

УДК 599.745.2575.174.015.3

**МИКРОСАТЕЛЛИТЫ И ГЛАВНЫЙ КОМПЛЕКС
ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ АТЛАНТИЧЕСКОГО МОРЖА *ODOBENUS
ROSMARUS ROSMARUS* (LINNAEUS, 1758)
НА ЛЕЖБИЩАХ БАРЕНЦЕВА МОРЯ**

© 2023 г. И. Г. Мещерский¹, * (ORCID: 0000-0003-4739-3342),
С. И. Мещерский¹ (ORCID: 0000-0001-5301-9846), Н. В. Крюкова^{1,2} (ORCID: 0000-0002-4392-8330),
С. М. Артемьева^{1,3} (ORCID: 0009-0002-1480-4424), А. И. Исаченко⁴ (ORCID: 0009-0003-9298-3891),
Р. Е. Лазарева⁴ (ORCID: 0009-0009-3105-1728), А. И. Шевелев² (ORCID: 0009-0003-6587-3398),
В. В. Рожнов¹ (ORCID: 0000-0002-2142-0763)

¹Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Москва, 119071 Россия

²Камчатский филиал Тихоокеанского института географии ДВО РАН,
Петропавловск-Камчатский, 683000 Россия

³Зоологический музей МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, 125009 Россия

⁴ООО “Арктический Научный Центр”, Москва, 119333 Россия

*e-mail: meschersky@rambler.ru

Поступила в редакцию 29.11.2022 г.

После доработки 18.04.2023 г.

Принята к публикации 08.06.2023 г.

Впервые проанализировано аллельное разнообразие гена *DQB* главного комплекса гистосовместимости (МНС) у атлантического моржа из европейской части Арктики — с лежбищ на архипелаге Земля Франца-Иосифа и у северной оконечности архипелага Новая Земля. Показано, что по данному локусу между двумя исследованными лежбищами имеются существенные различия. Одновременный анализ микросателлитных локусов выявляет меньший уровень отличий, а также позволяет предполагать, что на летнем лежбище на Новой Земле собираются животные более чем из одной пространственно-географической группировки (популяции). Высказано предположение, что особи с различающимся МНС-генотипом предпочитают различные участки нагула вне зависимости от районов пребывания в период размножения.

Ключевые слова: морж, *Odobenus rosmarus rosmarus*, *Odobenus rosmarus divergens*, генетическая структура, главный комплекс гистосовместимости (МНС), *DQB*, микросателлиты, архипелаг Земля Франца-Иосифа, архипелаг Новая Земля

DOI: 10.31857/S0134347523050091, **EDN:** EPVPMW

Пространственно-популяционная структура атлантического моржа в пределах восточной части его ареала изучена недостаточно хорошо. С использованием ряда методов, в том числе генетических, было показано, что моржи, круглогодично встречающиеся в водах архипелагов Шпицберген и Земля Франца-Иосифа, образуют единую группировку, генетически отличающуюся от моржей у восточного побережья Гренландии (Andersen et al., 1998, 2017; Born et al., 2001). Также показан определенный уровень генетических различий моржей Земли Франца-Иосифа—Шпицбергена от моржей юго-восточной части Баренцева моря—Печорского моря (Andersen et al., 2017). Однако генетическая характеристика групп моржей, наблюдаемых в летне-осенний пе-

риод на лежбищах у северной оконечности архипелага Новая Земля и в Карском море, остается неизвестной (Born et al., 1995; Wiig et al., 2014).

Указаний на встречу моржей у северной оконечности Новой Земли в зимнее время нет. К.К. Чапский (1976) и С.Е. Беликов (2011) сообщают о наблюдениях в этом районе моржей только в безледовый период, и наиболее вероятно, что лежбища здесь формируются за счет миграции животных из других регионов с последующим их уходом при наступлении ледового сезона. Согласно мнению К.К. Чапского (1976), моржи, летующие у северной оконечности Новой Земли, зимуют на юго-востоке Баренцева моря. Возможность этого была подтверждена радиопрослеживанием — две из 30 особей, помеченных на протя-

жении шести лет (2012–2017 гг.) в период с июля по август на о-ве Вайгач, мигрировали к Новой Земле: одна (2012 г.) к карскому берегу о-ва Северный, а другая (2014 г.) – в район о-ва Гемскерк и Оранских о-вов (Semenova et al., 2019). В то же время по данным ООО “Арктический Научный Центр”, в район Оранских островов в ноябре 2020 г. мигрировал и один из моржей, снабженный спутниковым передатчиком в конце августа на архипелаге Земля Франца-Иосифа.

Помимо традиционной оценки генетической структуры видов с использованием данных о составе митохондриальных линий и аллелей микросателлитных локусов, в зоологических исследованиях используют анализ встречаемости аллелей генов главного комплекса гистосовместимости (МНС). Белки этого комплекса играют важную роль в обеспечении иммунных реакций организма. Различия в аллельном составе их генов могут быть связаны не только с генетической обособленностью той или иной группировки, но и с различным набором патогенов, с которыми сталкиваются животные, и/или с внешними условиями, способствующими либо препятствующими влиянию патогенов.

Ранее проводили изучение распределения аллелей экзона 2 гена *DQB* – гена МНС класса II – у тихоокеанского подвида моржа *Odobenus rosmarus divergens* (Illiger, 1815) в Беринговом море и у атлантического – *Odobenus rosmarus rosmarus* (Linnaeus, 1758) в двух районах на западном и одном на восточном побережье Гренландии (Sonsthagen et al., 2014). Однако для европейской части Арктики характер разнообразия и географического распределения аллелей данного локуса до настоящего времени не исследовали.

