ГЕНЕТИКА, 2021, том 57, № 4, с. 454–463

ГЕНЕТИКА ЖИВОТНЫХ

УДК 575.852'1

НЕНЕЙТРАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ЦИТОХРОМА *b* У БАЛОБАНА *Falco cherrug* Grey, 1834 И КРЕЧЕТА *Falco rusticolus* L.

© 2021 г. Д. Н. Рожкова[1, 2, *], Л. С. Зиневич[1, 2], И. В. Карякин[1], А. Г. Сорокин[2], В. Г. Тамбовцева[1], А. М. Куликов[1]

[1]*Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова Российской академии наук, Москва, 119334 Россия*

[2]*Всероссийский научно-исследовательский институт охраны окружающей среды, Москва, 117628 Россия*

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

Поступила в редакцию 30.05.2020 г.
После доработки 20.07.2020 г.
Принята к публикации 25.08.2020 г.

Изменчивость митохондриальной ДНК влияет на характеристики метаболизма клеток и свидетельствует об эволюционных процессах. Проанализированы последовательности митохондриального гена цитохрома *b* балобана и кречета. Найдены пять аминокислотных замен, для двух из которых показано изменение физико-химических свойств аминокислот. Сделаны предположения о филогенетической истории формирования и функциональном влиянии найденных вариантов аминокислотных замен.

Ключевые слова: цитохром *b*, аминокислотные замены, молекулярная эволюция, балобан, кречет.

DOI: 10.31857/S0016675821040123

Молекулярная эволюция, происходящая при видообразовании, оставляет регистрируемые следы неслучайного накопления изменчивости в локусах, связанных с изолирующими механизмами и адаптациями [1]. Некоторые адаптации затрагивают характеристики энергетического метаболизма, зависящего от изменчивости митохондриальной ДНК (мтДНК) [2–4]. Значимость вариативности мтДНК была неоднократно показана для различных представителей царства Животные Animalia [5–11]. Изменчивость митохондриальных генов и некодирующих последовательностей используется также в качестве надежных филогенетических маркеров [12–14]. В терминах молекулярной биологии был показан положительный и отрицательный отбор определенных сайтов последовательностей митохондриального генома для представителей отрядов лососеобразные Salmoniformes, хвостатые земноводные Caudata, грызуны Rodentia и парнокопытные Artiodactyla [15–18]. У летающих птиц процессы видообразования определяет также дополнительный фактор – способность к быстрым перемещениям внутри всего ареала обитания вида, что предполагает фенотипическую пластичность ключевых адаптаций, связанных с меняющимися в результате таких перемещений факторами внешней среды. Для некоторых видов птиц проведены исследования, посвященные анализу связи между наличием ненейтральных аминокислотных замен в белках митохондриальной электрон-транспортной цепи и участием этих белков в адаптации к определенным климатическим условиям [2–4, 19, 20]. В результате в каждом конкретном случае выявлены предполагаемые молекулярные адаптации для некоторых белков комплекса дегидрогеназ, цитохромов, а также для гена *ATP6*. Сопоставление филогенетических данных и анализа ненейтральной изменчивости митохондриального генома позволяет делать предположения об этапах видообразования близкородственных и репродуктивно неизолированных видов, обитающих в различных экологических условиях.

К подобным видам относятся объекты нашего исследования – балобан и кречет – дневные хищные птицы из группы видов *Hierofalco* семейства Falconidae. Балобан обитает в Палеарктике, населяя аридные зоны от Восточной Европы до Дальнего Востока [21, 22]. На этом обширном географическом ареале у балобана выделяют, по данным исследования Д-петли, две митохондриальные гаплогруппы – западную и единую с кречетом восточную [23]. При этом кречет распространен циркумполярно и обитает в зоне тундр и лесотундр [24]. Таким образом, балобан и кречет обитают в разных климатических условиях, которые предположительно, как описано выше, могут быть взаимосвязаны с отбором изменений в митохондриальных белках. Согласно данным Красного листа Международного союза охраны природы балобан имеет “угрожаемый” (Endangered),

Таблица 1. Набор специфических праймеров для получения полной последовательности цитохрома *b* балобана и кречета

Название праймера	Последовательность прямого 5'–3' и обратного 3'–5' праймеров
FCB1f/FCB3r	ATCAATCCTAACTATCCTACTC/CAGATGAAGAATAAGGATGC
FCB3f/FCB1r	GACTAATCCGCAACCTACATG/GGAAGGTGAGGTGGATTAGGG
FCB2f/FCB4r	ACTGACCCGATTCTTCGCCC/GTGAAGTAGAGGGCTTAG
FCB4f/FCB2r	CCGCCTCAGTGCTAATCC/GGGTGTGTGGTTGGTGGG

