

На правах рукописи



Куслий Мария Александровна

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ДРЕВНИХ И СОВРЕМЕННЫХ
ЛОШАДЕЙ АЛТАЯ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ ТЕРРИТОРИЙ

03.01.07 – молекулярная генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Новосибирск 2022

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

Научный руководитель: Графодатский Александр Сергеевич, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, заведующий отделом разнообразия и эволюции геномов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Оппоненты: Пилипенко Александр Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией палеогенетики населения Евразии Федерального исследовательского центра Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск

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

Ведущее учреждение: Зоологический институт РАН, г. Санкт-Петербург

Защита состоится: 14 сентября 2022 г. 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, 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 наук



О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Анализ древней ДНК является незаменимым инструментом для исследований лошадей древних культур и их происхождения, определения центра одомашнивания лошади (*Equus ferus caballus*), поскольку с помощью морфометрического анализа не всегда можно определить подвиговую, видовую и половую принадлежность лошади (Levine 2005), и только анализ древней ДНК может предоставить информацию об эволюционной истории, геномных изменениях под влиянием отбора, генетических и инфекционных заболеваний, а также о происхождении и миграционных путях древних лошадей, а значит и соответствующих культур (Orlando 2020). Алтай и сопредельные территории представляют интерес для исследователей древней ДНК лошадей, поскольку лошадь имела большое значение во многих археологических культурах этого региона (Горбунов и др. 2019), и он находится в непосредственной близости к одному из предполагаемых центров одомашнивания лошади (Северо-Восточный Казахстан) (Gaunitz et al. 2018).

Степень разработанности темы исследования

Только некоторые образцы костных останков лошадей из археологических памятников Алтая и сопредельных территорий были исследованы на уровне древней ДНК (Fages et al. 2019; Куслий и др. 2020). Определено генетическое разнообразие этих домашних животных в некоторых культурах Алтайских гор Монголии и Казахстана бронзового и раннего железного веков (Cieslak et al. 2010; Fages et al. 2019; Gaunitz et al. 2018; Keyser-Tracqui et al. 2005; Pilipenko et al. 2010). В основном были изучены лошади пазырыкской общности (Fages et al. 2019; Gaunitz et al. 2018; Keyser-Tracqui et al. 2005; Pilipenko et al. 2010). При этом ДНК древних и средневековых лошадей Алтайских гор России ещё не была исследована на момент начала данного диссертационного исследования. Полногеномные исследования диких лошадей с сопредельных с Алтаем территорий расширили ареал вымершего вида *Equus lenensis* до Южной Сибири (Fages et al. 2019), определили происхождение лошадей Пржевальского и время их расхождения с домашними лошадьми (Gaunitz et al. 2018; Der Sarkissian et al. 2015). На основе митогеномных последовательностей были определены филогенетические взаимоотношения древних лошадей Китая, юга Западной и Восточной Сибири бронзового и железного веков (Cai et al. 2009; Cieslak et al. 2010; Dawei et al. 2007; Lei et al. 2009). Исследования полных геномов древних и средневековых лошадей сопредельных с Алтаем территорий выявили происхождение лошадей культуры

херексуров и “оленных” камней и хуннской культуры Монголии и определили филогеографические паттерны лошадей Монгольской империи и Уйгурского каганата (Fages et al. 2019). Описаны геномные изменения, ассоциированные с ранними и поздними стадиями одомашнивания лошади (Librado et al. 2017).

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является определение происхождения, генетического разнообразия, филогеографических взаимоотношений древних и современных лошадей Алтая и сопредельных территорий, а также выявление генетических и инфекционных заболеваний лошадей разных археологических культур этого региона. Для достижения этой цели были поставлены следующие **задачи**:

1. определить генетическое разнообразие современных лошадей алтайской породы и выявить степень дифференциации между современными лошадьми алтайской породы Юго-Восточного и Восточного Алтая и современными лошадьми монгольской породы на основе анализа нуклеотидных полиморфизмов гипервариабельного района I митогенома;
2. определить гаплотипы древних лошадей разных археологических культур Алтая и сопредельных территорий и выявить филогенетические связи между ними и современными лошадьми разных пород на основе анализа генетических вариантов митохондриального и ядерного геномов;
3. идентифицировать аллели фенотипических признаков и генетических заболеваний у древних лошадей разных археологических культур Алтая и сопредельных территорий;
4. определить возбудителей инфекционных заболеваний древних лошадей изучаемого региона с помощью метагеномного анализа их костных образцов;
5. определить филогенетическое положение позднепалеолитических лошадей Алтая на филогенетических деревьях, построенных на основе последовательностей митогеномов и полных ядерных геномов древних и современных лошадей из разных регионов мира;
6. выяснить происхождение некоторых энеолитических и более поздних древних домашних лошадей Алтая и сопредельных территорий;
7. определить являлся ли Алтай центром одомашнивания современных лошадей на основе широкомасштабных полногеномных реконструкций.

Научная новизна исследования

Мы впервые оценили перспективность региона Алтай и сопредельных территорий для исследований древней ДНК лошадей на

основе результатов анализа содержания эндогенной ДНК в их костных образцах. Впервые определены молекулярно-генетическими методами пол лошадей из памятников разных археологических культур этого региона, гаплотипы и фенотипические признаки ботайских лошадей юга Западной Сибири, лошадей бийкенской культуры Алтая раннего железного века; проведено сравнение полученного генетического и фенотипического разнообразия с аналогичным разнообразием выборок лошадей из других культур исследуемого региона. На основе полногеномных филогеографических реконструкций выяснено, являлся ли Алтай центром одомашнивания лошади. Мы впервые выявили генетический материал патогенных для домашних лошадей микробов в костных образцах древних и средневековых лошадей Алтая и сопредельных территорий. Впервые проверена гипотеза (Лобанова и Трушников 2005) о том, что лошади Восточного Алтая генетически ближе к лошадям монгольской породы, чем к лошадям Южного Алтая.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость данного исследования заключается в определении географического центра одомашнивания лошади, популяционной истории диких и домашних лошадей Алтая и сопредельных территорий. Это косвенно указывает на происхождение и миграционные пути многих археологических культур и имеет большое значение для понимания истории региона. Наши метагеномные данные позволяют выявить эволюционную историю обнаруженных патогенов, что может способствовать обеспечению биобезопасности домашних лошадей.

Полученные нами последовательности ДНК, находящиеся в известных базах данных (GenBank, European Nucleotide Archive), могут быть использованы другими исследователями в сравнительном анализе генетического разнообразия разных групп древних и современных домашних лошадей Евразии, что имеет практическое значение для определения стратегий разведения домашних лошадей разных пород.

Методология и методы исследования

В исследовании мы использовали широко распространенные молекулярно-генетические методы выделения древней ДНК из костей, зубов и современной ДНК из конского волоса с использованием спин-колонок с силикагелевой мембраной и из мышечной ткани с помощью фенола, приготовления парно-концевых геномных библиотек и их целевого обогащения, секвенирование по Сэнгеру и высокопроизводительное секвенирование, а также биоинформатический анализ, включавший филогенетические реконструкции, внутривидовой и структурный анализы, Struc-f4 анализ

компонентов предковости, анализ генетической преемственности, метагеномный анализ.