Цель настоящей работы – оценка генетических различий атлантического моржа с лежбищ архипелага Земля Франца-Иосифа и с севера архипелага Новая Земля по селективно-нейтральным (микросателлитные локусы) и адаптивно значимым (экзон 2 гена *DQB*) маркерам, а также сравнение аллельного состава гена *DQB* моржей атлантического и тихоокеанского подвидов в российской части их ареалов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Образцы кожи атлантического моржа были собраны методом дистанционной биопсии в период с 23.08.2020 по 31.08.2020 гг. на о-вах Гохштеттера, Ева-Лив и Мертвого Тюленя архипелага Земля Франца-Иосифа и 22.08.2020 и 09.09.2020 гг. на Больших Оранских о-вах у северной оконечности архипелага Новая Земля. Одновременно со сбором образцов по внешним признакам определяли пол особи. Направленного отбора проб у особей разных полов не проводили – выбор животных

определяли возможностью подойти к ним на том или ином лежбище. Образцы кожи тихоокеанского моржа были собраны от животных, добытых в рамках аборигенного промысла (Крюкова, 2019) в Чукотском автономном округе в районе мыса Инчоун (66.29° N, 170.25° W, сентябрь–октябрь 2017 г.) и в б. Кенискин (66.90° N, 171.66° W, октябрь–ноябрь 2018 г.). Образцы консервировали и сохраняли в 96%-ном этаноле.

Тотальную ДНК из зафиксированной кожной ткани выделяли с использованием наборов реагентов InviMag Tissue DNA Mini Kit/KF96 (STRATEC Molecular, Германия) либо Magna DNA Prep (Изоген, Россия) на процессоре магнитных частиц KingFisher Flex 96 (Thermo Fisher Scientific, Финляндия).

В выборках атлантического моржа проводили определение аллельного состава 12 динуклеотидных микросателлитных локусов: *OrrFCB2*, *OrrFCB7*, *OrrFCB8*, *OrrFCB9*, *OrrFCB11*, *OrrFCB16*, *OrrFCB24* (Buchanan et al., 1998), *Hg4.2*, *Hg6.1* (Allen et al., 1995), *Hgdii* (Allen et al., 1995; Twiss et al., 2006), *M11* (Gemmell et al., 1997), *sCPV9* (Goodman, 1997) с использованием флуоресцентно-меченых праймеров. Каждый локус амплифицировали отдельно. Для локусов *Hgdii*, *M11* и *sCPV9* использовали температуру отжига 54°C, для остальных – 58°C. Во всех случаях проведение ПЦР включало финальную стадию элонгации в течение 40 мин при 72°C. Полученные ПЦР-продукты смешивали по 2–4 (не более одного типа красителя на смесь) и анализировали на секвенаторе НАНОФОР 05 (Синтол, Россия) в присутствии размерного стандарта DMSO-100 (NimaGen, Нидерланды). Полученные хроматограммы расшифровывали с помощью программного обеспечения GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems, США). Пики, соответствующие специфичным продуктам реакции, фиксировали при визуальном анализе хроматограмм. Аллели идентифицировали путем разбивки полученных значений длин фрагментов на размерные классы с шагом два. Для получения референтных значений в сериях анализа, разделенных по времени, дополнительно анализировали 4–8 образцов, генотипированных в предыдущей серии. Также методом фрагментного анализа проводили контроль определения половой принадлежности особей в выборках атлантического моржа с использованием праймеров, предложенных ранее (Jayasankar et al., 2008) и снабженных флуоресцентными метками.

Для поиска идентичных генотипов (образцов, повторно взятых у одной особи) в выборках атлантического моржа использовали программу GeneCap 1.2 (Wilberg, Dreher, 2004). Для оценки соответствия распределения частот аллелей уравнению Харди–Вайнберга и показателя аллельного богатства использовали программу Fstat 2.9.3.2

(Goudet, 1995). Для проверки результатов генотипирования на возможность присутствия нуль-аллелей — программу Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004). Для оценки показателей разнообразия (число аллелей на локус, среднее генетическое разнообразие, ожидаемая и наблюдаемая гетерозиготность), уровня генетических отличий между выборками (F_{st} -критерий) и оценки его статистической достоверности — программу Arlequin 3.5.1 (Excoffier, Lischer, 2010). При раздельном анализе данных для самцов и самок не были использованы генотипы детенышей-сеголеток в силу отсутствия у них самостоятельной миграционной активности. Для оценки наличия генетической структуры в объединенной выборке методом кластеризации использовали программу Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000) с применением моделей Admixture и Admixture LocPrior при 250000 реплик burnin и 1000000 реплик основного анализа в шести повторностях для каждой из гипотез $K = 1-5$. Оценку результата проводили по методу Evanno, реализованному в онлайн-сервисе Structure Harvester (Earl, Holdt, 2012).

Определение нуклеотидных последовательностей экзона 2 гена *DQB* в выборках атлантического и тихоокеанского моржей было выполнено в ООО “Евроген Лаб” (Россия) на основе таргетного секвенирования на платформе Illumina ПЦР-продуктов, полученных с использованием праймеров *DQBF* и *DQBR* (Sonsthagen et al., 2014) с ожидаемой длиной ампликона 240 п.н. Подготовку индивидуальных библиотек проводили в соответствии с руководством “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” (Part # 15044223 Rev. B; Illumina) с увеличенным количеством циклов амплификации на первой стадии ПЦР (35 циклов). После получения ампликонов библиотеки были очищены и смешаны эквимольно с помощью SequelPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher, Cat # A10510-01). Контроль качества полученных пулов библиотек был проведен с помощью системы Fragment Analyzer, а количественный анализ — qPCR. Пул библиотек был секвенирован на Illumina MiSeq с применением реактивов MiSeq Reagent Kit v2 Nano: длина прочтений — 250 п.н. с двух сторон фрагментов, 500 циклов. Для контроля параметров секвенирования использовали библиотеку фага PhiX.

