

Молекулярная генетика

Рубрика

doi.org/10.31043/2410-2733-2024-1-5-17

УДК 639.111.623 : 575.21

Н. А. Чурбакова, В. Р. Харзинова, О. А. Кошкина, В. В. Волкова

Применение микросателлитного анализа в генетических исследованиях европейского зубра (*Bison bonasus*)**Аннотация.**

Цель: обобщить накопленный материал по исследованию микросателлитных локусов у европейского зубра (*Bison bonasus*), описанный в научной литературе, и провести их сравнительную характеристику.

Материалы и методы. База данных PubMed®/The National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) и научная электронная библиотека eLIBRARY.RU (<https://elibrary.ru/>).

Результаты. Вопросу изучения генетического разнообразия популяций зубра посвящено множество работ, основанных на оценке родословных, а также на использовании ядерных и митохондриальных маркеров. Оценка генетического разнообразия и популяционной структуры, а также контроля степени инбридинга разводимых в неволе групп является одной из основных задач при сохранении и воспроизводстве редких видов. Это связано с тем, что в таких группах наблюдается снижение генетической изменчивости, которая влияет на адаптацию и выживание реинтродуцированных на волю особей. Первые работы, посвященные изучению популяций зубров, проводились в 60-х годах XX века и были основаны на анализе групп крови. С открытием структуры ДНК и развитием методов определения ее вариативности, на смену изучения белкового полиморфизма пришёл анализ самих нуклеотидных последовательностей ДНК. Широкое распространение в исследованиях генетической структуры европейского зубра получили микросателлиты, однонуклеотидные полиморфизмы ядерной и митохондриальной ДНК. Одним из важных критериев, предъявляемых к ДНК-маркерам, наряду с простотой использования и высокой воспроизводимостью, является, по возможности, снижение стоимости анализа и доступность для рутинного использования. В этой связи в нашем исследовании большее внимание мы уделили более рентабельному методу – анализу микросателлитных локусов. Всего для популяции европейского зубра было успешно амплифицировано 48 микросателлитных локусов. В основном использовались мультиплексные панели микросателлитных маркеров, разработанные для крупного рогатого скота (*Bos taurus*). При этом спектр и количество локусов в работах разных авторов не был одинаков. Исключение составил только локус BM1824, который был использован почти всеми научными коллективами. Число аллелей на локус варьировало от 1 до 6. Большинство рассмотренных локусов характеризуется низким количеством аллелей, что затрудняет оценку действительного показателя уровня инбридинга в популяциях зубра. В связи с этим необходимым является поиск новых, ранее неисследованных высокополиморфных локусов для оценки генетического разнообразия зубра, которые позволят не только более детально описать актуальное состояние генетического разнообразия, уровень генетического инбридинга, но и дать оценку степени дифференциации линий, а также помогут выявить наличие гибридизации с североамериканским бизоном (*Bison bison bison*) и крупным рогатым скотом (*Bos taurus*).

Ключевые слова: Европейский зубр; *Bison bonasus*; генетический маркер; мтДНК; STR; SNP; генетическое разнообразие.

Авторы:

Чурбакова Н. А. – аспирант; e-mail: nadushik95@mail.ru;

Харзинова В. Р. – кандидат биологических наук; e-mail: veronika0784@mail.ru;

Кошкина О. А. – кандидат биологических наук; e-mail: olechka1808@list.ru;

Волкова В. В. – кандидат биологических наук; e-mail: moonlit_elf@mail.ru.

ФГБНУ ФИЦ ВИЖ им. Л. К. Эрнста; 142132, Российская Федерация, Московская область, Городской округ Подольск, п. Дубровицы 60.

Введение. Биоразнообразие критически важно для продовольственной безопасности и здоровья человека, а также для устранения смертельной угрозы изменения климата [1]. Биоразнообразие, как оно определено соглаше-

нием, подписанным в Рио-де-Жанейро в 1992 году, включает три основных уровня, которые тесно взаимосвязаны между собой: генетический, видовой и экосистемный [2]. Сохранение генетических ресурсов рассматривается как ключевой

компонент управления природными активами [3]. К сожалению, по оценкам Международного союза охраны природы (МСОП) 26 % млекопитающих находятся под угрозой исчезновения [4].

Зубр (*Bison bonasus*) — единственный дикий представитель подсемейства Бычьих на Европейском континенте, сохранившийся до наших дней и спасённый от исчезновения благодаря значительным усилиям по его сохранению с начала XX века [5]. Всё нынешнее поголовье зубров в мире происходит от 12 животных-основателей, из которых 11 представителей равнинного подвида (*B.b bonasus*) и одного последнего представителя кавказского подвида (*B.b caucasicus*) [6]. В результате длительной научной и селекционной работы численность мирового стада увеличилась с 48 особей (1927 г.) до 10 536 особей (European Bison Pedigree Book, 2022). В настоящее время 78 % всего вида обитает в свободно живущих популяциях [7].

Несмотря на то, что численность российского поголовья зубров на конец 2022 года составила 2355 особей, среднерусская популяция зубров с устойчивой численностью 1000 половозрелых особей не создана. При такой численности популяция сможет стать самоподдерживающейся (жизнеспособной), и зубры в центральной части России перестанут быть под угрозой исчезновения. Также обмену генами препятствует изолированность большинства свободноживущих популяций друг от друга [8].

Оценка генетического разнообразия и популяционной структуры, а также контроля степени инбридинга разводимых в неволе групп является одной из основных задач при сохранении и воспроизводстве редких видов. Это связано с тем, что в таких группах наблюдается снижение генетической изменчивости, которая влияет на адаптацию и выживание реинтродуцированных на волю особей [9].

Вопросу изучения генетического разнообразия популяций зубра посвящено множество работ, основанных на оценке родословных, а также на использовании ядерных и митохондриальных маркеров. Такие исследования выявили, что все популяции зубра характеризуются высокой степенью инбридинга и низким генетическим разнообразием, что приводит к потере уникальных генов, вызывая снижение общей жизнеспособности и плодовитости зубров [10]. Поэтому существует необходимость в наличии информативных систем оценки популяционно-генетических параметров всего поголовья зубров, которые в дальнейшем помогут в сохранении и управлении генетическими ресурсами вида.

Цель исследований — обобщить накопленный

материал по исследованию микросателлитных локусов у европейского зубра (*Bison bonasus*), описанный в научной литературе, и провести их сравнительную характеристику.

Материалы и методы. База данных PubMed®/The National Center for Biotechnology Information (NCBI) и научная электронная библиотека eLIBRARY.RU.

Результаты и обсуждение. Первое теоретическое предложение использования маркеров в селекции сделано А. С. Серебровским в начале XX века. Первоначально в качестве маркера использовались генетические факторы, которые проявлялись на уровне фенотипа и влияли на количественный признак. Следующим шагом в развитие генетических маркеров стало использование различных белков, в том числе и в плазме крови [11].

Первые работы, посвященные изучению популяций зубров, проводились в 60-х годах прошлого века и были основаны на анализе групп крови. Несмотря на многолетнюю работу, полученные результаты были довольно скудными, поскольку для исследований были использованы только особи, выведенные из разведения [12].

