На правах рукописи

Саломашкина Валентина Валерьевна

ВНУТРИВИДОВАЯ СТРУКТУРА БУРОГО МЕДВЕДЯ (*URSUS ARCTOS*) РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН ПО ДАННЫМ ПОЛИМОРФИЗМА ЯДЕРНОЙ И МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

1.5.12 – Зоология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва, 2023

Работа выполнена в Кабинете методов молекулярной диагностики Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук»

Научный руководитель:	**Холодова Марина Владимировна** доктор биологических наук, главный научный сотрудник, руководитель Кабинета методов молекулярной диагностики ФГБУН «Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук»
Официальные оппоненты:	**Политов Дмитрий Владиславович** доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией популяционной генетики им. акад. Ю.П. Алтухова ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук
	Абрамсон Наталья Иосифовна кандидат биологических наук, ведущий научный заведующая лаборатории эволюционной геномики и палеогеномики ФГБУН «Зоологический институт Российской академии наук»
Ведущая организация:	ФГБОУ ВО «Пензенский государственный университет» г. Пенза

Защита состоится «____» _____ 2023 года в __часов __минут на заседании диссертационного совета 24.1.109.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33.
Тел/факс: +7(495)952-35-84, e-mail: admin@sevin.ru

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке Отделения биологических наук Российской академии наук по адресу: 119071, г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, на сайте ФГБУН ИПЭЭ РАН по адресу: www.sev-in.ru и на сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу: vak.minobrnauki.gov.ru

Автореферат разослан «_ __ _» ____ _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета к.б.н. Е.А. Кацман

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Изучение внутривидовой изменчивости всегда представляло интерес для исследователей. С развитием методов молекулярной биологии начали исследоваться генетические характеристики внутривидовой изменчивости, которые не заменяют, а дополняют данные морфологического анализа. Генетические методы позволяют выделять отдельные популяции, оценивать степень родства между ними, выявлять группы с особым природоохранным статусом, а также рассматриваемые в качестве эволюционно значимых единиц. Кроме того, результаты молекулярно-генетического анализа дают возможность установить случаи гибридизации и интрогрессии, а также описать криптические виды.

Бурый медведь (*Ursus arctos* Linnaeus 1758) – крупный хищник, имеющий широкий голарктический ареал, в котором имеются как протяженные непрерывные участки, так и изолированные популяции. Его характеризуют высокий уровень морфологической изменчивости и экологической пластичности, эврибионтность и эврифагия [Гептнер и др., 1967; Пажетнов, 2017]. На территории России находится наиболее многочисленная и географически протяженная часть его ареала [McLellan et al., 2017]. Бурый медведь - важный промысловый вид, имеющий также и культурное значение. *U. arctos* является ключевым видом во многих наземных экосистемах Голарктики. Оценка его численности и мониторинг популяций имеют значение для управления ресурсами, включая охрану и промысел. В составе данного вида выделяется более десяти подвидов [Baryshnikov, Mano, Masuda, 2005; Kitchener, 2010; Барышников, 2007; Чернявский, Кречмар, 2001].

В исследованиях филогеографии медведь занимает особое место, так как он был одним из первых крупных млекопитающих, чья внутривидовая структура начала изучаться с использованием молекулярно-генетических методов, что сразу принесло интересные результаты [Cronin et al., 1991; Taberlet, Bouvet, 1992, 1994; Taberlet et al., 1995; Talbot, Shields, 1996; Waits et al., 1998]. До настоящего времени изучение молекулярно-генетических особенностей как *U. arctos* в целом, так и отдельных популяций сохраняет актуальность, и ему посвящено большое число статей, в том числе с использованием ископаемых образцов [Anijalg et al., 2018; Ersmark et al., 2019; Matosiuk et al., 2019; Molodtseva et al., 2022; Salis et al., 2021; Гуськов и др., 2013; Valdiosera et al., 2008]. Хотя популяции бурого медведя Европы и частично Северной Америки с точки зрения генетики изучены достаточно хорошо, на ареале вида существуют регионы, данные по которым отсутствуют или отрывочны. Прежде всего, к таким «белым пятнам» в Евразии относятся Кавказский регион, Сибирь и Центральная Азия. Изучение медведей этих регионов важно для получения более полной картины внутривидового разнообразия и реконструкции истории формирования современного ареала бурого медведя.

Для бурого медведя характерна выраженная филопатрия самок и активное расселение самцов, что может отражаться на внутривидовой генетической структуре. Представляет интерес изучение не только изменчивости митохондриальной ДНК (мтДНК), отражающей филогеографию материнских линий, но и изменчивости бипарентальных и Y-хромосомных маркеров для уточнения «отцовской филогеографии». В отличие от мтДНК, которая является классическим инструментом филогеографии, Y-хромосомные маркеры все еще остаются недооцененными при изучении внутривидовой структуры млекопитающих.

Степень разработанности темы исследования. Данные о генетической структуре бурого медведя Сибири, Кавказа и Закавказья крайне фрагментарны, а Дальнего Востока России – недостаточно полны по сравнению с Европейской частью ареала. Реконструкция

филогеографической структуры вида проводилась разными авторами на основании различных фрагментов мтДНК, что усложняет обобщение полученных результатов. Исследования генетического разнообразия и степени связанности континуальных популяций бурого медведя в масштабе континента с использованием аутосомных микросателлитных локусов (STR – short tandem repeats) не проводились. Изучение отцовских линий бурого медведя находится на начальных стадиях, существует всего несколько работ с использованием маркеров Y-хромосомы.

Цель работы - описать генетическую структуру и уровень разнообразия бурого медведя, обитающего на территории России и прилегающих государств, на основании анализа полиморфизма молекулярных маркеров ядерной и митохондриальной ДНК, а также реконструировать возможные сценарии формирования современной филогеографической структуры вида.

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

1. Оценить разнообразие бурого медведя, обитающего на территории России и прилегающих стран, включая малоизученные регионы Кавказа и Западной Сибири, на основании результатов анализа полиморфизма аллелей 10 аутосомных микросателлитных локусов ядерной ДНК, имеющих бипарентальное наследование. Оценить уровень межрегиональной генетической дифференциации.
2. Проанализировать изменчивость бурых медведей из различных частей Евразийского ареала, включая малоизученные регионы Кавказа и Западной Сибири, на основании полиморфизма мтДНК (последовательностей гипервариабельного фрагмента контрольного региона и гена цитохрома *b* с фланкирующими участками), характеризующей разнообразие материнских линий наследования.
3. На основании анализа оригинальных и полученных другими авторами данных по полиморфизму мтДНК определить принадлежность выявленных нами материнских линий к известным общемировым кладам и уточнить филогеографическую структуру бурого медведя Евразии и предположить пути ее формирования.
4. Получить данные об изменчивости маркеров, расположенных на Y-хромосоме (8 микросателлитных локусов и один SNP), и выявить закономерности в распределении отцовских линий на ареале бурого медведя.

Научная новизна работы. Впервые с применением комплекса молекулярных маркеров с разной скоростью эволюции и типом наследования (мтДНК, аутосомные STR, Y-хромосомные локусы) исследованы бурые медведи, обитающие на территории России и сопредельных стран.

Впервые описаны материнские линии и получены генотипы по ядерным STR для бурых медведей, обитающих в Западной Сибири и на Кавказе. Среди медведей Кавказа описана новая гаплогруппа мтДНК. Впервые выявлены: в Западной Сибири представители митохондриальной клады, ранее встреченной только на Восточной Аляске и о. Хоккайдо; на склонах Большого Кавказа – представители клады, ранее описанной на территории Ирана. Проведена реконструкция филогенетических отношений и датировка ключевых событий в истории вида на основании фрагмента мтДНК длиной 1849 п.н. Получены генетические данные, демонстрирующие вклад медведей древнего рефугиума Западной Сибири в формирование современной генетической структуры *U. arctos*.

На основании анализа аутосомных STR показано наличие крупных региональных генетических кластеров в составе континуальной материковой популяции бурого медведя Евразии. Значительно дополнены общемировые данные по отцовским генетическим линиям

бурого медведя. Получены данные об изменчивости маркеров Y-хромосомы, свидетельствующие о закономерном пространственном распределении отцовских линий бурого медведя в Евразии. Впервые дана комплексная оценка генетического разнообразия бурого медведя из различных регионов России и сопредельных стран.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные в данной работе результаты уточняют и обогащают представления о структуре вида *U. arctos* и истории формирования его современного ареала. Результаты и выводы данной работы расширяют знания в области микроэволюции и филогеографии широкоареальных видов крупных млекопитающих. Новые данные о генетической структуре *U. arctos* могут служить основой для дальнейших исследований в области сравнительной филогеографии крупных млекопитающих Евразии. Результаты исследования могут в дальнейшем использоваться при планировании природоохранных работ, включающих данный вид, в особенности в Кавказском регионе. Полученные в работе гаплотипы мтДНК существенно расширили объем имеющихся данных для *U. arctos* в международной базе GenBank (NCBI) и могут быть использованы другими исследователями. Результаты данной работы могут быть использованы в пособиях и лекционных курсах по филогеографии и популяционной экологии млекопитающих для студентов ВУЗов.

Методы исследования. Работа выполнена на базе Кабинета методов молекулярной диагностики, входящего в ЦКП «Инструментальные методы в экологии» ИПЭЭ РАН. Выделение тотальной ДНК проводилось с помощью фирменных наборов. Для анализа мтДНК проводилась амплификация нескольких фрагментов: фрагмента контрольного региона (КР) (5'-гипервариабельная область), последовательности гена цитохрома b (*cyt b*) и фланкирующих участков. Для анализа десяти аутосомных и восьми Y-хромосомных STR проводилась амплификация с флуоресцентно меченными праймерами и определение длин фрагментов с помощью электрофореза на капиллярном секвенаторе. Последовательности нуклеотидов мтДНК и фрагмента, прилежащего к Y-хромосомному полиморфизму Y-579.1B, устанавливались методом секвенирования по Сэнгеру. Для статистической обработки проводились байесовская кластеризация, реконструкция филогенетических деревьев методом Байеса, построение медианных сетей гаплотипов (программы Structure 2.3.4, BEAST 2.6.7, Network 10.2.0.0, Arlequin 3.5.2.2, GenAlEx 6 и др.).

Основные положения, выносимые на защиту

1. На территории Кавказа и Закавказья в позднем плейстоцене существовал рефугиум бурого медведя, который поддерживался по меньшей мере на протяжение последних 120 тысяч лет. Современные медведи Кавказа и Европейской части России не несут следов связывавшего их потока генов, несмотря на предположения о существовании связи между этими популяциями в историческое время.
2. По нашим данным, существует ограничение потока генов между медведями Зауралья и Западно-Сибирской низменности.
3. Для бурого медведя, чья история включала несколько последовательных волн расселения, при которых смешивались представители предыдущих и последующих волн, морфологическая изменчивость и внутривидовая систематика не могут быть напрямую соотнесены с генетической структурой вида.

Личный вклад соискателя. Автор лично проводил все лабораторные процедуры, направленные на получение результатов, описанных в диссертации. Для образцов, предоставленных музеями, процедура отбора материала также проводилась непосредственно

автором. Вклад автора в подготовку и написание диссертации составил 90-95%, лабораторная работа, анализ и статистическая обработка полностью выполнены автором.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы работы были представлены на отечественных и международных научных конференциях: Актуальные проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых (2012, Россия), Fundamental and applied research in biology: the IIIrd International conference of young scientists (2014, Ukraine), Динамика популяций охотничьих животных Северной Европы (2014, Россия), Биологическое разнообразие и проблемы охраны фауны Кавказа–2 (2014, Армения), Структура вида у млекопитающих» (2015, Россия), X Съезд Териологического общества при РАН (2016, Россия), 24th International conference on bear research and management (2016, USA), 26th International conference on Bear Research and Management (2018, Slovenia), Генетика популяций: прогресс и перспективы (2017, Россия), 11th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife (2017, Germany), Млекопитающие России: фаунистика и вопросы териогеографии (2019, Россия). Материалы работы были представлены на отчетной конференции ИПЭЭ РАН за 2015-2017 годы.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 15 работ, в том числе 4 статьи в изданиях, входящих в перечень научных журналов ВАК и базу цитирования WoS, и глава в коллективной монографии «Bears of the World: Ecology, Conservation and Management».

