

Статья

Анализ митохондриальной ДНК для определения статуса популяции Северного Снежного барана (*Ovis nivicola*)

Арсен. В. Дотцев ^{*}, Елизабет Кунс ², Вероника Р. Харзинова ¹, Иннокентий М. Охлопков ³, Фенг-Ху Лв ⁴, Менг-Ху Ли ⁴, Андрей Родионов ¹, Алексей В. Шахин ¹, Тарас П. Сипко ⁵, Дмитрий Г. Медведев ⁶, Елена А. Гладир ¹, Вугар А. Багиров ¹, Готфрид Брем ^{1,7}, Ивика Меджугорас ² и Наталья А. Зиновьева ^{1,*}

¹ Федеральный Исследовательский Центр Животноводства имени Л.К. Эрнста, 142132 Москва, Россия; veronika0784@mail.ru (V.R.K.); rodiand@yandex.ru (A.N.R.); alexshahin@mail.ru (A.V.S.); elenagladyr@mail.ru (E.A.G.); vugarbagirov@mail.ru (V.A.B.); gottfried.brem@agrobiogen.de (G.B.)

Группа популяционной геномики, Кафедра ветеринарных наук, LMU Munich, 80539 Мюнхен, Германия;

Elisabeth.Kunz@gen.vetmed.uni-muenchen.de (E.K.); Ivica.Medjugorac@gen.vetmed.uni-muenchen.de (I.M.)

³ Институт биологических проблем криолитозоны СО РАН, 677000 Якутск, Россия; imo-ibpc@yandex.ru

⁴ Колледж животноводства и технологии, Китайский сельскохозяйственный университет, Пекин 100193, Китай; lvfenghua@cau.edu.cn (F.-H.L.); menghua.li@ioz.ac.cn (M.-H.L.)

⁵ Институт экологии и эволюции им. Н. Н. Северцова РАН, 119071, Москва Russia; sipkotp@mail.ru

⁶ Факультет охотоведения и Биологии, Иркутский государственный сельскохозяйственный университет, 664038 Иркутск, Россия; dmimedvedev@yandex.ru

⁷ Институт животноводства и генетики, Университет ветеринарной медицины (VMU), A-1210 Vienna, Австрия

* Correspondence: asnd@mail.ru (A.V.D.); n_zinovieva@mail.ru (N.A.Z.); Tel.: +7-49-6765-1104 (A.V.D.); +7-49-6765-1404 (N.A.Z.)



Цитирование: Доцев, А. В.; Кунс, Е.; Харзинова, В. Р.; Охлопков, И. М.; Л. В., Ф.-Х., М.-Х.; Родионов, А. Н.; Шахин А. В., Сипко Т. П., Медведев Д. Г. и др. Анализ митохондриальной ДНК для определения статуса популяции Северного Снежного барана (*Ovis nivicola*). *Life* **2021**, *11*, 252. <https://doi.org/10.3390/life11030252>

Академические редакторы:
Андреа Лучетти и Федерико
Плацци

Получено: 19 Февраля 2012
Принято: 16 Марта 2021
Опубликовано 18 Марта 2021

Примечание издателя:
Издательство MDPI остается нейтральным по отношению к юридическим претензиям в опубликованных картах и их институциональной принадлежности.



Авторское право: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. Статья находится в свободном доступе согласно с условиями лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Резюме: В настоящий момент, внутривидовая таксономия снежного барана (*Ovis nivicola*) является спорной и требует уточнения с помощью молекулярно-генетических маркеров ДНК. В нашей предыдущей работе с использованием анализа полногеномного однонуклеотидного полиморфизма (ОНП), мы обнаружили, что популяция обитающая на хребте Хараулах отличался генетически от другой популяции якутского подвида, к которому его обычно относили. Целью нашего исследования было выяснение таксономического статуса Хараулахского снежного барана с использованием гена митохондриального цитохрома *b*. В настоящее исследование было включено в общей сложности 87 образцов из пяти различных географических точек обитания якутского снежного барана, а также 20 образцов других признанных подвидов. Нами было выявлено 19 гаплотипов, два из которых принадлежали популяции с хребта Хараулах. Анализ медианной сети и Байесовского дерева показал, что популяция, обитающая в районе Хараулаха группировалась отдельно от остальных видов Якутских снежных баранов. Дивергенции между Хараулахской популяцией и якутским снежным бараном оценивается в $0,48 \pm 0,19$ МЯ. Таким образом, изучение последовательностей *cytb* мтДНК подтвердило результаты обще геномного SNP-анализа. Учитывая высокую степень дивергенции Хараулахского снежного барана от других групп, идентифицированных как с помощью молекулярно-генетических, так и митохондриальных ДНК-маркеров, мы предлагаем классифицировать Хараулахскую популяцию как отдельный подвид.

Ключевые слова: дикий баран, толсторог, таксономия; мтДНК; цитохром *b*; Якутский снежный баран; *Ovis nivicola lydekkeri*

видом в северо-Восточной Сибири и на

1. Введение:

Снежный баран (*Ovis nivicola*) (Video S1) является эндемичным

Дальнем Востоке России. Наряду с североамериканскими баранами (толсторогами) (*Ovis canadensis*) и бараном Далла (*Ovis dalli*), он относится к подроду *Pachyceros* рода *Ovis* [1]. Внутривидовая таксономия снежного барана весьма противоречива и в настоящее время остается недостаточно изученной [2–4]. В то время как одни ученые считают, что снежных овец не следует делить на подвиды, а скорее рассматривать как подвид североамериканских диких баранов [5], другие выделяют до семи подвидов [6].

Согласно классификации Чернявского [4], которая официально признана Международным советом по охране дичи и дикой природы (CIC), выделяются четыре подвида: Камчатский (*O. n. nivicola*), Корякский (*O. n. koriakorum*), Путоранский (*O. n. borealis*) и Якутский (*O. n. lydekkeri*) [7].

До настоящего времени таксономическое деление снежного барана (*O. nivicola*) на подвиды основывалось на морфологических различиях между особями. Однако на морфологические характеристики влияют как происхождение животных, так и условия окружающей среды (питание, температура и т. д.). Поэтому использование такого подхода может ввести в заблуждение при определении структуры популяции. Таким образом, различия между особями разного происхождения могут быть нивелированы, нахождением в сходных условиях окружающей среды. Напротив, животные одного и того же или сходного генетического происхождения могут развить отличительные признаки благодаря своей адаптации к различным условиям окружающей среды.