В 1995 г. Т. Sipko с соавтр. изучен полиморфизм девяти систем групп крови у трех репродуктивных линий зубра. Все проанализированные системы групп крови были полиморфными, при этом были обнаружены 50 из 57 протестированных антигенов. Количество обнаруженных антигенов групп крови у зубров сопоставимо с таковым у пород домашнего скота. Однако внутрипопуляционное разнообразие, оцененное с помощью критерия μ , у крупного рогатого скота было значительно выше, чем у зубров. К тому же коэффициенты сходства между линиями зубров были выше, чем между различными стадами внутри породы крупного рогатого скота [13].

В 1996 году тем же коллективом авторов изучены данные по 16 полиморфным системам (22 локусам) биохимических маркеров крови у различных линий европейского зубра. Полиморфизм был выявлен в трех локусах: Pgm, Idh и Tf. Полученные оценки генетических расстояний между линиями европейского зубра также продемонстрировали между ними тесную взаимосвязь [14].

Позднее внимание исследователей переключилось на гены главного комплекса гистосовместимости (МНС — major histocompatibility complex), отвечающие за иммунитет. Считается, что потеря вариативности в этих генах у видов, прошедших через «бутылочное горлышко», ставит под угрозу их выживание. Так, W. Babik с соавт., исследовав изменчивость главного комплекса гистосовместимости I класса в выборке из 99 особей

зубра, пришли к выводу о том, что общая организация МНС похожа на систему крупного рогатого скота, но генетическая изменчивость намного ниже. Всего авторами обнаружено 7 классических аллелей I класса, что составляет примерно одну десятую от числа, известного у крупного рогатого скота, и четверть от числа, известного у американского бизона [15]. Наиболее информативным геном у копытных считают ген *DRB3*, который относится ко II классу МНС. J. Radwan с соавт. обнаружили низкий уровень полиморфизма аллелей гена *DRB3*, который был результатом длительного катастрофического снижения численности популяции в начале XX века [16].

С открытием структуры ДНК и развитием методов определения ее вариабельности, на смену изучения белкового полиморфизма пришёл анализ самих нуклеотидных последовательностей ДНК [17]. Широкое распространение в исследованиях генетической структуры европейского зубра получили микросателлиты (STR, short tandem repeats), однонуклеотидные полиморфизмы (SNP, single-nucleotide polymorphism) ядерной и митохондриальной ДНК (mtDNA).

С конца 1990-х годов активно проводится изучение полиморфизма митохондриальной ДНК (мтДНК) [18–23]. Особое внимание исследователи уделяют высоковариабельному участку мтДНК - D-петле. Например, В. Burzyńska с соавт. амплифицировали фрагмент D-петли мтДНК длиной 1026 п.н. у 14 животных из трех материнских линий. Анализ контрольной области продемонстрировал наличие четырех вариабельных участков в изученной популяции зубров. Выявленная нестабильность нуклеотидных замен могла указывать на внутрилинейную изменчивость митохондриального генома. [18].

J. Wojcik с соавт. проанализировали фрагмент митохондриальной ДНК длиной 1429 п.н., включающий область D-петли, у 87 животных и выявили наличие трех гаплотипов в популяции европейского зубра [20].

О. Kostyunina с соавт. провели сравнительное исследование аллелофонда и генетической структуры двух российских и одной белорусской популяций зубра в сравнении с представителями видов *Bison bison* и *Bos taurus* [23]. Был проведен анализ полиморфизма фрагмента D-петли мтДНК длиной 630 п.н. на наличие гаплотипов зубра и крупного рогатого скота. Авторами был найден единый гаплотип для всех зубров (*Bison bonasus*), который отличался от последовательностей бизонов (*Bison bison bison*) и крупного рогатого скота (*Bos taurus*).

Следует отметить, что ряд авторов выявил на-

личие гибридизации между зубром (*Bison bonasus*) и крупным рогатым скотом (*Bos taurus*). Так, в популяции зубров в Чергинском экспериментальном хозяйстве (республика Алтай) было выявлено два гаплотипа — один из которых совпадал с наиболее распространённым европейским гаплотипом мтДНК зубра, а второй — с гаплотипом мтДНК КРС. Так же была обнаружена одна гибридная самка со сложной родословной (*B. bonasus* x *B. bison* x *B. Taurus*) [21].

В своём исследовании J. Zeyland с соавт. впервые представили полный митохондриальный геном зубра (NC_014044) и использовали его для реконструкции филогенетических отношений между европейский зубром, бизоном и яком. Полный митохондриальный геном зубра был получен путем амплификации 41 перекрывающегося фрагмента [22].

Еще одним перспективным направлением для оценки степени генетического разнообразия является анализ однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) ядерной ДНК. Технологии обнаружения SNP эволюционировали от трудоемких и отнимающих много времени процессов к одним из наиболее автоматизированных и относительно недорогих методов. Исследователями были приняты попытки проведения полногеномного исследования вида *Bison bonasus* с использованием ДНК-чипов BovineSNP50 Genotyping BeadChip и BovineHD Genotyping BeadChip (Illumina Inc, США), разработанных для крупного рогатого скота [24–29]. Использование коммерческих ДНК-чипов, разработанных для родственных сельскохозяйственных животных, позволило проводить одновременный анализ более тысячи SNP.

Например, в 2010 году С. Pertoldi с соавт. впервые провели генотипирование зубра (*Bison bonasus*) с использованием ДНК-чипа BovineSNP50 (Illumina Inc, США) в сравнении с двумя подвидами американского бизона — лесного бизона (*Bison bison athabasca*) и степного бизона (*Bison bison bison*), а также семью породами крупного рогатого скота (*Bos taurus*). Полученные данные способствовали реконструкции эволюционных взаимосвязей между этими видами [24].

Позднее К. Oleński с соавт. провели полногеномное исследование 163 зубров с использованием ДНК-чипа BovineHD (Illumina Inc, США) с целью создания панели высокополиморфных SNP для индивидуальной идентификации зубра и установления родства. В результате получена панель из 100 высокополиморфных SNP [25].

Вместе с тем М. Wojciechowska с соавт. разработали отдельные панели для проведения генетического анализа европейского зубра. Авто-

рами были предложены: панель из 20 SNP для выявления гибридизации с *Bos taurus* и *Bison bison*, панель из 50 SNP для идентификации особей и установления родства, а также панель из 30 SNP для оценки принадлежности к генетической линии [29].

Несмотря на высокую эффективность SNP, большая часть работ у зубров посвящена исследованиям микросателлитных локусов. Это связано с тем, что одним из важных критериев, предъявляемых к ДНК-маркерам, наряду с простотой использования и высокой воспроизводимостью, является, по возможности, снижение стоимости анализа и доступность для рутинного использования [17]. В этой связи в нашем исследовании большее внимание мы уделили анализу микросателлитных локусов, с использованием которого возможна оценка генетического разнообразия вида с низкой генетической вариабельностью. В основном для оценки популяции зубров используются мультиплексные панели микросателлитных маркеров, разработанные для крупного рогатого скота (*Bos taurus*) [23, 30–34].

В 2004 году В. Gralak с соавтр. прогенотипировали популяцию зубров из польской части Беловежской пуши с использованием 21 STR-локуса. В результате из 40 идентифицированных аллелей только 2 оказались специфичными для европейского зубра. К тому же популяция характеризовалась низким уровнем гетерозиготности, который варьировал от 0,13 до 0,53 в зависимости от локуса [35].

В 2005 году в исследовании популяции зубра из Беловежского национального парка Польши К. Luenser с соавтр. идентифицировали только 9 полиморфных микросателлитных локусов из 18 со средним числом аллелей на локус равным 2,30 [36].

