

УДК 575.174.015.3:599.323.42

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РАЗНООБРАЗИЯ АЛЛЕЛЕЙ ГЕНА DRB1 ГЛАВНОГО КОМПЛЕКСА ГИСТОСОВМЕСТИМОСТИ У ДВУХ ВИДОВ ХОМЯЧКОВ РОДА *ALLOCRICETULUS* ARGYROPULO 1932

© 2023 г. И. Г. Мещерский^{а, *}, Н. Ю. Феоктистова^{а, **},
А. В. Гуреева^{а, ***}, А. В. Суров^{а, ****}

^аИнститут проблем экологии и эволюции имени А.Н. Северцова РАН,
Москва, 119071 Россия

*e-mail: meschersky@rambler.ru

**e-mail: Feoktistovanyu@gmail.com

***e-mail: anngureeva@gmail.com

****e-mail: surov@sevin.ru

Поступила в редакцию 12.02.2023 г.

После доработки 09.05.2023 г.

Принята к публикации 16.06.2023 г.

Методом NGS секвенирования впервые определено аллельное разнообразие экзона 2 гена DRB1 (класс II главного комплекса гистосовместимости — МНС) в естественных популяциях двух видов хомячков рода *Allocricetulus*: хомячка Эверсмманна (*A. evermanni*) и монгольского (*A. curtatus*). Эти виды близки генетически, но распространены аллопатрично и демонстрируют разную биотопическую приуроченность. Хомячок Эверсмманна населяет степи и часто связан с агроценозами. Монгольский хомячок обитает в полупустынях и пустынях, где антропогенный пресс практически отсутствует. Анализ выявил достоверное влияние положительного отбора на разнообразие аллелей гена DRB1 у обоих исследованных видов. Однако хомячок Эверсмманна отличается большей средней дистанцией между аллелями, но меньшей долей гетерозиготных особей, в то время как монгольский хомячок характеризуется большим индивидуальным разнообразием аллелей. Таким образом, несмотря на обширный ареал у хомячка Эверсмманна, мы наблюдаем значительно меньшее функциональное разнообразие адаптивных генов, что может быть связано с повышенным антропогенным влиянием.

Ключевые слова: монгольский хомячок, хомячок Эверсмманна, МНС класс II, таргетное секвенирование, генетическое разнообразие, патогенная нагрузка, естественный отбор

DOI: 10.31857/S0044513423070085, EDN: ZQRYJI

Хозяйственная деятельность проявляется в разрушении естественных биотопов, интродукции инвазивных видов, изменении климата и т.п. и ведет к росту числа видов, находящихся под угрозой исчезновения. Одним из аспектов этой проблемы является утрата генетического разнообразия. Фрагментация биотопов под воздействием деятельности человека приводит к снижению численности популяций, сокращению потока генов и одновременному увеличению доли инбредных особей (Ujvari, Belov, 2011). Популяции, утратившие генетические разнообразие, становятся уязвимыми, в т.ч. к новым патогенам (O'Brien, Evermann, 1988; Willi et al., 2006; Zhu et al., 2007; Fox, Reed, 2011; Lobo et al., 2021).

В течение последних четырех десятилетий для оценки генетического разнообразия часто использовались селективно нейтральные микроса-

теллитные локусы. Результаты таких исследований служили основой для рекомендаций по управлению популяциями (Madsen et al., 2000; Neumann et al., 2005). Однако надо учитывать и факт возможного сокращения генетического разнообразия только в отдельных функционально важных локусах, несмотря на сохранение изменчивости в других частях генома. В первую очередь следует выбирать локусы, которые участвуют в иммунной защите, поддержании репродуктивных и других физиологических функций. Локусы главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex — МНС) хорошо подходят для исследований в этом направлении (Aguilar et al., 2004; Sommer, 2005; Ekblom et al., 2010; Miller et al., 2008, 2010; Becker et al., 2009; Ujvari, Belov, 2011). Эти гены играют ключевую роль в иммунной защите организма, в т.ч. в обеспече-

нии ответа на патогенную нагрузку (Janeway, 2001; Acevedo-Whitehouse, Cunningham, 2006; Radwan et al., 2010; Biedrzycka et al., 2011; Shiina et al., 2015; Gigliotti et al., 2022 и др.).

Бурное развитие современного сельского хозяйства, включающее массовую распашку, использование пестицидов, изменение пастбищной нагрузки, в последние десятилетия привело к резкому сокращению и фрагментации естественных биотопов в степной и лесостепной зонах Евразии. Это повлекло за собой сокращение естественных популяций степных видов животных, в т.ч. грызунов. Кроме того, грызуны подвергаются прямому уничтожению как вредители сельского хозяйства, резервуары зоонозов и объекты пушного промысла (Скалон, Гагина, 2004; Шилова, Шекарова, 2005; Шилова, 2011; Biedrzycka, Konopinski, 2007). Это могло послужить причиной резкого сокращения численности целого ряда видов евразийских сусликов (*Spermophilus suslicus*, *S. pygmaeus*, *S. erythrogenys*, *S. citellus*) (Biedrzycka, Konopinski, 2007; Шилова и др., 2015 и др.), обыкновенного хомяка (*Cricetus cricetus*) (Surov et al., 2016; Banaszek et al., 2020). При этом в работах на крапчатом суслике (Biedrzycka et al., 2011) и обыкновенном хомяке (Smulders et al., 2003) было показано сокращение разнообразия генов МНС.

Ближайшими родственниками обыкновенного хомяка являются представители рода *Allocricetulus*. Один из них — хомячок Эверсмманна (*A. evermanni* Brandt 1859) — частично симбиотичен с обыкновенным хомяком и обитает преимущественно в равнинных степях, полупустынях (редко в пустынях), в агроценозах и около построек человека. Ареал этого вида простирается от Средней и Нижней Волги на западе до северо-западного Сынцзяна на востоке (Mammal Species of the World, 2005; Павлинов, 2006).