Исследование ДНК-полиморфизмов позволяет выявить “истинные” генетические различия между особями, и оно все шире используется в исследованиях по вопросам биологической систематики [8]. Наиболее распространенным методологическим подходом является изучение полиморфизмов митохондриальной ДНК (мтДНК). Преимуществом мтДНК является отсутствие рекомбинации и материнского типа наследования, а также возможность извлечения мтДНК из небольших количеств биологических образцов, поскольку клетки животных содержат ее многочисленные копии. Например, с помощью мтДНК три вида таров были отнесены к отдельным монотипическим родам—*Nemitragus jemlahicus*, *Nilgiritragus hylocrius* и *Arabitragus jayakari*, в то время как по морфологическим признакам они были классифицированы как различные подвиды одного и того же вида [9]. Разработка ДНК-чипов для одновременного анализа нескольких тысяч или даже сотен тысяч однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в геноме сельскохозяйственных животных позволила использовать этот высокоинформативный инструмент для изучения геномов родственных диких видов [10,11], включая толсторогов [12] и снежных баранов [13]. В последней работе было выявлено, что популяции якутского снежного барана (*O. n. lydekkeri*), традиционно рассматриваемые как единый подвид, представлены особями разного происхождения. В частности, установлено иное от других популяций якутского снежного барана, происхождение снежного барана, обитающего в самой северной части ареала снежного барана—хребте Хараулах [13]. Для подтверждения статуса Хараулахских баранов, как самостоятельного подвида необходимы дополнительные исследования с использованием других типов изменчивости ДНК. Из-за широкого применения в филогенетических исследованиях и признания научным сообществом результатов полиморфизмов мтДНК являются наиболее подходящим для этих целей типом варибельности последовательностей. Использование митохондриальной ДНК представляет особый интерес при изучении *O. nivicola* в связи с ее материнской наследственностью. Общеизвестно, что самки снежных баранов гораздо менее склонны к миграции, чем самцы. Как правило, самки остаются, где они родились, в то время как бараны могут мигрировать на расстояния до 100-150 км в поисках самок [3].

Таким образом, настоящая работа была направлена на уточнение таксономического статуса Хараулахской популяции снежного барана на основе анализа полиморфизма гена митохондриального цитохрома В (*cytb*).

2. Материалы и методы

Для исследования были отобраны животные пяти различных географических местностей Якутского снежного барана (*O. n. lydekkeri*), включая хребет Хараулах-залив Тикси (ТИК, $n = 21$), Орулган (ОРУ, $n = 25$), Центрально-Верхоянский (ВЕР, $n = 23$), Сунтар-Хаятский (СХ, $n = 11$) и Момский (МОМ, $n = 7$) хребты, а также образцы трех других наиболее узнаваемых подвидов, включая Камчатский (КАМ, $n = 9$), Корякский (КОР, $n = 9$), Путоранский (ПУТ, $n = 3$) (рис. 1) [1]. Образцы мышечной ткани снежного барана были собраны в ходе научных экспедиций по разрешениям, выданным Департаментом охотничьего хозяйства Республики Саха (Якутия). Некоторые образцы были предоставлены трофейными охотниками и

представителями коренных народов, имеющих лицензию на охоту на снежного барана для личного потребления в соответствии с Федеральным законом Российской Федерации. Нам удалось получить лишь несколько образцов, соответствующего качества пригодных для получения ДНК подвида Путоранского барана, занесенного в Красную книгу. Все они от животных, погибших по естественным причинам.

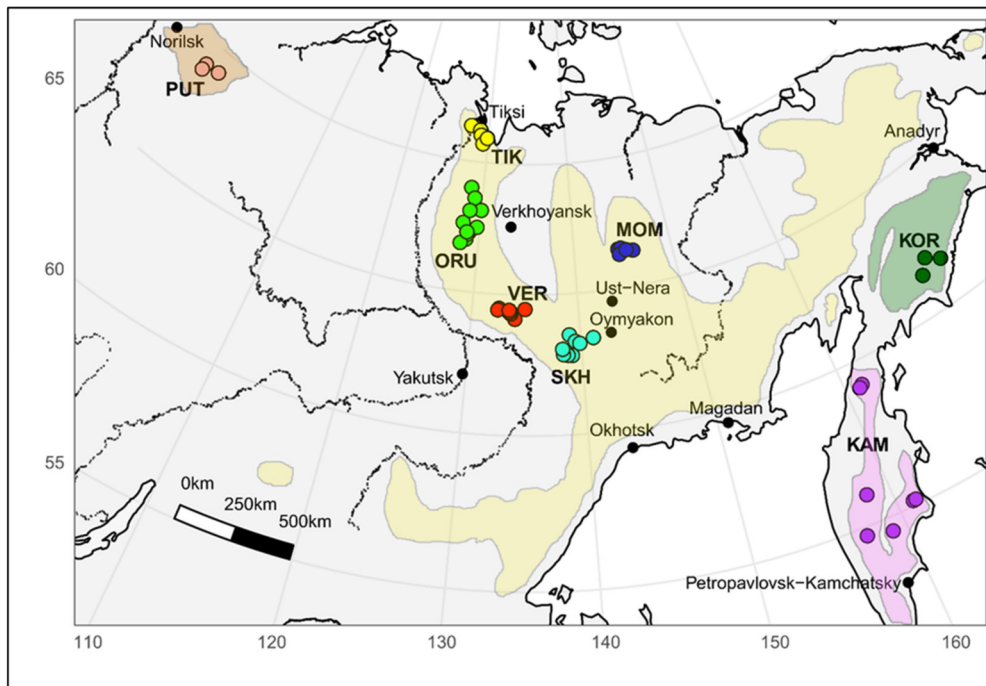


Рисунок 1. На карте отмечены места, где были взяты пробы снежного барана, использованные в данном исследовании, и районом обитания вида. ТИХ = хребет Хараулах–бухта Тикси, ОРУ = Орулган, ЦВХ = Центральный Верхоянск, СХ = Сунтар-Хаята, MOM = Момский, КАМ = Камчатский снежный баран, КОР = Коряк, ПУТ = Путоранский.

Экстракцию ДНК проводили с помощью колонок Nexttec (Nexttec Biotechnology GmbH, Леверкузен, Германия) в соответствии с рекомендациями производителя. Последовательности гена *cytb* якутского снежного барана определяли методом секвенирования по Сэнгеру двух перекрывающихся фрагментов (площадь перекрытия около 50 п. п.). Последовательности *cytb* Камчатского, Корякского и Путоранского снежных баранов были определены с использованием технологии секвенирования следующего поколения (NGS)[14]. Для этого были амплифицированы три перекрывающихся фрагмента мтДНК (область перекрытия более 290 п. н.) длиной 6,5, 5,7 и 6,7 кб. Полученные продукты полимеразной цепной реакции (ПЦР) очищали и использовали для подготовки библиотек к секвенированию, которые затем секвенировали методом парного конца 100 бп на HiSeq 1500 (Illumina). Для проверки сопоставимости результатов секвенирования по Сэнгеру и технологии NGS часть образцов якутского снежного барана ($n = 20$) была секвенирована двумя методами. Все сравниваемые последовательности оказались идентичны. Для аннотирования митохондриального генома [15] использовался веб-сервер Mitos. Последовательность *cytb* была восстановлена из полной последовательности мтДНК после ее выравнивания, выполненного с использованием МЫШЕЧНОГО алгоритма [16] в программном обеспечении MEGA 7.0.26 [17].

