

УДК 575.11:598.288.6

“ЭВОЛЮЦИЯ” МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ГЕНОМА ПЕНОЧКИ-ТАЛОВКИ (*Phylloscopus borealis* SENSU LATO) ПРОИСХОДИТ В ЕЕ ЯДЕРНОМ ГЕНОМЕ

© 2024 г. Л. Н. Спиридонова¹, О. П. Вальчук¹, Я. А. Редькин^{2,3}

¹Федеральный научный центр Биоразнообразия наземной биоты Восточной
Азии Дальневосточного отделения Российской академии наук, Владивосток, 690022 Россия
²Научноисследовательский Зоологический музей Московского государственного университета
им. М.В. Ломоносова, Москва, 125009 Россия

³Институт биологических проблем криолитозоны Сибирского отделения Российской академии наук,
г. Якутск, 677000 Россия
e-mail: spiridonova@biosoil.ru

Поступила в редакцию 20.12.2023 г.

После доработки 11.01.2024 г.

Принята к публикации 23.01.2024 г.

Проведено секвенирование частичного фрагмента генов *ND5–cytb* митохондриального генома (1553 пн) и его ядерных копий *Phylloscopus borealis sensu lato* (s. l.), принадлежащих к отдельным таксономическим группам из разных частей ареала. Показана идентичность большинства таксон-специфичных и уникальных митохондриальных замен у форм *examinandus* и *xanthodryas* с таковыми в ядерных копиях мтДНК *borealis*. Различия митохондриальных гаплотипов *examinandus* с ядерными копиями мтДНК *borealis* имели низкие значения ($p = 0.02$), а генетическая дивергенция собственно мтДНК *borealis–examinandus*, *borealis–xanthodryas* и *examinandus–xanthodryas* значительно превышала предыдущие значения ($p = 0.035$, 0.044 и 0.046 соответственно). Впервые в ядерном геноме одной особи *borealis* в западной части гнездового ареала (Республика Коми) обнаружена ядерная копия митохондриального гаплотипа самой восточной формы *xanthodryas*, а ядерные копии мтДНК *xanthodryas* из префектуры Тояма (Япония) оказались, в свою очередь, близки митохондриальным гаплотипам *borealis* из Кытлыма (Свердловская обл.) ($p = 0.018$). Таким образом, источником большинства замен в митохондриальных ДНК исследованных форм являются мутации, возникшие в ядерных копиях митохондриальных генов. Происхождение митохондриальных гаплотипов *examinandus* и *xanthodryas* из ядерных копий мтДНК *borealis* и близкое сходство их ядерных геномов дают основание рассматривать митогеномы этих форм в качестве вариантов гаплотипа одного вида *Ph. borealis* s. l. С большой долей вероятности можно утверждать, что время дивергенции гаплотипов анализируемых форм значительно меньше, чем 2.5–3 млн лет, как то предполагалось рядом авторов ранее, а “молекулярные часы”, не учитывающие рекомбинационные события между ядерным и митохондриальным геномами, в данном случае не могут быть использованы.

Ключевые слова: митохондриальный геном, ядерные копии мтДНК, межгеномная рекомбинация, *Phylloscopus borealis*.

DOI: 10.31857/S0016675824070045 EDN: BIIJXE

Митохондриальные маркеры широко используются для изучения генетического разнообразия и построения молекулярных филогений. Однако согласованность классической и молекулярной систематики часто нарушается. Анализ хранящихся в Генбанке последовательностей митохондриальных (мт) генов из работ по филогенетике разных таксонов убедительно показал, что одной из причин несоответствия молекулярных данных

классическим морфологическим признакам, несомненно, является ложное использование ядерных копий мт-генов (NUMT) вместо подлинных мтДНК [1]. Ядерные копии митохондриальных генов, с одной стороны, могут вносить существенные ошибки в филогенетический анализ [2], а с другой — могут помочь разрешению вопросов о происхождении новых вариантов гаплотипов мтДНК [3–5]. В настоящее время NUMT обнаружены во

всех исследованных в этом отношении растениях и животных. Научный интерес к ядерным копиям митохондриальной ДНК, ранее считавшимся “молекулярным мусором” в филогенетических исследованиях, в последнее время возрастает [1, 6–9 и мн. др.]. Особый интерес для исследования молекулярных причин глубокой дивергенции митохондриальных линий у таксонов низкого ранга со слабыми морфологическими отличиями представляют группы видов и подвидов со значительно дифференцированными митохондриальными гаплотипами. В настоящее время имеется много примеров глубокой дивергенции митохондриальных гаплотипов, особенно у птиц, на так называемые восточные и западные [10–13]. В этом отношении интересным оказался комплекс широко распространенной пеночки-таловки, представленный тремя сильно различающимися филогруппами мт-гаплотипов.

Систематика форм, входящих в состав группировки пеночек-таловок *Phylloscopus borealis* (s. l.), представляет собой один из сложных случаев среди пеночек Северной Палеарктики. В настоящее время существуют два противоположных взгляда. По мнению российских орнитологов, совпадающему с критериями классической систематики, это по-прежнему один политипический вид со сложной внутривидовой структурой, включающий семь подвидов [14–15]. По особенностям вокализации эти формы образуют три хорошо обособленные подвидовые группы. Первая — “*borealis*”, объединяет северо-европейские, сибирские и аляскинские популяции, отличающиеся так называемой “быстрой” песней, включает расы: *Ph. b. talovka* Portenko, 1938; *Ph. b. transbaicalica* Portenko, 1938; *Ph. b. borealis* (Blasius, 1858) и *Ph. b. kennicotti* (S.F. Baird, 1869). Вторая — “*hylebata*”, включает популяции южной части Сихотэ-Алиня, Сахалина, Хоккайдо, Курильских островов и Камчатки, объединяет два подвида с “медленным” типом песни: *Ph. b. hylebata* Swinhoe, 1860 (южный, более мелкий) и *Ph. b. examinandus* Stresemann, 1913 (северный, более крупный). И третья — “японская таловка”, гнездящаяся на островах Хонсю и Кюсю, представленная единственной формой *Ph. b. xanthodryas* (Swinhoe, 1863) и обладающая также очень специфичным характером песни. Согласно другой точке зрения, более распространенной в мировой литературе [16–21], основанной на результатах молекулярных исследований (цитохром *b*) в сочетании с указанными данными по вокализации, выделяются три разных вида: “*Ph. borealis*”, “*Ph. examinandus*” и “*Ph. xanthodryas*”.

Следует отметить, что области распространения “медленного” и “быстрого” типа песни у таловок заметно перекрываются. Самые западные районы, где среди птиц с “быстрой” песней изредка отмечались песни “медленного” типа, установлены в

Хэнтэй-Чикойском нагорье [22] и нижнем течении р. Олёкмы в Южной Якутии [15]. При этом А.А. Назаренко [22] подчеркивает, что в Забайкалье песни обоих типов воспроизводят одни и те же самцы. Среди особей с “медленной” песней на Сахалине изредка можно слышать и “быстрый” вариант песни или сочетание элементов обоих вариантов у одних и тех же птиц (наши данные). Анализ окраски коллекционных экземпляров, собранных в гнездовой период на Сахалине и в Приамурье, показывает, что в этих регионах часто встречаются таловки со смешанными признаками. Е.Г. Лобков [23] прямо указывает, что весь север Камчатского полуострова, граничащий с Корьякским нагорьем, где обитают *Ph. b. borealis*, населяют таловки с переходными признаками. Все это указывает на то, что в зонах вторичного контакта таловок с быстрым и медленным типами песни в Приамурье, Приморье и сопредельных регионах, а также на севере Камчатки и на Сахалине сформировались переходные (гибридные) популяции этих птиц со смешанными морфологическими признаками и смешанной вокализацией. Выполненные к нынешнему моменту генетические исследования таловок с разным типом песни из разных частей ареала [16, 18, 20] основаны на малом количестве особей из такого же соответственно малого числа локалитетов, что без проведения должного анализа фенотипической принадлежности птиц не позволяет выявить характер репродуктивных отношений между ними. В связи со сказанным выше нам представляется более оправданным считать эти группы конспецифичными. Кроме того, использование названия “*examinandus* Stresemann, 1913” для отделения таловок с медленным типом песни неверно, поскольку птицам этой же группы должно принадлежать старшее имя “*hylebata* Swinhoe, 1860” [15, 24].

