ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ мтДНК В ПОВОЛЖСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ЧЕРНОГО КОРШУНА (*MILVUS MIGRANS BODDAERT, 1783*)

М. Д. Симаков¹, М. В. Корепов², А. А. Кузьмин³, С. В. Титов⁴

^{1, 4} Пензенский государственный университет, Россия, 440026, г. Пенза, ул. Красная, 40

² Ульяновский государственный педагогический университет имени И. Н. Ульянова, Россия, 432071, г. Ульяновск, пл. Ленина, 4/5

³ Пензенский государственный технологический университет, Россия, 440039, г. Пенза, проезд Байдукова/ул. Гагарина, 1а/11

¹ maksimakov@bk.ru, ² korepov@list.ru, ³ kuzmin-puh@yandex.ru, ⁴ svtitov@yandex.ru

Аннотация. Актуальность и цели. Черный коршун (*Milvus migrans* Boddaert, 1783) является одним из распространенных видов дневных хищных птиц Поволжья. Коршун консервативен в выборе мест гнездования и использует одно и то же гнездо несколько лет подряд. Новые гнезда *M. migrans* строит редко. На территории Поволжья черный коршун образует устойчивые перелетные популяции, характеризующиеся, вследствие присущему виду гнездовому консерватизму, постоянством пространственного распределения особей. Этот вид дневных хищных птиц является удобной моделью для исследований популяционного полиморфизма. Целью работы было изучение полиморфизма поволжской популяции черного коршуна (*M. migrans* Bodd.) по данным анализа изменчивости контрольного региона (D-loop) митохондриальной ДНК. **Материалы и методы.** Материалом для работы послужил биоматериал, собранный неинвазивными методами в ходе полевых исследований 2017–2019 гг. поволжской популяции черного коршуна (*M. migrans* Bodd.). Всего собрано 47 образцов перьев, из 29 удалось выделить ДНК. Для генетического анализа образцов ДНК использовали фрагмент (357 пн) гипervарибельного контрольного региона (D-loop) мтДНК. Секвенирование фрагментов контрольного региона мтДНК ($n = 25$) проводили на секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems). Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие было изучено с помощью программы DnaSP 5.10.01. Для реконструкции филогенетических отношений использовали методы максимального правдоподобия (ML) и ближайшего соседа (NJ) в программах MEGA X и MrBayes 3.2.7. Медианная сеть (Median Joining) митохондриальных гаплотипов была построена в программе PopART с использованием алгоритма TCS. Помимо полученных с территории Поволжья последовательностей были проанализированы 5 гаплотипов контрольного региона мтДНК *M. migrans*, характеризующих популяцию коршунов в южной Испании и 10 – *M. milvus*, описывающих полиморфизм красного коршуна в Европе, а также 2 гаплотипа подвида красного коршуна *M. milvus fasciicauda*. Для статистической обработки результатов для всех тестов был установлен уровень значимости $p < 0.05$. **Результаты.** Выявленное гаплотипическое разнообразие ($h = 16$) европейской популяции черного коршуна по контрольному региону мтДНК является широким по своему размаху ($Hd = 0.924$) и имеет некоторые региональные особенности (испанская популяция – $h = 5$, поволжская популяция – $h = 14$). По всей видимости, это разнообразие окажется еще большим при увеличении размеров выборки. Наибольший уровень средней эволюционной дивергенции (p , дистанция) по парам последовательностей был обнаружен в гаплогруппе европейского черного коршуна (Mmg) – 1.4 ± 0.4 %. Оценка средней эволюционной дистанции между анализируемыми гаплогруппами показала, что она максимальна при сравнении гаплогруппы *M. migrans* с гаплогруппами *M. milvus*: Mmg/Mml – 2.9 ± 0.9 %; Mmg/Mmf – 3.2 ± 1.1 %. Результаты анализа среднего эволюционного разнообразия (π) выделенных гаплогрупп свидетельствуют о низком уровне их дифференциации. **Заключение.** Проведенный анализ дивергенции и разнообразия гаплотипов контрольного региона мтДНК не позволяет с высокой долей уверенности утверждать о существовании подразделенной генетической структуры ареала европейского черного коршуна, хотя наличие подразделенных генетических линий в нем очевидно. При расширении аналитической выборки, за счет охвата новых территорий ареала, вполне ожидаемо выявление структурированности области распространения *M. migrans migrans*.

Ключевые слова: *Milvus migrans*, контрольный регион, мтДНК, гаплотипическое разнообразие

Благодарности. Выражаем благодарность за предоставление некоторых образцов перьев черного коршуна Глушенкову Олегу Владимировичу, ведущему научному сотруднику Государственного природного заповедника «Присурский» и национального парка «Чаваш Вармане», и Кореповой Дарье Александровне, заведующему отделом природы Ульяновского областного краеведческого музея имени И. А. Гончарова.