а кречет “близкий к уязвимому” (Near threatened) статус [25]. Эти виды также включены соответственно во II и I Приложения Конвенции о международной торговле видами дикой фауны и флоры, находящимися под угрозой исчезновения [26]. На территории России эти сокола занесены в Красную книгу [27] и им присвоен статус особо ценных видов животных в соответствии с Постановлением Правительства № 978 от 31.10.2013 г. [28]. Охрана балобана и кречета в дикой природе является актуальной задачей, требующей понимания их эволюционной истории и влияния на нее антропогенного воздействия [29]. Проведенное нами исследование основано на изучении полной последовательности гена цитохрома *b* (cyt *b*), кодирующего ключевой мембранный белок комплекса цитохромов *bc1*, обеспечивающего перенос электронов и формирование протонного градиента на мембране митохондрий в процессе окислительного фосфорилирования [30, 31]. Ранее полная последовательность cyt *b* использовалась для расчетов филогенетических отношений видов группы *Hierofalco* без изучения эволюционной значимости олигонуклеотидных замен и соответствующих им физико-химических свойств аминокислот [32]. Нами получены данные о характере аминокислотных замен в гене cyt *b* у балобана и кречета, а также сделаны предположения об эволюционной истории этих видов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетический анализ был проведен на основе 16 полученных и четырех референсных полных последовательностей гена cyt *b*. Сбор образцов проведен на базе ФГБУ “ВНИИ Экология” и в рамках реализации проекта по восстановлению генетического разнообразия балобана в Алтае-Саянском регионе [33]. Дополнительные образцы получены из Коллекции линных перьев редких и особо ценных видов хищных птиц Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, большая часть которой собрана в рамках проектов Российской сети изучения и охраны пернатых хищников. В качестве материала использованы различные ткани от неродственных особей из изолированных популяций. Оригинальные данные получены от двух образцов заспиртованных мышечных тканей кречетов из Чукотско-Камчатской популяции, шести образцов мезенхимной пульпы линного пера от балобанов Крымского полуострова, восьми образцов заспиртованного растущего пера с дермальной пульпой и кровью от балобанов Алтае-Саянского региона, включая четырех выращенных в неволе птенцов от самок, изъятых из природы в данной местности. Для сравнения использованы последовательности из базы данных NCBI [34] цитохрома *b* балобана и кречета, а также пустельги обыкновенной *Falco tinnunculus* и сапсана *Falco peregrinus* в качестве внешних видов, под номерами KP337902.1, NC_029359.1, EU196361.1, JX029991.1 соответственно. Пробоподготовка заспиртованных образцов включала в себя их просушку и измельчение, а для линного пера проводилась по описанному ранее методу [35]. Выделение ДНК осуществлялось набором ДНК–Экстран-2 (Синтол, Россия) на основе протеиназы К согласно протоколу производителя. Для дальнейшего генотипирования образцов с помощью программ Primer-BLAST (NCBI, США) и PrimerSelect (DNASTAR, США) был разработан набор специфических перекрывающихся праймеров на полную последовательность гена cyt *b* (табл. 1). Амплификация и секвенирование по Сэнгеру проведены с использованием коммерческих наборов реактивов ScreenMix-HS (Евроген, Россия) и BigDye 3.1 (Applied Biosystems, США) соответственно и оборудования Центра коллективного пользования Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН: амплификатора Veriti Fast (Applied Biosystems, США) и секвенатора ABI 3500 (Applied Biosystems). Обработка результатов секвенирования проведена с помощью компонента SeqMan программного пакета Lasergene (DNASTAR).

Сравнение полученных последовательностей с известными митохондриальными вставками ядерного генома (NUMT) балобана [36] осуществлено с помощью программы BLAST (NCBI). Проверенные последовательности длиной 1143 пн загружены в базу данных GenBank (NCBI) под номерами MT431193–MT431208. Соотношение частот несинонимичных замен нуклеотидов к синонимичным (dN/dS) рассчитано *Z*-тестом в программном пакете MEGA X, использованном также для определения соответствующих аминокислотных последовательностей [37]. Построение филогенетического дерева

для расчетов изменения свойств белка в процессе эволюции также осуществлено с помощью алгоритмов MEGA X [38, 39]. Для построения и анализа объемных трехмерных (3D) моделей белка цитохрома *b* исследуемых особей балобана и кречета использованы данные о структуре комплекса цитохромов *bc*1 домашней курицы *Gallus gallus* [40]. Моделирование на основе гомологии белков осуществлено на сервере SWISS-MODEL [41–46]. Дополнительная визуализация проведена с помощью программы iCn3D на основе WebGL для интерактивного просмотра трехмерных макромолекулярных структур и химических веществ [47]. Несмотря на известную структуру и функцию белка, были проведены дополнительные расчеты взаимодействия цитохрома с другими белками электрон-транспортной цепи митохондрий методом иерархического прогнозирования I-TASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) [48–50]. Предсказание функционального значения аминокислотных замен осуществлено с помощью сетевого программного инструмента PROVEAN (Protein variation effect analyzer), предсказывающего влияние изменения последовательности гена на функцию белка [51–53]. Расчеты селективного влияния на структурные и биохимические свойства аминокислот в процессе филогенеза на основе качественных и категориальных статистических тестов проведены в программе TreeSAAP (Selection of amino acid properties based on phylogenetic trees) [54]. Алгоритм данной программы опирается на топологию филогенетического дерева, построенного на основе изучаемых последовательностей гена. В процессе расчетов происходит сопоставление наблюдаемого распределения изменений 31 физико-химического свойства аминокислот с распределением, ожидаемым в условиях селективной нейтральности и предполагаемого случайного характера аминокислотных замен. Нахождение свойств заменяемых аминокислотных остатков под рассматриваемым на молекулярном уровне положительным отбором оценивается по положительным значениям *Z*-теста. При этом полученные значения распределяются на восемь категорий значимости, отражающих направление положительного отбора биохимических свойств белка. Первые три категории отражают влияние положительного стабилизирующего отбора, т.е. направленного на поддержание оптимальной активности белка, в то время как в категориях с шестой по восьмую отражен положительный дестабилизирующий отбор, поддерживающий радикальные смещения в структурных и функциональных характеристиках белка. Достоверная оценка имеет величину выше или равную +3.09 и вероятность $p < 0.001$ [15, 54].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами были получены 16 полных последовательностей гена cyt *b* балобанов и кречетов из четырех регионов от образцов, хранящихся на базе Коллекции линных перьев редких и особо ценных видов хищных птиц Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (табл. 2). Установлено, что полученные последовательности не являются NUMT. Стандартный метод расчета соотношения частот dN/dS не показал наличия положительного отбора среди 16 исследуемых последовательностей гена cyt *b*, т.е. число синонимичных нуклеотидных замен больше, чем несинонимичных [55]. Выравнивание и сравнение оригинальных аминокислотных последовательностей балобана и кречета друг с другом, а также с референсными последовательностями сапсана, кречета и балобана (JX029991.1, NC_029359.1, KP337902.1 соответственно) показало несколько замен аминокислот (табл. 3). Наиболее распространенная замена неполярной (гидрофобной) аминокислоты Ala на полярную (гидрофильную) Thr отмечена у всех балобанов из Крыма и двух из Алтае-Саянского региона в позиции 191 (571–573 пн). У образца FC16 из Алтае-Саянского региона обнаружена единичная замена неполярной аминокислоты Ile на полярную Thr в позиции 230 (687–690 пн). В последовательности cyt *b* образца FC09 из Крыма произошла замена неполярной аминокислоты Ala на Gly в позиции 294 (880–882 пн). Для образца FC38 из Крыма показаны замены полярных аминокислот Ser на Asn в позиции 305 (913–915 пн) и Thr на неполярную Ala в позиции 331 (991–993 пн).