Последовательности генов *cytb* североамериканских диких овец были загружены из базы данных GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov (доступно на 15 декабря 2020)): В окончательный набор данных были добавлены овцы Далля (*O. dalli*) (ODA, $n = 3$), бараны Скалистые гор (*O. canadensis canadensis*) (OCC, $n = 8$) и Пустынные толстороги (*O. canadensis nelsoni*) (OCN, $n = 11$). Полный список образцов с указанием регистрационных номеров GenBank NCBI представлен в таблице 1. 1.

Таблица 1. Список последовательностей генов мтДНК *cytb* североамериканских диких овец, загруженных из базы данных GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov (доступно на 15 декабря 2020)).

# Вид//	Номер присоединения в Генбанке	Ссылки
1	Бараны Скалистых гор (<i>Ovis canadensis canadensis</i>)	8 EU365985, EU366063, EU366064, EU366065, EU366066, EU366067, FJ936176, FJ936177
2	Пустынный толсторог (<i>Ovis canadensis nelsoni</i>)	11 EU366059, EU366060, EU366061, EU366062, FJ936178, FJ936179, FJ936180, FJ936181, FJ936182, FJ936183, HM222706
3	Баран Далла (<i>Ovis dalli</i>)	3 MH779627, EU365992, FJ936184

Rezaei H.R. et al. [18]

Rezaei H.R. et al. [18]

Naidu A. et al. [19]

Dotsev A. et al. [14]

Rezaei H.R. et al. [18]

Для построения медианной соединительной сети [20], используется программное обеспечение PopART 1.7 [21]. Для Байесовской филогенетической реконструкции была выбрана одна выборка с наиболее частым гаплотипом из каждой популяции. Популяция с хребта Орулган была представлена двумя выборками гаплотипов, относящимися к центральному Верхоянску-ВЕР/ОРУ и к Хараулахскому хребту-ТИК/ОРУ. Построение байесовского филогенетического дерева проводилось с помощью программы BEAST 2.5 [22] с последующей визуализацией в FigTree 1.4.2 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree> (доступно на 15 декабря 2020)). Определение наилучших эволюционных моделей проводилось отдельно для каждого нуклеотида в программе PartitionFinder 2 [23] с использованием информационного скорректированного критерия Акайке (AICc) [24]. Наиболее оптимальными оказались эволюционные модели HKY + I, HKY и HKY + G соответственно для первого, второго и третьего кодонов гена *cytb*. Расчеты парных FST, а также анализ AMOVA проводились в программе Arlequin 3.5.2.2 [25]. Генетические расстояния на основе модели Кимуры-2-параметра [26] рассчитывались с помощью программного обеспечения MEGA 7.0.26. Далее, основываясь на этих расстояниях, в программе SplitsTree 4.14.6 было построено филогенетическое дерево [27]. Для расчета параметров генетического разнообразия использовалась программа DnaSP 6.12.01 [28] количество полиморфных сайтов (S), среднее число нуклеотидных различий (K), количество гаплотипов (H), разнообразие гаплотипов (Hd), разнообразие нуклеотидов (p). Мы также проверили гипотезу расширения популяции, рассчитав статистику нейтральности Фу Fs [29] и сделали тест Тадзимы D [30] и тест DnaSP 6.12.01. Демографические истории популяций снежных овец были выведены с помощью анализа попарного распределения расогласований [31] и рассчитаны в рамках модели постоянного размера популяции в DnaSP 6.12.01.

Дивергенция оценивалась с помощью программного обеспечения BEAST 2.5. Для калибровки молекулярных часов мы добавили априорную модель, предполагающую, что два вида группы *O. canadensis* и *O. dalli* были разделены 1,5 миллиона лет назад (MYA). Этот калибровочный узел был получен как медианное время расхождения из веб-ресурса TimeTree (<http://www.timetree.org> (доступно на 15 декабря 2020)) [32].

Для создания карт с участками выборки использовались пакеты R “maps” [33] и “ggplot2” [34].

3. Результаты и обсуждение

Для уточнения таксономического статуса хараулахской популяции снежных баранов, которая по результатам геномного анализа SNP была предложена в качестве самостоятельного подвида [13], нами было проведено исследование всей последовательности гена цитохрома B (*cytb*) у четырех наиболее узнаваемых подвидов снежных баранов, включая Якутский (*O. n. lydekkeri*), Камчатский (*O. n. nivicola*), Корякский (*O. n. koriakorum*) и Путоранский (*O. n. borealis*). Последовательности *cytb* овец Далла (*O. dalli*) и двух подвидов толсторогов (*O. canadensis canadensis*) и (*O. canadensis nelsoni*) были включены в окончательный набор данных в качестве аутгрупп.

Всего мы выявили 19 гаплотипов в 107 образцах снежного барана. Кроме того, *O. n. koriakorum* и *O. n. borealis*, а также популяция *O. n. lydekkeri* с Момского хребта были представлены одним гаплотипом. Значения параметров генетического разнообразия (Таблица 2) в популяциях якутского снежного барана согласуются с данными, полученными в исследовании на основе SNP-маркеров. Таким образом, гаплотипическое разнообразие (Гд) на Верхоянском хребте увеличивается в южном направлении с 0,381 0,111 на Хараулахе до 0,746 0,098 в Сунтар-хаятской популяции. Наименьшие значения нуклеотидного разнообразия (p) и среднее количество нуклеотидных различий (K) наблюдалось в Хараулахской популяции снежного барана.

Таблица 2. Показатели генетического разнообразия и нейтральности популяций снежных овец рассчитаны по нуклеотидной последовательности митохондриального гена *cytb*.

Популяци и	n	S	K (±SD)	H	Hd (±SD)	π (±SD)	Tajima's D	Fu's Fs
ТИК	21	1	0,893 ± 0,375	2	0,387 ± 0,493	0,00163 ± 0,00007	0,65593	0,94374
ОРУ	25	5	1,117 ± 1,002	3	0,540 ± 0,066	0,00243 ± 0,00088	1,23135	3,39081
VER	23	7	3,018 ± 1,703	5	0,861 ± 0,087	0,00239 ± 0,00158	-0,14378	0,34957
MOM	7	0	0	1	0	0	-	-
KAM	9	7	2,722 ± 0,592	5	0,861 ± 0,087	0,00239 ± 0,00158	0,25402	0,16693
KOR	8	0	0	1	0	0	-	-
PUT	3	0	0	1	0	0	-	-

Популяция: ХХТ = хребет Хараулах–бухта Тикси, ОРУ = Орулган, ВЕР = Центральный Верхоянск, СХ = Сунтар - Хаята, МОМ = Момский, КАМ = Камчатка, КОР = Коряк, ПУТ = Пудорана; n – количество образцов; S – количество полиморфных сайтов; K – среднее число нуклеотидных различий; SD – стандартное отклонение; H – количество гаплотипов; Hd – разнообразие гаплотипов; π – разнообразие нуклеотидов; D – значение критерия нейтральности Тадзимы, Fu – среднее значение критерия нейтральности Тадзимы. Fs – значение критерия нейтральности Фу.

