

УДК 575.8:599.742.2

## ИЗМЕНЧИВОСТЬ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНА ЦИТОХРОМА *b* БУРОГО МЕДВЕДЯ (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) ЮГА ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА РОССИИ

© 2013 г. В. Ю. Гуськов<sup>1</sup>, И. Н. Шереметьева<sup>1</sup>, И. В. Середкин<sup>2</sup>, А. П. Крюков<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Биолого-почвенный институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток 690022  
e-mail: valguskov@gmail.com

<sup>2</sup> Тихоокеанский институт географии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток 690041  
Поступила в редакцию 12.03.2013 г.

Впервые изучена генетическая изменчивость бурого медведя *Ursus arctos* юга Дальнего Востока России на основании последовательностей гена цитохрома *b* митохондриальной ДНК. В результате выявлено наличие двух филогенетических групп гаплотипов, описанных ранее для других частей ареала. Часть образцов принадлежит к распространенной по всему ареалу группе гаплотипов, а часть относится к редкой, ранее известной только для Японии и Аляски. Данная находка частично проясняет картину расселения бурого медведя на территории Дальнего Востока России и Японии.

DOI: 10.7868/S0016675813110076

Бурый медведь (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) – голарктический полиморфный вид с широким непрерывным ареалом обитания, протянувшимся от Европы через Азию в Северную Америку. Исторически сформированные многочисленные географические расы медведей [1] характеризуются различной морфологической и экологической специализацией. Бурый медведь служит важным объектом молекулярно-генетических (в том числе филогеографических) исследований и моделью для построения сценариев формирования ареалов животных в Четвертичном периоде.

