

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 $32\,360 \pm 450$ 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

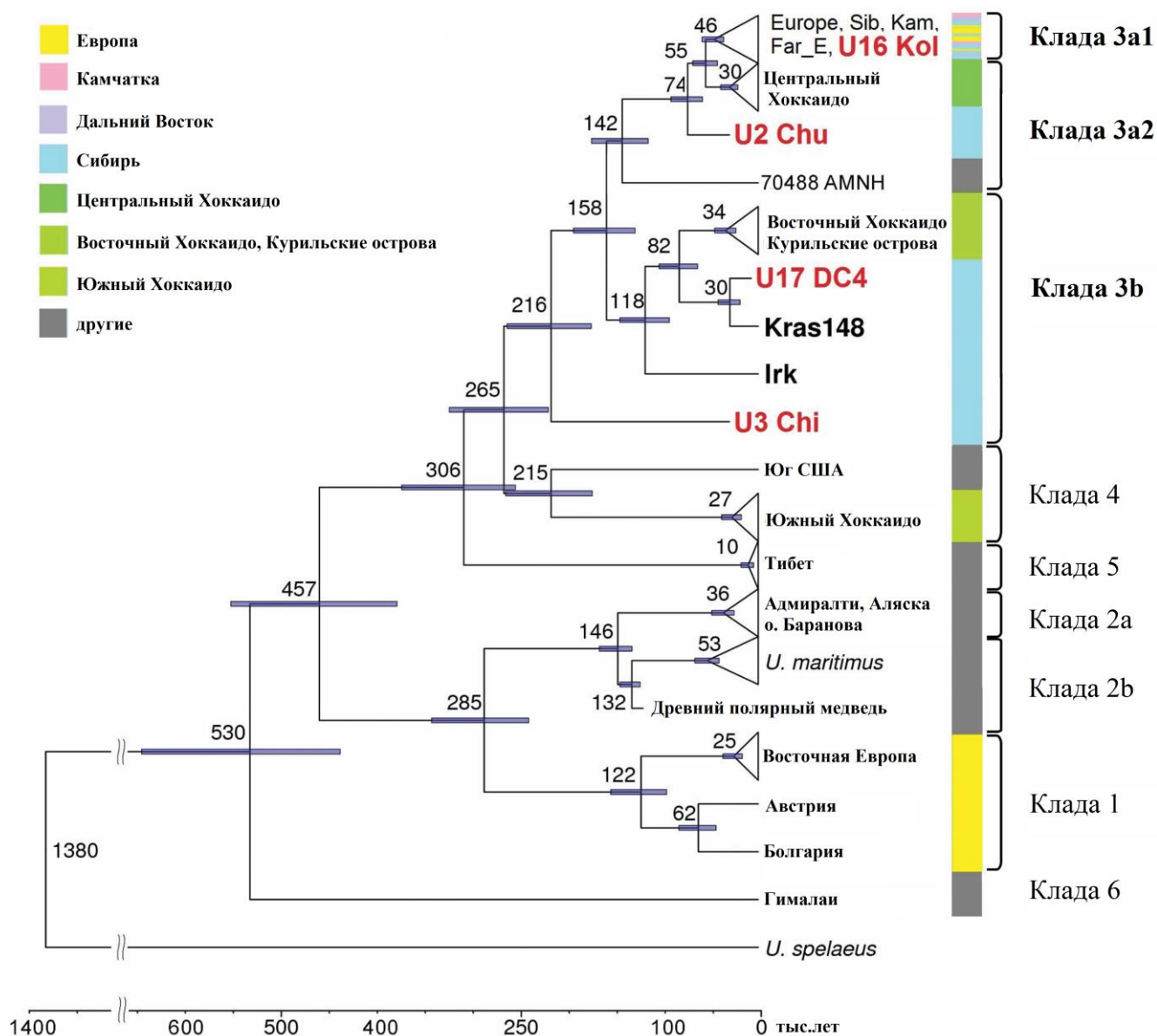


Рис. 4. Датированная филогения BEAST для полных митохондриальных геномов 282 бурых медведей (Таблица 3П,4П,11П). Ветви Клады 3a1 свернуты для краткости. Красным обозначены древние образцы, а черным жирным шрифтом обозначены современные образцы из настоящего исследования. Значения в узлах и синие линии - 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

