

Genetic Differentiation and Polymorphism of the Volga Population of Eastern Imperial Eagle According to Mitochondrial DNA Analysis

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ И ПОЛИМОРФИЗМ ПОВОЛЖСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ ОРЛА-МОГИЛЬНИКА ПО ДАННЫМ АНАЛИЗА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК

Korepov M.V. (Ilya Ulyanov State Pedagogical University, Biology and Chemistry Department, Ulyanovsk, Russia)

Stryukov S.A. (Ulyanovsk Regional Museum of Local Lore named after I.A. Goncharov, Nature Department, Ulyanovsk, Russia)

Корепов М.В. (Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова, кафедра биологии и химии, Ульяновск, Россия)

Стрюков С.А. (Ульяновский областной краеведческий музей им. И.А. Гончарова, отдел природы, Ульяновск, Россия)

Контакт:

Михаил Корепов
korepov@list.ru

Станислав Стрюков
stanislav_str@mail.ru

Contact:

Mikhail Korepov
korepov@list.ru

Stanislav Stryukov
stanislav_str@mail.ru

Орлы-могильники (*Aquila heliaca*), населяющие Ульяновскую область, относятся к повожской популяции вида, локализованной в бассейне Средней Волги у северной границы ареала вида и характеризующейся рядом экологических особенностей: предпочтением типичных лесостепных ландшафтов и гнездованием по возвышенным элементам рельефа, как правило, в предвершинных развилках старовозрастных сосен.

В XXI в. произошло значительное увеличение доли гнездовых участков орлов-могильников с ранее нехарактерным для

Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*) inhabited Ulyanovskiy Region of Russia belongs to Volga population located in the basin of a middle part of Volga river at the northern borders of a species breeding area. This population got several ecological features like giving preference to typical forest-steppe landscapes and nesting on an elevated part of a landscape preferably on the top branching of old pine trees.

In XXI century, a significant increase of breeding sites with non-typical nest location was noted. These non-typical nests locate in a trunk bifurcation in the middle part of a canopy of leafy trees growing in the lower parts of a landscape or in agricultural lands. This breeding stereotype is specific for a Caspian population of Eastern Imperial Eagle that breeds to the south from Volga population, and at the end of XX century was extremely rare in Ulyanovsk Region.

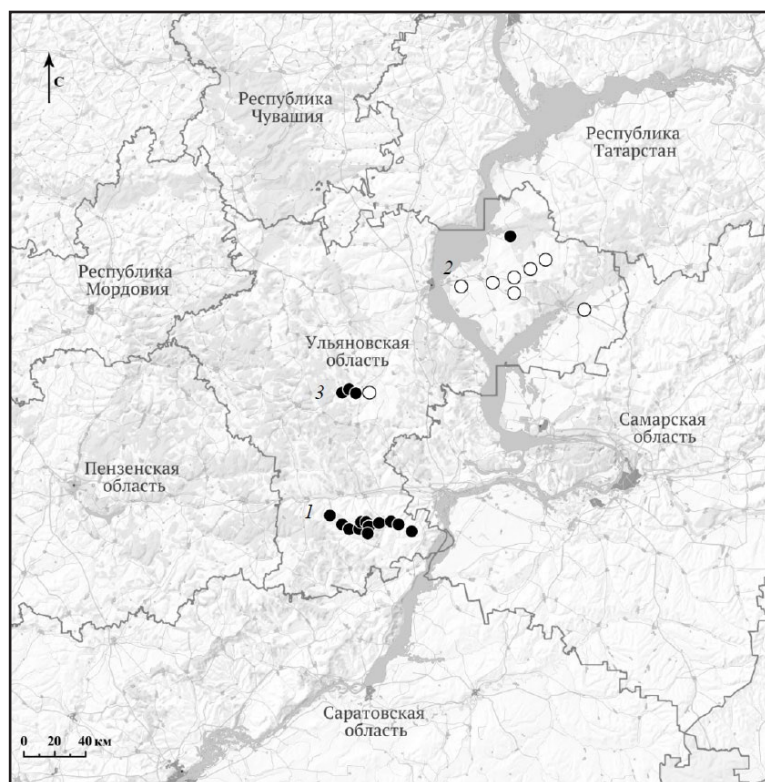


Рис. 1. Места сбора проб для генетического анализа повожской популяции орла-могильника (*Aquila heliaca*). Условные обозначения: чёрные пунсоны – места сбора проб с «поволжским» типом гнездования, белые пунсоны – места сбора проб с «прикаспийским» типом гнездования; 1 – Засызранская гнездовая группировка, 2 – Заволжская гнездовая группировка, 3 – Центральная гнездовая группировка.