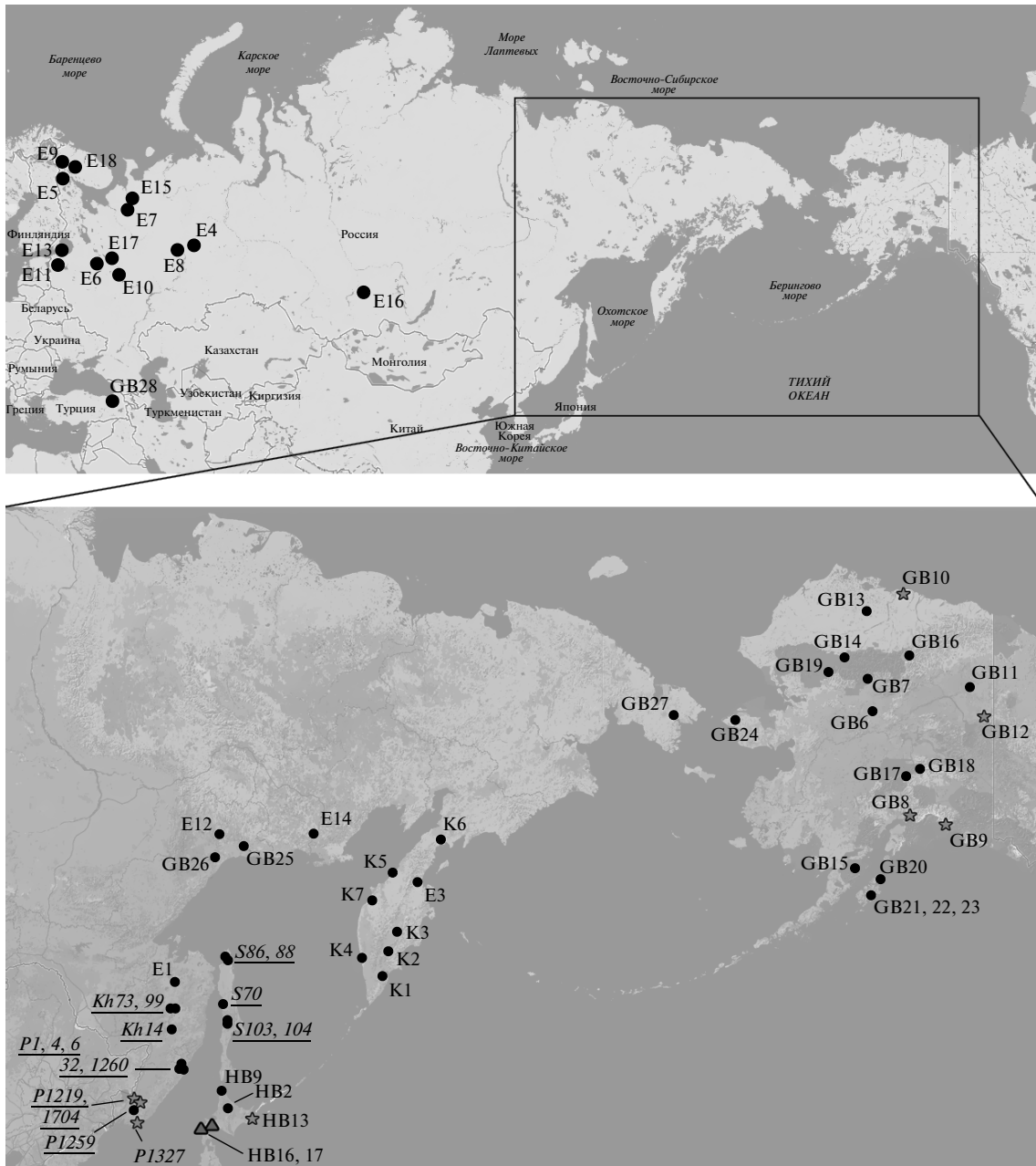
Исследования митохондриальной ДНК (мтДНК) современных популяций бурого медведя позволили выделить на филогенетических реконструкциях некоторое (от 4 до 6) число кластеров и подкластеров [2–11]. Эти кластеры соответствуют двум географическим группам: “западной” и “восточной”, каждая из которых распространена на обширной территории. Используя терминологию, предложенную Leonard et al. [12] и расширенную Miller et al. [10], “восточную” линию медведей делят на следующие подкластеры: За, являющийся основным на большей части ареала, включает медведей из европейской части России, Дальнего Востока (Хабаровский край, побережье Охотского моря, Камчатка, Чукотский п-ов), Японии (центральная часть о. Хоккайдо) и Аляски; гаплотипы подкластера 3b редки и встречаются только на восточной части о. Хоккайдо и на востоке Аляски; в подкластер 4 входят медведи только из юго-западной части о. Хоккайдо и Канады [11, 13].

Изучение генетических особенностей современных популяций бурого медведя выявило присутствие на о. Хоккайдо трех аллопатрических групп, каждая из которых характеризуется специфическим набором гаплотипов митохондриальной ДНК [6, 8, 9, 14, 15]. В то же время ближайшие к Хоккайдо территории Приморского края, Сахалина и Курильских островов остаются не обследованными в генетическом аспекте. Поэтому строить гипотезы об историческом распространении бурого медведя на данной территории не представляется возможным. Исследование этого региона могло бы прояснить многие вопросы, связанные в том числе и с путями заселения бурым медведем Сахалина, Курильских островов и Хоккайдо.

Целью данной работы является изучение молекулярно-генетической изменчивости бурого медведя юга Дальнего Востока России.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовано 17 образцов тканей бурого медведя *U. arctos* из Приморского и Хабаровского краев и из Сахалинской области. Приморский край (Р): Тернейский район – 5 экз., Чугуевский район – 3 экз., Лазовский район – 1 экз. Хабаровский край (Kh): Комсомольский район – 2 экз., район им. Лаза – 1 экз. Сахалинская область (S): Охинский район – 2 экз., Смирныховский район – 2 экз., Александровск-Сахалинский район – 1 экз. (в скобках здесь приведены коды локалитетов; рис. 1).



