На правах рукописи

Молодцева Анна Сергеевна

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ДРЕВНИХ И СОВРЕМЕННЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ КРУПНЫХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ ЗАПАДНОЙ СИБИРИ

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск 2022

Работа выполнена в лаборатории сравнительной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Научный руководитель: **Трифонов Владимир Александрович**, доктор биологических наук, профессор РАН, заведующий лабораторией сравнительной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Оппоненты: **Прохорчук Егор Борисович**, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией геномики и эпигеномики позвоночных Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, г. Москва

Ковалева Вера Юрьевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экологии сообществ позвоночных животных Федерального бюджетного учреждения науки Института систематики и экологии животных СО РАН, г. Новосибирск

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск

Защита состоится: **«**14**»** сентября 2022г. на утреннем заседании диссертационного совета Д 003.074.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, г. Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, e-mail: ovant@mcb.nsc.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref

Автореферат разослан «17» июня 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических на О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

Изучение древней ДНК является одним из методов палеогенетики – молодой и динамично развивающейся области науки на стыке молекулярной эволюционной биологии, археологии и палеонтологии. Сложность работы с аДНК (ancient DNA) обусловлена крайне низким содержанием эндогенной ДНК на фоне ее контаминаций ДНК древних и современных микроорганизмов, деградации аДНК и химической модификации оснований, приводящей к ошибкам считывания последовательности нуклеотидов. Поэтому исследования древней ДНК тесно связаны с методологическими достижениями, решающими специфичные для этой области технические проблемы.

Сегодня палеогенетики восстанавливают последовательности ДНК из палеонтологических образцов, реконструируют нуклеотидные последовательности геномов и структуру популяций в прошлом. Серия крупномасштабных исследований показала истинный потенциал древних образцов ДНК для изучения процессов эволюции, проверки моделей и гипотез, использующихся для изучения хода эволюции и популяционной генетики, а также анализа палеоэкологических изменений. Последние достижения в области секвенирования ДНК на платформах нового поколения дали возможность наиболее полно восстанавливать структуру геномов археологических и палеонтологических образцов. Получаемая информация позволяет изучать генетическое родство между вымершими и современными популяциями и видами.

Работа соискателя посвящена сравнению митохондриальной ДНК древних и современных крупных млекопитающих Западной Сибири, т.к популяционная история для большинства видов на данной территории до сих пор остается неизученной, не смотря на многочисленные и хорошо описанные костные остатки, найденные при раскопках археологических и палеонтологических памятников. В работе исследовали образцы из Денисовой и Разбойничьей пещер, археологического памятника Колывань, рек Чик и Чумыш.

Целью работы является установление филогенетических связей и популяционной истории для представителей крупных млекопитающих Западной Сибири с помощью анализа последовательностей митохондриальной ДНК.

Соответственно были поставлены следующие **задачи**:

1. Провести филогенетический анализ древних образцов сибирской косули (*Capreolus pygargus*) из Денисовой пещеры (возрастом 1-40 тыс. лет) и современных сибирских косуль из нескольких регионов северной Азии.

2. Определить филогенетическое положение древнего собакоподобного представителя рода *Canis* (возрастом 33 тыс. лет) из Разбойничьей пещеры.

3. Определить видовую принадлежность древнего представителя семейства Equidae из Денисовой пещеры и филогенетическое положение образца относительно древних и современных видов.

4. Изучить популяционную историю бурого медведя (*Ursus arctos)* на территории Западной Сибири, используя последовательности мт ДНК древних представителей бурых медведей из Денисовой пещеры, рек Чик и Чумыш, археологического памятника Колыванское и современных популяций.

Научная новизна.

В настоящем исследовании с применением метода вложенных пар праймеров получены последовательности контрольного района митохондриальных геномов для 14 древних косуль из Денисовой пещеры от 40 тыс. лет до 1 тыс. лет и для 37 современных косуль с различных территорий Алтая, Западной Сибири, Дальнего Востока, Якутии, Маньчжурии. Филогенетический анализ показал высокое разнообразие древних косуль и связи с различными современными популяциями, каждая из которых обладает намного более низким генетическим разнообразием.

Филогенетический анализ полных митохондриальных геномов древних и современных представителей псовых, показал родство древнего собакоподобного образца с Алтая из Разбойничьей пещеры возрастом 33 тыс. лет [Ovodov., 2011] с современными охотничьими породами собак из Европы, что может свидетельствовать о более раннем процессе одомашнивания во времена охотников собирателей, еще до появления земледелия.

Определена видовая принадлежность древнего представителя лошадиных - *Equus ovodovi*, и это расширяет ареал обитания данного вида по сравнению с ранее полученными сведениями. Благодаря использованию высокопроизводительного секвенирования и гибридизационного обогащения библиотек целевыми фрагментами полностью восстановлен митохондриальный геном вымершего вида и показано, что филогенетически лошади Оводова ближе к зебрам, чем к ослам, куланам и кианам.

Реконструировали митохондриальные геномы четырех древних бурых медведей (возрастом 5,5 -40 тыс. лет) и 19 современных особей. Получены молекулярно-генетические доказательства множественных волн миграции древних бурых медведей и их следы в современных популяциях Западной Сибири.

Положения, выносимые на защиту.

Сибирская косуля отличается высоким гаплотипическим разнообразием в плейстоцене на Алтае, что может свидетельствовать о роли этого региона для сохранения вида в периоды ледникового максимума.

Древний представитель семейства псовые из Разбойничьей пещеры наиболее близок к современным охотничьим европейским породам собак, что может свидетельствовать о множественных фактах одомашнивания и отодвигает время доместикации собак к периоду 18,8-32,1 тыс. лет назад.

Древний представитель лошадиных относится к вымершему виду *E. ovodovi* и имеет большее родство с зебрами, чем с ослами, куланам и кианга́ми.

Популяционная история бурых медведей насчитывает несколько волн миграции из Южной Сибири на Аляску и в Японию, что отражается на гаплотипическом составе плейстоценовых образцов.

Теоретическая и научно-практическая значимость работы.

Данные филогенетического и популяционного анализа уточняют и дополняют взгляды на популяционную историю и современную систематику для сибирской косули (*Capreolus pygargus*) и бурого медведя *(Ursus arctos).*

Зонд, разработанный для обогащения целевыми фрагментами библиотек для секвенирования, позволяет восстанавливать митохондриальные геномы вымерших видов лошадиных.

Описанные нами последовательности разных видов крупных млекопитающих внесены в общедоступные базы данных и могут быть в дальнейшем использованы при анализе современных и древних популяций и планировании природоохранных мероприятий с целью восстановления природных популяций.

Степень достоверности и апробация результатов.

Научные положения и выводы являются обоснованными. Полученные результаты являются достоверными и согласуются с современными литературными данными.

Материалы диссертационной работы были представлены на международных конференциях: Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2010», Москва 2010; «II Международная научно-практическая конференция постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине: геномика, протеомика, биоинформатика», Новосибирск, 2011; High-throughput sequencing in genomics, Novosibirsk 2013; Всероссийская конференция с международным участием «Высокопроизводительное секвенирование в геномике», Новосибирск, 2017; Международная конференция «Хромосома 2018», Новосибирск, 2018.