Секвенирование полного митогенома трех особей с о. Сахалин выявило у одной из них два значительно дифференцированных гаплотипа: собственно митохондриальный гаплотип *examinandus* и ядерную копию мтДНК (NUMT), сходную с мт-гаплотипом *borealis* [5]. В связи с этим мы выдвинули гипотезу происхождения гаплотипа *examinandus* из ядерного генома *borealis* посредством межгеномной рекомбинации. Принимая во внимание результаты наших предыдущих исследований [3–5], цель настоящей работы заключалась в поиске причин глубокой дифференциации митохондриальных гаплотипов комплекса форм *Ph. borealis* s. l. на фоне слабой морфологической изменчивости. Для этого необходимо было на обширном материале, по возможности со всего видового ареала, исследовать наиболее дифференцированные участки митохондриального генома и их ядерные копии и сравнить их у всех представителей комплекса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сбор материала и амплификация фрагмента *ND5-cytb* мтДНК

В дальнейшем изложении для упрощения наименования трех таксономических группировок комплекса мы будем использовать названия “*Ph. borealis*”, “*Ph. examinandus*” и “*Ph. xanthodryas*” в соответствии с их обозначением в современных Списках птиц мира [21, 25]. Материал для исследования представлен 80 образцами из 28 локалитетов, которые были собраны в разное время и охватывают большую часть гнездового ареала форм этого комплекса в России и в Японии (рис. 1, табл. 1). Для упрощения исследований образцам, имеющим оригинальные коды (номера колец живых птиц или уникальные номера и коды экземпляров зоологических коллекций), были присвоены также порядковые номера (табл. 1) Образцы мышечных тканей и крови были фиксированы в 96%-ном этаноле. ДНК выделяли набором ISILATE II Genomic DNA Kit (Bioline, Inc.). Кроме того, использован материал в виде перьев от образцов, хранящихся в зоологических музеях МГУ и ДВФУ.

Удачным фрагментом митохондриального генома для проведения данной работы оказался участок длиной 1.5 тпн., включающий смежные части генов NADH-дегидрогеназы единицы 5 (*ND5*) и цитохрома *b* (*cytb*). Ядерная копия мтДНК (NUMT) этого фрагмента была обнаружена в результате полногеномного секвенирования у одной из птиц о. Сахалин [5]. Для синтеза фрагмента из митохондриального и ядерного геномов использованы специфичные праймеры Ph NUMT-Fw-12890 5'-CAGGCTCTATCATCCACAGCCTT-3' и Ph NUMT-Rv-14417 5'-CACCTAGTAGGTTA GGTGAAAATAGG-3'. По причине плохой сохранности ДНК в музейном материале для амплификации исследуемого фрагмента у музейных образцов использовали дополнительные внутренние праймеры (Ph NUMT-Fw-13788 5'-AAGTTTCATCAAGCAGAGATGTTTG-3' и Ph NUMT-Rv-13764 5'-CAAACATCTCTGCTTGATGA AACTT-3'). В сравнительный анализ мы взяли следующие последовательности генов *ND5* и *cytb*, хранящиеся в Генбанке NCBI: *Ph. xanthodryas* (о. Сикоку AB362465; AB362466), *Ph. examinandus* (о. Сахалин AB362464), *Ph. borealis* (Магадан AB362462). Выборка *Ph. xanthodryas* была дополнена десятью последовательностями части гена *cytb* из Генбанка (MH079391, AB362458, AB362457, AB362456, AB362455, AB362452, AB362451, AB362449, AB362447, AB362448). Эти последовательности были использованы только в филогенетической реконструкции, за исключением сети гаплотипов.

Амплификацию фрагмента проводили в 20 мкл объема, содержащего 20 нг матрицы ДНК, 5

пмолей каждого праймера, 1 × готовой смеси для ПЦР с Taq AB ДНК-полимеразой (Компания “Алкор Био”, Россия). Цикл амплификации включал преденатурацию 3 мин/95 °С, затем 35 циклов: денатурация 30 с/95 °С, отжиг праймера 30 с/58 °С, элонгация в зависимости от длины фрагмента 30 или 90 с/72 °С, и финальная элонгация 72 °С в течение 5 мин.

Секвенирование, клонирование и компьютерная обработка последовательностей

Продукт амплификации был использован для циклического секвенирования с набором реагентов ABI PRISM® BigDye™ Terminator v. 3.1. Реакцию присоединения метки проводили с теми же праймерами. Секвенирование проводили на автоматическом лазерном секвенаторе ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, США/Hitachi Япония).

Для образцов, имеющих в амплифицированном фрагменте две наиболее дивергированные последовательности, проведено клонирование с помощью набора InsTAclone™ PCR cloning Kit (Fermentas, Литва) согласно инструкции производителя. Более подробная методика клонирования описана ранее [3]. Прямые и обратные последовательности были собраны в пакете программы Staden 1.53 [26]. Выравнивание проводилось в программе ClustalW, предложенной в MEGA v 7.0.21 [27].

Изменчивость гаплотипического (*h*) и нуклеотидного (π) разнообразия [28] форм анализировали в программе DnaSP v5.10.01 [29]. Дивергенцию между гаплотипами (*p*-дистанция) определяли с использованием модели замен GTR+G+I [28] в MEGA v 7.0.21. Выбор филогенетической модели проводился с помощью modeltest [30] в той же программе. Филогенетические реконструкции гаплотипов осуществлялись методом максимального правдоподобия (ML) и байесовским подходом (BI). Построение филогенетических деревьев ML проводили в программе MEGA, а BI был выполнен в программе MrBayes 3.1.2 [31]. Для оценки достоверности ветвлений филогенетического дерева, построенного по методу ML, проводилось 500 репликаций [32]. При BI-анализе создавали три миллиона генераций цепей Маркова, отбирая пробы каждые 100 генераций, т. е. 30000 проб. Первые 25% проб исключались из анализа. В программе Tracer 1.7.1 визуально оценивали сближение марковских цепей Монте-Карло (MCMC) к стационарному распределению [33]. Все значения эффективного размера выборки (ESS) были больше 200.

Сеть гаплотипов и поиск деревьев максимальной экономии (MP) анализировали методом усредненного объединения Median-Joining (MJ) в программе Network 10.2.0.0 [34]. Первичные последовательности клонов фрагмента *ND5-cytb* и его ядерных копий депонированы в Генбанк под



Рис. 1. Ареал и места сбора образцов *Ph. borealis* s. l. Номера точек соответствуют материалам, представленным в табл. 1.

номерами доступа для митохондриального фрагмента OR890288–OR890367 и для его ядерных копий OR890368–OR890425.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменчивость последовательностей фрагмента генов *ND5*–*cytb*

В результате анализа для 80 особей пеночки-таловки получены первичные последовательности митохондриального генома фрагмента генов *ND5*–*cytb* длиной около 1.5 тпн. У 58 образцов секвенирование фрагментов показало наличие двух значительно дифференцированных гаплотипов, один из которых являлся таксон-специфичным митохондриальным гаплотипом, а второй ядерной копией мтДНК (рис. 2). Одна птица (IN17880), отловленная и окольцованная в Японии в период осенней миграции, по результатам секвенирования имела отличающийся от всех остальных набор двойных пиков. Клонирование ее фрагмента обнаружило присутствие двух вариантов последовательностей, один из которых оказался гаплотипом *xanthodryas*, а второй – копией мтДНК, аналогичной таковым

borealis. В свою очередь, гнездящаяся особь (R-34870) из окрестностей пос. Порог (Респ. Коми, Троицко-Печорский р-н) в секвенированной последовательности имела сходные двойные пики, представленные на рис. 2.

Изменчивость митохондриальных гаплотипов у всех форм оказалась одинаково высокой. Число переменных сайтов для всех особей составило 181 (общее с NUMT – 277), из них 109 (общее с NUMT – 154) парсимони-информативных и 72 (общее с NUMT – 123) – единичные замены. Скорости замен транзиций и трансверсий, выраженные в процентном соотношении, приведены в табл. 2. Транзиции G/A и T/C внесли максимальный вклад в нуклеотидное разнообразие митохондриальной ДНК и ее ядерных копий. В несколько раз чаще, по сравнению с другими трансверсиями, встречались G/C-замены. Нуклеотидное разнообразие имело низкие значения и значительно варьировало, снижаясь в ряду *examinandus*–*borealis*–*xanthodryas* (табл. 3)

Полиморфные митохондриальные сайты *borealis*, *examinandus* и NUMT представлены на рис. 3 (а, б, в соответственно). В выборке *borealis* отсутствовала четко выраженная популяционная

