Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability / K. P. Claffey, S. C. Shih, A. Mullen // Mol. Biol. Cell. – 1998. – V. 9. – P. 469-481.
17. Clauss, M. Molecular biology of the VEGF and the VEGF receptor family / M. Clauss // Semin. Thromb. Hemost. – 2000. – V. 26. – P. 561-569.
18. Cui, G. Composition of the milk of yaks raised at different altitudes on the Qinghai-Tibetan Plateau / G. Cui, F. Yuan, A. Degen // International Dairy Journal. – 2016. – V. 59. – P. 29-35.
19. Dempster, A. P. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm / A. P. Dempster, N. M. Laird, D. B. Rubin // J Roy. Stat. Soc. – 1977. – V. 39. – P. 1-38.

20. Dorji, T. Genetic diversity in Bhutanese yak (*Bos grunniens*) populations using microsatellite markers / T. Dorji, M. Goddard, J. Perkins // Proceedings of the third international congress on yak held in Lhasa, China. – 2000. – P. 197-201.
21. Dyblor, E. The first time to discovery of yak fossils in Yakutsk / E. Dyblor // Vertebrate Palasiatica. – 1957. – V. 1. – № 4. – P. 293-300.
22. E, G. Complete mitochondrial genome of the rare subspecies of genus *Bos*, Tianzhu white yak from Tibetan area in China / G. E, R. Na, Y. Zhao // Mitochondrial DNA. – 2016. – V. 27. – № 2. – P. 1443-1444.
23. Earl, D. A. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method / D. A. Earl, B. M. vonHoldt // Conservation Genetics Resources. – 2012. – V 4. – № 2. – P. 359-361.
24. Edgar, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R.C. Edgar // Nucl. Acids Research. – 2004. – V. 32. – № 5. – P. 1792-1797.
25. Elsik, C. The Genome Sequence of Taurine Cattle: A Window to Ruminant Biology and Evolution / C. Elsik, R. Tellam, K. Worley // Science. – 2009. – V. 324. – № 5926. – P. 522-528.
26. Excoffier, L. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis / L. Excoffier, G. Laval, S. Schneider // Evolutionary bioinformatics. – 2005. – V. 1. – P. 117693430500100003.
27. Fang, Y. C. The analysis of the situation and development prospect of Chinese wild yak / Y. C. Fang // Agricultural Information & Technology. – 2009. – V. 14-15.
28. FAO. DAD-IS. [www.fao.org/dad-is/en/](http://www.fao.org/dad-is/en/)
29. Feng, Z.J., Cai, G.Q., Zheng, C.L. The mammal in Tibet / Z. J. Feng, G. Q. Cai, C. L. Zheng // Beijing: Science Press. – 1986.
30. Ferrara, N. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells / N. Ferrara, W.J. Henzel // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1989. – V. 161. – P. 851-858.