Для цитирования: Симаков М. Д., Корепов М. В., Кузьмин А. А., Титов С. В. Генетическое разнообразие мтДНК в поволжской популяции черного коршуна (*Milvus migrans* Boddaert, 1783) // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2021. Vol. 6 (1). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2021-1-5>

GENETIC DIVERSITY OF mtDNA IN THE VOLGA BLACK KITE POPULATION (*MILVUS MIGRANS* BODDAERT, 1783)

M. D. Simakov¹, M. V. Korepov², A. A. Kuzmin³, S. V. Titov⁴

^{1,4} Penza State University, 40 Krasnaya street, Penza, 440026, Russia

² Ulyanovsk State Pedagogical University named after I. N. Ulyanov, 4/5 Lenin square, Ulyanovsk, 432071, Russia

³ Penza State Technological University, 1A / 11 Baidukova proezd / Gagarina street, Penza, 440039, Russia

¹ maksimakov@bk.ru, ² korepov@list.ru, ³ kuzmin-puh@yandex.ru, ⁴ svtitov@yandex.ru

Abstract. *Background.* Black kite (*Milvus migrans* Boddaert, 1783) is a common diurnal bird of prey in Volga Region. Kites are very conservative in a choice of places for nesting and usually use the same nest for several years. *M. migrans* rarely built new nest. On the territory of Volga Region black kite forms stable migratory populations which due to nesting conservatism are characterized by constancy of individuals' spatial distribution. This species of diurnal birds of prey is a convenient model for study of population polymorphism. Purpose of article is studying of polymorphism in black kite's Volga population basing on analysis of mtDNA control region variability data. *Materials and methods.* Sample of probes were collected in a black kite's Volga population during field studies in 2017–2019 using noninvasive methods. Sample includes 47 probes of feathers, from 29 of them DNA was obtained. For genetic analysis fragments of hyper variable control region of mtDNA (357bp) were used. Sequencing (n = 25) was carried out with ABI3500 (Applied Biosystems) sequencer. Haplotype and nucleotide diversity was studied in DnaSP 5.10.01. For reconstruction of phylogenetic relations methods of maximum likelihood and nearest-neighbor were implemented using MEGA X and MrBayes 3.2.7. Median joining of mitochondrial haplotypes was constructed in PopART using TCS algorithm. Also 5 similar mtDNA region haplotypes of Black kites from South Spain population, 10 haplotypes of Red kites from European population and 2 haplotypes of Red kite's subspecies *M. milvus fasciicauda* were analyzed. Significance level for all statistical tests is $p < 0.05$. *Results.* Haplotype's diversity ($h = 16$) revealed in Black kite's European population is wide in its range ($H_d = 0.924$) and has some regional features (Spanish population – $h = 5$, Volga population – $h = 14$). Probably diversity will increase with increasing of sample size. Maximum level of mean evolution divergence (p , distance) for pairs of sequences was revealed in European Black kite haplogroup (Mmg) – 1.4 ± 0.4 %. Estimation of mean evolution distance between haplogroups shows maximum between *M. migrans* and *M. milvus*: Mmg/Mml – 2.9 ± 0.9 %, *M. migrans* and *M. milvus fasciicauda*: Mmg/Mmf – 3.2 ± 1.1 %. Results of mean evolution diversity (p) in haplogroups show low level of differentiation inside groups. *Conclusion.* Divergence and diversity analysis of mtDNA control region haplotypes did not reveal subdivision of genetic structure in European black kite area but presence of subdivided genetic lines is obvious. With increasing of sample size by coverage of new territories within area revealing of subdivision in genetic structure is quite expected.

Keywords: *Milvus migrans*, control region, mtDNA, haplotype diversity

Acknowledgments. We would like to express our gratitude for providing some samples of black kite feathers to Oleg Vladimirovich Glushenkov, a leading researcher of the Priskurskiy State Nature Reserve and Chavash Varmane Bor National Park, and to Daria Alexandrovna Korepova, Head of the Nature Department of the Goncharov Ulyanovsk Local History Museum.

For citation: Simakov M.D., Korepov M.V., Kuzmin A.A., Titov S.V. Genetic diversity of mtDNA in the Volga black kite population (*Milvus migrans* Boddaert, 1783). *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2021;6(1). (In Russ.). Available from: <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2021-1-5>

Черный коршун (*Milvus migrans* Boddaert, 1783) является одним из распространенных видов дневных хищных птиц Поволжья [1–3]. *Milvus migrans* обитает по речным долинам, на обширных низменностях и по берегам крупных озер и рек, где фрагменты леса (рельки и колки) чередуются с болотами, лугами и сельскохозяйственными землями [4]. Большинство исследователей подчеркивают явное тяготение коршуна к водоемам [5–7 и др.]. Анализ литературных данных показывает, что биотопические предпочтения черного коршуна определяют сочетание оптимальных условий для его

обитания. Прежде всего это наличие подходящих мест для гнездования в относительной близости открытых участков, которые активно используются *M. migrans* в качестве кормовых биотопов [8]. Излюбленными гнездовыми биотопами *M. migrans* являются различные густые широколиственные, смешанные и хвойные леса по береговым склонам рек, водохранилищ и озер. На гнездовании коршун не избегает населенных пунктов, а в сельскохозяйственных районах даже гнездится близ них на расстоянии 0.5–4 км [9]. В лесостепной и лесной зонах в естественных местообитаниях коршуны гнез-

дятся отдельными парами на охраняемых от особей своего вида гнездовых участках. Границами участка обычно выступают естественные элементы ландшафта (дороги, окраины населенных пунктов, берега водных объектов, лесополосы и др.) [10]. Коршун консервативен в выборе мест гнездования и использует одно и то же гнездо несколько лет подряд. Новые гнезда *M. migrans* строит редко [2, 8, 9, 11–13].