Положения, выносимые на защиту

1. Большинство выявленных митотипов современных лошадей алтайской породы распространены среди домашних лошадей Алтая и сопредельных территорий, при этом современные лошади Восточного Алтая генетически более близки современным лошадям монгольской породы, чем современные лошади Южного Алтая.
2. Сходство митотипов некоторых лошадей бийкенской и тюркской культур Алтая и многих лошадей коренных пород Центральной Азии свидетельствует в пользу преемственности генофонда лошадей этих культур и центральноазиатского происхождения бийкенской культуры. Близость митотипов некоторых лошадей пазырыкской культуры Алтая и многих лошадей местных пород Среднего Востока поддерживает гипотезу о средневосточном происхождении пазырыкской культуры. Наличие близких митотипов между лошадьми культуры херексуров и “оленных” камней и хуннуской культуры Монголии и многими современными лошадьми восточноазиатского происхождения указывает на преемственность генофонда лошадей вышеперечисленных культур и пород. Генетическая близость лошадей культуры херексуров и “оленных” камней Монголии и алды-бельской культуры Тывы подтверждает наличие контактов между этими культурами.
3. Серебристая масть была впервые обнаружена у лошадей энеолита. У большинства исследованных домашних лошадей Алтая и сопредельных территорий было выявлено большое количество аллелей, ассоциированных с высотой и большими размерами тела, различными типами скаковых качеств и мастями (серебристой, леопардовой) и небольшое количество аллелей генетических болезней, таких как поликистоз почек и абиотрофия мозжечка.
4. Патогенная для лошадей бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae* обнаруживается у монгольских лошадей, начиная с позднего бронзового века.
5. Позднепалеолитические лошади Алтая принадлежали гаплотипам вымершей генетической линии лошадей Сибири.
6. Энеолитические лошади культуры ботайского круга юга Западной Сибири произошли от более ранних ботайских лошадей Северного Казахстана, которые также являются предками лошадей Пржевальского. Было определено происхождение исследованных домашних лошадей Алтая и сопредельных территорий позднего бронзового – раннего железного веков от лошадей синташтинской культуры Южного Урала бронзового века.

7. Алтай не является географическим центром одомашнивания лошади.

Личный вклад соискателя

Все этапы лабораторных экспериментов и биоинформатического анализа данных секвенирования, обсуждение результатов, подготовка публикаций проводились лично соискателем или при его непосредственном участии.

Степень достоверности и апробация результатов

Мы проводили все эксперименты с древней ДНК в лабораторных помещениях, предназначенных только для исследований древней ДНК, и в соответствии с “критериями аутентичности” (Willerslev and Cooper 2005). Воспроизводимость данных секвенирования по Сэнгеру подтверждалась повторными экспериментами, а аутентичность данных высокопроизводительного секвенирования библиотек фрагментов древней ДНК подтверждалась характерными профилями фрагментированности и дезаминирования оснований.

Основные результаты диссертационного исследования были опубликованы в 5 научных статьях в рецензируемых изданиях из рекомендованного перечня ВАК и были представлены на следующих 4 международных конференциях и опубликованы в материалах этих конференций: II Всероссийской конференции с международным участием “Высокопроизводительное секвенирование в геномике” (Новосибирск, Россия, 18–23 июня 2017 г.), международной научно-практической конференции “Ботайская культура и другие энеолитические памятники Центральной Азии” (Алматы, Казахстан, 4–6 апреля 2019 г.), VI международной научной конференции “Экология древних и традиционных обществ” (Тюмень, Россия, 2–6 ноября 2020 г.), международной научной конференции “Древние культуры Монголии, Южной Сибири и Северного Китая” (Абакан, Россия, 8–11 сентября 2021 г.).

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка терминов, списка цитированной литературы, в который входит 706 ссылок, приложений. Работа изложена на 313 страницах, содержит 32 рисунка, 13 таблиц, 5 приложений.

Благодарности

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю, чл.-корр. РАН, д.б.н., профессору А. С. Графодатскому,

своим научным консультантам к.б.н. Н. В. Воробьевой, А. С. Дружковой (Молодцевой), к.б.н. А. А. Юрловой, PhD, профессору Л. Орландо, д.и.н., профессору А. А. Тишкину, коллегам, с которыми мы совместно проводили некоторые этапы лабораторных экспериментов, А. И. Неуместовой, PhD А. Фажу, А. Фроментье, PhD Н. Хану, PhD С. Вагнер, PhD С. Лю, С. Скьявинатто, Л. Тонассо-Кальвьер, и коллегам, помогавшим мне в биоинформатическом анализе данных, к.б.н. А. И. Макунину, PhD, профессору Л. Орландо, PhD П. Либрадо, а также всем сотрудникам отдела разнообразия и эволюции геномов ИМКБ СО РАН и исследовательской группы по археологии, геномике, эволюции и обществу Центра антропобиологии и геномики Тулузы за постоянную помощь и поддержку.

Работа была выполнена при частичном финансировании РФФ (проекты №22-18-00470 и №16-18-10033, руководитель А. А. Тишкин; проект №19-14-00034-П, руководитель А. С. Графодатский), РФФИ (проект №20-04-00213, руководитель Н. В. Воробьева), IDEX Chaire d'Excellence (OURASI) Университета Поля Сабатье и Европейского исследовательского совета в рамках исследовательской и инновационной программы Horizon 2020 Европейского союза (грантовое соглашение 681605).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы состоит из семи параграфов. В первом параграфе описывается эволюционная история семейства лошадиные, в частности, рода лошади, особое внимание уделено описанию видового разнообразия лошадей Алтая и сопредельных территорий. Второй параграф посвящен описанию основных характеристик древней ДНК и ключевых факторов, влияющих на её сохранность. В третьем параграфе рассмотрена история развития методов исследования древней ДНК, более подробно описаны технологии, использованные в данном исследовании. Четвертый параграф содержит информацию о значении лошади в разных сферах жизни общества тех археологических культур, лошади которых были исследованы на молекулярно-генетическом уровне в данной работе, а также о гипотезах о происхождении и контактах рассматриваемых культур. Пятый параграф представляет собой обзор основных результатов молекулярно-генетических исследований древних и средневековых лошадей Алтая и сопредельных территорий. В шестом параграфе описаны гипотезы о географическом расположении центра одомашнивания лошади, а также генетические и фенотипические изменения лошадей, ассоциированные с процессом одомашнивания. В седьмом параграфе приведена информация об

экстерьерных отличиях лошадей аборигенных пород Алтая и сопредельных территорий, а также об их генетическом разнообразии, происхождении и филогенетических связях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Использованные образцы

Древние образцы были представлены фрагментами костей или зубами лошадей, а современные образцы представляли собой волосы лошадей с луковицами. 191 костный образец лошадей из 36 памятников Алтая, Верхнего Приобья, Тывы, Бурятии, Монголии, Китая и Таджикистана были предоставлены д.и.н., проф. А. А. Тишкиным (АлтГУ, Барнаул). 21 костный образец лошадей из шести памятников Алтая и Новосибирской области передан академиком РАН, д.и.н., проф. В. И. Молодиным и Д. А. Ненаховым (ИАЭТ СО РАН, Новосибирск). 11 костных образцов лошадей из двух памятников юга Западной Сибири получены от к.б.н. С. К. Васильева (ИАЭТ СО РАН, Новосибирск). 7 костных образцов лошадей из двух поселений юга Западной Сибири были предоставлены нам к.б.н. П. А. Косинцевым (ИЭРиЖ УрО РАН, Екатеринбург), 1 костный образец лошади из пещеры Дальнего Востока России был предоставлен нам д.б.н., проф. М. П. Тиуновым (ФНЦ Биоразнообразие ДВО РАН, Владивосток). Образцы волос современных лошадей Алтая были предоставлены нам руководителями генофондного хозяйства “Чингиз” (Улаганский район) и частных хозяйств Улаганского и Кош-Агачского районов, собраны к.б.н. А. А. Юрловой и к.б.н. Н. В. Гуторовой.