Публикации.

Материал диссертации представлен в 6 статьях в рецензируемых журналах, все из списка ВАК, и имеется 9 публикаций в виде тезисов конференций.

Вклад автора.

Автором выполнена экспериментальная работа по гаплотипированию древних и современных косуль, древнего собакоподобного образца,

лошади Оводова и древних медведей: разработана система вложенных праймеров для косуль и собаки, зондов для обогащения для лошади и медведей, подготовлены библиотеки митохондриальной ДНК (мтДНК) под индексами Illumina для получения прочтений полных митохондриальных геномов.

Обработка данных секвенирования, восстановление полных или частичных митохондриальных последовательностей с использованием различных референсных геномов, сравнение последовательностей древних и современных представителей различных видов, филогенетический анализ и подготовка публикаций проводились совместно с соавторами Трифоновым В. А., Макуниным А. И., Воробьевой Н. В., Кичигиным И. Г., Щербаковым Д. Н.

Структура и объем диссертации.

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 253 ссылки, и приложения. Диссертация изложена на 150 страницах машинописного текста, содержит 17 таблиц и 27 рисунков.

Благодарности автора.

Работа выполнена в отделе разнообразия и эволюции геномов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск.

Автор выражает глубокую признательность за организационную помощь, постоянное внимание и ценные советы в выполнении этого исследования своему руководителю Владимиру Александровичу Трифонову и научным консультантам Надежде Валентиновне Воробьевой и Александру Сергеевичу Графодатскому (ИМКБ СО РАН) за участие и помощь в работе и благодарит за участие Макунина Алексея Игоревича, Щербакова Дмитрия Юрьевича и всех соавторов. За предоставленные палеонтологические и археологиеские материалы Сергея Константиновича Васильева, Дмитрия Николаевича Оводова и Алексея Алексеевича Тишкина.

Автор выражает благодарность сотрудникам отдела эволюции и разнообразия геномов ИМКБ СО РАН за постоянную помощь и поддержку.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы включает шесть разделов. Изложена история изучения древней ДНК: от работ, в которых получены первые короткие последовательности митохондриальной ДНК для ряда видов до современных популяционных работ, включающих анализ ядерных и

митохондриальных маркеров, полученных с помощью современных методов молекулярной биологии: гибридизационного обогащения целевыми фрагментами и высокопроизводительного секвенирования с тщательным биоинформатическим анализом, реконструирующим филогению и историю формирования видов. Представлена информация о палеонтологических и археологических памятниках Западной Сибири. Описаны объекты исследования и имеющиеся наработки в их изучении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы, использованные в работе.

Древние образцы сибирской косули из Денисовой пещеры возрастом 1-40 тыс. лет, собакоподобный образец из Разбойничьей пещеры (33 тыс.лет), лошадь Оводова из Денисовой пещеры (32 тыс.лет), бурые медведи (4,5-40 тыс.лет) из Денисовой пещеры, археологического памятника Колыванское-I, рек Чик и Чумыш. Современные образцы 37 косуль из Новосибирской области, Якутии, Дальнего Востока, Тянь-Шаня, Алтая. 19 образцов современных бурых медведей из различных регионов Сибири: Новосибирска, Томска, Красноярска, Иркутска, Якутии; Дальнего Востока: Хабаровск. Образцы для выделения ДНК были собраны у сибирских косуль и бурых медведей, которые были получены на основании разрешений на добычу охотничьих ресурсов.

Методы молекулярной биологии.

Экстракцию древней ДНК проводили в специализированном боксе с соблюдением правил протокола аутентичности по методу Янга с соавторами [Yang и др., 1998] с модификацией. Для древних косуль и собакоподобного образца использовали полногеномную амплификацию с изменением стадии фрагментации, систему вложенных праймеров и секвенирование по методу Сэнгера. Для лошади Оводова и древних медведей проводили приготовление индексированных библиотек, гибридизационное обогащение целевыми фрагментами мтДНК и секвенирование на высопроизводительной платформе MiSeq Illumina.

Выделение современной ДНК проводили на колонках DNeasy Blood &Tissue Kit (QIAGEN) в соответствии с протоколом производителя. В работе использованы стандартные методы молекулярной биологии: ПЦР, секвенирование по методу Сэнгера.

Биоинформатический анализ данных. Полученные последовательности выравнивали с помощью программ CLUSTAL W version 1.8, bowtie2 v. 2.2.9, MAFFT v.7.245 и BWA MEM v.0.7.17-r118

Данные высокопроизводительного секвенирования обрабатывали с помощью PALEOMIX BAM Pipeline v1.2.5. Полученные последовательности были обрезаны и коллапсированы с использованием AdapterRemoval v.2.1.7. Для улучшения качества проводили удаление дубликатов ПЦР и изменение качества замен для потенциальных сайтов дезаминирования (mapDamage v. 2.0.6) и дополнительное выравнивание

областей с инсерциями и делециями (GATK v. 3.3-0-g37228af (ge9d806836)). Консенсусные последовательности сравнивали и корректировали вручную (Geneious v. 8.1.6)

Филогенетический анализ проводили с применением программного обеспечения MEGA 5, MOBYLE PORTAL (http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py), TREE-PUZZLE v5.2, MrBayes v3.2.5, RAxML v8.2.3, MAFFT, FigTree v1.4.2, Haplotype Viewer.

Для популяционного анализа использовали программное обеспечение Arlequin 3.5, DnaSP 5.10, AMOVA и BEAST 1.8.4.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Филогенетические взаимоотношения древних и современных сибирских косуль (*C. pygargus)*

Нами получены нуклеотидные последовательности КР мтДНК длиной 629 н.п. для 37 современных образцов косули сибирской из Якутии, Горного Алтая, Новосибирской области, Дальнего Востока, Киргизии и 14 древних образцов из различных литологических слоев Денисовой пещеры.

Построение филогенетических деревьев (Рис. 1) показало наличие подразделения на кластеры, включающие и древних и современных косуль, относительное положение кластеров имеет низкую поддержку.

Сибирская косуля отличается большим гаплотипическим разнообразием и смешанным составом современных популяций, за исключением западносибирской и якутской. Границы ареала *C. p. pygargus*, по нашим данным, захватывают территорию Кыргызстана. Близкое родство современных якутских косуль древнему гаплотипу DC17 говорит о том, что заселение территории Якутии могло проходить с территории Алтая.

Палинологические исследования свидетельствуют, что в последний ледниковый максимум среднегодовая температура была на 1-3^0 выше современных температур, на территории Алтая произрастали широколиственные леса и условия были благоприятны для обитания сибирской косули и других видов крупных млекопитающих. Современные европейские косули несут гаплотипы, обнаруженные среди древних алтайских сибирских косуль и являются свидетельством межвидовой гибридизации в прошлом.