В систематическом отношении на территории РФ черный коршун представлен двумя подвидами из пяти: европейским (*M. migrans migrans* Boddaert, 1783), распространенным в центральной, южной и восточной Европе, и черноухим (*M. migrans lineatus* Gray, 1831), обитающим в Сибири и Приамурье [1–3]. При этом европейский подвид черного коршуна на европейской части РФ образует зону симпатрии с морфологически близким номинальным подвидом красного коршуна (*M. milvus milvus* Linnaeus, 1758) [2]. В условиях совместного содержания в неволе эти два близких вида коршунов могут скрещиваться и давать гибридное потомство. Сведений о случаях естественной гибридизации нет, хотя бытует мнение, что эндемичный (о-ва Зеленого Мыса) подвид красного коршуна (*M. milvus fasciicauda* Hartert, 1914), характеризующийся переходными между двумя видовыми формами морфологическими признаками, имеет гибридогенное происхождение [2].

Таким образом, на территории Поволжья черный коршун образует устойчивые перелетные популяции, характеризующиеся вследствие присущему виду гнездовому консерватизму постоянством пространственного распределения особей. Этот вид дневных хищных птиц является удобной моделью для исследований популяционного полиморфизма.

Целью работы было изучение полиморфизма поволжской популяции черного коршуна (*M. migrans* Bodd.) по данным анализа изменчивости контрольного региона (D-loop) митохондриальной ДНК.

Материал и методы

Материалом для работы послужил биоматериал, собранный неинвазивными методами в ходе полевых исследований 2017–2019 гг. поволжской популяции черного коршуна (*M. migrans* Bodd.). Для выделения ДНК по стандартной методике фенолхлороформной экстракции после обработки материала протеиназой К и SDS [14, 15] использовали линные перья взрослых птиц, преимущественно маховые и рулевые, собранные под жилыми гнездами коршунов, а также у птиц, содержащихся в неволе. Всего собрано 47 образцов, из 29 удалось выделить ДНК (табл. 1).

Таблица 1

Образцы ДНК черных коршунов поволжской популяции (*Milvus migrans* Bodd.)

Table 1

DNA samples of black kites of the Volga population (*Milvus migrans* Bodd.)

№ п/п	№ образца	Адрес	Координаты
1	2	3	4
1.	13 Mmg	Саратовская обл., Краснокутский р-н, окр-ти с. Дьяковка	N 50.779191, E 46.785141
2.	14 Mmg		
3.	15 Mmg		
4.	25 Mmg	Пензенская обл., Пензенский р-н, окр-ти с. Золотаревка	N 53.043218, E 45.269667
5.	26 Mmg	Пензенская обл., Мокшанский р-н, окр-ти с. Рамзай	N 53.311837, E 44.783864
6.	76 Mmg	Чувашская Республика, Комсомольский р-н, окр-ти с. Александровка	N 55.252965, E 47.572089
7.	77 Mmg	Пензенская обл., Шемышейский р-н, окр-ти с. Усть-Уза	N 52.965789, E 45.350820
8.	78 Mmg	Пензенская обл., Шемышейский р-н, окр-ти с. Шемышейка	N 52.890919, E 45.344772
9.	79 Mmg	Пензенская обл., Шемышейский р-н, окр-ти с. Шемышейка	N 52.910583, E 45.330806
10.	80 Mmg	Пензенская обл., Шемышейский р-н, окр-ти с. Новая Яксарка	N 53.000331, E 45.359401
11.	81 Mmg	Пензенская обл., Тамалинский р-н, окр-ти с. Варварино	N 52.451666, E 43.300426
12.	85 Mmg	Пензенская обл., Шемышейский р-н, окр-ти с. Ленинка	N 53.009182, E 45.298628
13.	93 Mmg	Пензенская обл., г. Пенза, р-н Шуист	N 53.222444, E 45.030500
14.	95 Mmg	Пензенская обл., Шемышейский р-н, окр-ти с. Усть-Уза	N 52.965789, E 45.350820
15.	124 Mmg	г. Ульяновск, Центр спасения птиц	N 54.294084, E 48.301125
16.	125 Mmg	Ульяновская обл., Радищевский р-н, окр-ти с. Соловчиха	N 52.955583, E 47.791861
17.	126 Mmg	Ульяновская обл., Цильнинский р-н, окр-ти пос. Цильна	N 54.594771, E 48.110794

Окончание табл. 1

End of Table 1

1	2	3	4
18.	127 Mmg	Ульяновская обл., Старомайский р-н, окр-ти с. Красная Река	N 54.602233, E 49.114725
19.	128 Mmg	Ульяновская обл., Старокулатский р-н, окр-ти с. Старый Мостяк	N 52.704137, E 47.417796
20.	129 Mmg	Ульяновская обл., Николаевский р-н, окр-ти с. Куроедово	N 53.124005, E 47.411904
21.	130 Mmg	Ульяновская обл., окр-ти пос. Цильна	N 54.614160, E 48.188436
22.	239 Mmg	Чувашская Республика, окр-ти г. Новочебоксарск	N 56.057918, E 47.524645
23.	241 Mmg	Пензенская обл., Шемышейский р-н, окр-ти с. Усть-Уза	N 52.965806, E 45.350806
24.	243 Mmg	Пензенская обл., Шемышейский р-н, окр-ти с. Усть-Уза	N 52.971532, E 45.351977
25.	244 Mmg	Пензенская обл., Пензенский р-н, окр-ти с. Саловка	N 53.112833, E 44.776889
26.	245 Mmg	Пензенская обл., Неверкинский р-н, окр-ти с. Старая Андреевка	N 52.856990, E 46.598420
27.	246 Mmg	Пензенская обл., Камешкирский р-н, окр-ти с. Мордовский Камешкир	N 52.945120, E 46.196970
28.	247 Mmg	Пензенская обл., Кузнецкий р-н, окр-ти с. Болтино	N 52.991170, E 46.153310
29.	248 Mmg	Пензенская обл., Городищенский р-н, окр-ти с. Мордовский Ишим	N 53.192875, E 45.646438