Реализация и внедрение результатов работы. В рамках подготовки диссертации была выполнена работа по индивидуальному определению медведей, обитающих на территории заповедника «Брянский Лес» совместно с сотрудником заповедника Е.Ф. Ситниковой [Sitnikova, Salomashkina, 2018]. Выполнена видовая идентификация экскрементов и образцов шерсти бурого медведя, впервые встреченного в заповеднике Остров Врангеля [Babiy et al., 2022]. Материалы диссертации использовались в процессе выполнения работ по гранту РФФИ «Своеобразие генетической структуры и история формирования популяции бурого медведя (*Ursus arctos* L., 1758) Кавказа и Закавказья» (проект 16-34-01083 мол_а, рук. Саломашкина В.В.), а также гранту РФФИ «Европейско-сибирская дизъюнкция в филогеографической структуре и генетическом разнообразии парнокопытных (Artiodactyla) и хищных (Carnivora) млекопитающих России» (проект № 10-04-01351 а, рук. Холодова М.В.) и подпрограммы «Динамика и сохранение генофондов» Программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Живая природа: современное состояние и проблемы развития».

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, выводов и 6 глав (обзор литературы, материалы и методы, глава результатов и обсуждения для каждого из трех использованных генетических маркеров, глава сопоставления полученных результатов). Работа изложена на 249 страницах машинописного текста, включая 227 страниц основного текста и 22 страницы Приложений. Работа содержит 62 рисунка и 28 таблиц в основном тексте, 7 таблиц и 2 рисунка в Приложении. Список литературы включает 264 наименования, в том числе 238 на иностранных языках.

Благодарности. Автор выражает искреннюю благодарность коллективу Кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН (П.А. Сорокину, И.Г. Мещерскому, Е.Ю. Звычайной и другим) за обучение методам работы с генетическими материалами, а также помощь и поддержку в течение всего процесса работы над диссертацией. Также автор благодарен всем научным сотрудникам, охотоведам и охотникам, принимавшим участие в сборе образцов, и

сотрудникам зоологических музеев, благодаря которым эта работа стала возможной. Автор благодарит своего научного руководителя, Марину Владимировну Холодову, за бесконечное терпение и участие в формировании научных особенностей как диссертации, так и ее автора. Также автор благодарит коллектив Лаборатории генной инженерии ФГБУ НМИЦ гематологии за моральную поддержку в течение всего времени работы над диссертацией.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** отражены актуальность научного исследования, степень разработанности темы, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, цели и задачи работы и основные положения, выносимые на защиту.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзор литературы входят следующие разделы: «Краткая биологическая характеристика вида»; «Ареал бурого медведя»; «Подвидовая структура бурого медведя»; «Обзор исследований генетической структуры бурого медведя».

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Характеристика исследованных образцов

В работе использовались образцы различных тканей (N=178) бурого медведя (*Ursus arctos*), имеющиеся в коллекции Кабинета методов молекулярной диагностики ИПЭЭ РАН, а также предоставленные Зоологическими музеями МГУ (г. Москва), ИЭРиЖ УрО РАН (г. Екатеринбург), НАН Армении (г. Ереван). Происхождение образцов представлено в таблице 1 и на рисунках 1, 5, 10.

Таблица 1. Происхождение образцов тканей бурого медведя, включенных в исследование. «a-STR» – число образцов, генотипированных по 8-10 аутосомным STR. «мтДНК» - число образцов, для которых получены последовательности мтДНК указанной длины. «Y-STR» – число образцов, генотипированных по 8 Y-хромосомным STR и Y-SNP (Y-579.1B).

Район происхождения образцов	a-STR	мтДНК: 570 п.н. (1860 п.н.)	Y-STR	Всего исследовано
Кавказ и Закавказье	31	37 (20)	11	39
Европейская часть России	25	21 (19)	14	26
Урал	19	29 (14)	9	31
Западная Сибирь	28	36 (26)	25	39
Северная Монголия	5	5 (4)	3	5
Юг побережья Охотского моря	13	15 (11)	8	20
Чукотка	7	7 (1)		8
Камчатка	10	11 (8)	6	11
Всего	**138**	**161 (103)**	**73**	**178**

2.2 Молекулярно-генетический анализ

Выделение тотальной ДНК проводилось следующими наборами: Diatom DNA Prep 100 («Изоген», Москва), DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Германия) – мягкие ткани; QIAquick PCR purification kit – костная ткань; QIAamp DNA Investigator Kit – шерсть, костная ткань; QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Германия) – экскременты.

Для исследования филогеографической структуры бурого медведя на основе анализа мтДНК были выбраны 5’-гипервариабельная область контрольного региона (КР) длиной 570 п.н. и последовательность гена цитохрома b (*cyt b*) с фланкирующими участками (ген NADH дегидрогеназы *ND6* (частично), ген tRNA-Glu, tRNA-Thr, tRNA-Pro) длиной 1289 п.н. Суммарная длина конкатенатного фрагмента составила 1860 п.н. Для амплификации использовались

праймеры, описанные в работах [Korsten et al., 2009; Loreille et al., 2001; Matsuhashi et al., 1999; Рожнов и др., 2010]. Для изучения современной генетической структуры бурого медведя были выбраны 10 аутосомных STR (Mu10, Mu23, Mu51, Mu50, Mu59, G10L, Cxx20, UarT647, UarT259, G10X [Bellemain, Taberlet, 2004; Kleven et al., 2012; Ostrander, Sprague, Rine, 1993; Paetkau et al., 1995; Paetkau, Strobeck, 1994; Taberlet et al., 1997]). Для анализа изменчивости отцовской линии были выбраны восемь Y-хромосомных STR (Y15020.1, Y369.1, Y369.4, Y318.1, Y318.2, Y318.4, Y318.6, Y318.9) и один однонуклеотидный полиморфизм (SNP) Y-579.1B [Bidon et al., 2014]. Для образцов, представленных костной тканью, шерстью и экскрементами, проводилось не менее трех амплификаций STR; в анализ были включены только образцы, для которых были получены воспроизводимые результаты. Секвенирование ДНК и визуализация STR производились на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems).

Для определения пола использовались праймеры, описанные в статье [Ennis, Gallagher, 2009].

2.3 Статистическая обработка полученных результатов

Полученные последовательности мтДНК выравнивались вручную с помощью программы BioEdit 7.2.5 [Hall, 1999]. Статистическая обработка проводилась с помощью программ Arlequin 3.5.2.2 [Excoffier, Lischer, 2010], MEGA 7.0.26 [Kumar, Stecher, Tamura, 2016] и Network 10.2.0.0 [Bandelt, Forster, Rohl, 1999]. Реконструкция филогенетических отношений проводилась с помощью пакета программ BEAST 2.6.7 [Bouckaert et al., 2019], выбор эволюционной модели – с помощью программ TOPALi 2.5 [Milne et al., 2009] и MEGA 7.0.26, визуализация полученных деревьев – в программе FigTree 1.4.3 [http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/]. Филогенетическая реконструкция проводилась на основании 75 млн. генераций Марковских цепей Монте-Карло с записью каждые 1500 генераций с 20% отжига.

Для сопоставления нуклеотидных последовательностей, полученных в данной работе и описанных в литературе, в анализ были включены 565 гомологичных последовательностей из базы GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/). В качестве внешней группы использовались 17 последовательностей других видов медведей. Для калибровки филогенетических деревьев использовались опубликованные последовательности ископаемых образцов *U. arctos* с известными датировками. Для образцов, датированных радиоуглеродным методом, приведенные радиоуглеродные даты калибровались с помощью онлайн-калькулятора OxCal 4.4 [Bronk Ramsey, 2009], шкала калибровки IntCal20 [Reimer et al., 2020].

Статистическая обработка аутосомных STR проводилась в программах Arlequin 3.5.2.2, Cervus 3.0 [Kalinowski, Taper, Marshall, 2007], GenAlEx 6 [Peakall, Smouse, 2006], Fstat v 2.9.4 [Goudet, 2003], SPAGeDi1-5d (build02-06-2017) [Hardy, Vekemans, 2002]. Выявление генетической структуры проводилось с помощью байесовской кластеризации в программе *Structure* 2.3.4 [Pritchard, Stephens, Donnelly, 2000]; для определения наиболее правдоподобного числа кластеров (K) использовался метод [Evanno, Regnaut, Goudet, 2005], реализуемый на онлайн-ресурсе StructureHarvester [Earl, vonHoldt, 2012]. Кластеризация проводилась на основании 1 млн. генераций анализа и 200 тыс. генераций отжига; проводилось 10 повторностей для K от 1 до 10.

Для обработки Y-хромосомных STR использовались программы Network 10.2.0.0 и GenAlEx 6. Для построения медианной сети гаплотипов Y-хромосомным STR был присвоен уровень значимости, обратно пропорциональный их вариабельности [Hirata et al., 2017].

Для расчета географических дистанций использовалась программа Geographic Distance Matrix Generator v1.2.3 [Ersts, 2019], для анализа классов географических дистанций – программа SPAGeDi1-5d.

ГЛАВА 3. ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЯДЕРНЫХ АУТОСОМНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ

3.1 Результаты

Общее число генотипированных особей составило 138. В составе выборки было выделено 10 территориальных группировок, исходя из локалитетов мест добычи животных: I – Юго-Западный Кавказ; II – Юго-Восточный Кавказ; III – Малый Кавказ; IV – Европейская часть России; V – Урал; VI – Западная Сибирь; VII – Северная Монголия; VIII – юг побережья Охотского моря; IX – Чукотка; X – Камчатка (рис. 1).

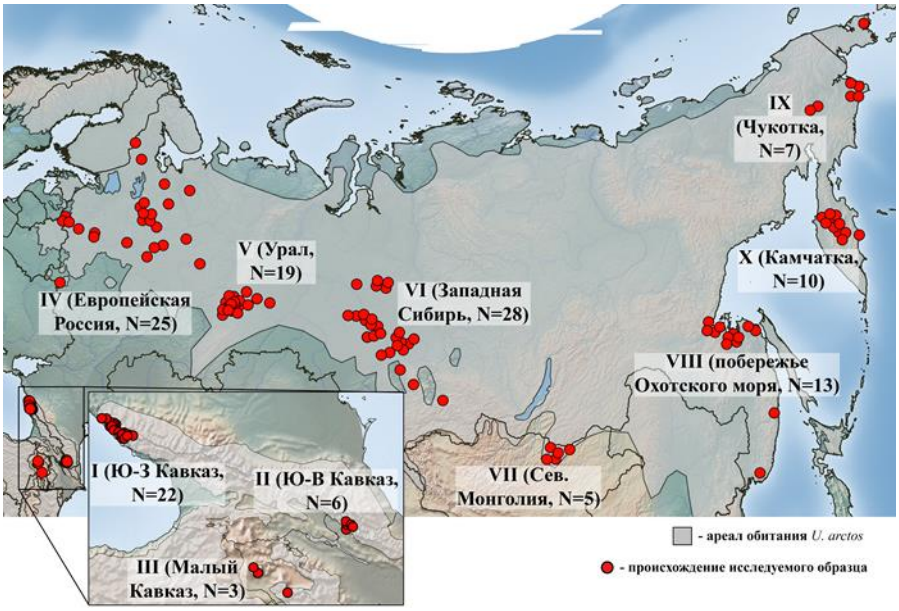


Рис. 1. Карта мест сбора образцов, для которых были получены генотипы по исследуемым аутосомным STR. Указано разделение на выделенные географические группировки.