В 2006 году Т. Roth с соавтр. провели генотипирование 35 зубров кавказско-беловежской линии из четырёх зоопарков в Германии с использованием коммерческого набора из 11 STR-локусов (StockMarks for Cattle Bovine, Applied Biosystems, Foster). Все локусы успешно амплифицировались со средним числом аллелей на локус равным 2,36 [30].

Размер выборки является одним из важнейших факторов, влияющих на точность оценки параметров генетического разнообразия популяции. В 2009 году проведённое исследование М. Tokarska с соавтр. на увеличенной выборке зубров, рождённых с 1985 по 2006 год в Беловежском национальном парке Польши, позволило обнаружить 17 полиморфных локусов со средним числом аллелей на локус равным 3,06. Однако в этой работе научный коллектив авторов

пришёл к выводу о том, что определение отцовства и идентификации особи на основе 17 STR-локусов по сравнению с анализом 960 SNP является не информативным из-за низкого уровня гетерозиготности выбранных локусов [26]. Данный коллектив авторов позднее провёл исследование полиморфизма 12 микросателлитных локусов зубров за 50 лет, которое не выявило достоверного различия генетического разнообразия пяти временных групп (с 1955 по 2005 год рождения) [37].

Высокое аллельное разнообразие было выявлено и в популяции зубров из национального парка «Беловежская пуца» Республики Беларусь. В 2011 году М. Михайлова с соавт. идентифицировали 16 аллелей в 6 локусах. Однако в сравнении с крупным рогатым скотом популяция зубров все равно характеризуется низким генетическим разнообразием [31].

В 2015 М. Tokarska с соавтр. провели анализ беловежской и кавказско-беловежской линий в сравнении с вымершим подвидом кавказского зубра (*Bison bonasus caucasicus*). Выполненное исследование 19 микросателлитных локусов и 1512 SNP выявило наличие у особей беловежской линии аллелей кавказского зубра [38]. В дальнейшем М. Михайлова с соавт. в своём исследовании приходят к схожему выводу. На основе анализа 9 микросателлитных локусов в белорусской популяции были выявлены уникальные аллели, не характерные польской популяции [34].

Российская популяция кавказско-беловежской линии впервые была исследована Dotsev с соавтр. в 2018 году с использованием 10 микросателлитных локусов крупного рогатого скота, из которых восемь были полиморфными со средним числом аллелей на локус равное 2,8 [32].

В работе О. Kostyunina с соавтр. в 2020 году установлена четкая генетическая дифференциация популяции зубров (*Bison bonasus*) из Приокско-Террасного и Окского заповедников России и национального парка «Беловежская пуца» в Беларуси от бизонов (*Bison bison*) и крупного рогатого скота (*Bos taurus*) на основе анализа 11 микросателлитных маркеров. При этом была выявлена близость бизона к зубру, обусловленная принадлежностью их к одному роду [23].

В том же году относительно низкое среднее число аллелей на локус 2,18 было выявлено в пяти субпопуляциях европейского зубра в Беларуси на основе исследования 11 микросателлитных локусов крупного рогатого скота [33]. Ожидаемая гетерозиготность для белорусской субпопуляции из Беловежской пуши оказалась заметно ниже ($H_e = 0,277$) в исследовании О. Kostyunina с соавтр. [23] по сравнению со значением этого

показателя, полученным для той же популяции в исследовании К. Homel с соавтр. ($H_e = 0,374$) [33]. Это могло быть связано с большим объемом выборки в предыдущем исследовании по сравнению с данным.

W. Olech с соавтр. в своей работе в 2023 году обобщили результаты анализа генетического разнообразия, проведенного для мировой популяции зубров на сегодняшний день. Также авторы показали, что с использованием 10 STR-локусов возможно выявить генетическую дифференциацию между четырьмя свободно живущими популяциями беловежской линии, однако такое количество локусов не позволило определить генетическую линию отдельного животного [10].

В 2023 году впервые проведено изучение ге-

нетического разнообразия и генетической структуры литовской популяции зубра. Результаты микросателлитного анализа, полученные в работе R. Lapickis с соавтр., показали, что популяция имеет генетическую структуру, отличную от популяций в Польше, Германии и Швеции, поскольку она была сформирована из особей Приокско-Террасного заповедника России [39].

Все работы авторов, цитируемые в данном анализе, различались количеством микросателлитных локусов, выбранных для оценки генетической структуры популяций зубра. Для наглядного представления результатов их работ мы представили сравнительный анализ полиморфизма описанных локусов в таблице 1 с наименованием локусов микросателлитов, диапазоном длин

Таблица 1. Микросателлитные локусы, используемые при оценке генетического разнообразия популяции европейского зубра

№ п/п	Локус	Диапазон длин аллелей	Число аллелей на локус	Последовательности праймеров (5'-3')
1	2	3	4	5
1.	AGLA232	—	2 [26] 2 [37] 2 [38]	F: CCTTTGCAAATACCTCCTGACCAG R: AATGGTTCTACATTTGCTAGGTGTC
2.	AGLA269	—	3 [38]	F: CTTTCAATGTATTTGCTTATTTGTT R: GACACTAGTAGATTTGAAACCCA
3.	AGLA293	—	2 [10]	F: GAAACTCAACCCAAGACAACCTCAAG R: ATGACTTTATTCTCCACCTAGCAGA
4.	BBJ24	—	2 [26] 2 [37] 3 [38]	F: GAGGATTATGGGGACACTGC R: TACTGGTCACAACACTTCAC
5.	BL42	—	1 [36]	F: CAAGGTCAAGTCCAAATGCC R: GCATTTTTGTGTAAATTCATGC
6.	BM203	—	1 [36]	F: GGGTGTGACATTTTGTTCCTC R: CTGCTCGCCACTAGTCCTTC
7.	BM723	146–152 [39]	3 [26] 2 [37] 3 [38] 3 [39]	F: ACCCTTGGTTTTCTGCTGG R: CATCCTGTGTGAGTGTGTGTTG
8.	BM757	—	4 [26] 2 [37] 5 [38]	F: TGGAACAATGTAAACCTGGG R: TTGAGCCACCAAGGAACC
9.	BM1225	254–260 [36]	3 [26] 3 [36] 3 [38]	F: TTTCTCAACAGAGGTGTCCAC R: ACCCCTATCACCATGCTCTG
10.	BM1818	250–266 [32] 262–264 [35] 260–264 [36]	2 [10] 4 [32] 2 [35] 2 [36]	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC
11.	BM1824	178–180 [30] 186–188 [31] 178–180 [32] 181–183 [34] 180–182 [35]	2 [10] 3 [26] 2 [30] 2 [31] 2 [32] 2 [34] 2 [35] 4 [38]	F: GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC R: CATCTCCAACCTGCTTCCTTG

Продолжение таблицы 1. Микросателлитные локусы, используемые при оценке генетического разнообразия популяции европейского зубра