Методы

Выделение современной ДНК из волос лошадей проводили с использованием набора DNeasy Blood & Tissue (Qiagen), выделение древней ДНК из костей и зубов выполняли либо по методу Янга и соавторов (Yang et al. 1998) с модификациями Сандерсона, Рэдли, Мейтона (Sanderson, Radley, and Mayton 1995) либо по протоколу Гамбы и соавторов (метод Y) (Gamba et al. 2016). Митохондриальное генетическое разнообразие лошадей определяли с помощью секвенирования по методу Сэнгера продуктов ПЦР или высокопроизводительного секвенирования ампликонов или обогащенных библиотек древней ДНК, приготовленных с помощью набора TruSeq® Nano DNA Sample Preparation (Illumina) и обогащенных по протоколу Маричича и соавторов (Maricic, Whitten, and Pääbo 2010), и последующего филогеографического (медианная сеть (программа Network v5.0.1.1), Байесовское древо (программная платформа BEAST v1.10.4 (Suchard et al. 2018))) и популяционно-генетического анализ данных секвенирования (анализы главных компонент (программа jalview

v2.11.0. (Waterhouse et al. 2009)), значений F_{ST} (Arlequin v3.5.2.2 (Excoffier and Lischer 2010))). Ядерное и микробное генетическое разнообразие было выявлено путем шотган-секвенирования геномных библиотек, приготовленных по методу Мейера и Кирхера (Meyer and Kircher 2010) с модификациями Гамбы и соавторов (Gamba et al. 2016), и филогеографического (по методу присоединения соседей с помощью FastME v2.0 (Lefort, Desper, and Gascuel 2015)), статистического (Strucf4, определение генетической преемственности по Шрайбер (Schraiber 2018), пола (с помощью конвейера PALEOMIX Zonkey (Schubert et al. 2017)), фенотипа и генетических заболеваний лошадей) и метагеномного (с помощью конвейера metaBIT (Louvel et al. 2016)) анализов полученных данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ полиморфизмов контрольного района митогенома лошадей

1.1. Анализ последовательностей гипервариабельного района I (HVR I) митогенома современных и древних лошадей

Мы определили гаплотипы по HVR I митогенома современных алтайских лошадей из трех групп: “смешанной” группы частного хозяйства Кош-Агачского района (Юго-Восточный Алтай) и “смешанной” и породной групп частного и генофондного хозяйств Улаганского района соответственно (Восточный Алтай), а также 18 древних лошадей из 7 памятников Алтая и 3 памятников Монголии. Географическое расположение памятников и хозяйств показано на Рисунке 1.

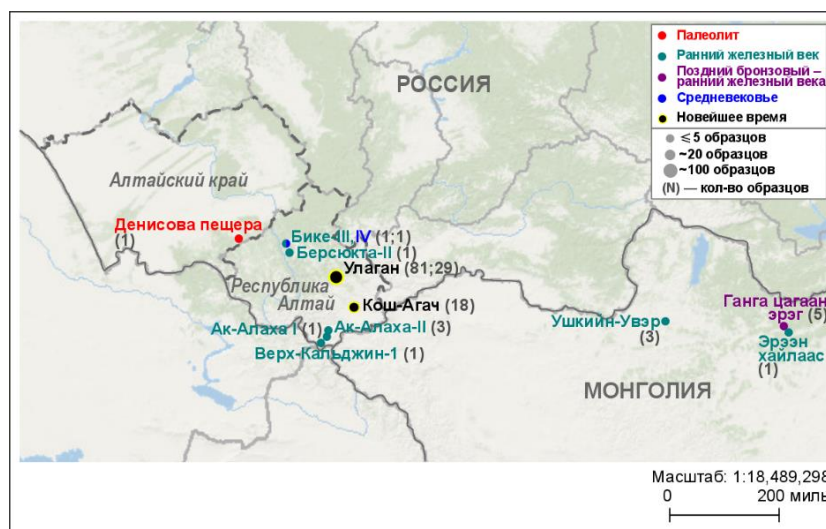


Рисунок 1. Расположение памятников и хозяйств, лошади которых были исследованы нами на уровне HVR I митогенома.

Все гаплотипы и гаплогруппы HVR I митогенома названы в соответствии с классификацией Чеслака и соавторов (Cieslak et al. 2010),

и все описанные в этом параграфе результаты сравниваются с результатами Чеслака и соавторов (Cieslak et al. 2010).

По результатам анализа нуклеотидных полиморфизмов в 246 п.н. фрагменте контрольного района митогенома современные лошади Алтая были отнесены к 19 митотипам, а древние и средневековые лошади Алтая и Монголии — к 8 и 6 митотипам соответственно. Большинство выявленных у древних и современных домашних лошадей Алтая и Монголии гаплотипов контрольного района митогенома относятся к определенному ранее гаплотипическому разнообразию лошадей этих регионов. Исключение составили некоторые лошади пазырыкской и тюркской культур Алтая и культуры херексуров и “оленных” камней Монголии, митотипы которых более характерны для Европы и Малой Азии согласно литературным данным.

1.2. Филогенетический анализ

На основании выравнивания последовательностей фрагмента HVR I митогенома исследованных нами древних, средневековых и современных лошадей Алтая и древних лошадей Монголии, а также древних и современных лошадей разных пород Западной Сибири и монгольской породы, исследованных Чеслаком и соавторами (Cieslak et al. 2010), была построена медианная филогенетическая сеть (Рисунок 2).