**Рис. 1.** Карта локализации исследованных образцов бурого медведя на территории Европейской России, Дальнего Востока и Аляски. Собственные образцы отмечены курсивом и подчеркнуты. Точкой отмечены гаплотипы подкластера 3а, звездочкой – подкластера 3б, треугольником – подкластера 4.

Выделение ДНК осуществляли с использованием стандартного метода экстракции фенол-хлороформом [16] из свежих или фиксированных 95%-ным спиртом тканей мышц. Фрагменты гена цитохрома *b* были амплифицированы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием двух пар праймеров: прямого UB1F и обратного UB1R для первого фрагмента и прямого UB2F и обратного UB2R для второго фрагмента [11]. Амплификацию проводили на приборе UNOII – Thermoblock (“Biometra”, Германия) в

25 мкл реакционной смеси, включавшей 1–2 мкг тотальной ДНК, 2.5 мкл 10× буфера, 1 мкл 20 мМ смеси dNTPs, 0.5 мкл каждого праймера, 3 ед. *Taq*-полимеразы (“СибЭнзим”, Новосибирск) и деионизированную воду. ПЦР-реакцию проводили по следующей схеме: начальная денатурация ДНК (94°C – 120 с), 35 циклов амплификации (94°C – 10 с, 56°C – 10 с, 72°C – 60 с) и достройка цепей (72°C – 420 с). Продукты амплификации подвергали циклическому секвенированию с помощью набора Big Dye Terminator версия 3.1 (“Ар-

plied Biosystems”, США) при следующих условиях: начальная денатурация ДНК (96°C – 60 с), 25 циклов амплификации (96°C – 30 с, 50°C – 10 с, 60°C – 240 с). Последовательности нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе ABI Prizm 3130 (“Applied Biosystems”, США) Биологического почвенного института ДВО РАН (Владивосток).

Редактирование и выравнивание полученных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit 7.0.9.0 [17]. Помимо собственных данных в работе использованы все последовательности гомологичного участка гена цитохрома *b* мтДНК бурого медведя с Дальнего Востока, Японии, Аляски и европейской части России, хранящиеся в базе данных GenBank/NCBI под номерами AB020905–AB020909 (HB); UAU18875–UAU18897 (GB); EU567097–EU567120 (E, K) [5, 8, 11] (рис. 1), – всего 69 последовательностей. Коды локалитетов в скобках даны по первоисточникам. При построении филогенетических деревьев в качестве внешней группы были использованы последовательности гомологичного участка мтДНК гималайского медведя *Ursus thibetanus* G. Cuvier, 1823, хранящиеся в базе данных GenBank/NCBI под номером FM177759 [18].

Филогенетические реконструкции были выполнены с использованием следующих методических подходов: “ближайшего соседа” (NJ), “максимального правдоподобия” (ML) и “максимальной экономии” (MP). Деревья построены и расчеты проведены с помощью программы MEGA 5.1 [19]. Устойчивость кластеризации оценивалась с помощью бутстреп-анализа при 1000 повторностей. Гаплотипическое (*h*) и нуклеотидное ( $\pi$ ) разнообразие рассчитывали по программам DnaSP 5.10.01 [20] и ProSeq 2.9.1 [21].

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Впервые для 17 экземпляров бурого медведя юга Дальнего Востока были получены полные нуклеотидные последовательности гена цитохрома *b* мтДНК длиной 1140 пн. Они содержали 14 переменных сайтов (1.2%), среди которых восемь были информативны. Всего обнаружено семь различных гаплотипов, шесть из которых в данной выборке уникальны (номера S70, S104, Kh73, P1219, P1327 и P1704). Они внесены в GenBank ENA под номерами HG008039–HG008044.