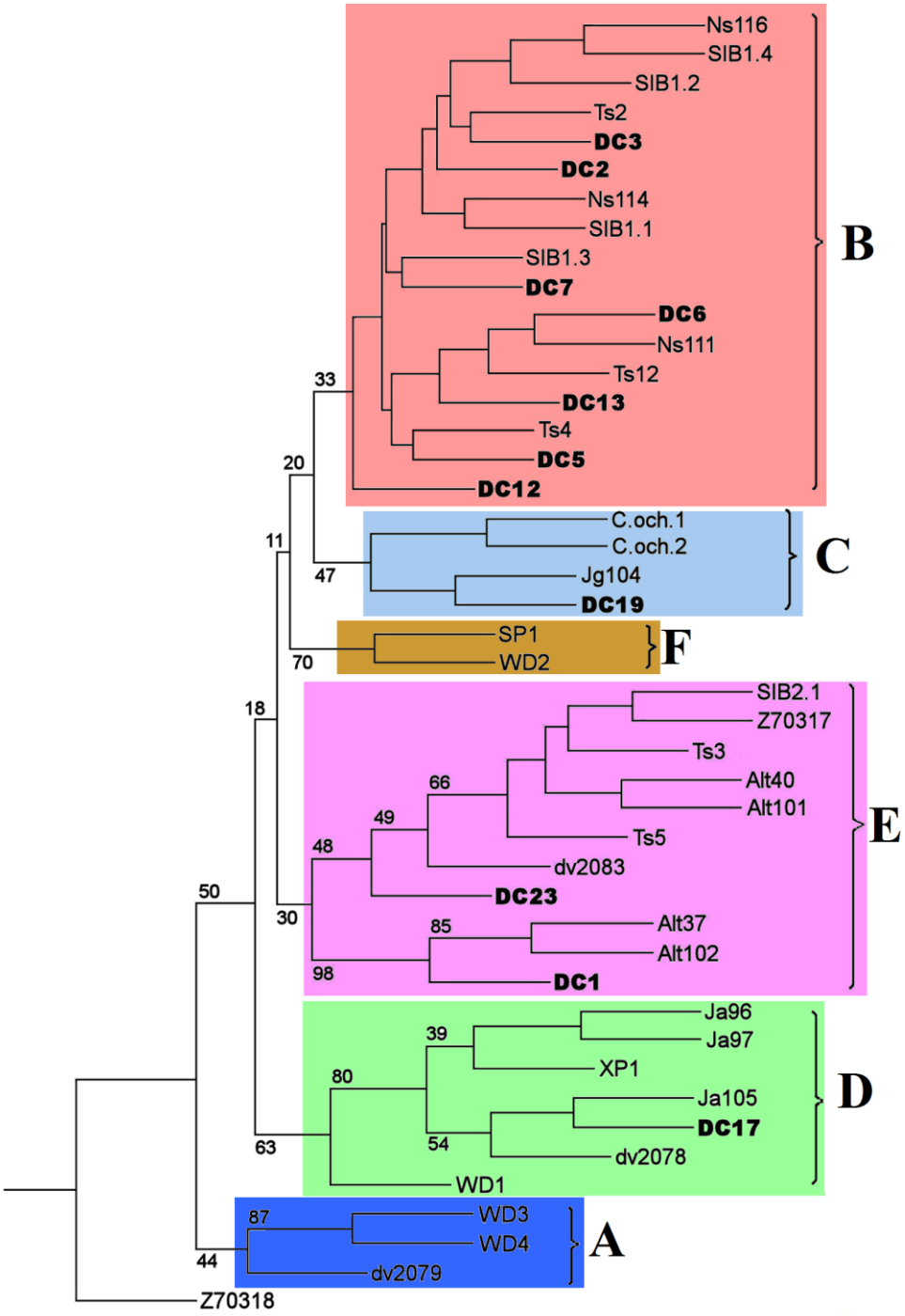

Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом максимального правдоподобия (ML) для КР мтДНК сибирской косули с бутстреп-поддержкой 100. Параметр соотношения транзиций и трансверсий=9,72 и параметр гамма-распределения альфа=0,28 определены в соответствии с моделью Кимуры 2P (ARLEQUIN, версия 3.1). Указаны основные кластеры и значения поддержки. В качестве внешней группы взята европейская косуля (Z70318). Сокращения: «DC» — образцы из Денисовой пещеры, «Alt» — образцы с Алтая; «Ns» – образцы из Новосибирской области; «Ts» – образцы Тянь-Шаня; «Ja» — якутские образцы; «dv» – образцы с российского Дальнего Востока (изучаются здесь); «SIB2» и Z70317 — российские дальневосточные образцы из [Randi, Pierpaoli, Danilkin, 1998]; «SIB1» – образец из Курганской области [Randi, Pierpaoli, Danilkin, 1998]; «WD», «XP», «SP» – образцы из Северо-Восточного Китая [Xiao и др., 2007]; «C.och» — корейские образцы (из GenBank). Кластеры (A–F) отмечены разными цветами.

3.2. Филогенетический анализ *Canidae*

Первый этап работы с собакоподобным образцом из Разбойничьей пещеры возрастом 33 тыс. лет включал восстановление последовательности КР мт ДНК 413 п.н. и сравнение с известными последовательностями псовых. Предварительный анализ показал, что исследованный нами образец с Алтая, вероятно, является древней собакой. Для подтверждения этого вывода последовало получение полного митохондриального генома для этого образца.

Филогенетический анализ на основе полных митохондриальных геномов 18 древних образцов псовых возрастом 36-1 тыс. лет, современных геномов 77 собак, 49 серых волков *(Canis lupus)* и четырех койотов *(Canis latrans)* выявил хорошо разрешенную филогению (рис. 2).

Хотя собаки и волки не являются взаимно монофилетическими кладами, все современные собаки и многие популяции волков попадают в одну из нескольких хорошо поддерживаемых клад. В рамках этой древовидной топологии собаки попадают в одну из четырех клад (от A до D) (рис. 3), причем клада A содержит большинство последовательностей собак (64%). Три гаплотипа древних бельгийских псовых образуют наиболее глубоко расходящуюся группу на дереве. Хотя ранее морфология одного из них, собаки Гойе (Бельгия, 36 тыс. лет), была интерпретирована как собакоподобная [Germonpré и др., 2009], гомология мтДНК этого образца с другими псовыми показывает, что она является сестринской группой к кладе, содержащей всех современных собак и волков, и не может быть прямым предком собак. Более подробный анализ полной мтДНК предполагаемого образца собаки из Разбойничьей пещеры убедительно указывает на его положение в корне клады, объединяющей два древних генома волка, двух современных волков, а также двух собак скандинавского происхождения (клада D). Данная клада включает: большую шведскую лайку (ямхунд), выведенную в Швеции и использующуюся для охоты на лося, а также норвежского элкхунда - национальную породу Норвегии, также использующуюся в охоте на крупного зверя и мелкую дичь.