31. Ferrara, N. The biology of VEGF and its receptors / N. Ferrara, H. P. Gerber, J. LeCouter // *Nat. Med.* – 2003. – V. 9. – P. 669-676.
32. Flerow, C.C. On the geographic distribution of the genus *Poephagus* during the Pleistocene and Holocene / C.C. Flerow // *Quaternary Paleontol.* (East) Berlin. – 1980. – V. 4. – P. 123-126.
33. Fox, J. The mountain ungulates of Ladakh, India / J. Fox, C. Nurbu, R. Chundawat // *Biol. Conserv.* – 1991. – V. 58. – P. 167-190.
34. Ge, F. Cloning and characterization of MHC-DQA1 and MHC-DQA2 molecules from yak (*Bos grunniens*) / F. Ge, S. Memon, D. Xi // *Archiv Tierzucht.* – 2016. – V. 59. – № 3. – P. 395-400.
35. Gerald, W. The yak / W. Gerald, J. L. Han, R. J. Long // Food and Agricultural Organization of the United Nations. – 2003. – P. 460.
36. Goe, M. Monitoring of traits for yak and yak hybrids / M. Goe, G. Stranzinger // In *Proceedings of the Third International Congress on Yak held in Lhasa.* – 2002. – P. 291-299.
37. Goudet, J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics / J. Goudet // *Mol. Ecol. Res.* – 2005. – V. 5. – № 1. – P. 184-186.
38. Gray, J. E. Catalogue of the specimens and drawings of mammals, birds, reptiles, and fishes of Nepal and Tibet / Gray, J. E. – 1863. – 90 pp.
39. Greb, R. R. Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) mRNA expression levels decrease after menopause in normal breast tissue but not in breast cancer lesions / R. R. Greb, I. Maier, D. Wallwiener, L. Kiesel // *Br. J. Cancer.* – 1999. – V. 8. – № 1. – P. 225-231.
40. Groeneveld, L. F. The GLOBALDIV Consortium. Genetic diversity in farm animals – a review / L. F. Groeneveld, J. A. Lenstra, H. Eding // *Animal Genetics.* – 2010. – V. 41. – № 1. – P. 6-31.
41. Guo, S. Origin of mitochondrial DNA diversity of domestic yaks / S. Guo, P. Savolainen, J. Su // *BMC Evol. Biol.* – 2006. – V. 6. – № 73. – doi:10.1186/1471-2148-6-73

42. Guo, X. The complete mitochondrial genome of the Qinghai Plateau yak *Bos grunniens* (Cetartiodactyla: Bovidae) / X. Guo, J. Pei, P. Bao // Mitochondrial DNA. – 2016. – V. 27. – № 4. – P. 2889-2890.
43. He, Y. Changes in the Anatomic and Microscopic Structure and the Expression of HIF-1 $\alpha$  and VEGF of the Yak Heart with Aging and Hypoxia / Y. He, S. Yu, J. Hu // Plos One. – 2016. – V. 11. – № 2. – doi:10.1371/journal.pone.0149947
44. Katoh, K. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment / K. Katoh, K. Kuma, H. Toh, T. Miyata // Nucl. Acids Res. – 2005. – V. 33. – № 2. – P. 511-518. – doi 10.1093/nar/gki198
45. Kroll, J. VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR) / J. Kroll, J. Waltenberger // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1998. – V. 252. – P. 743-746.
46. Kuang, L. High-altitude adaptation of yak based on genetic variants and activity of lactate dehydrogenase-1 / L. Kuang, Y. Zheng, Y. Lin // Biochemical Genetics. – 2010. – V. 48. – № 5. – P. 418-427.
47. Lai, S. Mitochondrial DNA sequence diversity and origin of Chinese domestic yak / S. Lai, S. Chen, Y. Liu, Y. Yao // Animal Genet. – 2007. – V. 38. – P. 77-80.
48. Lan, D. Identification and characteristics analysis of toll-like receptors family genes in yak / D. Lan, B. Lin, X. Xiong // Genes and Genomics. – 2016. – V. 38. – № 5. – P. 429-438.
49. Lanfear, R. PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses / R. Lanfear, B. Calcott, SYW. Ho, S. Guindon // Mol. Biol. Evol. – 2012. – V. 29. – № 6. – P. 1695-1701. – doi 10.1093/molbev/mss020 bioinformatics/btu033
50. Leslie, D. *Bos grunniens* and *Bos mutus* (Artiodactyla: Bovidae) / D. Leslie, G. Schaller // Mammalian Species. – 2009. – P. 1-17.
51. Li, D. Genetic diversity of DNA microsatellite for Tibetan Yak / D. Li, Z. X. Chai, Q. M. Ji // Yi Chuan. – 2013. – V. 35. – № 2. – P. 175-184.