Fig. 1. Sampling points for genetic analysis of the Volga population of Eastern Imperial Eagle (*Aquila heliaca*). Legend: black dots – nests typical for the Volga population, white dots – nests typical for the Caspian population; 1 – Zasyzranskaya breeding group, 2 – Transvolga breeding group, 3 – Right-bank breeding group.

поволжской популяции способом гнездования – в пониженных элементах рельефа и агроландшафтах, как правило, в развилке ствола в средней части кроны лиственных деревьев. Такой стереотип гнездования характерен для расположенной южнее прикаспийской популяции вида и в конце XX в. в Ульяновской области отмечался крайне редко.

В настоящее время 34 % всех гнездящихся в Ульяновской области орлов-могильников имеют «прикаспийский» тип гнездования. В Правобережье значения этого показателя ниже среднего по региону – 23 %, а в Заволжье выше – 56 %. Являются ли изменения биотопической приуроченности орлов, населяющих Среднее Поволжье, результатом адаптации птиц поволжской популяции или следствием заселения региона птицами южных популяций, для которых такой стереотип гнездования характерен, остается невыясненным.

Нами были исследованы 25 образцов фрагмента митохондриальной ДНК (D-loop, 345 пн) орлов-могильников с территории Ульяновской области из трех основных гнездовых группировок, населяющих Засызранскую лесостепь ($n=12$), Заволжье ($n=8$) и центральную часть Правобережья Ульяновской области ($n=4$). Из них 17 образцов принадлежит птицам с типичным для поволжской популяции стереотипом гнездования и 8 – птицам с нехарактерным для региона способом гнездования.

Для выделения ДНК использовали линные перья взрослых птиц, а также пульпу перьев птенцов и кровь птиц, содержащихся в неволе. Секвенирование фрагментов Д-петли проводили с использованием набора реактивов для секвенирования ДНК BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit в генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). Анализ гаплотипического и нуклеотидного разнообразия фрагментов мтДНК проведен в программе DnaSP 4.10. С целью выявления мутационной связи и истории происхождения гаплотипов были построены медианные сети с использованием пакета программ NetWork 5.0.0.0.

Уровень изменчивости фрагментов контрольного региона мтДНК орла-могильника оказался низким, что соответствует внутривидовому, и изменяется в пределах от 2,1 до 0,0 % (в среднем около 0,7 %). При этом соотношение транзиций и трансверсий (Ts/Tv) составило 8,0286 (R), а нукле-

Currently, 34% of all breeding Imperial Eagles in Ulyanovsk Region got a Caspian breeding stereotype. On the right bank of river Volga the percentage is lower than mean – 23%; in Transvolga area – is higher – 56%.

The question arose if the alteration in breeding stereotype was a result of a breeding adaptation of local birds or a result of an invasion of southern birds into the region?

We investigated 25 samples of mitochondrial DNA fragment (D-loop, 345 bp) of Imperial Eagles collected in three main breeding groups in Ulyanovsk Region – in Zasyzranskaya forest-steppe ($n=12$), in Transvolga area ($n=8$) and on the right bank of Volga in the central part of Ulyanovsk Region (Right-bank group) ($n=4$). Among them, 17 samples belong to birds with breeding stereotype typical for Volga population and 8 – to birds with the non-typical breeding stereotype.

For DNA extraction we used molted feathers of adult birds, feather pulp of nestlings and blood of captive birds. The D-loop fragments were sequenced using a set of reagents for DNA sequencing BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit in a genetic analyzer ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems). The haplotype and nucleotide diversity of the mtDNA fragments was analyzed in the DnaSP 4.10 program. Pursuing the goal of identifying the haplotypes' origin and mutational bonds we constructed median networks using the software package NetWork 5.0.0.0.

The level of mtDNA control region variability was found to be low matching intraspecific level and vary from 2.1% to 0.0% (mean 0.7%). The ratio of transitions to transversions (Ts/Tv) was 8,0286 (R), and nucleotide frequencies were the following: A=28,9 %, T=28,2 %, C=24,2 % и G=18,7 %.

Intragroup level of genetic diversity was 0.5% and coincide with the overall level of this index (0.5%). The mean value of between-group genetic diversity was 0.02%. Genetic diversity between main breeding groups – Zasyzran group, Right-bank group, and Transvolga group – was also insignificant. Divergency in the groups was 0.5%, 0.8% and 0.4% respectively. The maximum level of divergence was noted between Zasyzran and Right-bank groups (0.7%), and minimum between Zasyzran and Transvolga groups (0.4%). Genetic variability within breeding groups was 0.6% and for the whole sampling – 0.5%. The mean value of intragroup genetic variability was only

отидные частоты составили для A=28,9 %, T=28,2 %, C=24,2 % и G=18,7 %.

