

## Проблема генетической идентификации балобана *Falco cherrug* и кречета *Falco rusticolus*

Gyr- and Saker Falcons genetic identification  
problems and prospects

Д.Н. Рожкова<sup>1,5</sup>, Л.С. Зиневич<sup>1,5</sup>, И.В. Карякин<sup>2</sup>,  
Я.А. Редькин<sup>3</sup>, В.Г. Тамбовцева<sup>1</sup>, Г. Шрамко<sup>4</sup>,  
А.Г. Сорокин<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова, РАН,

<sup>2</sup> ООО «Сибирский экологический центр», Новосибирск,

<sup>3</sup> Научно-исследовательский Зоологический музей МГУ им.  
М.В. Ломоносова, Москва,

<sup>4</sup> Дебреценский университет, Дебрецен, Венгрия

<sup>5</sup> ВНИИ «Экология», Москва, Россия,

E-mail: darroznature@gmail.com

### Введение

Фундаментальной задачей изучения близкородственных видов птиц является реконструкция их эволюции. Особого внимания заслуживают виды, подвергающиеся разрушительному антропогенному воздействию. Эволюционно молодая группа видов *Hierofalco* (Jarvis, 2014) является подходящей моделью для исследования процессов видообразования. Входящие в данную группу балобан и лаггар *Falco jugger* включены в Красный лист МСОП со статусом «угрожаемый» (Endangered) и «близкий к уязвимому» (Near threatened) соответственно (BirdLife International, 2016, 2017). На территории России балобану и кречету присвоен статус особо ценных видов животных (ПП РФ N 978 от 31.10.2013 г.), занесенных в Красную книгу (2001) по причине сокращения численности.

Основные данные о морфологии и биологии *Hierofalco* имеются в многочисленных публикациях (Мензбир, 1916; Бутурлин, Дементьев, 1936; Сушкин, 1938; Дементьев, 1951; Дементьев, Шагдарсурен, 1964; Карякин, 2011; Пфеффер, 2012 и др.). В публикациях отражен схожий спектр фенотипов, а также способность разных представителей *Hierofalco* скрещиваться и оставлять плодовитое потомство. При этом их ареалы и экологические характеристики крайне различны. Как следствие, возник вопрос не только о происхождении кречета и балобана, но и имеющего дискуссионный статус «алтайского сокола», отличающегося темным оперением от остальных балобанов Алтае-Саянского региона.

Что касается молекулярно-генетической реконструкции эволюции данных видов, первые описания филогенетических взаимосвязей четырех представителей группы *Hierofalco* внутри семейства *Falconidae* были основаны на анализе фрагментов (300 п.н.) или полной последовательности (1142 п.н.) *cyt b*. Внутри группы для кречета выявили одну, а для балобана и «алтайского сокола» – три совпадающие митохондриальные линии, не коррелирующие с популяционной принадлежностью. Птицы с «алтайским» фенотипом были признаны одним из фенотипов балобана. Для объяснения генетического и морфологического разнообразия видов была выдвинута гипотеза о древней (около 200 тысяч л.н.) гибридизации видов, независимо существующих от 1 млн. л.н. (Seibold, 1993; Helbig, 1994; Wink, 2000, 2004).

В работах Ф. Ниттингер с соавторами (2005, 2007) в качестве маркеров видовой принадлежности применены микросателлиты (STR) и митохондриальная Д-петля. Анализ фрагмента Д-петли размером от 412 до 458 п.н. показал наличие двух, западной и восточной, гаплогрупп балобана, где вторая также включает в себя кречета. Этот результат согласуется с отсутствием достоверных отличий между видами по результатам исследования 6 микросателлитных локусов. Наличие одинаковых нейтральных маркеров авторы объясняют как возможным явлением неполного расхождения линий, так и древней или современной гибридизацией.

Н. Дауни с соавторами (2008) на основе анализа последовательностей цитохромоксидазы I и набора из 9 STR-локусов установили парафилетичность происхождения балобана и кречета при достоверности отличий видов друг от друга.

Результаты исследования А.В. Нечаевой и др. (2018) на основе ранее описанных нейтральных маркеров также не прояснили вопрос происхождения видов и их возможную гибридизацию.