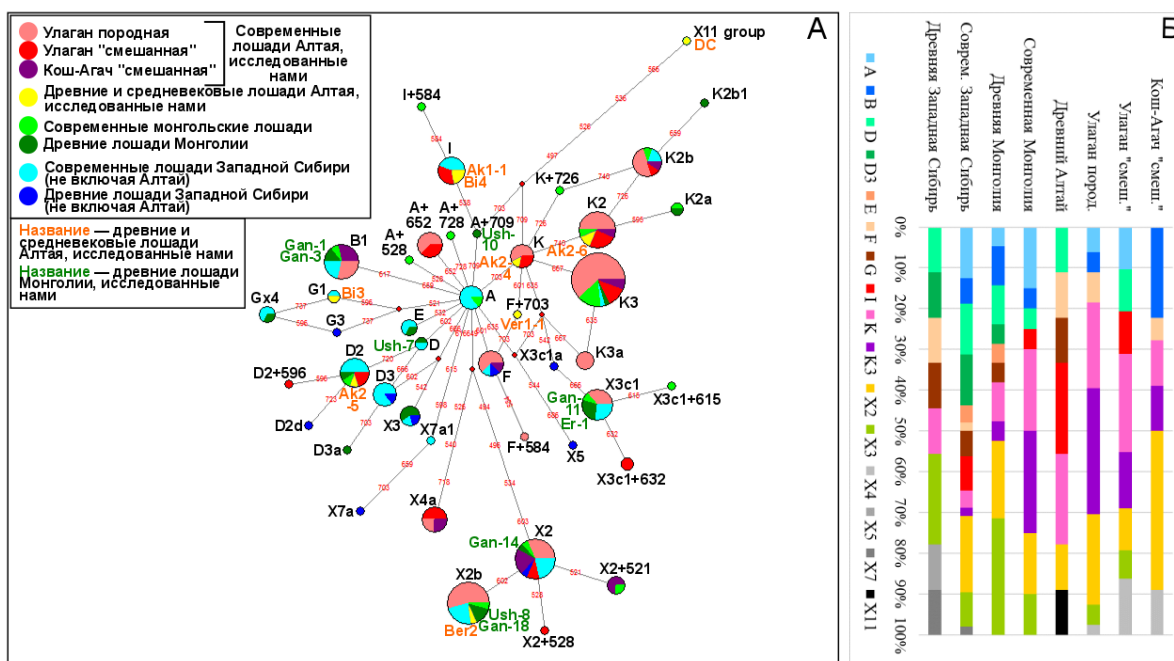


Рисунок 2. А — Филогенетическая сеть современных, средневековых и древних лошадей Западной Сибири и Монголии на основе последовательностей фрагмента HVR I митогенома. Размер кругов — кол-во особей. Номера на ветвях сети — положения генетических вариантов с 15,000 п.н. в NC_001640.1; Б — Диаграмма частот встречаемости гаплогрупп в исследуемых группах лошадей.

Филогенетическая сеть (Рисунок 2(А)) визуализировала перекрытие митохондриального генетического разнообразия (возможно,

отражающее генетическую преемственность или поток генов) между группами пазырыкских (Ak1-1) и тюркских (Bi4) лошадей Алтая, между лошадьми культуры херексурсов и “оленных” камней (Ush-8, Gan-11, Gan-18), хуннской культуры (Er-1) Монголии и пазырыкскими лошадьми (Ber2). Рисунок 2 также показывает, что лошади Улагана (Восточный Алтай) по разнообразию митотипов ближе к монгольским лошадям, чем лошади Кош-Агача (Южный Алтай).

1.3. Популяционно-генетический анализ данных

Для того чтобы уточнить степень дифференциации между исследуемыми нами группами современных лошадей Алтая, мы провели следующие три популяционно-генетических анализа: анализ главных компонент (PCA) (Рисунок 3), вычисление индекса фиксации (F_{ST}), иерархический анализ распределения генетической изменчивости по априорно сформированным объединенным группам (AMOVA).

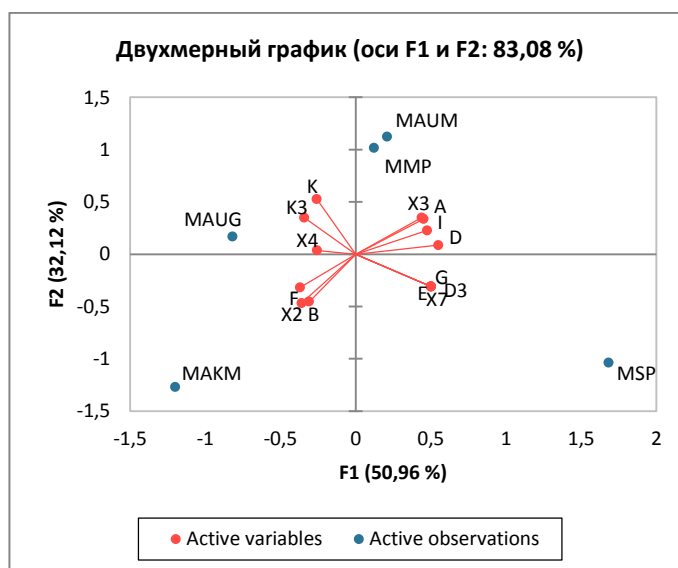


Рисунок 3. Двухмерный график PCA на основе частот встречаемости митогрупп в 5 группах лошадей. Группы MAUM, MAKМ (“смешанный” Улаган и Кош-Агач), MAUG (породный Улаган), MSP (породы Западной Сибири) и MMP (монгольская порода) из статьи Чеслака и соавторов (Cieslak et al. 2010).

Как видно на Рисунке 3, вдоль 1-ой и 2-ой главных компонент группы лошадей Улагана (MAUG, MAUM) ближе к группе лошадей монгольской породы (MMP), чем группа лошадей Кош-Агача (MAKM), что подтверждает аналогичный вывод филогенетического анализа.

Значения F_{ST} свидетельствуют об умеренной ($0.05 < F_{ST} < 0.15$) дифференциации групп MAKМ и MAUM, MAKМ и MAUG, MAKМ и SM и об отсутствии дифференциации между группами MAUG, MAUM и SM.

Уровни дифференциации между исследуемыми группами лошадей Алтая были подтверждены анализом AMOVA.

Можно заключить, что результаты ряда анализов (филогенетического, PCA, значений F_{ST} , AMOVA) на основе последовательностей мтДНК подтвердили гипотезу (Бахтушкин и др. 1974; Лобанова и Трушников 2005) о том, что лошади восточных регионов Алтая более родственны монгольским лошадям, чем лошади южных регионов Алтая. Однако для окончательного вывода необходимо исследовать большее количество лошадей Южного Алтая.

2. Анализ митогеномов древних лошадей

Полные и почти полные митогеномы были получены для одной палеолитической лошади Алтая, трех и двух лошадей бийкенской и пазырыкской культур Алтая соответственно, одной тюркской лошади Алтая, а также для пяти и одной лошадей культуры херексуров и “оленных” камней и хуннской культуры Монголии соответственно. Расположение и датировки соответствующих памятников показаны на Рисунке 1.

2.1. Аутентичность древней ДНК

Увеличенное количество замен $C \rightarrow T$ и $G \rightarrow A$ в начале и конце прочтений, которое является одной из особенностей библиотек древней ДНК (Sawyer et al. 2012) (Рисунок 4), и небольшой размер вставок библиотек (в среднем ~ 70 п.н.) подтверждают аутентичность полученных нами последовательностей древней ДНК.

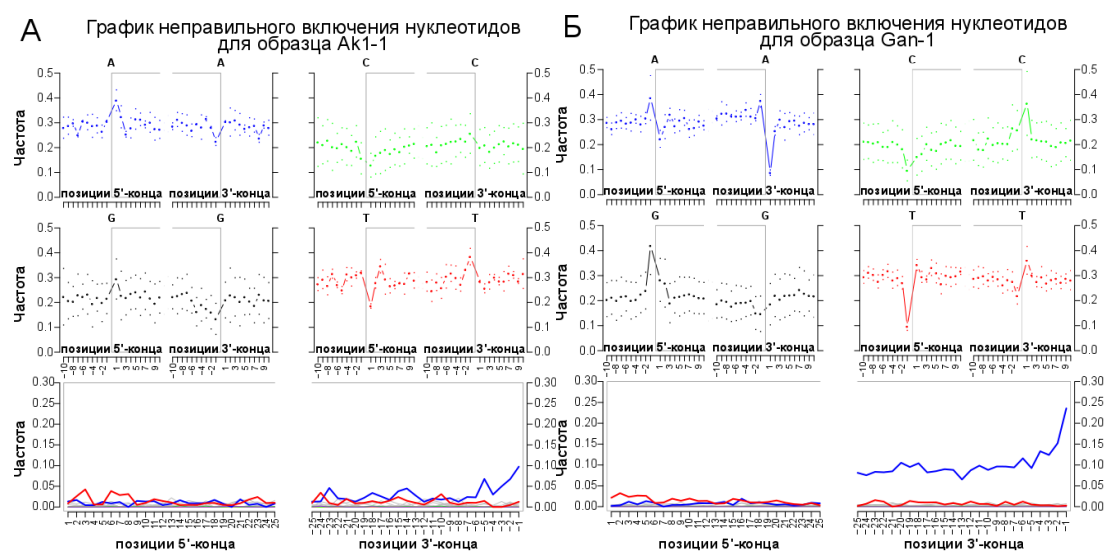


Рисунок 4. Примеры паттернов повреждения ДНК некоторых исследуемых древних лошадей Алтая и Монголии.