Для генетического анализа образцов ДНК использовали фрагмент (357 пн) гипервариабельного контрольного региона (D-loop) мтДНК при использовании праймеров, примененных для красного коршуна: Mil 1/F (5'-ATAATGCACTATCATGGG-3') и Mil 2/R (5'-GGGCAAAGAATGGTC-3') [16]. Полимеразную цепную реакцию (PCR) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-HCl (pH 8.9), 20 мМ сульфат аммония, 20 мкМ ЭДТА, 150 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (200 мкМ каждого), 2 мМ хлористый магний, 15 пмоль каждого из праймеров, 2 ед. активности Taq-полимеразы и 0.1–0.2 мкг ДНК.

Секвенирование фрагментов контрольного региона мтДНК ($n = 25$) проводили на секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems) с использованием набора реактивов BigDye® Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kits при первоначальной подготовке проб в амплификаторе SimpliAmp™ Thermal Cycler. Нуклеотидные последовательности были прочитаны и отредактированы с помощью программы BioEdit 7.1.3.0 [17]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли по алгоритму ClustalW в программе MEGA X с обязательной доводкой вручную [18].

Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие было изучено с помощью программы DnaSP 5.10.01 [19]. Для реконструкции филогенетических отношений использовали методы максимального правдоподобия (ML) и присоединения соседа (NJ) в программе MEGA X [20] и метод максимального правдоподобия (ML) в программе MrBayes 3.2.7 [21]. При визуализации филогенетических связей за основу была взята топология байесовского дерева. Байесовский анализ проводили в два одновременных запуска по 1 000 000 поколений с частотой регистрации

параметров каждые 100 поколений. Первые 25 % поколения были исключены как обучающие. Статистическая достоверность порядка ветвления оценивалась с помощью бутстрэп-анализа 1000 альтернативных деревьев (процент бутстрэпа, %) и байесовских апостериорных вероятностей (%). Модель, наилучшим образом описывающая эволюционные изменения исследуемых последовательностей, была определена в программах jModelTest 2.1.10 [22] и MEGA X на основе байесовского информационного критерия (BIC). Медианная сеть (Median Joining) митохондриальных гаплотипов была построена в программе PopART [23] с использованием алгоритма TCS [24].

Полученные в ходе исследования нуклеотидные последовательности вновь выявленных гаплотипов контрольного региона мтДНК черного коршуна были депонированы в GenBank NCBI под Acc.No.: MW885755–MW885768 (гаплотипы 6–16) (табл. 2). Помимо полученных с территории Поволжья последовательностей были проанализированы 5 гаплотипов контрольного региона мтДНК *M. migrans* (Mmg) (Acc.No.: AY762224–AY574885), характеризующих популяцию коршунов в южной Испании и 10 – *M. milvus* (Mml) (Acc.No.: AY762214–AY762223), описывающих полиморфизм красного коршуна в Европе [16], а также 2 гаплотипа подвида красного коршуна *M. milvus fasciicauda* (Mmf) (Acc.No.: AY994496, AY994497) [25]. В качестве внешней группы в филогенетических построениях была использована последовательность контрольного региона мтДНК обыкновенного канюка (*Buteo buteo* Linnaeus, 1758) (Acc.No.: AY299609) [26].

Для статистической обработки результатов для всех тестов был установлен уровень значимости $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

Проведенные молекулярно-генетические исследования позволили описать 11 новых гаплотипов (митотипов) контрольного региона мтДНК черного коршуна. Все перья, из которых были выделены образцы ДНК вновь типированных митотипов, были собраны на территории Поволжья.

Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие поволжской популяции черного коршуна оценивали по результатам анализа изменчивости фрагментов (334 пн) контрольного региона (D-loop) мтДНК (DnaSP 5.10.01). При этом вследствие отсутствия «случайности» формирования имеющейся аналитической выборки

использовали только неповторяющиеся нуклеотидные последовательности ($n = 11$) в поволжской популяции *M. migrans* и последовательности пяти гаплотипов черных коршунов с юга Испании.

Число сегрегирующих сайтов составило 6, число мутаций – 10. Было выделено 16 гаплотипов (h), гаплотипическое разнообразие (Hd) составило 0.9241, нуклеотидное разнообразие (Pi) 0.00828, среднее число нуклеотидных различий (k) – 2.759 (см. табл. 2). При этом выявлена низкая дисперсия разнообразия гаплотипов (0.00099; Fu's F_s statistic – 8.900, Strobeck's S statistic 1.000), а вероятность того, что число гаплотипов равно только 16, составляет 0 %.