Результаты тестов Тадзимы D и Фу Fs были статистически незначимы во всех популяциях, поэтому мы не смогли отвергнуть нулевую гипотезу, которая указывает на отклонение от нейтральности и предполагает недавнее расширение популяции.

Медианная сеть присоединения (Рис.2) показала, что группа, населяющая горы Камчатки - *O. n. nivicola*, была наиболее отделена от остальных и наиболее близка к историческому предку современного снежного барана. Все остальные образцы были получены из одного гаплотипа, встречающегося в настоящее время в центральном Верхоянском хребте – ВЕР и на Орулганском хребте – ОРУ. Среди образцов с хребта Хараулах мы выделили два гаплотипа, которые отличались друг от друга единственной мутацией. Один из этих гаплотипов был также обнаружен у животных с хребта Орулган. Таким образом, наличие в популяции ОРУ гаплотипов, отличающихся друг от друга четырьмя нуклеотидными заменами, подтверждает смешанное происхождение этой популяции, как это было выявлено при исследовании множественных SNP-маркеров [13]. Установлен гипотетический гаплотип, связывающий популяцию с хребта Хараулах с пудоранским снежным бараном.

Генетические расстояния на основе модели Кимура-2-параметра (Таблица 3) подтвердили наибольшую генетическую дистанцию камчатского снежного барана от других изученных групп.

Таблица 3. Генетические расстояния между изученными популяциями снежных овец и североамериканскими дикими овцами.

Популяци и	ТИК	ОРУ	VER	SKH	MOM	KOR	KAM	PUT	OCC	OCN	ODA
ТИК	*	0.002	0.005	0.008	0.005	0.006	0.012	0.006	0.025	0.022	0.025
ОРУ	0.438	*	0.004	0.006	0.004	0.004	0.010	0.005	0.024	0.021	0.024
VER	0.831	0.570	*	0.004	0.003	0.003	0.009	0.005	0.023	0.021	0.024
SKH	0.850	0.661	0.560	*	0.006	0.005	0.011	0.007	0.025	0.025	0.028
MOM	0.950	0.689	0.651	0.741	*	0.004	0.010	0.006	0.024	0.022	0.025
KOR	0.959	0.718	0.665	0.714	1.000	*	0.009	0.005	0.023	0.021	0.024
KAM	0.919	0.813	0.804	0.771	0.868	0.865	*	0.011	0.020	0.020	0.021
PUT	0.950	0.704	0.741	0.708	1.000	1.000	0.834	*	0.026	0.025	0.028
OCC	0.972	0.924	0.933	0.913	0.967	0.968	0.904	0.958	*	0.012	0.013
OCN	0.972	0.934	0.941	0.926	0.966	0.967	0.912	0.959	0.769	*	0.006
ODA	0.981	0.929	0.935	0.899	0.981	0.982	0.884	0.966	0.876	0.886	*

Ниже диагонали показаны попарные FST и выше диагонали генетические расстояния (на основе модели Кимуры-2-параметра). Значимые значения FST выделены жирным шрифтом (p < 0,05). Популяции ХХТ = хребет Хараулах–бухта Тикси, ОРУ = Орулган, ВЕР = Центральный Верхоянск, СХ = Сунтар-Хаята, МОМ = Момский, КАМ = Камчатка, КОР = Коряк, ПУТ = Пудорана, ОДА = Баран Далла, ОКК = Толсторог Скалистых гор, ОКН = Пустынный толсторог. Звездочка: ноль.

Центрально-верхоянская, Сунтар-хаятская и момская популяции имели сходные генетические расстояния с хараулахской популяцией (0,005, 0,008, 0,005 соответственно) и с популяцией обитающей на Пудоранского плато (0,005, 0,007, 0,006) и ниже с корякской (0,003, 0,005, 0,004). Парные значения FST выявили высокую генетическую дифференциацию между популяциями снежного барана. Самые низкие значения FST наблюдались между ТИК и ОРУ–0.438 и самые высокие между ТИК и KOR–0.959. Показано, что значения FST между ХХТ и популяциями *O. n. lydekkeri* (VER, SKH, MOM) варьировали от 0,831 (ТИК и VER) до 0,950 (ТИК и MOM) и были выше, чем в пределах других

Видов якутских снежных баранов от 0,560 (ВЕР и СХ) до 0,741 (СХ и МОМ). Эти результаты согласуются с исследованием якутского снежного барана на основе цельногеномных SNP-маркеров [13]. Деревья построены основываясь на генетических расстояниях и попарном F_{ST} (Рис. 3).

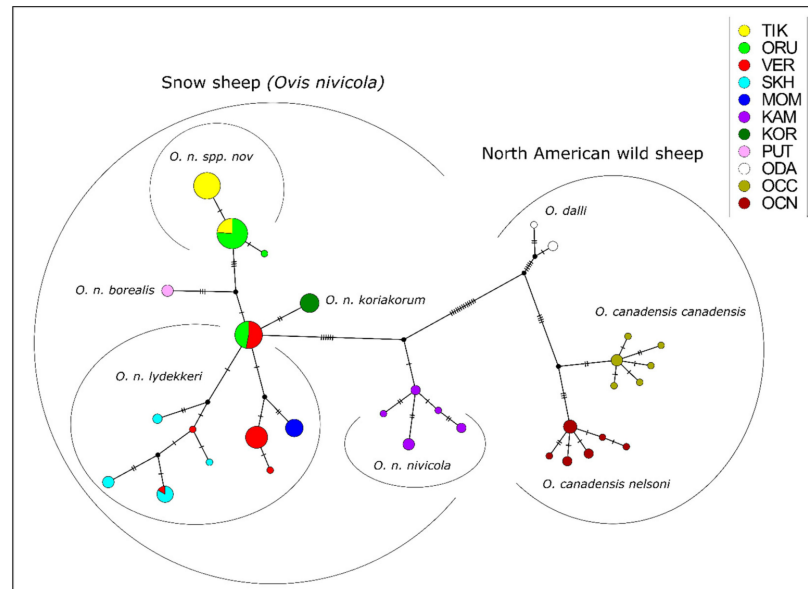


Рисунок 2. Медиана присоединения сети гаплотипов снежных овец (*Ovis nivicola*) и североамериканских диких овец, основанная на анализе полиморфизма гена мтДНК *cytb*. Диаметр круга соответствует числу особей, принадлежащих к данному гаплотипу. Количество поперечных линий указывает на количество нуклеотидных замен. Черные круги в точках ветвления сети-это гипотетические гаплотипы. ХХТ = хребет Хараулах-бухта Тикси, ОРУ = Орулган, ВЕР = Центральный Верхоянск, СХ = Сунтар-Хаята, МОМ = Момский, КАМ = Камчатка, КОР = Коряк, ПУТЬ = Путорана, ОДА = Баран Далла, ОКК = Толсторог Скалистых гор, ОКН = Пустынный толсторог.