Таблица 1. Образцы *Ph. borealis* s. l., использованные в анализе

Номер экзем- пляра	Форма	Место сбора	Номер точки на карте	Номер доступа Генбанка (мтДНК)	Номер доступа Генбанка (NUMT)
R-41117	borealis	РФ, Мурманская обл., Мончегорский р-н, дол. р. Нявки	1	OR890317	OR890391
R-41119	«	»	1	OR890318	OR890392
R-84460	«	Карелия, Кемский р-н, окр. пос. Кузема	2	OR890322	OR890396
R-97928	«	РФ, Архангельская обл., Плесецкий р-н, 40 км к югу от Архангельска	3	OR890319	OR890393
R-115722	«	РФ, Архангельская обл., Приморский р-н, Двинская губа, о. Мудьюг	4	OR890320	OR890394
R-115723	«	»	4	OR890321	OR890395
R-98720	«	РФ, Костромская обл., Чухломский р-н, окр. д. Рагозино	5	OR890315	OR890389
R-98721	«	»	5	OR890316	OR890390
ZMMU 612	«	РФ, Кировская обл., Подосиновский р-н	6	OR890290	
ZMMU 611	«	РФ, Кировская обл., Опаринский р-н	7	OR890289	OR890368
ZMMU 174	«	»	7	OR890288	OR890369
R-126924	«	РФ, Кировская обл., Опаринский р-н, окр. пос. Латышский	7	OR890291	OR890370
4204-1	«	»	7	OR890293	
5533-1	«	»	7	OR890292	OR890371
R-13109	«	РФ, Респ. Коми, гор. окр. Вуктыл, р. Шугор, окр. пос. Усть-Паток	8	OR890302	OR890379
R-13106	«	РФ, Респ. Коми, гор. окр. Вуктыл, р. Печора, дер. Мича-Бичевник	9	OR890301	OR890378
R-34868	«	РФ, Респ. Коми, Троицко-Печорский р-н, окр. пос. Порог	10	OR890303	
R-34870	«	»	10	OR890304	OR890380; OR890381
R-34871	«	»	10	OR890305	
R-34874	«	»	10	OR890306	
R-34875	«	»	10	OR890307	
R-34876	«	»	10	OR890308	OR890382
R-66106	«	РФ, Респ. Коми, Троицко-Печорский р-н, окр. г. Медвежий Камень	11	OR890309	OR890383

Таблица 1. (продолжение)

Номер экзем- пляра	Форма	Место сбора	Номер точки на карте	Номер доступа Генбанка (MT ДНК)	Номер доступа (NU MT)
R-131414	«	РФ, Свердловская обл., Ивдельский р-н, окр. г. Ивдель	12	OR890294	OR890372
R-131419	«	»	12	OR890295	OR890373
R-131421	«	»	12	OR890296	
2013-1	«	РФ, Свердловская обл., гор. окр. Карпинск, окр. пос. Кытлым	13	OR890298	OR890375
2012-1	«	»	13	OR890297	OR890374
5531-1	«	»	13	OR890299	OR890376
5532-1	«	»	13	OR890300	OR890377
R-116350	«	РФ, Респ. Коми, гор. окр. Воркута, окр. пос. Елецкий, р. Лёк-Елец	14	OR890310	OR890384
R-116351	«	»	14	OR890311	OR890385
R-116352	«	РФ, Респ. Коми, гор. окр. Воркута, хр. Енганэпэ, гора Южная	15	OR890312	OR890386
R-116353	«	»	15	OR890313	OR890387
R-115724	«	РФ, Респ. Коми, гор. окр. Воркута, хр. Енганэпэ, ручей Изъявож	15	OR890314	OR890388
R-123732	«	РФ, Эвенкийский авт. окр., Илимпиский р-н, устье р. Тайменья	16	OR890323	
R-123733	«	»	16	OR890324	
MIA 327	«	РФ, Хабаровский край, Верхнебуреинский р-н, хр. Эзоп	17	OR890325	
VF17218	<i>examinandus</i>	РФ, о. Сахалин, Ногликский р-н, залив Чайво	18	OR890337	OR890422
VF17223	«	»	18	OR890336	OR890423
K48-13	«	РФ, о. Сахалин, окр. Луньского зали- ва, гора Пик (480 м)	19	OR890338	OR890424
RYA-3202	«	РФ, о. Сахалин, Ногликский р-н, р. Плелярна	19	OR890343	OR890401
RYA-2888	«	РФ, о. Сахалин, Ногликский р-н, долина р. Набиль	19	OR890341	OR890399
RYA-2892	«	РФ, о. Сахалин, Тымовский р-н, пойма р. Малой Тыми (правый берег)	19	OR890342	OR890400
RYA-2878	«	РФ, о. Сахалин, Тымовский р-н, лев. берег р. Пилengi, ур. Пастушье	19	OR890340	OR890398
RYA-2874	«	РФ, о. Сахалин, Тымовский р-н, лев. бер. р. Тыми, окр. пос. Тымовское	19	OR890339	OR890397
VF57191	«	РФ, о. Сахалин, Тымовский р-н, пос. Зональное	20	OR890346	OR890404
VF57186	«	»	20	OR890344	OR890402
VF57190	«	»	20	OR890345	OR890403
VN85096	мигрант	Приморский край, р. Средняя Литовка	21	OR890326	OR890408; OR890407

Таблица 1. (окончание)

Номер экзем- пляра	Форма	Место сбора	Номер точки на карте	Номер доступа Генбанка (MT ДНК)	Номер доступа (NU MT)
VN85047	«	РФ, Приморский край, р. Литовка, приток Новорудная	21	OR890327	
VN85077	«	»	21	OR890329	
VN85138	«	»	21	OR890328	OR890409
M72	«	»	21	OR890330	
VN85359	«	»	21	OR890333	
VN85342	«	»	21	OR890334	OR890405
VN85382	«	»	21	OR890335	OR890406
VF17419	«	»	21	OR890331	
VF58089	«	»	21	OR890332	
CBH5193	<i>examinandus</i>	РФ, Командорские о-ва, о. Беринга	22	OR890353	OR890415
CBH5233	«	»	22	OR890352	OR890414
RYA-3543	«	РФ, Камчатский край, Быстринский р-н, окр. пос. Эссо	23	OR890348	OR890413
RYA-3372	«	РФ, Камчатский край, Милюковский р-н, пос. Милюково	24	OR890351	OR890410
RYA-3429	«	»	24	OR890349	OR890411
RYA 3453	«	»	24	OR890347	OR890412
RYA-3334	«	РФ, Камчатский край, Елизовский р-н, пойма р. Авачи	25	OR890350	
RYA-4084	«	РФ, о. Уруп, ур. Компанейское у бухты Новокурильская	26	OR890358	
RYA-4106	«	»	26	OR890359	
RYA-3948	«	РФ, о. Итуруп, берег бухты Касатка	27	OR890355	OR890417
RYA-4016	«	»	27	OR890357	OR890418
RYA-3940	«	»	27	OR890354	OR890416
RYA-3959	«	»	27	OR890356	OR890425
5-xanth	<i>xanthodryas</i>	Я., о. Хонсю, преф. Тояма, ст. Фучу	28	OR890360	OR890419
6-xanth	«	»	28	OR890361	OR890420
IH17880	«	»	28	OR890362	OR890421
IH17886	<i>examinandus</i>	»	28	OR890365	
IH17878	«	»	28	OR890363	
IH17892	«	»	28	OR890366	
1G86030	«	»	28	OR890364	
1G83034	«	»	28	OR890367	

Примечание. РФ – Российская Федерация, Я. – Япония.

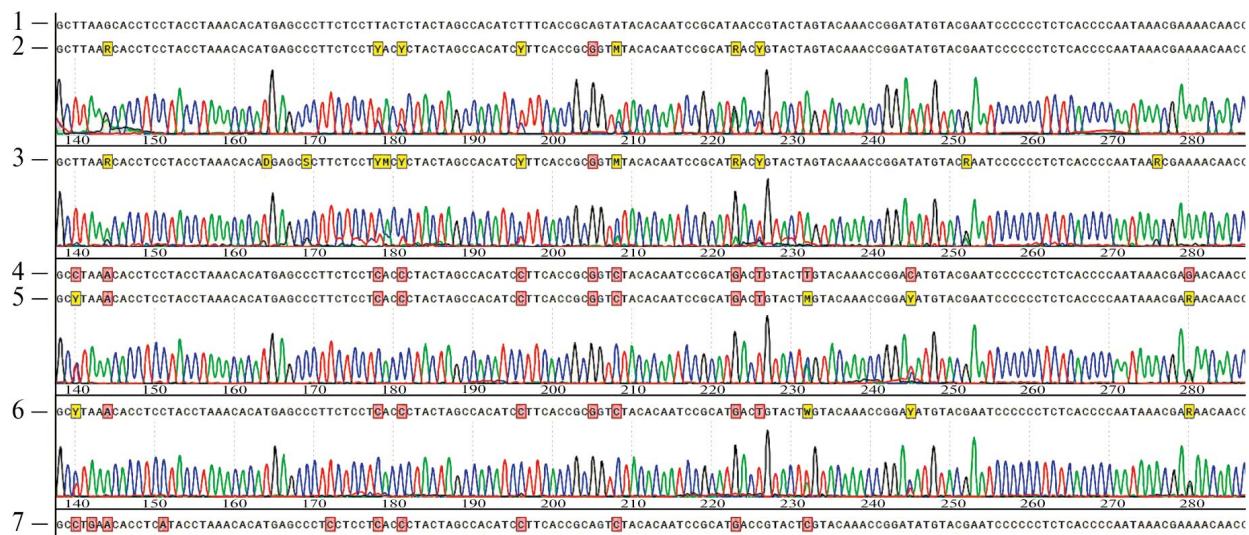


Рис. 2. Участок гена ND5 мтДНК форм *Ph. borealis* s. l.: 1 – *xanthodryas* (Генбанк AB362465), 2 – *xanthodryas* (IH17880), 3 – *borealis* (R-34870), 4 – *examinandus* (Генбанк AB362424), 5 – *examinandus* (VF57191), 6 – *examinandus* (RYA-3202), 7 – *borealis* (Генбанк AB362462). Красным цветом отмечены сайты, отличающиеся от последовательности *xanthodryas*. Сайты с двойными пиками показаны желтым цветом, с буквенным обозначением транзиций (R, Y) и трансверсий (D, M, S, W).

