Techniques and Methods

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

A Possibility of Morphometrical Determining of Sex of Steppe Eagle Nestlings from Western and Eastern Populations?

ВОЗМОЖНО ЛИ МОРФОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛА ПТЕНЦОВ СТЕПНЫХ ОРЛОВ ИЗ ЗАПАДНЫХ И ВОСТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ ВИДА?

Karyakin I.V. (Center of Field Studies, N. Novgorod, Russia)

Zinevich L.S. (Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia)

Shnayder E.P. (Sibecocenter, LLC, Berdsk, Novosibirsk region, Russia)

Карякин И.В. (Центр полевых исследований, Н. Новгород, Россия)

Зиневич Л.С. (ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия)

Шнайдер Е.П. (ООО «Сибэкоцентр», Бердск, Новосибирская область, Россия)

Контакт:

Игорь Карякин
Центр полевых
исследований
603109, Россия,
Нижегород, ул.
Нижегородская, 3–29
тел.: +7 831 433 38 47
ikar_research@mail.ru

Людмила Зиневич
ФГБУН Институт
биологии развития
им. Н.К. Кольцова РАН
119334, Россия,
Москва, ул. Вавилова, 26
тел.: +7 499 135 33 22,
факс: +7 499 135 80 12
lzinevich@gmail.com

Елена Шнайдер
ООО «Сибэкоцентр»
630090, Россия,
Новосибирск,
а/я 547
тел.: +7 913 795 65 49
equ001@gmail.com

Резюме

Половой диморфизм у птенцов степного орла (*Aquila nipalensis*) выражен достаточно слабо и определение пола классическими морфометрическими методами вызывает затруднение. К тому же до сих пор такие методы не были разработаны. В данной статье представлена и апробирована морфометрическая методика определения пола птенцов степных орлов, происходящих из разных популяций с разными размерными классами птиц. В основу методики заложена формула классификации, полученная в результате дискриминантного анализа промеров птенцов степного орла, сделанных в Центральном Казахстане и Республике Алтай в 2017 г. Для исключения ошибок в морфометрии самок и самцов птенцов степного орла был использован молекулярно-генетический метод определения пола.

Ключевые слова: пернатые хищники, хищные птицы, степной орёл, *Aquila nipalensis*, определение пола.

Поступила в редакцию 12.12.2017 г. **Принята к публикации** 30.12.2017 г.

Abstract

Sexual dimorphism among nestlings of the Steppe Eagle (*Aquila nipalensis*) is poorly manifested. Thus, determining of sex by morphometric methods encountered many difficulties and could be completed only by the most experienced ornithologists who knows the species very well. This article presents a morphometric method for determining sex of nestlings of the Steppe Eagles from different breeding populations that belongs to different size classes. The method is based on classification formula obtained via linear discriminant analysis conducted for the data set of measurements of Steppe Eagle's nestlings from Central Kazakhstan and Altai Republic in 2017. To control the sex determination of nestlings a molecular-genetics method was used.

Keywords: raptors, birds of prey, Steppe Eagle, *Aquila nipalensis*, sex identification.

Received: 12/12/2017. **Accepted:** 30/12/2017.

DOI: 10.19074/1814-8654-2017-35-194-218

Введение

Половой диморфизм у птенцов степного орла (*Aquila nipalensis*), как и у многих других видов хищных птиц, выражен достаточно слабо. Особенно осложняет полевую идентификацию пола у птенцов степного орла ряд особенностей этого вида. Во-первых, степные орлы, в отличие от других настоящих орлов, часто покидают гнёзда в возрасте от 50 до 60 дней с ещё недоросшими маховыми и рулями. Во-вторых, в ареале вида существует два раз-

Introduction

Nestlings of the Steppe Eagle (*Aquila nipalensis*) do not display clear sexual dimorphism. Thus determining of sex by morphometric methods encountered many difficulties and considered as unreliable. Clear sex determination could be obtained via molecular-genetics methods (Griffiths *et al.*, 1996; Elleegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1998; Fridolfsson, Elleegren, 1999). However, these methods could hardly be implemented in fields in short terms, which makes it essen-

Contact:

Igor Karyakin
Center of Field Studies
Nizhegorodskaya str.,
3–29,
Nizhniy Novgorod,
Russia, 603109
tel.: +7 831 433 38 47
ikar_research@mail.ru