Кроме хомячка Эверсмманна, род *Allocricetulus* включает монгольского хомячка (*A. curtatus* Allen 1925), который генетически очень близок к предыдущему виду (Феокистова и др., 2018; Lebedev et al., 2018; Гуреева, 2022), однако аллопатричен с ним и имеет иную биотопическую приуроченность. Монгольский хомячок обитает на востоке аридной части Китая (Внутренняя Монголия, автономные районы Нинся-Хуэйский и Сынцзян, а также провинция Ганьсу) и в Монголии. В России он встречается на юге Республики Тыва. Придерживается полужакрепленных и закрепленных песков, а также солянковых полупустынь (Павлинов, 2006). Этот вид редок в естественных биотопах, но при этом практически не испытывает антропогенной нагрузки. В то же время хомячок Эверсмманна активно осваивает сельскохозяйственные угодья, в частности зерновые поля и бахчи. В период освоения целины (1950-е годы) в Казахстане наблюдалось резкое увеличение

численности этого вида, тогда как на целинных участках она практически не менялась (Карасёва, 1961). Последующее сокращение популяций хомячка Эверсмманна могло быть связано с изменением культуры земледелия, химизацией сельского хозяйства с использованием удобрений и ядохимикатов. Сейчас хомячок Эверсмманна включен в Красные книги Курганской (2012) Ульяновской (2015) Челябинской (2017), Тюменской (2020) областей со статусом 3 (редкий) или 4 (численность неизвестна). Монгольский хомячок включен в Красную книгу Республики Тыва со статусом 3 (Красная книга Республики Тыва, 2019), но его включение обусловлено тем, что Тыва является краем ареала вида.

В задачу нашего исследования входило сравнение аллельного разнообразия экзона 2 гена DRB1, входящего в состав МНС класса II у двух генетически близких видов рода *Allocricetulus*, обитающих в условиях с разной антропогенной нагрузкой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для проведения молекулярно-генетического анализа были использованы образцы ткани 18 особей хомячка Эверсмманна и 9 особей монгольского хомячка. Образцы были собраны практически со всего ареала хомячка Эверсмманна и большей части ареала монгольского хомячка.

Места сбора образцов представлены на рис. 1 и в табл. 1. Образцы ткани уха или фаланги пальца (при отлове живых зверьков) фиксировали в 96% этаноле. Тотальную ДНК выделяли с использованием набора реагентов Diatom™ DNA Prep (ООО “Лаборатория Изоген”, Москва, Россия) по инструкции производителя.

Для амплификации экзона 2 гена DRB1 мы использовали праймеры на основе последовательностей, предложенных в работе Smulders et al., 2003 для обыкновенного хомяка.

Определение нуклеотидных последовательностей отдельных аллелей было выполнено в “ООО Евроген Лаб.” на основе таргетного секвенирования на платформе Illumina ПЦР-продуктов, полученных с использованием указанных праймеров. Специфичность праймеров была проверена постановкой ПЦР с последующим секвенированием продукта методом Сэнгера.

Подготовку индивидуальных библиотек проводили в соответствии с протоколом, описанным в руководстве “16S Metagenomic Sequencing Library Preparation” (Part # 15044223 Rev. B; Illumina) с использованием полимеразы KAPA HiFi DNA Polymerase (Roche) и с увеличенным количеством циклов амплификации на первой стадии ПЦР (35 циклов) в связи с низкой концентрацией ДНК в некоторых образцах. После получения ампли-

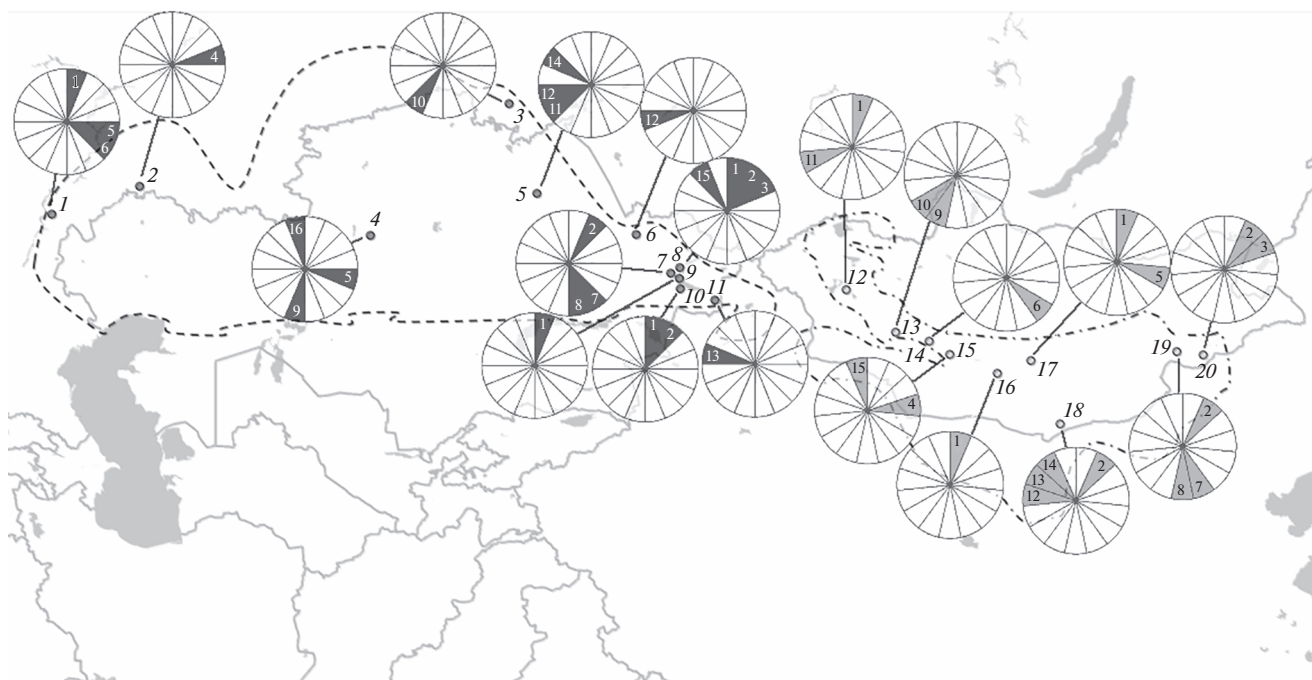


Рис. 1. Места сбора материала для анализа: *A. evermanni* (точки с 1–11) и для *A. curtatus* (с 12–20). Координаты локалитетов указаны в табл. 1. Ареалы *A. evermanni* (— — —), *A. curtatus* (— · —) построенные на основе объединения данных из нескольких литературных источников (Воронцов, 1960; Пантелеев, 1998; Соколов, Орлов, 1980; Flint, 1966; Mammal Species of the World, 2005; Smith, Xie, 2008) и собственных данных. Круговые диаграммы отражают встречи аллелей гена DRB1 в разных локалитетах, цифры на диаграммах соответствуют номерам аллелей Alev-DRB1 (черный фон) и Alcu-DRB1 (серый фон), приведенным в табл. 2.

конов библиотеки были очищены и смешаны эквимолярно с помощью SequelPrep™ Normalization Plate Kit (ThermoFisher, Cat # A10510-01). Контроль качества полученных пулов библиотек был проведен с помощью системы Fragment Analyzer, количественный анализ — при помощи qPCR.