Результаты кластеризации Байесовским методом с учетом географического происхождения образцов (LOCPRIOR) приведены на рис. 2. При анализе общей выборки оптимальным числом кластеров оказались K=2 и K=3 (рис. 2А-1 и -2, соотв.). При K=2 медведи с Кавказа (группировки I-III, Кавказский кластер) отделялись от медведей протяженной материковой популяции Евразии (группировки IV-X, Основной Евразийский кластер). При K=3 медведи Основного Евразийского кластера разделялись на зверей из западных и восточных частей ареала: Западный и Восточный генетические кластеры, группировки IV-V и VII-X, соответственно. Медведи Западной Сибири (группировка VI) заняли промежуточное положение между ними.

В составе Кавказского кластера генетической структуры выявлено не было (рис. 2Б). Для дальнейшего анализа Основного Евразийского кластера образцы из Сибири были объединены поочередно с Западным (рис. 2Г) и Восточным (рис. 2Д) кластерами.

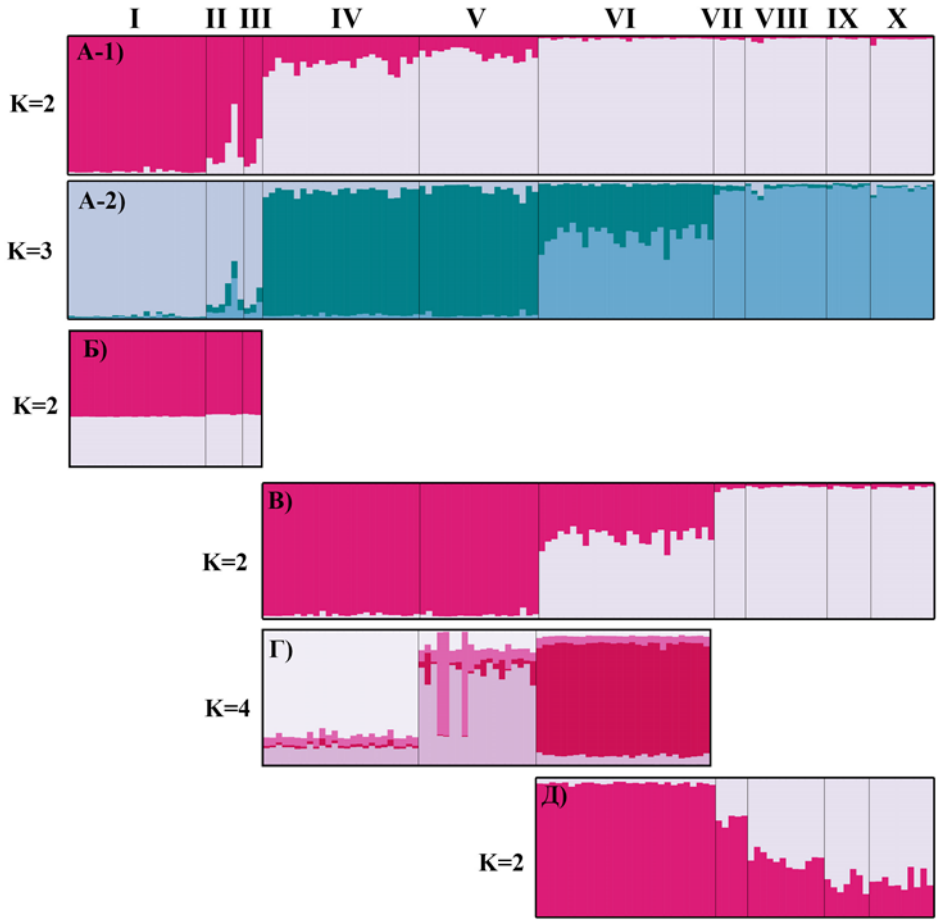


Рис. 2. Кластеризация образцов бурого медведя 10 аутосомным STR. Приведены результаты для наиболее правдоподобного числа кластеров согласно методу [Evanno, Regnaut, Goudet, 2005]. По оси Y указана вероятность того, что конкретная особь (отдельные столбцы по оси X) может быть отнесена к определенному генетическому кластеру. Цвета соответствуют выделяемым кластерам; рисунки А–Д (см. описание в тексте) соответствуют различным этапам иерархического анализа. Римскими цифрами (I-X) обозначены регионы сбора образцов (см. рис. 1).

При объединении Западного кластера и группировки VI оптимальное K оказалось равно 4, однако один из кластеров фактически был представлен несколькими особями (рис. 2Г) и далее не будет обсуждаться. Три оставшихся кластера соответствуют группировкам медведей Европейской России (IV), Урала (V) и Сибири (VI). При объединении группировки VI и особей из Восточного кластера не удалось выявить четкой структуры, но вероятность отнесения особей к разным кластерам менялась градуально по мере продвижения на восток (рис. 2Д).

Таблица 2. Значения генетических дистанций Fst между выделенными географическими группировками образцов бурого медведя (см. рис. 1). Двойная граница ячеек показывает исключенную из анализа малочисленную группировку III. **Все генетические дистанции статистически достоверны (p<0,05).** Цветами отмечены самые низкие (зеленый) и самые высокие (красный) 25% генетических дистанций.

	I	II	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
I (Ю-З Кавказ)									
II (Ю-В) Кавказ)	0,025								
IV (Европейская Россия)	0,055	0,023							
V (Урал)	0,050	0,038	0,021						
VI (Сибирь)	0,058	0,047	0,042	0,033					
VII (Сев. Монголия)	0,081	0,073	0,080	0,081	0,038				
VIII (поб. Охотского моря)	0,077	0,071	0,054	0,066	0,039	0,033			
IX (Чукотка)	0,074	0,098	0,076	0,094	0,043	0,063	0,027		
X (Камчатка)	0,067	0,079	0,079	0,073	0,043	0,065	0,039	0,042	

При анализе без учета происхождения образцов полученная картина оказалась более «шумной», однако общая закономерность выделения генетических кластеров сохранилась.

Также был проведен анализ генетических дистанций Fst (табл. 2) на основании 9 аутосомных STR. Выявленный паттерн генетических дистанций имеет значительное сходство с описанными ранее результатами Байесовской кластеризации. Наименьшие генетические дистанции соответствуют выделению Кавказского (группировки I-II), Западного (группировки IV-V) и Восточного (группировки VII-X) генетических кластеров. Медведи Западной Сибири (группировка VI) демонстрирует близость как к Западному, так и к Восточному кластерам. Медведи Северной Монголии (группировка VII) оказались близки только к группировкам Западной Сибири и побережья Охотского моря (VI, VIII).

Поскольку образцы из Западной Сибири отделялись как от Западного, так и от Восточного генетических кластеров, представляется целесообразным выделить их в отдельный Центральный генетический кластер.

Итоговая схема разделения исследуемой выборки бурого медведя на генетические кластеры приведена на рисунке 3. Показатели генетического разнообразия и гетерозиготности выявленных генетических кластеров приведены в таблице 3.

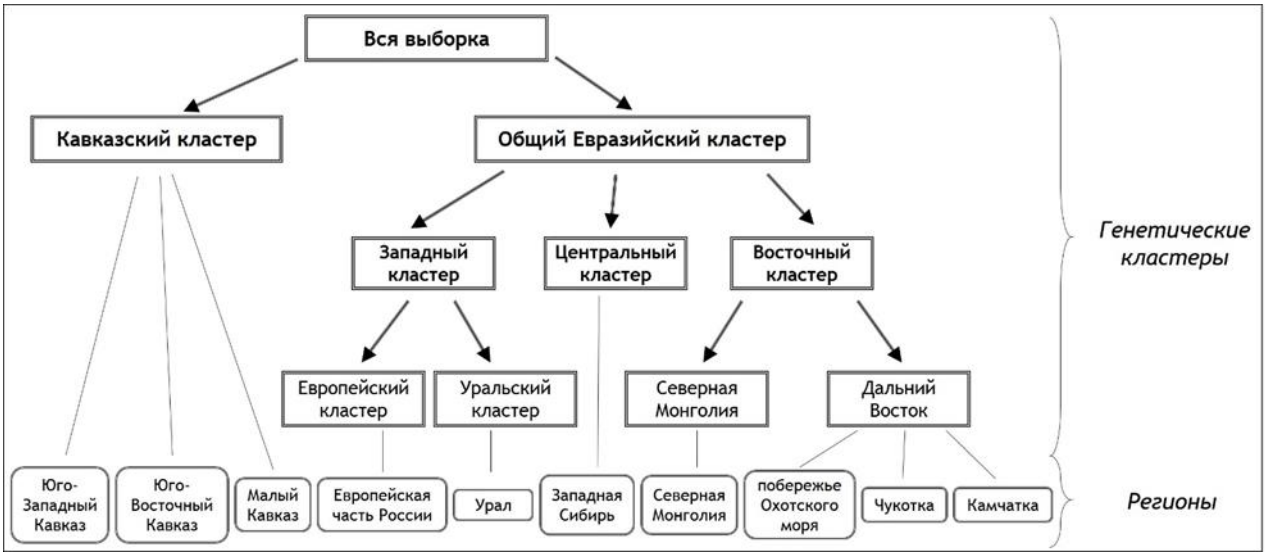


Рис. 3. Схема выявленных генетических кластеров бурого медведя, согласно анализу аутосомных микросателлитных локусов.

Уровень генетического разнообразия и гетерозиготности медведей из Кавказского кластера по всем параметрам несколько ниже, чем разнообразие зверей из Западного, Центрального и Восточного кластеров; также только в Кавказском кластере статистически значим коэффициент инбридинга Fis. В целом уровень генетического разнообразия медведей Кавказа соответствует скорее показателям региональных кластеров более низкого уровня, а по уровню гетерозиготности уступает и им тоже. Медведи Западного, Центрального и Восточного генетических кластеров имеют сходные уровни гетерозиготности и генетического разнообразия, различаясь только по числу уникальных «приватных» аллелей.

Кластер Урала демонстрирует самые низкие показатели разнообразия и гетерозиготности среди остальных исследованных регионов, за исключением группировки Монголии (но в ее состав входит всего 5 образцов). Среднее число аллелей и число «приватных» аллелей на Урале также являются наиболее низкими среди исследованных выборок.

Таблица 3. Показатели генетического разнообразия выявленных генетических кластеров на основании анализа 10 аутосомных STR. N – число исследованных особей, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, NA – среднее число аллелей на локус, Fis – индекс инбридинга, Pr –

число уникальных «приватных» аллелей. *- значение Fis статистически достоверно (p<0,05); ** - анализ на основании 9 локусов.

	N	Ho	He	NA	Fis	Pr
Кавказский кластер	**31**	**0,745 ± 0,115**	**0,779 ± 0,102**	**8,5 ± 2,32**	**0,088 ***	**3**
Западный кластер	**44**	**0,793 ± 0,088**	**0,829 ± 0,041**	**11,2 ± 1,87**	**0,027**	**16**
Европейская часть России	25	0,816 ± 0,079	0,818 ± 0,059	9,5 ± 1,43	-0,005	9
Урал	19	0,757 ± 0,155	0,819 ± 0,047	7,9 ± 1,37	0,052	3
Центральный кластер (Западная Сибирь)	**28**	**0,786 ± 0,068**	**0,838 ± 0,053**	**10 ± 1,63**	**0,049**	**7**
Восточный кластер	**35**	**0,799 ± 0,086**	**0,827 ± 0,053**	**10 ± 2,54**	**0,035**	**11**
Монголия **	5	0,793 ± 0,259	0,82 ± 0,125	5,3 ± 1,58	0,013	0
Дальний Восток	30	0,796 ± 0,096	0,819 ± 0,061	9,7 ± 2,5	0,019	9

Интересно, что, хотя согласно байесовской кластеризации, медведи Кавказа отличаются от всех остальных медведей, входящих в анализ, генетические дистанции между Кавказским генетическим кластером и внутренними подкластерами Основного Евразийского кластера не превышают дистанций между последними (табл. 4).