Ludmila Zinevich
Koltzov Institute of
Developmental Biology
of Russian Academy of
Sciences IDB RAS
Vavilova str., 26,
Moscow,
Russia, 119334
tel.: +7 499 135 33 22,
fax: +7 499 135 80 12
lzinevich@gmail.com

Elena Shnayder
Sibecocenter, LLC
P.O. Box 547,
Novosibirsk,
Russia, 630090
tel.: +7 913 795 65 49
equ001@gmail.com

мерных класса птиц – наиболее крупные орлы локализуются в горах Алтае-Саянского региона и их частота встречаемости в популяциях падает по мере продвижения на запад, юг и восток от Алтае-Саяна к границам гнездового ареала вида (Карякин и др., 2016b). Поэтому определение пола птенцов степного орла классическими морфометрическими методами вызывает затруднение. Надёжным способом считается молекулярно-генетический метод определения пола (Griffiths et al., 1996; Elleegren, 1996; Griffiths et al., 1998; Fridolfsson, Elleegren, 1999). Данный метод основан на ПЦР-амплификации гена хромохеликазы (CHD) на половых хромосомах птиц. Ранее этот метод уже использовался для определения пола у различных видов хищных птиц в России и показал свою эффективность (Нестеренко, 2003; Мастеров, Романов, 2014; Бабушкин и др., 2013; 2016). Однако, до сих пор у полевых исследователей нет возможности в кратчайшие сроки осуществлять определение пола у птиц данным методом, что приводит к необходимости разрабатывать видоспецифические морфометрические методы.

Цель данной статьи – разработать и апробировать морфометрическую методику определения пола птенцов степных орлов, происходящих из разных популяций с разными размерными классами птиц. Для исключения ошибок в морфометрии самок и самцов птенцов степного орла был использован молекулярно-генетический метод определения пола.

Методика

Для целей данной статьи в полевой сезон 2017 г. проведены промеры 68 птенцов степного орла в возрастной группе 45–55 дней ± 5 дней в двух модельных регионах – Центральном Казахстане ($n=28$), где гнездятся одни из самых мелких степных орлов в ареале вида, и в Юго-Восточном Алтае ($n=40$), где гнездятся одни из самых крупных

птиц для развития видов-связанных морфометрических методов.

The aim of the present study is to develop a reliable morphometric method to determine sex of nestlings of the Steppe Eagles from different breeding populations that belongs to different size classes. To control the sex determination of nestlings a molecular-genetics method was used.

Methods

During the field season of 2017 measurements of 68 nestlings of Steppe Eagles in the age 45–55 ± 5 days old were obtained. Nestlings originated from two regions: i) Central Kazakhstan (KZ) ($n=28$) where breeding population consists of the smallest-sized Steppe Eagles among the whole world population, and ii) South-Eastern Altai ($n=40$) where breeds Steppe Eagles with the biggest body size (fig. 1). Additionally this study employs measurements from 14 nestlings from Eastern Kazakhstan from 2010 and 2016.

Age of nestlings was determined visually considering the development of feathers (Karyakin, 2010). The following measurements of nestlings were recorded: bill's length from the tip to the forehead (DKL), bill's length from the tip to the cere (DKV), bill's length from the tip to the anterior edge of the nostrils (DKN), bill depth (VK), gape's size (RR), tarsus's length (DC), tarsus's diameter (SHC), length of tail feathers (DH), wing's length (DK) (Karyakin, 2004).

For 40 nestlings (15 from Central KZ and 25 from Altai) sex was determined via molecular-genetics method (MGM). For the molecular genetic analysis, we used samples of growing contour feathers with sheath (with some blood) of the Steppe Eagle nestlings preserved in ethanol 96% or DNA lysis buffer from The Collection of raptors molted feathers of IDB RAS and Sibecocenter LLC. DNA extraction was performed using the Diatome DNA Prep 100 Kit (Biocom, Russia) according to the manufacturer's protocol. The PCR analysis was performed with the ScreenMix-HS Kit (Evrogen, Russia) and the VeritiFast thermocycler (Applied Biosystems, USA) according to the standard avian molecular sexing

Птенец степного орла (*Aquila nipalensis*) в возрасте около 55 дней. Фото И. Карякина.