Для построения филогенетических реконструкций выбрана двухпараметрическая модель Кимуры (K2P) с учетом и транзиций, и трансверсий и независимо от позиции нуклеотида, которая в нашем случае показала наибольшую бутстреп-поддержку на NJ-дереве. Реконструкции филогенетических отношений между гаплотипами исследованных бурых медведей, построенные

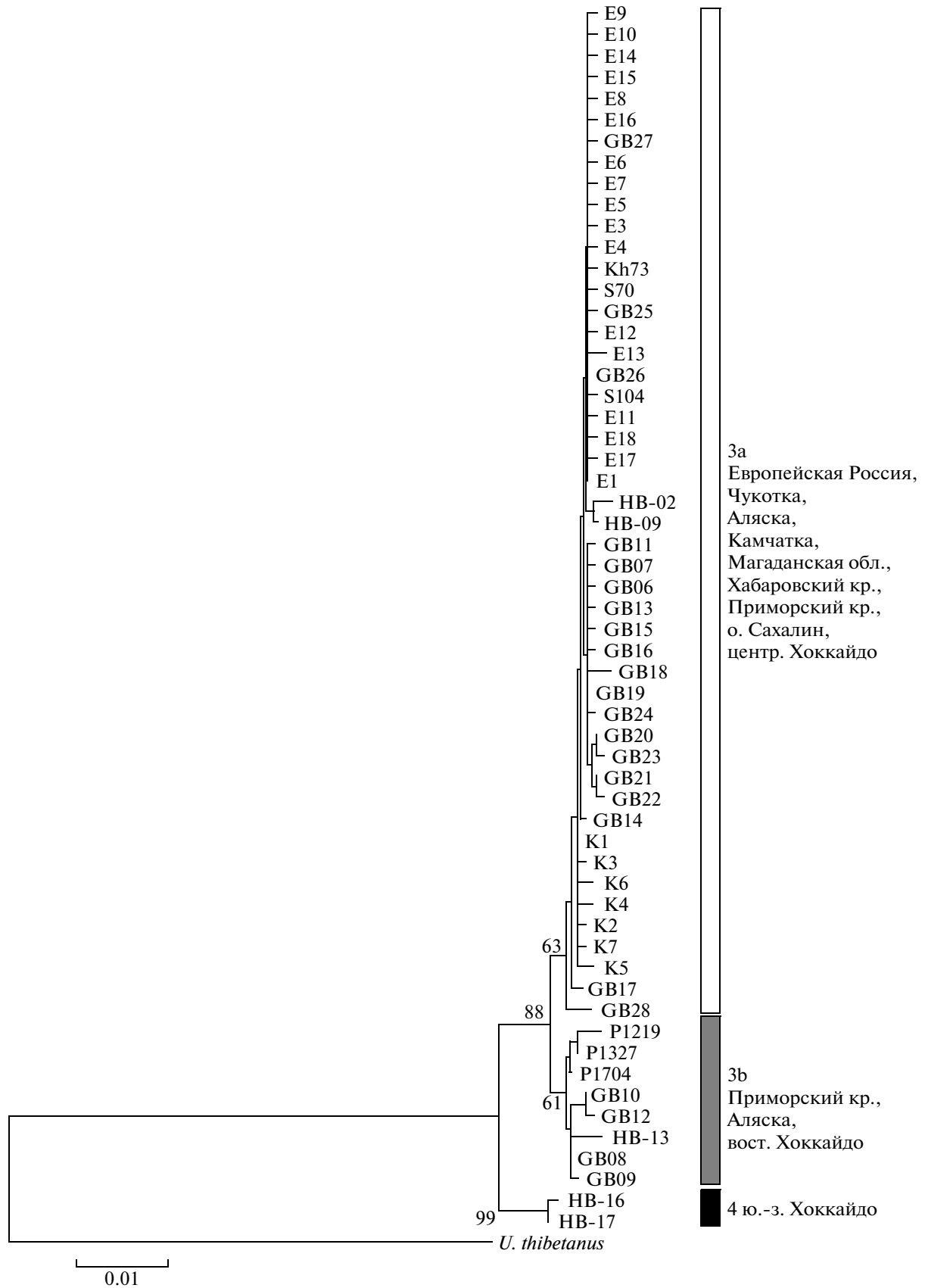
различными методами (NJ, ML, MP), привели к идентичной топологии дерева (рис. 2). Все последовательности разделились на три группы, соответствующие кластерам, описанным у Korsten et al. [11]. Последовательности гена цитохрома *b* бурого медведя юга Дальнего Востока разошлись по двум группам: номера P1219, P1327 и P1704 из Приморья попали в редкую группу, обнаруженную только на о. Хоккайдо и Аляске. Все остальные, в том числе последовательности пяти образцов бурого медведя с о. Сахалин, вошли в основную, распространенную на большей части ареала группу 3а (см. рис. 1 и 2). Последовательности с номерами образцов P1, P4, P6, P32, P1259, P1260, Kh14, Kh99, S86, S88 и S103 были идентичны основному гаплотипу E1, описанному у Korsten et al. [11].