Для описания степени вариабельности изучаемых аминокислотных последовательностей проведено их выравнивание с последовательностями цитохрома *b* 17 представителей разных родов семейства Falconidae, доступными в базе данных NCBI: EU233073.1 (*Falco jugger*), EU233120.1 (*Falco subniger*), U83309.1 (*Daptrius ater*), KP064202.1: 13708–14850 (*Phalcoboenus australis*), EU233141.1 (*Milvago chimango*), U83314.1 (*Micrastur semitorquatus*), U83319.1 (*Herpetotheres cachinnans*), U83312.1 (*Spizaiapteryx circumcinctu*), U83317.1 (*Polihierax semitorquatus*), U83318.1 (*Microhierax erythrogenys*), EU233075.1 (*Falco longipennis*), EU233119.1 (*Falco subbuteo*), NC_025579.1: 13705–14847 (*Falco columbarius*), EU233053.1 (*Falco concolor*), NC_039842.1: 13710–14852 (*Falco amurensis*), U83311.1 (*Falco vespertinus*), NC_029846.1: 13578–14720 (*Falco naumanni*). Для представленного списка видов установлено, что сайты аминокислотных замен 191 и 294 показаны только для балобана и кречета, в то время как аминокислотные остатки 230, 305 и 331 имеют различные варианты у многих видов.

Трехмерные модели cyt *b* и расчет функциональной значимости аминокислотных замен построены на основе последовательности гена белка

Таблица 2. Данные об исследованных образцах

Обозначение образца	Материал	Регион/год	Координаты сбора*	Сборщик	Номер в GenBank
FR5/FR5CH	КП	Чукотский автономный округ, 2019	63.06 N 179.33 E	Сарычев Е. И.	MT431197
FR6/FR6KM	ЗМТ	Камчатский край, 2019	Нет данных	Сорокин А. Г.	MT431198
FC6/A25-RUAF1814-D314	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.75 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431206
FC16/MMAL10-RUAF1845-D319	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431200
FC21/BH-RT504-1-D023	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431204
FC23/FC-RT01-RUVS1079-D038	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.55 N 94.65 E	Карякин И. В.	MT431202
FC43/FC-RT11-1-D024	ЗРП	Республика Тыва, 2018	50.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431205
FC47/FC-RT11-1-RUVS1055-D033	ЗРП	Республика Тыва, 2018	50.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431203
FC53/FC-RT229-2-D019	ЗРП	Республика Тыва, 2018	51.25 N 94.25 E	Карякин И. В.	MT431201
FC172/FC-RT277-1-D172	ЗРП	Республика Тыва, 2018	50.25 N 94.75 E	Карякин И. В.	MT431199
FC09/FCCR0907	ЛП	Крымский полуостров, 2019	44.95 N 34.05 E	Прокопенко С. П.	MT431208
FC10/FCCR1007	ЛП	Крымский полуостров, 2019	45.05 N 34.31 E	Прокопенко С. П.	MT431207
FC/FC-RKR48	ЛП	Крымский полуостров, 2015	45.25 N 34.75 E	Карякин И. В.	MT431193
FC23/FC-RKR23-1	ЛП	Крымский полуостров, 2015	45.75 N 33.25 E	Карякин И. В.	MT431195
FC25/FC-RKR25-1	ЛП	Крымский полуостров, 2015	45.75 N 32.75 E	Карякин И. В.	MT431194
FC38/FC-RKR38-1	ЛП	Крымский полуостров, 2015	45.25 N 33.25 E	Карякин И. В.	MT431196

Примечание. КП – контурное перо, ЗМТ – заспиртованная мышечная ткань, ЗРП – заспиртованное растущее перо с кровью, ЛП – линное перо.
* Даны неточные координаты расположения мест сбора с целью охраны птиц.