Таким образом, можно предположить, что доместикация собаки происходила раньше по времени, чем предполагалось ранее и приходится на время охотников-собирателей 18-32 тыс. лет назад. Современные волки не являются прямыми предками современных собак. Современные европейские породы собак, скорее всего произошли от группы древней клады волков, дикие представители которых вымерли к настоящему времени [Thalmann и др., 2013].

Одна из самых ранних предполагаемых собак из Разбойничьей пещеры могла представлять прерванный эпизод одомашнивания. Это говорит о том, что условия приручения собак не были уникальными для одного места и времени.

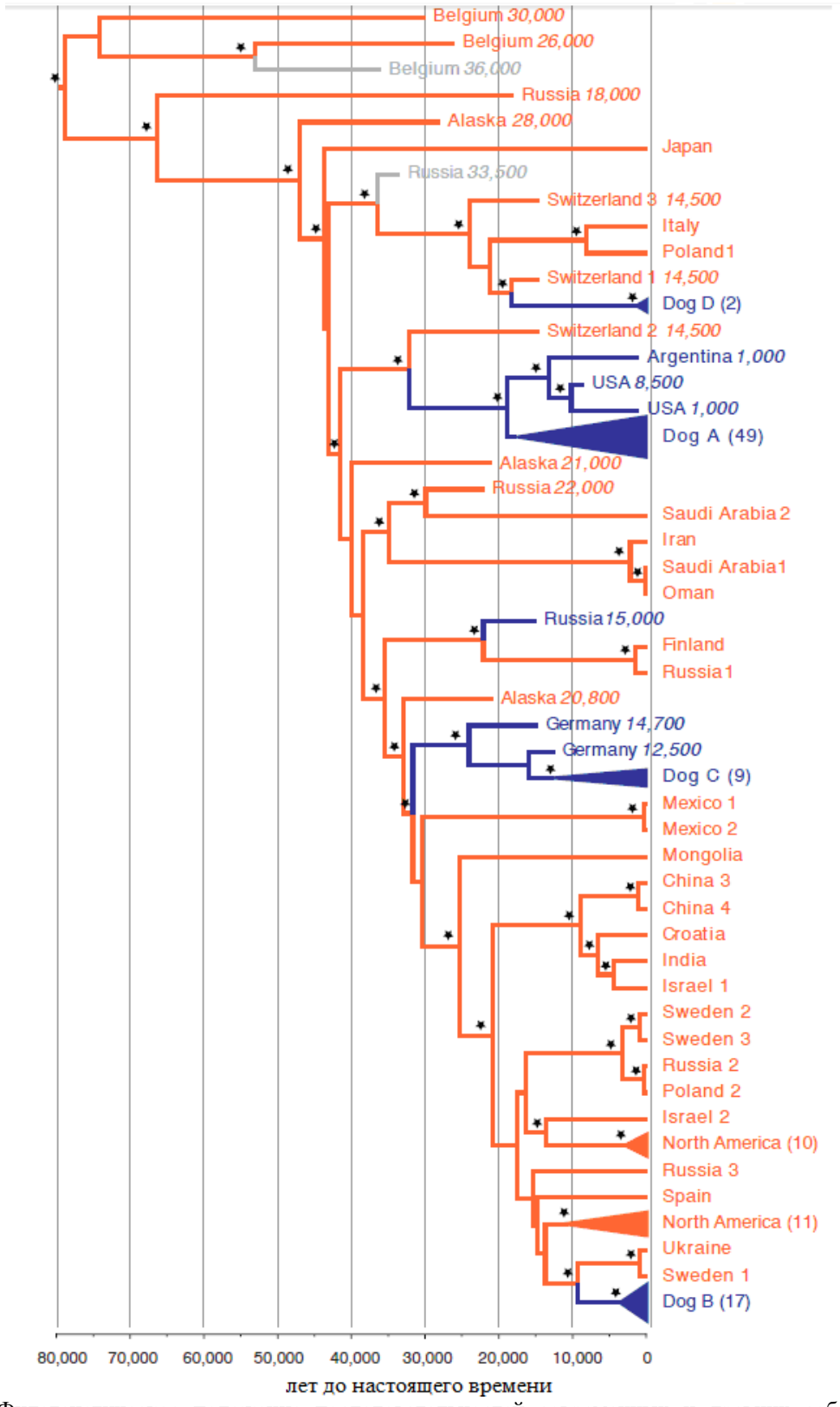

Рис.2. Филогенетическое положение последовательностей современных и древних собак (синий) и волков (оранжевый), полученное с помощью методов: ближайших соседей, максимального правдоподобия и байесовского. Внешняя группа (четыре койота) и две последовательности китайских волков были исключены. Для древних образцов подписана страна происхождения и примерный возраст (выделены курсивом; в годах до настоящего времени). Ископаемые образцы с неоднозначной таксономической классификацией обозначены серым цветом. Всякий раз, когда современные псовые последовательности образуют монофилетический кластер, количество последовательностей в кластере указано в скобках. Звездочки показывают статистическую поддержку, когда оба значения бутстрепа >90%, а апостериорная поддержка >0,9 для анализа максимального правдоподобия и байесовского анализа соответственно.

3.3. Определение видовой принадлежности и филогенетического положения древнего образца представителя *Equidae*

Мы реконструировали полную последовательность митохондриального генома для костного образца представителя лошадиных из Денисовой пещеры, возрастом 32 360 ± 450 лет. Полученная последовательность ДНК была отнесена к вымершему виду *Equus ovodovi* (в GenBank – KY114520).

Всего было получено 8506508 ридов. Для обработки данных использовали PALEOMIX BAM Pipeline v1.2.5. 3235963 (38,0%) пар ридов были успешно обрезаны и коллапсированы (AdapterRemoval v. 2.1.7). Из-за филогенетической близости *E. ovodovi* к современным некабаллоидным лошадям мы использовали полные митохондриальные геномы *E. asinus, E. hemionus* и *E. kiang* в качестве дополнительных референсных геномов в дополнение к лошади *(E. caballus*), использованной в предыдущем исследовании (GenBank: NC_001788.1, NC_016061.1, NC_020433.1 и NC_001640.1, соответственно). В результате длина последовательности с 15 084 (мтДНК *E. caballus* в качестве референса) увеличилась до 17 590 (*E. hemionus*). Консенсусные последовательности сравнивали и корректировали вручную (Geneious v. 8.1.6), что приводило к полному (100%) восстановлению митохондриального генома. Показано, что геном, полученный в нашем исследовании, не обладает кластером тандемных повторов в контрольной области, как предполагалось ранее. Чтобы определить филогенетическое положение образца, мы использовали все последовательности из исследования, реконструировавшего отношения между вымершими и современными лошадиными **(**Vilstrup et al., 2013). Исследуемый образец располагается близко к *E. ovodovi* из Хакасии. Два образца *E. ovodovi* разделяют 118 нуклеотидных изменений по сравнению с 45–163 (в среднем 109) с современной *E. caballus*, что указывает на то, что оба образца *E. ovodovi* принадлежат к одному и тому же виду (Рис. 3). Наши данные подтвердили результаты, полученные на основе выборки из Хакасии, расширили географический ареал и время существования вида *E. ovodovi*. Они указывают на то, что *E. ovodovi* несколько ближе к зебрам, чем к *E. asinus, E. hemionus* или *E. kiang*, в то время как предыдущее исследование [Vilstrup et al., 2013] указывало на базальную позицию *E. ovodovi* у всех некабаллоидных лошадиных.