Таблица 2

Гаплотипы (митотипы) фрагментов (334 пн) мтДНК (control region, D-loop) черных коршунов.
Во второй колонке указаны характерные нуклеотидные замены
и номер их позиций в последовательности

Table 2

Haplotypes (mitotypes) of mitochondrial DNA (control region, D-loop) of black kites.
The second column shows the characteristic nucleotide substitutions
and the number of their positions in the sequence

Гап- тип	2	5	9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	№ образца, Асс.Но секвенса	Регион*
	5	2	4	7	0	1	7	1	1	2	8	9	3	6	7	3		
Нар 1	T	C	C	T	G	G	C	C	G	A	A	C	G	T	C	T	AY762224	И
Нар 2	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	AY762225, Mmg – 125, 127, 243, 246	И, П, У
Нар 3	C	T	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	AY762226, Mmg – 81, 245	И, П
Нар 4	C	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	AY762227, Mmg – 93	И, П
Нар 5	C	T	T	.	.	.	T	.	A	G	.	.	.	.	.	.	AY762228, Mmg – 244	И, П
Нар 6	C	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Mmg – 13, 76 (MW885755, MW885756)	С, Ч
Нар 7	C	T	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	Mmg – 26 (MW885757)	П
Нар 8	C	T	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Mmg – 77 (MW885758)	П
Нар 9	C	T	T	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	G	.	Mmg – 80 (MW885759)	П
Нар 10	C	T	T	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	C	Mmg – 85, 95, 126 (MW885760–62), 241	П, У
Нар 11	.	T	T	.	.	.	.	T	.	.	C	A	.	.	.	.	Mmg – 124 (MW885763)	У
Нар 12	C	T	T	.	.	A	T	.	A	.	.	.	.	.	.	C	Mmg – 128 (MW885764)	У
Нар 13	C	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	Mmg – 129 (MW885765)	У
Нар 14	C	T	T	.	.	A	.	.	A	.	.	.	T	.	.	C	Mmg – 130 (MW885766)	У
Нар 15	.	T	T	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	Mmg – 239 (MW885767)	Ч
Нар 16	C	T	T	G	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	Mmg – 248 (MW885768)	П

*Обозначение регионов: И – юг Испании (Roques, Negro, 2005), П – Пензенская, С – Саратовская, У – Ульяновская области, Ч – Чувашская Республика.

Анализ распределения гаплотипов контрольного региона мтДНК по двум изолированным популяциям черного коршуна (Испания и Поволжье) не выявил какой-либо закономерности. Однако в этих популяциях присутствуют специфические митотипы. Для испанской популяции таким гаплотипом явля-

ется Нар 1, а для поволжской – 11 гаплотипов (Нар 6–16). При этом четыре «испанских» гаплотипа (Нар 2–5) были выявлены также и в поволжской популяции, в средневолжской ее части: Нар 2 – в Пензенской и Ульяновской области, Нар 3–5 – в Пензенской области.

Проведенный тест Таджимы выявил особенность популяционной структуры черного коршуна в Европе на примере двух пространственно разделенных популяций. Отрицательное значение показателя Tajima's D (-1.076 ; $p > 0.10$) свидетельствует о низком числе выявленных митотипов по сравнению с числом сегрегирующих сайтов. Низкие частоты редких митотипов указывают на возможный рост населения после прохождения популяциями состояния «бутылочного горлышка» в период депрессии численности. Именно на такую демографическую экспансию указывают отрицательные ($p > 0.10$) показатели F_u и L_i 's D^* и F_u и L_i 's F^* : -0.682 и -0.946 .

Таким образом, выявленное гаплотипическое разнообразие европейской популяции черного коршуна по контрольному региону мтДНК является широким по своему размаху и имеет некоторые региональные особенности. По всей видимости, это разнообразие окажется еще большим при увеличении размеров выборки, а маркер D-лооп мтДНК является вполне эффективным для филогеографической реконструкции видового ареала черного коршуна.

С целью изучения полиморфизма митохондриальной ДНК были проведены NJ- и ML-анализы последовательностей фрагментов (262 пн) D-лооп мтДНК, представляющих гаплотипы коршуна – *M. migrans migrans* ($n = 16$), *M. milvus milvus* ($n = 10$) и *M. milvus fasciicauda* ($n = 2$) (MEGA X и MrBayes). При этом мы намеренно включили в выборку только уникальные последовательности секвенсов, исключая их повторение. Наиболее подходящей моделью для описания филогенетических отношений между гаплотипами при построении дендрограммы оказалась модель Хасэгавы-Кишино-Яно (HKY+I, $-\ln L = 750.66$, BIC = 1852.12; jModelTest), а для описания уровня эволюционной дифференциации и разнообразия гаплотипов – 2-параметрическая модель Кимуры (K2+G (0.4), $-\ln L = 760.94$, BIC = 2050.58; MEGA).

Дендрограмма, построенная с учетом неравномерности скорости эволюционных изменений нуклеотидных последовательностей и показывающая филогенетические отношения гаплотипов контрольного региона мтДНК коршуна, позволила объединить их в гаплогруппы, соответствующие двум подвидам двух симпатрических видов – *M. migrans migrans* и *M. milvus milvus* (рис. 1).