1	2	3	4	5
12.	BM2113	125–127 [30] 127–131 [32] 121–133 [34] 127 [35]	2 [30] 2 [32] 5 [34] 1 [35] 1 [36]	F: GCTGCCTTCTACCAAATACCC R: CTCCTGAGAGAAGCAACACC
13.	BM2830	143–163 [36]	4 [26] 3 [36] 3 [37] 4 [38]	F: AATGGGCGTATAAACACAGATG R: TGAGTCCTGTCACCATCAGC
14.	BM3507	—	2 [38]	F: GCCCAAAGAAAGAAGTATGTGC R: TAGTGCGGAGTCAGTCATGTG
15.	BM4107	—	1 [36]	F: AGCCCCTGCTATTGTGTGAG R: ATAGGGTTTGCATTGTTTCAGG
16.	BM4440	—	2 [26] 2 [37] 6 [38]	F: CCCTGGCATTCAACAAGTGT R: TAGATGCAAAACACACACACA
17.	BM5004	—	2 [26] 2 [37] 5 [38]	F: TCTGGAGTGAATGTTTCTGAGG R: TTGTGATGAGCACCTGAAGG
18.	BM6438	264–274 [36] 262–274 [39]	2 [36] 3 [39]	F: TTGAGCACAGACACAGACTGG R: ACTGAATGCCTCCTTTGTGC
19.	BMC1222	—	3 [26] 3 [38]	F: CCAATTTTGCAGATAAGAAAACA R: CCTGAGTGTTCCCTCCTGAGT
20.	BOVFSH	—	5 [26] 3 [38]	F: CTTCTTGGGATATAGACTTAGTGGC R: GCTTAGATTAGCCTGACTATGA
21.	BOVIRBP	126–142 [36]	2 [36] 1 [39]	F: GTATGATCACCTTCTATGCTTC R: GCTTAGGTAATCATCAGATAGC
22.	BTJAB1	206–228 [36]	4 [36]	F: CATTAAGGGCTGGGATTTCCT R: AGATTTCTGGAGGAGGCTCACAGCA
23.	BTJAB3	—	1 [36]	—
24.	CSRM60	89 [35]	1 [35]	F: AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCCA R: AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG
25.	CSSM66	172–196 [35]	3 [35]	F: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA R: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG
26.	EBMS044	—	4 [10]	F: CCTTGCCACTATTTTCCTCCA R: CCAAATGACACATGACAGCC
27.	ETH3	117–123 [30] 119–129 [34] 119–123 [35]	3 [30] 3 [34] 3 [35]	F: GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG R: ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG
28.	ETH10	211–215 [30] 211–215 [32] 213–221 [34] 211–215 [35] 208–212 [36]	3 [10] 3 [30] 3 [32] 4 [34] 3 [35] 3 [36]	F: GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA R: CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC
29.	ETH121	186–214 [39]	5 [39]	F: CCAACTCCTTACAGCAAATGTC R: ATTTAGAGCTGGCTGGTAAGTG
30.	ETH152	197–203 [35]	3 [35] 3 [26] 5 [38]	F: TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG R: GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG
31.	ETH185	228 [35]	1 [35]	F: TGCATGGACAGAGCAGCCTGGC R: GCACCCCAACGAAAGCTCCCAG
32.	ETH225	156–158 [30] 166–168 [31] 156–158 [32] 153–155 [34] 156–158 [35]	2 [10] 2 [30] 2 [31] 2 [32] 2 [34] 2 [35]	F: GATCACCTTGCCACTATTTTCCT R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT

Продолжение таблицы 1. Микросателлитные локусы, используемые при оценке генетического разнообразия популяции европейского зубра

1	2	3	4	5
33.	HEL9	143–163 [35]	4 [10] 2 [35]	F: CCCATTCACTCTTCAGAGGT R: CACATCCATGTTCTCACCAC
34.	ILSTS006	282 [35]	1 [35]	F: TGTCTGTATTTCTGCTGTGG R: ACACGGAAGCGATCTAAACG
35.	ILSTS034	—	2 [10]	F: AAGGGTCTAAGTCCACTGGC R: GACCTGGTTTAGCAGAGAGC
36.	INRA023	190–192 [30] 190–198 [31] 192 [32] 192 [34] 194 [35]	2 [30] 4 [31] 1 [32] 1 [34] 1 [35]	F: GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC R: TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTCA
37.	INRA032	173 [35]	1 [35]	F: AAAGTGTATTCTCTAATAGCAC R: GCAAGACATATCTCCATTCCTT
38.	INRA037	120 [35]	1 [35]	F: GATCCTGCTTATATTTAACCAC R: AAAATTCCATGGAGAGAGAAAC
39.	INRA123	—	4 [10]	F: TCTAGAGGATCCCCGCTGAC R: AGAGAGCAACTCCACTGT
40.	MM12	113–115 [35]	2 [10] 2 [35]	F: CAAGACAGGTGTTTCAATCT R: ATCGACTCTGGGGATGATGT
41.	RT29	—	3 [26] 2 [37] 2 [38]	—
42.	SPS115	244–258 [30] 244–258 [32] 250–258 [34] 252–256 [35]	4 [30] 4 [32] 3 [34] 2 [35]	F: AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG R: AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG
43.	TGLA53	146–148 [30] 139–149 [31] 153–155 [34] 150–152 [35]	3 [26] 2 [30] 4 [31] 2 [34] 2 [35] 2 [37] 3 [38]	F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA
44.	TGLA57	—	3 [26] 3 [37] 4 [38]	F: GCTTTTAAATCCTCAGCTTGCTG R: GCTTCCAAAACCTTACAATATGTAT
45.	TGLA122	141–163 [30] 137–163 [32] 132–164 [34] 141–165 [35] 140–164 [36]	2 [30] 4 [32] 3 [34] 2 [35] 2 [36]	F: CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC R: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC
46.	TGLA126	113–119 [30] 104–108 [31] 109–123 [32] 112–122 [34] 111–121 [35] 111–122 [36]	3 [26] 2 [30] 3 [31] 5 [32] 3 [34] 3 [35] 3 [36] 3 [37] 6 [38]	F: CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT R: TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC
47.	TGLA227	69–71 [30] 69 [32] 74 [35]	2 [30] 1 [32] 1 [35] 1 [39]	F: CGAATTCCAAATCTGTTAATTTGCT R: ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA
48.	TGLA261	—	4 [26] 2 [37]	F: TCAAATCTCATTCTCTCCAGAAGGC R: CCAACTTATATTAGGCACAATGTCC

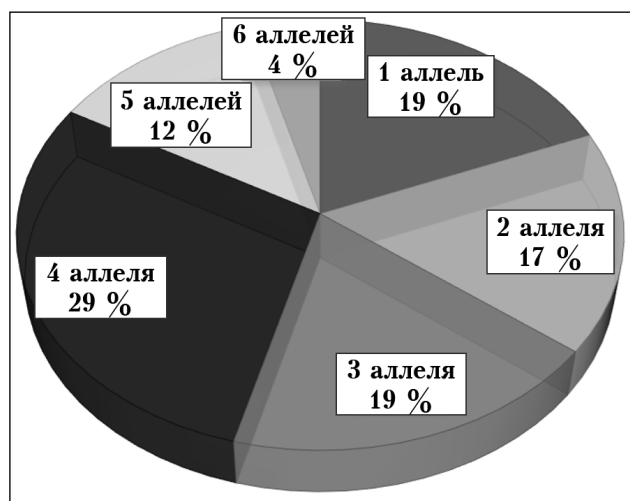


Рис. 1. Полиморфизм исследованных микросателлитных локусов

аллелей и их числа на локус, а также последовательностью праймеров.