Преобразование файлов в формат FASTQ проводили в программе bcl2fastq 2.17.1.14 Conversion (Illumina). На первом этапе анализа прямые и обратные чтения для каждого образца были слиты при помощи инструмента BBMerge из пакета BBTools 38.87 (Bushnell et al., 2017). Чтения, которые не сливались однозначно без замен, а также слитые чтения длиной менее 200 п.н. не учитывали. Для дальнейшего анализа использованы только образцы, для которых было получено не менее

100 последовательностей, отвечавших данным условиям.

Слитые чтения были выровнены на референс последовательности экзона 2 гена *DQB* моржа (аллель *Odoro-DQB*05*, GenBank KJ004398) при помощи программного обеспечения Bowtie 2 (Langmead, Salzberg, 2012) с опцией local. Последовательности, полученные для каждой особи, проверяли на вероятность ошибок секвенирования и возникновения химер с помощью программы USEARCH 11.0.667: команда unoise3, значение альфа-параметра = 2 (Edgar, 2010, 2016). В качестве валидных аллелей были приняты варианты, прошедшие данную проверку, имеющие более высокую частоту, чем любой из вариантов, признанный артефактом, а также представленные в индивидуальном образце не менее чем 30 копиями и составляющими не менее 20% от общего числа последовательностей, полученных для данной особи. Значения ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, гаплотипического и нуклеотидного разнообразия и уровня отличий между выборками (частоты аллелей по данным о генотипах — F_{st} и среднее число попарных отличий в нуклеотидных последовательностях — Φ_{st}) оценивали в программе Arlequin 3.5.1. Для анализа синонимичных (dS) и несинонимичных (dN) замен и соответствия их соотношения воздействию положительного (балансирующего) отбора (Z -тест на основе метода Nei-Gojobori с проведением бутстреп-теста, включавшего 10 000 реплик) использовали программу MEGA X (Kumar et al., 2018). Нуклеотидные последовательности аллелей были транслированы, и в аминокислотных последовательностях определены позиции, потенциально ответственные за связывание антигена, по ранее используемой схеме (Sonsthagen et al., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ

При анализе микросателлитных локусов два образца из выборки с архипелага Новая Земля были исключены, как с высокой степенью вероятности взятые повторно у одних и тех животных (полное совпадение генотипов). Итоговый объем проанализированных выборок составил 38 особей (28 самцов, 6 самок и 4 детеныша) с архипелага Земля Франца-Иосифа и 29 особей (18 самцов, 8 самок, 1 особь с неопределенной половой принадлежностью и 2 детеныша) с Новой Земли. Доля неопределенных аллелей в общей выборке составила 3.6%. Для всех локусов во всех выборках не было отмечено достоверного (с учетом поправки Бонферрони) отклонения от распределения Харди–Вайнберга или подозрения на наличие нуль-аллелей.

Таблица 1. Генетическое разнообразие групп атлантического моржа по микросателлитным локусам

Показатель	Земля Франца-Иосифа	Новая Земля	Земля Франца-Иосифа	Новая Земля	Земля Франца-Иосифа	Новая Земля
	все особи		самцы		самки	
<i>n</i>	38	29	28	18	10	8
<i>GD</i>	0.6	0.522	0.605	0.544	0.561	0.478
<i>A</i>	5.333	6.083	5.083	5.909	3.667	4.273
<i>AR</i>	5.108	5.612	3.458	3.382	3.219	3.156
<i>H_{obs}</i>	0.55	0.53	0.553	0.582	0.549	0.617
<i>H_{exp}</i>	0.624	0.582	0.632	0.646	0.597	0.607

Примечание. *n* — число особей в выборке, *GD* — среднее генетическое разнообразие, *A* — среднее число аллелей на локус, *AR* — среднее значение аллельного богатства, *H_{obs}* — наблюдаемая гетерозиготность, *H_{exp}* — ожидаемая гетерозиготность.

Таблица 2. Уровень различий между группами атлантического моржа (микросателлитные локусы, F_{st} -критерий)

Пары сравнения	F_{st}	<i>p</i>
Земля Франца-Иосифа/Новая Земля, все особи	0.013	0.009
Земля Франца-Иосифа/Новая Земля, самцы	0.014	0.041
Земля Франца-Иосифа/Новая Земля, самки	0.05	0.026
Земля Франца-Иосифа: самцы/самки	0.016	0.187
Новая Земля: самцы/самки	0.004	0.379

Примечание. Здесь и в табл. 3, 6 и 7 статистически достоверные значения выделены полужирным шрифтом; *p* — вероятность соответствия нуль-гипотезе, предполагающей отсутствие различий между сравниваемыми группами.

Несмотря на невысокий уровень значений F_{st} -критерия, различия между моржами с архипелагов Земля Франца-Иосифа и Новая Земля являются статистически достоверными для всех пар сравнения (все особи, самцы, самки). В то же время между самцами и самками в пределах одной географической выборки различия статистически недостоверны (табл. 1, 2).

Анализ обобщенной выборки методом кластеризации при использовании моделей Admixture и Admixture LocPrior не выявил наличия генетической структуры: хотя метод Evanno в обоих случаях определял как наиболее вероятную гипотезу $K = 2$, минимальное значение показателя $LnP(K)$ было получено для гипотезы $K = 1$ (результаты здесь не приведены). В модели Admixture для $K = 2$ вероятность принадлежности всех особей обоих районов к тому или другому кластеру была примерно одинакова — 0.472–0.540 в среднем для 6 повторностей (рис. 1а). Однако при использовании функции LocPrior все особи выборки с Земли Франца-Иосифа и часть особей с Новой Земли с высокой вероятностью (0.701–0.922) были отнесены к единому кластеру (кластер 1) (рис. 1б), а для нескольких особей с Новой Земли были получены высокие значения вероятности (0.704–0.870) отнесения к другому кластеру (кластер 2). Для остальных особей с Новой Земли вероят-

ность отнесения к кластеру 1 варьировала в пределах 0.697–0.398.