Аналогичные выводы можно сделать и из анализа Байесовского филогенетического дерева (Рис. 4): два Хараулахских гаплотипа образовали кладу с путоранским снежным бараном.

Все якутские популяции (ВЕР, СХ, МОМ) вместе с корякскими снежными баранами были помещены в другую кладу. Камчатская популяция была наиболее удалена от всех остальных групп снежных баранов. Чтобы оценить приблизительное время дивергенции между популяциями снежных овец, мы калибровали молекулярные часы, рассматривая время парной дивергенции

Для *O. canadensis* and *O. dalli*-1.5 млн. лет назад (МYA), рассчитано как медиана из предыдущих исследований [1,18,35,36] приведено на веб-ресурсе TimeTree [32]. Согласно нашей модели, мы получили время дивергенции между *O. nivicola* и североамериканскими дикими овцами около 2 млн лет, что согласуется с медианным временем для этих видов, указанным на веб-ресурсе TimeTree-1,94 млн лет. Хараулахская популяция (ТИК) расходилась от ближайшей группы с плато Путорана (ПУТ) примерно на 0,3 0,13 млн лет, а от якутских популяций снежного барана (ВЕР, СХ, МОМ) - на 0,48 0,19 млн лет. Самая отдаленная камчатская популяция была отделена от всех остальных популяций снежного барана 0,93 0,35 MYA. Все вышеперечисленные клады были поддержаны высокими значениями апостериорной вероятности: ХХТ-ПУТ-0,91, ХХТ -Якутский снежный баран-1, КАМ-все остальные популяции снежного барана-1 (рис. С1).

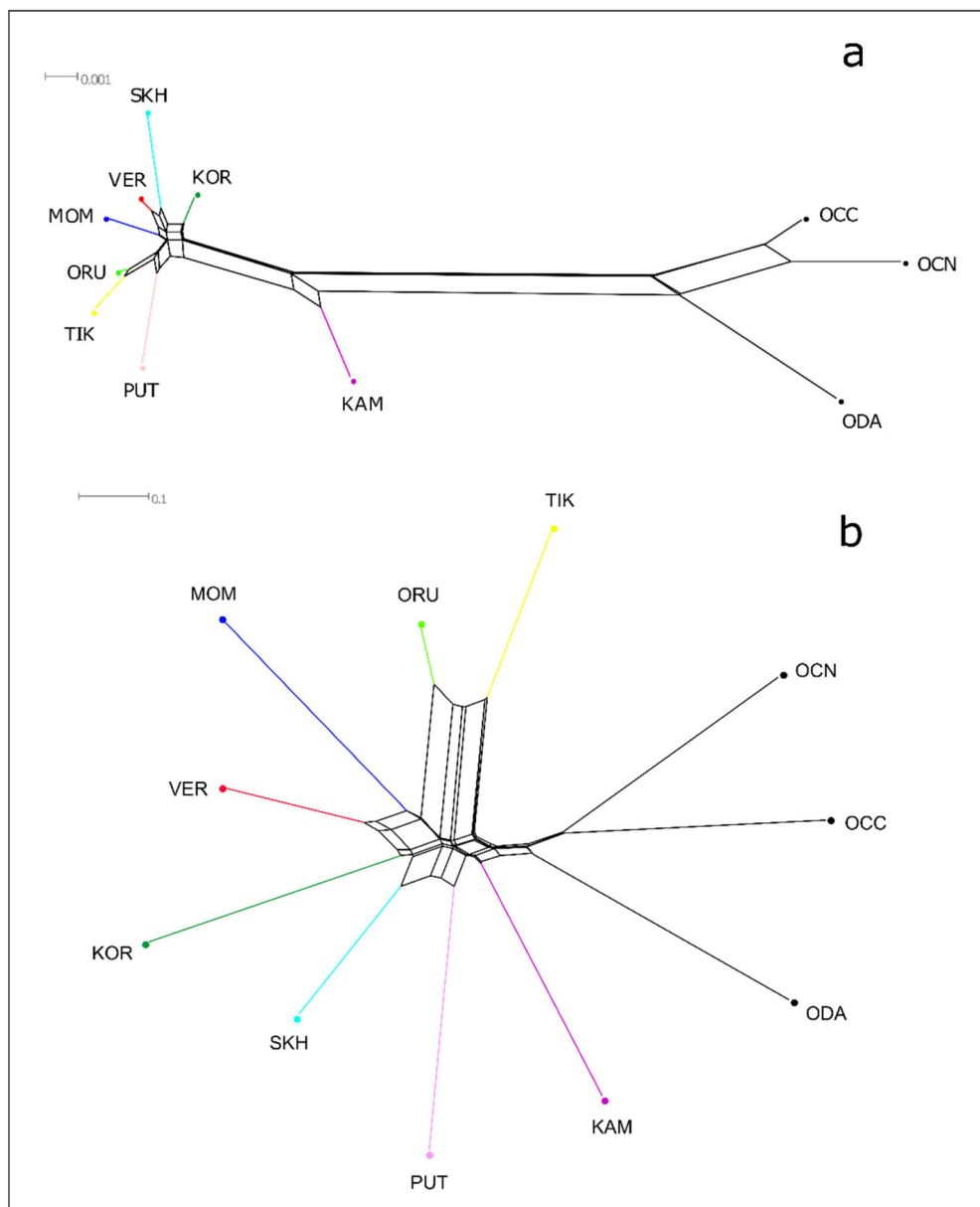


Рисунок 3. Древо снежных баранов (*Ovis pivicola*) и североамериканских диких баранов, основанное на генетических расстояниях на основе модели Кимура-2-параметра (а) и попарного F_{ST} (б) ХХТ = хребет Хараулах-бухта Тикси, ОРУ = Орулган, ВЕР = Центральный Верхоянск, СХ = Сунтар-Хаята, МОМ = Момский, КАМ = Камчатка, КОР = Коряк, ПУТЬ = Путорана, ОДА = Баран Далла, ОКК = Толсторог Скалистых гор, ОКН = Пустынный толсторог.

Приведены результаты исследования АМОВА, которое проводилось для четырех популяций *O. n. lydekkeri*: ХХТ, ВЕР, СХ и МОМ, поддерживали генетическую дифференциацию между популяциями якутского снежного барана со значительной вариацией 78,8% (Таблица 4). В популяциях было обнаружено только 21,2% генетических вариаций. ОРУ не был включен в этот тест из-за его смешанного происхождения.

Таблица 4. Результаты АМОВА для якутских популяций *O. pivicola* на основе гена цитохрома *b*.

Source of Variation	d.f.	SS	VC	V%
Among populations	3	105.035	2.36458	78.8
Within populations	58	36.9	0.63621	21.2
Total	61	141.935	3.00080	

d.f = степени свободы; SS = сумма квадратов; VC = компоненты дисперсии; V% = процент вариации.