Пул библиотек был секвенирован на Illumina MiSeq с использованием реактивов MiSeq Reagent Kit v2 Nano: длина прочтений — 250 п.н. с двух сторон фрагментов, 500 циклов. Для контроля параметров секвенирования использовалась библиотека фага PhiX.

Файлы FASTQ были получены с помощью программного обеспечения bcl2fastq v2.17.1.14 Conversion Software (Illumina). При обработке файлов в формате FASTQ с парными чтениями для каждого образца на первом этапе анализа прямые и обратные чтения были слиты при помощи инструмента Bbmerge из пакета BBTools v38.87 (Bushnell et al., 2017). Чтения, которые не сливались однозначно без замен, не учитывали. Слитые чтения были выровнены на референс одного из вариантов последовательности DRB1 экзон 2 известных для обыкновенного хомяка (Crcr-DRB1*14 аллель, GenBank AJ490324, Smulders et al., 2003) при помощи программного обеспечения Bowtie2 (Langmead, Salzberg, 2012) с опцией “local”. Из полученных выравниваний были из-

влечены чтения с длиной не менее 240 п.н. при длине референтной последовательности 245 п.н. (включая области посадки праймеров). Для дальнейшего анализа были использованы только образцы, для которых было получено не менее 100 последовательностей, отвечавших данному условию.

В наборе последовательностей, полученных для каждого образца, были определены уникальные варианты (аллели) и посчитана частота их встречаемости. Для дальнейшего анализа были отобраны варианты, представленные в каждом случае не менее чем 4 повторностями и составляющие не менее 4% от общего количества полученных для данной особи последовательностей.

После удаления областей посадки праймеров, последовательности, полученные для каждой особи, проверяли на вероятность наличия ошибок секвенирования и возникновения химер с помощью программы usearch v11.0.667 (Edgar, 2010), с установлением опций команды unoise3 минимальное количество копий варианта = 4, альфа-параметр = 2 (Edgar, 2016). Варианты, прошедшие данную проверку и имеющие более высокую частоту, чем любой из вариантов, признанный артефактом, были признаны в качестве валидных аллелей.

Таблица 1. Места сбора исследуемого материала и число образцов

№ локалитета	Координаты	Число образцов
1	50.76 N, 46.74 E	2
2	51.7 N, 51.29 E	1
3	54.99 N, 73.32 E	1
4	51.77 N, 72.75 E	1
5	51.64 N, 74.67 E	2
6	50.07 N, 80.76 E	1
7	48.53 N, 82.77 E	2
8	48.75 N, 83.42 E	3
9	48.28 N, 83.3 E	2
10	48.05 N, 83.37 E	2
11	47.69 N, 85.47 E	1
12	47.97 N, 93.17 E	1
13	46.35 N, 96.01 E	1
14	45.95 N, 98.07 E	1
15	45.62 N, 99.26 E	1
16	44.64 N, 101.59 E	1
17	45.05 N, 103.81 E	1
18	42.23 N, 105.41 E	1
19	45.39 N, 112.51 E	1
20	45.23 N, 114.18 E	1

Примечания. Номер локалитета соответствует номеру на рис. 1.

Идентичность последовательностей аллелей, отмеченных у разных особей, определяли с использованием онлайн-сервиса FaBox 1.61 (Villesen, 2007).

Варианты последовательностей, отобранные для последующего анализа, а также соответствующие им последовательности аминокислот проверяли на соответствие ожидаемому участку генома с использованием функции BLAST на сайте NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Для каждого вида оценивали: общее число аллелей, среднюю дистанцию между аллелями (p-дистанцию) в программе MEGA X (Kumar et al., 2018); среднее число аллелей на особь; соотношение числа гомозиготных и гетерозиготных особей. В связи с обнаруженной многокопийностью гена определение индивидуальных генотипов было невозможно. Индивидуальную изменчивость генотипов оценивали по индексу Симпсона на основании числа особей, у которых был встречен тот или иной аллель. Полученные варианты нуклеотидных последовательностей были транслированы, определены число вариантов аминокислотных последовательностей и их соответствие отмеченным аллелям гена.

Медианные сети вариантов нуклеотидных последовательностей были построены в программе

Network 4 методом Median Joining (Bandelt et al., 1999).

Оценку филогенетических связей между отмеченными вариантами гена DRB1 проводили с включением в анализ вариантов, также известных для обыкновенного хомяка (*Cricetus cricetus*) как филогенетически наиболее близкого вида. Чтобы избежать влияния нейтральной изменчивости, накопившейся за время независимой эволюции представителей двух разных родов, анализ был проведен на основе результирующих аминокислотных последовательностей. Дерево, включающее последовательности белка, соответствующие аллелям двух исследованных видов рода *Allocricetulus* и 25 аллелям обыкновенного хомяка (Феоктистова и др., 2022, GenBank ON081883 – ON081907), было построено в программе MEGA X методом Neighbour Joining (NJ) с использованием модели Jones-Taylor-Thornton (JTT + G). Оптимальная модель, соответствующая критериям BIC и AICc, а также значение G (0.3) были определены средствами программы MEGA. Также с использованием программы MEGA было определено количество и соотношение несинонимичных и синонимичных замен в полученных нуклеотидных последовательностях и выполнен Z-test на оценку влияния балансирующего отбора (positive selection) на увеличение разнообразия аминокислотных последовательностей. Тест был проведен на основе модифицированного метода Nei-Golobori (модель proportion) с допущением о вдвое большей вероятности транзиций по отношению к трансверсиям ($R = 1.0$) и подтвержден бутстреп-тестом, включавшим 10000 реплик. В связи с тем, что достоверное влияние отбора было установлено для полученных последовательностей в целом, отдельную оценку для сайтов, потенциально ответственных за связывание антигена, не проводили.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Последовательности, отвечающие указанным выше критериям, были получены для всех исследованных образцов. Для каждого образца было получено от 165 до 1348 нуклеотидных последовательностей, представлявших от 58 до 382 вариантов (гаплотипов, аллелей). Из них от одного до четырех отвечали перечисленным выше условиям валидности принимаемых аллелей. В случае присутствия в генотипе одного аллеля, отвечающего заданным условиям (гомозигота), его частота в общем числе вариантов, полученных для данного образца, составляла 56.6–70.4% (151–808 копий). В случае наличия в генотипе двух и более аллелей частоты каждого составляли 4.2–55.6% (26–653 копии), в сумме – 29.4–73.1% (105–801 копия). Отношение числа копий аллеля, представленного в результирующем файле с меньшей частотой,