В обоих случаях исследования обеспечивают низкую поддержку в разрешении политомии этих четырех групп (*E. ovodovi, E. asinus, E. hemionus, E. Kiang* и зебр). Мы ожидаем, что тщательное изучение ядерных маркеров в древних образцах *E. ovodovi* позволит точнее определить филогенетическое положение среди Equinae.

Видовое определение представителей лошадиных по морфорогическим признакам является сложной задачей и практически невозможно для обломков костей и зубов. Современные молекулярно-генетические методы и биоинформационный анализ позволяют не только

идентифицировать предков современных животных, но и определять вымершие виды, что стало возможным в нашем исследовании на примере обломка зуба *E. ovodovi*. Данная находка расширяет границы ареала данного вида, а филогенетический анализ полного митохондриального генома определяет базальное положение лошади Оводова к современным зебрам, отдельно от клады ослов и кианго, хоть и с низкой статистической поддержкой.

Радиоуглеродное датирование является важным этапом при работе с древними образцами, так как даже костные образцы из хорошо описанных литологических слоев могут быть вторично переотложены в более раннем слое. Для ископаемого образца из семейства лошадиные из Денисовой пещеры (сл.9.1) предполагался возраст около 10 тыс. лет, но радиоуглеродное датирование показало, что образцу около 32 тыс. лет.

Рис. 3. Филогенетическое дерево на основе полных митохондриальных геномов, включая образцы, использованные в [Vilstrup и др., 2013] и образец *E. ovodovi* из Денисовой пещеры. Значения поддержки: апостериорные вероятности из 4250 из 5000 деревьев, отобранных с помощью MrBayes / bootstrap из 1000 повторов с помощью RaxML. ‘*’ Указывает на полную поддержку обоими методами (1/100), ‘-’ указывает на отличия в порядке ветвления для дерева RaxML

3.4. Результаты полного митогеномного секвенирования древних и современных бурых медведей Западной Сибири

Мы восстановили последовательности митохондриальных геномов для 4 древних (~4,5–40 тыс. лет) и одного современного медведя, используя гибридизационное обогащение библиотек для секвенирования с последующим прочтением на платформе высокопроизводительного секвенирования Illumina MiSeq, а также полные митохондриальные геномы для 18 современных образцов бурого медведя из Сибири (Иркутская, Томская, Красноярская, Якутская области) и Дальнего Востока (Хабаровский край) путем секвенирования перекрывающихся фрагментов ПЦР. Для древних образцов возрастом 3,6–40 тыс. лет 0,04–0,66% прочтений были картированы на референсный геном, а при 0,5–3 млн прочтений удалось достичь 6,7–76,6-кратного покрытия митохондриального генома. В результате консенсусные последовательности были успешно реконструированы почти полностью (91–99,8% для 3-кратного порога покрытия) для древних образцов. Мы также подтвердили отсутствие контаминации ДНК из зондов гибридизации; мы секвенировали современный образец, используемый для получения зонда (Irk), и вручную проверили, что его характерные замены не присутствуют в данных по древней ДНК.

3.4.1. Аутентичность данных, полученных по древним образцам

Работы с древними образцами проводились в стерильном боксе, рабочие поверхности и инструменты обрабатывали деконтаминирующим раствором DNAzap (Ambion), облучением УФ. Применение высокопроизводительного секвенирования позволило получать многократное покрытие для исследуемых районов и на стадии обработки данных отфильтровать экзогенные примеси, находить позиции подвергшиеся дезаминированию. Спектр распределения замен к концу рида у древних и современных образцов отличается: для последовательностей древней ДНК характерно увеличение числа замен на концах ридов, в отличие от современной ДНК

3.4.1. Филогенетический анализ бурых медведей

Мы провели филогенетический анализ на основе полных митохондриальных последовательностей 4 древних, 19 современных медведей из Сибири и Дальнего Востока, а также 259 ранее опубликованных митохондриальных геномов бурых и белых медведей, отобранных по всему миру.

Как древние, так и современные образцы из Сибири и Дальнего Востока попали в кладу 3 (Рис. 4). Самые древние образцы в нашей выборке, U2 Chu и U3 Chi (около 30–40 тыс. лет) были идентифицированы как внешние группы для субклады 3a и всей клады 3 соответственно.