генетическая структура. Исключением явились мигрирующие птицы, отловленные в Приморье, гаплотипы которых отличались от западных тремя

Таблица 2. Значения нуклеотидных замен (в %), посчитанные по модели максимального правдоподобия (Maximum Composite Likelihood)

с\на	A	T	C	G
A	—	0.80	1.24	17.05
T	1.07	—	21.25	0.65
C	1.01	20.6	—	1.55
G	37.30	1.05	4.19	—

Примечание. Полужирным шрифтом обозначены транзиции, курсивом – трансверсии.

Таблица 3. Гаплотипическое (*h*), нуклеотидное (π) и внутривидовое (*p*-dist) разнообразие митохондриального фрагмента ND5–cytb и его ядерных копий *Ph. borealis* s. l

Формы (N/H)	h	π	<i>p</i> -dist
<i>borealis</i> (47/42)	0.99	0.00898	0.004
<i>examinandus</i> (29/29)	1.00	0.01310	0.010
<i>xanthodryas</i> (4/4)	1.00	0.00548	0.005
NUMT (58/58)	1.00	0.01929	0.020

Примечание. N – количество образцов, H – количество гаплотипов.

фиксированными заменами. Близким к ним оказался мт-гаплотип магаданской особи, взятой из Генбанка (AB362462).

Наиболее дивергированными митохондриальными гаплотипами обладали птицы из Кытлыма (Свердловская обл.) (2012-1, 5531-1 и 5532-1), Карелии (R-84460) и Костромской области (R-98721). Только два гаплотипа *borealis* встречены повторно, один у птиц из Респ. Коми (R-13106, R-13109, R-34876) и второй из Респ. Коми (R-34871), Мурманской обл. (R-41117 и R-41119) и Эвенкии (R-123732). Ядерные копии мтДНК обладали максимальным нуклеотидным разнообразием, у них выявлен 221 полиморфный сайт: для *examinandus* и *borealis* – 83 и 84 соответственно, для *xanthodryas* – 19. Из 58 последовательностей NUMT только у восьми выявлены стоп-кодоны митохондриальной ДНК (AGA, AGG).

Нуклеотидные последовательности *examinandus*, в отличие от *borealis*, разделились на две филогенетические линии, различающиеся между собой по более чем 30 фиксированным сайтам, однако не имеющие строгой географической привязки (рис. 3,б). Возможно, данный факт отражает существование в составе группировки таловок с “медленной” песней двух географических рас: *Ph. b. examinandus* и упомянутой выше *Ph. b. hylebata*. Выборка *xanthodryas* из-за малого количества исследованных образцов на рисунке не представлена.

Последовательности ядерных копий мтДНК, несмотря на их высокую гетерогенность, разделились на две филогруппы, которые мы обозначили как NUMT I (западная) и NUMT II (восточная)

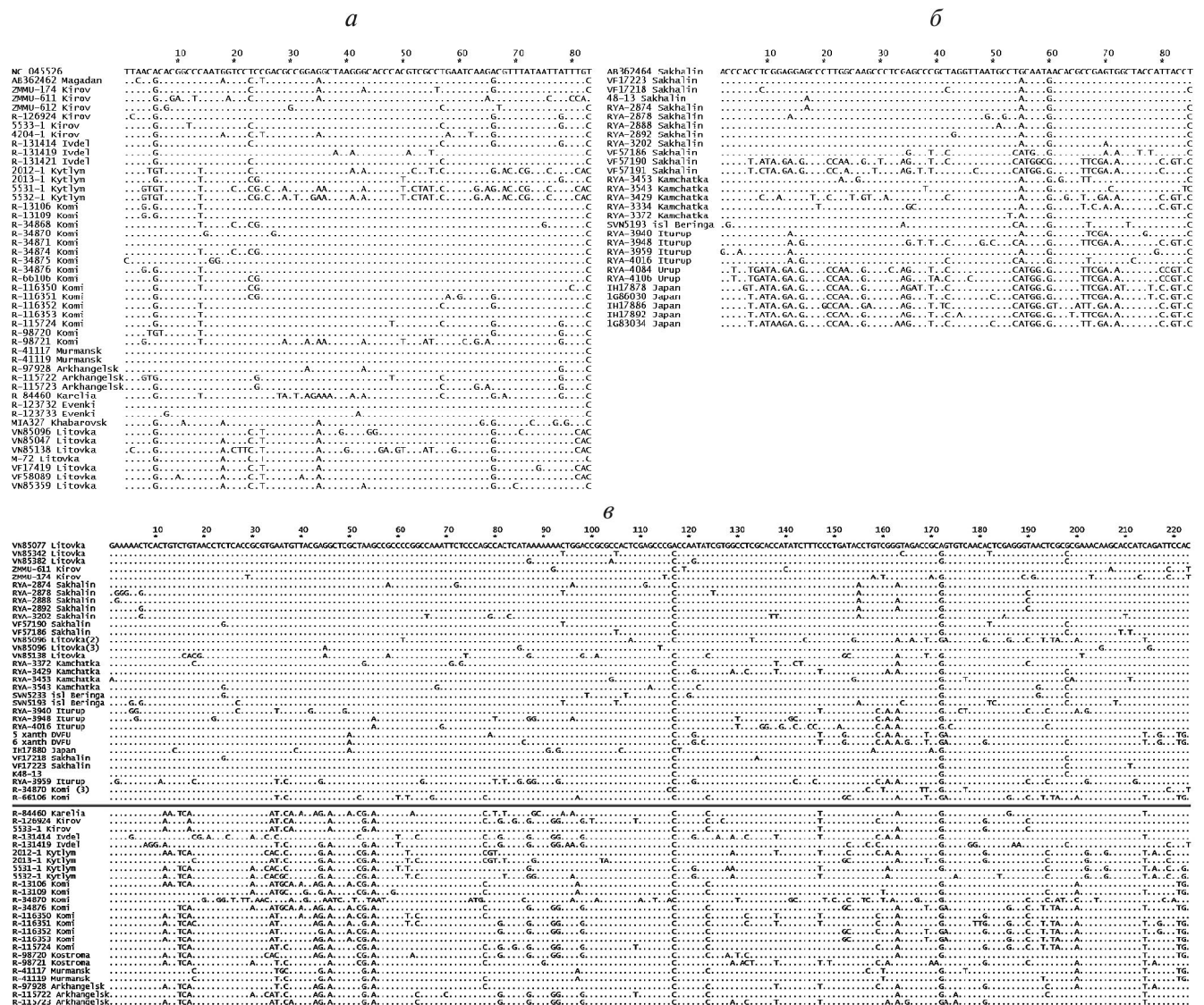


Рис. 3. Полиморфные сайты фрагмента *ND5-cytb* и его ядерных копий *Ph. borealis* s. l.: *borealis* (а), *examinandus* (б) и NUMT (чертой разделены филогруппы NUMT II (вверху) и NUMT I (внизу)) (в).

(рис. 3, в). В первую вошли в основном *borealis* из западной части ареала и часть мигрирующих птиц из Приморья, а также, что особенно важно, две японские *xanthodryas* из музея ДВФУ. Ядерные копии мтДНК *xanthodryas* оказались близки митохондриальным гаплотипам птиц из Кытлыма ($p = 0.018$). Такие же значения ($p = 0.02$) получены между митохондриальными гаплотипами *examinandus* и ядерными копиями мтДНК западных *borealis*. В линии NUMT II объединились в основном ядерные копии мтДНК представителей восточной части ареала и некоторых особей из западных территорий. Кроме того, в нее вошли последовательности неясной локализованности (ядерной или

митохондриальной), поскольку митохондриальные гаплотипы, недавно возникшие из ядерных копий, имеют с ними одинаковые последовательности и не могут быть адекватно идентифицированы.

В ядерных копиях мтДНК исследуемого фрагмента двух образцов с Камчатки (RYA-3453(2)) и Сахалина (VF17223(2)) обнаружена делеция триплета TCA, кодирующего аминокислоту Ser₍₁₄₀₎. Такая же делеция присутствует в гене *cytb* мтДНК у образцов с островов Сахалин (VF57186) и Уруп (RYA-4084, RYA-4106) и птиц, окольцованных в Японии в период осенней миграции (IH17878, 1G86030).