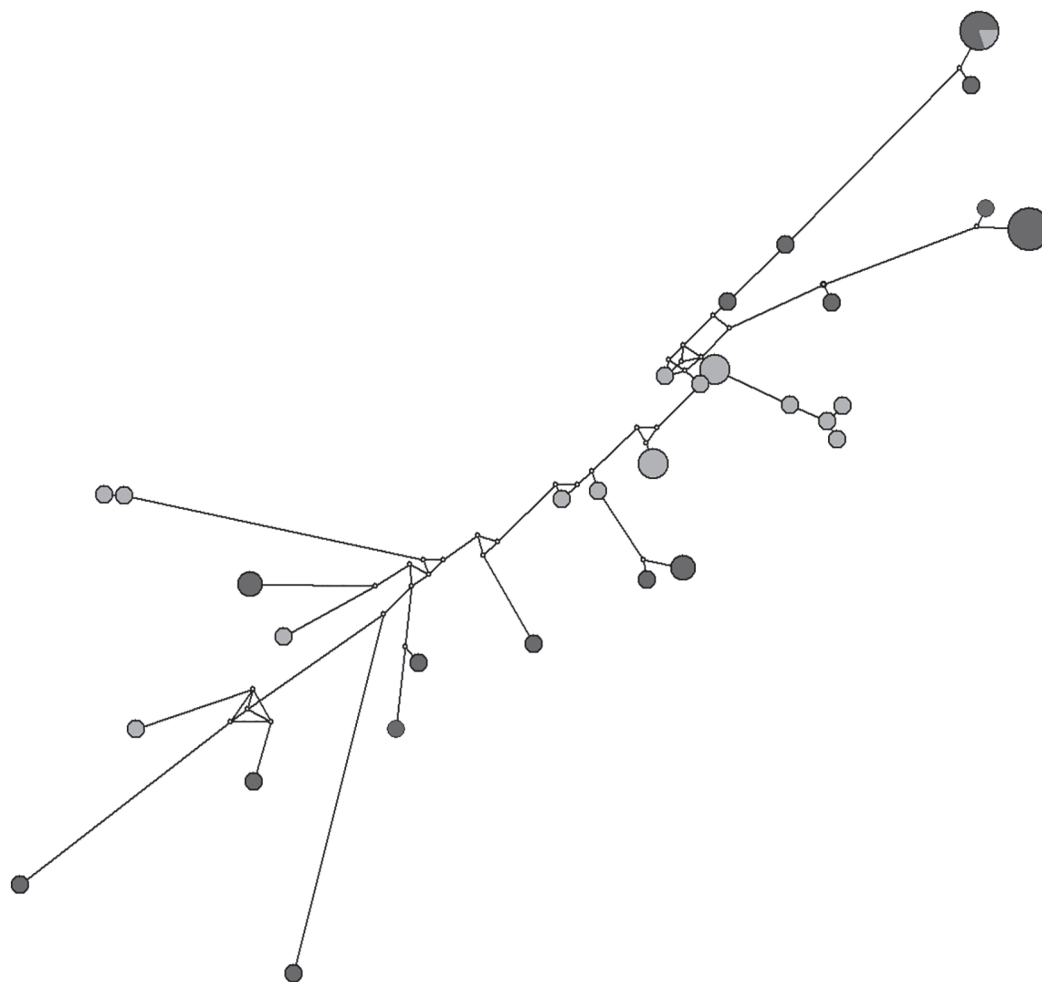


Рис. 2. Медианная сеть отмеченных вариантов нуклеотидных последовательностей экзона 2 гена DRB1 у двух видов хомячков рода *Allocricetulus*. Черный цвет — аллели *A. evermanni*, серый — *A. curtatus*. Диаметр кружков пропорционален встречаемости аллелей в обобщенной выборке.

к числу копий аллеля, представленного в результирующем файле с большей частотой, составляло от 0.124 до 0.963. После удаления участков посадки праймеров все признанные валидными последовательности имели длину 201 п.н., не содержали делеций или вставок, которые могли сдвигать рамку считывания, а также стоп-кодона. Всего в двух исследованных выборках был отмечен 31 вариант (аллель): 16 аллелей для хомячка Эверсмана и 15 для монгольского хомячка, причем один аллель (Alev-DRB1*02 = Alcu-DRB1*12) (рис. 2) был обнаружен у обоих исследованных видов. Все последовательности были депонированы в базу данных GenBank NCBI под номерами (табл. 2).

При проверке с использованием функции BLAST для всех полученных вариантов было установлено соответствие гену DRB1 МНС класса II у грызунов. Для трех аллелей хомячка Эверсмана и двух аллелей монгольского хомячка было обнаружено 100% сходство с аллелями обык-

новенного хомяка Alev-DRB1*05 = Crchr-DRB1*20 (ON081888); Alev-DRB1*06 = Crchr-DRB1*26 (ON081894); Alev-DRB1*16 = Crchr-DRB1*22 (ON081890); Alcu-DRB1*07 = Crchr-DRB1*29 (ON081897); Alcu-DRB1*13 = Crchr-DRB1*32 (ON081900).

Каждому варианту нуклеотидной последовательности соответствовал оригинальный вариант белка. Использование функции BLAST для соответствующих всем аллелям аминокислотных последовательностей также показало их соответствие бета цепи антигенов МНС класса II у грызунов (class II histocompatibility antigen, beta domain). Причем большинство белковых последовательностей имели максимальное сходство с белками обыкновенного хомяка, а также с двумя другими видами грызунов — обыкновенной белкой (*Sciurus vulgaris*) и водяной полевкой (*Arvicola amphibius*).

Количество аллелей, отмеченных в генотипе одного животного, варьировало от одного до трех у хомячка Эверсмана и от одного до четырех у

Таблица 2. Аллели локуса DRB1, экзон 2, отмеченные в ходе исследования хомячков рода *Allocricetulus*

Аллель	№ записи в Генбанке	Число особей, несущих данный аллель	Локалитет
Alev-DRB1*01	OQ709768	6	1, 8, 9, 10
Alev-DRB1*02	OQ709769	4	7, 8, 10
Alev-DRB1*03	OQ709770	1	8
Alev-DRB1*04	OQ709771	1	2
Alev-DRB1*05	OQ709772	2	1, 4
Alev-DRB1*06	OQ709773	1	1
Alev-DRB1*07	OQ709774	1	7
Alev-DRB1*08	OQ709775	1	7
Alev-DRB1*09	OQ709776	1	4
Alev-DRB1*10	OQ709777	1	3
Alev-DRB1*11	OQ709778	1	5
Alev-DRB1*12	OQ709779	2	5, 6
Alev-DRB1*13	OQ709780	1	11
Alev-DRB1*14	OQ709781	1	5
Alev-DRB1*15	OQ709782	1	8
Alev-DRB1*16	OQ709783	1	4
Alcu-DRB1*01	OQ709784	3	12, 16, 17
Alcu-DRB1*02	OQ709785	3	18, 19, 20
Alcu-DRB1*03	OQ709786	1	20
Alcu-DRB1*04	OQ709787	1	15
Alcu-DRB1*05	OQ709788	1	17
Alcu-DRB1*06	OQ709789	1	14
Alcu-DRB1*07	OQ709790	1	19
Alcu-DRB1*08	OQ709791	1	19
Alcu-DRB1*09	OQ709792	1	13
Alcu-DRB1*10	OQ709793	1	13
Alcu-DRB1*11	OQ709794	1	12
Alcu-DRB1*12	OQ709795	1	18
Alcu-DRB1*13	OQ709796	1	18
Alcu-DRB1*14	OQ709797	1	18
Alcu-DRB1*15	OQ709798	1	15

Примечания. Номера локалитетов соответствуют таковым в табл. 1 и на рис. 1.

