УДК 598.279.23:575.2(470.4)

DOI 10.21685/2500-0578-2021-3-2

НОВЫЕ ДАННЫЕ К ПОЛИМОРФИЗМУ ПОВОЛЖСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОРЛА-МОГИЛЬНИКА (*AQUILA HELIACA*, FALCONIFORMES, ACCIPITRIDAE) ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ И МИКРОСАТЕЛЛИТНОЙ ДНК

М. Д. Симаков¹, М. В. Корепов², С. А. Стрюков³,
Д. А. Корепова⁴, А. А. Кузьмин⁵, С. В. Титов⁶

^{1,6} 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

^{3,4} Ульяновский областной краеведческий музей имени И. А. Гончарова, Россия, 432017, г. Ульяновск, б. Новый Венец, 3/4

⁵ Пензенский государственный технологический университет, Россия, 440039, г. Пенза, проезд Байдукова/ул. Гагарина, 1а/11

¹ maksimakov@bk.ru, ² korepov@list.ru, ³ stanislav_str@mail.ru,

⁴ dahafomina@list.ru, ⁵ kuzmin-puh@yandex.ru, ⁶ svtitov@yandex.ru

Аннотация. Актуальность и цели. Анализ имеющихся данных по изучению полиморфизма контрольного региона мтДНК в евразийских популяциях орлов-могильников (1996–2020 гг.) свидетельствует об их генетической дифференциации по географическому распространению, а периодическое обнаружение новых гаплотипов указывает на актуальность таких исследований и недостаточную изученность данного вопроса. Целью работы было уточнение уровня полиморфизма и выявление специфических генетических черт повожской популяции орла-могильника (*A. heliaca*) по данным анализа изменчивости митохондриальной и микросателлитной ДНК. **Материалы и методы.** Материалом для генетических исследований послужили новые сборы ($n = 22$) линных перьев орлов-могильников, коллекционированных в Ульяновской области ($n = 15$), Республиках Татарстан ($n = 4$) и Мордовия ($n = 2$), Чувашской Республике ($n = 1$). ДНК выделяли из линных перьев взрослых птиц, пульпы и крови птенцов по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции. Для генетического анализа использовали фрагмент (345 пн) контрольного региона мтДНК (D-loop) и три тетра-нуклеотидных микросателлитных повтора (IEAAAG09, IEAAAG11, IEAAAG15). Секвенирование фрагментов контрольного региона мтДНК ($n = 22$) и микросателлитной ДНК ($n = 171$) проводили на секвенаторе ABI 3500 (Applied Biosystems). Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие изучали с помощью программы DnaSP 5.10.01. Для реконструкции филогенетических отношений использовали методы максимального правдоподобия (ML) и присоединения соседа (NJ) в программе MEGA X. Анализ микросателлитных генетических данных осуществляли при использовании программ Arlequin 3.5.2 и Structure 2.3.4. Полученные нуклеотидные последовательности вновь выявленных гаплотипов мтДНК орла-могильника были депонированы в GenBank NCBI под номерами OK504653 (гаплотип RE) и OK504654 (гаплотип RF). Для статистической обработки результатов для всех тестов был установлен уровень значимости $p < 0.05$. **Результаты.** Анализ распределения гаплотипов контрольного региона мтДНК по пяти географически изолированным гнездовым группам орла-могильника в Поволжье (UIR-NW – северо-запад Ульяновской области, UIR-NE – северо-восток Ульяновской области, UIR-C – центр Ульяновской области, UIR-S – юг Ульяновской области, RTat – Республика Татарстан) выявил их подразделенность. При анализе средних чисел нуклеотидных различий заметна обособленность гнездовых групп из Республики Татарстан и Ульяновской области. Среднее число нуклеотидных различий (k) между всеми гнездовыми группами составило 1.606 и оказалось ниже этого показателя при сравнении группы из Татарстана с ульяновскими группами (1.739). В филогенетическом анализе выделили две гаплогруппы орла-могильника. Первую гаплогруппу (AqH_1) формируют гаплотипы мтДНК, характеризующиеся одной или двумя нуклеотидными заменами. Вторая гаплогруппа (AqH_2), напротив, состоит из гаплотипов, имеющих от 3 до 5 нуклеотидных замен. Результаты медианного теста также указывают на существование двух генетически близких групп последовательностей фрагмента контрольного региона мтДНК, соответствующих в большей и меньшей степени измененным гаплотипам. Проведенный анализ микросателлитной ДНК географически изолированных гнездовых групп орлов-могильников на территории Ульяновской области выявил низкий уровень внутреннего полиморфизма. **Заключение.** Проведенные исследования показали, что повожская популяция является генетически дифференцированной. Она состоит из двух субпопуляций – ульяновской и татарстанской, характеризующихся специфическими гаплотипами мтДНК и приуроченных к различным возвышенностям – Приволжской и Бугульминско-Белебеевской. Несмотря на эти выявленные различия, анализ микросателлитной ДНК, а также реконструкция эволюционных событий, связанных с изменчивостью гаплотипов мтДНК, показывают, что уровень полиморфизма ульяновской субпопуляции орлов-могильников является низким, а сама популяция достаточно однородной.

Ключевые слова: *Aquila heliaca*, контрольный регион, мтДНК, гаплотипическое разнообразие, поволжская популяция

Благодарности. Выражаем благодарность за предоставление некоторых образцов перьев орла-могильника Глушенкову Олегу Владимировичу, ведущему научному сотруднику Государственного природного заповедника «Присурский» и Национального парка «Чаваш Вармане», и Лапшину Александру Сергеевичу, сотруднику биологического музея Национального исследовательского Мордовского государственного университета имени Н. П. Огарева.

Для цитирования: Симаков М. Д., Корепов М. В., Стрюков С. А., Корепова Д. А., Кузьмин А. А., Титов С. В. Новые данные к полиморфизму поволжской популяции орла-могильника (*Aquila heliaca*, falconiformes, accipitridae) по результатам анализа митохондриальной и микросателлитной ДНК // Russian Journal of Ecosystem Ecology. 2021. Vol. 6 (3). <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2021-3-2>

NEW DATA ON THE POLYMORPHISM OF THE VOLGA POPULATION OF THE IMPERIAL EAGLE (*AQUILA HELIACA*, FALCONIFORMES, ACCIPITRIDAE) BASED ON THE RESULTS OF THE ANALYSIS OF MITOCHONDRIAL AND MICROSATELLITE DNA

M. D. Simakov¹, M. V. Korepov², S. A. Stryukov³,
D. A. Korepova⁴, A. A. Kuz'min⁵, S. V. Titov⁶

^{1, 6} 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, 4} Ulyanovsk Regional Museum of Local History named after I. A. Goncharov, 3/4 b. Novyy Venets, Ulyanovsk, 432017, Russia

⁵ Penza State Technological University, 1A / 11 Baidukova proezd / Gagarina street, Penza, 440039, Russia