балобана под номером KP337902.1. Использование алгоритмов SWISS-MODEL и последующая визуализация в программе iCn3D (рис. 1) позволили установить положение 191, 230, 294, 305 и 331 сайтов аминокислотных остатков в *H*-спиралях белка 11, 13, 16, 17 и 18 соответственно. Согласно результатам расчета методами I-TASSER установлено, что активный центр белка, комплементарно связывающийся с железосодержащим лигандом heme *b* (протогем IX), сформирован более чем двадцатью, от 42 до 187, специфичными сайтами посадки. В то же время взаимодействие cyt *b* с убихиноном (кофермент Q) осуществляется через 13 аминокислотных остатков, от 18 до 229. Исследуемые сайты замен, 191 и 230, находятся вблизи от ключевых участков белка cyt *b*, взаимодействующих с коферментом Q и протогемом IX. Предположительно они способны влиять на формирование функциональных связей указанных структурных элементов электрон-транспортной цепи с cyt *b*. Влияние найденных аминокислотных замен на функцию белка оценено с помощью инструмента PROVEAN, который использует для прогнозирования порог оценки равный –2.5. Если указанная замена аминокислоты получает балл ниже или равный пороговому значению, она рассматривается как вредная, а при баллах выше пороговых как нейтральная. Согласно этой концепции для сайтов 230 и 294 пред-

Таблица 3. Распределение и варианты аминокислот в последовательности цитохрома *b* изучаемых образцов по сравнению с референсными последовательностями сапсана, кречета и балобана

Вариант сравниваемых последовательностей белков cyt *b*	Позиции несовпадающих аминокислот cyt *b* и соответствующие им варианты кодонов				
	191: GCA/ACA	230: ATC/ACC	294: GCA/GGA	305: AGC/AAC	331: ACT/GCT
JX029991.1	Ala	Ile	Ala	Ser	Ala
NC_029359.1	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
KP337902.1	Thr	Ile	Ala	Ser	Thr
FR5 Чукотка	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FR6 Камчатка	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC6 АСР	**Thr**	Ile	Ala	Ser	Thr
FC16 АСР	Ala	**Thr**	Ala	Ser	Thr
FC21 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC23 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC43 АСР	**Thr**	Ile	Ala	Ser	Thr
FC47 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC53 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC172 АСР	Ala	Ile	Ala	Ser	Thr
FC09 Крым	**Thr**	Ile	**Gly**	Ser	Thr
FC10 Крым	**Thr**	Ile	Ala	Ser	Thr
FC Крым	**Thr**	Ile	Ala	Ser	Thr
FC23 Крым	**Thr**	Ile	Ala	Ser	Thr
FC25 Крым	**Thr**	Ile	Ala	Ser	Thr
FC38 Крым	**Thr**	Ile	Ala	**Asn**	**Ala**

Примечание. Варианты последовательностей белков cyt *b* птиц: 1) JX029991.1, NC_029359.1, KP337902.1 – референсные последовательности *F. peregrinus, F. rusticolus, F. cherrug* (выделены нижним подчеркиванием); 2) FR5, 6 – *F. rusticolus* № 5 и 6 из Чукотско-Камчатской популяции; 3) FC6–172 – *F. cherrug* из Алтае-Саянского региона (АСР); 4) FC09–38 – *F. cherrug* из Крыма. Отличия аминокислотных позиций оригинальных последовательностей от большинства референсных выделены полужирным шрифтом.

сказано вредное, а для остальных рассматриваемых замен нейтральное воздействие на функцию цитохрома *b* балобана. При прогнозировании сайты аминокислотных замен 191 и 331 (рис. 1) получили соответственно 1.506 и 1.851 баллов относительно порогового значения. Для выявления степени адаптационной значимости исследуемых нуклеотидных замен в гене cyt *b* проанализированы изменения физико-химических свойств соответствующих аминокислот в ходе эволюции с помощью алгоритмов TreeSAAP. В основе дальнейшего анализа находится филогенетическое дерево из 20 исследуемых последовательной cyt *b*, построенное в программе MEGA X (рис. 2). Отражены филогенетические связи гаплотипов гена cyt *b* балобанов и кречетов. Среди 16 особей исследуемых видов найдено семь гаплотипов cyt *b*, совокупно имеющих три ненейтральные аминокислотные замены, находящиеся под действием положительного отбора согласно программе TreeSAAP. Примечательно, что замена 191 аминокислоты наблюдается у всех птиц с Крымского полуострова, при этом у образца FC38 обнаружены еще две аминокислотные замены. У кречетов данные замены отсутствуют. У балобанов Алтае-Саянского региона обнаружены гаплотипы, входящие в гаплогруппы как балобанов с запада ареала, так и кречетов. Установлены изменения двух аминокислотных свойств, соответствующих заданным параметрам: энергия слабых (невалентных) взаимодействий (short and medium range non-bonded energy) и сжимаемость (compressibility) [57]. Эти свойства отнесены к третьей и пятой категориям значимости с вероятностью 99.9% и значениями 3.519 и 3.391 соответственно. Данные изменения аминокислотных свойств зафиксированы для кодона 191 при формировании 23-го предкового и последующих гаплотипов. При переходе от 23-го предкового гаплотипа к образцу FC38 из Крыма для кодона 305 наблюдается изменение свойств энергии слабых (невалентных) взаимодействий, а для кодона 331 – дополнительно свойства сжимаемости. Для аминокислотной замены в позиции 331 цитохрома *b* сапсана (JX029991.1) также обнаруже-