Методами секвенирования нового поколения (NGS) получены полные ядерные и митохондриальные геномы балобана и кречета. Сравнение их кариотипов и геномов позволило выявить отсутствие существенных хромосомных перестроек между видами (Zhan, 2013; Sveinsdóttir, 2017; Joseph, 2018).

Таким образом, при большом количестве существующих данных, остаются актуальными вопросы формирования видов группы *Hierofalco* и поиска генетических маркеров для их идентификации. Наше исследование было направлено на сопоставление существующих данных с целью получения непротиворечивой гипотезы эволюции изучаемых видов.

### Материалы и методы

Сбор, обработка и анализ данных производился ранее описанными общими методиками (Horvath, 2005; Зиневич, 2018; Галинская, 2019). Свод данных об исследованных образцах приведен в таблице 1.

**Таблица 1**

Материал, использованный для генетического анализа

Тип материала	Количество, единицы	Годы сбора	Источник материалов/ Регионы и места взятия образцов
Сухие ткани музейных тушек балобанов «алтайского» и других фенотипов	72	1881-2009	Зоологический музей МГУ/Алтае-Саяны, Даурия, Крым, Казахстан, Киргизия, Монголия, Средняя полоса РСФСР
Заспиртованные растущие перья и ткани природных птиц и «алтайских» балобанов из питомников	71	2017, 2018	Проект по восстановлению генетического разнообразия балобана в Алтае-Саянском регионе
Линные перья балобанов	16	2008-2019	Коллекция линных перьев редких и особо ценных видов хищных птиц ИБР РАН/ Алтае-Саянский регион, Даурия, Крым, Монголия, Устьорт
Заспиртованные контурные перья «алтайских» балобанов	3	2018	Питомник «Союза сокольников Северо-Запада» России/Алтае-Саянский регион
Сухие контурные перья кречетов	5	2019	НМЦ «Биоразнообразие» ВНИИ Экология/Чукотка
Заспиртованные ткани кречетов	8	2019	НМЦ «Биоразнообразие» ВНИИ Экология/ Камчатка, Чукотка
Линные перья кречетов	4	2017	Питомник «Алтай Фалькон»/ Алтае-Саянский регион
Заспиртованная кровь сапсанов	6	2018	Экспедиция Покровского И.Г./ остров Колгуев
Заспиртованные ткани сапсанов	3	2018	НМЦ «Биоразнообразие» ВНИИ Экология/птицы из питомников
Линные перья сапсанов	2	2009	Коллекция линных перьев редких и особо ценных видов хищных птиц ИБР РАН/ Алтае-Саянский регион

Выделение ДНК осуществлялось наборами TIANamp Genomic Kit (Китай) и ДНК-Экстран-2 (Россия) на основе протеиназы К согласно протоколам производителей. Для амплификации и секвенирования митохондриальных последовательностей использована разработанная нами библиотека специфических праймеров (табл.2).

ПЦР митохондриальных маркеров проводили с помощью NS Taq-полимеразы (Евроген, Россия) по модифицированному протоколу с добавлением 2-5% ДМСО. Для проведения микросателлитного анализа использованы ранее опубликованные праймеры к следующим локусам, эффективно апробированным на малой выборке образцов: Ufpcl, NVH fp13, NVH fp89, NVH fp54, NVH fp82-2, NVH fp92-1, NVH fp79-4, Age5 (Dawnaу, 2008).

Обработка результатов капиллярного электрофореза и секвени-

рования проведена с помощью программы GeneMarker (SoftGenetics, США) и программного пакета Lasergene (DNASTAR, США) соответственно. Расчет генетических расстояний осуществлен с помощью программного пакета Mega 7 (MEGA, США). Для анализа использованы референсные последовательности из базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>): KP337902.1 (*F. cherrug*), NC\_029359.1 (*F. rusticolus*), JX029991.1 (*F. peregrinus*) и EU196361.1 (*F. tinnunculus*). Структура популяций на основе вариаций частот аллелей рассчитана в пакете Geneland программной среды R-Studio (Guillot, 2005). Результаты визуализированы в MS Excel. Анализ полногеномной изменчивости осуществлён методом RAD-seq на Illumina NextSeq machine (single-end mid-output kit) по модифицированному протоколу из статьи Н. Бейрда (2008) с соавторами.