¹ maksimakov@bk.ru, ² korepov@list.ru, ³ stanislav_str@mail.ru,

⁴ dahafomina@list.ru, ⁵ kuzmin-puh@yandex.ru, ⁶ svtitov@yandex.ru

Abstract. Background. The analysis of the available data on the study of the polymorphism of the mtDNA control region in the Eurasian populations of burial eagles (1996-2020) indicates their genetic differentiation by geographical distribution. The periodic detection of new haplotypes indicates the relevance of such studies and insufficient knowledge of this issue. The aim of the work is to clarify the level of polymorphism and identify specific genetic features of the Volga population of the imperial eagle (*A. heliaca*) according to the analysis of the variability of mitochondrial and microsatellite DNA. **Materials and methods.** The material for genetic research was new collections ($n = 22$) of linn feathers of burial eagles collected in the Ulyanovsk region ($n = 15$), the Republic of Tatarstan ($n = 4$), the Republic Mordovia ($n = 2$) and the Chuvash Republic ($n = 1$). DNA was isolated from feathers of adult birds and the pulp and blood of chicks according to the standard method of phenol-chloroform extraction. A fragment (345 bp) of the mtDNA control region (D-loop) and three tetranucleotide microsatellite repeats (IEAAAG09, IEAAAG11, IEAAAG15) were used for genetic analysis. Fragments of the mtDNA control region ($n = 22$) and microsatellite DNA ($n = 171$) were sequenced using an ABI 3500 sequencer (Applied Biosystems). Haplotypic and nucleotide diversity were studied using the DnaSP 5.10.01 program. To reconstruct phylogenetic relationships, Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) methods were used in the MEGA X program. Microsatellite genetic data was analyzed using the Arlequin 3.5.2 and Structure 2.3.4 programs. The obtained nucleotide sequences of newly identified mtDNA haplotypes of the imperial eagle were deposited in GenBank NCBI under the numbers OK504653 (haplotype RE) and OK504654 (haplotype RF). For statistical processing of the results, a significance level of $p < 0.05$ was set for all tests. **Results.** Analysis of the distribution of mtDNA control region haplotypes across 5 geographically isolated Imperial eagle breeding groups in the Volga region (ULR-NW – northwest of the Ulyanovsk region, UIR-NE – northeast of the Ulyanovsk region, UIR-C – center of the Ulyanovsk region, UIR-S – south of the Ulyanovsk region, RTat – Republic of Tatarstan) revealed their subdivision. When analyzing the average numbers of nucleotide differences, the isolation of the breeding groups from the Republic of Tatarstan and the Ulyanovsk region is noticeable. The average number of nucleotide differences (k) between all nest groups was 1.606 and was lower than this indicator when comparing the group from Tatarstan with the Ulyanovsk groups (1.739). In the phylogenetic analysis, two haplogroups of the imperial eagle were identified. The first haplogroup (AQH_1) is formed by mtDNA haplotypes characterized by one or two nucleotide substitutions. The second haplogroup (AQH_2) consists of haplotypes having from 3 to 5 nucleotide substitutions. The results of the median test also indicate the existence of 2 genetically close groups of sequences of a fragment of the mtDNA control region corresponding to more or less altered haplotypes. The analysis of microsatellite DNA of geographically isolated breeding groups of imperial eagles in the Ulyanovsk region revealed a low level of internal polymorphism. **Conclusion.** The conducted studies have shown that the Volga population of the imperial eagle is genetically differentiated. It consists of two subpopulations – Ulyanovsk and Tatarstan, characterized by specific mtDNA haplotypes. These subpopulations are confined to the Volga and Bugulminsko-Belebeevskaya uplands. The analysis of microsatellite DNA, as well as the reconstruction of evolutionary events related to the variability of mtDNA haplo-

types show that the level of polymorphism of the Ulyanovsk subpopulation of imperial eagles is low, and the population itself is fairly homogeneous.

Keywords: *Aquila heliaca*, control region, mtDNA, haplotype diversity, Volga region population

Acknowledgments. We extend our gratitude to Oleg Vladimirovich Glushenkov, leading researcher of the Prisurskiy State Nature Reserve and the Chavash Varmane National Park, and Aleksandr Sergeevich Lapshin, curator of the Biological Museum of N.P. Ogarev National Research Mordovia State University for the provided samples of imperial eagle feathers.

For citation: Simakov M.D., Korepov M.V., Stryukov S.A., Korepova D.A., Kuz'min A.A., Titov S.V. New data on the polymorphism of the volga population of the imperial eagle (*Aquila heliaca*, falconiformes, accipitridae) based on the results of the analysis of mitochondrial and microsatellite DNA. *Russian Journal of Ecosystem Ecology*. 2021;6(3). (In Russ.). Available from: <https://doi.org/10.21685/2500-0578-2021-3-3>

Орел-могильник, или императорский орел (*Aquila heliaca*, Savigny, 1809), является редким видом дневных хищных птиц, занесенным в Красную книгу Российской Федерации (категория 2, У, III – сокращающий численность, уязвимый вид, требующий общих мер охраны) и Красный список Международного союза охраны природы (VU – уязвимый вид) [1, 2]. Благодаря своему палеарктическому распространению в пустынных, степных и лесостепных ландшафтах от Словакии на западе до Забайкалья на востоке и особенностям биотопической приуроченности [3] этот вид формирует многочисленные и не всегда четко ограниченные географические популяции (западную, карпатскую, днепро-донскую, прикаспийскую, поволжскую, южно-уральскую и др.), которые отличаются численностью и динамикой. Эти особенности распространения, несомненно, должны способствовать формированию определенной генетической дифференциации и возникновению заметных генетических различий обособленных популяций орлов.

Исследования генетической дифференциации географических популяций орлов проводили в основном по уровню изменчивости митохондриальной и микросателлитной ДНК. Первые исследования по этой проблематике были посвящены изучению молекулярно-генетической дифференциации и филогении 5 европейских орлов рода *Aquila* (*A. clanga*, *A. pomarina*, *A. chrysaetos*, *A. heliaca*, *A. adalberti*) по уровню изменчивости гена мтДНК *Cyt b* [4]. В ходе этих исследований были выявлены надежные видовые различия, а также подтвержден видовой статус испанского императорского орла *A. adalberti*, долгое время считавшегося подвидом *A. heliaca*. Позже исследование псевдоконтрольного региона мтДНК (ΨCR) у 6 видов рода *Aquila* (*A. clanga*, *A. pomarina*, *A. chrysaetos*, *A. nipalensis*, *A. heliaca*, *A. adalberti*) показало достаточно высокую их дифференциацию по данному молекулярному маркеру [5]. Впоследствии изучение испанских императорских орлов и орлов-могильников из Наурзумского заповедника (Северный Казахстан) выявило

достаточно надежные генетические различия этих популяций. Для *A. adalberti* было выделено три гаплотипа мтДНК (control region) – A, B, C, а для *A. heliaca* 7 гаплотипов – D, E, F, G, H, I, J [6].

Дальнейшее изучение генетической дифференциации орлов-могильников проводили на уровне региональных популяций. Так, исследования генетического полиморфизма орлов в Карпатском бассейне по митохондриальным и микросателлитным маркерам выявили незначительные генетические различия между западными и восточными субпопуляциями орлов в паннонской популяции (Словакия и Венгрия) [7].

Исследования полиморфизма контрольного региона мтДНК в поволжской популяции орлов-могильников (Ульяновская область) показали ее некоторую генетическую обособленность относительно западных и восточных евразийских популяций. Из 8 гаплотипов мтДНК орлов-могильников, выявленных на территории Ульяновской области, 4 (RA, RB, RC, RD) для поволжской популяции оказались специфичными; из 15 гаплотипов мтДНК, обнаруженных в Словакии, Венгрии и Казахстане, в Поволжье были выявлены только 4 – D, E, F, R [8].

Проведенные недавно исследования генетического полиморфизма популяций *A. heliaca* в Казахстане, Поволжье, Хакасии, на Урале, Алтае и Украине ($n = 70$) позволили выявить их гаплотипическую структуру, а также обнаружить новый для орла-могильника гаплотип мтДНК – new5 [9]. С позиций общего гаплотипического разнообразия *A. heliaca* этому гаплотипу следовало бы присвоить идущее после всех известных наименование RG.

Таким образом, анализ имеющихся данных по полиморфизму контрольного региона мтДНК в евразийских популяциях орлов-могильников свидетельствует об их генетической дифференциации по географическому распространению, а периодическое обнаружение новых гаплотипов указывает на актуальность таких исследований и недостаточную изученность данного вопроса.

Целью работы было уточнение уровня полиморфизма и выявление специфических генетических черт поволжской популяции орла-могильника (*A. heliaca*) по данным анализа изменчивости митохондриальной и микросателлитной ДНК.

Материал и методы

Материалом для генетических исследований послужили новые сборы ($n = 22$) линных перьев орлов-могильников, коллекционированных в Ульяновской области ($n = 15$), Республика Татарстан ($n = 4$) и Мордовия ($n = 2$), Чувашской Республике ($n = 1$) (табл. 1). При изучении генетической дифференциации локальных гнездовых групп *A. heliaca* в поволжской популяции кроме упомянутых выше генетических проб в аналитическую выборку ($n = 75$) были включены секвенсы фрагментов мтДНК

(D-loop) ($n = 25$), полученные в прошлых наших исследованиях (в том числе депонированные последовательности новых гаплотипов RA, RB, RC, RD – KU999948–KU999953 [8]), а также гаплотипы орлов-могильников ($n = 13$) из популяции в Татарстане (депонированные в GeneBank последовательности – MN486310, MN486311, MN486314–MN486316, MN486319, MN486322, MN486329, MN486319, MN486344, MN486345, MN486351, MN486355, MN486362 [9]). При анализе филогенетических связей между выявленными гаплотипами мтДНК помимо соответствующих им однократных проб, обнаруженных в Ульяновской области и Республике Татарстан, были проанализированы 15 гаплотипов, обнаруженных в паннонской (Словакия и Венгрия) и зауральской (Северный Казахстан, Наурзумский заповедник) популяциях (AJ574880 – AJ574885 [6] и EU433560, EU433561; KC555570 – KC555575 [7]).