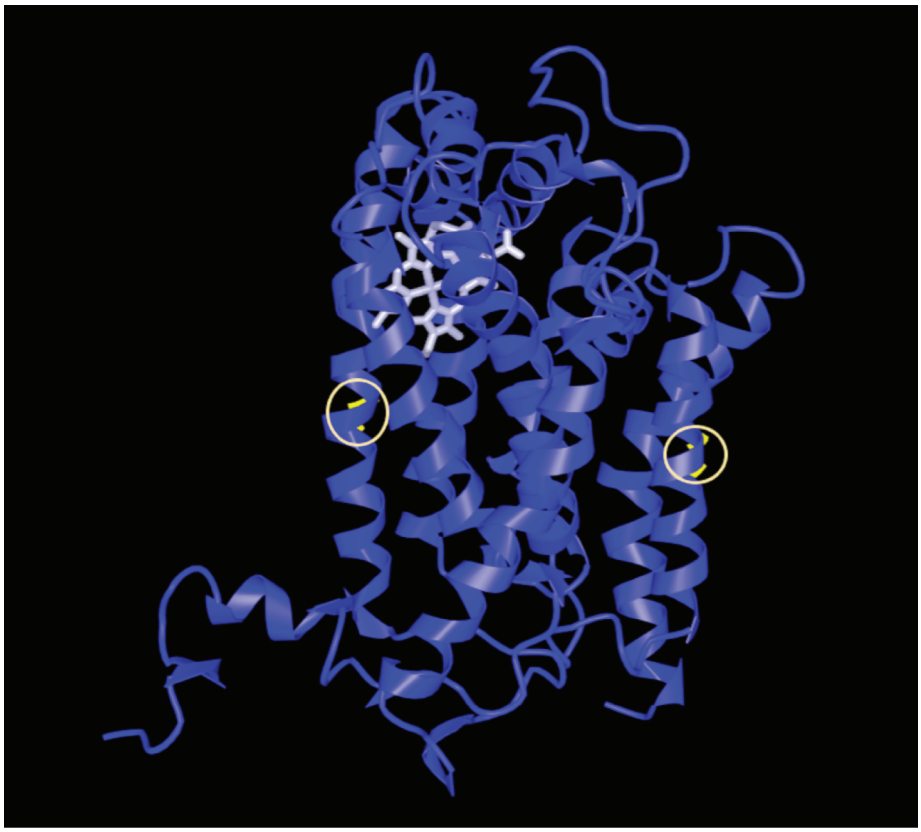

Рис. 1. Трехмерная структура цитохрома *b*, смоделированная на основе гомологии белков на сервере SWISS-MODEL и визуализированная в сетевой программе iCn3D. Желтым выделено положение сайтов аминокислотных замен – 191 на *H*-спирали 11 (слева) и 331 на *H*-спирали 18 (справа). Heme *b* обозначен светло-серым цветом.

но изменение этих двух свойств. Таким образом, предположительно свойства найденных аминокислотных замен (энергия слабых (невалентных) взаимодействий и сжимаемость) находятся под влиянием положительного стабилизирующего отбора и близкого к дестабилизирующему отбора соответственно.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение адаптаций энергетического метаболизма птиц к экологическим условиям является актуальной задачей. В ряде работ показаны молекулярные изменения и адаптации белков электрон-транспортной цепи животных из различных сред обитания [2–4, 15, 17–19]. Проведенный анализ изменчивости гена cyt *b* у редких и охраняемых видов соколов группы *Hierofalco* также позволил получить новые данные о молекулярных изменениях, в том числе относительно их эволюционной истории. В настоящее время существует гипотеза о формировании балобана и кречета от единого предка, населявшего обширные территории Палеарктики, в результате изоляции и разности условий местообитаний [58]. Наши данные позволяют предполагать, что в формировании найденных митохондриальных гаплотипов балобанов с запада ареала могли принимать участие не только генетико-автоматические процессы, связанные с прохождением через рефугиумы, но и отбор, поддерживающий стабильную функциональную активность некоторых белков электрон-транспортной цепи. У балобанов, обитающих на Крымском полуострове, на фоне общей низкой изменчивости исследованных последовательностей гена cyt *b* выявлены три аминокислотные замены (191, 305 и 331 кодоны) с изменяющимися физико-химическими свойствами и, возможно, поддерживаемые положительным отбором. При этом замена в кодоне 191 является филогенетически значимой, формирующей отдельную гаплогруппу. Согласно исходным алгоритмам, используемым для расчета программы TreeSAAP, предполагаемое влияние положительного стабилизирующего отбора согласуется с тем, что структура цитохрома *b* и его функции высоко консервативны, т.е. при серьезных изменениях белка происходят радикальные сдвиги энергетического метаболизма. Таким образом, полученные результаты указывают на возможный отбор при формировании исследуемых видов тех вариантов гена cyt *b*, которые обеспечивают адаптации на молекулярном уровне. Мы пред-