Nestling of the Steppe Eagle (*Aquila nipalensis*) at the age of about 55 days. Photo by I. Karyakin.

Рис. 1. Точки сбора полевого материала. Условные обозначения: 1 – гнездовой ареал степного орла (*Aquila nipalensis*), 2 – гнездовые группировки и/или популяции степного орла, 3 – места измерения птенцов степного орла на Алтае в 2017 г., 4 – в Центральном Казахстане в 2017 г., 5 – в Западном Казахстане в 2010, 2016 гг.

Fig. 1. Sample collecting spots. Legend: 1 – breeding range of the Steppe Eagle (*Aquila nipalensis*); 2 – nesting groups and / or breeding populations of the Steppe Eagle; 3 – nests where nestling's measurements were carried out: in Altai (in 2017); 4 – in Central Kazakhstan (in 2017) and 5 – in Western Kazakhstan (in 2010, 2016).

степных орлов (рис. 1). Также в работу привлечены промеры 14 птенцов, сделанные в 2010 и 2016 гг. в Западном Казахстане.

Возраст птенцов определялся визуально по развитию оперения (Карякин, 2010). У птенцов измерялись длина клюва от лба (DKL), длина клюва от восковицы (DKV), длина клюва от ноздри (DKN), высота клюва (VK), разрез рта (RR), длина цевки (DC), диаметр цевки (SHC), длина хвоста (DH), длина крыла (DK) (Карякин, 2004) – далее в тексте статьи принятые здесь сокращения (указаны в скобках) будут упоминаться в таблицах и диаграммах. В соответствии с методикой, измерения клюва и цевки проводились штангенциркулем с точностью до 2-го знака после запятой, измерения хвоста и крыла – рулеткой с точностью до 1-го знака после запятой (у птенцов в возрастной группе старше 55 дней округляли значения до 0,5 см).

К 45-дневному возрасту рост клюва и лап существенно тормозится, и птенцы степного орла достигают размеров, приближенных к таковым взрослых птиц. При этом рост крыла и хвоста всё ещё продолжается, по мере раскрытия трубок линейные размеры возрастают и становятся максимальными к 70-дневному возрасту, в среднем, через 10 дней после того, как птенцы покидают гнездо. При этом набор массы тела (по контролю за птицами в неволе) может происходить до 90-дневного возраста и составлять до 25 % за месяц (см., например, Спицын и др., 1986). Соответственно, в полевых условиях приходится работать в основном с птенцами степного орла в возрасте до 60 дней, когда размеры крыла и хвоста, а тем более масса тела, могут сильно варьировать, а размеры

protocol with 2550F/2718R primers and the products were visualized by electrophoresis in the 3% agarose gel. Typical results of molecular sexing of the Steppe Eagle nestlings are presented at the fig. 2.

The results of measurements of the nestlings, sex of which were determined via molecular-genetics method, are given in table 1. The results of measurements of nestlings, the sex of which was not determined via molecular-genetics method, are given in the Appendix¹⁵¹.

Statistical analysis was completed in Statistica 10 (StatSoft, 2012). All values are described as mean±SD. We tested the normality of the data using the Kolmogorov-Smirnov criterion before conducted parametric tests. All variables were distributed normally. We used linear discriminant analysis for variable selection and calculation of classification formula.

As a result, we got a classification formula that could classify nestlings by sex based on measurements of bill, tarsus, wing and tail.

Results

To compare measured parameters between groups of males and females we used T-student's test. T-test shows significant differences between males and females (males – $n=19$, females – $n=21$): by 7 parameters out of 9: SHC – 12.91 ± 0.74 mm for females and 11.27 ± 0.62 mm for males ($t\text{-value}=7.53$, $p<0.0005$), DC – 107.35 ± 6.71 mm for females and 99.94 ± 4.45 mm for males ($t\text{-value}=4.07$, $p<0.0005$), DKL – 50.48 ± 2.99 mm for females and 46.21 ± 2.53 mm for males ($t\text{-value}=4.85$, $p<0.0005$), DKV – 35.53 ± 1.89 mm for females and 32.94 ± 1.56 mm for males ($t\text{-value}=4.70$, $p<0.0005$), DKN – 31.00 ± 1.59 mm for fe-

¹⁵¹ <http://rrcn.ru/wp-content/uploads/2017/12/classification-SE.xls>

клюва и цевки уже стабильны. К тому же по измерениям клюва и цевки возникает меньше ошибок. Поэтому мы решили ориентироваться в первую очередь на размеры клюва и цевки, привлекая промеры крыла и хвоста в качестве дополнения, в основном для определения возрастной группы птенцов.