С учетом этого результата мы провели дополнительный анализ, выделив 8 особей (4 самца и 4 самки) со средней вероятностью отнесения к кластеру 2 более 70% в отдельную условную выборку. Все особи как с Земли Франца-Иосифа, так и с Новой Земли, с меньшей вероятностью отнесения к кластеру 2 условно рассматривали как принадлежащие к кластеру 1. Результат показал, что особи кластера 2 достоверно отличались как от остальной части выборки с Новой Земли, так и от выборки с Земли Франца-Иосифа, в то время как между двумя последними различий обнаружено не было (табл. 3). Во всех указанных группах по всем локусам не было отмечено отклонения частот аллелей от распределения Харди–Вайнберга.

При анализе нуклеотидных последовательностей аллелей гена *DQB* результат (от 133 до 3879 последовательностей на особь) был получен для 47 животных (24 самца и 23 самки) тихоокеанского моржа, 32 (23 самца и 9 самок) — атлантического моржа с островов Земли Франца-Иосифа и 14 (8 самцов, 6 самок) — с Новой Земли. Признанные валидными варианты, составившие от 23.3 до 74.6% от общего количества последовательностей для данного образца, были представлены в

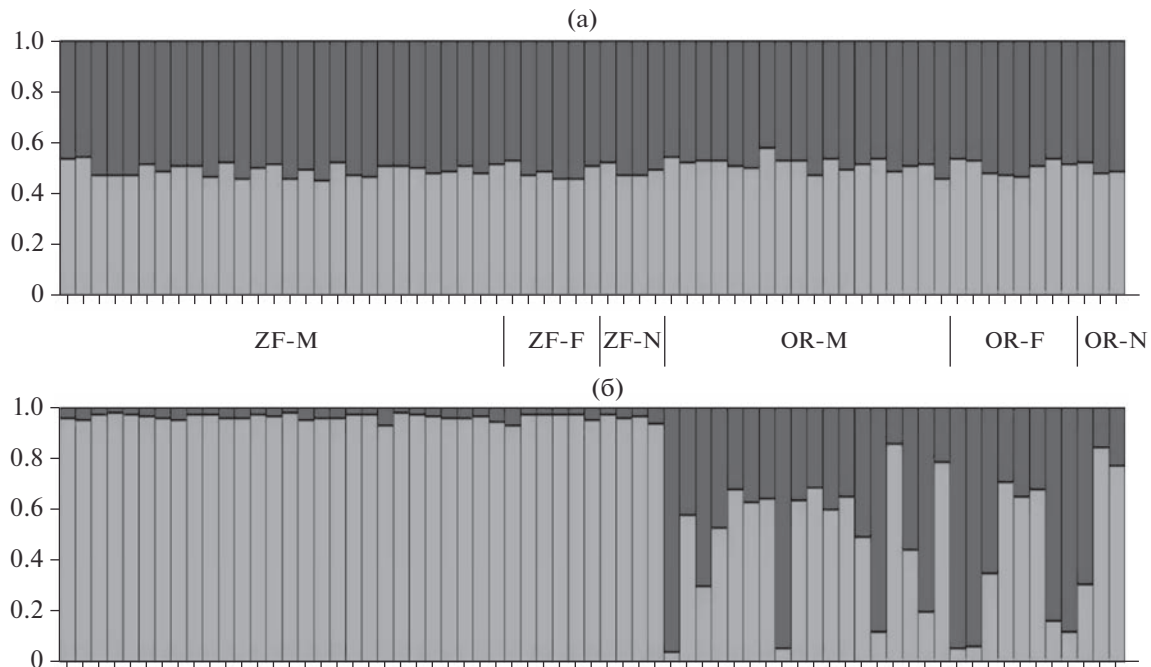


Рис. 1. Результат одной из повторностей анализа обобщенной выборки атлантического моржа ($n = 67$, 12 локусов) методом кластеризации при тестировании гипотезы $K = 2$. Каждый столбец диаграммы соответствует индивидуальному генотипу. По оси Y – значения вероятности принадлежности особи к одному из двух предполагаемых генетических кластеров. ZF-M – Земля Франца-Иосифа, самцы; ZF-F – Земля Франца-Иосифа, самки, ZF-N – Земля Франца-Иосифа, сеголетки, OR-M – Новая Земля, самцы, OR-F – Новая Земля, самки, OR-N – Новая Земля, сеголетки и особь с неустановленной половой принадлежностью. Модель: а – Admixture, б – Admixture LocPrior.

количестве от 37 до 1871 копий в каждом случае. Доля каждого из исключенных из рассмотрения (невалидных) вариантов ни в одном образце не превышала 10%. В случае наличия в образце единственного отвечающего заданным условиям варианта (гомозигота), он был представлен с частотой 54.8–74.6%, в случае двух вариантов (гетерозигота) их частота в сумме составляла 52.5–70.5%, а число копий одного варианта превышало число копий второго не более чем в два раза. Ни для одной особи не было отмечено более двух вариантов валидных последовательностей. После удаления концевых участков, комплиментарных использованным праймерам, все признанные валидными последовательности содержали 195 п.н. Стоп-кодона ни в одной последовательности обнаружено не было.