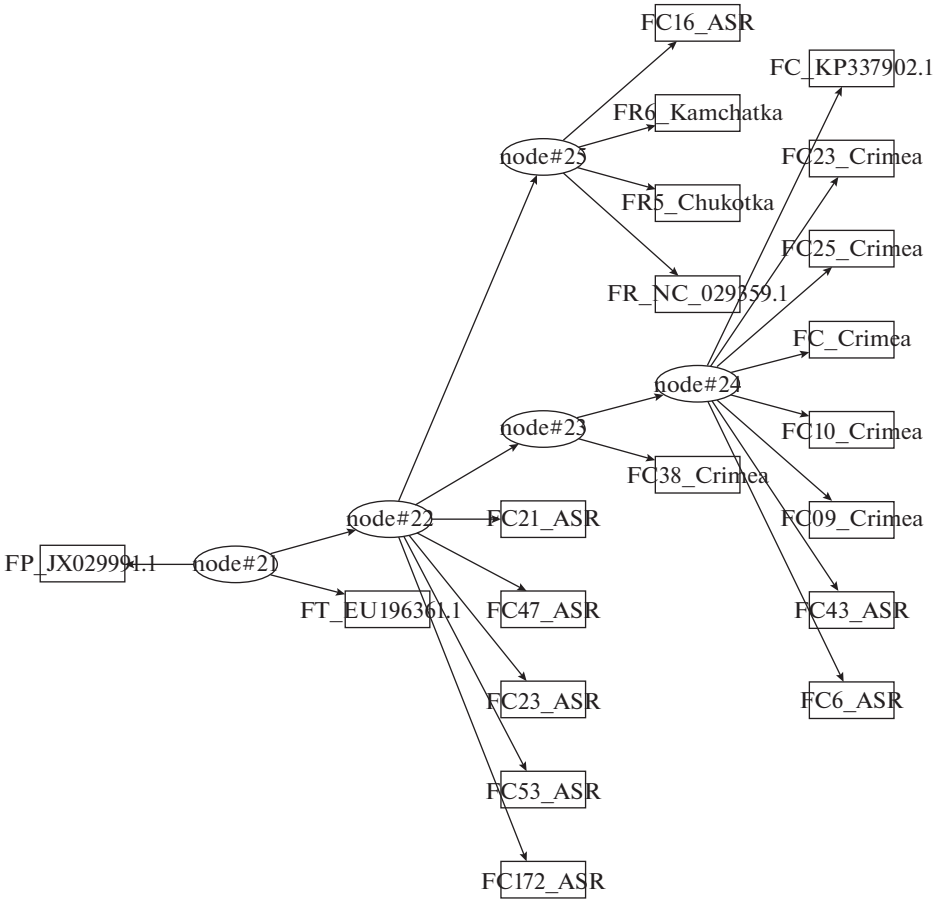

Рис. 2. Реконструкция предковых гаплотипов 20 исследуемых последовательностей гена cyt *b*, выполненная с помощью алгоритма baseml программного пакета PAML [56] в программе TreeSAAP на основе филогенетической топологии, рассчитанной методом максимального правдоподобия и модели Тамура–Нея с дискретным гамма-распределением (+G, парамет $p = 0.0500$) и 1000 бутстрэп-выборок в MEGA X.

полагаем, что часть изменчивости мтДНК у балобанов и кречетов является ненейтральной, вносящей отдельный вклад в формирование генетической структуры этих видов. Таким образом, необходимы дополнительные исследования филогеографической истории балобана и кречета на основе сравнения кодирующих последовательностей мембранных белков и переносчиков электронов, участвующих в процессах окислительного фосфорилирования.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ “ВНИИ Экология” 2019 года “Выявление генетических маркеров природных популяций редких и особо ценных видов птиц и млекопитающих для обоснования программ по охране и реинтродукции данных видов, а также оценка генетического разнообразия редких и особо ценных видов птиц (соколообразные и журавлеобразные), содержащихся в российских питомниках”, и раздела государственного задания ИБР РАН 2020 года № 0108-2019-0007 “Молекулярно-генетические и экологические механизмы видообразования и ранних этапов эволюции. Разработка подходов для оценки гомеостаза развития биологических систем (методология популяционной биологии развития)”.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Venditti C., Pagel M.* Speciation as an active force in promoting genetic evolution // Trends Ecol. Evol. 2010. V. 25. № 1. P. 14–20. https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.010
2. *Scott G.R., Schulte P.M., Egginton S. et al.* Molecular evolution of cytochrome C oxidase underlies high-altitude adaptation in the bar-headed goose // Mol. Biol. Evol. 2011. V. 28. № 1. P. 351–363. https://doi.org/10.1093/molbev/msq205
3. *Morales H.E., Pavlova A., Joseph L., Sunnucks P.* Positive and purifying selection in mitochondrial genomes of a bird with mitonuclear discordance // Mol. Ecol.