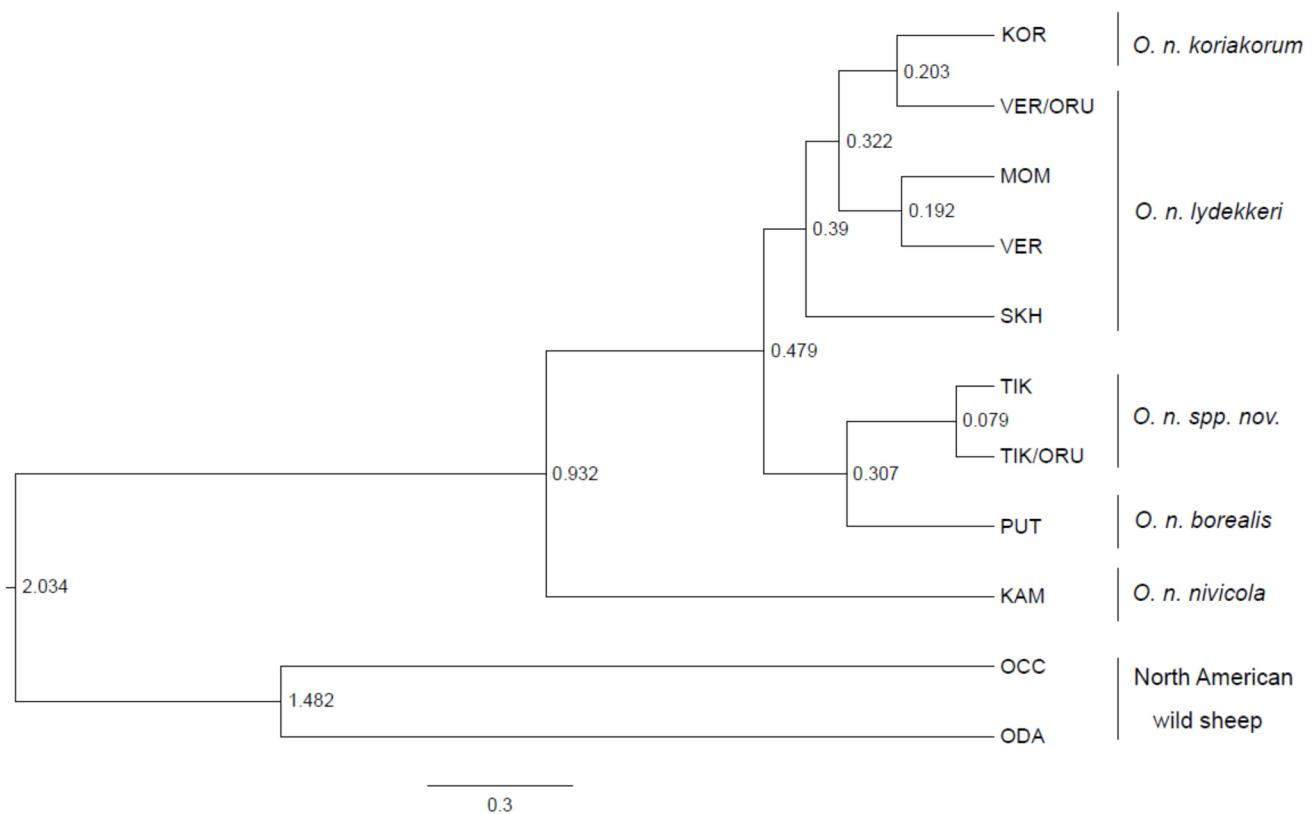


Рисунок 4. Байесовское филогенетическое дерево снежных баранов (*Ovis nivicola*) и североамериканских диких баранов, указывающее время дивергенции (в МЯ) оценок, основанных на гене мтДНК *cytb*.

Распределение рассогласования (распределение числа попарных различий между последовательностями) показало, что в ХХТ наблюдаемая кривая согласуется с ожидаемой моделью постоянного размера популяции (Рис.5). Для всех остальных популяций распределение несоответствий было мультимодальным. Эти результаты отражают тот факт, что популяция, обитающая на самой северной периферии ареала вида, развивалась независимо, без примеси других групп. Все остальные популяции могли выживать в периоды оледенения в убежищах и расширять свои ареалы, смешиваясь с другими популяциями. Например, популяция с хребта Орулган (ОРУ) образовалась путем смешения хараулахской популяции с группами из Центрального Верхоянского хребта, что было показано как молекулярными [13] так и митохондриальными исследованиями ДНК.

По результатам наших исследований популяции снежных баранов можно разделить на три основные группы. Первая и самая дальняя группа представлена снежными баранами Камчатки. Вторая группа объединяет популяции с плато Путорана и Хараулахского хребта, а третья включает Якутских снежных баранов наряду с представителями Корякского подвида. Полученные результаты не согласуются с традиционным подразделением снежных баранов, которое основывалось на морфологических признаках. Таким образом, Хараулахская популяция не должна рассматриваться как *O. n. lydekkeri* и, скорее, классифицироваться как отдельный подвид. Статус корякского подвида должен быть дополнительно изучен с использованием большего количества образцов и различных типов генетических маркеров.

Наконец, результаты нашего исследования должны привести к переоценке программ защиты снежного барана в Якутии. В настоящее время наиболее многочисленный подвид якутского снежного барана охраняется только в Момском природном парке и заповедниках: “Орулган-Сис” (хребет Орулган), “Верхнеиндигирский” (хребет Черский), “Келе” (Центральная часть Верхоянского хребта). На этих территориях создаются условия для сохранения природных ресурсов (путем ограничения хозяйственной деятельности) и условия, необходимые для охраны растений и животных [37]. Изученная популяция

снежного барана на хребте Хараулах охраняется только на территории федерального государственного природного заповедника “Усть-Ленский”, где охота на этот вид ограничена определенными периодами и длится с 1 августа по 30 ноября. Коренным народам также разрешается охотиться на снежных баранов только в эти периоды. Признание Хараулахской популяции отдельным подвидом позволит оценить численность популяции и организовать новые заповедные зоны в местах размножения и кормления. Создание нового ресурсного заповедника на Хараулахском хребте имеет важное значение для сохранения самой северной популяции снежного барана.