Из данных таблицы 1 видно, что всего для популяции европейского зубра было успешно амплифицировано 48 микросателлитных локусов, число аллелей в которых варьировало от 1 до 6. При этом спектр и количество локусов в работах разных авторов не был одинаков. Исключение составил только локус BM1824, который был использован почти всеми научными коллективами.

Из всех исследованных локусов (рис.1) ми-

нимальной полиморфностью обладали 9 локусов — AGLA269, BBJ24, BM723, BM1225, BM6438, BMC1222, CSSM66, ETH3, RT29 (19 % исследованных локусов), а наибольшей полиморфностью обладали локусы TGLA126 и BM4440 (4 % исследованных локусов). Таким образом, анализ показал, что 46 % ранее опубликованных микросателлитных локусов обладали высоким уровнем полиморфизма.

Закключение. Анализ литературных данных показал, что на данный момент апробировано на европейском зубре 48 микросателлитных локусов. 54 % рассмотренных локусов характеризуется низким количеством аллелей, что затрудняет оценку действительного показателя уровня инбридинга в популяциях зубра. Согласно литературным данным, 46 % рассмотренных локусов характеризовались высоким полиморфизмом (не менее четырёх аллелей на локус). В связи с этим необходимым является поиск новых, ранее неисследованных высокополиморфных локусов для оценки генетического разнообразия зубра, которые позволят не только более детально описать актуальное состояние генетического разнообразия, уровень геномного инбридинга, но и дать оценку степени дифференциации линий, а также позволят выявить наличие гибридизации с североамериканским бизоном (*Bison bison bison*) и крупным рогатым скотом (*Bos taurus*).

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках темы Государственного задания № FGGN-2024-0015.

Литература

1. Scheffers B. The broad footprint of climate change from genes to biomes to people / B. Scheffers, L. De Meester, T. Bridge, A. Hoffmann, J. Pandolfi, R. Corlett, S. Butchart, P. Pearce-Kelly, K. Kovacs, D. Dudgeon, M. Pacifici, C. Rondinini, W. Foden, T. Martin, C. Mora, D. Bickford, J. Watson // Science. — 2016. — Vol. 354. — P. 719.
2. Hogg C. Translating genomic advances into biodiversity conservation / C. Hogg // Nature Reviews Genetics. — 2023. — Vol. 10.
3. Иолчиев Б.С. Биологическая полноценность эпидидимального семени зубра (*Bison Bonasus L.*) при криоконсервации и длительном хранении / Б. С. Иолчиев, А. И. Абилов, А. В. Таджиева, В. А. Багиров, Ш. Н. Насибов, И. Н. Шайдуллин, П. М. Кленовицкий, Н. А. Комбарова, М. А. Жилинский // Сельскохозяйственная биология. — 2013. — Т. 52. — № 2. — С. 47–52.
4. IUCN Red List of Threatened Species. [Электронный ресурс]. Дата обращения: 01.02.2024. URL: <https://www.iucnredlist.org/>.
5. Флинт В. Е. Стратегия сохранения зубра в России / В. Е. Флинт, И. П. Белоусова, В. И. Перерва, В. Д. Казьмин, Е. Г. Киселева, И. В. Кудрявцев, Н. В. Пирожков, Т. Г. Сипко // Москва: Российская Академия наук, Всемирный фонд дикой природы (WWF). — 2002.
6. Olech W. The number of ancestors and their contribution to European bison (*Bison Bonasus L.*) population / W. Olech // Annals of Warsaw Agricultural University. Animal Science. — 1999. — No. 35. — P. 111–117.
7. Raczyński J. European Bison Pedigree Book 2022 / Raczyński J., Bołbot M. // Białowieża, Poland: Białowieński National Park. — 2023.

8. Распоряжение Минприроды России от 31.05.2021 N 17-р «Об утверждении Стратегии сохранения зубра в Российской Федерации». [Электронный ресурс]. Дата обращения: 01.02.2024. URL: https://www.mnr.gov.ru/docs/strategii_i_doktriny/strategiya_sokhraneniya_zubra_v_rossiyskoy_federatsii/.
9. Khan S. Overview on the Role of Advance Genomics in Conservation Biology of Endangered Species / S. Khan, G. Nabi, M. W. Ullah, M. Yousaf, S. Manan, R. Siddique, H. Hou // International Journal of Genomics. — 2016. — № 5. — P. 1–8.
10. Olech W. Genetic Diversity of Wisent *Bison bonasus* Based on STR Loci Analyzed in a Large Set of Samples / W. Olech, M. Wojciechowska, M. Kloch, M. Perlińska-Teresiak, Z. Nowak-Życzyńska // Diversity. — 2023. — Vol. 15. — № 3. — P. 399.
11. Чесноков Ю.В. Генетические маркеры: сравнительная классификация молекулярных маркеров / Ю.В. Чесноков // Овощи России. — 2018. — № 3 (41). — С. 11–15.
12. Gasparski J. M. Investigations on the Blood Groups of Wisents (*Bison Bonasus*) and Hybrids in Comparison with the Blood Groups of Cattle / J. M. Gasparski // Blood Groups of Animals. — 1965. — P. 93–97.
13. Sipko T. P. Blood group polymorphism in bison (*Bison bonasus*) / T. P. Sipko, G. S. Rautian, I. G. Uдина, S. V. Ukhanov, Z. I. Berendiaeva // Russian Journal of Genetics. — 1995. — Vol. 31. — № 1. — P. 93–100.
14. Sipko T. P. Polymorphism of biochemical markers in European bison (*Bison bonasus*) / T. P. Sipko, G. S. Rautian, I. G. Uдина, T. A. Takitskaia // Russian Journal of Genetics. — 1996. — Vol. 32. — № 3. — P. 346–351.
15. Babik W. Low major histocompatibility complex class I (MHC I) variation in the European bison (*Bison bonasus*) / W. Babik, A. Kawalko, J. Wyjck, J. Radwan // The Journal of heredity. — 2012. — Vol. 103. — № 3. — P. 349–359.
16. Radwan J. MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison / J. Radwan, A. Kawalko, J. Wyjck, W. Babik // Molecular ecology. — 2007. — Vol. 16. — № 3. — P. 531–540.
17. Омашева М. Е. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования / М. Е. Омашева, К. П. Аубакирова, Н. А. Рябушкина // Биотехнология. Теория и практика. — 2013. — № 4. — С. 20–28.
18. Burzyńska B. Phylogeny and genetic variation of the European bison *Bison bonasus* based on mitochondrial DNA D-loop sequences / B. Burzyńska, W. Olech, J. Topczewski // Acta Theriologica. — 1999. — Vol. 44. — № 3. — P. 253–262.
19. Ward T.J. Identification of domestic cattle hybrids in wild cattle and bison species: a general approach using mtDNA markers and the parametric bootstrap / T.J. Ward, J.P. Bielawski, S.K. Davis, J.W. Templeton, J.N. Derr // Animal Conservation. — 1999. — № 2. — P. 51–57.
20. Wyjck J. Post-bottleneck mtDNA diversity in a free-living population of European bison: Implications for conservation / J.M. Wojcik, A. Kawalko, M. Tokarska, M. Jaarola, P. Vallenback, C. Pertoldi // Journal of Zoology. — 2008. — Vol. 277. — № 1. — P. 81–87.
21. Yudin N.S. Detection of mitochondrial DNA from domestic cattle in European bison (*Bison bonasus*) from the Altai Republic in Russia / N.S. Yudin, I.V. Kulikov, K.V. Gunbin, R.B. Aitnazarov, A.V. Kushnir, T.P. Sipko, M.P. Moshkin // Animal Genetics. — 2012. — Vol. 43. — № 3 — P. 362.
22. Zeyland J. Tracking of wisent-bison-yak mitochondrial evolution / J. Zeyland, L. Wolko, D. Lipiński, A. Woźniak, A. Nowak, M. Szalata, J. Bocianowski, R. Słomski // Journal of applied genetics. — 2012. — Vol. 53. — № 3. — P. 317–322.
23. Kostyunina O. Comparative Genetic Characteristics of the Russian and Belarusian Populations of Wisent (*Bison bonasus*), North American Bison (*Bison bison*) and Cattle (*Bos taurus*) / O. V. Kostyunina, M. E. Mikhailova, A. V. Dotsev, I. I. Zemlyanko, V. V. Volkova, M. S. Fornara, N. A. Akopyan, A. S. Kra marenko, I. M. Okhlopov, P.V. Aksenova, E.L. Tsibizova, R. A. Mnatsekanov, N. A. Zinovieva // Cytology and Genetics. — 2020. — Vol. 54. — № 2. — P. 116–123.
24. Pertoldi C. Phylogenetic relationships among the European and American bison and seven cattle breeds reconstructed using the BovineSNP50 Illumina Genotyping BeadChip / C. Pertoldi, M. Tokarska, J. Wyjck, A. Kawalko, E. Randi, T. Kristensen, V. Loeschcke, D. Coltman, G. Wilson, V. Gregersen, C. Bendixen // Acta theriologica. — 2010. — Vol. 55. — № 2. — P. 97–108.