Гаплотипическое разнообразие медведей юга Дальнего Востока несколько ниже, чем для вида в целом ( $0.596 \pm 0.139$  против  $0.832 \pm 0.017$  соответственно) [11], а нуклеотидное разнообразие в обеих выборках сходно ( $0.0027$  и  $0.0023$ ). Генетическая *p*-дистанция между двумя группами, в которые вошли исследованные нами последовательности, составила  $0.0078 \pm 0.0023$ .

## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа изменчивости последовательностей гена цитохрома *b* бурого медведя, обитающего на юге Дальнего Востока России, нами выявлено наличие двух генетических групп (см. рис. 1, 2). Эти группы соотносятся с описанными ранее линиями А и В с о. Хоккайдо [6, 8, 9, 14, 15] и двумя подкластерами – основным 3а и редким 3б, описанными Korsten et al. [11]. Основная часть обнаруженных нами гаплотипов относится к линии А или подкластеру 3а [8, 9, 11]. При этом большинство экземпляров бурого медведя имеют одинаковый гаплотип, описанный ранее как основной для большей части ареала (E1). Гаплотипы остальных особей из группы 3а отличались всего на одну замену. Снижение гаплотипического разнообразия в дальневосточной выборке можно объяснить прежде всего ее небольшим объемом.

Факт наличия небольшого числа слабо различающихся гаплотипов на обширной территории, наряду с низким нуклеотидным и высоким гаплотипическим разнообразием для вида в целом, может указывать на то, что бурый медведь в результате последнего этапа своей истории испытывал серьезные снижения численности с последующим быстрым расселением по территории современного ареала. Это подтверждено рядом популяционно-демографических статистик на основании анализа протяженного участка митохондриального генома [11]. На основании комбинации Баессового анализа с датированными радиоуглеродным мето-



дом последовательностями и фоссильными калибровками время дивергенции между бурым и пещерным медведями (MRCA) оценено в 1350 тыс. лет [11]. Время дивергенции внутри основных исследованных ранее линий бурого медведя, определенное аналогичным путем, колеблется от 193 тыс. до 33 тыс. лет [11], что отражает относительно недавние демографические события в его пределах.

Ранее в исследованиях по филогеографии бурого медведя указывалось, что некоторые особи из удаленных локалитетов филогенетически ближе друг другу, чем особи из одного региона [9]. В упомянутой работе отмечено, что родство медведей Аляски и Японии может указывать на их миграцию из Евразии через Берингов мост на Аляску. При этом часть животных из этой линии могли мигрировать через Сахалин на Хоккайдо. На основании присутствия на Хоккайдо трех генетических групп Matsuhashi et al. [9] предположили, что заселение происходило тремя волнами и каждый раз через Сахалин.