Таблица 4. Значения дистанций Fst, разделяющих выделенные генетические кластеры высокого уровня, на основании анализа 10 аутосомных STR. **Все значения статистически достоверны (p<0,05).**

	Кавказский кластер (N=31)	Западный кластер (N=44)	Центральный кластер (N=28)	Восточный кластер (N=35)
Кавказский кластер (N=31)	0			
Западный кластер (N=44)	0,046	0		
Центральный кластер (N=28)	0,057	0,039	0	
Восточный кластер (N=35)	0,058	0,057	0,032	0

3.2 Обсуждение

В составе исследованной выборки наиболее явно выделяются генотипы медведей Кавказа, что соответствует представлениям о том, что по меньшей мере с начала XX века между кавказской и европейской популяциями не существовало сообщения через территории Восточно-Европейской равнины [Беликов и др., 1993; Гептнер и др., 1967].

Примечательно, что величина дистанции Fst, отделяющей медведей Кавказа от медведей Европейской России и Урала, имеет относительно небольшое значение (0,047 и 0,044), что значительно ниже, чем описанные в литературе дистанции, отделяющие другие изолированные популяции бурого медведя (Гоби, Гималаев, Йеллоустона; [Haroldson et al., 2010; Tumendemberel et al., 2019]). Можно предположить, что разница обусловлена значительно более низкой численностью этих популяций по сравнению с популяцией Кавказа.

Мы ожидали выявить в составе выборки медведей с Кавказа генетическую структуру, образовавшуюся из-за горного рельефа, однако она не была выявлена. Это может объясняться относительно малой выборкой, однако исследования популяций медведей из других гористых регионов также часто показывали отсутствие генетической структуры [Ambarlı et al., 2018; Frosch et al., 2014; Murtskhvaladze, Gavashelishvili, Tarkhnishvili, 2010].

Среди бурых медведей Основного Евразийского кластера (непрерывной евразийской части ареала) удалось выявить иерархическую систему генетических кластеров, в целом совпадающих с географическим происхождением образцов. Крупные генетические кластеры, выявляемые на основании анализа высокополиморфных ядерных маркеров, были описаны для других крупных млекопитающих, обладающих протяженным ареалом: американский черный

медведь (*U. americanus*) [Puckett, Eggert, 2016], красная рысь (*Lynx rufus*) [Croteau et al., 2012], евразийская рысь (*L. lynx*) [Lucena-Perez et al., 2020], серый волк (*Canis lupus*) [Knowles, 2010; Schweizer et al., 2016; Талала и др., 2020].

Одним из механизмов формирования генетической структуры в составе непрерывного ареала может быть изоляция расстоянием. Для проверки ее влияния был проведен тест Мантеля для 82 особей с известными координатами добычи. Показано, что в целом влияние географических дистанций на генетические является статистически значимым, хотя абсолютные значения коэффициента корреляции Мантеля не превышают 0,21. Результаты, указывающие на изоляцию расстоянием, получены также при использовании метода классов дистанций; в качестве меры генетического сходства использовался коэффициент родства (Loiselle et al. 1995). На рисунке 4 виден довольно четкий нисходящий тренд, что указывает на закономерное снижение степени родства между особями при увеличении географической дистанции между местами их добычи.

Можно сделать вывод, что изоляция расстоянием вносит значимый вклад в формирование генетической структуры бурого медведя Евразии.

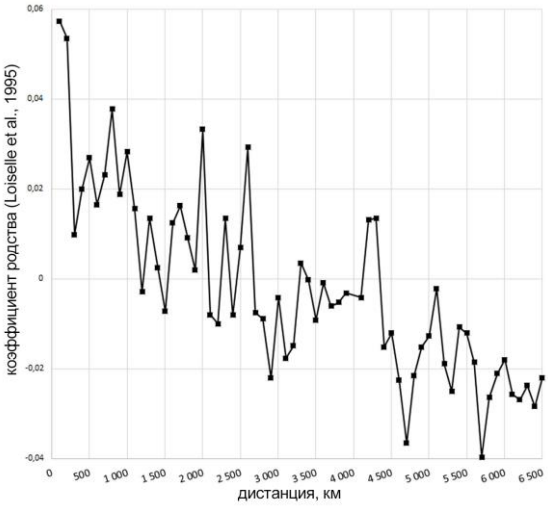


Рис. 4. Средние коэффициенты родства пар особей бурого медведя Общего евразийского кластера, разделенных различными географическими дистанциями. На график нанесены только географические группы, в составе которых было не менее 10 пар особей.

Сопоставление наших данных с данными других исследователей показало, что медведи всех исследованных нами регионов обладают высокой гетерозиготностью относительно других популяций *U. arctos*. Наши расчеты показали, что все выделенные генетические кластеры входят в верхний квартиль по уровню гетерозиготности, наравне со стабильными и многочисленными популяциями Евразии и Америки [Eiken et al., 2009; Kleven et al., 2012, 2012; Kopatz et al., 2014; Lewis, Pyare, Hundertmark, 2015; Schregel et al., 2012; Tammeleht et al., 2010; Tumendemberel et al., 2019; Waits et al., 2000]. По всей видимости, включенность в состав обширной популяции обеспечивает достаточно высокий уровень гетерозиготности региональных выборок. Исследованные в настоящей работе медведи с Кавказа, которые имеют более низкие показатели разнообразия и гетерозиготности, чем медведи других регионов России, при сравнении с мировыми данными также входят в число наиболее гетерозиготных популяций.

ГЛАВА 4. ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИТХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

4.1 Результаты

В рамках работы были получены последовательности фрагмента мтДНК для 161 образца тканей бурого медведя из разных регионов Евразии. Полная конкатенатная последовательность длиной 1860 п.н. была получена для 103 образцов; еще для 58 образцов был получен только фрагмент КР мтДНК длиной 552 п.н. (рис. 5).

Филогенетические отношения между гаплотипами демонстрирует сеть (рис. 6). При анализе конкатенатной последовательности было описано 65, а при анализе фрагмента КР (552 п.н.) – 70 гаплотипов. В составе исследуемой выборки были выделены гаплогруппы «Евразия», «Сибирь», «Сибирь-2», «Курилы», «Кавказ-1», «Кавказ-2» и «Кавказ-3».

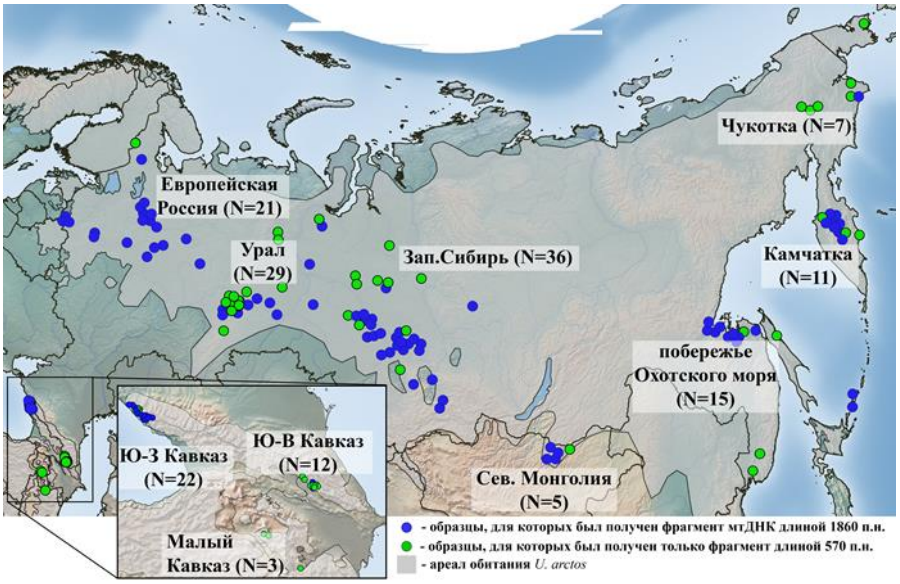
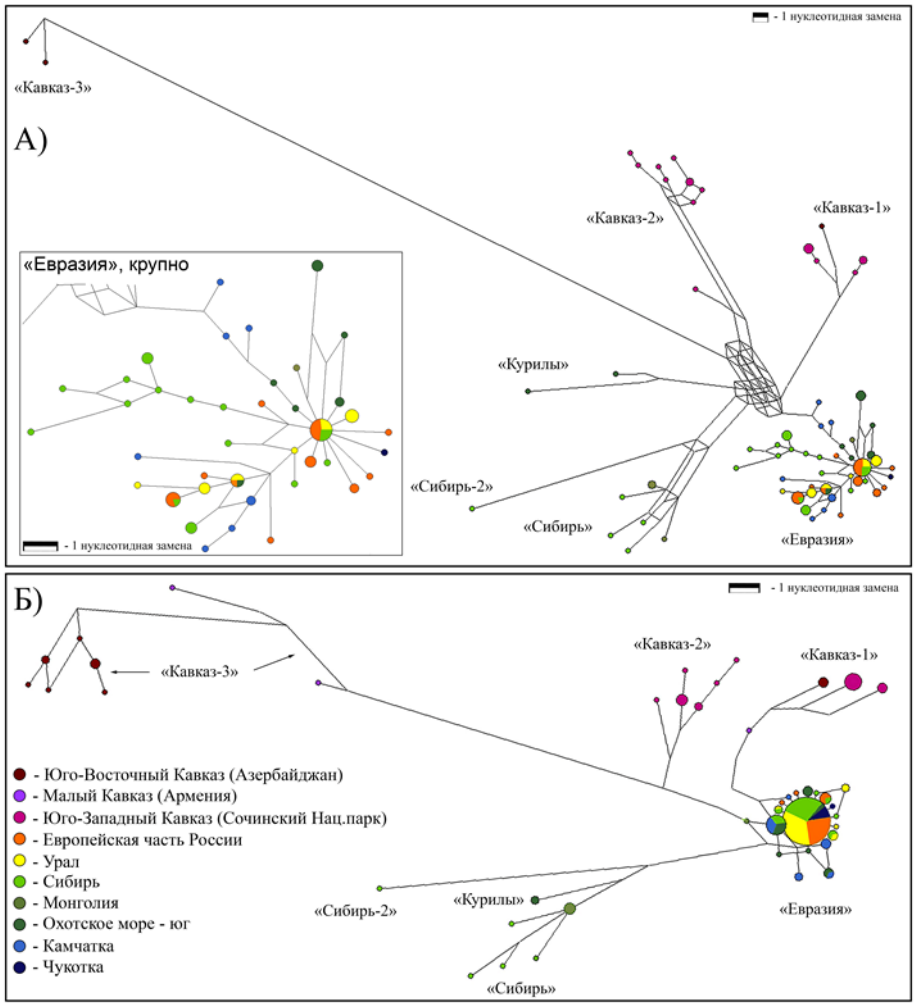


Рис. 5. Карта мест сбора образцов бурого медведя, для которых были получены фрагменты мтДНК различной длины, с указанием длины полученного фрагмента ДНК.

На данный момент описанные в литературе последовательности мтДНК современных бурых медведей разделяются на клады 1, 2a, 3a, 3b, 3d, 4, 5, 6, 7 [Davison et al., 2011; Lan et al., 2017]. Сопоставление полученных нами последовательностей с данными других исследователей (рис. 7, 8) показало, что гаплогруппа «Евразия» входит в состав митохондриальной клады 3a, гаплогруппы «Сибирь», «Сибирь-2» и «Курилы» - в состав клады 3b.