Проверка с использованием функции BLAST показала наивысшее сходство (97–98%) с известными вариантами экзона 2 гена *DQB* моржа и 94–96% с гомологичным участком генома других видов настоящих (*Phoca vitulina* Linnaeus, 1758, *Halichoerus grypus* (Fabricius, 1791), *Mirounga angustirostris* (Gill, 1866)) и ушастых (*Eumetopias jubatus* (Schreber, 1776), *Zalophus californianus* (Lesson, 1828)) тюленей. Проверка соответствующих аллелям аминокислотных последовательностей показала их сходство с бета-цепью антигена МНС класса II моржа (сходство 85–98%), тюленей и других хищных (сходство 80–95%).

В ходе анализа было отмечено 6 вариантов нуклеотидных последовательностей (аллелей), 4 из которых – *Odoro-DQB*01*, *Odoro-DQB*02*, *Odoro-DQB*03* и *Odoro-DQB*04* – были известны ранее

Таблица 3. Уровень различий между группами атлантического моржа, выделенными по результатам кластерного анализа с использованием модели Admixture LocPrior (F_{st} -критерий)

Пары сравнения	F_{st}	p
Земля Франца-Иосифа/Новая Земля, кластер 1	0.0039	0.2992
Земля Франца-Иосифа/Новая Земля, кластер 2	0.0699	0.000
Новая Земля, кластер 1/Новая Земля, кластер 2	0.0607	0.000
Земля Франца-Иосифа + Новая Земля, кластер 1/Новая Земля, кластер 2	0.0627	0.000

Таблица 4. Соотношение частот аллелей (гаплотипов) экзона 2 гена *DQB* в исследованных выборках

Аллель	Тихоокеанский морж, <i>n</i> = 94	Атлантический морж	
		Земля Франца-Иосифа, <i>n</i> = 64	Новая Земля, <i>n</i> = 28
<i>Odoro-DQB*01</i>	0.872	0.391	0.179
<i>Odoro-DQB*02</i>	0.011	0.172	0.392
<i>Odoro-DQB*03</i>	0.043	0.125	0.179
<i>Odoro-DQB*04</i>	0.074	0.156	0.071
<i>Odoro-DQB*06</i>	0	0.031	0.179
<i>Odoro-DQB*07</i>	0	0.125	0

Примечание. *n* – суммарное число копий аллелей во всех диплоидных генотипах.

Таблица 5. Показатели разнообразия аллелей экзона 2 гена *DQB* в генотипах животных

Показатель	Тихоокеанский морж	Атлантический морж	
		Земля Франца-Иосифа	Новая Земля
<i>n</i>	47	32	14
<i>A</i>	4	6	5
<i>H</i> _{exp} (<i>H</i>)	0.234	0.773	0.773
<i>π</i>	0.015	0.034	0.025
<i>H</i> _{obs}	0.255	0.656	0.714
<i>p</i> (HW)	1	0.531	0.832

Примечание. *n* – объем выборки, особей (диплоидных генотипов), *A* – число аллелей в выборке, *H*_{exp}(*H*) – ожидаемая гетерозиготность (гаплотипическое разнообразие), *π* – нуклеотидное разнообразие последовательностей, *H*_{obs} – наблюдаемая гетерозиготность, *p*(HW) – вероятность соответствия частот аллелей распределению Харди–Вайнберга.

(Sonsthagen et al., 2014) и еще два – *Odoro-DQB*06* (последовательность депонирована в GenBank под номером OP503615) и *Odoro-DQB*07* (GenBank OP503616), отмеченные в выборках атлантического моржа, зарегистрированы впервые. Аллель *Odoro-DQB*05*, отмеченный у единичной особи тихоокеанского моржа (Sonsthagen et al., 2014), в нашем исследовании встречен не был.

При сравнении между собой самцов и самок в пределах каждого региона как по представленности аллелей в выборке, так и с учетом данных об индивидуальных генотипах, различий между полами установлено не было (*F*_{st} = 0, *p* = 0.718–0.999). Ни для одной из выборок не было откло-

нения частот аллелей от ожидаемого в соответствии с уравнением Харди–Вайнберга (табл. 4–6).

Среди 14 моржей с Новой Земли, для которых были определены последовательности аллелей гена *DQB*, 10 особей могли быть отнесены к кластеру 1, а 4 особи – к кластеру 2, определяемым на основании анализа микросателлитных локусов (табл. 3). Различий между этими особями по представленности в генотипах аллелей гена *DQB* отмечено не было (*F*_{st} = 0.0041, *p* = 0.433).

Все известные нуклеотидные последовательности аллелей гена *DQB* моржа кодируют уникальные последовательности аминокислот. Однако превышение доли несинонимичных замен над синонимичными и статистически достоверное

Таблица 6. Различия между выборками, оцененные по представленности аллелей экзона 2 гена *DQB* в индивидуальных генотипах (*F*_{st}-критерий) и на основании попарных отличий в нуклеотидных последовательностях аллелей (*Φ*_{st}-критерий)

Пары сравнения	<i>F</i> _{st}	<i>Φ</i> _{st}
Тихоокеанский морж/атлантический морж, Земля Франца-Иосифа	0.2341 (<i>p</i> = 0.000)	0.1249 (<i>p</i> = 0.000)
Тихоокеанский морж/атлантический морж, Новая Земля	0.4821 (<i>p</i> = 0.000)	0.2360 (<i>p</i> = 0.000)
Атлантический морж, Земля Франца-Иосифа/Новая Земля	0.0616 (<i>p</i> = 0.008)	0.0181 (<i>p</i> = 0.1723)

Таблица 7. Количество синонимичных (dS) и несинонимичных (dN) замен в последовательностях экзона 2 гена *DQB* и результаты теста (*Z*) на положительный отбор по методу Nei-Gojobori

Показатель	Все триплеты последовательности (195 п.н.)	Антигенсвязывающие сайты (33 п.н.)
dN	0.0382, S.E. = 0.0129	0.1484, S.E. = 0.0517
dS	0.0421, S.E. = 0.0196	0.0000, S.E. = 0.0000
<i>Z</i>	−0.181, <i>p</i> = 1	2.838, <i>p</i> = 0.0027