25. Oleński K. Subset of SNPs for parental identification in European bison Lowland-Białowieża line (*Bison bonasus bonasus*) / K. Oleński, S. Kaminski, M. Tokarska, D. Hering // Conservation Genetics Resources. — 2017. — Vol. 10. — № 2 — P. 73–78.
26. Tokarska M. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison / M. Tokarska, T. Marshall, R. Kowalczyk, J. Wyjck, C. Pertoldi, T. Kristensen, V. Loeschcke, V. Gregersen, C. Bendixen // Heredity. — 2009. — Vol. 103. — № 4. — P. 326–332.
27. Kaminski S. Single nucleotide polymorphisms between two lines of European bison (*Bison bonasus*) detected by the use of Illumina Bovine 50 K BeadChip / S. Kaminski, W. Olech, K. Oleński, Z. Nowak, A. Rusc // Conservation Genetics Resources. — 2012. — Vol. 4. — № 2. — P. 311–314.
28. Wojciechowska M. Panel of informative SNP markers for two genetic lines of European bison: Lowland and Lowland–Caucasian / M. Wojciechowska, Z. Nowak, A. Gurgul, W. Olech, W. Drobik, T. Szmatoła // Animal Biodiversity and Conservation. — 2017. — Vol. 40. — № 1. — P. 17–25.
29. Wojciechowska M. From Wisent to the Lab and Back Again - A Complex SNP Set for Population Management as an Effective Tool in European Bison Conservation / M. Wojciechowska, K. Puchała, Z. Nowak-Życzyńska, M. Perlińska-Teresiak, M. Kloch, W. Drobik-Czwarono, W. Olech // Diversity. — 2023. — Vol. 15. — № 1. — P. 116.
30. Roth T. Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of European bison (*Bison bonasus*) / T. Roth, I. Pfeiffer, K. Weising, B. Brenig // Journal of Animal Breeding and Genetics. — 2006. — Vol. 123. — P. 406–409.
31. Михайлова М. Генетическое разнообразие белорусской популяции европейского зубра / М. Михайлова, Ю. Медведева, А. Буневич // Наука и инновации. — 2011. — №. 5 (95). — С. 60–62.
32. Доцев А. В. Исследование аллелофонда и генетической структуры российской популяции зубров (*Bison bonasus*) кавказско-беловежской линии / А. В. Доцев, П. В. Аксенова, В. В. Волкова, В. Р. Харзинова, О. В. Костюнина, Р. А. Мнацеканов, Н. А. Зиновьева // Экологическая генетика. — 2017. — Т. 15. — № 2. — С. 4–10.
33. Homel K. New data on the genetic diversity of European bison (*Bison bonasus*) in Belarus / K. Homel, K. Śliwińska, A. Valnisty, M. Nikiforovl // Theriologia Ukrainica. — 2020. — Vol. 19. — № 19. — P. 45–53.
34. Михайлова М. Е. Сравнение аллельных частот микросателлитных локусов белорусской и польской популяции европейского зубра (*Bison bonasus*) / М. Е. Михайлова, Ю. В. Медведева // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук. — 2023. — № 2. — С. 47–52.
35. Gralak B. Polymorphism of bovine microsatellite DNA sequences in the lowland European bison / B. Gralak, M. Kasińska, C. Niemczewski, Z. Kasiński, M. Żurkowski // Acta Theriologica. — 2004. — Vol. 49. — № 4. — P. 449–456.
36. Luenser K. Low level of genetic variability in European bison (*Bison bonasus*) from the Białowieża National Park in Poland / K. Luenser, J. Fickel, A. Lehnen, S. Speck, A. Ludwig // European Journal of Wildlife Research. — 2005. — Vol. 51. — № 1. — P. 84–87.
37. Tokarska M. Genetic variability in the European bison (*Bison bonasus*) population from Białowieża forest over 50 years / M. Tokarska, A. Kawałko, J. Wyjck, C. Pertoldi // Biological Journal of the Linnean Society. — 2009. — Vol. 97. — № 4. — P. 801–809.
38. Tokarska M. Genes of the extinct Caucasian bison still roam the Białowieża Forest and are the source of genetic discrepancies between Polish and Belarusian populations of the European bison, *Bison bonasus* / T. Małgorzata, A. Bunevich, D. Demontis, T. Sipko, K. Perzanowski, G. Baryshnikov, R. Kowalczyk, Y. Voitukhovskaya, J. Wyjck, B. Marcuk, I. Ruczynska, C. Pertoldi // Biological Journal of the Linnean Society. — 2015. — Vol. 114. — № 4. — P. 752–763.
39. Lapickis R. Analysis of the Genetic Diversity of the European Bison (*Bison bonasus*) Population in Lithuania / R. Lapickis, L. Gričiuvienė, A. Kibiša, I. Lipatova, A. Aleksandravičienė, I. Ražanskė, M. Wojciechowska, M. Kloch, W. Olech, A. Paulauskas // Diversity. — 2023. — Vol. 15. — № 3. — P. 406.

Churbakova N., Kharzinova V., Koshkina O., Volkova V.

Application of microsatellite analysis in genetic studies of the European (*Bison bonasus*)

Abstract.

Purpose: to summarise the results of the genetic diversity studies of the European bison (*Bison bonasus*) using microsatellite analysis method.

Materials and methods. NCBI's PubMed Database (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) and scientific electronic library eLIBRARY.RU (<https://elibrary.ru/>).