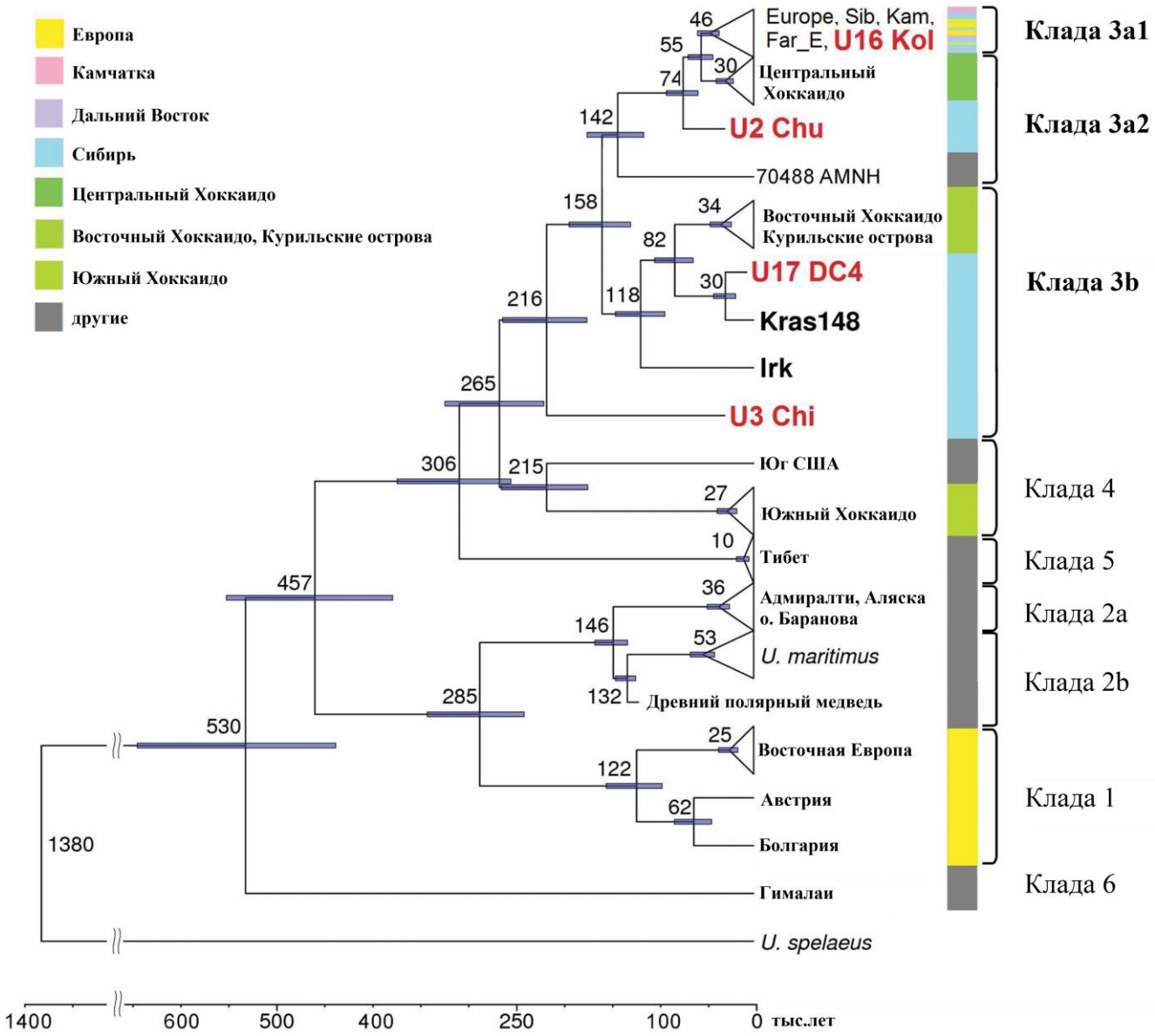

Рис. 4. Датированная филогения BEAST для полных митохондриальных геномов 282 бурых медведей (Таблица 3П,4П,11П). Ветви Клады 3a1 свернуты для краткости. Красным обозначены древние образцы, а черным жирным шрифтом обозначены современные образцы из настоящего исследования. Значения в узлах и синие линии - среднее значение и 95% доверительный интервал времени расхождения (в тысячах лет). Числа над ветвями – апостериорные байесовские вероятности. Аутгруппы: Индия, *Ursus thibetanus* MG066704 и *Ursus spelaeus* NC_011112.

Образец U16 Kol (~4,5 тыс. лет) был отнесен к современной широкораспространенной кладе 3a1, ближайшими родственниками которой являются современные медведи из Восточной и Северной Европейской России. Образец медведя U17 DC (~5,5 тыс. лет) оказался принадлежащим к кладе 3b и вместе с современным образцом из Сибири (Kras148) образовал субкладу, отличную от ранее описанной группы медведей Восточного Хоккайдо и Курильских островов.

Большинство современных образцов из нашего исследования располагаются внутри субклады 3a1 и разделяются на группы описанные ранее: юго-восточно-европейской и аляско-камчатской группы [Anijalg и др., 2018].

3.4.2. Популяционно-генетический анализ бурых медведей

Отношения между митохондриальными гаплотипами северных евразийских клад 3 и 4 были дополнительно исследованы с использованием медианной сети (рис. 5). Как и ожидалось, образцы с острова Хоккайдо и Курильских островов попали в три отдельные группы, соответствующие кладам 3a2, 3b (в которые также входили сибирские образцы Kras148 и Irk) и 4. Оставшееся разнообразие (клада 3a1) имело единое происхождение с четким различием между тремя группами: Камчатка, Европа и Сибирь вместе с Дальним Востоком (материк).

Мы оценили уровни генетической дифференциации между популяциями бурых медведей Северной Европы (исключив из этого анализа образцы из Центральной и Южной Европы), Сибири, Дальнего Востока (материк), Камчатки и Хоккайдо для полностью восстановленных митохондриальных

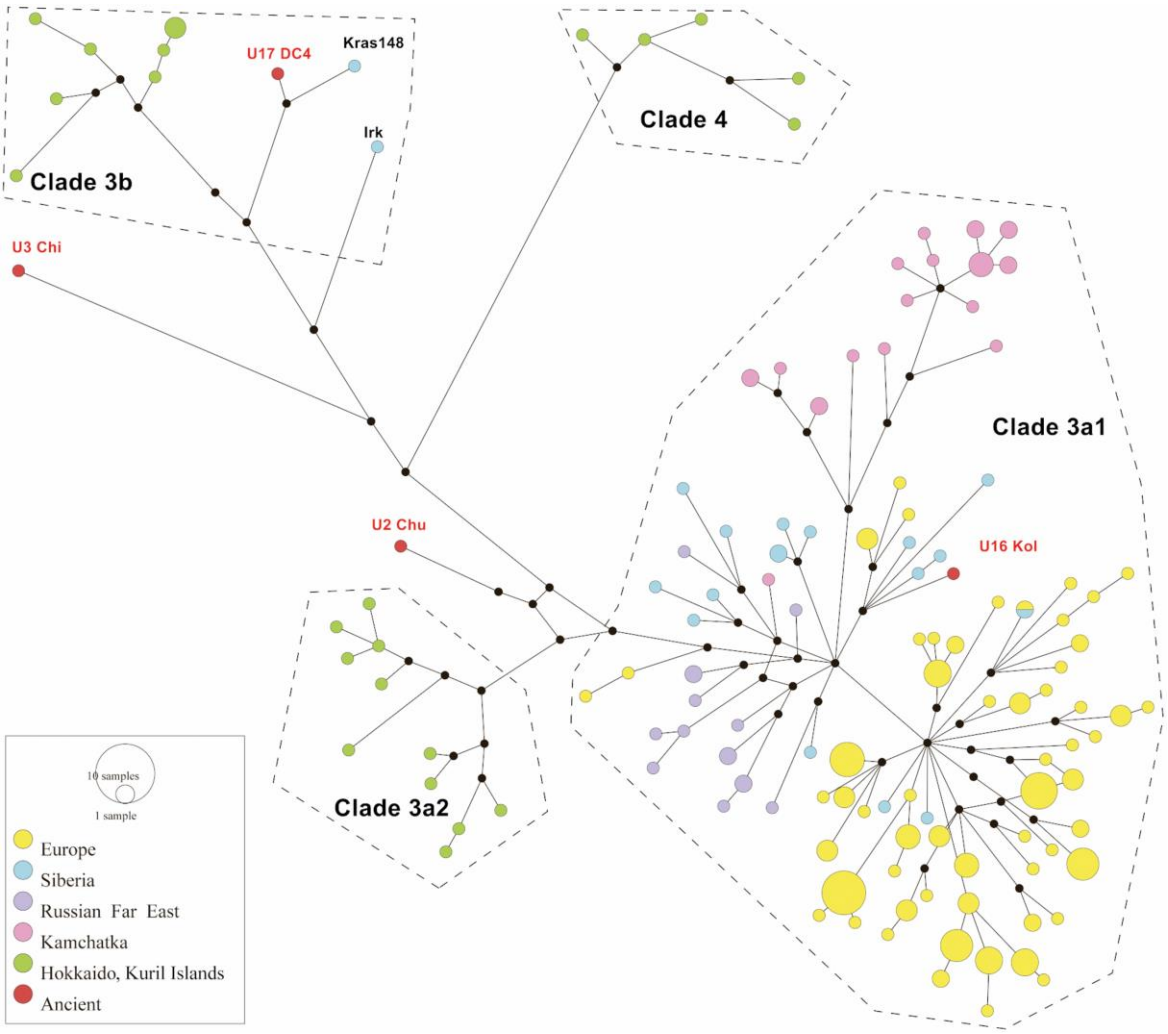

Рис. 5. Филогенетическая сеть из 136 митохондриальных геномов современных медведей, принадлежащих к кладам 3 и 4. Размер круга соответствует количеству идентичных образцов. Цветовое обозначение: желтый-Европа; синий-Сибирь; зеленый-Япония; красный-Камчатка; фиолетовый-Дальний Восток.