(*Z*-тест) соответствию воздействию положительного отбора установлено только для триплетов, предположительно кодирующих 11 антигенсвязывающих сайтов (табл. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее при генотипировании по 20 микросателлитным локусам между выборками с Земли Франца-Иосифа (9 особей) и Оранских о-вов (8 особей) не было обнаружено отличий ни по частотам встречаемости аллелей, ни по результатам анализа методом кластеризации (Шитова и др., 2015). Однако, значимость этого результата ограничена небольшим количеством прогенотипированных животных. Нами между этими двумя районами обнаружены, хотя и незначительные, но статистически достоверные различия. Различия такого же уровня ($F_{st} = 0.012$) при использовании сходной панели микросателлитных локусов были отмечены и при сравнении популяций моржей Земли Франца-Иосифа—Шпицбергена и Печорского моря, на основании чего авторами было сделано заключение, что группировка Печорского моря является обособленной популяцией (Andersen et al., 2017).

Лежбище на Больших Оранских о-вах, однако, может быть смешанным — на нем обитают особи как принадлежащие с высокой вероятностью к популяции Земли Франца-Иосифа—Шпицбергена, так и генетически отличные от них — вероятные мигранты из других районов, скорее всего из юго-восточной части Баренцева моря (Чапский, 1976; Semenova et al., 2019).

Существует предположение, что самцы атлантического моржа более склонны к миграциям, чем самки (Andersen et al., 2017). Это может отражаться на генетических характеристиках животных, собирающихся на летних лежбищах. Однако в нашем случае генетических различий между самцами и самками в проанализированных выборках, в т.ч. на архипелаге Новая Земля, выявлено не было.

Нами обнаружено у атлантического моржа два новых аллеля экзона 2 гена *DQB*. Теперь для подвида в целом известно 7 аллелей этого локуса. Такое небольшое число аллелей генов МНС характерно для ластоногих, однако в пределах вида отдельные популяции могут сильно отличаться по

соотношению частот аллелей (Hoelzel et al., 1999; Cammen et al., 2011; Lau et al., 2015; и др.), что и было установлено ранее для моржей из Берингова моря и разных районов побережья Гренландии (Sonsthagen et al., 2014).

Результат, полученный нами для особей тихоокеанского моржа из Чукотского моря, не отличается от такового для животных из Берингова моря: в обоих случаях доминирует единственный аллель *Odro-DQB*01*, а индекс гаплотипического разнообразия составляет 0.2–0.3 против 0.6–0.8 в разных группах атлантического моржа. Таким образом, низкое разнообразие аллелей гена *DQB* у тихоокеанского моржа, вероятно, отражает характеристику подвида в целом. Причины этого неясны, т.к. принципиальных различий в условиях обитания атлантического и тихоокеанского моржей не выявлено, а точные сведения о потенциальном наборе патогенов, с которыми сталкиваются животные, отсутствуют. К.К. Чапский (1976) отмечает, что у атлантического подвида было выявлено 10 из 11 видов гельминтов, известных для моржа, а у тихоокеанского — только 5, но допускает, что это может быть связано с разной степенью изученности их гельминтофауны. Объяснение преобладания у тихоокеанского моржа единственного аллеля гипотезой генетического дрейфа в условиях географической изоляции подвидов вступает в противоречие с тем, что его численность почти в 10 раз превышает численность атлантического моржа (Laidre et al., 2015; Beatty et al., 2022), а генетическое разнообразие тихоокеанского подвида как по аллельному составу микросателлитных локусов, так и по последовательностям митохондриальной ДНК существенно превышает разнообразие любой региональной группы атлантического подвида (Шитова и др., 2015, 2017; Lindqvist et al., 2009; Sonsthagen et al., 2014).

Для популяций атлантического моржа сведения о различиях в наборе патогенов и влияющих на их воздействие условиях среды отсутствуют. Тем не менее все пять исследованных на сегодняшний день его группировок существенно различаются по частоте встречаемости аллелей (рис. 2). Как и для животных из разных районов побережья Гренландии, уровень различий между выборками с Земли Франца-Иосифа и Новой Земли, оцененный по частотам аллелей гена *DQB* ($F_{st} =$