Для 40 особей (15 птиц из Центрального Казахстана и 25 птиц с Алтая) определён пол молекулярно-генетическим методом (МГМ). Для молекулярно-генетического анализа были использованы образцы трубок растущих контурных перьев с кровью птенцов (из груди), помещённые в спирт и/или лизирующий буфер, из объединённой коллекции ИБР РАН и ООО «Сибэкоцентр». ДНК экстрагировали с помощью коммерческого набора реактивов Diatome DNA Prep 100 (Россия) согласно протоколу производителя. Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью набора ScreenMix-HS (Евроген, Россия) и амплификатора VeritiFast (Applied Biosystems, США) по стандартному протоколу определения пола птиц с универсальными праймерами 2550F/2718R. Детекция продуктов ПЦР-амплификации осуществлялась методом электрофореза в 3 % агарозном геле.

Суть метода заключается в том, что на половых хромосомах птиц имеется ген белка хромохеликазы ДНК (CHD), представленный двумя копиями: CHD-Z и CHD-W. У птиц гетерогаметный пол – женский (у самок половые хромосомы ZW), а гомогаметный пол – мужской (половые хромосомы ZZ). Экзоны гена хромохеликазы ДНК одинаковы на обеих половых хромосомах, а интроны имеют разный размер на Z и W хромосомах. У самок копии этого гена разные по длине на разных половых хромосомах (ZW), а у самцов

males and 28.54 ± 1.33 mm for males (t -value=5.28, $p < 0.0005$), VK – 24.79 ± 1.48 mm for females and 22.89 ± 0.96 mm for males (t -value=4.73, $p < 0.0005$), RR – 71.20 ± 3.43 mm for females and 66.82 ± 3.80 mm for males (t -value=3.84, $p = 0.0005$) (table 3, fig. 5, 6). Lengths of wing and tail left insignificant (t -value=0.84, $p = 0.4$ и t -value=0.51, $p = 0.6$ respectively), because feathers of nestlings were still growing while being measured and their length depends mostly on the number of nestlings in brood since the youngest one is often smaller and could delay in development.

For all measurements (9 variables) we conducted a discriminant analysis (DA) with a sex as a grouping variable (table 4). The most important measurements in the resulting model appeared SHC, DKN and DKV. The classification of cases was correct in 95.24 % for females (20 correct cases out of 21) and 94.74 % for males (18 correct cases out of 19) (table 5).

The classifications function for sex determining in nestlings of the Steppe Eagles (Sf) could be describe as a difference between classification function for females (Ff) and classification function for males (Fm):

$$Sf = Ff - Fm,$$

$$Ff = -576.19 + -1.23 * DKL + -10.21 * DKV + 34.67 * DKN + 2.54 * VK + -0.39 * RR + 2.37 * DC + 30.16 * SHC + 0.28 * DK + -1.48 * DH,$$

$$Fm = -464.26 + -1.20 * DKL + -7.53 * DKV + 28.77 * DKN + 2.56 * VK + 0.32 * RR + 2.12 * DC + 24.14 * SHC + 0.27 * DK + -1.35 * DH$$

The individual is male if Sf value is below zero and female if Sf value is above zero. However, in a range of values from -1 to +1 the result could be insignificant and should be tested with additional methods.

To more accuracy discriminant analysis, we enlarge the number of variables by adding mutual ratios of measurements making 45 variables in total. The training sample includes 40 nestlings from Altai and Central Kazakhstan whose sex was determined genetically – 21 females and 19 males. We conducted discriminant analysis (DA) with forward stepwise algorithm for variable selection using sex as a grouping variable. The

Измерение клюва у степного орла. Фото Е. Ракина.

Measuring of a bill of the Steppe Eagle.
Photo by E. Rakin.