Рис. 6. Медианные сети гаплотипов, построенные на основании полученных нами последовательностей фрагмента мтДНК длиной 1860 п.н. (А) и 552 п.н. (Б). Диаметр кружков пропорционален числу особей, входящих в гаплотип, длина ветвей пропорциональна числу



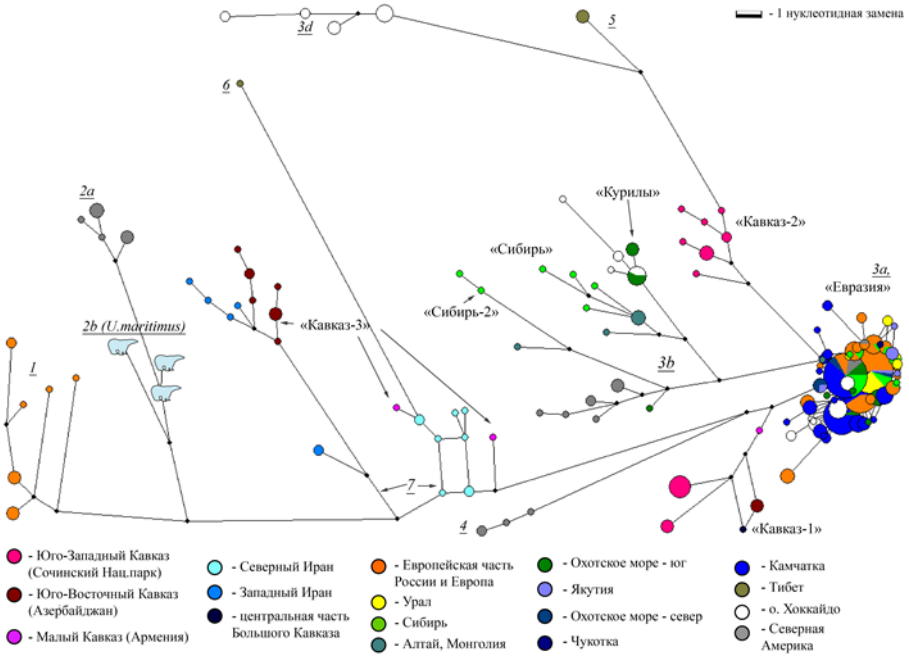


Рис. 7. Медианная сеть гаплотипов, построенная на основании фрагмента КР длиной 554 п.н. (с исключенной областью СТ-политракта) на основании полученных в этой работе данных и данных других исследователей (N=606). Диаметр кружков пропорционален числу особей, входящих в гаплотип, длина ветвей пропорциональна числу замен, разделяющих гаплотипы.

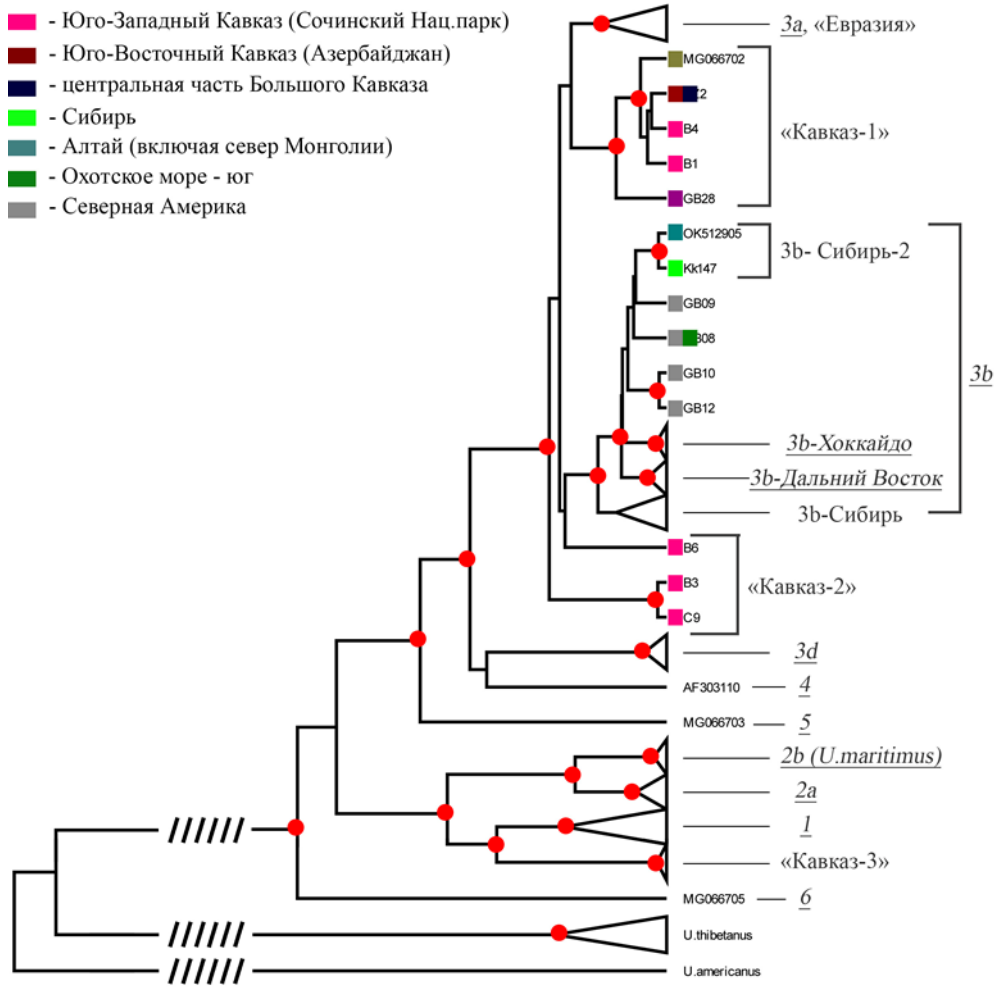


Рис. 8. Филогенетическое дерево гаплотипов, построенное на основании последовательности гена *cyt b* (1140 п.н.) методом Байесовской реконструкции. Часть ветвей сжата для удобства отображения. Красные кружки указывают на узлы с поддержкой выше 0,95.

Гаплогруппа «Кавказ-3» вошла в состав клады 7. Гаплогруппы «Кавказ-1» и «Кавказ-2» остались самостоятельными. При этом в их состав вошли единичные гаплотипы бурых медведей с Кавказа, которые ранее были отнесены к кладе 3a [Salis et al., 2021]. Представители гаплогруппы «Сибирь» сформировали в составе клады 3b отдельную ветвь 3b-Сибирь; гаплогруппа «Курилы» вошла в состав ветви 3b-Хоккайдо, а гаплотипы «Сибирь-2»

сформировали отдельную субкладу 3b-Сибирь-2, близкую к ветви 3b-Северная Америка (рис. 7, 8). Анализ изолированной последовательности гена *cyt b* длиной 1140 п.н. показал, что медведи с Дальнего Востока, принадлежащие к кладе 3b, также формируют отдельную ветвь (рис. 8). Выделенная нами субклада 3b-Сибирь занимает анцестральное положение относительно всех остальных субклад, отношения между которыми остаются не проясненными.

Анализ короткого фрагмента (252 п.н.) показал, что полученные нами гаплотипы клады «Кавказ-1» объединяются с гаплотипами медведей из Грузии и Турции [Murtskhvaladze, Gavashelishvili, Tarkhnishvili, 2010; Çilingir et al., 2016]. Филогенетический анализ методом Байесовской реконструкции подтвердил статистическую достоверность выделения гаплогрупп «Кавказ-1» (рис. 8) и «Кавказ-2» (данные анализа фрагментов длиной 1849 п.н., 552 п.н.; не приведено). Также показано объединение клад 3a, 3b, «Кавказ-1», «Кавказ-2» в единый узел. Сопоставление полученных нами данных и результатов других исследователей показало, что клада 3b отделилась от общего предка первой; порядок расхождения клад 3a, «Кавказ-1» и «Кавказ-2» остается неясным. Оценено предполагаемое время существования последнего общего предка (MRCA) для основных митохондриальных клад. Полученные нами датировки не противоречили друг другу и литературным данным. Время формирования «небольших» митохондриальных клад, таких как 3d, 2a, 2b, 3a2, а также субклад клады 3b приходится на 15-30 т.л.н., т.е. на период последнего ледникового максимума. Клада 3a оформилась в период между массивным ранневалдайским оледенением (80-100 т.л.н.) и менее выраженным калининским оледенением (50-60 т.л.н.). В этот же период существовали MRCA клады 3b и MRCA клады «Кавказ-1». MRCA для клад 1+2+7 и для клад 3a+3b+«Кавказ-1»+«Кавказ-2»+3d+4+5 существовали не позднее MIS7 (191-243 т.л.н.).

4.2 Обсуждение

На территории Кавказа и Закавказья выявлены три гаплогруппы: «Кавказ-1», «Кавказ-2» и «Кавказ-3» (клада 7). Гаплотипы из базы GenBank, вошедшие в нашей работе в кладу «Кавказ-1» [Murtskhvaladze, Gavashelishvili, Tarkhnishvili, 2010; Salis et al., 2021; Çilingir et al., 2016] и «Кавказ-2» [Salis et al., 2021], были описаны авторами как принадлежащие к 3a, однако включение новых образцов позволило нам показать, что эти линии мтДНК формируют две отдельные клады.

Карта распространения представителей различных митохондриальных клад на Кавказе и Ближнем Востоке приведена на рисунке 9. Разнообразие и древность линий мтДНК медведей региона позволяет предположить, что медведи на Кавказе являются автохтонными обитателями и присутствуют в регионе непрерывно в течение последних 150 тыс.

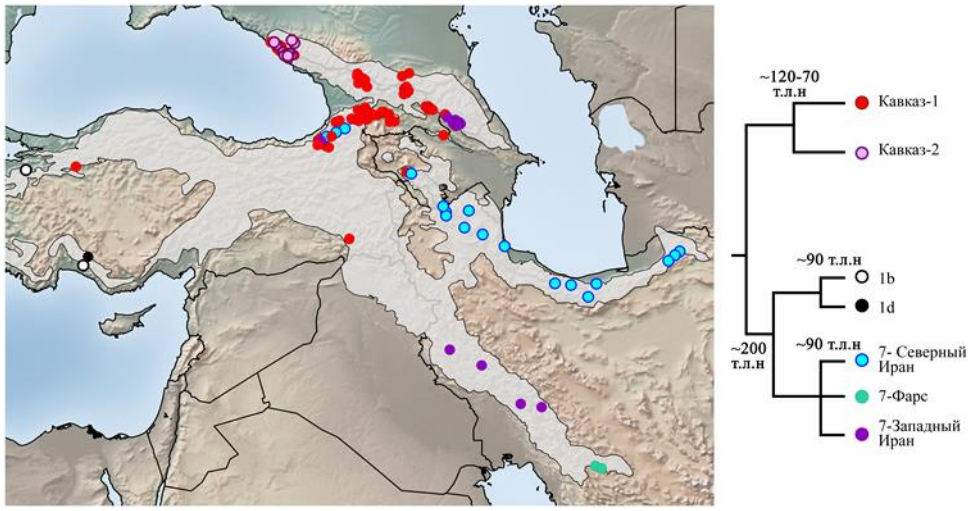


Рис. 9. Карта распространения основных митохондриальных клад на территории Кавказа, Закавказья и Ближнего Востока.

лет.