2.2. Данные секвенирования митогеномов

Средняя глубина покрытия охарактеризованных митогеномов варьирует от 6.7 до 85.9 раз, а ширина — от 97.3 % до 100 %. Среднее значение отношения уникальных картированных объединенных прочтений к их общему кол-ву составляет 15.1 %. Наименьший процент

дезаминирования оснований и наибольшее значение среднего размера фрагментов древней ДНК было определено для более молодых образцов (Ег-1 (I век до н. э. – I век н. э.)) и тех, которые находились в мерзлотных погребениях (плато Укок), что подтверждает вывод о влиянии возраста и среды вокруг образца на сохранность ДНК (Paijmans, González Fortes, and Förster 2019).

2.3. Филогенетические реконструкции

На основе 13 полученных нами, а также 200 ранее опубликованных, последовательностей митогеномов древних, исторических (XX век) и современных лошадей, происходящих из разных регионов мира, нами было построено филогенетическое древо байесовским методом (Рисунок 5).

Названия митогрупп и митотипов, встречающиеся в этом параграфе, взяты из классификации Ахилли и соавторов (Achilli et al. 2012).

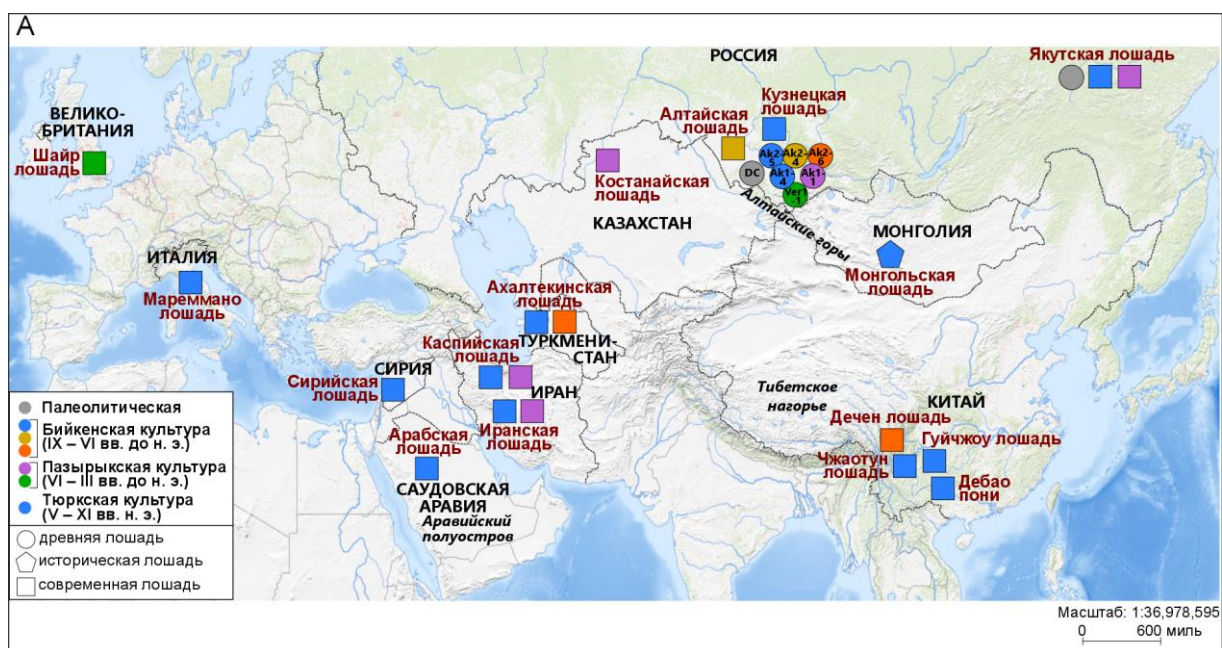
камней и хуннской культуры Монголии — митогруппам G, L и M домашних лошадей. Гаплотип дикой лошади (DC) из Денисовой пещеры Алтая относится к кладе вымерших лошадей Западной и Восточной Сибири. Филогенетический анализ на основе нашей выборки показал, что митохондриальные генофонды древних лошадей Алтая и Монголии различались, что может отражать разное происхождение лошадей и отсутствие контактов между соответствующими культурами, при этом генофонд материнских линий лошадей Алтая был более разнообразным.

2.3.1. Время расхождения гаплотипов

Как видно по Рисунку 5, митотипы исследованных нами древних и современных домашних лошадей разошлись в голоцене. В конце среднего плейстоцена существовали последние общие предки митохондриальных генетических линий домашних лошадей и диких лошадей Якутии и Алтая из базальной клады DC.

2.3.2. Филогеографические взаимоотношения

Филогеографические связи исследованных нами древних и средневековых лошадей отражены на Рисунке 6.



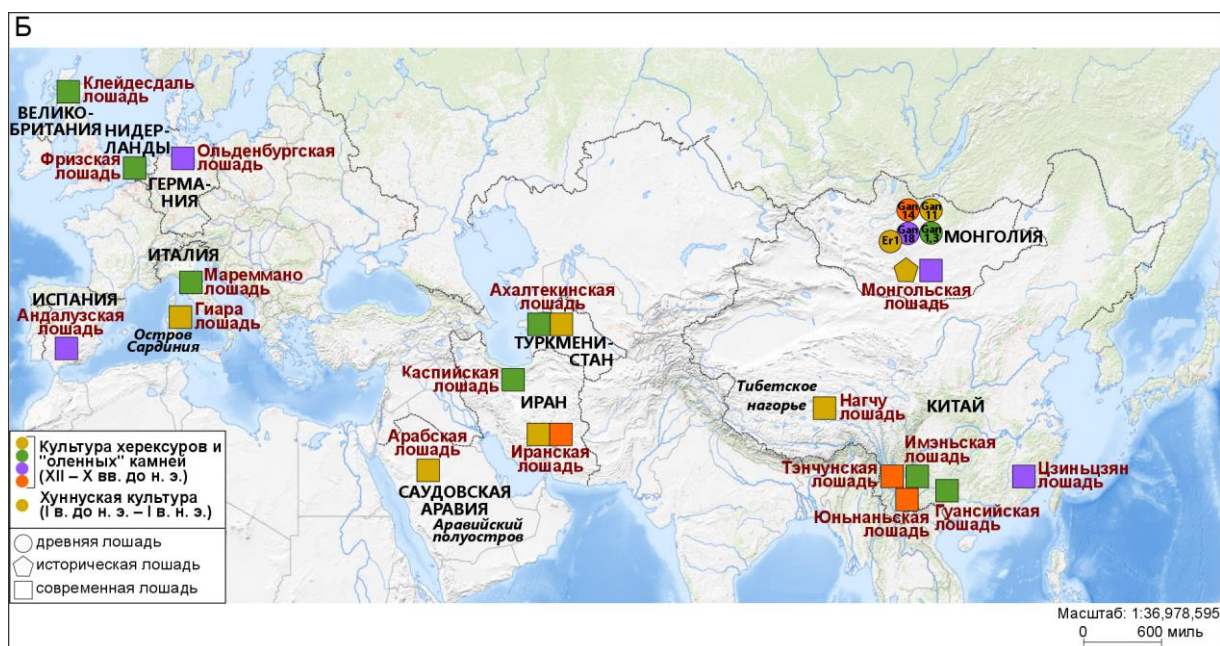


Рисунок 6. Географическое происхождение митотипов древних и средневековых лошадей Алтая (А) и Монголии (Б) и ближайших к ним митотипов. Одинаковый цвет показывает самые близкие митотипы. Мы изменили карту ресурса National Map Viewer Геологической службы США.