2015. V. 24. № 11. P. 2820–2837.
https://doi.org/10.1111/mec.13203

4. *Lamb A.M., Gan H.M., Greening C. et al.* Climate-driven mitochondrial selection: A test in Australian songbirds // Mol. Ecol. 2018. V. 27. № 4. P. 898–918.
https://doi.org/10.1111/mec.14488
5. *Barton N., Jones J.S.* Mitochondrial DNA: New clues about evolution // Nature. 1983. V. 306. № 24. P. 317–318.
https://doi.org/10.1038/306317a0
6. *Harrison R.G.* Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology // TREE. 1989. V. 4. № 7. P. 6–11.
https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90006-2
7. *Pereira S.L.* Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics // Genet. Mol. Biol. 2000. V. 23. № 4. P. 745–752.
https://doi.org/10.1590/S1415-47572000000400008
8. *Hebert P.D.N., Ratnasingham S., de Waard J.R.* Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species // Proc. Biol. Sci. 2003. V. 270. P. S96–S99.
https://doi.org/10.1098/rsbl.2003.0025
9. *Hebert P.D.N., Stoeckle M.Y., Zemlak T.S., Francis C.M.* Identification of birds through DNA barcodes // PLoS Biol. 2004. V. 2. P. 1657–1663.
https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312
10. *Baker A.J., Tavares E.S., Elbourne R.F.* Countering criticisms of single mitochondrial DNA gene barcoding in birds // Mol. Ecol. Resour. 2009. V. 9. P. 257–268.
https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02650.x
11. *Andrejevic M., Markovic M.K., Bursac B. et al.* Identification of a broad spectrum of mammalian and avian species using the short fragment of the mitochondrially encoded cytochrome b gene // Forensic Sci. Med. Pathol. 2019. V. 15. P. 169–177.
https://doi.org/10.1007/s12024-019-00096-4
12. *Baker A.J., Marshall H.D.* Mitochondrial control region sequences as tools for understanding evolution in avian molecular evolution and systematics // Avian Molecular Evolution and Systematics. San Diego, CA: Acad. Press, 1997. P. 51–82.
13. *Weir J.T., Schluter D.* Calibrating the avian molecular clock // Mol. Ecol. 2008. V. 17. P. 2321–2328.
https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03742.x
14. *Lavinia P.D., Kerr K.C.R., Tubaro P.L. et al.* Calibrating the molecular clock beyond cytochrome b: assessing the evolutionary rate of COI in birds // J. Avian Biol. 2016. V. 47. P. 84–91.
https://doi.org/10.1111/jav.00766
15. *McClellan D.A., Palfreyman E.J., Smith M.J. et al.* Physicochemical evolution and molecular adaptation of the Cetacean and Artiodactyl cytochrome b proteins // Mol. Biol. Evol. 2005. V. 22. № 3. P. 437–455.
https://doi.org/10.1093/molbev/msi028
16. *Gering E.J., Opazo J.C., Storz J.F.* Molecular evolution of cytochrome b in high- and low-altitude deer mice (genus Peromyscus) // Heredity. 2009. V. 102. P. 226–235.
https://doi.org/10.1038/hdy.2008.124
17. *Garvin M.R., Bielawski J.P., Gharrett A.J.* Positive Darwinian selection in the piston that powers proton pumps in complex I of the mitochondria of Pacific salmon // PLoS One. 2012. V. 7. № 8. P. 10.1371.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024127
18. *Малярчук Б.А.* Селективные процессы и адаптивная эволюция гена цитохрома b углозубов рода *Salamandrella* // Генетика. 2012. Т. 48. № 6. С. 713–718.
19. *Zhou T., Shen X., Irwin D.M. et al.* Mitogenomic analyses propose positive selection in mitochondrial genes for high-altitude adaptation in galliform birds // Mitochondrion. 2014. V. 18. P. 70–75.
https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.012
20. *Gu P., Liu W., Yao Y.F. et al.* Evidence of adaptive evolution of alpine pheasants to high-altitude environment from mitogenomic perspective // Mitochondrial DNA a DNA MappSeq Anal. 2016. V. 27. № 1. P. 455–462.
https://doi.org/10.3109/19401736.2014.900667
21. *Карякин И.В., Бакка С.В., Грабовский М.А. и др.* Балобан (*Falco cherrug*) в России // Инвентаризация, мониторинг и охрана ключевых орнитологических территорий России. Сб. науч. статей. Вып. 5. М.: Союз охраны птиц России, 2005. С. 48–66.
22. *Kovacs A., Williams N.P., Galbraith C.A.* Saker Falcon *Falco cherrug* Global Action Plan (SakerGAP). Abu Dhabi: Coordinating Unit of the Raptors MOU, 2014. 206 p.
23. *Nittinger F., Gamauf A., Pinsker W. et al.* Phylogeography and population structure of the saker falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization: mitochondrial and microsatellite data // Mol. Ecol. 2007. V. 16. P. 1497–1517.
https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03245.x
24. *Potapov E., Sale R.* The Gyrfalcon. London: T & AD Poyser, 2005. 360 p.
25. BirdLife International. IUCN Red List for birds. [Electronic resource]. URL: http://www.birdlife.org. Accessed 04.2020.
26. CITES. Checklist of CITES species. [Electronic resource] URL: http://checklist.cites.org. Accessed 04.2020.
27. Красная книга Российской Федерации (животные). М.: Астрель, 2001. 862 с.
28. Об утверждении перечня особо ценных диких животных и водных биологических ресурсов, принадлежащих к видам, занесенным в Красную книгу Российской Федерации и (или) охраняемым международными договорами Российской Федерации, для целей статей 226.1 и 258.1 Уголовного кодекса Российской Федерации [Электронный ресурс]: Постановление Правительства РФ от 31.10.2013 г., № 978. http://static.government.ru/media/files/41d49d332fed37b0fcb2.pdf (дата обращения 15.04.2020).
29. *Wilcox J.J.S., Boissinot S., Idaghdour Y.* Falcon genomics in the context of conservation, speciation, and human culture // Ecol. and Evol. 2019. V. 9. P. 14523–14537.
https://doi.org/10.1002/ece3.5864
30. *Esposti D.M., Vries D.S., Crimi M. et al.* Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein // Biochim. et Biophys. Acta. 1993. V. 1143. № 3. P. 243–271.
https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90197-n

31. *Zhang Z., Huang L., Shulmeister V.M. et al.* Electron transfer by domain movement in cytochrome bc_1 // Nature. 1998. V. 392. P. 677–684. https://doi.org/10.1038/33612

32. *Wink M., Sauer-Giirth H., Ellis D., Kenward R.* Phylogenetic relationships in the Hierofalco complex (Saker-, Gyr-, Lanner-, Laggar Falcon) // Reptors Worldwide. WWGBP/MME. 2004. P. 499–504.