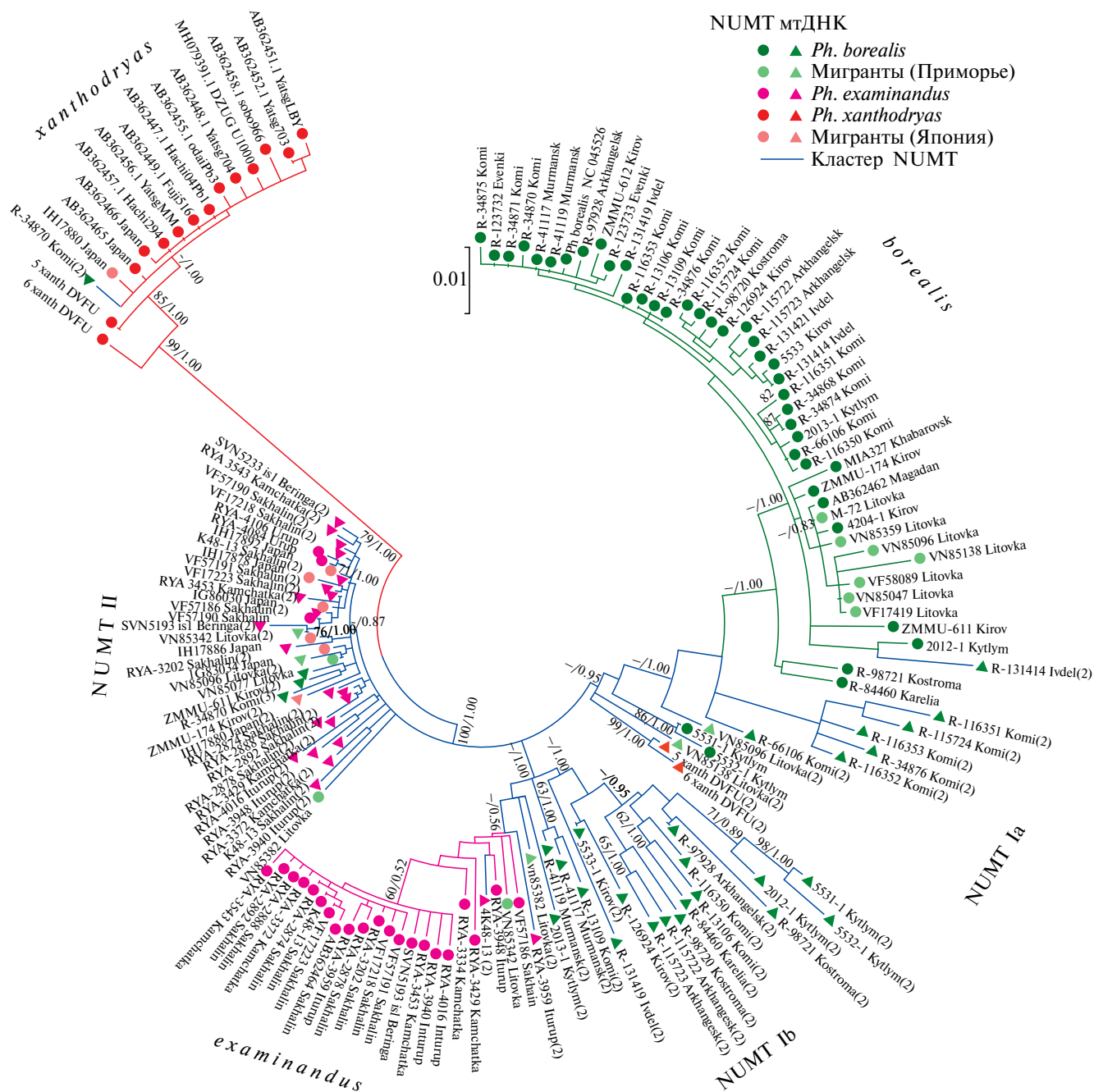


Рис. 4. Филогенетическое дерево последовательностей мтДНК фрагмента *ND5*—*cytb* и его ядерных копий *Ph. borealis* s. l., построенное по методу ML. В узлах ветвлений указаны значения поддержки (ML/BI $\geq 50\%$). Вверху дерева указан масштаб с длиной ветви, измеряемой количеством замен на сайт.

Дивергенция мтДНК в парах *borealis*—*examinandus*, *borealis*—*xanthodryas* и *examinandus*—*xanthodryas* значительно превышала вышеописанные значения ($p = 0.035$, 0.044 и 0.046 соответственно), что согласуется с литературными данными по этим формам (3.8–5.1%) [16].

Филогенетические связи митохондриальных гаплотипов и NUMT

Для построения реконструкции связей мт-гаплотипов и их ядерных копий использованы метод максимального правдоподобия (модель замен GTR+G+I, $bic = 22168.443$) и байесовский

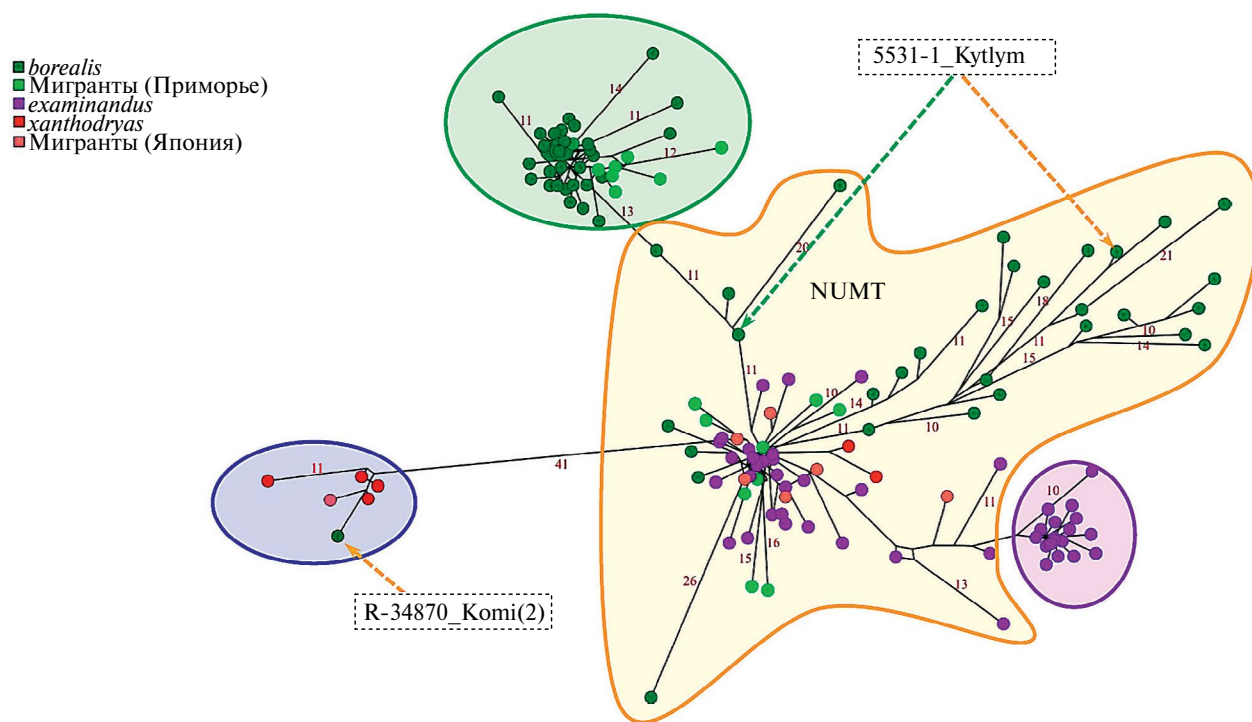


Рис. 5. Филогенетическая сеть последовательностей мтДНК фрагмента *ND5-cytb* *Ph. borealis* s. l. и его ядерных копий, построенная по методу Median Joining. На ветвях красным цветом указано количество замен (≥ 10). Зеленая пунктирная стрелка указывает мт-гаплотип, желтая — ядерную копию мтДНК.

подход. На обеих реконструкциях представлены четыре кластера, три из которых были существенно дифференцированы и соответствовали митохондриальным гаплотипам *borealis*, *examinandus* и *xanthodryas* (рис. 4). Четвертый кластер оказался наиболее гетерогенным, мы называем его супер-кластером по причине большого количества объединенных в нем последовательностей. Он включил не только все ядерные копии мтДНК, но и митохондриальные гаплотипы *examinandus*, которые обособились отдельной филогруппой. Условно супер-кластер разделился на три кластера, два из которых (NUMT Ia и NUMT Ib) соответствовали западной линии NUMT I и третий — восточной NUMT II. Часть NUMT отдельными длинными ветвями заняла промежуточное положение между митохондриальным и NUMT I кластерами.

Кластер *borealis* имел характерную для митохондриальных генов гребенчатую структуру с короткими внутренними ветвями и объединил большую часть западных таловок. В его состав обособленно вошла часть птиц, мигрирующих через Приморье вместе с одной особью из Магадана (AB362462). Ядерные копии мтДНК этих птиц объединились в западном кластере NUMT I. Интересным оказался факт присутствия у мигрирующей особи (K-25 VN85096) с митохондриальным гаплотипом *borealis* разных ядерных копий мтДНК, отнесенных

к кластерам NUMT I и NUMT II, что может указывать на ее гибридное происхождение *borealis* × *examinandus*. Значительно дивергированными оказались некоторые митохондриальные последовательности нескольких птиц — одной из Кытлыма (2012-1), объединившейся с ядерной копией мтДНК особи из Ивделя (R-131414) (обе из Свердловской обл.), и двух птиц из Костромской области (R-98721) и Карелии (R-84460). Их ядерные копии мтДНК вошли в удаленную ветвь кластера NUMT I. Заслуживает внимания тот факт, что митохондриальные гаплотипы двух других птиц из Кытлыма (5531-1 и 5532-1) также принадлежат к кластеру ядерных копий NUMT I. При этом их собственные ядерные копии мтДНК сгруппированы в другой ветви этого же кластера, однако на значительном удалении от собственных митохондриальных гаплотипов. Такое смешение митохондриальных гаплотипов с ядерными копиями на филогенетической реконструкции указывает на близкое родство этих последовательностей и позволяет сделать предположение об источнике возникновения первых.