Вероятно, современное распространение выявляемых материнских линий сформировалось в результате нескольких волн расселения. MRCA клад «Кавказ-1», «Кавказ-2» и 7 датируются периодом от 50 («Кавказ-2») до 86 (клада 7) т.л.н., что помещает заселение Кавказа предками современных медведей в период около MIS4 (57-71 т.л.н.). Примечательно, что распространение субклады 7-Западный Иран в настоящее время выглядит разорванным: медведи, принадлежащие к этой субкладе, встречаются в юго-западной части Ирана и на южном склоне Большого Кавказского хребта, а между этими локалитетами выявлены только медведи, несущие гаплотипы клады 7-Северный Иран. История формирования филогеографической структуры медведей Кавказа и Ближнего Востока не может быть реконструирована более подробно на основании имеющихся данных.

Наши данные показывают, что имеющиеся сообщения об обитании на территории Кавказа представителей клады 3a являются результатом либо неточности [Murtskhvaladze, Gavashelishvili, Tarkhnishvili, 2010], либо анализа небольшой выборки на основании короткого фрагмента [Çilingir et al., 2016], либо того, что единичные представители клад «Кавказ-1» и «Кавказ-2» выглядят как внешние «веточки» клады 3a [Salis et al., 2021; Segawa et al., 2021].
Мы показали, что в Западной и Южной Сибири бурые медведи несут не только гаплотипы клады 3a, но и гаплотипы клады 3b [Саломашкина и др., 2014]. Это показывает, что современная популяция бурых медведей Сибири сохраняет признаки анцестрального полиморфизма предковой популяции. Через несколько лет после публикации наших результатов данные о распространении клады 3b в Сибири, на Алтае, в Саянах и прилегающих горных системах, в том числе и среди ископаемых медведей, были подтверждены в публикациях на основании других выборок [Molodtseva et al., 2022; Salis et al., 2021; Tumendemberel et al., 2019].

Совокупность данных, опубликованных в работах [Tumendemberel et al., 2019], [Molodtseva et al., 2022], [Salis et al., 2021], и полученных в рамках данного исследования, показывает, что в южной части Сибири, на границе Монголии и России, представители клады 3b преобладают. Выявление на территории Сибири представителей разных субклад клады 3b (анцестральной 3b-Сибирь и «североамериканской» 3b-Сибирь-2) позволяет сформулировать сценарий расселения медведей из предковой популяции. Мы предполагаем, что клада 3b сформировалась на территории центральной Евразии, что подтверждают данные других исследователей [Salis et al., 2021], после чего расселялась на восток материка: на Дальний Восток, о. Хоккайдо и Берингию. Далее часть расселяющейся популяци продолжила движение через Берингийский мост в Северную Америку, а часть осталась в Евразии и вернулась в Сибирь.

По нашим данным, разделение предков клад 1 (Западная Европа и Турция) и 7 (Иран и Кавказ) произошло 191 [120-278] т.л.н., а MRCA современных представителей клады 7 существовал 86 [43-143] т.л.н. Мы предполагаем, что разделение клад 1 и 7 примерно соответствует времени, начиная с которого медведи обитали на территории Кавказа и Ближнего Востока непрерывно. Также, сопоставляя наши результаты с данными других исследователей, мы полагаем, что отделение клады 3b от узла 3a+«Кавказ-1»+«Кавказ-2» произошло в период 120-160 т.л.н. Дальнейшее расхождение клад 3a, «Кавказ-1» и «Кавказ-2» должно было случиться после отделения 3b, но до существования MRCA каждой из этих клад. MRCA клады 3a, если учитывать ее ископаемых представителей, определяется как 60-70 т.л.н.; MRCA клад «Кавказ-1» и «Кавказ-2» реконструируются в районе 70 и 50 т.л.н., соответственно. То есть, расхождение клад 3a, «Кавказ-1» и «Кавказ-2» должно было произойти в период 70-120 т.л.н., что включает микулинское межледниковье (117-128 т.л.н.) и последующее ранневалдайское оледенение (80-100 т.л.н.).

Полученные нами даты хорошо согласуются с данными других исследователей при датировке MRCA отдельных клад, а также для относительно «молодых» узлов, но по мере продвижения к корню филогенетического дерева полученные нами даты начинают отличаться в меньшую сторону от дат, полученных при анализе полного митогенома. Интересно расхождение в датах существования MRCA современных представителей клады 3b при анализе полного митогенома и фрагмента мтДНК длиной 1843 п.н.: 118 [93-144] т.л.н. [Molodtseva et al., 2022] и 66 [47-89] т.л.н. (данная работа), соответственно. Анализ более короткого фрагмента указывает на период прямо перед калининским оледенением (50-60 т.л.н.), а анализ полного митогенома – на период перед ранневалдайским оледенением (80-100 т.л.н.). Этот пример ярко показывает, что любая реконструкция истории формирования современной структуры вида в условиях недостаточности данных имеет довольно условный характер, и, хотя порядок событий реконструируется одинаково, конкретные датировки могут отличаться большой погрешностью.

ГЛАВА 5. ИЗМЕНЧИВОСТЬ Y-ХРОМОСОМНЫХ МАРКЕРОВ НА АРЕАЛЕ БУРОГО МЕДВЕДЯ РОССИИ (ФИЛОГЕОГРАФИЯ Y-ХРОМОСОМЫ)

5.1 Результаты

После определения пола в анализ отцовских линий бурого медведя было включено 73 самца (рис. 10). Все восемь использованных микросателлитных локусов Y-хромосомы оказались полиморфными. Для реконструкции отношений между гаплотипами была построена медианная сеть (рис. 11).

На структуре сети выделяются четыре гаплогруппы (номера I-IV). В отличие от достаточно консолидированных гаплогрупп I-III, гаплогруппа IV фактически является сборной и объединяет гаплотипы, которые не вошли в состав других гаплогрупп. Анализ генетических дистанций между особями методом главных координат подтвердил выделение гаплогрупп, определяемых на основании медианной сети гаплотипов.

Помимо анализа восьми Y-хромосомных STR мы использовали Y-хромосомный SNP Y-579.1B, имеющий две аллели - Y579-G и Y579-T. Распределение аллелей оказалось неравномерным: аллель Y579-T была выявлена у 51 особи из 73 исследованных, в то время как аллель Y579-G – у 22 особей (70 % и 30 % выборки, соответственно). Обращает на себя внимание тот факт, что все исследованные особи, определенные при анализе Y-хромосомных STR как принадлежащие к гаплогруппе II, несли более редкую аллель 579-G. Это подчёркивает общность происхождения отцовских линий гаплогруппы II.

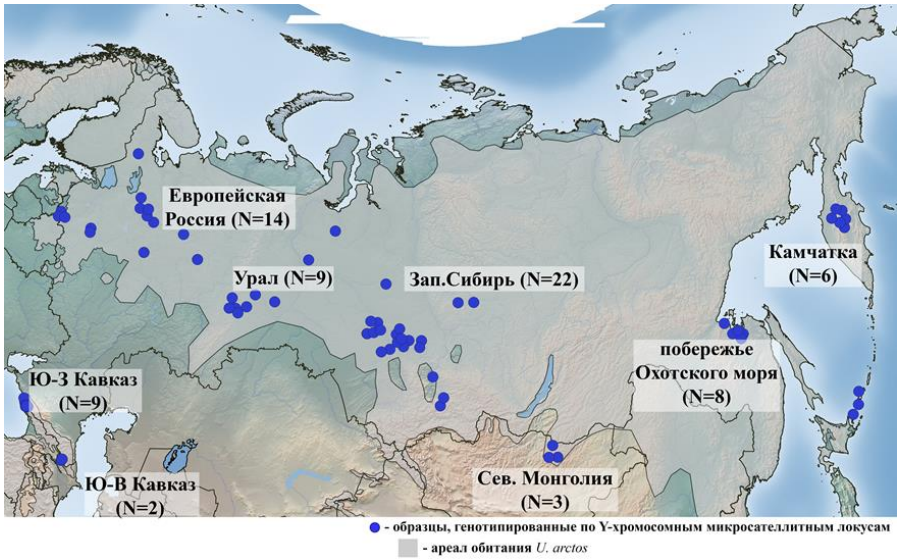


Рисунок 10. Карта мест сбора образцов бурого медведя *U. arctos*, включенных в анализ Y-хромосомных локусов.

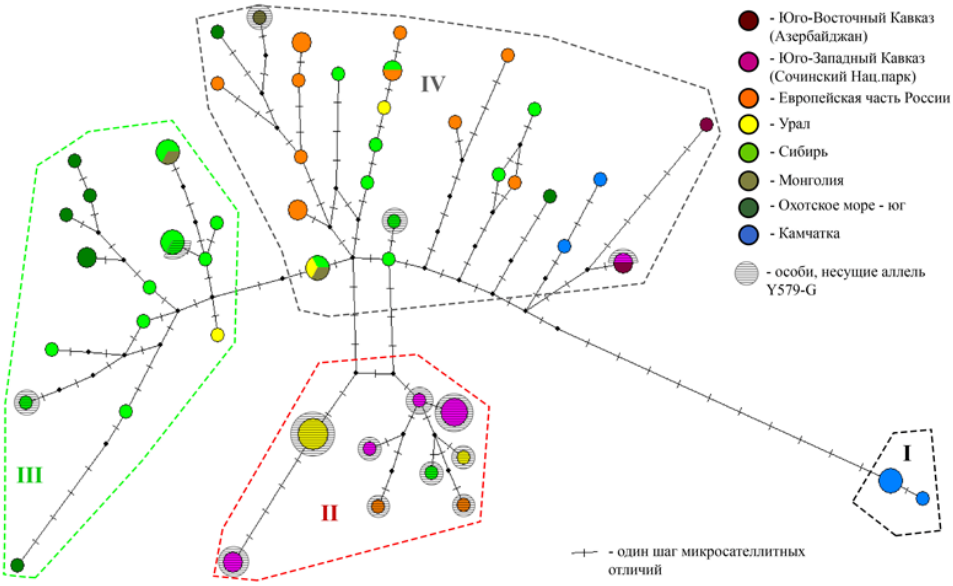


Рис. 11. Медианная сеть гаплотипов Y-хромосомных STR с отмеченными гаплогруппами и наложенными на сеть данными об аллелях особей по локусу Y579.1B.

Несмотря на то, что выявляемая при анализе Y-хромосомных маркеров филогеографическая структура менее четкая, чем при анализе мтДНК, все же можно отметить некоторые закономерности в географическом распределении выявленных отцовских линий (рис. 12). Гаплогруппа I представлена только особями с Камчатки. В гаплогруппе II доминируют особи с Юго-Западного Кавказа и Урала, суммарно составляя более 80% особей в гаплогруппе. В обоих регионах гаплогруппа II была доминирующей. В гаплогруппе III преобладали особи из Сибири и с побережья Охотского моря. При этом в выборке с побережья Охотского моря гаплогруппа III доминировала, в то время как в Сибири к ней принадлежало только около половины особей. В отличие от гаплогрупп I-III, представители гаплогруппы IV выявлены среди медведей изо всех исследованных локалитетов, что подчеркивает сборный характер этой гаплогруппы.