копии гена одинаковые по размерам на одинаковых хромосомах (ZZ). Таким образом, у самцов при амплификации гена хромохеликазы образуются фрагменты ДНК одинаковой длины (равной массы), а у самок – разной (CHD-Z и CHD-W) (Fridolfsson, Ellegren, 1999). Поэтому после внесения в гель полученных продуктов реакции и проведения электрофореза, у самок в ультрафиолетовом свете можно видеть две светящиеся полосы (по причине различия в массе ПЦР-продуктов с каждой хромосомы), а у самцов – одну (по причине равнозначности по массе) (рис. 2).

Результаты измерений птенцов, пол которых определён молекулярно-генетическим методом, приведены в табл. 1. Результаты измерений птенцов, пол которых не был определён молекулярно-генетическим методом, приведены в приложении¹⁵¹.

Статистическая обработка данных осуществлялась в программе Statistica 10 (StatSoft, 2012). Для выборок рассчитывались средние $\pm$ SD. Для определения нормальности распределения использовался критерий Колмогорова-Смирнова. Распределение всех переменных соответствовало нормальному. Для определения достоверности различий в выборках применяли t-критерий Стьюдента. Для определения вклада отдельных переменных в разделение выборки птенцов степного орла по половому признаку и вычисления классификационной формулы был проведён линейный дискриминантный анализ. Также был проведён дисперсионный анализ (ANOVA) для четырёх групп степных

Рис. 2. Результаты ПЦР фрагмента гена CHD1 с праймерами 2550F/2718R (Fridolfsson, Ellegren, 1999). LAD – маркер длин фрагментов ФХ174 ДНК/BsuRI (HaeIII) (ThermoFisher Scientific, США), M – самец, F – самка.

Fig. 2. PCR fragments of CHD1 gene with 2550F/2718R primers (Fridolfsson, Ellegren, 1999). LAD – DNA ladder phiX174 DNA/BsuRI (HaeIII) (ThermoFisher Scientific, USA), M – male, F – female.

most important variables in the resulting model are SHC, DH, DKV/DH, DKN/DH and RR/DC (table 6). The histogram of canonical scores is depicted on fig. 7.

To verify the variable selection, we tested it with leave-one-out cross-validation method. The classification of cases was correct in 90.48 % for females (19 correct cases out of 21) and 100 % for males (19 correct cases out of 19) (table 7).

The classifications function for sex determining in nestlings of the Steppe Eagles (*Sf*)

Табл. 1. Размеры птенцов степного орла (*Aquila nipalensis*) разного пола в Центральном Казахстане и на Алтае.

Table 1. Sizes of the Steppe Eagle (*Aquila nipalensis*) nestlings different sex in the Central Kazakhstan and Russian Altai.

Переменная (мм) Variable (mm)	Пол / Sex			
	Центральный Казахстан Central Kazakhstan		Русский Алтай Russian Altai	
	Самка / Female (n=8)	Самец / Male (n=7)	Самка / Female (n=13)	Самец / Male (n=12)
DKL	48.69 $\pm$ 2.58 (45.4–52.8)	44.94 $\pm$ 1.98 (41.5–47.1)	51.58 $\pm$ 2.74 (46.0–56.0)	46.94 $\pm$ 2.60 (42.0–51.8)
DKV	34.39 $\pm$ 1.17 (32.7–35.8)	32.00 $\pm$ 1.44 (29.2–33.5)	36.23 $\pm$ 1.94 (32.0–38.5)	33.48 $\pm$ 1.41 (30.3–35.4)
DKN	30.33 $\pm$ 1.08 (28.8–31.7)	27.70 $\pm$ 1.18 (25.7–28.8)	31.42 $\pm$ 1.74 (27.6–34.0)	29.03 $\pm$ 1.20 (27.1–30.5)
VK	24.08 $\pm$ 1.48 (22.5–26.5)	22.94 $\pm$ 1.06 (22.0–24.2)	25.22 $\pm$ 1.36 (23.2–28.6)	22.86 $\pm$ 0.95 (21.4–24.6)
RR	69.29 $\pm$ 2.51 (66.0–72.0)	63.86 $\pm$ 3.27 (59.2–59.2)	72.38 $\pm$ 3.46 (66.1–78.1)	68.54 $\pm$ 3.00 (63.0–72.0)
DC	105.11 $\pm$ 6.02 (97.0–115.0)	98.23 $\pm$ 4.36 (91.3–105.7)	108.72 $\pm$ 6.97 (97.6–121.7)	100.93 $\pm$ 4.36 (93.4–107.3)
SHC	12.26 $\pm$ 0.64 (11.1–13.0)	11.12 $\pm$ 0.59 (10.4–11.9)	13.31 $\pm$ 0.48 (12.6–14.2)	11.36 $\pm$ 0.65 (10.5–12.4)
DK	340.63 $\pm$ 41.87 (305.0–420.0)	328.57 $\pm$ 15.74 (305.0–345.0)	400.00 $\pm$ 46.90 (320.0–480.0)	385.00 $\pm$ 44.21 (315.0–460.0)
DH	168.75 $\pm$ 35.13 (135.0–240.0)	166.43 $\pm$ 11.07 (150.0–185.0)	206.15 $\pm$ 30.01 (160.0–250.0)	198.75 $\pm$ 22.97 (165.0–230.0)