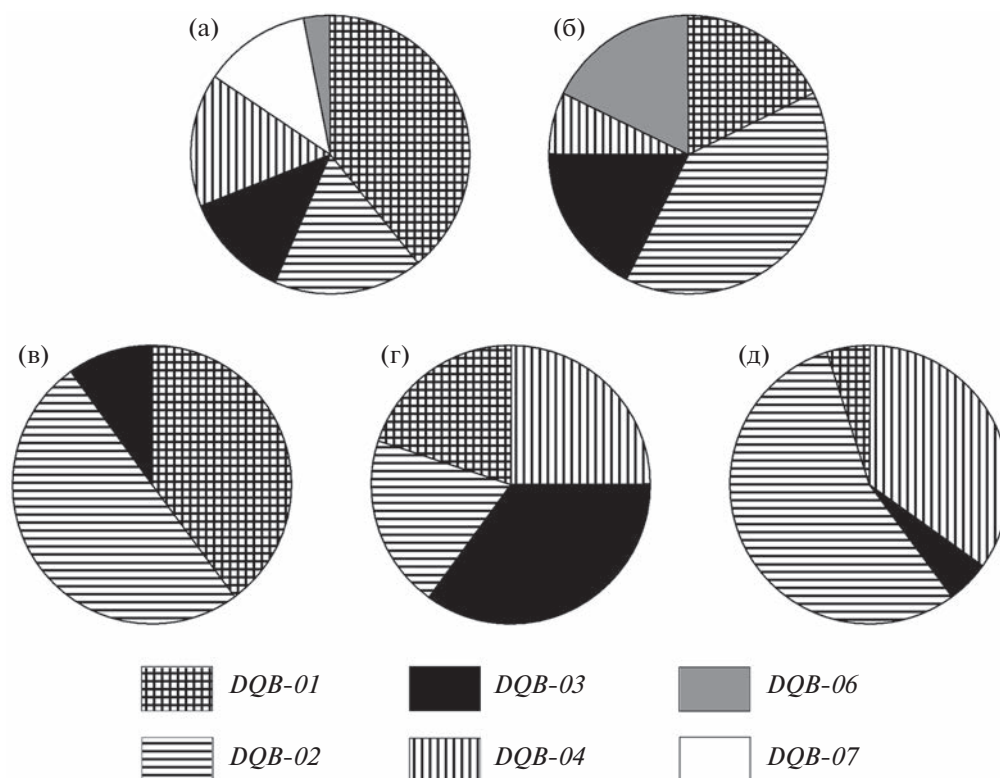


Рис. 2. Частоты аллелей экзона 2 гена *DQB* в пространственных группах атлантического моржа. а – Земля Франца-Иосифа, б – Новая Земля (наши данные); в – восточная (Scoresby Sound), г – юго-западная (Attu-Sisimiut), д – северо-западная (Thule) Гренландия (по: Sonsthagen et al., 2014).

= 0.062), оказывается более выраженным, чем при оценке по частотам аллелей микросателлитных локусов ($F_{st} = 0.013$). Похожая картина была получена при исследовании различий между репродуктивными лежбищами серого тюленя: животные на географически более близких, но биотопически различающихся участках побережий, заметно отличались между собой по наборам аллелей гена *DQB* (Cammien et al., 2011).

Выявленные различия в результатах, соответствующих селективно-нейтральным и адаптивно-значимым маркерам для моржей с летних лежбищ Новой Земли, позволяют выдвинуть предположение о предпочтении особями с отличающимися вариантами МНС-генотипов разных районов летнего нагула вне зависимости от их популяционной принадлежности. Разумеется, для подтверждения этого предположения необходимы более детальные исследования.

Большая разрешающая способность анализа генов МНС по сравнению с микросателлитными локусами, показанная ранее для популяций моржей западной части ареала, была подтверждена и в настоящей работе. В дальнейших исследованиях генетической структуры атлантического моржа, в частности в Баренцевом и Карском морях,

оценку по селективно-нейтральным локусам следует дополнять анализом данного маркера.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. На сбор проб биопсии атлантического моржа были получены соответствующие разрешения Федеральной службы по надзору в сфере природопользования.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Материалы публикации подготовлены в рамках выполнения работ по теме “Изучение и мониторинг моржа и белого медведя как индикаторов устойчивого состояния морских арктических экосистем” в рамках Программы сохранения биологического разнообразия ПАО “НК “Роснефть”. Отбор проб кожи тихоокеанского моржа проведен в рамках экспедиции КФ ТИГ