В результате нашего анализа на Сахалине были обнаружены особи только с гаплотипами кластера 3a, известного с центрального Хоккайдо, что может подтвердить пока лишь последнюю волну вселения медведя на Хоккайдо через этот остров. Мы не нашли на Сахалине гаплотипов кластера 3b, что можно объяснить скорее малой выборкой с этого острова, чем исчезновением их из значительной по размерам островной популяции по случайным причинам, таким как дрейф генов. Нельзя исключать и возможность вселения бурого медведя на Японские острова через мост, соединявший их с корейским полуостровом. Так, по данным палеонтологов, по крайней мере 17 тыс. лет назад этот вид обитал на о. Хонсю [22].

Для Приморского края мы обнаружили три уникальных гаплотипа, при этом они относятся к линии В с востока острова Хоккайдо [6, 8, 9, 14, 15] или подкластеру 3b с Хоккайдо и Вост. Аляски [11]. На материковой части Евразии данный тип гаплотипов отмечен впервые. Таким образом, в настоящее время на материковой части юга Дальнего Востока России (в Приморском крае) выявлено наличие двух дивергировавших генетических линий бурого медведя. Важно отметить, что редкие гаплотипы бурого медведя встречаются не только в Приморском крае, но также недавно зафиксированы и предварительно описаны на основании гипервариабельного участка контрольного региона мтДНК у особей с территории Томской области [23].

Наличие таких разных линий предполагает их становление в нескольких рефугиумах, обеспечивших географическую изоляцию, с последующим расселением. В целом логично предположить, что носители редкого ныне гаплотипа распространились на восток до Северной Америки и сохранились на дальневосточных окраинах ареала (Приморский край и Хоккайдо) и местами в его центре (например, в Западной Сибири), так как были вытеснены особями с основным гаплотипом (группы 3a), распространенным на сегодняшний день на большей части ареала. Дальнейший анализ генетических особенностей медведей Приморья, Сахалина, Курильских островов, а также побережья Охотского моря может дать более полную картину заселения ими восточной Евразии.

Работа выполнена при поддержке грантов ДВО РАН № 12-1-П6-02 и 12-1-ОБН-01.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников Г.Ф. Медвежьи (Carnivora, Ursidae). СПб.: Наука, 2007. 541 с.
2. Randi E., Gentile L., Boscagli G. et al. Mitochondrial DNA sequence divergence among some west European brown bear (*Ursus arctos* L.) populations: lessons for conservation // Heredity. 1994. V. 73. P. 480–489.
3. Taberlet P., Bouvet J. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe // Proc. R. Soc. B: Biol. Sci. 1994. V. 255. P. 195–200.
4. Kohn M., Knauer F., Stoffella A. et al. Conservation genetics of the European brown bear – a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences // Mol. Ecol. 1995. V. 4. P. 95–103.
5. Talbot S.L., Shields G.F. Phylogeography of brown bears (*Ursus arctos*) of Alaska and parapatry within the Ursidae // Mol. Phyl. Evol. 1996. V. 5. P. 477–494.
6. Masuda R., Murata K., Aiurzaniin A., Yoshida M.C. Phylogenetic status of brown bears *Ursus arctos* of Asia: a preliminary result inferred from mitochondrial DNA control region sequences // Hereditas. 1998. V. 128. P. 277–280.
7. Waits L.P., Talbot S.L., Ward R.H., Shields G.F. Mitochondrial DNA phylogeography of the North American brown bear and implications for conservation // Conservat. Biol. 1998. V. 12. P. 408–417.
8. Matsuhashi T., Masuda R., Mano T., Yoshida M.C. Microevolution of the mitochondrial DNA control region in the Japanese brown bear (*Ursus arctos*) population // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. P. 676–684.
9. Matsuhashi T., Masuda R., Mano T. et al. Phylogenetic relationships among worldwide populations of the

Рис. 2. NJ филогенетическое дерево гаплотипов бурого медведя *Ursus arctos*, полученное на основе анализа гена цитохрома *b* мтДНК. В узлах ветвлений указаны бутстреп-значения. Обозначения: P – Приморье, Kh – Хабаровский край, S – Сахалинская область; образцы из GenBank/NCBI: HB – по Matsuhashi et al. [8]; GB – по Talbot & Shields [5]; K, E – по Korsten et al. [11]. Обозначения подкластеров 3a, 3b и 4 даны по Korsten et al. [11]. В качестве внешней группы взят гаплотип *Ursus thibetanus* из базы GenBank/NCBI № FM177759 [18].