Таблица 2

Библиотека специфических праймеров  
на последовательности мт-генома балобана и кречета

Название	Последовательность 5'-3' прямого и обратного праймеров
FCB1f/FCB3r	ATCAATCCTAACTATCCTACTC / CAGATGAAGAATAAGGATGC
FCB3f/FCB1r	GACTAATCCGCAACCTACATG / GGAAGGTGAGGTGGATTAGGG
FCB2f/FCB4r	ACTGACCCGATTCTTCGCC / GTGAAGTAGAGGGCTTAG
FCB4f/FCB2r	CCGCCTCAGTGCTAATCC / GGGTGTGTGGTTGGTGGG
FCDf/FCR1r	TTGGCCAAGTACTTCACTCTCCT / CTGACGCTGGTTCGTGTAATG
FCR4f/FCD1r	TTGTAACCAAAGAGTGAAGG / TATACAGGGCATGGGTTAGT
FCR2f/FCR1r	CCCATTATGTATTACTTTGC / CTGACGCTGGTTCGTGTAATG
FCD3f/FCD3r	ACTAAACCCATGCCCTGTAT / GAACCAACCGCCCCAAAAAG
FCD4f/FCD4r	GCCCTTCTCCGAGCCATCTG / GGGTAGGGGGTTTTAAGTTTTTGT
FCD5f/FCD5r	CGGTTTGCATTTGGAGTCA / TCGGGCGGTTTAGGTTTATTGG

### Результаты и обсуждение

Для выборки, включающей двух кречетов Чукотско-Камчатской популяции, двух балобанов из Крыма и 8 балобанов из Алтае-Саянского региона, получены последовательности *сyt b* длиной 1122 п.н. и Д-петли длиной от 1321 до 1601 п.н. Филогенетический анализ фрагмента *сyt b* подтвердил наличие нескольких достоверных мт-



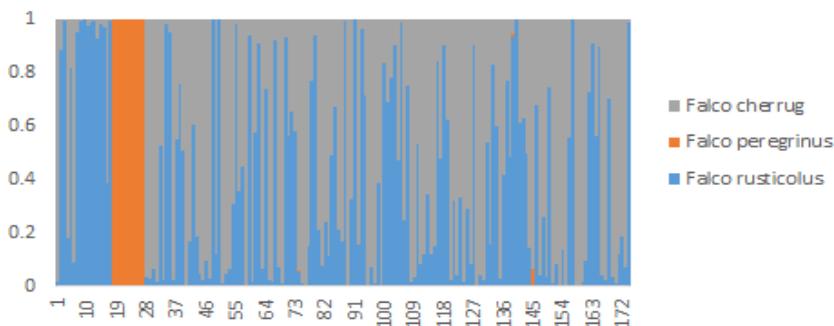


Рис. 2. Диаграмма распространения частот аллелей среди описанных образцов, рассчитанная в пакете Geneland программной среды R-Studio и визуализированная с помощью MS Excel

Для предварительного описания филогеографической структуры балобана был проведен анализ полных геномов методом RAD-Seq (Miller, 2007). Исследованы 20 балобанов из Паннонской популяции, 18 балобанов из Алтае-Саянского региона и два кречета из Чукотско-Камчатской популяции. Выборка из Алтае-Саянского региона включает трёх искусственно выращенных птиц с «алтайской» окраской, а также двух потомков дикой самки с этим фенотипом.

Было получено 36,3 млн. прочтений длиной 150 п.н. Картирование полученных данных на геном балобана из ОАЭ (номер в базе данных NCBI: AKMU00000000) позволило идентифицировать 1 618 374 сайтов рестрикции и выявить 752 872 олигонуклеотидных замен. В дальнейшей работе были использованы 18 089 полиморфизмов по геному. На их основе были реконструированы филогенетические отношения для исследуемых групп (рис. 3).

Наши результаты показывают, что балобаны из Сибири филогенетически ближе к кречету, чем к балобанам из европейской популяции (рис.3). Следует также отметить, что даже полногеномные исследования не позволили нам отличить птиц с тёмным оперением, описываемых как «алтайские сокола», от остальных балобанов Алтае-Саянского региона. Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать, что «западный» балобан отделился от единой предковой популяции, из которой в дальнейшем образовались «восточный» балобан и кречет при возникновении постоянной пространственной изоляции (Карякин, 2011).