Таблица 1

Образцы ДНК орлов-могильников поволжской популяции (*Aquila heliaca* Sav.)

Table 1

DNA samples of imperial eagle of the Volga population (*Aquila heliaca* Sav.)

№ образца	Адрес	Координаты
1	2	3
AqH61	Ульяновская обл., Радищевский р-н, с. Дмитриевка (Богдановский заказник)	N 52.966303, E 47.710770
AqH62	Ульяновская обл., Николаевский р-н, с. Сухая Терешка (Богдановский заказник)	N 53.010833, E 47.489167
AqH63	Ульяновская обл., Новоспасский р-н, с. Новая Лава (Богдановский заказник)	N 52.998056, E 47.584167
AqH64	Ульяновская обл., Новоспасский р-н, с. Новая Лава (Богдановский заказник)	N 53.023611, E 47.550556
AqH65	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Средниково	N 52.998056, E 48.048056
AqH66	Ульяновская обл., Старокулаткинский р-н, с. Старая Кулатка	N 52.777641, E 47.591869
AqH67	Ульяновская обл., Старокулаткинский р-н, с. Бахтевка	N 52.719682, E 47.779307
AqH68	Ульяновская обл., Старокулаткинский р-н, с. Старое Зеленое	N 52.7775, E 47.853056
AqH69	Ульяновская обл., Старокулаткинский р-н, с. Старая Кулатка	N 52.725833, E 47.767778
AqH70	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 52.963289, E 47.766730
AqH71	Ульяновская обл., Николаевский р-н, с. Калиновка (Акуловская степь)	N 53.103199, E 47.354590
AqH72	Республика Татарстан, Бавлинский р-н, с. Тат. Кандыз	N 54.106793, E 53.179939
AqH73	Республика Татарстан	–
AqH74	Республика Татарстан	–
AqH75	Республика Татарстан, Заинский р-н, с. Бура-Кирта	N 55.498898, E 52.210188
AqH76	Республика Татарстан, Лениногорский р-н, к Ю от с. Куакбаш	N 54.626445, E 52.196029
AqH77	Республика Татарстан	–
AqH86	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 52.958867, E 47.795864
AqH87	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 52.970242, E 47.807686
AqH88	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 52.999585, E 47.802509
AqH89	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 53.005169, E 47.757606
AqH90	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 52.907413, E 47.852729
AqH91	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 52.916662, E 47.753272
AqH92	Ульяновская обл., Новоспасский р-н, с. Новая Лава (Богдановский заказник)	N 53.025172, E 47.538502
AqH103	Ульяновская обл., Новоспасский р-н, с. Новая Лава (Богдановский заказник)	N 52.998004, E 47.584775
AqH104	Ульяновская обл., Новоспасский р-н, с. Новая Лава (Богдановский заказник)	N 52.958498, E 47.582262
AqH105	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Средниково	N 52.972618, E 48.080358
AqH106	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 52.914076, E 47.825667
AqH107	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 52.959722, E 47.798056
AqH108	Ульяновская обл., Чердаклинский р-н, с. Абдулово	N 54.438333, E 49.458889
AqH109	Ульяновская обл., Сурский р-н, с. Ружеевщина	N 54.442741, E 47.328904

Окончание табл. 1

End of Table 1

1	2	3
AqH110	Ульяновская обл., Сурский р-н, д. Александрия	N 54.488730, E 47.347477
AqH111	Ульяновская обл., Сенгилеевский р-н, с. Вырыстайкино	N 53.844444, E 48.923889
AqH112	Ульяновская обл., Городской округ Новоульяновск, с. Панская слобода	N 54.097222, E 48.413333
AqH113	Ульяновская обл., Сурский р-н, с. Лава	N 54.486944, E 46.86
AqH114	Ульяновская обл., Мелекесский р-н, с. Уткин	N 53.888611, E 49.655556
AqH115	Ульяновская обл., Майнский р-н, п. Искра	N 53.976111, E 47.735
AqH116	Ульяновская обл., Майнский р-н, п. Искра	N 53.976111, E 47.735
AqH117	Ульяновская обл., Радищевский р-н, п. Соловчиха (Богдановский заказник)	N 53.018765, E 47.889227
AqH210	Республика Мордовия, Ардатовский р-н, с. Полое	N 54.770396, E 46.185133
AqH211	Республика Мордовия, Дубенский р-н, с. Кайбичево	N 54.351204, E 46.241112
AqH240	Чувашская Республика, г. Новочебоксарск, полигон ТБО	N 56.057918, E 47.524645

ДНК выделяли из линных перьев взрослых птиц, преимущественно маховых и рулевых («рубчик»), собранных под жилыми гнездами орлов, а также из пульпы и крови птенцов (использовали полностью) [10] по стандартной методике фенол-хлороформной экстракции после обработки материала протеиназой К и SDS [11, 12]

Для генетического анализа полиморфизма мтДНК использовали фрагмент (345 пн) контрольного региона (D-loop), полученный при использовании праймеров: AID1 (5'-AAGGGCCATTATTGCCAAA-3') и Fbox (5'-GGGTTGCTGRTTTCACGTGAG-3') [6, 15]. Полимеразноцепную реакцию (PCR) проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ трис-HCl (pH 8.9), 20 мМ сульфат аммония, 20 мМ ЭДТА, 150 мкг/мл бычьего сывороточного альбумина, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (200 мМ каждого), 2 мМ хлористого магния, 15 пмоль каждого из праймеров, 2 ед. активности Taq-полимеразы и 0.1–0.2 мкг ДНК при температуре отжига 64 °C [13].

С целью выявления уровня генетической дифференциации гнездовых групп орлов-могильников на территории Ульяновской области был проведен анализ полиморфизма микросателлитной ДНК по трем тетраплексидам маркерам (CTTT-повтор) – IEAAAG09, IEAAAG11, IEAAAG15 [14]. PCR-реакцию проводили в тех же условиях, которые указаны выше, при температуре отжига 56, 64 и 62 °C соответственно. Аллельное разнообразие оценивали по электрофоретическим данным при обязательном секвенировании маркерных аллелей.

Секвенирование фрагментов контрольного региона мтДНК ($n = 22$) и микросателлитной ДНК ($n = 171$) 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 последователь-

ности были прочитаны и отредактированы с помощью программы BioEdit 7.1.3.0 [15]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли по алгоритму ClustalW в программе Mega X с обязательной доводкой вручную [16].

Гаплотипическое и нуклеотидное разнообразие изучали с помощью программы DnaSP 5.10.01 [17]. Для реконструкции филогенетических отношений использовали методы максимального правдоподобия (ML) и присоединения соседа (NJ) в программе MEGA X [18]. Статистическая достоверность порядка ветвления оценивалась с помощью бутстрэп-анализа 10 000 альтернативных деревьев (процент бутстрэпа, %). Модель, наилучшим образом описывающая эволюционные изменения исследуемых последовательностей, была определена в программах jModelTest 2.1.10 [19] и MEGA X на основе байесовского информационного критерия (BIC). Медианная сеть (Median Joining) митохондриальных гаплотипов была построена в программе PopART [20] с использованием алгоритма TCS [21].

При анализе полиморфизма орлов-могильников из Ульяновской области была использована 171 нуклеотидная последовательность микросателлитной ДНК. Анализ полученных генетических данных осуществляли при использовании программ Arlequin 3.5.2 [22] и Structure 2.3.4 [23].

Полученные в ходе настоящего исследования нуклеотидные последовательности вновь выявленных гаплотипов мтДНК орломогильника были депонированы в GenBank NCBI под номерами OK504653 (гаплотип RE) и OK504654 (гаплотип RF). Кроме того, в GenBank были предоставлены последовательности всех выявленных гаплотипов на территории Ульяновской области в соответствии с их локалитетами (OK504649–OK504652, OK504655, OK504656, OL336849–OL336875).