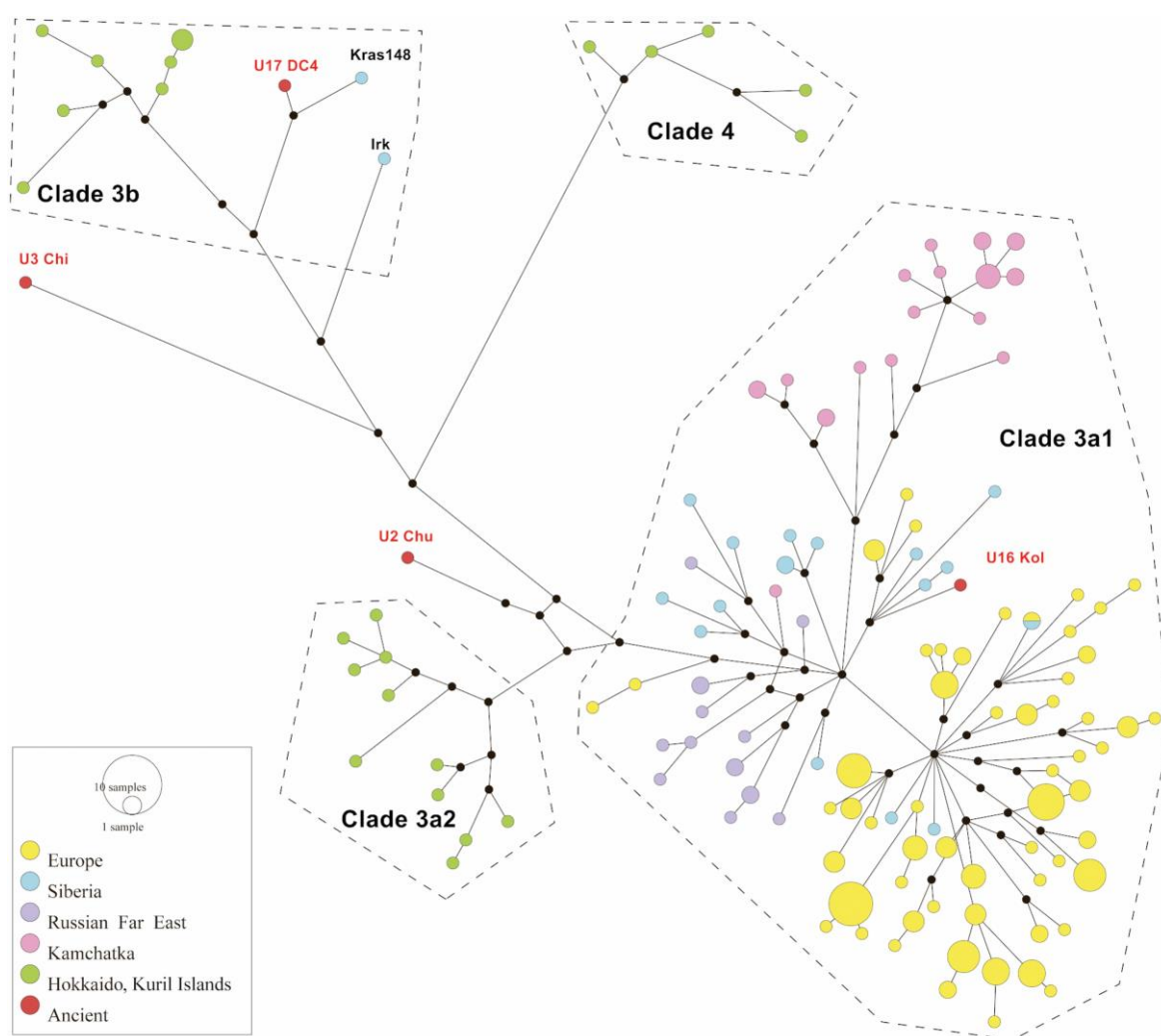


Рис. 5. Филогенетическая сеть из 136 митохондриальных геномов современных медведей, принадлежащих к кладам 3 и 4. Размер круга соответствует количеству идентичных образцов. Цветовое обозначение: желтый-Европа; синий-Сибирь; зеленый-Япония; красный-Камчатка; фиолетовый-Дальний Восток.

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. 17), 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 *S. 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 киангу.

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, Vasiliev 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, 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.