В рамках этой гипотезы о нахождении современных кречета и балобана в процессе дивергенции, данные RAD-Seq полностью согла-

суются со всеми ранее полученными результатами как микросателлитного анализа, так и анализа последовательностей митохондриального генома. При этом наблюдаемые различия нейтральных маркеров относятся к более ранним этапам эволюции группы *Hierofalco*, а видообразование идет по типу «геномных островов» (Yeaman, 2013). В таком случае, достоверные маркеры различий между западными и восточными группировками балобана и кречетом необходимо искать в адаптивно значимых ядерных генах, как это было сделано для балобанов Тибетского нагорья (Pan, 2017).

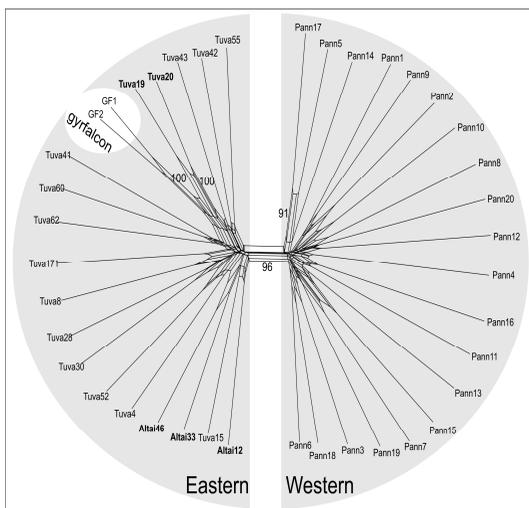


Рис. 3. Филогенетическое древо на основе 18 089 полиморфизмов по ядерному геному, построенное методом максимального правдоподобия.

Длина ветвей не отражает генетическую дистанцию.

Pann1-20 – балобаны из Паннонской популяции. Tuva4, 8, 15, 28, 30, 41, 42, 43, 52, 55, 60, 62, 171 – балобаны из Алтае-Саянского региона.

Tuva19, 20 – сибсы от дикой самки «алтайского» фенотипа.

Altai12, 33, 46 – балобаны «алтайского» фенотипа, выращенные в неволе. GF1, GF2 – кречеты из Чукотско-Камчатской популяции

### Выводы

Несмотря на отсутствие хромосомных перестроек и отличий в нейтральных маркерах, балобан и кречет имеют эволюционно значимые генетические различия, которые могут быть выявлены методами полногеномных исследований. Таким образом, группа видов *Hierofalco* представляет собой перспективную модель для исследования ранних этапов видообразования у хищных птиц.

Установление истинного статуса популяций балобана и разра-

ботка панели маркеров для генетической идентификации кречета и балобана являются актуальными задачами для охраны видов, находящихся в процессе формирования и при этом подвергающихся значительному антропогенному воздействию.

### Литература

- Бутурлин С.А., Дементьев Г.П., 1936. Полный определитель птиц СССР. Т. 3. – М.; Л.: КОИЗ. – 256 с.
- Галинская Т.В. и др., 2019. Предубеждения о микросателлитных исследованиях и как им противостоять // Генетика. Т. 55(6). – С. 617-632.  
DOI: 10.1134/S0016675819060043
- Дементьев Г.П., 1951. Отряд хищные птицы // Птицы Советского Союза. Т. 1. – М.: Советская наука. – С. 70–341.
- Дементьев Г.П., 1951. Соколы-кречеты. – М. – 187 с.
- Дементьев Г.П., Шагдарсурен О., 1964. О монгольских балобанах и таксономическом положении алтайского кречета // Исследования по фауне Советского Союза (птицы). – М. – С. 3–37.
- Зиневич Л. С. и др., 2018. Определение пола и другие рутинные ПЦР-анализы в исследовании хищных птиц // Пернатые хищники и их охрана. Спецвыпуск №1. – С. 208-210. DOI: 10.19074/1814-8654
- Карякин И.В., 2011. Популяционно-подвидовая структура ареала балобана // Пернатые хищники и их охрана. № 21. – С. 116-171.
- Мензбир М.А., 1916. Птицы (Aves). Falconiformes (Дневные хищные птицы). Т. 6. Вып. 1. – Петроград. – 344 с.
- Нечаева А.В. и др. 2018. О систематическом положении алтайского сокола // Генетика. Приложение. Т. 54.- С. S50-S53.  
DOI: 10.1134/S0016675818130155
- Пфеффер Р., 2012. Роль гибридизации в становлении форм крупных соколов комплекса // Пернатые хищники и их охрана. № 12. – С. 148–164.
- Сушкин П.П., 1938. Птицы Советского Алтая и прилежащих частей Северо-Западной Монголии. – М.–Л., Т. 1. 316 с., Т. 2.- 434 с.
- Beird N. A. et al., 2008. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. // PLoS ONE. Vol. 3(10): e3376.  
DOI:10.1371/journal.pone.0003376
- BirdLife International 2016. Falco jugger . The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T22696492A93568123.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-3.RLTS.T22696492A93568123.en>. Downloaded on 31 January 2020.
- BirdLife International 2017. Falco cherrug (amended version of 2016 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T22696495A110525916.  
<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-1.RLTS.T22696495A110525916.en>. Downloaded on 31 January 2020.
- Dawnay N. et al., 2008. Preliminary data suggests genetic distinctiveness of gyr and saker falcons // Conservation Genetics. Vol. 9. – P. 703-707.  
DOI:10.1007/s1059200793921
- Guillot G. et al., 2005. Geneland: A program for landscape genetics // Molecular