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

Результаты и обсуждение

Исследования расширенной по сравнению с выборкой в исследованиях 2016 г. ($n = 25$) выборки орлов-могильников поволжской популяции ($n = 60$) позволили выявить два новых гаплотипа мтДНК (D-loop) (Hap RE, Hap RF) и уточнить данные по гаплотипическому и нуклеотидному разнообразию *A. heliaca* в Поволжье (DnaSP 5.10.01).

Число сегрегирующих сайтов составило 10, число мутаций – 10, число сайтов с одноэлементными заменами – 4 (поз. 108, 185, 243, 341 пн), число информационных сайтов – 6 (поз. 96, 118, 134, 219, 227, 239 пн). Было выделено 14 гаплотипов (h), гаплотипическое разнообразие (Hd) составило 0.816, нуклеотидное разнообразие (Pi) – 0.00531, среднее число нуклеотидных различий (k) – 1.831 (табл. 2). При этом выявлена низкая дисперсия разнообразия гаплотипов (0.00101; Fu's Fs statistic = –5.848, Ströbeck's S statistic – 0.999), а вероятность того, что число гаплотипов равно только 14, составляет лишь 0,2 %.

Таблица 2

Выявленные в Ульяновской области гаплотипы (митотипы, 345 пн) мтДНК (контрольный регион) орлов-могильников. Во второй колонке указаны характерные нуклеотидные замены и номер их позиций в последовательности

Table 2

Haplotypes (mitotypes, 345 bp) of mtDNA (control region) of Imperial Eagles identified in the Ulyanovsk region. The second column shows the characteristic nucleotide substitutions and the number of their positions in the sequence

Гаплотип	Нуклеотидные замены и номера их позиций в последовательности												Номера депонированных последовательностей (GenBank NCBI)	
			1	1	1	1	2	2	2	2	3	3		3
	4	9	0	1	3	8	1	2	3	4	2	2		4
	5	6	8	8	4	5	9	7	9	3	8	9		1
Hap D*	A	A	C	C	G	G	T	A	T	A	A	C	G	= AJ567367
Hap E*	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	AJ574880
Hap F*	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	AJ574881
Hap G, H	.	G	.	T	.	.	C	.	C	.	.	.	.	AJ574882, AJ574883
Hap I	.	G	.	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	AJ574884
Hap J	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	A	.	AJ574885
Hap K	G	G	.	T	.	.	C	G	.	.	.	.	.	EU433560
Hap L	.	.	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	EU433561
Hap M, N	.	G	.	T	.	.	C	G	C	.	.	.	.	KC555570, KC555571
Hap P	G	G	.	T	.	.	C	.	.	.	.	.	.	KC555572
Hap Q	.	G	.	T	A	.	C	G	.	.	.	.	.	KC555573
Hap R*	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	.	KC555574
Hap S*	.	.	.	.	A	.	C	.	.	.	.	.	.	KC555575
Hap RA*	.	G	.	T	.	.	C	G	.	.	.	.	.	KU999948–KU999950
Hap RB*	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	KU999951
Hap RC*	.	.	T	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	KU999952
Hap RD*	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	KU999953
Hap RE**	.	.	.	.	.	.	C	.	.	G	.	.	.	XXXXXX
Hap RF**	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	XXXXXX
Hap RG(new5)***	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	MN486351, XXXXXX

П р и м е ч а н и е. Hap D–S – известные гаплотипы (GenBank, NCBI), обнаруженные в Карпатском бассейне (Словакия и Венгрия) и Наурзумском заповеднике (Северный Казахстан); Hap RA–RG – гаплотипы, впервые обнаруженные в Среднем Поволжье. Звездочкой (*) обозначены гаплотипы, обнаруженные на территории Ульяновской области по данным на 2016 г. [8], двумя звездочками (**) – гаплотипы, обнаруженные на территории Ульяновской области по данным на 2021 г., тремя звездочками (***) – гаплотип, обнаруженный на территории Татарстана [9].

N o t e. Hap D–S is known haplotypes (GenBank, NCBI) found in the Carpathian Basin (Slovakia and Hungary) and the Naurzum Reserve (Northern Kazakhstan); Hap RA–RG is haplotypes first discovered in the Middle Volga region. An asterisk (*) denotes haplotypes found on the territory of the Ulyanovsk region as of 2016 [8], two asterisks (**) – haplotypes found on the territory of the Ulyanovsk region as of 2021, three asterisks (***) – haplotype found on the territory of Tatarstan [9].

Анализ распределения гаплотипов контрольного региона мтДНК по 5 географически изолированным гнездовым группам орла-могильника в Поволжье (UIR-NW – северо-запад Ульяновской области, UIR-NE – северо-

восток Ульяновской области, UIR-C – центр Ульяновской области, UIR-S – юг Ульяновской области, RTat – Республика Татарстан) выявил некоторую их подразделенность (табл. 3, рис. 1).

Таблица 3

Распределение гаплотипов мтДНК (D-loop) в географически разобщенных гнездовых группах орла-могильника (*Aquila heliaca*) в Поволжье

Table 3

Distribution of mtDNA haplotypes (D-loop) in geographically separated breeding groups of the imperial eagle (*Aquila heliaca*) in the Volga region

Разобщенные гнездовые группы	ГАПЛОТИПЫ													
	D	E	H-G	F	I	R	S	RA	RB	RC	RD	RE	RF	RG
UIR-NW ($n = 5$)	2	1	–	–	–	–	–	1	–	–	1	–	–	–
UIR-NE ($n = 11$)	3	5	–	–	–	–	1	1	1	–	–	–	–	–
UIR-C ($n = 7$)	1	2	–	–	–	1	–	2	1	–	–	–	–	–
UIR-S ($n = 17$)	5	3	–	1	–	2	–	3	–	1	–	1	1	–
RTat ($n = 16$)	4	4	2	–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	5

Примечание. D, E ... RF, RG – выявленные гаплотипы ($n = 14$); географически разобщенные гнездовые группы орлов: UIR-NW – северо-запад Ульяновской области, UIR-NE – северо-восток Ульяновской области, UIR-C – центр Ульяновской области, UIR-S – юг Ульяновской области, RTat – Республика Татарстан.

Note. D, E ... RF, RG – identified haplotypes ($n = 14$); geographically separated breeding groups of eagles: UIR-NW – northwest of Ulyanovsk region, UIR-NE – northeast of Ulyanovsk region, UIR-C – center of Ulyanovsk region, UIR-S – south of Ulyanovsk region, RTat – Republic of Tatarstan.

Рис. 1. Распределение гаплотипов мтДНК (D-loop) в географически разобщенных гнездовых группах орла-могильника (*Aquila heliaca*) в Поволжье. D, E ... RF, RG – выявленные гаплотипы ($n = 14$); географически разобщенные группы орлов: 1 – северо-запад Ульяновской области (UIR-NW); 2 – северо-восток Ульяновской области (UIR-NE); 3 – центр Ульяновской области (UIR-C); 4 – юг Ульяновской области (UIR-S); 5 – Республика Татарстан (RTat)

Fig. 1. Distribution of mtDNA haplotypes (D-loop) in geographically separated breeding groups of the imperial eagle (*Aquila heliaca*) in the Volga region. D, E ... RF, RG – identified haplotypes ($n = 14$); geographically separated groups of eagles: 1 – northwest of the Ulyanovsk region (UIR-NW); 2 – northeast of the Ulyanovsk region (UIR-NE); 3 – center of the Ulyanovsk region (UIR-C); 4 – south of the Ulyanovsk region (UIR-S); 5 – Republic of Tatarstan (RTat)

В выделенных географических гнездовых группах орлов-могильников присутствуют специфические митотипы. Для группы из Республики Татарстан (RTat) такими гаплотипами является Hap H-G и RG (new5) (43 %). Для ульяновских групп таких гаплотипов оказалось 9: для северо-западной и северо-восточной групп – по 1; UIR-NW – Hap RD (20 %), UIR-NE – Hap S (9 %); для центральной (UIR-C) таких гаплотипов нет; для южной (UIR-S) их 4 – Hap F, RC, RE, RF (23 %). При этом во всех поволжских группах присутствуют часто встречающиеся в Евразии гаплотипы (Hap E и D) с высокой долей представительства (14–46 %). При анализе средних чисел нуклеотидных различий между этими группами была выявлена некоторая закономерность, указывающая на более заметную обособленность гнездовых групп из Республики Татарстан и Ульяновской области. Среднее число нуклеотидных различий (k) между всеми гнездовыми группами составило 1.606 и оказалось ниже этого показателя при сравнении группы из Татарстана с ульяновскими группами (1.739) и выше при сравнении только последних – 1.563. В целом обособленность гнездовых групп из Татарстана и Ульяновской области подтверждают и данные о гаплотипической их специфичности. Гаплотипическое своеобразие этих групп высокое и выражено почти одинаково – 43 и 47 % соответственно. Причина такой обособленности исследованных гнездовых групп орлов-могильников в Поволжье, на наш взгляд, связана со слабой подразделенностью поволжской популяции, возникшей на основе, вероятно, существующего гнездового консерватизма. По всей видимости, обособленное распределение отдельных генетических линий связано прежде всего с ландшафтными особенностями мест локализации этих групп, проявляющимися в мозаичности облесенных и открытых пространств. Гнездовая группа из Татарстана приурочена к Бугульминско-Белебеевской возвышенности; северо-западная, центральная и южная гнездовые группы Ульяновской области – к Приволжской возвышенности, а северо-восточная ульяновская гнездовая группа – к Заволжской низменности.