ДВО РАН, поддержанной грантом от US Fish and Wildlife Service.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Беликов С.Е. Морские млекопитающие Российской Арктики: изменения численности и среды обитания под воздействием антропогенных и природных факторов // Наземные и морские экосистемы. М.: Паулсен. 2011. С. 207–227.
- Крюкова Н.В. Проблемы законодательного регулирования традиционного (аборигенного) промысла тихоокеанского моржа в России // Арктика и Север. 2019. № 36. С. 24–41.
- Чапский К.К. Морж // Гептнер В.Г., Чапский К.К., Арсеньев В.А., Соколов В.Е. Млекопитающие Советского Союза. Т. 2. Ч. 3. Ластоногие и зубатые киты. М.: Высшая школа. 1976. С. 28–51.
- Шутова М.В., Гаврило М.В., Мизин И.А. и др. Микросателлитная изменчивость атлантического моржа (*Odobenus rosmarus rosmarus*) с лежбищ архипелага Земля Франца Иосифа и северной оконечности Новой Земли // Морские млекопитающие Голарктики. Сб. научн. тр. по мат-лам VIII межд. конф. Т. 2. М.: РОО “Совет по морским млекопитающим”. 2015. С. 319–326.
- Шутова М.В., Кочнев А.А., Дольникова О.Г. и др. Генетическое разнообразие тихоокеанского моржа (*Odobenus rosmarus divergens*) в западной части Чукотского моря // Генетика. 2017. Т. 53. № 2. С. 223–232.
- Allen P.J., Amos W., Pomeroy P.P., Twiss S.D. Microsatellite variation in grey seals (*Halichoerus grypus*) shows evidence of genetic differentiation between two British breeding colonies // Mol. Ecol. 1995. V. 4. № 6. P. 653–662.
- Andersen L.W., Born E.W., Gjertz I. et al. Population structure and gene flow of the Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the eastern Atlantic Arctic based on mitochondrial DNA and microsatellite variation // Mol. Ecol. 1998. V. 7. № 10. P. 1323–1336.
- Andersen L.W., Jacobsen M.W., Lydersen C. et al. Walruses (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the Pechora Sea in the context of contemporary population structure of Northeast Atlantic walruses // Biol. J. Linn. Soc. 2017. V. 122. № 4. P. 897–915.
- Beatty W.S., Lemons P.R., Everett J.P. et al. Estimating Pacific walrus abundance and survival with multievent mark-recapture models // Mar. Ecol.: Prog. Ser. 2022. V. 697. P. 167–182.
- Born E.W., Gjertz I., Reeves R.R. Population assessment of the Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus* L.) // Medd. Nor. Polarinst. Oslo. 1995. Nr. 138. 100 p.
- Born E.W., Andersen L.W., Gjertz I., Wiig Ø. A review of the genetic relationships of Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) east and west of Greenland // Pol. Biol. 2001. V. 24. № 10. P. 713–718.
- Buchanan F.C., Maiers L.D., Thue T.D. et al. Microsatellites from the Atlantic walrus *Odobenus rosmarus rosmarus* // Mol. Ecol. 1998. V. 7. № 8. P. 1083–1085.
- Bushnell B., Rood J., Singer E. BBMerge – accurate paired shotgun read merging via overlap // PLoS One. 2017. V. 12. № 10. e0185056. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185056>
- Cammen K., Hoffman J.I., Knapp L.A. et al. Geographic variation of the major histocompatibility complex in Eastern Atlantic grey seals (*Halichoerus grypus*) // Mol. Ecol. 2011. V. 20. № 4. P. 740–752.
- Earl D.A., von Holdt B.M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method // Conserv. Genet. Resour. 2012. V. 4. № 2. P. 359–361.
- Edgar R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. 2010. V. 26. № 19. P. 2460–2461.
- Edgar R.C. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing // bioRxiv. 2016. Art. ID 081257.
- 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. Res. 2010. V. 10. № 3. P. 564–567.
- Gemmell N.J., Allen P.J., Goodman S.J., Reed J.Z. Interspecific microsatellite markers for the study of pinniped populations // Mol. Ecol. 1997. V. 6. № 7. P. 661–666.
- Goodman S.J. Dinucleotide repeat polymorphisms at seven anonymous microsatellite loci cloned from the European harbor seal (*Phoca vitulina vitulina*) // Anim. Genet. 1997. V. 28. № 4. P. 310–311.
- Goudet J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics // J. Hered. 1995. V. 86. № 6. P. 485–486.
- Hoelzel A.R., Stephens J.C., O'Brien S.J. Molecular genetic diversity and evolution at the MHC DQB locus in four species of pinnipeds // Mol. Biol. Evol. 1999. V. 16. № 5. P. 611–618.
- Jayasankar P., Anoop B., Rajagopalan M. PCR-based sex determination of cetaceans and dugong from the Indian seas // Curr. Sci. 2008. V. 94. № 11. P. 1513–1516.
- Kumar S., Stecher G., Li M. et al. MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. № 6. P. 1547–1549.
- Laidre K.L., Stern H., Kovacs K.M. et al. Arctic marine mammal population status, sea ice habitat loss, and conservation recommendations for the 21st century // Conserv. Biol. 2015. V. 29. № 3. P. 724–737.
- Langmead B., Salzberg S.L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // Nat. Methods. 2012. V. 9. № 4. P. 357–359.
- Lau Q., Chow N., Gray R. et al. Diversity of MHC DQB and DRB genes in the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*) // J. Hered. 2015. V. 106. № 4. P. 395–402.

- Lindqvist C., Bachmann L., Andersen L.W. et al. The Laptev Sea walrus *Odobenus rosmarus laptevi*: an enigma revisited // Zool. Scr. 2009. V. 38. № 2. P. 113–127.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. 2000. V. 155. P. 945–959.
- Semenova V., Boltunov A., Nikiforov V. 2019. Key habitats and movement patterns of Pechora Sea walrus studied using satellite telemetry // Polar Biol. 2019. V. 42. № 9. P. 1763–1774.
- Sonsthagen S.A., Fales K., Jay C.V. et al. Spatial variation and low diversity in the major histocompatibility complex in walrus (*Odobenus rosmarus*) // Polar Biol. 2014. V. 37. P. 497–506.
- Twiss S.D., Poland V.F., Graves J.A., Pomeroy P.P. Finding fathers: spatio-temporal analysis of paternity assignment in grey seals (*Halichoerus grypus*) // Mol. Ecol. 2006. V. 15. № 7. P. 1939–1953.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. № 3. P. 535–538.
- Wiig Ø., Born E.W., Stewart R.E.A. Management of Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the arctic Atlantic // NAMMCO Sci. Publ. 2014. V. 9. P. 315–341.
- Wilberg M.J., Dreher B.P. GENECAP: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation // Mol. Ecol. Notes. 2004. V. 4. № 4. P. 783–785.

Microsatellites and the Major Histocompatibility Complex of the Atlantic Walrus *Odobenus rosmarus rosmarus* (Linnaeus, 1758) in Haulouts of the Barents Sea

I. G. Meschersky^a, S. I. Meschersky^a, N. V. Kryukova^{a, b}, S. M. Artemyeva^{a, c}, A. I. Isachenko^d, R. E. Lazareva^d, A. I. Shevelev^b, and V. V. Rozhnov^a

^aSevertsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^bKamchatka Branch of the Pacific Geographical Institute, Far East Branch of Russian Academy of Sciences, Petropavlovsk-Kamchatsky, 683000 Russia

^cZoological Museum of Moscow State University, Moscow, 125009 Russia

^dArctic Research Center, Moscow, 119333 Russia

The allelic diversity of the DQB gene of the major histocompatibility complex (MHC) in Atlantic walrus from the European part of the Arctic was analyzed for the first time. We studied animals from the haulouts located on the Franz Josef Land archipelago and near the northern tip of Novaya Zemlya. We demonstrated that there are significant differences for this locus between the two studied haulouts. Simultaneous analysis of microsatellite loci reveals a lower level of differentiation, and also suggest that animals from more than one spatial-geographical stock (population) gather at the summer haulout on Novaya Zemlya. It has been suggested that individuals with different MHC genotypes may prefer different feeding areas, regardless of the areas of residence during the breeding season.

Keywords: walrus, *Odobenus rosmarus rosmarus*, *Odobenus rosmarus divergens*, genetic structure, major histocompatibility complex (MHC), DQB, microsatellites, Franz Josef Land, Novaya Zemlya