Уровень генетического разнообразия внутри групп и для всей выборки в целом оказался равным и составил 0,5 %, а среднее значение межгруппового генетического разнообразия – 0,02 %. Также незначительным оказался уровень дифференциации между основными гнездовыми группировками орлов-могильников, населяющими Засызранскую лесостепь, центральную часть Правобережья и Заволжье Ульяновской области. Дивергенция внутри рассматриваемых групп составила 0,5, 0,8 и 0,4 % соответственно. Максимальная степень дивергенции отмечена между гнездовыми группировками, населяющими Засызранскую лесостепь и центральную часть Правобережья (0,7 %), минимальная – между группировками, населяющими Засызранскую лесостепь и Заволжье (0,4 %). Генетическое разнообразие внутри гнездовых группировок составило 0,6 %, для всей выборки – 0,5 %, а среднее значение межгруппового генетического разнообразия – лишь 0,05 %. Таким образом, проведенный анализ последовательностей фрагментов мтДНК показал, что данные орлы-могильники, по изученному молекулярному маркеру генетически сходны и относятся к одной полиморфной популяции.

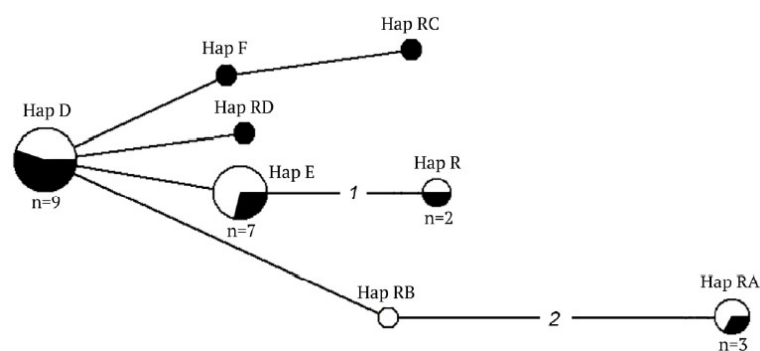


Рис. 2. Медианная сеть гаплотипов нуклеотидных последовательностей ($n=25$) фрагмента контрольного региона (D -loop, 345 пн) мтДНК (345 пн) орлов-могильников из Ульяновской области. Длина ветвей, соединяющих отдельные гаплотипы, пропорциональна количеству мутационных шагов (указаны цифрой по линии связи). Размер круга указывает на относительную частоту соответствующих гаплотипов в поволжской популяции. Белым цветом показаны гаплотипы орлов из Заволжской и Центральной гнездовых группировок, черным – из Засызранской гнездовой группировки.

Fig. 2. Median network of haplotypes sequences ($n=25$) of mitochondrial DNA control region fragment (D -loop, 345 bp) of Imperial Eagles from Ulyanovsk Region. A length of branches between haplotypes corresponds with the number of mutations (indicated with a digit along the line). The diameter of a circle indicates a relative frequency of corresponding haplotype in Volga population. Haplotypes of eagles from Transvolga and Right-bank groups are indicated with white color, from Zasyzran group – with black.

0.05%. Thus, the sequencing of mtDNA fragments revealed that Imperial Eagles of Ulyanovsk region are genetically similar for the studied molecular marker and belong to the same polymorphic population.

We revealed a low level of genetic differentiation between the geographical nesting groups (0.4–0.7 %), and between biotopic groups (0.5 %). The maximum genetic diversity was found in Zasyzran forest-steppe area inhabited by the largest breeding group of Imperial Eagles in Volga region.

Eight haplotypes of mtDNA were identified, including 4 (RA, RB, RC, RD) previously unknown for Imperial Eagle. A median test shows the predominance of ancestral type D and several lineages of haplotypes genetically related with haplotype D.

In Ulyanovsk region, we found only 4 haplotypes out of 15 noted for Slovakia, Hungary, and Kazakhstan (D, E, F, R), which indicates a certain isolation of Volga population of Imperial Eagle from eastern and western ones. Newly found haplotypes of mtDNA make up 24% of the total set of samples. Three of them are not wide-spread in Volga population and represented by only one sample.