52. Li, L. Significance and determination of RBC, Hb and Mb in yak of various ages / L. Li, M. Shen, H. Yu // *Acta Ecologiae Animalis Domastici*. – 2006. – V. 27. – P. 51-54.
53. Li, Q. Construction of microsatellite-enriched library of yak and phylogenetic study of six Chinese yak populations using yak-specific microsatellites / Q. Li, X. Zhao, Y. Li // *Proceedings of the fourth International Congress on Yak*. – Chengdu. Sichuan. China. – 2004. – P. 109-111.
54. Liang, C. Genome-wide Association Study Identifies Loci for the Polled Phenotype in Yak / C. Liang, L. Wang, X. Wu // *PLoS ONE*. – 2016a.
55. Liang, C. Characterization of the complete mitochondrial genome sequence of wild yak (*Bos mutus*) / C. Liang, X. Wu, X. Ding // *Mitochondrial DNA*. – 2016b. – V. 27. – № 2. – P. 1014-1015.
56. Liu, F. Y. Effect of different grazing intensities on grazing behavior of yak in summer / F. Y. Liu, R. J. Long // *Journal of Lanzhou University (Natural Science)*. – 2009. – V. 45. – № 2. – P. 55-60.
57. Liu, W. L. The origins and current situation of wild Yaks / W. L. Liu // *Journal of Tibet University*. – 2007. – V. 22. – № 1. – P. 114-117.
58. Lu, Z. L. Retrospect and prospect on science and technology development of yak in China / Z. L. Lu // *China Cattle Science*. – 2007. – V. 33. – № 4. – P. 3-13.
59. Ma, X. Observation of the histological structure of adult yak bronchial arteries / X. Ma, Y. Cui, J. He, B. Yang // *Chinese Veterinary Science*. – 2011. – V. 39. – P. 261–265.
60. Ma, Z. J. Genetic diversity in the mtDNA D-Loop region of wild yak (*Bos grunniens mutus*) / Z. J. Ma, J. C. Zhong, J. L. Han // *Acta Ecologica Sinica*. – 2009. – V. 29. – № 9. – P. 4798-4803.
61. Ma, Z. Genetic diversity and demographic history of wild Yak (*Bos grunniens mutus*) inferred from mtDNA D-loop sequences / Z. Ma, J. Zhong, J. Han // *African Journal of Biotechnology*. – 2010. – V. 9. – № 46. – P. 7805-7810.

62. Machein, M. R. Vascular endothelial growth factor expression, vascular volume, and, capillary permeability in human brain tumors / M. R. Machein, J. Kullmer, B.L. Fiebich // *Neurosurgery*. – 1999. – V. 44. – P. 732-740.
63. Mao, Y. The analysis of genetic diversity and differentiation of six Chinese cattle populations using microsatellite markers / Y. Mao, H. Chang, Z. Yang // *J Genet Genomics*. – 2008. – V. 35. – № 1. – P. 25-32.
64. Mao, Y. Genetic structure and differentiation of three Chinese indigenous cattle populations / Y. Mao, H. Chang, Z. Yang // *Biochem Genet*. – 2007. – V. 45. – № 3. – P. 195-209.
65. Marti, H. H. Systemic hypoxia changes the organ-specific distribution of vascular endothelial growth factor and its receptors / H. H. Marti, W. Risau // *PNAS*. – 1998. – V. 95. – P. 15809-15814.
66. Maxwell, P. H. Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator / P. H. Maxwell // *Experimental Physiology*. – 2005. – V. 90. – P. 791-797.
67. Medugorac, I. Whole-genome analysis of introgressive hybridization and characterization of the bovine legacy of Mongolian yaks / I. Medugorac, A. Graf, C. Grohs // *Nature Genetics*. – 2017. – V. 49. – P. 470-475.
68. Miller, D. Wild yaks and their conservation on the Tibet Plateau. In *Proc. 1<sup>st</sup> Int. Congress on Yak*, ed. R. Zhang, J. Han J. Wu / D. Miller, R. Harris, G. Cai // *Gansu Agricultural University, Lanzhou*. – 1994. – P. 27-34.
69. Minqiang, W. Analysis of two Chinese yak (*Bos grunniens*) populations using bovine microsatellite primers / W. Minqiang, S. Weigend, A. Barre-Dirie // *J. Animal Breed. Genet*. – 2003. – V. 120. – № 4. – P. 237-244.
70. Mipam, T. Maternal phylogeny of a newly-found yak population in China / T. Mipam, Y. Wen, C. Fu // *International Journal of Molecular Science*. – 2012. – V. 13. – № 9. – P. 11455-11470.
71. Miquerol, L. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression / L. Miquerol, B. L. Langille, A. Nagy // *Development*. – 2000. – V. 127. – P. 3941-3946.