- brown bear *Ursus arctos* // Zool. Sci. 2001. V. 18. P. 1137–1143.
10. Miller C.R., Waits L.P., Joyce P. Phylogeography and mitochondrial diversity of extirpated brown bear (*Ursus arctos*) populations in the contiguous United States and Mexico // Mol. Ecol. 2006. V. 15. P. 4477–4485.
  11. Korsten M., Ho S.Y., Davison J. et al. Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage across northern continental Eurasia after the last ice age: a general demographic model for mammals? // Mol. Ecol. 2009. V. 18. P. 1963–1979.
  12. Leonard J.A., Wayne R.K., Cooper A. Population genetics of ice age brown bears // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2000. V. 97. P. 1651–1654.
  13. Davison J., Ho S.Y., Bray S.C. et al. Late-Quaternary biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species // Quat. Sci. Rev. 2011. V. 30. P. 418–430.
  14. Tsuruga H., Mano T., Yamanaka M. Estimate of genetic variation in Hokkaido brown bears (*Ursus arctos yesoensis*) by DNA fingerprinting // Jpn. J. Vet. Res. 1994. V. 42 (3–4). P. 127–136.
  15. Masuda R., Amano T., Ono H. Ancient DNA analysis of brown bear (*Ursus arctos*) remains from the archeological site of Rebun Island, Hokkaido, Japan // Zool. Sci. 2001. V. 18 (5). P. 741–751.
  16. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 474 с.
  17. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999. V. 41. P. 95–98.
  18. Krause J., Unger T., Nocon A. Mitochondrial genomes reveal an explosive radiation of extinct and extant bears near the Miocene-Pliocene boundary // BMC Evol. Biol. 2008. V. 8. P. 220.
  19. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. P. 2731–2739.
  20. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451–1452.
  21. Filatov D.A. ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets // Mol. Ecol. Notes. 2002. V. 2. P. 621–624.
  22. Ohdachi S.D., Ishibashi Y., Iwasa M.A., Saitoh T. The wild mammals of Japan. Kyoto: Shoukadoh Book Sellers, 2009. 544 p.
  23. Саломашкина В.В., Тютеньков О.Ю., Москвитина Н.С., Холодова М.В. Анализ изменчивости контрольного региона мтДНК бурых медведей Сибири: предварительные результаты // Мат. Междунар. молодеж. конф. “Генетика животных и растений – фундаментальные проблемы и современные экспериментальные подходы”. Томск, 2012. С. 99–102.

## Mitochondrial Cytochrome *b* Gene Variation in Brown Bear (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) from Southern Part of Russian Far East

V. Yu. Gus'kov<sup>a</sup>, I. N. Sheremet'eva<sup>a</sup>, I. V. Seredkin<sup>b</sup>, and A. P. Kryukov<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia  
e-mail: valguskov@gmail.com

<sup>b</sup> Pacific Institute of Geography, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690041 Russia

The genetic variability of brown bear *Ursus arctos* from the southern part of the Russian Far East was first examined based on the variations in the mitochondrial DNA cytochrome *b* sequence. The presence of two phylogenetic groups of haplotypes described previously for other parts of the species range was demonstrated. Part of the samples belonged to the haplotype group distributed across the whole range, while another part belonged to the rare group previously only reported for Japan and Alaska. These findings partially clarify the pattern of brown-bear colonization on the territory of the Russian Far East and Japan.