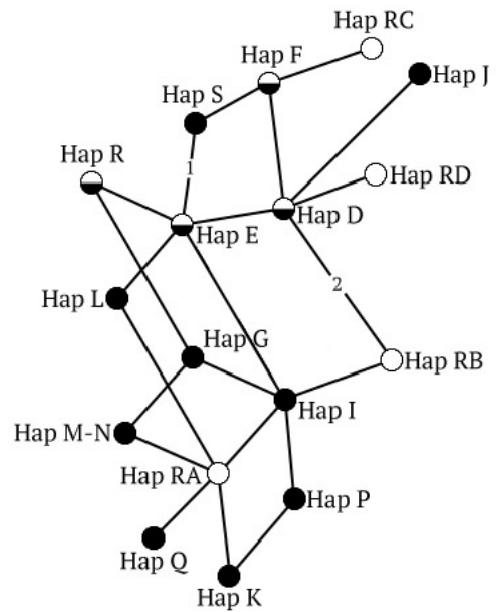
Median test of haplotypes from three North Eurasian populations of Imperial Eagles (Pannon, Transural and Volga populations) found no clear geographical grouping of haplotypes from different localities.

The results of our research show that the Volga population of Eastern Imperial Eagle has a number of specific genetic traits associated with unique mtDNA haplotypes which presented both in individuals with typical and non-typical breeding stereotype. That means that increased number of Imperial Eagles in the region is not due to an expansion of Caspian birds into Middle Volga region, but is the result of the adaptation of the indigenous Volga population to a variety of woodless habitats and unusual breeding conditions.

The genetical research was conducted in Penza State University. The authors are sincerely grateful for the comprehensive assistance to a head of laboratory Titov S.V.

Рис. 3. Медианная сеть гаплотипов нуклеотидных последовательностей фрагмента контрольного региона (D-loop) мтДНК (345 пн) орлов-могильников с территории Северной Евразии. Длина ветвей, соединяющих отдельные гаплотипы, пропорциональна количеству мутационных шагов (указаны цифрой по линии связи). Белые пунсоны – гаплотипы из поволжской популяции, черные пунсоны – гаплотипы из паннонской и (или) зауральской популяций, черно-белые пунсоны – общие гаплотипы для всех поволжской и паннонской и (или) зауральской популяций.

Fig. 3. Median network of haplotypes sequences (n=25) of mitochondrial DNA control region fragment (D-loop, 345 bp) of Imperial Eagles from Northern Eurasia. A length of branches between haplotypes corresponds with the number of mutations (indicated with a digit along the line). Haplotypes of eagles from Volga population are indicated with white color; from Pannon and (or) Transural population – with black; shared haplotypes are black-and-white.



Отмечена низкая генетическая дифференциация как между географическими (0,4–0,7 %), так и битопическими гнездовыми группировками (0,5 %). Максимальное генетическое разнообразие выявлено в Засызранской лесостепи, где сосредоточена крупнейшая в Поволжье гнездовая группировка орлов-могильников.

Из 8 выявленных гаплотипов мтДНК орлов-могильников, выявленных на территории Ульяновской области, четыре (RA, RB, RC, RD) не были ранее описаны для исследуемого вида. Результаты медианного теста указывают на преобладание анцестрального для Среднего Поволжья гаплотипа D, а также нескольких линий генетически связанных с ним гаплотипов.

Из 15 гаплотипов, обнаруженных в Словакии, Венгрии и Казахстане, на территории Ульяновской области отмечено только 4 (D, E, F, R). Такое распределение гаплотипов показывает некоторую обособленность поволжской популяции орла-могильника относительно западных и восточных популяций. На долю вновь обнаруженных гаплотипов мтДНК приходится 24 % всей выборки. При этом три из четырех гаплотипов не столь широко распространены в поволжской популяции и в изученной выборке представлены только одним образцом.

Медианный тест гаплотипов по трем евразийским популяциям орлов-могильников (паннонской, зауральской и поволжской) указывает на отсутствие четкой географической группировки гаплотипов из различных локалитетов Северной Евразии.

Из результатов проведенных исследований видно, что поволжская популяция орла-могильника имеет ряд специфических генетических признаков, связанных с наличием присущих только ей гаплотипов мтДНК, обнаруженных у птиц как с ти-

пичным, так и с нетипичным стереотипом гнездования. Этот факт свидетельствует о том, что увеличение численности поволжской популяции орлов, вероятно, не связано с экспансией в Среднее Поволжье птиц прикаспийской популяции. Более вероятно ситуация, при которой увеличение численности орлов-могильников в рассматриваемом регионе происходит в результате адаптации коренной, поволжской, популяции вида к разнообразным условиям обитания в малооблесенных ландшафтах и нетипичным условиям гнездования.

Генетические исследования проведены на базе Пензенского государственного университета. Авторы выражают искреннюю признательность за всестороннюю помощь руководителю лаборатории Титову С.В.