Проведенный тест Таджимы выявил особенность популяционной структуры орла-могильника в Поволжье на примере 5 географически разделенных гнездовых групп. Отрицательное значение показателя Tajima's D (-0.405 ; $p > 0.10$) свидетельствует о меньшем числе выявленных

митотипов по сравнению с числом сегрегирующих сайтов. Низкие частоты редких митотипов указывают на возможный рост населения – вероятно, после прохождения популяциями состояния «бутылочного горлышка» в период депрессии численности. Именно на такую демографическую экспансию указывают отрицательные ($p > 0.10$) показатели F_u и $Li's D^*$ и F_u и $Li's F^*$: -1.162 и -1.073 . Вероятность существования такой популяционной ситуации в поволжской популяции орла-могильника подтверждают данные по многолетней динамике численности и числа гнездовых пар могильников [24–26].

С целью изучения полиморфизма митохондриальной ДНК орла-могильника были проведены ML- и NJ-анализы последовательностей фрагментов D-loop мтДНК (345 пн), представляющих гаплотипы орла-могильника ($n = 22$) и в качестве внешней группы – гаплотипы ($n = 3$) испанского императорского орла (*A. adalberti*). 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 Kimura 2-parameter ($K2+G(0.05)$, $\ln L = -617.82$, $BIC = 1946.72$; $AICc = 1386.51$). Для описания уровня эволюционной дифференциации и разнообразия гаплотипов была использована та же модель.

На дендрограмме, иллюстрирующей филогенетические отношения выявленных митотипов мтДНК орла-могильника, выделяются две гаплогруппы (рис. 2). В первую (AqH_1) объединены 12 гаплотипов – D, E, F, J, L, R, S, RC, RD, RE, RF, RG. При этом в Ульяновской популяции из них отмечаются 9 (75 %), а 4 являются для нее специфическими – RC, RD, RE, RF. Гаплотипы J и L, описанные для орлов из Карпатского бассейна (Словакия и Венгрия) и Наурзумского заповедника (Северный Казахстан), и гаплотип, зафиксированный в Татарстане RG (new5), в Ульяновской популяции не были обнаружены. Во вторую гаплогруппу (AqH_2) вошли 10 гаплотипов – G, H, I, K, M, N, P, Q, RA, RB. При этом гаплотипы RA и RB являются специфическими для Ульяновской популяции *A. heliaca*. Кроме этого, хорошо обособленную третью гаплогруппу (AqA) образуют гаплотипы испанского императорского орла (*A. adalberti*).

Рис. 2. Дендрограмма филогенетических взаимоотношений гаплотипов орлов-могильников *Aquila heliaca* на основе анализа последовательностей контрольного региона мтДНК (345 пн) методом максимального правдоподобия (ML) и присоединения соседа (NJ) (Kimura 2-parameter models). Внешняя группа – испанский императорский орел (*A. adalberti*). Цифры в узлах указывают на уровень бутстреп-поддержки (10 000 бутстреп-реplik). AqH_1, AqH_2, AqA – выявленные гаплогруппы. Звездочкой (*) обозначены гаплотипы, обнаруженные на территории Ульяновской области по данным на 2016 г. [8], двумя звездочками (**) – гаплотипы, обнаруженные на территории Ульяновской области по данным на 2021 г., тремя звездочками (***) – гаплотип, обнаруженный на территории Татарстана [9].

Фото птиц на рисунке: *A. heliaca* – © Михаил Корепов, *A. adalberti* – © Ricardo Rodriguez

Fig. 2. Dendrogram of phylogenetic relationships of haplotypes of imperial eagles *Aquila heliaca* on the basis of analysis of mtDNA control region sequences (345 bp) using the Maximum Likelihood (ML) and Neighbor-Joining (NJ) methods (Kimura 2-parameter models). Outgroup – spanish imperial eagles (*A. adalberti*). The numbers in the nodes indicate the level of bootstrap support (10 000 bootstrap replications). AqH_1, AqH_2, AqA – identified haplogroups. An asterisk (*) denotes haplotypes found on the territory of the Ulyanovsk region as of 2016 [8], two asterisks (**) – haplotypes found on the territory of the Ulyanovsk region as of 2021, three asterisks (***) – haplotype found on the territory of Tatarstan [9].

Photo of birds in the figure: *A. heliaca* – © M. Korepov, *A. adalberti* – © Ricardo Rodriguez

При рассмотрении гаплотипического состава выделенных в филогенетическом анализе гаплогрупп орла-могильника заметна определенная закономерность. Первую гаплогруппу

(AqH_1) формируют гаплотипы мтДНК, характеризующиеся (относительно Hap D) одной или двумя нуклеотидными заменами (см. табл. 2). Вторая гаплогруппа (AqH_2), напротив, состоит

из гаплотипов, имеющих от 3 до 5 нуклеотидных замен. Наибольший уровень средней эволюционной дивергенции (p -дистанция) по парам последовательностей был обнаружен в гаплогруппе орла-могильника AqH_1 – 0.812 ± 0.363 %. Для гаплогрупп AqH_2 и AqA этот показатель оказался чуть ниже – 0.615 ± 0.374 % и 0.424 ± 0.353 % соответственно. Оценка средней эволюционной дистанции между анализируемыми гаплогруппами показала, что она ожидаемо максимальна при сравнении гаплогрупп *A. heliaca* с гаплогруппой *A. adalberti*: AqH_1/AqA – 3.22 ± 1.67 %; AqH_2/AqA – 2.80 ± 1.51 %. В это же время сравнение гаплогрупп орла-могильника (AqH_1/AqH_2) показывает их большую эволюционную близость – 1.76 ± 0.94 %.

Результаты анализа среднего эволюционного разнообразия (π) выделенных гаплогрупп свидетельствуют о низком уровне их дифференциации. Уровень среднего эволюционного разнообразия максимален для всей выборки гаплотипов – 0.0164 ± 0.0069 . Далее этот показатель понижается при межгрупповом сравнении – 0.0103 ± 0.0055 и достигает минимума при оценке разнообразия в отдельных гаплогруппах – 0.0062 ± 0.0030 . Таковую тенденцию косвенно подтверждают и значения коэффициента эволюционной дифференциации гаплотипов орла-могильника – 0.625 ± 0.133 .

Кластеризация гаплотипов, проведенная при построении дерева филогенетических отношений, позволила выявить близкие с точки зрения микроэволюционных преобразований гаплотипы. Гаплотипы, характерные для поволжской популяции орлов-могильников (Нар RA, RC, RD, RE, RF и RG), отличаются от гаплотипов, обнаруженных в европейских популяциях *A. heliaca*, только единичными нуклеотидными заменами – от Нар Q заменой A–G (поз. 134), от Нар F заменой C–T (поз. 108), от Нар D заменой G–C (поз. 185), от Нар L заменой A–G (поз. 243), от Нар D заменой G–T (поз. 341), от Нар R заменой C–T (поз. 219) соответственно (см. табл. 2). По имеющимся у нас данным сказать, что европейские гаплотипы являются материнскими для поволжских, мы не можем, констатируя лишь то, что выявленная связь гаплотипов вполне очевидна.