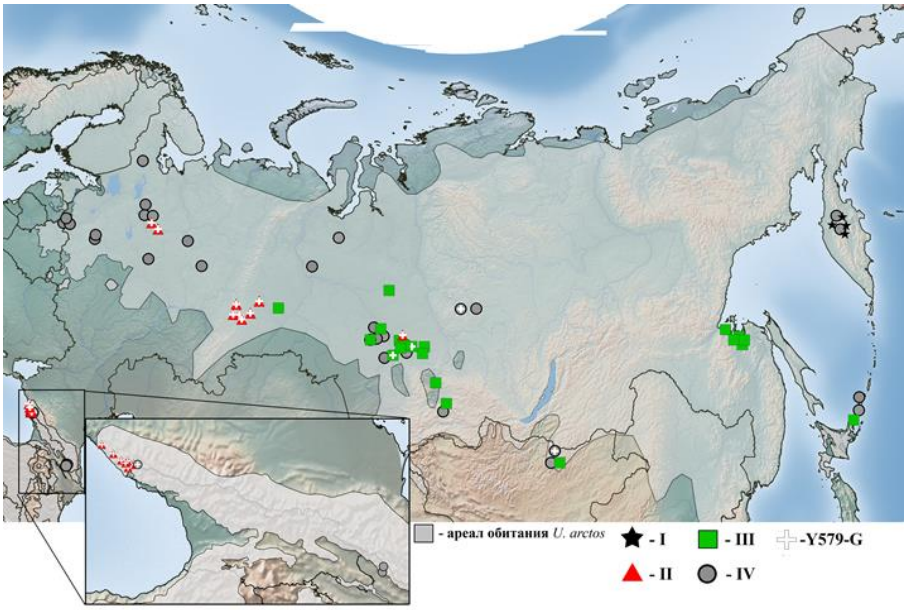


Рис. 12. Происхождение образцов бурого медведя, включенных в анализ Y-хромосомных генетических линий и отнесенных к различным гаплогруппам. Белым крестом внутри фигуры обозначены особи, несущие более редкую аллель Y579-G; особи без отметки несут аллель Y579-T.

5.2 Обсуждение

В настоящее время опубликовано три работы, посвященных разнообразию отцовских линий бурого медведя: [Bidon et al., 2014], [Hirata et al., 2017], [Schregel et al., 2015].

Структура выборки, использовавшейся в работах [Bidon et al., 2014] и [Hirata et al., 2017], сходна с нашей: относительно небольшое количество образцов из различных частей ареала, обеспечивающее глобальный охват, но слабое покрытие каждого региона в отдельности. В целом

в этих исследованиях авторам не удалось выявить структуру среди отцовских линий *U. arctos*, за исключением существенного отличия единичных особей с Камчатки и из других регионов и монофилии медведей Хоккайдо. Можно предположить, что уникальные отцовские линии медведей Камчатки, описанные этими авторами, соответствуют выявленной нами гаплогруппе I. Существование выраженных гаплогрупп в масштабе континентального ареала бурого медведя было показано только в нашей работе. Такой отличающийся результат может объясняться включением в настоящее исследование выборки медведей с Кавказа, а также увеличением числа образцов из Западной Сибири.

В работе [Schregel et al., 2015] анализировались образцы из одного ограниченного региона, поэтому сопоставление полученных в ней результатов с нашими данными не представляется возможным.

Наблюдаемое родство отцовских линий медведей Урала и Кавказа может объясняться миграцией самцов либо происхождением части медведей этих регионов из общего центра расселения. Гипотеза о миграции самцов между популяциями Урала и Кавказа в историческое время может иметь под собой основания: в начале XX века могла существовать связь между популяциями медведей Ирана и Сибири через систему горных хребтов на границе современных Казахстана и Китая, хотя северная оконечность этого «связующего коридора» соединяется с Западной Сибирью, а не Уралом. Однако также нельзя исключать и связь между древними центрами расселения, существовавшими на территории как Сибири, Алтая и Урала [Величко и др., 2009; Шпанский, Черноус, 2012], так и Кавказа [Верещагин, 1959]. Преобладание Y-хромосомной гаплогруппы III в более восточных частях ареала также может свидетельствовать о ее формировании в Алтае-Саянском рефугиуме и дальнейшем расселении из него.

Для сопоставления генетического разнообразия отцовских линий бурого медведя, выявленных в данной работе, и полученных другими исследователями, показатели разнообразия литературных выборок были рассчитаны на основании опубликованных длин микросателлитных локусов [Bidon et al., 2014; Hirata et al., 2017; Schregel et al., 2015]. Наиболее низкие значения продемонстрировали выборки медведей с о. Итуруп (среднее число попарных различий MPD 0,36 ± 0,37) и из Канады (MPD 0,75 ± 0,61), а наиболее высокий значения – выборки из Европейской части России (MPD 3,99 ± 2,12) и Западной Сибири (MPD 3,86 ± 2,01).

ГЛАВА 6. СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ МАРКЕРОВ

6.1 Сопоставление выявленных филогеографических паттернов

При сравнении внутривидовой структуры, выявленной на основании анализа различных генетических маркеров, наблюдаются некоторые сходные географические закономерности.

Все три использованных в данной работе молекулярных маркера указывают на своеобразие генетических линий медведей Кавказа. Генетическая обособленность медведей Кавказа согласно анализу аутосомных STR отражает современную изоляцию медведей от северных регионов. Уникальные линии мтДНК и отсутствие среди медведей Кавказа носителей континентальных материнских линий показывает древность происхождения и уникальную историю медведей Кавказа. Однако существование Y-хромосомной гаплогруппы, объединяющей медведей Кавказа и Урала, дополняет эту картину, указывая на возможность исторической связи популяции Кавказа с более северными частями ареала посредством исключительно или преимущественно миграции самцов.

Результаты анализа всех трех использованных генетических маркеров указывают на существование генетических различий между западной (Европейская часть России и Урал) и

восточной (Сибирь и Дальний Восток) частями непрерывного континентального ареала бурого медведя России. Для аутосомных STR это различие выражается в расположении границы Западного и Центрального генетических кластеров между Уралом и Сибирью; для мтДНК – в отсутствии на Урале и западнее представителей клады 3b; для Y-хромосомных STR – в резком увеличении на востоке доли особей, относящихся к гаплогруппе III. Недавняя работа, проведенная на независимой выборке бурых медведей Евразии, также показала существование ограничения потока генов в Зауралье [Jong de et al., 2023].

Фактором, вносящим вклад в отделение медведей, обитающих на Урале, от медведей, обитающих в Сибири, может быть различный уровень антропогенного влияния на среду обитания. Можно предполагать, что в наиболее восточных регионах страны, где плотность населенных пунктов и соединяющих их дорог минимальна, медведи имеют минимальные ограничения по передвижению и расселению. Однако антропогенный фактор мог оказывать наиболее существенное влияние только на протяжении последних сотен лет, и объясняет структуру быстро эволюционирующих аутосомных STR. В свою очередь, мтДНК эволюционирует достаточно медленно, и предполагается, что наблюдаемая структура отражает события, происходившие десятки или сотни тысяч лет назад.

Другим фактором может быть неравномерная пригодность среды для обитания медведей. В нашем исследовании представлены медведи с Урала (самый восточный образец с координатой 68,9° восточной долготы (ВД), все остальные расположены на 58,2° ВД и западнее) и из Сибири (77,3° ВД и восточнее). В зоне между 68,9° и 77,3° ВД, не представленной в данной работе, проходит русло реки Обь и располагается Обская низменность, известная болотистыми биотопами и труднопроходимостью, что может вносить вклад в ограничение расселения бурого медведя через этот регион, создавая проницаемый барьер. Также известно, что во времена ранневалдайского и калининского оледенений, а также последнего ледникового максимума в районе нынешнего русла Оби располагались ледниковые озера и стоки ледниковых рек [Mangerud, 2004], разделявшие зверей этих регионов. Существование филогеографического разрыва в районе русла реки Обь представляется интересным, но требует дальнейших исследований.

Генетические линии медведей Камчатки демонстрируют сходный паттерн изменчивости отцовских и материнских маркеров: в обоих случаях часть особей несет генетические линии, близкие к распространенным на материковой части ареала, а другая часть – линии, отличающиеся от материковых. Можно предполагать, что наблюдаемые параллели в структуре генетической изменчивости Y-хромосомных маркеров и мтДНК являются отражением одних и тех же событий. Выделение камчатских и материковых линий для мтДНК и Y-хромосомных маркеров не противоречит отсутствию значительных отличий медведей Камчатки от медведей континента согласно аутосомным STR. Поскольку ни мтДНК, ни Y-хромосома не рекомбинируют, разные, даже сильно отличающиеся, генетические линии могут существовать в единой популяции, не размываясь и не смешиваясь между собой. Аутосомные STR в силу рекомбинации и бипарентального типа наследования более чувствительны к существованию потока генов. Отсутствие разделения между медведями полуострова и континента согласно анализу аутосомных локусов может показывать, что существующего миграционного потока достаточно, чтобы обеспечить генетическую общность и закрепление в популяции медведей Камчатки материковых линий мтДНК и Y-хромосомы, внесенных мигрантами.

6.2 Сопоставление уровней генетического разнообразия медведей разных регионов

Показатели гетерозиготности аутосомных STR у медведей из различных регионов России различаются незначительно, демонстрируя высокий для *U. arctos* уровень. Разнообразие Y-хромосомных STR также мало отличается для медведей из различных регионов. Единственным исключением можно назвать Камчатку, медведи которой имеют несколько пониженное разнообразие отцовских линий. Уровень гаплотипического разнообразия мтДНК понижен у медведей Европейской России, Урала, а также Чукотки и Северной Монголии. Уровень нуклеотидного разнообразия мтДНК также демонстрирует резкое снижение в этих регионах, за исключением Монголии, где совместно обитают представители клад 3a и 3b. Примечательно, что медведи Европейской России, Урала и Чукотки демонстрируют снижение уровня разнообразия только мтДНК, но не Y-хромосомных и не аутосомных STR. Можно предположить, что поддержание разнообразия аутосомных и Y-хромосомных маркеров осуществляется за счет расселения самцов, в то время как ассоциированные с более филопатричными самками материнские линии все еще несут следы недавнего формирования популяций Европейской России, Урала и Чукотки. Медведи Кавказа имеют высокое разнообразие отцовских и материнских линий, а также среднее число аллелей на локус по аутосомным STR, но сниженную гетерозиготность, что указывает на сохранившиеся следы древности происхождения в совокупности с относительно небольшой современной численностью.

6.3 Сопоставление подвидовой и генетической структуры бурого медведя

При сопоставлении полученных нами и приведенных в литературе данных с подвидовым делением бурого медведя [Hall, 1984; Rausch, 1963; Барышников, 2007; Гептнер и др., 1967; Чернявский, Кречмар, 2001] было показано, что изменчивость аутосомных STR может соответствовать выделяемым подвидам в случаях, когда их обособление вызвано пространственной изоляцией. Данные митохондриальной ДНК в большинстве случаев не отражают современного состояния популяций и плохо соотносятся с подвидовым делением, ввиду чего могут быть использованы при обсуждении подвидового статуса только с большой осторожностью. Во многом это объясняется сложной историей формирования современной филогеографической структуры. Анализ Y-хромосомных маркеров для бурого медведя в целом затруднителен, поскольку еще не наработано достаточного массива данных для более уверенной интерпретации получаемых результатов.

Совокупность имеющихся на настоящий момент данных показывает, что ни один из используемых генетических маркеров не является подходящим для использования в качестве значимого аргумента при выделении подвидов в составе вида *Ursus arctos*. Результаты генетического анализа могут служить только дополнительным указанием на существование в том или ином регионе изолированных и самостоятельно поддерживающихся групп особей, либо на древность происхождения популяции, однако не дают указаний на то, может ли та или иная группа иметь подвидовой статус.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная филогеографическая структура бурого медведя Евразии формировалась в течение последних 150-300 тыс. лет. Можно предположить, что основной центр расселения бурого медведя на территории современной России находился в Южной Сибири. Можно предположить, что состав материнских линий популяции, населявшей ранее территорию Сибири, был гораздо богаче, чем сейчас.

Представители митохондриальных клад, преобладающих сейчас на Кавказе, появляются в этом регионе около 50 т.л.н. Кавказский регион являлся стацией переживания для бурого медведя на протяжении десятков тысяч лет, однако у нас нет оснований предполагать, что он

служил источником или реципиентом при относительно недавнем формировании современной популяции медведей Европы.