33. *Шнайдер Е.П., Николенко Э.Г., Карякин И.В. и др.* Результаты апробирования методики восстановления популяции балобана в России путем подсадки в естественные гнезда птенцов, выращенных в питомнике (с результатами GPS/GSM-трекинга слетков) // Пернатые хищники и их охрана. 2018. № 37. С. 66–94. https://doi.org/10.19074/1814-8654-2018-37-66-94

34. NCBI. [Electronic resource]. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov. Accessed 04.2020.

35. *Horvath M.B., Martinez-Cruz B., Negro J.J. et al.* An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds // J. Avian Biol. 2005. V. 36. № 1. P. 84–88. https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03370.x

36. *Nacer D.F., do Amaral F.R.* Striking pseudogenization in avian phylogenetics: Numts are large and common in falcons // Mol. Phylogenet. Evol. 2017. V. 115. P. 1–6. https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.07.002

37. *Kumar S., Stecher G., Li M. et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms // Mol. Biol. Evol. 2018. V. 35. P. 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096

38. *Felsenstein J.* Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // Evolution. 1985. V. 39. P. 783–791. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x

39. *Tamura K., Nei M.* Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Mol. Biol. Evol. 1993. V. 10. P. 512–526. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

40. RCSB PDB. PDB ID: 3TGU. Cytochrome bc1 complex from chicken with pfvs-designed moa inhibitor bound. [Electronic resource]. URL: https://www.rcsb.org/structure/3TGU. Accessed 04.2020.

41. *Guex N., Peitsch M.C., Schwede T.* Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective // Electrophoresis. 2009. V. 30. P. S162–S173. https://doi.org/10.1002/elps.200900140

42. *Benkert P., Biasini M., Schwede T.* Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 343–350. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662

43. *Bertoni M., Kiefer F., Biasini M. et al.* Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 10480. https://doi.org/10.1038/s41598-017-09654-8

44. *Bienert S., Waterhouse A., de Beer T.A.P. et al.* The SWISS-MODEL Repository – new features and functionality // Nucleic Acids Res. 2017. V. 45. P. D313–D319. https://doi.org/10.1093/nar/gkw1132

45. *Waterhouse A., Bertoni M., Bienert S. et al.* SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. P. W296–W303. https://doi.org/10.1093/nar/gky427

46. *Studer G., Rempfer C., Waterhouse A.M. et al.* QMEANDisCo – distance constraints applied on model quality estimation // Bioinformatics. 2020. V. 36. № 6. P. 1765–1771. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828

47. *Wang J., Youkharibache P., Zhang D. et al.* iCn3D, a web-based 3D viewer for sharing 1D/2D/3D representations of biomolecular structures // Bioinformatics. 2020. V. 36. № 1. P. 131–135. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz502

48. *Roy A., Kucukural A., Zhang Y.* I-TASSER: A unified platform for automated protein structure and function prediction // Nat. Protoc. 2010. V. 5. P. 725–738. https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5

49. *Yang J., Yan R., Roy A. et al.* The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction // Nat. Methods. 2015. V. 12. P. 7–8. https://doi.org/10.1038/nmeth.3213

50. *Yang J., Zhang Y.* I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. P. W174–W181. https://doi.org/10.1093/nar/gkv342

51. *Choi Y., Sims G.E., Murphy S. et al.* Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels // PLoS One. 2012. V. 7. № 10. P. e46688. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046688

52. *Choi Y.* A fast computation of pairwise sequence alignment scores between a protein and a set of single-locus variants of another protein // Proc. ACM Conference on BCB. N.Y.: ACM, 2012. P. 414–417. https://doi.org/10.1145/2382936.2382989

53. *Choi Y., Chan A.P.* PROVEAN web server: A tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels // Bioinformatics. 2015. V. 31. № 16. P. 2745–2747. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv195

54. *Woolley S., Johnson J., Smith M.J. et al.* TreeSAAP: selection on amino acid properties using phylogenetic trees // Bioinformatics. 2003. V. 19. № 5. P. 671–672. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg043

55. *Yang Z., Nielsen R., Goldman N., Pedersen A.M.* Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites // Genetics. 2000. V. 155. P. 431–449.

56. *Yang Z.* Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods // J. Mol. Evol. 1996. V. 42. P. 294–307. https://doi.org/10.1007/BF02198856

57. *Рубин А.Б.* Биофизика. М.: Книжный дом “Университет”, 1999. 448 с.

58. *Карякин И.В.* Популяционно-подвидовая структура ареала балобана // Пернатые хищники и их охрана. 2011. № 21. С. 116–171.

Non-Neutral Cytochrome *b* Variability in the Saker *Falco cherrug* Grey, 1834 and Gyrfalcon *Falco rusticolus* L.

D. N. Rozhkova[a, b, *], L. S. Zinevich[a, b], I. V. Karyakin[a], A. G. Sorokin[b], V. G. Tambovtseva[a], and A. M. Kulikov[a]

[a] *Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*
[b] *All-Russian Research Institute for Environmental Protection, Moscow, 117628 Russia*
**e-mail: darroznature@gmail.com*

Mitochondrial DNA variability affects cell metabolism characteristics and reflects evolutionary processes. Saker and gyrfalcon sequences of the cytochrome *b* mitochondrial gene have been analyzed. Five amino acid substitutions have been revealed, and changing of physical and chemical properties have been found for two of them. Suggestions have been made about phylogenetic formation history and functional influence of the detected amino acid substitution variants.

Keywords: cytochrome *b*, amino acid substitutions, molecular evolution, saker, gyrfalcon.