Для проведения более точной кластеризации анализируемых гаплотипов орлов-могильников и выяснения микроэволюционных событий между ними была построена медианная сеть

гаплотипов контрольного региона мтДНК, выявленных в поволжской популяции, и маркерных гаплотипов, не обнаруженных в ней (рис. 3). Сеть построена на основании 14 сегрегирующих и 7 информативных сайтов. Нуклеотидное разнообразие (π) вошедших в сеть последовательностей составила 0.1794, коэффициент дифференциации (F_{ST}) – 0.106 ($p < 0.029$), а тест Таджиджи выявил близкую к стабилизации генетической структуры изучаемых гаплогрупп орлов-могильников $T_s D = -0.369$ при $p = 0.622$. В целом она подтверждает данные, полученные выше при анализе последовательности в программе MEGA. Результаты медианного теста указывают на существование двух генетически близких групп последовательностей фрагмента контрольного региона мтДНК, соответствующих в большей и меньшей степени измененным гаплотипам. При этом в сети хорошо выделяются промежуточные гаплотипы между этими двумя группами – Нар L и RB, имеющие по 2 нуклеотидные замены. Анализ географической приуроченности гаплотипов выявил, что Нар D, E и RA являются широко распространенными и встречаются в 5–7 географически обособленных гнездовых группах орлов-могильников. Кроме того, первые два являются образующими для гаплогруппы AqH_1, а третий – для гаплогруппы AqH_2.

Полученные данные о скрытом в некотором смысле полиморфизме мтДНК орлов-могильников в поволжской популяции были сопоставлены с данными анализа полиморфизма микросателлитной ДНК. Для изученных гнездовых групп орлов на территории Ульяновской области (северо-западной, северо-восточной, центральной и южной) было выявлено 4 аллели для локуса IEAAAG09 и по 5 аллелей для локусов IEAAAG11 и IEAAAG15 (табл. 4). Среднее число аллелей на локус (N_a) варьирует от 2.667 до 5.000 (3.586 ± 0.538 , $n = 4$), ожидаемая гетерозиготность (H_{exp}) изменяется от 0.555 до 0.657 (0.624 ± 0.118 , $n = 4$), наблюдаемая гетерозиготность (H_{obs}) ниже ожидаемой и варьирует от 0.333 до 0.619 (0.508 ± 0.109 , $n = 4$), средний индекс аллельных «потерь» Гарза-Вильямса на локус (G-W) изменяется от 0.916 до 1.000 (0.958 ± 0.072 , $n = 4$), что в целом свидетельствует о стабильной численности данного вида при среднем значении индекса фиксации гамет (F_{ST}) – 0.321 ± 0.028 .

Рис. 3. Медианная сеть гаплотипов, построенная на основе последовательностей контрольного региона мтДНК (345 пн) орлов-могильников *Aquila heliaca* ($n = 75$). Поперечные штрихи на ветвях показывают количество мутационных событий. Цвета обозначают образцы гаплотипов с различной географической принадлежностью: *GenHap* – гаплотипы, не выявленные в Поволжье (NCBI GeneBank), *UR-NW* – северо-запад Ульяновской области, *UR-NE* – северо-восток Ульяновской области, *UR-C* – центр Ульяновской области, *UR-S* – юг Ульяновской области, *TAT* – Республика Татарстан, *Ch* – Чувашская Республика, *Mord* – Республика Мордовия. Размер круга пропорционален числу особей, а доли пропорциональны частотам гаплотипов

Fig. 3. Median haplotype network based on mtDNA control region sequences (345 bp) of imperial eagles *Aquila heliaca* ($n = 75$). Transverse strokes and numbers on the branches show the number of mutational events. The colors indicate haplotype samples with different geographical affiliation: *GenHap* – haplotypes not discovered in the Volga region (NCBI GeneBank), *UR-NW* – northwest of the Ulyanovsk region, *UR-NE* – northeast of the Ulyanovsk region, *UR-C* – center of the Ulyanovsk region, *UR-S* – south of the Ulyanovsk region, *TAT* – Republic of Tatarstan, *Ch* – Chuvash Republic, *Mord* – Republic of Mordovia. The circle size is proportional to the number of individuals, and the fractions are proportional to the frequencies of haplotypes

Таблица 4

Показатели генетической структуры гнездовых групп орла-могильника (*Aquila heliaca*) на территории Ульяновской области, полученные в ходе анализа трех микросателлитных локусов IEAAAG09, IEAAAG11 и IEAAAG15

Table 4

Indicators of the genetic structure of nesting groups of imperial eagles (*Aquila heliaca*) in the Ulyanovsk region, obtained during the analysis of three microsatellite loci IEAAAG09, IEAAAG11 and IEAAAG15

Группа	N	Индексы стандартной изменчивости					Индексы молекулярной изменчивости
		N_a	H_{obs}	H_{exp}	R	$G-W$	
UR-NW	4	2.677±0.577	0.333±0.000	0.555±0.203	2± 1	0.916±0.144	1.525
UR-NE	7	3.667±0.577	0.619±0.082	0.633±0.099	3± 0	0.916±0.144	1.737
UR-C	7	3± 0	0.541±0.294	0.657±0.08	2± 0	1±0	1.531
UR-S	33	5±1	0.54± 0.06	0.653±0.09	4± 1	1±0	1.708

Примечание. UR-NW – северо-запад Ульяновской области, UR-NE – северо-восток Ульяновской области, UR-C – центр Ульяновской области, UR-S – юг Ульяновской области. N – размер выборки; N_a – среднее число аллелей на локус; $G-W$ индекс – средний индекс аллельных «потерь» Garza-Williams на локус; H_{exp} – ожидаемая гетерозиготность; H_{obs} – наблюдаемая гетерозиготность; R (allelic range) – диапазон (разброс) аллелей; θ_H – ожидаемая гомозиготность; GD (average gene diversity over loci) – среднее генное разнообразие по локусу.

Note. UR-NW – northwest of the Ulyanovsk region, UR-NE – northeast of the Ulyanovsk region, UR-C – center of the Ulyanovsk region, UR-S – south of the Ulyanovsk region. N is the sample size; N_a is the average number of alleles per locus; $G-W$ index is the average index of Garza-Williams allelic "losses" per locus; H_{exp} is the expected heterozygosity; H_{obs} is the observed heterozygosity; R is the range (spread) alleles; θ_H – expected homozygosity; GD – average gene diversity over loci.

Анализ генетической структуры гнездовых групп орла-могильника на территории Ульяновской области в программе Structure 2.3.4 по трем микросателлитным локусам (IEAAAG09, IEAAAG11 и IEAAAG15) при использовании приложения Structure Harvester по методу Эванно [27] позволил получить следующие ре-

зультаты: оптимальное для анализа число кластеров (K), описывающих генетическую структуру четырех гнездовых групп *A. heliaca*, составило 5, а сама генетическая структура по этим популяциям является однородной с незначительными колебаниями относительно представленных особей (рис. 4).

Рис. 4. Модель расхождения гнездовых групп орла-могильника (*Aquila heliaca*) на территории Ульяновской области относительно кластеров ($K = 5$). Гнездовые группы: 1 – северо-запад Ульяновской области (UR-NW); 2 – северо-восток Ульяновской области (UR-NE); 3 – центр Ульяновской области (UR-C); 4 – юг Ульяновской области (UR-S)

Fig. 4. Model of divergence of nest groups of the imperial eagles (*Aquila heliaca*) on the territory of the Ulyanovsk region relative to clusters ($K = 5$). Breeding groups: 1 – northwest of the Ulyanovsk region (UR-NW); 2 – northeast of the Ulyanovsk region (UR-NE); 3 – center of the Ulyanovsk region (UR-C); 4 – south of the Ulyanovsk region (UR-S)

Таким образом, проведенный анализ микросателлитной ДНК орлов-могильников географически изолированных гнездовых групп на территории Ульяновской области выявил низкий уровень внутреннего полиморфизма в этой части поволжской популяции *A. heliaca* по этому молекулярно-генетическому маркеру.