Структура митохондриального кластера *examinandus*, объединившего птиц Камчатки, Командорских островов (о. Беринга), Сахалина и Итурупа, была сходна с предыдущим и имела монофилетическое происхождение. Он вошел

в состав кластера с ядерными копиями мтДНК *borealis* NUMT I. Интересно, что митохондриальные гаплотипы двух птиц с о. Уруп объединились с ядерными копиями более гетерогенного по таксономическому составу восточного кластера NUMT II. У одной птицы (VN85342), мигрировавшей в Приморье, обнаружен митохондриальный гаплотип *examinandus*, что подтверждает миграционные пути части *examinandus* через материк. Все ядерные копии мт-гаплотипов этих особей оказались в восточном кластере NUMT II.

Наиболее дифференцированной оказалась форма *xanthodryas*, которая отделилась от суперкластера ядерных копий, с максимальным количеством мутаций (более 40 замен). Два образца *xanthodryas* из музея ДВФУ нам удалось проанализировать на предмет ядерных копий мтДНК, которые оказались близки к митохондриальным последовательностям образцов из Кытлыма, из западной части ареала *borealis*. В свою очередь, одна из ядерных копий мтДНК образца (R-34870) из Республики Коми оказалась очень сходной с митохондриальными последовательностями *xanthodryas*.

Структура суперкластера NUMT, разделенного на три филогруппы NUMT Ia, NUMT Ib и NUMT II, значительно отличается от структуры кластеров, включающих митохондриальные гены. В нем преобладают длинные внутренние ветви, характерные для некодирующих ядерных генов. Кластер NUMT I представлен несколькими гетерогенными группами и занимает промежуточное положение между кластерами *borealis* и NUMT II. Он объединил не только ядерные копии мтДНК западных и восточных *borealis* и двух японских *xanthodryas*, но, что самое неожиданное, в него вошли некоторые мт-гаплотипы западных *borealis* и восточных *examinandus*.

Кластер NUMT II располагается между кластерами NUMT I и *xanthodryas*. Структура этого кластера характеризуется смешанным типом ветвления, представленным длинными ветвями, относящимися к ядерным копиям мтДНК, и короткими ветвями, типичными для митохондриальных генов (см. рис. 4). Наряду с ядерными копиями мтДНК в нем хаотично объединились также некоторые мт-гаплотипы *examinandus*. В этот же кластер вошли ядерные копии двух птиц из Кировской области (ZMMU-611 и ZMMU-174). Необходимо особо отметить базовое положение суперкластера NUMT для кластеров митохондриальных гаплотипов. Его центральное расположение подтверждает построенная в программе NetWork сеть гаплотипов (рис. 5). Из сети гаплотипов были исключены взятые из Генбанка десять последовательностей гена *cytb* *xanthodryas* по причине недостающей части фрагмента гена *ND5*. Количество замен между суперкластером NUMT и остальными филогруппами указано на ветвях сети. Важно отметить, что

некоторые ядерные копии мтДНК имели более 40 замен с центральным кластером, что указывает на скрытый в ядерном геноме огромный резерв разнообразия митохондриальных копий.

Интересным явился факт присутствия в кластере *xanthodryas* одной из ядерных копий, принадлежавшей особи *borealis* из западной части ареала (Респ. Коми, R-34870). В свою очередь, ядерные копии мтДНК двух *xanthodryas* (5-xanth, 6-xanth) сгруппировались в кластере NUMT I с мигрирующим *borealis* (VN85138) из Приморья, митохондриальный гаплотип которого сходен с магаданским гаплотипом из Генбанка (AB362462). Такое перекрестное расположение мт-гаплотипов и ядерных копий косвенно указывает на произошедший обмен между ядерным и митохондриальным геномами. Несмотря на обособленность каждого митохондриального кластера, базовым для всех форм оказался суперкластер с ядерными копиями мтДНК.

ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор фрагмента митохондриального генома *ND5-cytb* для анализа и сравнения его ядерных копий был определен нашим предыдущим исследованием [5]. Данные гены пользуются широкой популярностью в филогенетических исследованиях, и их последовательности в большом количестве представлены в разных генетических банках. Например, для гена *cytb* птиц прочитано около 56000 последовательностей, а для гена *ND5* — около 8000. Необходимо отметить, что около 30% этих последовательностей имеют ошибки разного характера, включая ядерные копии гена *cytb* мтДНК, на которые приходится до 1% ошибок [35]. Это свидетельствует о том, что не все ядерные копии митохондриальных генов по характерным признакам (отсутствие/присутствие терминирующих кодонов, наличие инделей, приводящих к сдвигу рамки считывания, и повышенный полиморфизм последовательностей за счет несинонимичных замен) могут быть отнесены к псевдогенам. Результаты настоящего исследования митохондриальных генов и их ядерных копий и ранее опубликованных работ [3–5] показывают в большинстве случаев полную функциональность ядерных копий, и при переходе из ядерного генома в митохондриальный они становятся полноценными кодирующими генами. Из 58 ядерных копий, представленных в данной работе, только у восьми обнаружены преждевременные терминирующие кодоны митохондриальной ДНК. Напомним, что стоп-кодоном копии митохондриального гена в ядерном геноме является TGA-триплет, кодирующий в митохондриальном геноме аминокислоту триптофан [3]. Поэтому не требуется каких-либо случайных мутаций и длительного

времени, чтобы ген стал “молчащим” при переходе в ядерный геном и наоборот.

Все таксон-специфичные и большинство уникальных замен митогенома исследованных образцов были обнаружены в его ядерных копиях, включая уникальную делецию ТСА-триплета, кодирующего аминокислоту серин Ser₍₁₄₀₎. Данный факт дополнительно подтверждает родство последовательностей, полученных из ядерного и митохондриального геномов. Кроме того, по таким маркерным сайтам можно также устанавливать родственные отношения и соответственно популяционную принадлежность птиц в периоды миграций и зимовки. Еще раз обращаем внимание на то, что митохондриальные последовательности *examinandus* объединились в одном кластере с ядерными копиями мтДНК *borealis*. У японской *xanthodryas* (IN17880) и западной *borealis* (Респ. Коми, R-34870) выявлены перекрестные ядерные копии мтДНК. Сходная ситуация была описана у других видов воробьиных *Calliope calliope* (Pallas, 1776) [3] и *C. pectoralis* Gould, 1837 [5].

Полученные данные указывают на то, что источником митохондриальных замен, т. е. “эволюции” таксон-специфичных гаплотипов мтДНК, в данном случае являются мутации в ядерных копиях мт-генов. Причем межгеномное рекомбинационное событие, происходящее в гоноцитах [3], предшественниках половых клеток птиц [36], предоставляет новый вариант гаплотипа с уже готовыми многими специфичными сайтами, передающимися по наследству сразу многим потомкам. Обнаруженные факты значительно сокращают время дивергенции мт-гаплотипов для анализируемых форм, чем это предполагалось ранее [18, 20], а “молекулярные часы”, не учитывающие рекомбинационных событий между ядерным и митохондриальным геномами, в этом случае не могут быть использованы. Появление новых филогрупп мтДНК обычно связывают с событиями Ледникового периода, климатическими колебаниями плейстоцена и рефугиумами, прохождением популяциями “бутылочного горлышка”. Принимая во внимание как описанные ранее факты по другим видам, так и представляемую работу, мы полагаем, что гомологичная рекомбинация между ядерным и митохондриальным геномами, являющаяся уникальным событием, раскрывает причину монофилии и глубокой дивергенции современных митохондриальных филогрупп *Ph. borealis* s. l. без всех выше описанных условий.

Сравнение митохондриальных генов и их ядерных копий может прояснить происхождение таксон-специфичных митохондриальных гаплотипов, как показано нами ранее [5, 8]. Поскольку все модели филогенетических реконструкций для мт-гаплотипов основаны на постепенном накоплении мутаций в самом митогеноме, рекомбинационные

события, случающиеся между ядерным и митохондриальным геномами с резкой сменой “старого” гаплотипа на более дифференцированный “новый”, не укладываются в эти модели. NUMTs практически не используются для построения филогенетических реконструкций, однако в ряде случаев анализ их изменчивости позволил провести реконструкцию филогенетических отношений, как, например, у полевок рода *Microtus* [37] и шимпанзе [38]. NUMTs являются быстроэволюционирующими видоспецифичными последовательностями и полезны для филогенетического анализа прежде всего в группах близкородственных видов и видов-двойников [39, 40].