72. Misquitta, C. M. The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology / C. M. Misquitta, V. R. Iyer, E. S. Werstiuk, A. K. Grover // *Mol. Cell Biochem.* – 2001. – V. 224. – P. 53-67.

73. Nagy, J. A. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis / J. A. Nagy, L. Benjamin, H. Zeng // *Angiogenesis.* – 2008. – V. 11. – № 2. – P. 109-119.

74. NCBI: id= 72004. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=72004>

75. NCBI: txid30521. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=30521>

76. Nguyen, T. Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of Swiss yak (*Poephagus grunniens*) / T. Nguyen, S. Genini, F. Menetrey // *Animal Genetics.* – 2005. – V. 36. – № 6. – P. 484-489.

77. Nijman, I. J. Mutation and recombination in cattle satellite DNA: a feedback model for the evolution of satellite DNA repeats / I. J. Nijman, J.A. Lenstra // *Journal of Molecular Evolution.* – 2001. – V. 52. – № 4. – P. 361-371.

78. Olsen, S. J. Confused yak taxonomy and evidence of domestication / S. J. Olsen // *Illinois State Museum Scientific Papers.* – 1991. – V. 23. – P. 387-393.

79. Olsen, S. J. Fossil ancestry of the yak, its cultural significance and domestication in Tibet / S. J. Olsen // *Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia.* – 1990. – V. 142. – P. 73-100.

80. Paradis, E. Pegas: an R package for population genetics with an integrated–modular approach / E. Paradis // *Bioinformatics.* – 2010. – V. 26. – № 3. – P. 419-420.

81. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P. E. Smouse // *Mol. Ecol. Res.* – 2006. – V. 6. – № 1. – P. 288-295.

82. Peripolli, E. Genome wide association study for beef tenderness in Polled Nellore cattle / E. Peripolli, R. O Silva, L. Castro // *International meeting of advances in animal science (IMAS).* – 2016. – V. 1. [Proceeding...]

83. Prinzenberg, E. M. Variants of CSN3 in Chinese yak (*Bos grunniens*) / E. M. Prinzenberg, J. Han, G. Erhardt // Proceedings of the 28th International conference of Animal Genetics held in Göttingen. – Germany. – 2002. – P. 127.
84. Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data / J. K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. – 2000. – V. 155. – № 2. – P. 945-959.
85. Qi, X. B. Understanding yak pastoralism in Central Asian Highlands: genetic evidence for origin, domestication and dispersion of domestic yak / X. B. Qi, J. L. Han, R. Blench // Past human migrations in East Asia: matching archaeology, linguistics and genetics. – Taylor & Francis Group. – 2008. – P. 427–442.
86. Qi, X. B. Assessment of cattle genetic introgression into domestic yak populations using mitochondrial and microsatellite DNA markers / X. B. Qi, H. Jianlin, G. Wang // Animal Genet. – 2010. – V. 41. – № 3. – P. 242-252.
87. Qing, G. Hypoxia inducible factor-2 $\alpha$ : a critical mediator of aggressive tumor phenotypes / G. Qing, M.C. Simon // Current Opinion in Genetics & Development. – 2009. – V. 19. – P. 60–66.
88. Qiu, Q. Yak whole-genome resequencing reveals domestication signatures and prehistoric population expansions / Q. Qiu, L. Wang, K. Wang // Nature Communicat. – 2015. – V. 6. – Article number 10283.
89. Qiu, Q. The yak genome and adaptation to life at high altitude / Q. Qiu, G. Zhang, T. Ma // Nature genetics. – 2012. – V. 44. – № 8. – P. 946-9.
90. Ramesha, K. P. Application of cattle microsatellite markers to assess genetic diversity of Indian yaks / K. P. Ramesha, T. K. Biswas, S. Jayakumar // The Indian Journal of Animal Sciences. – 2012. – V. 82. – № 7. – P. 770-772.
91. Ronquist, F. MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space / F. Ronquist, M. Teslenko, P. van der Mark // Syst. Biol. – 2012. – V. 61. – № 3. – P. 539-542. – doi 10.1093/sysbio/sys029.