2.3.2.1. Сравнение митотипов лошадей Алтая и Монголии разного времени

Близость митотипов была выявлена между лошастью бийкенской культуры Алтая и современной алтайской лошастью. Митотипы многих современных, исторических и древних лошадей Монголии принадлежат одним и тем же митогруппам. Не выявленное между древними лошадьми Алтая и Монголии перекрытие митохондриального генофонда наблюдается между современными лошадьми этих регионов.

2.3.2.2. Филогеографические связи исследованных древних и средневековых лошадей

Полученные данные о близости митотипов древних и средневековых лошадей Алтая и лошадей Среднего Востока и Центральной Азии, а также митотипов древних лошадей Монголии и восточноазиатских лошадей поддерживают гипотезы о центральноазиатском происхождении бийкенской культуры Алтая (Тишкин 2011), о средневосточном происхождении пазырыкской культуры Алтая (Тишкин 2007). На основе сходства митотипов можно предположить генетическую преемственность между лошадьми бийкенской и тюркской культур Алтая, а также между лошадьми культуры херексурс и “оленных” камней и хуннской культуры Монголии, что соотносится с выводом полногеномного исследования о генетической преемственности между людьми этих культур (Jeong et al. 2020). Но поскольку филогеографическая структура лошадей на основе

митохондриальных данных не очень четкая, и мтДНК наследуется только по материнской линии, эти выводы следует воспринимать, как предварительные.

Для определения всего спектра генетического разнообразия древних лошадей Алтая и сопредельных территорий нами был проведен анализ полногеномных данных, результаты которого представлены в следующем разделе.

3. Полногеномное исследование лошадей

Расположение памятников, костные образцы лошадей которых были исследованы нами на полногеномном уровне, показано на Рисунке 7.

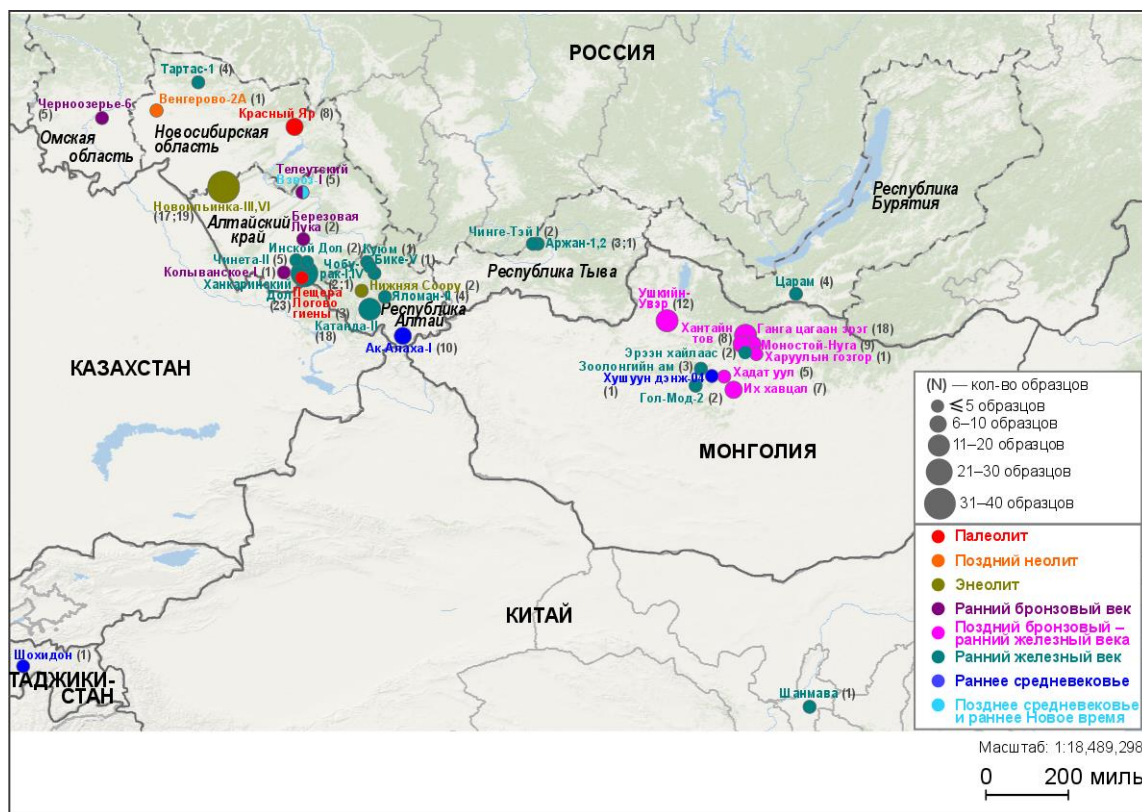


Рисунок 7. Расположение памятников, лошади которых были исследованы нами на полногеномном уровне.

3.1. Степень сохранности древней ДНК

В 218 образцах лошадей, относящихся к 13 различным типам остеологического материала, из 43 памятников Алтая и сопредельных территорий (Рисунок 7), которые принадлежат 18 археологическим культурам, нами было определено процентное содержание эндогенной (лошадиной) ДНК. Мы определили, что самое большое кол-во эндогенной ДНК содержится в каменистых частях височной кости, лучевых, пуловых костях, верхних челюстях и некоторых зубах, и что около половины исследованных образцов ($c > 25\%$ эндогенной ДНК)

подходят для полногеномного шотган-секвенирования, что указывает на перспективность этого региона для исследований древней ДНК.

3.2. Патогенные микробные профили образцов

Результаты метагеномного анализа показали наличие генетического материала следующих патогенных для домашних животных микробов в исследованных образцах древних и средневековых лошадей: *Erysipelothrix tonsillarum*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Staphylococcus lentus*, *Eimeria tenella*. Характерные профили дезаминирования оснований подтвердили древнее происхождение выявленного генетического материала. Полученные данные показали, что бактерии рода *Erysipelothrix* заражали лошадей, начиная с энеолита, а бактерии рода *Staphylococcus* — с бронзового века, протисты рода *Eimeria* циркулировали среди лошадей уже в раннем железном веке. При этом бактерия *Erysipelothrix rhusiopathiae* является самой патогенной для лошадей (Seahorn et al. 1989) из всех выявленных.

3.3. Определение пола лошадей

Сравнивая покрытия X-хромосомы и аутосом, нормированные на общую длину соответствующих хромосом, мы определили молекулярный пол 146 лошадей из 38 памятников. Полученные нами данные о смещении соотношения полов в пользу жеребцов в остеологических коллекциях большинства памятников, датированных с раннего бронзового века, согласуются с результатами исследования Фажа и соавторов (Fages et al. 2020). Однако выявленное нами соотношение полов в пользу кобыл в группах лошадей, относящихся к некоторым поселениям энеолита и погребальным комплексам раннего железного века Алтая и сопредельных территорий, отличается от вывода вышеупомянутого исследования о сбалансированном соотношении полов в группах лошадей от позднего палеолита до бронзового века (Fages et al. 2020).