монгольского хомячка. Таким образом, для обоих исследованных видов, как ранее и для обыкновенного хомяка (Феоктистова и др., 2022), была обнаружена многокопийность экзона 2 гена DRB1 МНС класса II. Количество гетерозигот в относительном выражении было гораздо больше у монгольского хомячка, по сравнению с хомячком Эверсмманна. У последнего среди 18 исследованных особей гомозиготными оказались 11 (61.1%). У монгольского хомячка из 9 особей гомозиготной оказалась только одна (11.1%), а остальные были гетерозиготными. Средняя дистанция между нуклеотидными последовательностями аллелей хомячка Эверсмманна составила 0.094, тогда

как аналогичный показатель у монгольского хомячка был несколько ниже — 0.085. Та же тенденция наблюдалась и при оценке средней дистанции между вариантами белка, соответствующими аллелям. У хомячка Эверсмманна эта величина составила 0.198, а у монгольского — 0.157. Однако у монгольского хомячка разнообразие индивидуальных генотипов было выше. Значение индекса Симпсона составило 11.65 у монгольского хомячка и 9.39 у хомячка Эверсмманна.

На рис. 2 представлена сеть нуклеотидных последовательностей, полученная для обоих исследованных видов. Последовательности аллелей гена монгольского хомячка в основном сосредото-

точены в центре сети и образуют компактную группу, тогда как большинство вариантов хомячка Эверсмана рассредоточены по периферии. Однако выявление конкретных филогенетических связей между отдельными вариантами в большинстве случаев невозможно из-за значительного количества неразрешенных узлов. У обоих видов не обнаруживается выраженной приуроченности аллелей к определенным географическим районам (рис. 1, табл. 2).

Число несинонимичных замен в последовательностях аллелей существенно превышало число синонимичных как в выборке хомячка Эверсмана, так и в выборке монгольского хомячка (табл. 3).

Достоверное соответствие гипотезе воздействия балансирующего отбора было отмечено для обоих видов. Для последнего это соответствие было более выражено (табл. 3).

Проведенный методом Neighbour Joining анализ филогенетических связей между вариантами аминокислотных последовательностей, соответствующих аллелям двух исследованных видов и обыкновенного хомяка, показал объединение этих последовательностей в три основные группы без выраженной бутстреп-поддержки. Каждая из трех групп включала варианты, отмеченные у всех трех видов (рис. 3). Очевидно, эти группы в большей степени отражают структуру белков, и, возможно, их функциональную значимость, чем филогенетические отношения между видами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическое разнообразие является важнейшим фактором благополучного существования популяций. Его изучение должно сочетать оценку как по нейтральным генетическим маркерам митохондриальной и ядерной ДНК, так и по генам, ответственным за адаптивные характеристики организма, в частности по генам МНС (Pfreder et al., 2000; Reed, Frankham, 2001; Hedrick, 2001; McKay, Latta, 2002; Luikart et al., 2003; Palo et al., 2003; Gomez-Mestre, Tejedo, 2004; Ujvari et al., 2005; Ujvari, Belov, 2011; Shiina et al., 2015). Последние играют ключевую роль в обеспечении иммунных функций организма при инфекционной и паразитарной нагрузке, а наличие полиморфизма этих генов может свидетельствовать о благополучном состоянии популяций (Biedrzycka et al., 2011). Разнообразие генов МНС является важным фактором при формировании прогноза выживания для исчезающих популяций животных в дикой природе (Ujvari, Belov, 2011; Shiina et al., 2015). В частности, для популяций европейского суслика (*Spermophilus suslicus*) показано, что именно DRB (класс II МНС) является важным показателем, отражающим степень паразитарной

Таблица 3. Результаты оценки числа несинонимичных (dN) и синонимичных (dS) замен и результаты Z-теста на соответствие наблюдающегося разнообразия вариантов нуклеотидных последовательностей воздействию балансирующего отбора

Показатель	<i>A. evermanni</i>	<i>A. curtatus</i>
dN (S.E.)	0.105 (0.018)	0.09 (0.019)
dS (S.E.)	0.058 (0.019)	0.067 (0.021)
dN/dS	1.81	1.343
Z	2.667	1.734
p(Z)	0.004	0.043

Примечания. Статистически достоверные значения выделены жирным шрифтом.

нагрузки. Показано, что этот ген находится под действием отбора и гомозиготность особей с определенными аллелями DRB делает их восприимчивыми к инфекции, вызванной кровяными паразитами *Haemobartonella* (Biedrzycka et al., 2011).

Исследования, оценивающие аллельное разнообразие экзона 2 гена DRB1 у обыкновенного хомяка — вида, близкого к роду *Allocricetulus*, — было проведено для ряда популяций из разных частей ареала (Smulders et al., 2003; Феоктистова и др., 2022). Для популяций обыкновенного хомяка Франции и Голландии было выявлено резкое снижение разнообразия, вплоть до сохранения единственного аллеля экзона 2 гена DRB1. В то же время анализ музейных образцов показал, что еще в начале XX века в этих популяциях присутствовало не менее 7 аллелей этого гена. С резким сокращением аллельного разнообразия DRB1 в крайней западной части ареала вида связывают снижение средней массы тела, ухудшение параметров размножения и снижение устойчивости к паразитарным нагрузкам. В то же время в современной относительно благополучной популяции обыкновенного хомяка в Чехии у 15 животных было отмечено 13 различных аллелей гена DRB1, и большинство животных были гетерозиготными (Smulders et al., 2003). Сходный уровень разнообразия был отмечен нами для обыкновенного хомяка в Крыму. Причем разнообразие городской популяции было выше, чем у хомячков, обитающих в сельской местности (Феоктистова и др., 2022).