92. Rozas, J. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets / J. Rozas, A. Ferrer-Mata, J. K. Sanchez-DelBarrio // *Mol. Biol. Evol.* – 2017. – V. 34. – № 12. – P. 3299-3302. – doi 10.1093/molbev/msx248.
93. Sanchez-Mazas, A. Past human migrations in East Asia: matching archaeology, linguistics and genetics / A. Sanchez-Mazas, R. Blench, M.D. Ross // London and New York: Routledge Taylor & Francis Group. – 2008. – P. 427-442.
94. Schaller, G. B. Distribution, status, and conservation of wild yak *Bos grunniens* / G. B. Schaller, W. L. Liu // *Biological Conservation.* – 1996. – V. 76. – P. 1-8.
95. Shi, Q. Endangered wild yak (*Bos grunniens*) in the Tibetan plateau and adjacent regions: Population size, distribution, conservation perspectives and its relation to the domestic subspecies / Q. Shi, Y. Guo, S. C. Engelhardt // *J. Nature Conservat.* – 2016. – V. 32. – P. 35-43.
96. Shibuya, M. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymph angiogenesis / M. Shibuya, L. Claesson-Welsh // *Exp. Cell Res.* – 2006. – V. 312. – P. 549-560.
97. Slatkin, M. Isolation by Distance in Equilibrium and Non-Equilibrium Populations / M. Slatkin // *Evolution.* – 1993. – V. 47. – № 1. – P. 264-279.
98. Srikanth, K. Transcriptome analysis and identification of significantly differentially expressed genes in Holstein calves subjected to severe thermal stress / K. Srikanth, E. Lee, A. Kwan // *International journal of biometeorology.* – 2017. – V. 61. – № 11. – P. 1993-2008. – doi: 10.1007/s00484-017-1392-3
99. Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies / A. Stamatakis // *Bioinformatics.* – 2014. – V. 30. – № 9. – P. 1312-1313.
100. Stringer, S. E. The role of heparan sulphate proteoglycans in angiogenesis / S. E. Stringer // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – V. 34. – P. 451-453.
101. Sundqvist, L. A new approach to estimate directional genetic differentiation and asymmetric migration patterns / L. Sundqvist, M. Zackrisson, D. Kleinhan // *arXiv pre-print.* – 2016. – 1304.0118v1.