Одним из примеров глубокой митохондриальной дивергенции при отсутствии ядерных отличий является пара *Ph. affinis* (Tickell, 1833) — *Ph. occisinensis* Martens et al., 2008. Выделение *occisinensis* в отдельный вид [41] основано главным образом на значительной митохондриальной дивергенции. Анализ ядерных геномов (SNP), наряду с биоакустическими и морфологическими признаками, показал высокое сходство этих таксонов [13]. В то же время результаты секвенирования митохондриальных геномов продемонстрировали их глубокую дивергенцию, которую объясняют экспансией формы *affinis* на запад, где она заменила ныне “вымершую” родственную форму, считавшуюся донором ее мтДНК и незначительной части ее ядерного генома. Причина замены собственного митохондриального гаплотипа *affinis* на чужой осталась загадкой. В связи с этим Д. Чжан с соавт. предлагают новый термин — “призрачная интрогрессия” и предлагают ее в качестве причины глубокой дивергенции митохондриальных гаплотипов *Ph. affinis* и *Ph. occisinensis* [13]. Время расхождения *occisinensis* и *affinis* по митохондриальному гену *цитохрома b* П. Альстрем с соавт. датируют более 4 млн лет, а для форм *borealis*, *examinandus* и *xanthodryas* — периодом в 2.5–3 млн лет [42]. Однако, как показывают наши исследования, все таксон-специфичные митохондриальные гаплотипы существующих в настоящее время форм *Ph. borealis* представлены в его ядерных копиях мтДНК.

Скрытые межгеномные рекомбинационные процессы, случающиеся в организме, можно увидеть по косвенным признакам, анализируя значительный материал не только мтДНК, но и ее ядерных копий. Если в анализе по митохондриальным маркерам присутствуют длинные ветви с особями, отличающимися большим количеством мутаций от базового гаплотипа, есть большая вероятность обнаружения либо рекомбинационного события, либо ядерной копии мтДНК. Как показывает наше исследование, митохондриальные копии в ядерном геноме не всегда имеют признаки, отличающие их от ядерных псевдогенов. К примеру, мт-гаплотипы особей *borealis* из Кытлыма,

Костромской области и Карелии по их кластеризации на филогенетической реконструкции (см. рис. 4) можно было бы рассматривать в качестве ядерных копий мтДНК, если бы мы не обнаружили их собственные NUMT, которые оказались значительно дивергировавшими.

Разделение суперкластера NUMT на три филогруппы (NUMT Ia, NUMT Ib и NUMT II) можно объяснить несколькими, одновременными межгеномными рекомбинационными событиями, в результате которых новая ядерная копия мтДНК изменялась независимо от предыдущих. Высокая скорость мутаций, характерная для ядерных псевдогенов, обеспечила глубокую дифференциацию обнаруженных филогрупп. Ядерные копии мтДНК, пребывающие длительное время в ядерном геноме, могут существенно изменяться от собственных митохондриальных геномов. Объединение в одном кластере с ядерными копиями *borealis* гаплотипов *examinandus* указывает на источник их происхождения, причем собственные ядерные копии *examinandus*, продолжая “эволюционировать” в ядерном геноме, значительно дивергировали от первоначальной последовательности ядерной копии *borealis*. Структура кластеров на филогенетической реконструкции, построенной с использованием митохондриальных генов и их ядерных копий, поразительно различается. Кластеры, включающие митохондриальные последовательности, имеют характерную картину распределения, соответствующую так называемому принципу “эффекта основателя”, длинную монофилетическую ветвь с короткими внутренними гребенками.

Суперкластер NUMT в основном образован длинными ветвями за счет высокого нуклеотидного разнообразия ядерных копий мтДНК, что согласуется с литературными данными, указывающими на высокую степень изменчивости псевдогенов митохондриального происхождения, и противоречит представлению о них как о “молекулярных ископаемых” [7]. Принимая во внимание эти отличия, можно предположить, что в целом ряде исследований митохондриальных маркеров, результатом которых на филогенетических реконструкциях стало выявление высокой гетерогенности либо полифилетического происхождения, анализировались не собственно митохондриальные гены, а их ядерные копии.

Таким образом, все таксон-специфичные митохондриальные гаплотипы *borealis*, *examinandus* и *xanthodryas*, по нашему мнению, произошли из ядерных копий мтДНК одной формы, обитающей в настоящее время, в частности, на юге Предуралья (соответствующей подвиду *Ph. b. talovka*). Ядерный геном служит местом, где происходят “эволюция” митохондриального генома и накопление его генетической изменчивости. Обнаруженные варианты ядерных копий являются потенциальным

источником новых гаплотипов мтДНК и представляют собой скрытый молекулярный резерв мтДНК, который может быть реализован через межгеномную рекомбинацию. В то же время ядерный геном, кодирующий морфологические признаки, остается прежним, что объясняет слабую морфологическую дивергенцию форм при глубоких отличиях митохондриальных гаплотипов. Основываясь на наших выводах о происхождении митохондриальных гаплотипов форм *examinandus* и *xanthodryas* из ядерных копий мтДНК *borealis* и учитывая высокое сходство их ядерных геномов, мы рассматриваем митогеномы этих форм в качестве вариантов гаплотипа одного вида *Ph. borealis* s. l.

Авторы чрезвычайно признательны В.Н. Сотникову, предоставившему уникальные материалы собственных сборов из различных частей гнездового ареала исследуемого вида.

Работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема № 121031500274-4 “Эволюционные аспекты формирования наземной биоты востока Азии”), а также гостемы: “Таксономический и биохорологический анализ животного мира как основа изучения и сохранения структуры биологического разнообразия” номер ЦИТИС-121032300105-0.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных. Был использован музейный материал, а не живые особи.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

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. Гребельный С.Д., Иванова Н.Ю., Нефедова Е.А. Обмен между ядерным и митохондриальными геномами (по результатам анализа ядерных и цитоплазматических копий митохондриальных генов – *numts* и *cymts*) // Цитология. 2018. Т. 60. № 11. С. 899–902. <https://doi.org/10.1134/S004137711811007X>
2. Sorenson M.D., Quinn T.W. Numts: A challenge for avian systematics and population biology. Auk. 1998. V. 115. P. 214–221.

3. Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П., Редькин Я.А., Крюков А.П. Ядерные копии митохондриальных генов – источник новых гаплотипов гена цитохрома *b* мтДНК *Luscinia calliope* (Muscicapidae, Aves) // Генетика. 2016. Т. 52. № 9. С. 1069–1080. <https://doi.org/10.7868/S0016675816090137>
4. Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П., Редькин Я.А. Новый случай рекомбинации между ядерным и митохондриальным геномами в роде *Calliope* Gould, 1836 (Muscicapidae, Aves): гипотеза происхождения *Calliope pectoralis* Gould, 1837 // Генетика. 2019. Т. 55. № 1. С. 81–93. <https://doi.org/10.1134/S0016675819010132>.
5. Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П. Полный митохондриальный геном *Phylloscopus examinandus* и гипотеза его происхождения // Генетика. 2022. Т. 58. № 3. С. 362–366. <https://doi.org/10.31857/S0016675822030146>
6. Triant D.A., DeWoody J.A. Demography and phylogenetic utility of numt pseudogenes in the southern red-backed // J. Mammalogy. 2009. V. 90. № 3. P. 561–570. <https://doi.org/10.1644/08-MAMM-A-149R1.1>
7. Романов Д.А., Андрианов Б.В. Митохондриальные последовательности в ядерном геноме животных // Успехи соврем. биологии. 2013. Т. 133. № 3. С. 254–268.
8. Спиридонова Л.Н., Вальчук О.П., Редькин Я.А. и др. Филогеография и демографическая история соловья-красношейки *Luscinia calliope* // Генетика. 2017. Т. 53. № 8. С. 933–951. <https://doi.org/10.7868/S0016675817080100>
9. Волков В.А., Григорьева Е.А., Лебедева М.В., Потомкина Е.К. Гетероплазмия и ядерные копии митохондриальных генов (NUMTs), выявленные в зоне интрогрессивной гибридизации ели европейской и ели сибирской // Тр. Санкт-Петербургского науч.-исслед. ин-та лесного хозяйства. 2022. № 1. С. 4–19. DOI: 10.21178/2079-6080.2022.1.4
10. Fok K.W., Wade C.M., Parkin D.T. Inferring the phylogeny of disjunct populations of the azurewinged magpie *Cyanopica cyanus* from mitochondrial control region sequences // Proc. R. Soc. Lond. B. 2002. V. 269. P. 1671–1679. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2057>
11. Kryukov A., Iwasa M.A., Kakizawa R. et al. Synchronic east-west divergence in azure-winged magpies (*Cyanopica cyanus*) and magpies (*Pica pica*) // J. Zool. Syst. Evol. Res. 2004. V. 42. P. 342–351. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2004.00287.x>
12. Kryukov A., Spiridonova L., Mori S. et al. Deep phylogeographic breaks in magpie *Pica pica* across the Holarctic: concordance with bioacoustics and phenotypes // Zool. Sci. 2017. V. 34. P. 185–200. <https://doi.org/10.2108/zs160119>
13. Zhang D., Tang L., Cheng Y., Hao Y., et al. “Ghost introgression” as a cause of deep mitochondrial divergence in a bird species complex // Mol. Biol. Evol. 2019. V. 36. № 11. P. 2375–2386. <https://doi.org/10.1093/molbev/msz170>
14. Коблик Е.А., Редькин Я.А., Архипов В.Ю. Список птиц Российской Федерации. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2006. 281 с.
15. Глуценко Ю.Н., Нечаев В.А., Редькин Я.А. Птицы Приморского края: краткий фаунистический обзор. М.: Тов-во науч. изданий КМК, 2016. 523 с.
16. Reeves A.B., Drovetski S.V., Fadeev I.V. Mitochondrial DNA data imply a stepping-stone colonization of Beringia by arctic warbler *Phylloscopus borealis* // J. Avian Biol. 2008. V. 39. P. 567–575. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2008.04421.x>
17. Saitoh T., Shigeta Y., Ueda K. Morphological differences among populations of the Arctic Warbler with some intraspecific taxonomic notes // Ornith. Sci. 2008. V. 7 (2). P. 135–142. <https://doi.org/10.2326/1347-0558-7.2.135>
18. Saitoh T., Alström P., Nishiumi I. et al. Old divergences in a boreal bird supports long-term survival through the Ice Ages // BMC Evol. Biology. 2010. V. 10 (1). № 35. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-35>
19. Saitoh T., Nishiumi I., Shigeta Y., Ueda K. Re-examination of the taxonomy of the Arctic Warbler *Phylloscopus borealis* (Blasius): Three separate species withing the *Phylloscopus [borealis]* subspecies // Japan. J. Ornithol. 2011. V. 61 (1). P. 46–59. <https://doi.org/10.3838/jjo.61.46>
20. Alström P., Saitoh T. et al. The Arctic Warbler *Phylloscopus borealis* – three anciently separated cryptic species revealed // Ibis. 2011. V. 153. P. 395–410.
21. Dickinson E.C., Christidis L. The Howard & Moore Complete Checklist of the Birds of the World: Passerines. 4th ed. V. 2. Eastbourne: Aves Press, 2014. 752 p.
22. Назаренко А.А. К орнитофауне Хэнтэй-Чикойского нагорья, Южное Забайкалье // Сб. Экология и зоогеография некоторых позвоночных суши Дальнего Востока. Владивосток, 1978. С. 40–56.
23. Лобков Е.Г. Гнездящиеся птицы Камчатки. Владивосток: ДВНЦ АН СССР, 1986. 290 с.
24. Red'kin Ya.A. Geographic variation and reproductive isolation in the eastern populations of arctic warbler // Avian migrants in the Northern Pacific: Breeding and Stopover sites in changing Earth. Scientific conf. Institute of Marine Geology and Geophysics FEB RAS: Abstracts. Yuzhno-Sakhalinsk, September 3–7, 2013. P. 11. /
25. Del Hoyo J., Collar N.J. (Eds). HBW and BirdLife International Illustrated Checklist of the Birds of the World: Passerines. Barcelona, Spain: Lynx Edicions, 2016. V. 2. 1013 p.
26. Bonfield J.K., Smith K.F., Staden R. A New DNA Sequence Assembly Program // Nucl. Acids Res. 1995. V. 23. P. 4992–4999.

27. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Mol Biol Evol.* 2016. V. 33 №7. P. 1870–1874.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
28. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. N. Y.: Oxford Univ. Press, 2000. 333 p.
29. Librado P., Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. P. 1451–1452.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
30. Goldman N. Statistical tests of models of DNA substitution // *J. Mol. Evol.* 1993. V. 36. P. 182–198.
31. Huelsenbeck J.P., Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees // *Bioinformatics*. 2001. V. 17. P. 754–755.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
32. Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap // *Evolution*. 1985. V. 39. P. 783–791.
33. Rambaut A., Drummond A.J., Xie D., Baele G., Suchard M.A. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7 // *Systematic Biology*. 2018. V. 67 (5). P. 901–904.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
34. Bandelt H.J., Forster P., Rohl A. Median-Joining networks for inferring intraspecific phylogenies // *Mol. Biol. Evol.* 1999. V. 16. P. 37–48.
35. Van den Burg M.P., Vieites D.R. Bird genetic databases need improved curation and error reporting to NCBI // *Ibis*. 2022.
<https://doi.org/10.1111/ibi.13143>
36. Стрижикова С.В., Стрижиков В.К., Житенко Н.В. Гистогенез яичников у птиц в пренатальном периоде онтогенеза // *Успехи соврем. естествознания*. 2002. Т. 4. С. 77–78.
37. Triant D.A., DeWoody J.A. Molecular analyses of mitochondrial pseudogenes within the nuclear genome of arvicoline rodents // *Genetica*. 2008. V. 132. № 1. P. 21–33.
<https://doi.org/10.1007/s10709-007-9145-6>
38. Hazkani-Covo E., Graur D. A comparative analysis of numt evolution in human and chimpanzee // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. № 1. P. 13–18. <https://doi.org/10.1093/molbev/msl149>
39. Hazkani-Covo E. Nuclear sequences of mitochondrial origin as phylogenetic markers // *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2010.
<https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0022877>
40. Андрианов Б.В., Романов Д.А., Горелова Т.В. и др. Перенос митохондриальной ДНК в ядерный геном клеток пересееваемой клеточной линии *Drosophila virilis* // *Генетика*. 2013. Т. 49. № 6. С. 788–792.
<https://doi.org/10.7868/S0016675813060027>
41. Martens J., Sun Y.-H., Packert M. Intraspecific differentiation of Sino-Himalayan bish-dwelling *Phylloscopus* leaf warblers, with description of two new taxa (*P. fuscatus*, *P. fuligiventer*, *P. affinis*, *P. armandii*, *P. subaffinis*) // *Vertebrate Zool.* 2008. V. 58. № 2. P. 233–265.
<https://doi.org/10.3897/vz.58.e30935>
42. Alström P., Rheindt F.E., Zhang R. et al. Complete species-level phylogeny of the leaf warbler (Aves: Phylloscopidae) radiation // *Mol. Phylogenet. Evol.* 2018. V. 126. P. 141–152.
<https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.03.0311>

The “Evolution” of the Mitochondrial Genome of the (*Phylloscopus borealis* Sensu Lato) Occurs in its Nuclear Genome

L. N. Spiridonova^{1, *}, O. P. Valchuk¹, Ya. A. Red'kin^{2, 3}

¹Federal Scientific Center for Biodiversity of Terrestrial Biota of Eastern Asia Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok, 690022 Russia

²Zoological Museum, Moscow State University, Moscow, 125009 Russia

³Institute of Biological Problems of the Cryolithozone, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Yakutsk, 677000 Russia
e-mail: spiridonova@biosoil.ru

Sequencing of a partial fragment of the *ND5*–*cytb* mitochondrial genes (1553 bp) and its nuclear copies was carried out to *Phylloscopus borealis* sensu lato, belonging to individual taxonomic groups from different parts of the range. It was shown that the majority of taxon-specific and unique mitochondrial substitutions in *examinandus* and *xanthodryas* forms were identical to those in nuclear copies of *borealis* mtDNA. Differences between mitochondrial haplotypes of *examinandus* and nuclear copies of mtDNA *borealis* were low ($p = 0.02$), at the same time the mtDNA genetic divergence in *borealis*–*examinandus*, *borealis*–*xanthodryas* and *examinandus*–*xanthodryas* significantly exceeded this value ($p = 0.035$, 0.044 and 0.046 , respectively). A nuclear copy of the mitochondrial haplotype of the easternmost form of *xanthodryas* was first discovered in the nuclear genome of one *borealis* individual in the western part of the breeding range (Komi Republic). Alongside this, it was shown at the first time, the nuclear copies of *xanthodryas* mtDNA from Toyama Prefecture (Japan) were close to the mitochondrial haplotypes of *borealis* from Kytlym (Sverdlovsk region) ($p = 0.018$). Thus, the mutations emerging in the nuclear copies of mitochondrial genes are the source of most substitutions in the mitochondrial DNA of the studied forms. The origin of the mitochondrial haplotypes *examinandus* and *xanthodryas* from nuclear copies of mtDNA *borealis* and the close similarity of their nuclear genomes gives grounds to consider the mitogenomes of these forms as variants of the haplotype of the single species *Ph. borealis* sensu lato. With a high degree of probability, it can be argued that the divergence time of the haplotypes of the analyzed forms is significantly less than 2.5–3 million years, as previously assumed by a number of authors [Saitoh et al. 2010; Alström et al. 2011], and the “molecular clock” that do not take into account recombination events between the nuclear and mitochondrial genomes cannot be used in this case.

Keywords: mitochondrial genome, nuclear copies of mtDNA, intergenomic recombination, *Phylloscopus borealis*