Results. Many studies have been devoted to the maintenance of genetic diversity of the European bison. To date, most studies in the field based on evaluation of pedigree data and on the use of nuclear and mitochondrial markers. Assessment of genetic diversity and population structure, control inbreeding level of captive-bred groups is one of the main tasks in the conservation and reproduction of rare species. This is due to the fact that in such groups there is a decrease in genetic variability, which affects the adaptation and survival of individuals reintroduced to the wild. The first genetic studies of wisent began with the analysis of blood groups in the 1960s. With the discovery of DNA structure and the development of methods for determining its variability, the study of protein polymorphism was replaced by the analysis of the nucleotide sequence in a DNA molecule. Microsatellites, single-nucleotide polymorphisms and mitochondrial DNA have become widespread in studies of the genetic structure of wisent. One of the important criteria for DNA markers, is to reduce the cost of analysis and availability for routine use. In this regard, in our study, we paid more attention to a more cost-effective method, which is the analysis of microsatellite loci. A total of 48 microsatellite loci were successfully amplified for the European bison population. The multiplex panels of microsatellite markers developed for cattle (*Bos taurus*) were mainly used. At the same time, the spectrum and number of loci in the studies of different authors were not the same. The only exception was the BM1824 locus, which was used by almost all research teams. The number of alleles per locus varied from 1 to 6. Most of the loci considered are characterised by a low number of alleles, which makes it difficult to assess the actual indicator of the level of inbreeding in the European bison populations. In this connection, it is necessary to search for new, previously unexplored, highly polymorphic loci for estimating the genetic diversity of wisent, which will allow not only a more detailed description of the current state of genetic diversity, the level of genomic inbreeding, but also an assessment of the degree of lineage differentiation, and will help to identify the presence of hybridisation with the North American bison (*Bison bison*) and the cattle (*Bos taurus*).

Key words: wisent; *Bison bonasus*; genetic diversity; genetic marker; mtDNA; STR markers; SNP; DNA chip.

Authors:

Churbakova N. — post-graduate student; e-mail: nadushik95@mail.ru;

Kharzinova V. — PhD (Biol. Sci.), e-mail: veronika0784@mail.ru;

Koshkina O. — PhD (Biol. Sci.), e-mail: olechka1808@list.ru;

Volkova V. — PhD (Biol. Sci.), e-mail: moonlit_elf@mail.ru.

L. K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; 142132, Russian Federation, Moscow region, Podolsk city district, Dubrovitsy settlement 60.

References

1. Scheffers B. The broad footprint of climate change from genes to biomes to people / B. Scheffers, L. De Meester, T. Bridge, A. Hoffmann, J. Pandolfi, R. Corlett, S. Butchart, P. Pearce-Kelly, K. Kovacs, D. Dudgeon, M. Pacifici, C. Rondinini, W. Foden, T. Martin, C. Mora, D. Bickford, J. Watson // Science. — 2016. — Vol. 354. — P. 719.
2. Hogg C. Translating genomic advances into biodiversity conservation / C. Hogg // Nature Reviews Genetics. — 2023. — Vol. 10.
3. Iolchiev B. S. Biological integrity of bison epididymal sperm under cryoconservation and long storage / B. S. Iolchiev, A. I. Abilov, A. V. Tadzhiyeva, V. A. Bagirov, Sh.N. Nasibov, I.N. Shaidullin, P.M. Klenovitskiy, N. A. Kombarova, M. A. Zhilinskiy // Agricultural Biology — 2013. — Vol. 52. — No. 2. — P. 47–52.

4. IUCN Red List of Threatened Species. [Electronic resource]. Date of request: 01.02.2024. URL: <https://www.iucnredlist.org/>.
5. Flint V. E Strategy for conservation of the European Bison in the Russian Federation / V. E. Flint, I. P. Belousova, V. I. Pererva, V. D. Kazmin, E. G. Kiseleva, I. V. Kudryavtzev, N.V. Pirozhkov, T.G. Sipko // Moscow: Russian Academy of Sciences, World Wide Fund for Nature (WWF). — 2002.
6. Olech W. The number of ancestors and their contribution to European bison (*Bison bonasus* L.) population / W. Olech // Annals of Warsaw Agricultural University. Animal Science. — 1999. — No. 35. — P. 111–117.
7. Raczyński J. European Bison Pedigree Book 2022 / Raczyński J., Bołbot M. // Białowieża, Poland: Białowieski National Park. — 2023.
8. Order of the Ministry of Natural Resources and Environment of the Russian Federation of 31.05.2021 N 17-p "On Approval of the Strategy for European bison Conservation in the Russian Federation". [Electronic resource]. Date of request: 01.02.2024. URL: https://www.mnr.gov.ru/docs/strategii_i_doktriny/strategiya_sokhraneniya_zubra_v_rossiyskoy_federatsii/.
9. Khan S. Overview on the Role of Advance Genomics in Conservation Biology of Endangered Species / S. Khan, G. Nabi, M. W. Ullah, M. Yousaf, S. Manan, R. Siddique, H. Hou // International Journal of Genomics. — 2016. — № 5. — P. 1–8.
10. Olech W. Genetic Diversity of Wisent *Bison bonasus* Based on STR Loci Analyzed in a Large Set of Samples / W. Olech, M. Wojciechowska, M. Kloch, M. Perlińska-Teresiak, Z. Nowak-Życzyńska // Diversity. — 2023. — Vol. 15. — № 3. — P. 399.
11. Chesnokov Yu.V. Genetic markers: comparative classification of molecular markers / Yu.V. Chesnokov // Vegetable crops of Russia. — 2018. — No. 3 (41). — P. 11–15.
12. Gasparski J.M. Investigations on the Blood Groups of Wisents (*Bison Bonasus*) and Hybrids in Comparison with the Blood Groups of Cattle / J.M. Gasparski // Blood Groups of Animals. — 1965. — P. 93–97.
13. Sipko T.P. Blood group polymorphism in bison (*Bison bonasus*) / T.P. Sipko, G.S. Rautian, I.G. Udina, S.V. Ukhanov, Z.I. Berendiaeva // Russian Journal of Genetics. — 1995. — Vol. 31. — № 1. — P. 93–100.
14. Sipko T.P. Polymorphism of biochemical markers in European bison (*Bison bonasus*) / T.P. Sipko, G.S. Rautian, I.G. Udina, T.A. Takitskaia // Russian Journal of Genetics. — 1996. — Vol. 32. — № 3. — P. 346–351.
15. Babik W. Low major histocompatibility complex class I (MHC I) variation in the European bison (*Bison bonasus*) / W. Babik, A. Kawalko, J. Wyjck, J. Radwan // The Journal of heredity. — 2012. — Vol. 103. — № 3. — P. 349–359.
16. Radwan J. MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison / J. Radwan, A. Kawalko, J. Wyjck, W. Babik // Molecular ecology. — 2007. — Vol. 16. — № 3. — P. 531–540.
17. Omasheva M. E. Molecular markers. Causes and consequences of genotyping errors / M.E. Omasheva, K. P. Aubakirova, N. A. Ryabushkina // Biotechnology. Theory and practice. — 2013. — No. 4. — P. 20–28.
18. Burzyńska B. Phylogeny and genetic variation of the European bison *Bison bonasus* based on mitochondrial DNA D-loop sequences / B. Burzyńska, W. Olech, J. Topczewski // Acta Theriologica. — 1999. — Vol. 44. — № 3. — P. 253–262.
19. Ward T.J. Identification of domestic cattle hybrids in wild cattle and bison species: a general approach using mtDNA markers and the parametric bootstrap / T.J. Ward, J.P. Bielawski, S.K. Davis, J.W. Templeton, J.N. Derr // Animal Conservation. — 1999. — № 2. — P. 51–57.
20. Wyjck J. Post-bottleneck mtDNA diversity in a free-living population of European bison: Implications for conservation / J.M. Wojcik, A. Kawalko, M. Tokarska, M. Jaarola, P. Vallenback, C. Pertoldi // Journal of Zoology. — 2008. — Vol. 277. — № 1. — P. 81–87.
21. Yudin N. S. Detection of mitochondrial DNA from domestic cattle in European bison (*Bison bonasus*) from the Altai Republic in Russia / N. S. Yudin, I. V. Kulikov, K. V. Gunbin, R. B. Aitnazarov, A. V. Kushnir, T. P. Sipko, M. P. Moshkin // Animal Genetics. — 2012. — Vol. 43. — № 3 — P. 362.
22. Zeyland J. Tracking of wisent-bison-yak mitochondrial evolution / J. Zeyland, L. Wolko, D. Lipiński, A. Woźniak, A. Nowak, M. Szalata, J. Bocianowski, R. Słomski // Journal of applied genetics. — 2012. — Vol. 53. — № 3. — P. 317–322.
23. Kostyunina O. Comparative Genetic Characteristics of the Russian and Belarusian Populations of Wisent (*Bison bonasus*), North American Bison (*Bison bison*) and Cattle (*Bos taurus*) / O.V. Kostyunina, M.E. Mikhailova, A.V. Dotsev, I.I. Zemlyanko, V.V. Volkova, M.S. Fornara, N.A. Akopyan et al. // Cytology and Genetics. — 2020. — Vol. 54. — № 2. — P. 116–123.