Верхняя гаплогруппа (Mmg), сформированная гаплотипами европейского черного коршуна, характеризуется заметной структурированностью. В ней с высоким уровнем поддержки вероятности выделяются три кластера – кластер А, сформированный гаплотипами с юга и

севера Ульяновской области; кластер В, объединяющий гаплотипы центра Пензенской области; кластер С, сформированный гаплотипами с центра Ульяновской области и севера Чувашской Республики (см. табл. 1, 2). При этом такое объединение гаплотипов в большей степени свидетельствует о существовании отдельных генетических линий в области распространения *M. migrans migrans*, а не отражает возможную подразделенную структуру ареала европейского черного коршуна. Нижняя гаплогруппа (Mml), представленная гаплотипами номинального подвида красного коршуна *M. milvus milvus* и эндемичного подвида *M. milvus fasciicauda*, является слабо дифференцированной, в ней не были выявлены отдельных кластеров гаплотипов мтДНК. При этом также заметна определенная ее однородность и при сравнении гаплотипов двух подвигов красного коршуна – *M. milvus milvus* и *M. milvus fasciicauda*.

Анализ генетической изменчивости фрагмента контрольного региона мтДНК по выделенным в ходе филогенетического анализа гаплогруппам, соответствующим двум подвидам двух симпатрических видов коршунов, и гаплогруппы эндемичного подвида красного коршуна *M. milvus fasciicauda* выявил следующие результаты.

Наибольший уровень средней эволюционной дивергенции (p , дистанция) по парам последовательностей был обнаружен в гаплогруппе европейского черного коршуна (Mmg) – 1.4 ± 0.4 %. Для гаплогруппы эндемичного (Mmf) и номинального подвигов красного коршуна (Mml) этот показатель оказался чуть ниже – 1.2 ± 0.8 % и 1.1 ± 0.4 % соответственно. Оценка средней эволюционной дистанции между анализируемыми гаплогруппами показала, что она максимальна при сравнении гаплогруппы *M. migrans* с гаплогруппами *M. milvus*: Mmg/Mml – 2.9 ± 0.9 %; Mmg/Mmf – 3.2 ± 1.1 %. В то же время сравнение гаплогрупп двух подвигов красного коршуна (Mml/Mmf) показывает их эволюционную близость: -1.1 ± 0.4 %.

Результаты анализа среднего эволюционного разнообразия (π) выделенных гаплогрупп свидетельствуют о низком уровне их дифференциации. Уровень среднего эволюционного разнообразия максимален для всей выборки гаплотипов – 0.0213 ± 0.0062 . Далее этот показатель понижается при оценке разнообразия в отдельных гаплогруппах – 0.0123 ± 0.0035 и достигает минимума при межгрупповом сравнении – 0.0091 ± 0.0047 . Такую тенденцию косвенно подтверждают и значения коэффициента эволюционной дифференциации гаплотипов коршуна – 0.424 ± 0.158 .

Рис. 1. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений гаплотипов коршунов *M. migrans migrans* (Mmg), *M. milvus milvus* (Mml) и *M. milvus fasciicauda* (Mmf) на основе анализа последовательностей контрольного региона мтДНК (262 пн) методом максимального правдоподобия (ML) в Байесовском анализе ($p = 0.0109$).

Внешняя группа – обыкновенный канюк (*Buteo buteo*). Цифры в узлах указывают на уровень бутстреп-поддержки. Байесовские апостериорные вероятности указаны в порядке присоединения соседей/максимального правдоподобия/байесовского анализа. Фото птиц на рисунке: *M. migrans* – © Александр Гончаров, *M. milvus* – © Thomas Kraft, *Buteo buteo* – © Светлана Медведева

Fig. 1. Dendrogram of phylogenetic relationships of haplotypes of kites *M. migrans migrans* (Mmg), *M. milvus milvus* (Mml) и *M. milvus fasciicauda* (Mmf) on the basis of analysis of mtDNA control region sequences (262 bp) using the maximum likelihood method in Bayesian analysis ($p = 0.0109$). Outgroup – common buzzard (*Buteo buteo*). The numbers in the nodes indicate the level of bootstrap support. The Bayesian a posteriori probabilities are listed in order neighbour-joining/maximum likelihood/Bayesian analysis. Photo of birds in the figure: *M. migrans* – © Alexander Goncharov, *M. milvus* – © Thomas Kraft, *Buteo buteo* – © Svetlana Medvedeva

Для проведения более точной кластеризации анализируемых гаплотипов коршунов и выяснения микроэволюционных событий между ними была построена медианная сеть гаплотипов контрольного региона мтДНК (рис. 2) в двух вариантах: медианная сеть гаплотипов

красного (*M. milvus milvus* (Mml), *M. milvus fasciicauda* (Mmf)) и европейского черного коршунов (*M. migrans migrans* (Mmg)) (262 пн) и медианная сеть гаплотипов только европейского черного коршуна (*M. migrans migrans* (Mmg)) (334 пн). В первом варианте сеть по-

строена на основании 24 сегрегирующих и 14 информативных сайтов. Нуклеотидное разнообразие (π) вошедших в сеть последовательностей составила 0.212, коэффициент дифференциации (F_{ST}) – 0.608 ($p < 0.001$), а тест Таджимы выявил близкую к стабилизации генетической структуры изучаемых гаплогрупп коршунов $T's D = -0.592$, при $p = 0.703$. В це-

лом она подтверждает данные, полученные при ML-анализе выше. Результаты медианного теста указывает на существование двух генетически близких групп последовательностей фрагмента контрольного региона мтДНК, соответствующих европейским видовым формам: *M. milvus* и *M. migrans*.