геномов 218 современных образцов. Генетическая дифференциация между популяциями Хоккайдо и остальными регионами высока (значения F_{ST} между 0,2 и 0,5). Европейские популяции также довольно сильно отличаются от азиатских (F_{ST} от 0,15 до 0,38). Популяция Камчатки значительно отличается как от Европы, так и от Дальнего Востока (материк) ($F_{ST} > 0,37$ для обоих) и в меньшей степени от Сибири ($F_{ST} = 0,29$). Дифференциация между Дальним Востоком (материк) и Сибирью очень низкая.

С точки зрения внутрипопуляционного нуклеотидного разнообразия популяции Хоккайдо ($\pi = 0,007$) и Сибири ($\pi = 0,0023$) гораздо более разнообразны по сравнению с Европой, Дальним Востоком (материк) и Камчаткой ($\pi = 0,001$), что отражает наличие гаплотипов из двух (Сибирь) или трех (Япония) волн миграции.

3.4.3. Миграционные волны бурых медведей

До недавнего времени считалось, что распространение бурых медведей *(U. arctos)* по территории современной континентальной Евразии и в Северную Америку происходило в позднем плейстоцене (37–29 тыс. лет назад) из Северной Евразии [Korsten и др., 2009; Anijalg и др., 2018]. Мы приводим дополнительные доказательства, подтверждающие гипотезу евразийского происхождения всей клады 3 на основе анализа полной митохондриальной ДНК. Хотя митохондриальные линии показывают наследование только по материнской линии, наши данные демонстрируют наличие базальных гаплотипов среди древних образцов из Сибири до последнего ледникового максимума.

Большинство современных образцов из Северной Евразии относятся к кладе 3a1, так же как и наши сибирские и дальневосточные медведи. Эта клада соответствует последней волне миграции бурого медведя [Anijalg и др., 2018]. Два образца из Сибири относились к кладе 3b, которая ранее была обнаружена на Хоккайдо и Курильских островах на основании полного анализа митохондриальной ДНК [Hirata и др., 2013], а дополнительные образцы с Северного Кавказа, Сибири и Дальнего Востока России были отнесены к кладе 3b на основании митохондриальных последовательностей cytB, CR и анализа полиморфизма длины амплифицированного продукта [Hirata и др., 2013; Gus'kov и др., 2013; Salomashkina и др., 2014; Tumendemberel и др., 2019]. Обнаружение современных бурых медведей из Южной Сибири (Irk, Kras128) из обеих клад 3b1 и 3b2 подтверждает эти наблюдения и еще раз говорит о континентальном происхождении клады 3, предполагавшееся ранее [Hirata и др., 2013].

Клада 4 включает современных бурых медведей с Хоккайдо [Hirata и др., 2013] и Северной Америки [Barnes и др., 2002; Delisle, Strobeck, 2002]. Основываясь на наличии трех генетических линий на Хоккайдо, Матсухаши с соавторами [Matsuhashi и др., 2001] предположили, что на остров вселялись медведи тремя отдельными волнами, подобными волнам

в Северной Америке. Потомки самой последней населяют северную и центральную части острова, тогда как потомки первой волны миграции – юго-западную часть [Hirata и др., 2013]. Сходные филогеографические структуры на Хоккайдо и в Северной Америке указывают на одновременную миграцию медведей из Евразии через Берингию на Аляску и через Сахалин в Японию в ледниковые периоды понижения уровня моря. Эта модель миграции в Японию через Сахалин описана и для других видов, таких как сибирская белка-летяга *Pteromys volans* [Oshida и др., 2005], сибирский бурундук *Tamias sibiricus* [Lee и др., 2008] и соболь *Martes zibellina* [Kinoshita и др., 2015].

Филогенетический анализ показал, что проанализированные древние образцы очень разнообразны и содержат гаплотипы, характерные для разных миграционных волн. Например, древний медведь U16 Kol (~4,5 тыс. лет) из предгорий Алтая принадлежит к широко распространенной евразийской гаплогруппе 3a1 и очень похож на современных медведей из европейской части России и Эстонии. Образец (U2 Chu) из р. Чумыш (возраст ~40 тыс. лет) занимает базальное положение во всей кладе 3a, включающей евразийскую популяцию и популяцию центрального Хоккайдо. Клада 3a - самая распространенная современная клада в Северной Евразии: и считается, что она широко распространилась после последнего ледникового максимума. Древний медведь U17DC из Денисовой пещеры (возраст ~5,5 тыс. лет) принадлежит к субкладе 3b, в которую входят современные медведи с Хоккайдо и Курильских островов, Сибири, Северного Кавказа и континентального Дальнего Востока России. Филогенетический анализ позволяет предположить, что представители клады 3b из Японии и Сибири имели самого позднего общего предка ~82 тыс. лет назад (рис. 5), что примерно соответствует предыдущим оценкам [Salis и др., 2021]. Образец U3 Chi из р. Чик (возрастом ~ 30 тыс. лет) является базальным для всей клады 3, время дивергенции оценивается в 216 тыс. лет назад. Этот результат может быть менее точным, т.к. этот геном собран не полностью (91%, в отличие от> 96% в других древних образцах). Однако наш результат подтверждает более ранние сведения о базальном положении древних бурых медведей из Сибири по отношению к современным евразийским популяциям [Rey-Iglesia и др., 2019].

В данном исследовании мы показали, что большинство современных бурых медведей Сибири и Дальнего Востока относятся к основной евразийской гаплогруппе 3. Высокое генетическое разнообразие среди древних бурых медведей свидетельствует о сдвиге, произошедшем в гаплотипическом разнообразии, и наличии общего предка для популяции современных медведей континентального Дальнего Востока и Сибири. Изоляция западноевропейской группы могла быть результатом деятельности человека, которая ограничивала свободное передвижение медведей. Сибирь и Дальний Восток менее подвержены влиянию антропогенных факторов, а среда обитания остается нетронутой, что могло способствовать широкому распространению клады 3a1. Полученные

данные о репрезентативности гаплогрупп в сочетании с реконструкцией возможных волн миграции бурых медведей через Евразию подчеркивают важность южносибирского рефугиума для популяций бурых медведей не только в период последнего ледникового максимума, но и в более ранние периоды, по крайней мере, последние 200 тыс. лет.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современные молекулярные методы и биоинформационный анализ позволили восстанавливать популяционную историю для сибирской косули, бурых медведей, вымершего вида семейства лошадиные и одного из самых древних представителей семейства псовых.