24. Pertoldi C. Phylogenetic relationships among the European and American bison and seven cattle breeds reconstructed using the BovineSNP50 Illumina Genotyping BeadChip / C. Pertoldi, M. Tokarska, J. Wyjciek, A. Kawałko, E. Randi, T. Kristensen, V. Loeschcke, D. Coltman, G. Wilson, V. Gregersen, C. Bendixen // *Acta theriologica*. — 2010. — Vol. 55. — № 2. — P. 97–108.
25. Oleński K. Subset of SNPs for parental identification in European bison Lowland-Białowieża line (*Bison bonasus bonasus*) / K. Oleński, S. Kaminski, M. Tokarska, D. Hering // *Conservation Genetics Resources*. — 2017. — Vol. 10. — № 2 — P. 73–78.
26. Tokarska M. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: the case of European bison / M. Tokarska, T. Marshall, R. Kowalczyk, J. Wyjciek, C. Pertoldi, T. Kristensen, V. Loeschcke, V. Gregersen, C. Bendixen // *Heredity*. — 2009. — Vol. 103. — № 4. — P. 326–332.
27. Kaminski S. Single nucleotide polymorphisms between two lines of European bison (*Bison bonasus*) detected by the use of Illumina Bovine 50 K BeadChip / S. Kaminski, W. Olech, K. Oleński, Z. Nowak, A. Rusc // *Conservation Genetics Resources*. — 2012. — Vol. 4. — № 2. — P. 311–314.
28. Wojciechowska M. Panel of informative SNP markers for two genetic lines of European bison: Lowland and Lowland–Caucasian / M. Wojciechowska, Z. Nowak, A. Gurgul, W. Olech, W. Drobik, T. Szmatoła // *Animal Biodiversity and Conservation*. — 2017. — Vol. 40. — № 1. — P. 17–25.
29. Wojciechowska M. From Wisent to the Lab and Back Again - A Complex SNP Set for Population Management as an Effective Tool in European Bison Conservation / M. Wojciechowska, K. Puchała, Z. Nowak-Życzyńska, M. Perlińska-Teresiak, M. Kloch, W. Drobik-Czwaro, W. Olech // *Diversity*. — 2023. — Vol. 15. — № 1. — P. 116.
30. Roth T. Application of bovine microsatellite markers for genetic diversity analysis of European bison (*Bison bonasus*) / T. Roth, I. Pfeiffer, K. Weising, B. Brenig // *Journal of Animal Breeding and Genetics*. — 2006. — Vol. 123. — P. 406–409.
31. Mikhailova M. Genetic diversity of the Belarusian population of European bison / M. Mikhailova, Y. Medvedeva, A. Bunevich // *Science and Innovations*. — 2011. — No. 5 (95). — P. 60–62.
32. Dotsev A.V. Study of allele pool and genetic structure of Russian population of Lowland-Caucasian line of European bison (*Bison bonasus*) / A.V. Dotsev, P.V. Aksenova, V.V. Volkova, V.R. Kharzinova, O.V. Kostyunina, R.A. Mnatsekanov, N.A. Zinovieva // *Ecological genetics* — 2017. — Vol. 15. — No. 2. — P. 4–10.
33. Homel K. New data on the genetic diversity of European bison (*Bison bonasus*) in Belarus / K. Homel, K. Śliwińska, A. Valnisty, M. Nikiforovl // *Theriologia Ukrainica*. — 2020. — Vol. 19. — № 19. — P. 45–53.
34. Mikhailova M.E. Comparison of allele frequencies of microsatellite loci in Belorussian and Polish population of European bison (*Bison bonasus*) / M.E. Mikhailova, Yu.V. Medvedeva // *Vestsi Natsyyanal'nai Akademii Navuk Belarusi. Seryya Biyalagichnykh Navuk*. — 2023. — No.2. — P. 47–52.
35. Gralak B. Polymorphism of bovine microsatellite DNA sequences in the lowland European bison / B. Gralak, M. Kasińska, C. Niemczewski, Z. Kasiński, M. Żurkowski // *Acta Theriologica*. — 2004. — Vol. 49. — № 4. — P. 449–456.
36. Luenser K. Low level of genetic variability in European bison (*Bison bonasus*) from the Białowieża National Park in Poland / K. Luenser, J. Fickel, A. Lehnen, S. Speck, A. Ludwig // *European Journal of Wildlife Research*. — 2005. — Vol. 51. — № 1. — P. 84–87.
37. Tokarska M. Genetic variability in the European bison (*Bison bonasus*) population from Białowieża forest over 50 years / M. Tokarska, A. Kawałko, J. Wyjciek, C. Pertoldi // *Biological Journal of the Linnean Society*. — 2009. — Vol. 97. — № 4. — P. 801–809.
38. Tokarska M. Genes of the extinct Caucasian bison still roam the Białowieża Forest and are the source of genetic discrepancies between Polish and Belarusian populations of the European bison, *Bison bonasus* / T. Małgorzata, A. Bunevich, D. Demontis, T. Sipko, K. Perzanowski, G. Baryshnikov, R. Kowalczyk, Y. Voitukhovskaya, J. Wyjciek, B. Marczuk, I. Ruczynska, C. Pertoldi // *Biological Journal of the Linnean Society*. — 2015. — Vol. 114. — № 4. — P. 752–763.
39. Lapickis R. Analysis of the Genetic Diversity of the European Bison (*Bison bonasus*) Population in Lithuania / R. Lapickis, L. Gričiuvienė, A. Kibiša, I. Lipatova, A. Aleksandravičienė, I. Ražanskė, M. Wojciechowska, M. Kloch, W. Olech, A. Paulauskas // *Diversity*. — 2023. — Vol. 15. — № 3. — P. 406.