- Ecology Notes. Vol. 5. – P.712-715. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01031.x
- Helbig A.J. et al., 1994. Phylogenetic relationships among Falcon species (genus Falco) according to DNA sequence 66 variation of the cytochrome b gene // Raptor Conservation Today. – P. 593–599.
- Horvath M.B. et al., 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds // Journal of Avian Biology. V. 36. №1. – P. 84-88. DOI: 10.1111/j.0908-8857.2005.03370.x
- Jarvis E. D. et al., 2014. Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds // Science, 346 (6215), – P. 1320-1331. DOI: 10.1126/science.1253451.
- Joseph S. et al., 2018. Chromosome Level Genome Assembly and Comparative Genomics between Three Falcon Species Reveals an Unusual Pattern of Genome Organisation // Diversity. Vol.10 (4). – P. 113. DOI: 10.3390/d10040113
- Miller M.R. et al., 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers // Genome Research. Vol. 17(2). – P. 240-248. DOI: 10.1101/gr.5681207
- Nittinger F. et al., 2005. Out of Africa? Phylogenetic relationships between *Falco biarmicus* and the other hierofalcons (Aves: Falconidae) // Blackwell Verlag. V. 43. № 4. – P. 321–331. DOI: 10.1111/j.1439-0469.2005.00326.x
- Nittinger F. et al., 2007. Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data // Molecular Ecology. Vol. 16. – P. 1497-1517. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2007.03245.x
- Pan S. et al., 2017. Population transcriptomes reveal synergistic responses of DNA polymorphism and RNA expression to extreme environments on the Qinghai-Tibetan Plateau in a predatory bird // Molecular ecology. Vol. 26. – P. 2993-3010. DOI: 10.1111/mec.14090
- Seibold I. et al., 1993. Molecular systematics of falcons (family Falconidae). // Naturwissenschaften. Vol. 80. – P. 87-90.
- Sveinsdóttir M. et al., 2017. Complete mitochondrial genome of the gyrfalcon *Falco rusticolus* (Aves, Falconiformes, Falconidae) // Mitochondrion DNA, part A. Vol.28 (3). – P. 370-371. DOI: 10.3109/19401736.2015.1126827
- Wink M. et al., 2004. Phylogenetic Relationships in the Hierofalco Complex (Saker-, Gyr-, Lanner-, Laggar Falcon) // Raptors World. – P. 499–504.
- Wink M., Sauer-Gurth H., 2000. Advances in the molecular systematics of African raptors // Raptors at risk. – P. 135-147.
- Yeaman S., 2013. Genomic rearrangements and the evolution of clusters of locally adaptive loci. // PNAS. Vol. 110(19). – P. 1743-1751. DOI: 10.1073/pnas.1219381110
- Zhan X. et al., 2013. Peregrine and saker falcon genome sequences provide insights into evolution of a predatory lifestyle. // Nature Genetics. Vol. 45. – P. 563–566. DOI: 10.1038/ng.2588
-