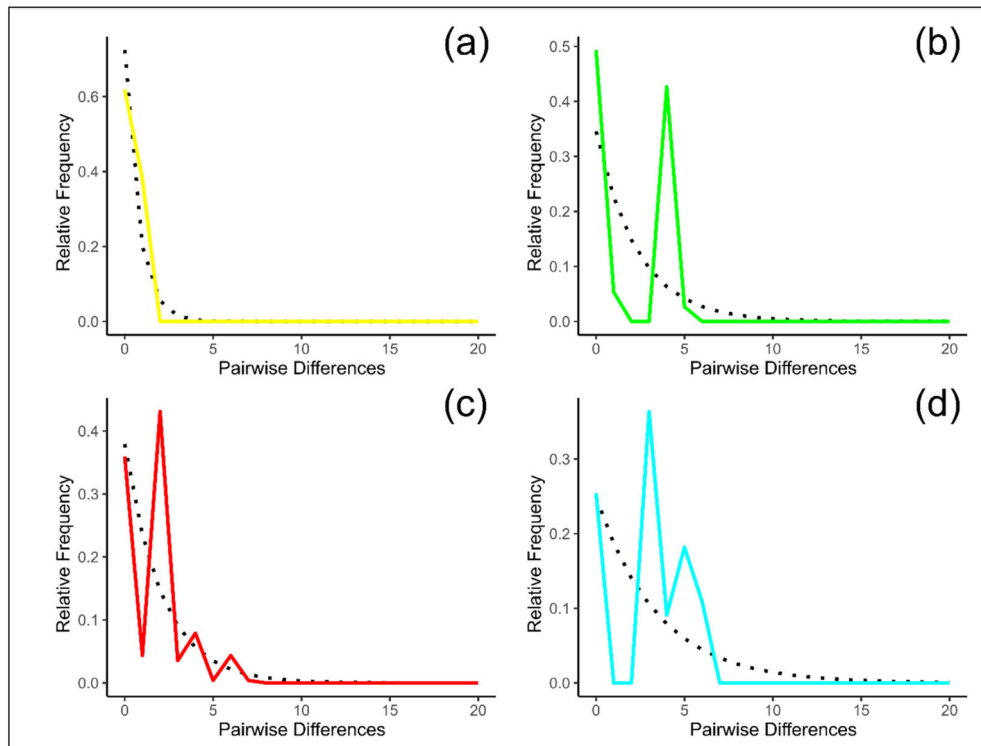


Рисунок 5. Распределение рассогласования для популяций *Ovis nivicola*. Пунктирная линия представляет ожидаемое распределение в рамках модели постоянного размера популяции, а сплошная линия—наблюдаемую парную разницу. (a) ТТХ, (b) ОРУ, (c) ВЕР and (d) СХ популяции. ХХТ = хребет Хараулах–Тикси, ОРУ = Орулган, ВЕР = Центральный Верхоянск, СХ = хребты Сунтар–Хаята.

4. Заключение

Наше исследование всей последовательности *cytb* у четырех наиболее узнаваемых подвидов азиатского снежного барана (*Ovis nivicola*) показало наибольшую генетическую дистанцию камчатской популяции (*O. n. nivicola*). Все остальные образцы были получены из одного гаплотипа, встречающегося в настоящее время в центральном Верхоянском ВЕР и на Орулганском хребте—ОРУ. Показано, что по числу нуклеотидных замен Хараулахская популяция отличается от “основного” якутского гаплотипа даже больше, чем официально признанные Путоранский и Корякский подвиды. Орулганская популяция имеет примитивное происхождение и представлена двумя основными гаплотипами, отличающимися друг от друга четырьмя нуклеотидными заменами. Таким образом, изучение последовательностей *cytb* мтДНК подтвердило результаты общегеномного SNP-анализа. Учитывая высокую степень дивергенции Хараулахского снежного барана от других групп, идентифицированных как с помощью молекулярно-генетических, так и митохондриальных ДНК-маркеров, мы предлагаем классифицировать Хараулахскую популяцию как отдельный подвид. Результаты нашего исследования могут быть использованы в программах сохранения биоразнообразия.

Дополнительные Материалы: Следующие материалы доступны онлайн <https://www.mdpi.com/2075-1729/11/3/252/s1>, Рис. S1: Байесовское филогенетическое дерево снежных баранов (*Ovis nivicola*) и североамериканских диких баранов с указанием апостериорных вероятностных значений, Видео S1: Представитель самой северной

популяции снежных баранов (хребет Хараулах). Видео: Эдуард В. Бендерский.

Авторские материалы: Концептуализация, А. В. Д., Н. А. З.; методология, А. В. Д., Е. К., Ф.-Н. Л., М. - Н. Л., А. Н. Р., В. А. В., Е. А. Г., И. М., Г. В.; программное обеспечение, А. В. Д.; Е. К., А. В. С., валидация, А. В. Д., А. В. С., формальный анализ, А. В. Д. и Н. А. З.; исследование, А. В. Д. и Н. А. З.; ресурсы, И. М. О., Т. П. С., Д. Г. М.; курация данных, А. В. Д.; написание – подготовка оригинального проекта, А. В. Д.; написание – обзор и редактирование, В. Р. К., Н. А. З.; визуализация, А. В. Д. и Н. А. З.; надзор, Н. А. З.; администрирование проекта, А. В. Д.; приобретение финансирования, А. В. Д. и Н. А. З. Все авторы прочитали и согласились с опубликованным вариантом рукописи.

Финансирование: Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда в рамках проекта № 21-46 - 00001 (секвенирование NGS) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках темы 0445-2019-0024 (Сбор ДНК и секвенирование Сэнгера).

Наблюдательный совет: Все процедуры проводились в соответствии с этическими нормами Федерального научного центра животноводства им.Эрнста. Протокол был одобрен Комиссией по этике экспериментов на животных Федерального научного центра животноводства им.Эрнста. Номер протокола 2021/2). Биоматериалы из коллекции Биоресурсов Федерального научного центра животноводства им.Эрнста, полученные при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Образцы мышечной ткани снежных баранов были собраны в ходе научных экспедиций после получения разрешения на сбор, выданного Департаментом охотничьего хозяйства Республики Саха в соответствии с Законом Российской Федерации от 24 июля 2009 года № 209-ФЗ.

Заявление об информированном согласии: Неприменимо.

Заявление о доступности данных: Последовательности генов *cutb* снежных баранов, полученные для исследования, были депонированы в базу данных GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov (доступно на 15 декабря 2020)). Номера: MW736905 - MW737011.

Благодарности: Мы благодарны Бендерскому Е. В. и Клубу горных охотников (www.kgo-club.ru (дата обращения 15 декабря 2020)) за предоставление части образцов снежных баранов. Благодарим Грицьшина В. А. за лабораторную помощь.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Спонсоры не играли никакой роли в разработке исследования, в сборе, анализе или интерпретации данных, в написании рукописи или в решении опубликовать результаты.