Полученные в ходе нашего исследования данные по полиморфизму географически изолированных гнездовых групп в поволжской популяции орла-могильника позволили рассмотреть вопрос гаплотипического разнообразия изученных евразийских популяций *A. heliaca* (рис. 5, табл. 5). Распределение гаплотипов в географически подразделенных популяциях имеет закономерный характер. При анализе распределения самых распространенных гап-

типов – E (43 % от общей выборки, $n = 157$) и D (19 %) – заметно, что их представительство в популяциях сначала снижается, а потом вновь возрастает при продвижении с запада на восток. В популяциях Восточной Европы соотношения этих гаплотипов составляют 50 % к 8 %, в поволжской популяции – 28 % к 28 %, а в популяциях Зауралья и Западной Сибири – 75 % к 50 % и 61 % к 10 % соответственно. При этом именно эти два гаплотипа являются образующими гаплогруппу AqH_1 с низкой изменчивостью последовательностей, связанной, по-видимому, с характером географической изменчивости, определяемой ландшафтными и биотопическими особенностями местообитаний в пределах широкого евразийского ареала (см. рис. 2).

Рис. 5. Распределение гаплотипов мтДНК (D-loop) в географически разобщенных гнездовых группах орла-могильника (*Aquila heliaca*) в Евразии. D, E ... RF, RG – выявленные гаплотипы ($n = 16$); географически разобщенные группы орлов: 1 – Западная Словения (WestSlov); 2 – Восточная Словения (EastSlov); 3 – Восточная Украина (EastUkr); 4 – Ульяновская область (UIR); 5 – Республика Татарстан (RTat); 6 – Оренбургская область (OrenbR); 7 – Республика Казахстан, запад и центр (RKazakh); 8 – Наурзумский заповедник, Северный Казахстан (NurKazakh); 9 – Республика Хакасия (RKhak); 10 – Республика Алтай (RAIt)

Fig. 5. Distribution of mtDNA haplotypes (D-loop) in geographically separated breeding groups of the imperial eagle (*Aquila heliaca*) in Eurasia. D, E ... RF, RG – identified haplotypes ($n = 16$); geographically separated groups of eagles: 1 – Western Slovenia (WestSlov); 2 – Eastern Slovenia (EastSlov); 3 – Eastern Ukraine (EastUkr); 4 – Ulyanovsk Region (UIR); 5 – Republic of Tatarstan (RTat); 6 – Orenburg Region (OrenbR); 7 – Republic of Kazakhstan, west and center (RKazakh); 8 – Naurzumsky Reserve, Northern Kazakhstan (NurKazakh); 9 – Republic of Khakassia (RKhak); 10 – Republic of Altai (RAIt)

Таблица 5

Распределение гаплотипов мтДНК (D-loop) в географически разобщенных гнездовых группах орла-могильника (*Aquila heliaca*) в Евразии

Table 5

Distribution of mtDNA haplotypes (D-loop) in geographically separated breeding groups of the imperial eagle (*Aquila heliaca*) in Eurasia

Регион	Гаплотипы															
	D	E	H-G	F	I	K	L	R	S	RA	RB	RC	RD	RE	RF	RG
WestSlov ($n = 12$)	2	6	—	—	3	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EstSlov ($n = 12$)	—	5	—	—	—	2	4	—	1	—	—	—	—	—	—	—
UIR ($n = 40$)	11	11	—	1	—	—	—	3	1	7	2	1	1	1	1	—
KazakhR ($n = 9$)	—	6	—	1	—	—	—	—	—	1	1	—	—	—	—	—
Naurzum ($n = 20$)	10	8	1	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
RTat ($n = 16$)	4	4	2	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	5
RMord ($n = 2$)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—	—	—
ChR ($n = 1$)	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
AltR ($n = 31$)	3	19	—	8	—	—	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—
RKhak ($n = 3$)	—	3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
OrenbR ($n = 4$)	—	3	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
RBash ($n = 1$)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1
SamR ($n = 1$)	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
StavrR ($n = 1$)	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
EastUkr ($n = 4$)	—	1	—	—	—	—	1	—	—	1	1	—	—	—	—	—
Bcero ($n = 157$)	30	69	3	12	4	3	5	3	3	11	4	1	1	1	1	6

Примечание. D, E ... RF, RG – выявленные гаплотипы ($n = 16$); географически разобщенные гнездовые группы орлов: WestSlov – Западная Словения, EastSlov – Восточная Словения, EastUkr – Восточная Украина (Харьков), UIR – Ульяновская область, RKazakh – Западный и Центральный Казахстан, NurKazakh – Наурзумский заповедник, Северный Казахстан, RTat – Республика Татарстан, RMord – Республика Мордовия, ChR – Чувашская Республика, RAlt – Республика Алтай, RKhak – Республика Хакасия, OrenbR – Оренбургская область, RBash – Республика Башкортостан, SamR – Самарская область, StavR – Ставропольский край, EastUkr – Восточная Украина (Харьков).

Note. D, E ... RF, RG – identified haplotypes ($n = 16$); geographically separated breeding groups of eagles: WestSlov – Western Slovenia, EastSlov – Eastern Slovenia, EastUkr – Eastern Ukraine (Kharkiv), UIR – Ulyanovsk region, RKazakh – Western and Central Kazakhstan, NurKazakh – Naurzum Reserve, Northern Kazakhstan, RTat – Republic of Tatarstan, RMord – Republic of Mordovia, ChR – Chuvash Republic, RAlt – Republic of Altai, RKhak – Republic of Khakassia, OrenbR – Orenburg Region, RBash – Republic of Bashkortostan, SamR – Samara region, StavR – Stavropol region, EastUkr – Eastern Ukraine (Kharkiv).

Максимальное число специфических гаплотипов отмечается в части поволжской (Нар R, RA, RB, RC, RD, RE, RF – 42 %) популяции, приуроченной к территории Ульяновской области. В гнездовой группе из Республики Татарстан выявлен только один специфический гаплотип (Нар RG). При этом именно он и является в ней самым распространенным – 31 %. В поволжской популяции, как и в случае с гаплогруппой AqH_1, самые распространенные гаплотипы Нар RA и R (25 %) являются образующими гаплогруппу AqH_2 с высокой изменчивостью последовательностей. Последняя, по всей вероятности, связана с широким размахом изменчивости последовательностей и локальным закреплением генетических линий в результате гнездового консерватизма, наблюдающихся по причине сильной мозаичности биотопов в условиях лесостепной зоны и хорошо выраженной антропогенной фрагментированности среды обитания. Аналогичное, но не

столь выраженное повышение гаплотипического разнообразия наблюдается и в популяциях орла-могильника, приуроченных к областям высотной поясности и характеризующихся высотным разнообразием условий обитания с одновременной поясной их однородностью.

Таким образом, проведенные исследования показали, что поволжская популяция является генетически дифференцированной и состоит по крайней мере из двух субпопуляций – ульяновской и татарстанской, характеризующихся специфическими гаплотипами мтДНК и приуроченных к различным возвышенностям – Приволжской и Бугульминско-Белебеевской. Несмотря на эти различия, анализ микросателлитной ДНК, а также реконструкция эволюционных событий, связанных с изменчивостью гаплотипов мтДНК, показывают, что уровень полиморфизма ульяновской субпопуляции орлов-могильников является низким, а сама популяция достаточно однородной.

Список литературы

1. Красная книга Российской Федерации: (Животные). М. : Тов-во научн. изданий КМК, 2008. 855 с.
2. Об утверждении Перечня объектов животного мира, занесенных в Красную книгу Российской Федерации : приказ Министерства природных ресурсов и экологии РФ № 162 от 24 марта 2020 г. // Информационно-правовой портал «Гарант».
3. Белик В. П., Галушин В. М. Популяционная структура ареала орла-могильника в Северной Евразии // Королевский орел: Распространение, состояние популяций и перспективы охраны орла-могильника (*Aquila heliaca*) в России : сб. науч. тр. М. : Союз охраны птиц России, 1999. С. 129–139.
4. Seibold I., Helbig A. J., Meyburg B.-U. [et al.]. Genetic Differentiation and Molecular Phylogeny of European Aquila Eagles according to Cytochrome b Nucleotide Sequences // Eagle Studies. Berlin, London & Paris, 1996. P. 1–15.
5. Väli Ü. Mitochondrial pseudo-control region in old world eagles (genus *Aquila*) // Molecular Ecology. 2002. Vol. 11. P. 2189–2194.
6. Martinez-Cruz B., Godoy J. A., Negro J. J. Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*) // Molecular Ecology. 2004. № 13. P. 2243–2255.
7. Vili N., Horváth M., Szabó K. [et al.]. Genetic structure of the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population in Slovakia // Slovak Rapt J. 2009. № 3. P. 21–28.
8. Корепов М. В., Стрюков С. А., Корепова Д. А. [и др.]. Генетическая дифференциация и полиморфизм поволжской популяции орла-могильника (*Aquila heliaca*, Falconiformes, Accipitridae) по данным анализа митохондриальной ДНК // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Естественные науки. 2017. № 3 (19). С. 3–15. doi: 10.21685/2307-9150-2017-3-1.
9. Zinevich L. S., Schepetov D. M., Karyakin I. V. NCBI. Direct Submission: MN486302-MN486372. VRT 20-MAY-2020. 2020.