3.4. Определение фенотипов лошадей

Мы определили аллели локусов, ассоциированных с фенотипическими признаками и генетическими заболеваниями, и их состояние (гомозиготное или гетерозиготное) в геномах 25 лошадей, которые к моменту написания этой диссертационной работы были секвенированы со средней глубиной покрытия от ~ 1х до ~ 8х. Результаты этого анализа представлены на Рисунке 8.

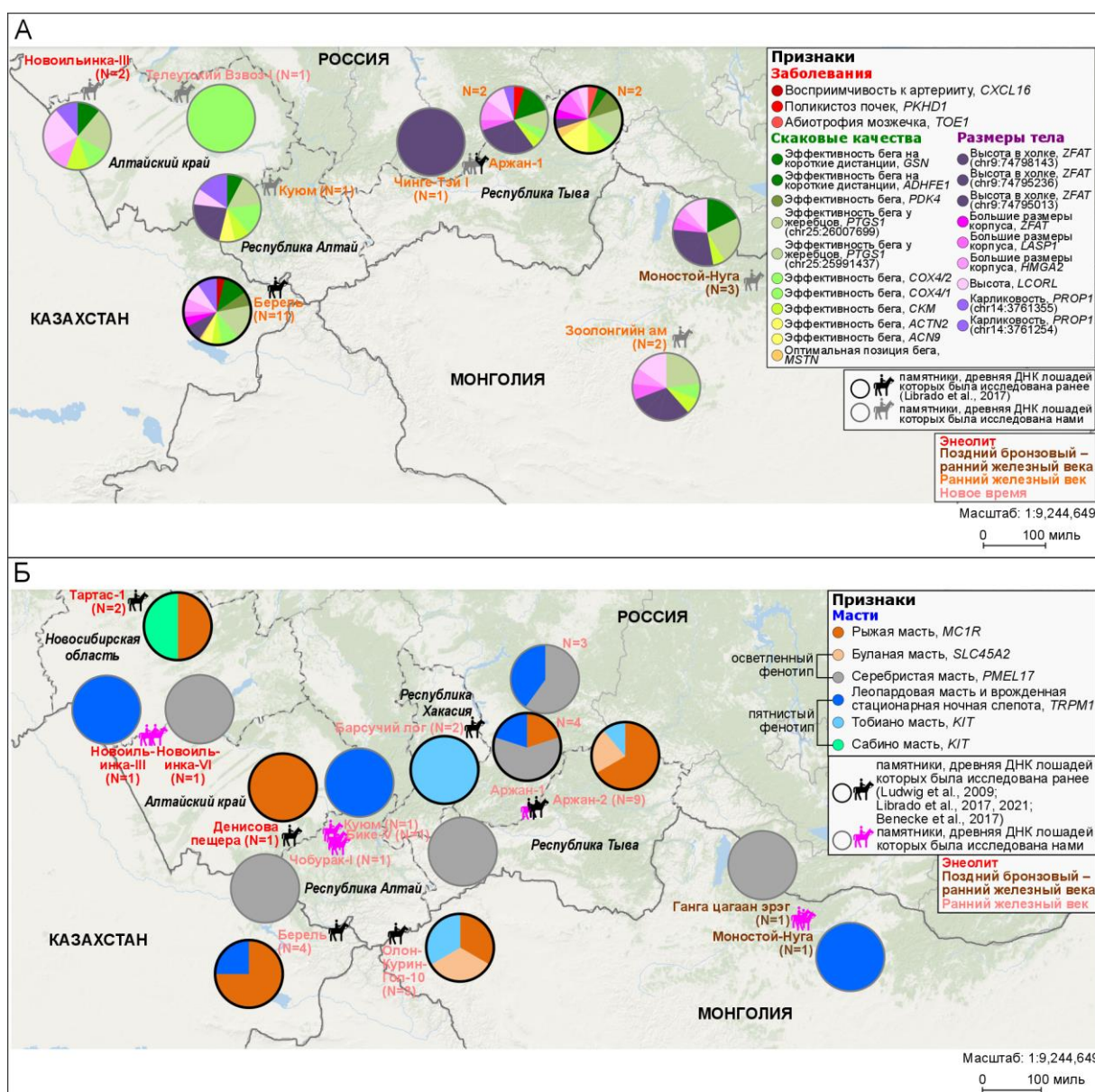


Рисунок 8. Соотношение частот встречаемости аллелей (секторов кругов) генетических заболеваний, эффективности бега, размеров тела (А) и мастей (Б) в исследованных группах лошадей. Мы изменили карту ресурса National Map Viewer Геологической службы США.

Мы впервые обнаружили аллель серебристой масти у лошади периода энеолита, а именно у лошади памятника Новоильинка-VI культуры ботайского круга юга Западной Сибири, что может указывать на одомашнивание лошадей в этой культуре, так как этот аллель не был обнаружен у диких лошадей. Наблюдается увеличение разнообразия аллелей, ассоциированных с большими размерами и высотой тела, у домашних лошадей, начиная с позднего бронзового века (культура херексуров и “оленных” камней Монголии, алды-бельская культура Тывы, бийкенская культура Алтая), а также наличие разных аллелей окраски шерсти, скаковых качеств и небольшого количества аллелей,

связанных с генетическими заболеваниями, у всех исследованных лошадей, начиная с энеолита.

3.5. Филогеографические реконструкции

Нами было построено филогенетическое древо методом ближайших соседей и получены соотношения компонентов предковости с помощью Struct-f4 анализа (Рисунок 9(А,Б)) на основе полногеномных последовательностей исследованных нами 22 древних лошадей, относящихся ко времени до н. э., и 251 древней лошади из разных регионов Евразии.



Рисунок 9. Полногеномное филогенетическое древо (А) и профили компонентов предковости (Б) древних лошадей Алтая и сопредельных территорий (выделены символами “звездочка”) и древних лошадей из других регионов Евразии. Значения бутстрэп-поддержки узлов древа выше 75 % показаны красными кругами.

Полногеномный филогеографический анализ выявил четыре основных кластера, соответствующих разным генетическим линиям лошадей: ленской лошади, европейской дикой лошади, ботайской лошади (включая лошадей Пржевальского и их гибридов, а также исследованных нами лошадей памятников Новоильинка-III и Новоильинка-VI), домашней лошади (*Equus ferus caballus*) и её предков.

К четвертому кластеру относятся предположительно дикие лошади Восточной и Юго-Восточной Европы (лошади Понтийско-Каспийской степи (неолита и раннего энеолита, ямной, майкопской, катакомбной культур раннего бронзового века), лошади неолита, энеолита и бронзового века с территории Турции), степной тарпан Восточной Европы и современные и древние домашние лошади.

Топология нашего филогенетического дерева и результаты Strucf4 анализа компонентов предковости показали, что лошади ямной, майкопской, катакомбной культур наиболее генетически близки всем домашним лошадям, при этом генетическая преемственность с одомашненными лошадьми была показана для двух лошадей позднего этапа ямной культуры. Полученные данные позволили нам определить Понтийско-Каспийскую степь, как центр одомашнивания лошади.

Лошади синташтинской культуры Южного Урала бронзового века, к которой относятся первые неопровержимые свидетельства одомашнивания лошадей (Епимахов 2020), присутствуют в наиболее древнихкладах домашних лошадей Азии позднего бронзового – раннего железного веков (Рисунок 9(А)), что свидетельствует о происхождении всех исследованных лошадей Азии от синташтинских лошадей.