Современные бурые медведи материковой популяции Евразии демонстрируют существование ограничения для потока генов в широтном направлении между Уралом и Сибирью. Такое ограничение сейчас может быть результатом антропогенной трансформации среды, а в прошлом могло существовать из-за климатических особенностей региона и расположения в нем перигляциальных водных систем.

Нам удалось выявить филогеографическую структуру отцовских линий для бурого медведя. Полученные результаты показывают, что, хотя анализ Y-хромосомных данных и их интерпретация сложнее, чем для более разработанных генетических маркеров (мтДНК и аутосомных STR), использование этих маркеров может быть перспективным для реконструкции истории вида.

Выявленные особенности генетической структуры бурого медведя слабо соответствуют подвидовому подразделению. Наибольшее сходство между подвидовой и генетической структурой наблюдается при использовании наиболее вариабельных аутосомных локусов.

Перспективы дальнейшей разработки темы. Бурый медведь продолжает оставаться перспективным видом для исследования с точки зрения филогеографии и генетических характеристик. Большой интерес представляют исследования медведей, обитающих на северном склоне Большого Кавказского хребта; интересными могут быть также данные о филогеографической структуре медведей Кавказа в исторический период, до сокращения ареала XX века. По-прежнему актуальны данные о медведях таких регионов как Якутия, север Красноярского края, Средняя Азия. Отдельный интерес представляет вопрос о влиянии на поток генов реки Енисей, которую ранее предлагали в качестве возможной границы подвидов.

ВЫВОДЫ

1. На основании анализа 10 аутосомных микросателлитных локусов среди бурых медведей России и сопредельных стран выявлена генетическая структура иерархического типа, состоящая из региональных кластеров нескольких уровней. Отдельно выделяется кластер Кавказской популяции. Генотипы медведей обширной протяженной части материкового ареала Евразии разделяются на Западный (Европейская Россия и Урал), Центральный (Западная Сибирь) и Восточный (Северная Монголия, Дальний Восток, Чукотка, Камчатка) кластеры. Разделение этих кластеров в значительной степени определяется изоляцией расстоянием.

2. На территории Кавказа описана сложная структура материнских линий, выявлены три гаплогруппы мтДНК: одна («Кавказ-3») относится к общемировой кладе 7 (Иранская клада), две другие («Кавказ-1» и «Кавказ-2») описаны впервые.

3. Для образцов из Сибири (Томская область, Хакасия, Красноярский край) впервые были описаны гаплотипы мтДНК, принадлежащие к общемировой кладе 3b, распространенной на о. Хоккайдо и в Северной Америке. В составе клады 3b гаплотипы из Сибири занимают базальное положение, что указывает на их древность и близость к анцестральному типу.

4. Анализ филогеографической структуры мтДНК позволил предложить сценарий расселения бурого медведя по территории Евразии. Предполагается быстрое расселение по материку, разделившее предков клад 3a, 3b, «Кавказ-1» и «Кавказ-2». При этом часть предковой популяции клады 3b, обитавшей в Сибири, расселилась восточнее: на Дальний Восток, о.

Хоккайдо и в Америку; в дальнейшем американская ветвь дифференцировалась на две группы, и медведи с гаплотипами одной из них мигрировали обратно в Сибирь.

5. На основании анализа восьми микросателлитных локусов и SNP, расположенных на Y-хромосоме, впервые для бурого медведя выявлена внутривидовая структура отцовских линий. В качестве отдельных гаплогрупп выделяются гаплотипы с Камчатки (группа I), из Сибири и Дальнего Востока (группа II), и гаплотипы с Урала и Кавказа, объединяющиеся в гаплогруппу III. Представители слабо организованной гаплогруппы IV встречаются во всех исследованных частях ареала.

6. Анализ полиморфизма аутосомных микросателлитных локусов для медведей всех исследованных регионов выявил высокий уровень гетерозиготности (He), ассоциирующийся с благополучным состоянием современных популяций. Звери Европейской части России и Урала характеризуются высоким разнообразием аутосомных микросателлитов и наиболее низким разнообразием мтДНК среди исследованных нами популяций, что свидетельствует об относительно недавнем заселении медведями этой территории.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах из перечня ВАК:

1. **Саломашкина В. В.** Новые данные о филогеографии и генетическом разнообразии бурого медведя *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 Северо-восточной Евразии (анализ полиморфизма контрольного региона мтДНК) / В. В. Саломашкина, М. В. Холодова, О. Ю. Тютеньков, Н. С. Москвитина, Н. Г. Ерохин // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2014b. – Т. 2014. – № 1. – С. 30-39.
2. **Саломашкина В. В.** Генетическая изменчивость бурого медведя (*Ursus arctos* L., 1758) / В. В. Саломашкина, М. В. Холодова, У. А. Семенов, А. С. Мурадов, А. Малхасян // Генетика. – 2016. – Т. 52. – № 12. – С. 1437-1447.
3. Babiy U. V. First evidence of a brown bear on Wrangel Island, Russia / U. V. Babiy, **V. V. Salomashkina,** P. S. Kulemeev, M. V. Kholodova, A. R. Gruzdev, E. V. Regehr // Ursus. – 2022. – Vol. 2022. – № 33e4.
4. Molodtseva A. S. Phylogeography of ancient and modern brown bears from eastern Eurasia / A. S. Molodtseva, A. I. Makunin, **V. V. Salomashkina**, I. G. Kichigin, N. V. Vorobieva, S. K. Vasiliev, M. V. Shunkov, A. A. Tishkin, S. P. Grushin, P. Anijalg, E. Tammeleht, M. Keis, G. G. Boeskorov, N. Mamaev, I. M. Okhlopkov, A. P. Kryukov, E. A. Lyapunova, M. V. Kholodova, I. V. Seryodkin, U. Saarma, V. A. Trifonov, A. S. Graphodatsky // Biological Journal of the Linnean Society. – 2022. – Vol. 135. – № 4. – P. 722-733.

Глава в коллективной монографии:

1. Kitchener A. C. Systematics, Evolution, and Genetics of Bears / A. C. Kitchener, E. Bellemain, X. Ding, A. Kopatz, V. E. Kutschera, **V. Salomashkina**, M. Ruiz-García, T. Graves, Y. Hou, L. Werdelin, A. Janke // Bears of the World / V. Penteriani, M. Melletti ред. . – Cambridge University Press, 2020. – С. 3-20.

Публикации в сборниках тезисов научных конференций:

1. Холодова М. В. Новые данные о генетическом разнообразии бурых медведей (*Ursus arctos* L., 1758) Кавказа: полиморфизм контрольного региона митохондриальной ДНК / М. В. Холодова, У. А. Семенов, **В. В. Саломашкина** // Материалы Международной научной конференции «Биологическое разнообразие и проблемы охраны фауны Кавказа». – Ереван, Армения, 2011. – С. 327-331.
2. **Саломашкина В. В.** Новые сведения о полиморфизме митохондриальной ДНК бурого медведя северо-восточной Евразии / В. В. Саломашкина // Пятая конференция «Актуальные

проблемы экологии и эволюции в исследованиях молодых ученых. Тезисы конференции молодых сотрудников и аспирантов ИПЭЭ РАН». – Москва, Россия, 2012. – С. 44.

3. **Саломашкина В. В.** Анализ изменчивости контрольного региона мтДНК бурых медведей Сибири: предварительные результаты / В. В. Саломашкина, О. Ю. Тютеньков, Н. С. Москвитина, М. В. Холодова // «Генетика животных и растений – фундаментальные проблемы и современные экспериментальные подходы» в рамках Фестиваля науки». – Томск, Россия, 2012. – С. 99-102.
4. **Саломашкина В. В.** Генетические характеристики бурого медведя Европейской части России в сравнении с сородичами из других частей ареала / В. В. Саломашкина // Тезисы докладов VI Международного симпозиума «Динамика популяций охотничьих животных Северной Европы. – п. Киркколахти, Россия, 2014. – С. 158.
5. **Саломашкина В. В.** Бурый медведь Кавказа и Закавказья: генетические особенности и следы исторического формирования популяции / В. В. Саломашкина, М. В. Холодова, У. А. Семенов, А. С. Мурадов // Материалы международной научной конференции «Биологическое разнообразие и проблемы охраны фауны Кавказа – 2». – Ереван, Армения, 2014. – С. 329-333.
6. **Salomashkina V. V.** New data on the genetic diversity of the brown bear (*Ursus arctos* L., 1758) of the Caucasus, based on the control region and 6 microsatellite loci polymorphism / V. V. Salomashkina, M. V. Kholodova, U. Semenov, A. Muradov // Fundamental and applied research in biology: abstracts of the IIIrd International conference of young scientists. – Donetsk, Ukraine, 2014. – P. 69.
7. **Саломашкина В. В.** Соотношение между подвидовой структурой и генетической изменчивостью бурого медведя (*Ursus arctos* L., 1758) / В. В. Саломашкина, М. В. Холодова // Материалы конференции «Структура вида у млекопитающих». – Москва, Россия, 2015. – С. 73.
8. **Саломашкина В. В.** Генетическая структура бурого медведя (*Ursus arctos* L., 1758) Кавказа и Закавказья на основании анализа митохондриальных и ядерных маркеров / В. В. Саломашкина, М. В. Холодова, У. А. Семенов, А. С. Мурадов, А. Малхасян // Материалы международного совещания «Териофауна России и сопредельных территорий» (X Съезд Териологического общества при РАН). – Москва, Россия, 2016. – С. 159.
9. **Salomashkina V. V.** Genetic characterization of the brown bear (*Ursus arctos*) of the Caucasus (mtDNA and 8 microsatellite loci) / V. V. Salomashkina, M. V. Kholodova, U. Semenov, A. Muradov, A. Malkhasyan // 24th International conference on bear research and management. – Anchorage, USA, 2016. – P. 130.
10. **Саломашкина В. В.** Генетическая структура и разнообразие бурого медведя Евразии на основании анализа полиморфизма микросателлитных локусов / В. В. Саломашкина, М. В. Холодова // Генетика популяций: прогресс и перспективы. – Звенигородская биологическая станция, Россия, 2017. – С. 248-249.
11. **Salomashkina V. V.** Caucasian brown bear genetics reveals complicated structure and history of the population / V. V. Salomashkina, M. V. Kholodova, U. Semenov, A. Muradov, A. Malkhasyan // 11th International Conference on Behaviour, Physiology and Genetics of Wildlife. – Berlin, Germany, 2017. – P. 115.
12. Druzhkova A. S. The phylogeographical history of the brown bear (*Ursus arctos* Linnaeus) in northeast Eurasia / A. S. Druzhkova, A. I. Makunin, I. G. Kichigin, N. V. Vorobieva, S. K. Vasiliev, M. V. Shunkov, A. A. Tishkin, S. P. Grushin, P. Anijalg, E. Tammeleht, M. Keis, G. G. Boeskorov, N. Mamaev, I. Okhlopkov, A. P. Kryukov, E. A. Lyapunova, M. V. Kholodova, **V. V. Salomashkina**, I. V. Seryodkin, U. Saarma, V. A. Trifonov, A. S. Graphodatsky // Материалы международной конференции Хромосома, 2018. – Новосибирск, Россия, 2018. – P. 18-19.
13. Sitnikova E. F. Genetic status and structure of brown bears in the Bryansk region / E. F. Sitnikova, **V. V. Salomashkina** // 26th International conference on Bear Research and Management. – Ljubljana, Slovenia, 2018. – P. 184.

14. **Саломашкина В. В.** Опыт применения Y-хромосомных маркеров для выявления филогеографической структуры бурого медведя (*Ursus arctos*) / В. В. Саломашкина, М. В. Холодова // В сборнике: Млекопитающие России: фаунистика и вопросы териогеографии. – Ростов-на-Дону, Россия, 2019. – С. 243-246.