Список литературы

1. Bunch, T.D.; Wu, C.; Zhang, Y.-P.; Wang, S. Phylogenetic Analysis of Snow Sheep (*Ovis nivicola*) and Closely Related Taxa. *J. Hered.* **2006**, *97*, 21–30. [CrossRef] [PubMed]
2. Revin, Y.V.; Sopin, L.V.; Zhelezov, N.K. *Snow Sheep*; Nauka: Novosibirsk, Russia, 1988. (In Russian)
3. Zhelezov-Chukotsky, N.K. *Ecology of Snow Sheep of Northern Asia*; Nauka: Moscow, Russia, 1994. (In Russian)
4. Chernyavsky, F.B. On taxonomy and history of snow sheep (subgenus *Pachyceros*, Artiodactyla). *J. Zool.* **2004**, *83*, 1059–1070. (In Russian)
5. Danilkin, A.A. *Mammals of Russia and Adjacent Regions: Hollow-Horned Ruminants (Bovidae)*; KMK: Moscow, Russia, 2005. (In Russian)
6. Zhelezov-Chukotsky, N.K. New subspecies of snow sheep in Russian northern Asia. In *6th World Congress on Mountain Ungulates and 5th International Symposium on Mouflon*; Book of Abstracts; Ministry of the Interior: Nicosia, Cyprus, 2016; p. 95.
7. Damm, G.R.; Franco, N. *CIC Caprinae Atlas of the World*; CIC International Council for Game and Wildlife Conservation: Budakeszi, Hungary; Rowland Ward Publications: Johannesburg, South Africa, 2014.
8. Abramson, N.I. Molecular and conventional phylogenetics. Towards the common ground. *Proc. Zool. Inst. Russ. Acad. Sci.* **2013**, *2*, 219–229. (In Russian)
9. Ropiquet, A.; Hassanin, A. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). *Mol. Phylogenetics Evol.* **2005**, *36*, 154–168. [CrossRef] [PubMed]
10. Tokarska, M.; Marshall, T.; Kowalczyk, R.; Wójcik, J.M.; Pertoldi, C.; Kristensen, T.N.; Loeschcke, V.; Gregersen, V.R.; Bendixen, C. Effectiveness of microsatellite and SNP markers for parentage and identity analysis in species with low genetic diversity: The case of European bison. *Heredity* **2009**, *103*, 326–332. [CrossRef] [PubMed]
11. Kharzinova, V.R.; Dotsev, A.V.; Deniskova, T.E.; Solovieva, A.D.; Fedorov, V.I.; Layshev, K.A.; Romanenko, T.M.; Okhlopkov, I.M.; Wimmers, K.; Reyer, H.; et al. Genetic diversity and population structure of domestic and wild reindeer (*Rangifer tarandus* L. 1758): A novel approach using BovineHD BeadChip. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0207944. [CrossRef]
12. Miller, J.; Poissant, J.; Kijas, J.; Coltman, D. The International Sheep Genomics Consortium. A genome-wide set of SNPs detects population substructure and long range linkage disequilibrium in wild sheep. *Mol. Ecol. Resour.* **2010**, *11*, 314–322.

[\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

13. Dotsev, A.V.; Deniskova, T.E.; Okhlopkov, I.M.; Mészáros, G.; Sölkner, J.; Reyer, H.; Wimmers, K.; Brem, G.; Zinovieva, N.A. Genome-wide SNP analysis unveils genetic structure and phylogeographic history of snow sheep (*Ovis nivicola*) populations inhabiting the Verkhoyansk Mountains and Momsky Ridge (northeastern Siberia). *Ecol. Evol.* **2018**, *8*, 8000–8010. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Dotsev, A.V.; Kunz, E.; Shakhin, A.V.; Petrov, S.N.; Kostyunina, O.V.; Okhlopkov, I.M.; Deniskova, T.E.; Barbato, M.; Bagirov, V.A.; Medvedev, D.G.; et al. The first complete mitochondrial genomes of snow sheep (*Ovis nivicola*) and thinhorn sheep (*Ovis dalli*) and their phylogenetic implications for the genus *Ovis*. *Mitochondrial DNA Part B* **2019**, *4*, 1332–1333. [[CrossRef](#)]
15. Bernt, M.; Donath, A.; Jühling, F.; Externbrink, F.; Florentz, C.; Fritsch, G.; Pütz, J.; Middendorf, M.; Stadler, P.F. MITOS: Improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation. *Mol. Phylogenetics Evol.* **2013**, *69*, 313–319. [[CrossRef](#)]
16. Edgar, R.C. MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, 1792–1797. [[CrossRef](#)]
17. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874. [[CrossRef](#)]
18. Rezaei, H.R.; Naderi, S.; Chintauan-Marquier, I.C.; Taberlet, P.; Virk, A.T.; Naghash, H.R.; Rioux, D.; Kaboli, M.; Pompanon, F. Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2010**, *54*, 315–326. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Naidu, A.; Fitak, R.R.; Munguia-Vega, A.; Culver, M. Novel primers for complete mitochondrial cytochrome b gene sequencing in mammals. *Mol. Ecol. Resour.* **2012**, *12*, 191–196. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Bandelt, H.J.; Forster, P.; Rohl, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* **1999**, *16*, 37–48. [[CrossRef](#)]
21. Leigh, J.W.; Bryant, D. Popart: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* **2015**, *6*, 1110–1116. [[CrossRef](#)]
22. Bouckaert, R.; Vaughan, T.G.; Barido-Sottani, J.; Duchêne, S.; Fourment, M.; Gavryushkina, A.; Heled, J.; Jones, G.; Kühnert, D.; De Maio, N.; et al. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comput. Biol.* **2019**, *15*, e1006650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lanfear, R.; Frandsen, P.B.; Wright, A.M.; Senfeld, T.; Calcott, B. PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 772–773. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Akaike, H. A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans. Autom. Control.* **1974**, *19*, 716–723. [[CrossRef](#)]
25. Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* **2010**, *10*, 564–567. [[CrossRef](#)]
26. Kimura, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* **1980**, *16*, 111–120. [[CrossRef](#)]
27. Huson, D.H.; Bryant, D. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.* **2005**, *23*, 254–267. [[CrossRef](#)]
28. Rozas, J.; Ferrer-Mata, A.; Sánchez-DelBarrio, J.C.; Guirao-Rico, S.; Librado, P.; Ramos-Onsins, S.E.; Sánchez-Gracia, A. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 3299–3302. [[CrossRef](#)]
29. Fu, Y.-X. Statistical Tests of Neutrality of Mutations against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics* **1997**, *147*, 915–925. [[CrossRef](#)]
30. Tajima, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* **1989**, *123*, 585–595. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Rogers, A.R.; Harpending, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* **1992**, *9*, 552–569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kumar, S.; Stecher, G.; Suleski, M.; Hedges, S.B. TimeTree: A Resource for Timelines, Timetrees, and Divergence Times. *Mol. Biol. Evol.* **2017**, *34*, 1812–1819. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Becker, R.A.; Wilks, A.R.; Brownrigg, R.; Minka, T.P.; Deckmyn, A. Maps: Draw Geographical Maps; R Package Version 3.3.0. 2018. Available online: <https://CRAN.R-project.org/package=maps> (accessed on 22 December 2020).
34. Wickham, H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2009; p. 213. [[CrossRef](#)]
35. Fritz, S.A.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Purvis, A. Geographical variation in predictors of mammalian extinction risk: Big is bad, but only in the tropics. *Ecol. Lett.* **2009**, *12*, 538–549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Humphreys, A.M.; Barraclough, T.G. The evolutionary reality of higher taxa in mammals. *Proc. R. Soc. B Boil. Sci.* **2014**, *281*, 20132750. [[CrossRef](#)]
37. Bagirov, V.A.; Okhlopkov, I.M.; Zinovieva, N.A. *Yakut Snow Sheep: Genetic Diversity and Ways of Conservation of the Gene Pool*; Publishing House of L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry: Dubrovitsy, Russia, 2016. (In Russian)