102. Thangarajaha, H. The molecular basis for impaired hypoxia-induced VEGF expression in diabetic tissues/ H. Thangarajaha, D. Yaob, E. I. Chang // *PNAS*. – 2009. – V. 103. – P. 13505-13510.
103. Tu, Z. Mitochondrial DNA polymorphism and genetic diversity in Chinese yak / Z. Tu, Y. Zhang, H. Qiu // *Acta Genetica Sinica*. – 1998. – V. 25. – № 3. – P. 205-212.
104. Van Patot, M. C. Hypoxia: Adapting to high altitude by mutating EPAS-1, the gene encoding HIF-2 $\alpha$  / M. C. Van Patot, M. Gassmann // *High Altitude Medicine & Biology*. – 2011. – V. 12. – P. 157-167.
105. Verma, P. Overexpression of genes associated with hypoxia in cattle adapted to Trans Himalayan region of Ladakh / P. Verma, A. Sharma, M. Sodhi // *Cell Biol Int*. – 2018. – V. 42. – P. 1141-1148.
106. Wang, D. P. Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  cDNA cloning and its mRNA and protein tissue specific expression in domestic yak (*Bos grunniens*) from Qinghai-Tibetan plateau / D. P. Wang, H. G. Li, Y. J. Li // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006. – V. 348. – P. 310-319.
107. Wang, K. Genome-wide variation within and between wild and domestic yak / K. Wang, Q. Hu, H. Ma // *Mol. Ecol. Res*. – 2014. – V. 14. – № 4. – P. 794–801.
108. Wang, Z. Phylogeographical analyses of domestic and wild yaks based on mitochondrial DNA: New data and reappraisal / Z. Wang, X. Shen, B. Liu // *Journal of Biogeography*. – 2010. – V. 37. – P. 2332-2344.
109. Warnes, G. R. gplots: various R programming tools for plotting data / G. R. Warnes, B. Bolker, L. Bonebakker // <http://CRAN.R-project.org/package=gplots>. – 2016.
110. Wiener, G. The yak / G. Wiener, H. Jianlin, L. Ruijun // Regional Office for Asia and the Pacific Food and Agriculture Organization of the United Nations. – 2003. – 59 pp.
111. Wilson, D. E. Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference / D. E. Wilson, D. M. Reeder // Baltingore: Johns Hopkins University Press. –

2005. – 3rd ed. – 142 pp.

112. Wu, X. Characterization of the complete mitochondrial genome sequence of Gannan yak (*Bos grunniens*) / X. Wu, X. Ding, M. Chu // Mitochondrial DNA. – 2016a. – V. 27. – № 2. – P. 1014-1015.

113. Wu, X. Novel SNP of EPAS1 gene associated with higher hemoglobin concentration revealed the hypoxia adaptation of yak (*Bos grunniens*) / X. Wu, X. Ding, M. Chu // Journal of Integrative Agriculture. – 2015. – V. 14. – №4. – P. 741-748.

114. Wu, X. Association of novel single-nucleotide polymorphisms of the vascular endothelial growth factor-A gene with high-altitude adaptation in yak (*Bos grunniens*) / X. Wu, C. Liang, X. Ding // Genetics and Molecular Research. – 2013. – V. 12. – № 4. – P. 5506-5515.

115. Wu, X. The complete mitochondrial genome sequence of the Datong yak (*Bos grunniens*) / X. Wu, C. Min, C. Liang // Mitochondrial DNA. – 2016b. – V. 27. – № 1. – P. 539-540.

116. Xu, F. Rat brain VEGF expression in alveolar hypoxia: possible role in high-altitude cerebral edema / F. Xu, J. W. Severinghaus // J. Appl. Physiol. – 1998. – V. 85. – P. 53-57.

117. Xu, S. A genome-wide search for signals of high-altitude adaptation in Tibetans / S. Xu, S. Li, Y. Yang // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – V. 28. – № 2. – P. 1003-1011.

118. Xuebin, Q. Genetic diversity and differentiation of Mongolian and Russian yak populations / Q. Xuebin, H. Jianlin, B. Lkhava // J. Animal Breed. Genet. – 2005. – V. 122. – № 2. – P. 117-126.

119. Yang, B. H. The genetic resources of wild Artiodactyla and Perissodactyla in China / B. H. Yang // Lanzhou: Gansu Science Press. – 2006. – P. 277–288.

120. Yue, X. Comprehensive investigation of nucleotide diversity in yaks / X. Yue, Y. Liang, Y. Liang, F. Li // Animal Genetics. – 2016. – V. 47. – № 6. – P. 752-755.