В указанной работе нами также была показана возможность присутствия в генотипе обыкновенного хомяка до четырех разных последовательностей экзона 2 гена DRB1 (Феоктистова и др., 2022). Ранее многокопийность генов МНС была отмечена, в частности, у песчанок (*Gerbillurus paeiba*) (Harf, Sommer, 2005), бобров (*Castor fiber pohlei*) (Babik et al., 2005), рыжих (*Clethrionomys glareolus*) (Axtner, Sommer, 2007) и горных (*Microtus montanus*) полевок (Winternitz, Wares, 2013).

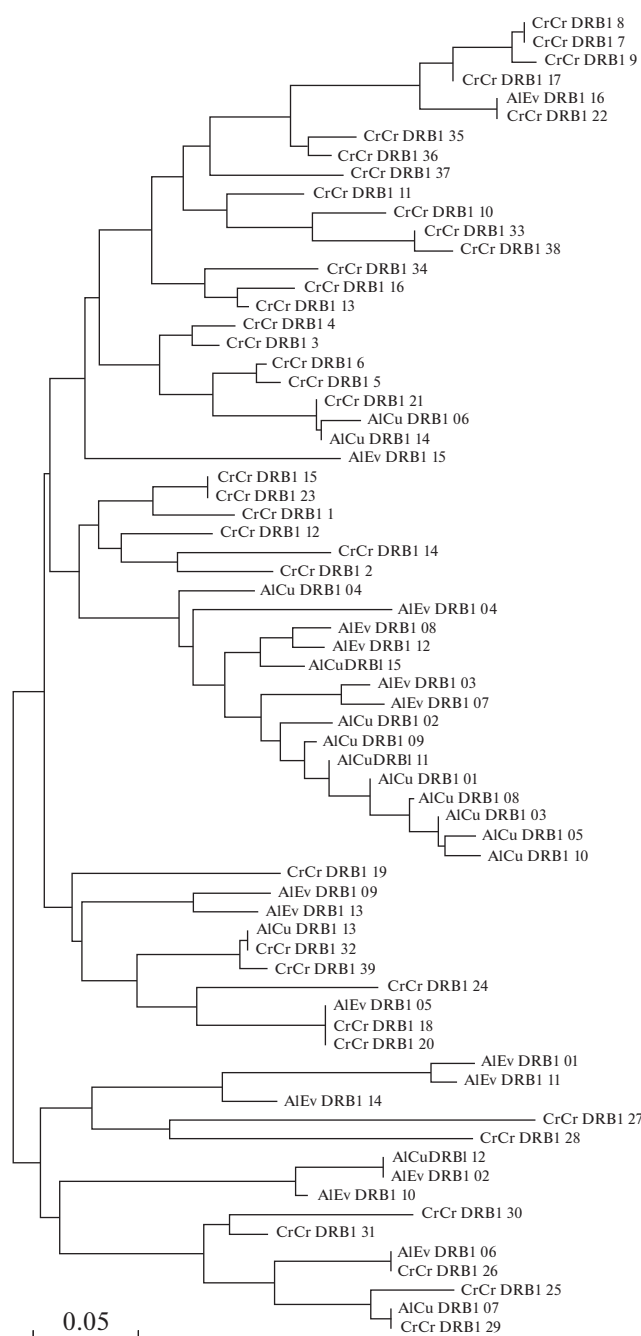


Рис. 3. Дерево NJ аминокислотных последовательностей, соответствующих аллелям экзона 2 гена DRB1 двух видов рода *Allocricetulus*, а также *Cricetus cricetus*.

Проведенный в настоящей работе анализ аллельного разнообразия экзона 2 гена DRB1 показал, что два исследованных вида различаются по степени разнообразия данного гена. Хомячок Эверсмана отличается низким индивидуальным (и региональным) разнообразием аллельного состава, однако отмеченные у вида аллели весьма дистанцированы друг от друга, что может свидетельствовать об их разной функциональной зна-

чимости (рис. 2). Монгольский хомячок, напротив, характеризуется более высоким разнообразием индивидуальных генотипов, большим числом аллелей в составе индивидуальных генотипов и меньшей долей гомозиготных особей. В то же время, большинство аллелей этого вида расположено близко друг от друга и только некоторые обособлены от основной группы (рис. 2).

Интересно, что анализ гена цитохрома *b* (*cyt b*) мтДНК тех же самых образцов показал значительно большее разнообразие этого гена и более глубокую дивергенцию у хомячка Эверсмана по сравнению с монгольским хомячком (Гуреева, 2022).

Характерно, что у двух исследованных видов обнаружен всего один общий аллель, тогда как с обыкновенным хомяком у хомячка Эверсмана три общих аллеля, а у монгольского — два. Это может свидетельствовать о большем функциональном сходстве этих аллелей у более удаленных видов. Обыкновенный хомяк, ареал которого занимает огромную площадь и охватывает самые разные биотопы, сталкивается с очень широким спектром паразитарной нагрузки, что выражается в большом разнообразии аллелей исследованного гена MHC. Некоторые из этих аллелей оказываются общими или близкими к аллелям обоих видов рода *Allocricetulus*.

Полученные результаты демонстрируют более низкое индивидуальное разнообразие аллелей гена DRB1 у хомячка Эверсмана и позволяют предполагать, что популяции этого вида на большей части ареала, подверженной большому антропогенному воздействию, являются менее благополучными по сравнению с популяциями монгольского хомячка, обитающего в условиях, не затронутых антропогенным влиянием. Внесение хомячка Эверсмана в ряд региональных красных книг России является адекватной мерой, требующей привлечения внимания к ситуации с этим видом.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИПЭЭ РАН FFER-2021-0004) при частичной финансовой поддержке РФФИ № 19-34-90059.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Воронцов Н.Н., 1960. Виды хомяков Палеарктики in statu nascendi // Доклады АН СССР. Т. 132. № 6. С. 1448–1451.
- Гуреева А.В., 2022. Филогеография и систематика рода *Allocricetulus* (Rodentia, Cricetinae). Автореф. ... дис. канд. биол. наук. М.: Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН. 27 с.
- Карасёва Е.В., 1961. Влияние распахки целины на образ жизни и территориальное распределение мы-