Выявленная нами генетическая близость лошадей культуры херексуров и “оленных” камней разных периодов времени и из разных регионов Монголии (Рисунок 9) указывает на постоянство и однородность генофонда лошадей этой культуры, а близость полногеномных гаплотипов некоторых лошадей этой культуры и алды-бельской культуры Тывы, скорее всего, свидетельствует о наличии контактов между этими двумя культурами. Отсутствие близкого генетического родства между лошадьми культуры херексуров и “оленных” камней и бийкенской культуры Алтая согласуется с полученными нами митогеномными данными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы определили отличия митохондриального генофонда древних, средневековых и современных лошадей Алтая и Монголии, на основе близости митотипов предположили генетическую преемственность между лошадьми некоторых культур и пород (бийкенской, тюркской культур Алтая и алтайской породы; культуры херексуров и “оленных” камней, хуннуской культуры Монголии и монгольской породы),

определили филогеографические связи исследованных древних и современных лошадей, которые могут отражать пути миграции лошадей. Эти данные позволили нам поддержать некоторые гипотезы о происхождении, наличии контактов, миграционных путях соответствующих культур. Результаты полногеномного анализа в целом подтвердили ранее опубликованные данные о соотношении полов и фенотипическом составе разных групп древних лошадей, указали на расположение центра одомашнивания лошади в Понтийско-Каспийской степи, происхождение древних домашних лошадей Азии от синташтинских лошадей, близкое генетическое родство между лошадьми культуры херексуров и “оленных” камней Монголии и алдыбельской культуры Тывы, свидетельствующее о контактах между этими культурами, наличие следующих микробов, патогенных для домашних животных: *Erysipelothrix tonsillarum*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Staphylococcus lentus*, *Eimeria tenella*, у исследованных лошадей Алтая и сопредельных территорий.

Выявленное высокое содержание эндогенной ДНК в исследованных костных образцах лошадей Алтая и сопредельных территорий указывает на перспективность этого региона для исследований генофонда древних лошадей разных культур, результаты которых будут представлять собой дополнительную подтверждающую основу для гипотез о происхождении и контактах соответствующих археологических культур. В подобных исследованиях предпочтение лучше отдавать изучению полногеномных последовательностей, поскольку они позволяют выявить самый достоверный и цельный спектр генетического разнообразия.

ВЫВОДЫ

1. Анализ нуклеотидных полиморфизмов гипервариабельного района I митогенома выявил, что большинство гаплотипов современных алтайских лошадей широко распространено среди лошадей Южной Сибири и Монголии. Результаты ряда анализов (филогеографические реконструкции, PCA, F_{ST} , AMOVA) контрольного района митогенома показали отсутствие дифференциации между “смешанной” и породной группами современных лошадей Восточного Алтая, умеренный уровень дифференциации между группами современных лошадей Восточного и Юго-Восточного Алтая, а также между группой лошадей Юго-Восточного Алтая и группой современных лошадей монгольской породы.
2. Филогенетически близкие митотипы были выявлены между лошадьми бийкенской и тюркской культур Алтая и многими современными лошадьми аборигенных пород Центральной Азии, в том

числе алтайской породы, между лошадьми пазырыкской культуры Алтая и многими современными лошадьми коренных пород Среднего Востока, между лошадьми культуры херексурсов и “оленных” камней и хуннской культуры Монголии и многими современными лошадьми монгольской породы и местных пород Китая и Средиземноморья, что может указывать на преемственность между этими культурами и пути миграции. Полногеномные филогеографические реконструкции показали близкое генетическое родство лошадей культуры херексурсов и “оленных” камней Монголии с лошадьми алды-бельской культуры Тывы, что является косвенным подтверждением наличия контактов между этими двумя культурами.

3. Анализ локусов, связанных с различными фенотипическими признаками и генетическими заболеваниями лошадей, показал, что лошади серебристой окраски встречались уже в энеолите, и в целом все исследованные лошади Алтая и сопредельных территорий характеризуются большим количеством аллелей, связанных с высотой и крупными размерами тела, различными типами скаковых качеств и мастями (рыжая, буланая, серебристая, леопардовая, тобиано, сабино) и небольшим количеством аллелей генетических болезней, были выявлены только аллели поликистоза почек и абиотрофии мозжечка.

4. Идентификация фрагмента генома бактерии *Erysipelothrix rhusiopathiae*, патогенной для лошадей, в костном образце древней лошади культуры херексурсов и “оленных” камней Монголии указывает на то, что этот патоген заражал домашних лошадей Монголии, начиная с позднего бронзового века.

5. Базальное положение исследованных позднепалеолитических лошадей Алтая на митогеномном и полногеномном филогенетических деревьях указывает на то, что они принадлежали вымершей генетической линии лошадей Сибири, внесшей минимальный вклад в генофонд современных домашних лошадей.

6. Филогеографические реконструкции на основе полногеномных последовательностей определили происхождение энеолитических лошадей памятников Новоильинка-III и Новоильинка-VI культуры ботайского круга юга Западной Сибири от более ранних ботайских лошадей Северного Казахстана, которые являются предками лошадей Пржевальского. Полногеномный филогенетический анализ также выявил происхождение лошадей бийкенской, алды-бельской, херексурсов и “оленных” камней культур Алтая и сопредельных территорий от лошадей синташтинской культуры Южного Урала бронзового века.

7. Филогеографический полногеномный анализ и Struct-f4 анализ компонентов предковости определили, что географический центр

одомашнивания лошади расположен в Понтийско-Каспийской степи, а не на Алтае.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО
ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ В РЕЦЕНЗИРУЕМЫХ ИЗДАНИЯХ ИЗ
РЕКОМЕНДОВАННОГО ПЕРЕЧНЯ ВАК**

1. **Куслий М.А.**, Дружкова А.С., Попова К.О., Воробьева Н.В., Макунин А.И., Юрлова А.А., Тишкин А.А., Миняев С.С., Трифонов В.А., Графодатский А.С., Дымова М.А. & Филипенко М.Л. Генотипирование и определение масти древних лошадей Бурятии // Цитология. 2016. Т. 58. № 4. С. 304–308.
2. **Kusliy M.A.**, Vorobieva N.V., Tishkin A.A., Makunin A.I., Druzhkova A.S., Trifonov V.A., Iderkhantai T.-O. & Graphodatsky A.S. Traces of Late Bronze and Early Iron Age Mongolian Horse Mitochondrial Lineages in Modern Populations // Genes. 2021. V. 12. № 3. P. 412.
3. Vorobieva N.V., Makunin A.I., Druzhkova A.S., **Kusliy M.A.**, Trifonov V.A., Popova K.O., Polosmak N.V., Molodin V.I., Vasiliev S.K., Shunkov M.V. & Graphodatsky A.S. High genetic diversity of ancient horses from the Ukok Plateau // PLoS One. 2020. V. 15. № 11. P. e0241997.
4. Librado P., Khan N., Fages A., **Kusliy M.A.**, (158 coauthors), Orlando L. The origins and spread of domestic horses from the Western Eurasian steppes // Nature. 2021. V. 598. № 7882. P. 634–640.
5. Suchan T., **Kusliy M.A.**, (20 coauthors), Orlando L. Performance and automation of ancient DNA capture with RNA hyRAD probes // Molecular Ecology Resources. 2022. V. 22. № 3. P. 891–907.