121. Zhang, G. Analysis of genetic diversity and population structure of Chinese yak breeds (*Bos grunniens*) using microsatellite markers / G. Zhang, W. Chen, M. Xue // J. Genet. Genome. – 2008. – V. 35. – P. 233–238. – doi 10.1016/S1673-8527(08)60032-6
122. Zhang, X. Genome-wide patterns of copy number variation in the Chinese yak genome / X. Zhang, K. Wang, L. Wang // BMC Genomics. – 2016. – V. 17. – doi 10.1186/s12864-016-2702-6
123. Zhang, Z. G. Distribution and conservation of yak (*Bos grunniens*) / Z. G. Zhang, L. Xia, Q. S. Yang // Chinese Journal of Zoology. – 2009. – V. 44. – № 1. – P. 148-150.
124. Zhong, J. Mitochondrial complete genome sequencing and phylogenetic research on wild yak / J. Zhong, Z. Chai, Z. Ma // Acta Ecologica Sinica. – 2015. – V. 35. – № 5. – P. 1564-1572.
125. Zhong, J. Classification of ecological types of the Chinese yak / J. Zhong, Z. Chen, S. Zhao, Y. Xiao // Acta Ecologica Sinica. – 2006. – V. 26. – № 7. – P. 2068-2072.
126. Аль-Кейси Т.В. Сравнительное исследование аллелофонда яков и их гибридов с крупным рогатым скотом с использованием микросателлитов: дис. ... канд. биол. наук: 03.02.07; 06.02.07 / Татьяна Викторовна Аль-Кейси. – Дубровицы, 2011. – 97 с.
127. Давыдов, В. Н. Генофонд домашних животных юга Восточной Сибири / В. Н. Давыдов. – Улан-Удэ, 1990. – 147 с.
128. Иванова, В. В. Гибридизация яка с крупным рогатым скотом и ее перспективы: автореф. дис. ... канд. с-х наук / В. В. Иванова. – М., 1956. – С. 20.
129. Кан-оол, Б. К. Современное состояние, тенденция численности и распространения яков в Республике Тыва / Б. К. Кан-оол // Инновационная наука. – 2016. – № 9. – С. 100-102.

130. Кирова, Ю. И. Регуляторная роль сукцинатзависимых сигнальных систем (HIF-1a и GPR91) при адаптации к гипоксии: дис. ... д-ра биол. наук: 14.03.03 / Кирова Юлия Игоревна. – М., 2016. – 280 с.

131. Лус, Я.Я. Видовые гибриды яка и крупного рогатого скота / Я.Я. Лус – М.: Изд-во АН СССР, 1927. – 49 с.

132. Маниатис, Т. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. – М. – Мир, 1984. – 291 с.

133. Породы животных. Государственный реестр селекционных достижений, допущенных к использованию. Министерство сельского хозяйства Российской Федерации Департамент животноводства и племенного дела ФГБУ «Государственная комиссия Российской Федерации по испытанию и охране селекционных достижений». – М. – 2015. – Том 2. – С. 23-162.

134. Столповский, Ю. А. Сравнительный анализ полиморфизма ISSR-маркеров в популяциях яка (*Bos mutus*) и гибридов F1 между яком и крупным рогатым скотом в Саяно-Алтайском регионе / Ю. А. Столповский, Н. В. Кол, А. Н. Евсюков, Л. В. Нестерук, Ч. М. Доржу, Ц. Цэндсүрэн, Г. Е. Сулимова // Генетика. – 2014. – Т. 50 – № 10. – С. 1163-1176.

(Stolpovsky Yu. A. Comparative analysis of ISSR marker polymorphism in populations of yak (*Bos mutus*) and in F1 hybrids between yak and cattle in the Sayan-Altai region / Yu. A. Stolpovsky, N.V. Kol, A. N. Evsyukov, L. V. Nesteruk, Ch. M. Dorzhu, C. Censuren, G. E. Sulimova // Rus. J. Genetics. – 2014. – V. 50. – № 10. – P. 1025-1037).

135. Столповский Ю.А. Генофонды домашних животных Монголии / Ю. А. Столповский, Ц. Цэндсүрэн, Н. В. Кол, В. Н. Воронкова, Г. Е. Сулимова. – М.: Т-во научных изданий КМК, 2013. – 275 с.