Fig. 2. Median haplotype networks based on mtDNA control region sequences: A – red (*M. milvus milvus* (Mml), *M. milvus fasciicauda* (Mmf) and European black kites (*M. migrans migrans* (Mmg) (262 bp) and B – only European black kites (*M. migrans migrans* (Mmg) (334 bp). Transverse strokes and numbers on the branches show the number of mutational events. The colors denote samples various different taxonomy or with various geographical affiliations (MmgI – southern Spain, MmgP – Volga region). The circle size is proportional to the number of individuals, and the fractions are proportional to the frequencies of samples per haplotype

Во втором варианте сеть построена на основании 16 сегрегирующих и 9 информативных сайтов. Нуклеотидное разнообразие (π) вошедших в сеть последовательностей составила 0.172, коэффициент дифференциации (F_{ST}) – 0.006 ($p = 0.442$). Тест Таджимы выявил особенность генетической структуры изучаемых гаплогрупп коршунов, свидетельствующую о недавнем прохождении поволжской популяции состояния «бутылочного горлышка»: $T's D = -1.076$, при $p = 0.851$. В целом выявленная генетическая структура, как и ML-анализ, описанный выше, указывает на существование процесса дифференциации отдельных генети-

ческих линий, слабо связанных с географической локализацией.

Таким образом, проведенный анализ дивергенции и разнообразия гаплотипов контрольного региона мтДНК не позволяет с высокой долей уверенности утверждать о существовании подразделенной генетической структуры ареала европейского черного коршуна, хотя наличие подразделенных генетических линий в нем очевидно. При расширении аналитической выборки за счет охвата новых территорий ареала вполне ожидаемо выявление структурированности области распространения *M. migrans migrans*.

Список литературы

1. Беме Р. Л., Динец В. Л., Флинт В. Е., Черенков А. Е. Птицы. Энциклопедия природы России / под общ. ред. В. Е. Флинта. 2-е изд., доп. и перераб. М., 1998. 432 с.
2. Коблик Е. А. Разнообразие птиц (по материалам экспозиции Зоологического музея МГУ). М. : МГУ, 2001. Ч. 1. 384 с.
3. Степанян Л. С. Конспект орнитологической фауны России и сопредельных территорий. М. : Академкнига, 2003. 808 с.
4. Глущенко Ю. Н., Сотников В. Н., Коробов Д. В. [и др.]. Орнитологические наблюдения в Приморском крае в 2016 году // Русский орнитологический журнал. 2016. Т. 25, Экспресс-выпуск 1339. С. 3491–3504.
5. Штегман В. К. Дневные хищники: Зоол. ин-т АН СССР. Фауна СССР. Нов. сер. № 14. Птицы. М.-Л., 1937. Т. 1, вып. 5. С. 1–43.
6. Дементьев Г. П., Мекленбурцев Р. Н., Судилковская А. М. Птицы Советского Союза. М. : Советская наука, 1951. Т. 1. 652 с.
7. Митропольский О. В., Фоттлер Э. Р., Третьяков Г. П. Птицы Узбекистана. Отряд Соколообразные. Ташкент, 1987. Т. 1. С. 123–246.
8. Бахтин Р. Ф. Черный коршун в антропогенных ландшафтах : монография. Бийск : ФГБОУ ВПО «АГАО», 2013. 123 с.
9. Карякин И. В. Пернатые хищники Уральского региона. Соколообразные (Falconiformes), Совообразные (Strigiformes). Пермь : Изд. ЦПИ СОЖ Урала/СоЭС, 1998. 483 с.
10. Завьялов Е. В., Шляхтин Г. В., Табачишин В. Г. [и др.]. Птицы севера Нижнего Поволжья. Состав орнитофауны. Саратов : Изд-во Саратовского ун-та, 2005. Кн. 2. 320 с.
11. Аверин Ю. В., Ганя И. М., Успенский Г. А. Птицы Молдавии. Кишинев : Штиинца, 1971. Т. 2. 236 с.
12. Кучин А. П. Птицы Алтая. Барнаул : Алт. кн. изд-во, 1976. 232 с.
13. Васильченко А. А. Птицы Кемеровской области. Кемерово : Кузбассвуиздат, 2004. 488 с.
14. Arrigi F. E., Bergendahl G., Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues // Exp. Cell. Res. 1968. № 50. P. 47–53.
15. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. URL: <https://cshlpress.com> (дата обращения: 25.09.2020).
16. Roques S., Negro J. J. MtDNA genetic diversity and population history of a dwindling raptorial bird, the red kite (*Milvus milvus*) // Biological Conservation. 2005. Vol. 126. P. 41–50.
17. Hall T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT // Nucleic Acids Symposium Series. 1999. Vol. 41. P. 95–98. URL: <https://bioedit.software.informer.com> (дата обращения: 25.09.2020).
18. Multiple Sequence Alignment. URL: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> (дата обращения: 25.09.2020).
19. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1451–1452.
20. Kumar S., Stecher G., Li M. [et. al.]. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms // Molecular Biology and Evolution. 2018. Vol. 35. P. 1547–1549.
21. Ronquist F., Huelsenbeck J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. Vol. 19. P. 1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180.
22. Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nature Methods. 2012. Vol. 9. P. 772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
23. Leigh J. W., Bryant D., Nakagawa S. POPART: full feature software for haplotype network construction // Methods in Ecology and Evolution. 2015. Vol. 6. P. 1110–1116. doi: 10.1111/2041-210x.12410.