Филогенетический анализ полученных современных гаплотипов *C. pygargus* с территорий Алтая, Новосибирской области, Якутии, Тянь-Шаня, Дальнего Востока, опроверг существующие представления о границах популяционных ареалов. Богатое гаплотипическое разнообразие среди древних образцов свидетельствует о том что, Северо-западная часть Алтая могла представлять рефугиальную зону, которая, благодаря строению горного рельефа была защищена от активного влияния древних оледенений и обладала благоприятными условиями для обитания косуль и последующего распространения на освободившиеся от оледенения территории.

Филогенетический анализ для собакоподобного образца из Разбойничьей пещеры (Алтай) показал его близкое положение к современным охотничьим породам собак из Европы и изменил представление о времени одомашнивания собак, подтверждая теорию о многократном одомашнивании волка в различных географических областях. Однако необходима работа с последовательностями доисторических волков из того же региона, чтобы оценить разнообразие популяции и их генетический вклад в современные популяции собак и волков.

До недавнего времени популяционная история сибирских бурых медведей оставалась белым пятном среди широко изученных евразийских представителей. Большинство современных гаплотипов из исследованной выборки принадлежат к наиболее распространенной евразийской кладе 3. Один из древних гаплотипов занимает базальное положение по отношению ко всей кладе 3; второй является базальным для гаплогруппы 3a (наиболее распространенная субклада), а два других принадлежат к кладам 3a1 и 3b. Современные сибирские медведи сохраняют по крайней мере часть этого разнообразия; кроме самой распространенной гаплогруппы 3a мы демонстрируем наличие клады 3b, которая ранее встречалась в основном в континентальной Евразии и Северной Японии. Расширение числа образцов позволит более подробно описать гаплотипический состав древних популяций и изменение их со временем.

Территория Западной Сибири богата археологическими и палеонтологическими памятниками, собраны многотысячные коллекции костных образцов. Для восстановления полной картины видового разнообразия позднего плейстоцена и истории ее изменения до настоящего времени необходимы комплексные палеогенетические исследования. Особенности наследования митохондриальной ДНК позволяют проследить формирование материнской линии для разных видов крупных млекопитающих, но необходимо исследовать также ядерные маркеры для изучения фактов межвидовой гибридизации.

ВЫВОДЫ

1. Гаплотипы древних сибирских косуль из Денисовой пещеры (возрастом 1-40 тыс. лет) располагаются базально к современным представителям и отличаются высоким разнообразием: это может свидетельствовать о том, что территория Алтая была рефугиумом во время ледникового максимума, и повлияла на структуру современных популяций, обитающих на территории Алтая, Новосибирской области, Тянь-Шаня, Якутии и Дальнего Востока.

2. Образец представителя псовых из Разбойничьей пещеры возрастом около 32 тыс. лет наиболее близок к древним волкам и европейским породам охотничьих собак из клады D, что может свидетельствовать о множественных фактах одомашнивания и отодвигает время доместикации собак к периоду 18.8-32.1 тыс. лет назад.

3. Древний представитель лошадиных относится к вымершему виду *E. ovodovi:* филогенетическое положение этого вида ближе к зебрам, чем к ослам, кулану и кианту.

4. Митохондриальные гаплотипы древних бурых медведей (Ursus arctos) подтверждают теорию о волнах миграции в плейстоцене: большинство современных бурых медведей относится к наиболее распространенному евразийскому гаплотипу 3a, а наличие древних и современных бурых медведей с гаплотипами 3b свидетельствует о континентальном происхождении данной клады и о том, что Сибирь была рефугиумом для современных бурых медведей.

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vorobieva NV, Sherbakov DY, **Druzhkova AS**, Stanyon R, Tsybankov AA, Vasiljev SK, Shunkov MV, Trifonov VA, Graphodatsky AS. Genotyping of *Capreolus pygargus* fossil DNA from Denisova Cave reveals phylogenetic relationships between ancient and modern populations. PLoS One 6(8): e24045, 2011.

2. **Druzhkova AS**, Thalmann O, Trifonov VA, Leonard JA, Vorobieva NV, Ovodov ND, Graphodatsky AS, Wayne RK. Ancient DNA analysis affirms the canid from Altai as a primitive dog. PLoS ONE 8(3): e57754, 2013.

3. O. Thalmann, B. Shapiro, P. Cui, V. J. Schuenemann, S. K. Sawyer, D. L. Greenfield, M. B. Germonpre, M. V. Sablin, F. Lopez-Giraldez, X. Domingo-Roura, H. Napierala,10 H-P. Uerpmann, D. M. Loponte, A. A. Acosta, L. Giemsch, R. W. Schmitz, B. Worthington, J. E. Buikstra, A. **Druzhkova, A. S.** Graphodatsky, N. D. Ovodov, N. Wahlberg, A. H. Freedman, R. M. Schweizer, K.-P. Koepfli, J. A. Leonard,M. Meyer, J. Krause,S. Paabo, R. E. Green, R. K. Wayne Complete Mitochondrial Genomes of Ancient Canids Suggest a European Origin of Domestic Dogs 2013 SCIENCE Vol. 342 no. 6160 pp. 871-874 DOI: 10.1126/science.1243650.

4. Дружкова АС, Воробьева НВ, Трифонов ВА, Графодатский АС. Древняя ДНК: итоги и перспективы (к 30-летию начала исследований). Генетика 51: 627–643, 2015.

5. Druzhkova AS, Makunin AI, Vorobieva NV, Vasiliev SK, Ovodov ND, Shunkov MV, Trifonov VA, Graphodatsky AS. Complete mitochondrial genome of an extinct *Equus* (*Sussemionus*) *ovodovi* specimen from Denisova cave (Altai, Russia). Mitochondrial DNA Part B 2(1): 79-81, 2017.

6. Molodtseva AS, Makunin AI, Salomashkina VV, Kichigin IG, Vorobieva NV, Vasiliev SK, Shunkov MV, Tishkin AA, Grushin SP, Anijalg P, Tammeleht E, Keis M, Boeskorov GG, Mamaev N, Okhlopkov IM, Kryukov AP, Lyapunova EA, Kholodova MV, Seryodkin IV, Saarma U, Trifonov VA, Graphodatsky AS. Phylogeography of ancient and modern brown bears from eastern Eurasia. Biol J Linn Soc: blac009, 2022.

Подписано в печать 16.06.2022 г. Печать офсетная.
Бумага офсетная. Формат 60х84 1/16. Усл. печ. 1,4 л.
Тираж 100 экз. Заказ № 755

Отпечатано в типографии «АЛЕКСПРЕСС»
ИП Малыгин Алексей Михайлович
630090, Новосибирск, пр-т Академика Лаврентьева, 6/1, оф.104
Тел. (383) 217-43-46