- шевидных грызунов в Северном Казахстане // Зоологический журнал. Т. 40. № 5. С. 768–773.
- Красная книга Курганской области, 2012. Под ред. В.Н. Большакова и др. Курган: Изд-во Курганского гос. ун-та. 448 с.
- Красная книга Республики Тыва (животные, растения и грибы), 2019. Отв. ред. С.О. Ондар, Д.Н. Шауло. Изд. 2-е. Воронеж. 560 с.
- Красная книга Тюменской области: Животные, растения, грибы, 2020. Отв. ред. О.А. Петрова. Изд. 2-е. Кемерово: ООО «ТЕХНОПРИНТ». 460 с.
- Красная книга Ульяновской области, 2015. Под науч. ред. Е.А. Артемьевой, А.В. Масленникова, М.В. Корепова. М.: Изд-во Буки Веди. 550 с.
- Красная книга Челябинской области: Животные, растения, грибы, 2017. Отв. ред. А.В. Лагунов. 2-е изд. М.: Реарт. 504 с.
- Павлинов И.Я., 2006. Систематика современных млекопитающих. М.: Изд-во МГУ. 287 с.
- Пантелеев П.А., 1998. Грызуны Палеарктики: состав и ареалы. М.: Наука. 117 с.
- Скалон Н.В., Гагина Т.В., 2004. Спасать ли краснощекого суслика в Кузнецкой степи? // Степной бюллетень. № 15. С. 42–46.
- Соколов В.Е., Орлов В.Н., 1980. Определитель млекопитающих Монгольской Народной Республики. М.: Наука. 351 с.
- Феоктистова Н.Ю., Кропоткина М.В., Потапникова Е.В., Гуреева А.В., Кузнецова Е.В., Суров А.В., 2018. Видообразование у аллопатрических видов хомячков подсемейства Cricetinae (Rodentia, Cricetidae) // Журнал общей биологии. Т. 79. № 4. С. 262–276.
- Феоктистова Н.Ю., Мещерский И.Г., Карманова Т.Н., Гуреева А.В., Суров А.В., 2022. Разнообразие аллелей главного комплекса гистосовместимости у обыкновенного хомяка (*Cricetus cricetus*) в городской и сельской популяциях // Известия Академии наук, серия биологическая. № 5. С. 470–481.
- Шилова С.А., 2011. Вопросы контроля численности и охраны сусликов России (род *Spermophilus*) // Аридные экосистемы. Т. 17. № 4. С. 104–112.
- Шилова С.А., Савинецкая Л.Е., Чабовский А.В., 2015. Долговременная современная динамика популяции желтого суслика (*Spermophilus fulvus* Rodentia, Sciridae) в Приуральских песках Заволжья // Зоологический журнал. Т. 94. № 8. С. 944–954.
- Шилова С.А., Шекарова О.Н., 2005. Суслики Евразии. Проблемы охраны // Степной бюллетень. Т. 18. С. 20–25.
- Acevedo-Whitehouse K., Cunningham A.A., 2006. Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? // Trends in Ecology and Evolution. V. 21. № 8. P. 433–438.
- Aguilar A., Roemer G., Debenham S., Binns M., Garcelon D., Wayne R.K., 2004. High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal // Proceedings of the National Academy of Sciences. V. 101. P. 3490–3494.
- Axtner J., Sommer S., 2007. Gene duplication, allelic diversity, selection processes and adaptive value of mhc class ii drb genes of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*. Immunogenetics. V. 59. P. 417–426.
- Babik W., Durka W., Radwan J., 2005. Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) // Molecular Ecology. V. 14. № 14. P. 4249–4257.
- Banaszek A., Bogomolov P., Feoktistova N., La Haye M., Monecke S., Reinert T.E., Rusin M., Surov A., Weinhold U., Ziomek J., 2020. *Cricetus cricetus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2020: e.T5529A111875852.
- Bandelt H.-J., Forster P., Röhl A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies // Molecular Biology and Evolution. V. 16. P. 37–48.
- Becker L., Nieberg C., Jahreis K., Peters E., 2009. MHC class II variation in the endangered European mink *Mustela lutreola* (L. 1761) Consequences for species conservation // Immunogenetics. V. 61. P. 281–288.
- Biedrzycka A., Kloch A., Buczek M., Radwan J., 2011. Major histocompatibility complex DRB genes and blood parasite loads in fragmented populations of the spotted suslik *Spermophilus suslicus* // Mammalian Biology. V. 76. № 6. P. 672–677.
- Biedrzycka A., Konopinski M.K., 2007. Genetic variability and the effect of habitat fragmentation in spotted suslik *Spermophilus suslicus* populations from two different regions // Conservation Genetics. № 9. P. 1211–1221.
- Bushnell B., Rood J., Singer E., 2017. BB Merge – Accurate paired shotgun read merging via overlap // PLoS ONE. V. 12. № 10: e0185056.
- Edgar R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST // Bioinformatics. V. 26. P. 2460–2461.
- Edgar R.C., 2016. UNOISE2: improved error-correction for Illumina 16S and ITS amplicon sequencing // bioRxiv 081257.
- Eklom R., Sæther S.A., Fiske P., Kålås J.A., Höglund J., 2010. Balancing selection, sexual selection and geographic structure in MHC genes of Great Snipe // Genetica. V. 18. P. 453–461.
- Flint W.E., 1966. Die Zwerghamster der Palaarktischen fauna. Wittenberg: A. Ziemsen Verlag. P. 1–99.
- Fox C.W., Reed D.H., 2011. Inbreeding depression increases with environmental stress: an experimental study and meta-analysis // Evolution. V. 65. № 1. P. 246–258.
- Gigliotti A.K., Bowen W.D., Hammill M.O., Puryear W.B., Runstadler J., Wenzel F.W., Cammen K.M., 2022. Sequence Diversity and Differences at the Highly Duplicated MHC-I Gene Reflect Viral Susceptibility in Sympatric Pinniped Species // Journal of Heredity. V. 113. № 5. P. 525–537.
- Gomez-Mestre I., Tejedo M., 2004. Contrasting patterns of quantitative and neutral genetic variation in locally adapted populations of the natterjack toad, *Bufo calamita* // Evolution. V. 58. P. 2343–2352.
- Harf R., Sommer S., 2005. Association between major histocompatibility complex class II DRB alleles and parasite load in the hairy-footed gerbil, *Gerbillurus paeba*, in the southern Kalahari // Molecular Ecology. V. 14. № 1. P. 85–91.
- Hedrick P.W., 2001. Conservation genetics: Where are we now? // Trends in Ecology and Evolution. V. 16. P. 629–636.