24. Clement M., Posada D., Crandall K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // *Molecular Ecology*. 2000. Vol. 9. P. 1657–1659. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x.
25. Johnson J. A., Watson R. T., Mindell D. P. Prioritizing species conservation: does the Cape Verde kite exist? // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2005. Vol. 272. P. 1365–1371.
26. Kruckenhauser L., Haring E., Pinsker W. [et al.]. Genetic vs. morphological differentiation of old world buzzards (genus *Buteo*, Accipitridae) // *Zoologica Scripta*. 2004. Vol. 33. P. 197–211.

References

1. Beme R.L., Dinets V.L., Flint V.E., Cherenkov A.E. Ptitsy. *Entsiklopediya prirody Rossii* = Encyclopedia of Russian nature. 2nd ed., suppl. and rev. Moscow, 1998:432. (In Russ.)
2. Koblik E. A. *Raznoobrazie ptits (po materialam ekspozitsii Zoologicheskogo muzeya MGU)* = Diversity of birds (on the materials from the exhibition at MSU Zoological Museum). Moscow: MGU, 2001;1:384. (In Russ.)
3. Stepanyan L.S. *Konspekt ornitologicheskoy fauny Rossii i sopredel'nykh territoriy* = . Moscow: Akademkniga, 2003:808. (In Russ.)
4. Glushchenko Yu.N., Sotnikov V.N., Korobov D.V. [et al.]. Ornithological observations in the Primorsky Krai in 2016. *Russkiy ornitologicheskii zhurnal* = Russian journal on ornithology. 2016;25(1339):3491–3504. (In Russ.)
5. Shtegman V.K. *Dnevnye khishchniki: Zool. in-t AN SSSR. Fauna SSSR. Nov. ser. № 14. Ptitsy* = Diurnal predators: Zoological Institute of the USSR Academy of Sciences. Fauna of the USSR. Series no.14. Moscow-Leningrad, 1937;1(5):1–43. (In Russ.)
6. Dement'ev G.P., Meklenburtsev R.N., Sudilovskaya A.M. *Ptitsy Sovetskogo Soyuz* = Birds of the Soviet Union. Moscow: Sovetskaya nauka, 1951;1:652. (In Russ.)
7. Mitropol'skiy O.V., Fotteler E.R., Tretyakov G.P. *Ptitsy Uzbekistana. Otryad Sokoloobraznye* = Birds of Uzbekistan. The Falconiformes. Tashkent, 1987;1:123–246. (In Russ.)
8. Bakhtin R.F. *Chernyy korshun v antropogennykh landshaftakh: monografiya* = Black kite in anthropogenic landscapes: monograph. Biysk: FGBOU VPO «AGAO», 2013:123. (In Russ.)
9. Karyakin I.V. *Pernatnye khishchniki Ural'skogo regiona. Sokoloobraznye (Falconiformes), Sovoobraznye (Strigiformes)* = Birds of prey of the Ural region. the Falconiformes. The Strigiformes. Perm: Izd. TsPI SOZh Urala/CoES, 1998:483. (In Russ.)
10. Zav'yalov E.V., Shlyakhtin G.V., Tabachishin V.G. [et al.]. *Ptitsy severa Nizhnego Povolzh'ya. Sostav ornitofauny* = Birds of the northern Lower Volga region. Composition of ornithological fauna. Saratov: Izd-vo Saratovskogo un-ta, 2005;2:320. (In Russ.)
11. Averin Yu.V., Ganya I.M., Uspenskiy G.A. *Ptitsy Moldavii* = Birds of Moldavia. Kishinev: Shtiintsa, 1971;2:236. (In Russ.)
12. Kuchin A.P. *Ptitsy Altaya* = Birds of Altai. Barnaul: Alt. kn. izd-vo, 1976:232. (In Russ.)
13. Vasil'chenko A.A. *Ptitsy Kemerovskoy oblasti* = Birds of the Kemerovo region. Kemerovo: Kuzbassvuzizdat, 2004:488. (In Russ.)
14. Arrigi F.E., Bergendahl G., Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues. *Exp. Cell. Res.* 1968;50:47–53.
15. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Available at: <https://cshlpress.com> (accessed 25.09.2020).
16. Roques S., Negro J.J. MtDNA genetic diversity and population history of a dwindling raptorial bird, the red kite (*Milvus milvus*). *Biological Conservation*. 2005;126:41–50.
17. Hall T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999;41:95–98. Available at: <https://bioedit.software.informer.com> (accessed 25.09.2020).
18. *Multiple Sequence Alignment*. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw> (accessed 25.09.2020).
19. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25:1451–1452.
20. Kumar S., Stecher G., Li M. [et. al.]. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*. 2018;35:1547–1549.
21. Ronquist F., Huelsenbeck J.P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19:1572–1574. doi: 10.1093/bioinformatics/btg180.
22. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 2012;9:772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
23. Leigh J. W., Bryant D., Nakagawa S. POPART: full feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*. 2015;6:1110–1116. doi: 10.1111/2041-210x.12410.
24. Clement M., Posada D., Crandall K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 2000;9:1657–1659. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x.
25. Johnson J.A., Watson R.T., Mindell D.P. Prioritizing species conservation: does the Cape Verde kite exist? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2005;272:1365–1371.
26. Kruckenhauser L., Haring E., Pinsker W. [et al.]. Genetic vs. morphological differentiation of old world buzzards (genus *Buteo*, Accipitridae). *Zoologica Scripta*. 2004;33:197–211.