10. Vili N., Nemesházi E., Kovács S. [et al.]. Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling // J. Ornithol. 2013. Vol. 154. P. 587–595.
11. 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.
12. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. URL: <http://www.cshlpress.com>
13. Godoy J. A., Negro J. J., Hiraldo F., Donazar J. A. Phylogeography, genetic structure and diversity in the bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.), as revealed by mitochondrial DNA // Molecular Ecology. 2004. № 13. P. 371–390.
14. Busch J. D., Katzner T. E., Bragin E., Keim P. Tetranucleotide microsatellites for *aquila* and *haliaeetus* eagles // Molecular Ecology Notes. 2005. Vol. 5. P. 39–41. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00823.x.
15. 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>
16. URL: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>
17. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // Bioinformatics. 2009. Vol. 25. P. 1451–1452.
18. 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.
19. Darriba D., Taboada G. L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing // Nature Methods. 2012. Vol. 9 (8). P. 772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
20. Leigh J. W., Bryant D., Nakagawa S. POPART: full feature software for haplotype network construction // Methods in Ecology and Evolution. 2015. Vol. 6 (9). P. 1110–1116. doi: 10.1111/2041-210x.12410.
21. Clement M., Posada D., Crandall K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies // Molecular Ecology. 2000. Vol. 9 (10). P. 1657–1659. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x.
22. Excoffier L., Lischer H. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Institute of Ecology and Evolution, University of Bern, 1995–2015.
23. Pritchard J. K., Wen X., Falush D. Documentation for Structure software: Version 2.3. 2010. URL: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>
24. Бородин О. В., Смирнова С. Л., Свиридова Т. В. [и др.]. Современное состояние орла-могильника в Ульяновской области // Королевский орел: Распространение, состояние популяций и перспективы охраны орла-могильника (*Aquila heliaca*) в России : сб. науч. тр. М. : Союз охраны птиц России, 1999. С. 68–73.
25. Корепов М. В. Распространение и численность могильника (*Aquila heliaca*, *Falconiformes*, *Accipitridae*) в центральной части Приволжской возвышенности // Зоологический журнал. 2012. Т. 91, № 2. С. 190–201.
26. Корепов М. В., Бородин О. В. Солнечный орел (*Aquila heliaca*) – природный символ Ульяновской области. Ульяновск : НИЦ «Поволжье», 2013. 213 с.
27. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUC-
TURE: a simulation study // Molecular Ecology. 2005. Vol. 14. P. 2611–2620.

References

1. *Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii: (Zhivotnye)* = Red book of the Russian Federation (Animals). Moscow: Tov-vo nauchn. izdaniy KMK, 2008:855. (In Russ.)
2. On the approval of the List of fauna species included in the Red Book of the Russian Federation: order of the Ministry of Natural Resources and Ecology RF no. 162 of 24 March, 2020. *Informatsionno-pravovoy portal «Garant»* = Information and legal portal «Garant». (In Russ.)
3. Belik V.P., Galushin V.M. Population structure of the range of the Imperial Eagle in Northern Eurasia. *Korolevskiy orel: Rasprostraneniye, sostoyaniye populyatsiy i perspektivy okhrany orla-mogil'nika (Aquila heliaca) v Rossii: sb. nauch. tr.* = Royal Eagle: Distribution, state of populations and prospects for protecting the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) in Russia: collection of articles. Moscow: Soyuz okhrany ptits Rossii, 1999:129–139. (In Russ.)
4. Seibold I., Helbig A.J., Meyburg B.-U. [et al.]. Genetic Differentiation and Molecular Phylogeny of European Aquila Eagles according to Cytochrome b Nucleotide Sequences. *Eagle Studies*. Berlin, London & Paris, 1996:1–15.
5. Väli Ü. Mitochondrial pseudo-control region in old world eagles (genus *Aquila*). *Molecular Ecology*. 2002;11:2189–2194.
6. Martinez-Cruz B., Godoy J.A., Negro J.J. Population genetics after fragmentation: the case of the endangered Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Molecular Ecology*. 2004;(13):2243–2255.
7. Vili N., Horváth M., Szabó K. [et al.]. Genetic structure of the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) population in Slovakia. *Slovak Rapt J.* 2009;(3):21–28.
8. Korepov M.V., Stryukov S.A., Korepova D.A. [et al.]. Genetic differentiation and polymorphism of the Volga imperial eagle (*Aquila heliaca*, *Falconiformes*, *Accipitridae*) population according to the analysis of mitochondrial DNA. *Izvestiya vysshikh uchebnykh zavedeniy. Povolzhskiy region. Estestvennye nauki* = University proceedings. The Volga region. Natural sciences. 2017;(3):3–15. (In Russ.). doi: 10.21685/2307-9150-2017-3-1
9. Zinevich L.S., Schepetov D.M., Karyakin I.V. *NCBI. Direct Submission: MN486302-MN486372. VRT 20-MAY-2020.* 2020.

10. Vili N., Nemesházi E., Kovács S. [et al.]. Factors affecting DNA quality in feathers used for non-invasive sampling. *J. Ornithol.* 2013;154:587–595.
11. Arrigi F.E., Bergendahl G., Mandel M. Isolation and characterization of DNA from fixed cells and tissues. *Exp. Cell. Res.* 1968;(50):47–53.
12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. Available at: <http://www.cshlpress.com>
13. Godoy J.A., Negro J.J., Hiraldo F., Donazar J.A. Phylogeography, genetic structure and diversity in the bearded vulture (*Gypaetus barbatus*, L.), as revealed by mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*. 2004;(13):371–390.
14. Busch J.D., Katzner T.E., Bragin E., Keim P. Tetranucleotide microsatellites for aquila and haliaeetus eagles. *Molecular Ecology Notes*. 2005;5:39–41. doi: 10.1111/j.1471-8286.2004.00823.x
15. 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>
16. Available at: <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>
17. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 2009;25:1451–1452.
18. 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.
19. Darriba D., Taboada G.L., Doallo R., Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. 2012;9(8):772. doi: 10.1038/nmeth.2109
20. Leigh J.W., Bryant D., Nakagawa S. POPART: full feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*. 2015;6(9):1110–1116. doi: 10.1111/2041-210x.12410
21. Clement M., Posada D., Crandall K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*. 2000;9(10):1657–1659. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.01020.x
22. Excoffier L., Lischer H. An *Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis*. Institute of Ecology and Evolution, University of Bern, 1995–2015.
23. Pritchard J.K., Wen X., Falush D. *Documentation for Structure software: Version 2.3*. 2010. Available at: <http://pritch.bsd.uchicago.edu/structure.html>
24. Borodin O.V., Smirnova S.L., Sviridova T.V. [et al.]. The current state of the Imperial eagle in the Ulyanovsk region. *Korolevskiy orel: Rasprostranenie, sostoyanie populyatsiy i perspektivy okhrany orla-mogil'nika (Aquila heliaca) v Rossii: sb. nauch. tr.* = Royal Eagle: Distribution, state of populations and prospects for protecting the Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) in Russia: collection of articles. Moscow: Soyuz okhrany ptits Rossii, 1999:68–73. (In Russ.)
25. Korepov M.V. Distribution and number of the Imperial Eagle (*quila heliaca*, Falconiformes, Accipitridae) in the central part of the Volga Upland. *Zoologicheskii zhurnal* = Zoological journal. 2012;91(2):190–201. (In Russ.)
26. Korepov M.V., Borodin O.V. *Solnechnyy orel (Aquila heliaca) – prirodnyy simvol Ul'yanovskoy oblasti* = The sun eagle (*Aquila heliaca*) is a natural symbol of the Ulyanovsk region. Ulyanovsk: NITs «Povolzh'e», 2013:213. (In Russ.)
27. Evanno G., Regnaut S., Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14:2611–2620.