- Janeway C.A., 2001. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. V. 98. № 13. P. 7461–7468.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms // *Molecular Biology and Evolution*. V. 35. P. 1547–1549.
- Langmead B., Salzberg S., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2 // *Nature Methods*. V. 9. P. 357–359.
- Lebedev V.S., Bannikova A.A., Neumann K., Ushakova M.V., Ivanova N.V., Surov A.V., 2018. Molecular phylogenetics and taxonomy of dwarf hamsters *Cricetulus* Milne-Edwards, 1867 (Cricetidae, Rodentia): description of a new genus and reinstatement of another // *Zootaxa*. V. 4387. № 2. P. 331–349.
- Lobo K., Johnson P.A., Johnson J.C., Mardon A., 2021. On Genetic Rescue: A Brief Conspectus // *Academia Letters* 3554.
- Luikart G., England P.R., Tallmo D., Jordan S., Taberlet P., 2003. The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing // *Nature Reviews Genetics*. V. 4. P. 981–999.
- Madsen T., Olsson M., Wittzell H., Stille B., Gullberg A., Shine R., Andersson S., Tegelström H., 2000. Population size and genetic diversity in sand lizards (*Lacerta agilis*) and adders (*Vipera berus*) // *Biological Conservation*. V. 94. № 2. P. 257–262.
- Mammal Species of the World*, 2005. A Taxonomic and Geographic Reference. Eds Wilson D.E., Reeder D. Baltimore: The J. Hopkins University Press. V. 2. P. 1040–1041.
- McKay J.K., Latta R.G., 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits // *Trends in Ecology and Evolution*. V. 17. № 6. P. 285–291.
- Miller H.C., Allendorf F., Daugherty C.H., 2010. Genetic diversity and differentiation at MHC genes in island populations of tuatara (*Sphenodon* spp.) // *Molecular Ecology*. V. 19. P. 3894–3908.
- Miller H.C., Miller K.A., Daugherty C.H., 2008. Reduced MHC variation in a threatened tuatara species // *Animal Conservation*. V. 11. P. 206–214.
- Neumann K., Michaux J.R., Maak S., Jansman H.A., Kayser A., Mundt G., Gattermann R., 2005. Genetic spatial structure of European common hamsters (*Cricetus cricetus*) – a result of repeated range expansion and demographic bottlenecks // *Molecular Ecology*. V. 14. № 5. P. 1473–483.
- O'Brien S.J., Evermann J.F., 1988. Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations // *Trends in Ecology and Evolution*. V. 3. № 10. P. 254–259.
- Palo J.U., O'Hara R.B., Laugen A.T., Laurila A., Primmer C.R., Merila J., 2003. Latitudinal divergence of common frog (*Rana temporaria*) life history traits by natural selection: Evidence from a comparison of molecular and quantitative genetic data // *Molecular Ecology*. V. 12. P. 1963–1978.
- Pfrender M.E., Spitze K., Hicks J., Morgan K., Latta L., Lynch M., 2000. Lack of concordance between genetic diversity estimates at the molecular and quantitative-trait levels // *Conservation Genetics*. V. 1. P. 263–269.
- Radwan J., Biedrzycka A., Babik W., 2010. Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? // *Biological Conservation*. V. 143. P. 537–544.
- Reed D.H., Frankham R., 2001. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta-analysis // *Evolution*. V. 55. P. 1095–1110.
- Shiina T., Yamada Y., Aarnink A., Suzuki S., Masuya A., Ito S., Ido D., Yamanaka H., Iwatani C., Tsuchiya H., Ishigaki H., Itoh Y., Ogasawara K., Kulski J.K., Blancher A., 2015. Discovery of novel MHC-class I alleles and haplotypes in Filipino cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) by pyrosequencing and Sanger sequencing // *Immunoge*. V. 67. № 10. P. 563–578.
- Smith A.T., Xie Y., 2008. A Guide to the Mammals of China. United Kingdom: Princeton University Press. P. 240.
- Smulders M.J.M., Snoek L.B., Booy G., Vosman B., 2003. Complete loss of MHC genetic diversity in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands. Consequences for conservation strategies // *Conservation Genetics*. V. 4. № 4. P. 441–451.
- Sommer S., 2005. The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation // *Frontiers in Zoology*. V. 2. № 16. P. 1–18.
- Surov A., Banaszek A., Bogomolov P., Feoktistova N., Monecke S., 2016. Dramatic global decrease in the range and reproduction rate of the European hamster *Cricetus cricetus* // *Endangered species research*. V. 31. P. 119–145.
- Ujvari B., Belov K., 2011. Major histocompatibility complex (MHC) markers in conservation biology // *International Journal of Molecular Sciences*. V. 12. P. 5168–5186.
- Ujvari B., Olsson M., Madsen T., 2005. Discrepancy in mitochondrial and nuclear polymorphism in meadow vipers (*Vipera ursinii*) questions the unambiguous use of mtDNA in conservation studies // *Amphibia-Reptilia*. V. 26. P. 287–292.
- Villesen P., 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences // *Molecular Ecology Notes*. V. 7. P. 965–968.
- Willi Y., Van Buskirk J., Hoffmann A.A., 2006. Limits to the adaptive potential of small populations // *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. V. 37. P. 433–458.
- Winternitz J.C., Wares J.P., 2013. Duplication and population dynamics shape historic patterns of selection and genetic variation at the major histocompatibility complex in rodents // *Ecology and Evolution*. V. 3. № 6. P. 1552–1568.
- Zhu L., Ruan X.D., Ge Y.F., Wan Q.H., Fang S.G., 2007. Low major histocompatibility complex class II DQA diversity in the giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) // *BMC Genetics*. V. 8: 29.

ALLELE DIVERSITY OF THE MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX GENE DRB1 IN TWO SPECIES OF HAMSTER OF THE GENUS *ALLOCRICETULUS* Argyropulo 1932

I. G. Meschersky^{1, *}, N. Y. Feoktistova^{1, **}, A. V. Gureeva^{1, ***}, A. V. Surov^{1, ****}

¹*Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences,
Ul. Leninsky Prospekt 33, Moscow, 119071 Russia*

**e-mail: meschersky@rambler.ru*

***e-mail: Feoktistovanyu@gmail.com*

****e-mail: anngureeva@gmail.com*

*****e-mail: surov@sevin.ru*

For the first time, the allelic diversity of exon 2 of the DRB1 gene (class II of the major histocompatibility complex, MHC) was determined by NGS sequencing in natural populations of two species of the genus *Allocricetulus*: Eversmann's hamster (*A. eversmanni*) and the Mongolian hamster (*A. curtatus*). These species are genetically close, but allopatric and demonstrate different habitat preferences. Eversmann's hamster inhabits the steppes and is often associated with agrocenosis, while the Mongolian hamster occurs in semi-deserts and deserts, where anthropogenic pressure is practically absent. Our analysis revealed a significant effect of positive selection on the diversity of alleles of the DRB1 gene in both study species. However, Eversmann's hamster is characterized by a large average distance between alleles, but a smaller proportion of heterozygous individuals, while the Mongolian hamster is characterized by a larger individual variety of alleles. Thus, despite the extensive range of Eversmann's hamster, we noted significantly less functional diversity of adaptive genes, which may be due to an increased anthropogenic exposure.

Keywords: *Allocricetulus curtatus*, *A. eversmanni*, MHC class II, targeted sequencing, genetic diversity, pathogen load, natural selection