¹⁵¹ <http://rrcn.ru/wp-content/uploads/2017/12/classification-SE.xls>

орлов (самки из Центрального Казахстана, самцы из Центрального Казахстана, самки с Алтая и самцы с Алтая).

В качестве результата исследований предложена формула классификации степных орлов на самок и самцов по основным измерениям клюва, цевки, крыла и хвоста.

Результаты исследований

Корреляционный анализ параметров птенцов, пол которых был определён генетическими методами ($n=40$), показал достоверные корреляции между несколькими параметрами. Высокую степень корреляции между собой показали длина крыла и длина хвоста ($r=0,95$, $p<0,05$), длина клюва от восковицы и от ноздри ($r=0,945$, $p<0,05$), длина клюва от лба и восковицы ($r=0,900$, $p<0,05$), что свидетельствует о взаимозависимости этих признаков. Соотношение этих параметров внутри анализируемой возрастной группы и по мере роста птенца постоянно изменяются пропорционально друг другу. Менее значимая корреляция оказалась между высотой клюва и разрезом рта ($r=0,74$, $p<0,05$), что свидетельствует о слабой взаимозависимости этих двух параметров. Таким

could be describe as a difference between classification function for females (Ff) and classification function for males (Fm):

$$Sf = Ff - Fm,$$

$$Ff = -1385.47 + 32.60 * SHC + 4.61 * DH + 5153.82 * DKN/DH + 1832.00 * DKV/DH + 388.82 * RR/DC,$$

$$Fm = -1237.94 + 26.51 * SHC + 4.40 * DH + 4199.15 * DKN/DH + 2328.12 * DKV/DH + 432.15 * RR/DC,$$

The individual is male if Sf value is below zero and female if Sf value is above zero. However, in a range of values from -1.5 to $+1.5$ the result could be insignificant and should be tested with additional methods.

Based on the resulting classification function we determined the sex of the 28 nestlings that did not undergo sex determination via molecular-genetics methods. Eighteen of them turned out to be males and 8 – females. Two nestlings ended up in the group where classification function Sf lays between -1.5 and $+1.5$, thus we considered their identification as unreliable (one bird originated from Central KZ and one from Altai). Thus, in the test group we were able to ID sex of 92.86% of cases (table 8).

Рис. 3. Корреляционные зависимости между параметрами птенцов степного орла.

Fig. 3. Correlations between morphometric parameters of nestlings of the Steppe Eagle.

Табл. 2. Корреляционные зависимости между параметрами птенцов степного орла в группах самок и самцов.

Table 2. Correlations between morphometric parameters of nestlings of the Steppe Eagle in groups of females and males.

Самки / Females $p<0.05$	DKL	DKV	DKN	VK	RR	DC	SHC	DK	DH
DKL	1	0.819	0.846	0.664	0.825	0.448	0.480	0.752	0.748
DKV	0.819	1	0.900	0.701	0.879	0.551	0.524	0.818	0.790
DKN	0.846	0.900	1	0.746	0.916	0.443	0.366	0.793	0.763
VK	0.664	0.701	0.746	1	0.751	0.577	0.390	0.803	0.729
RR	0.825	0.879	0.916	0.751	1	0.565	0.508	0.870	0.835
DC	0.448	0.551	0.443	0.577	0.565	1	0.377	0.556	0.527
SHC	0.480	0.524	0.366	0.390	0.508	0.377	1	0.630	0.621
DK	0.752	0.818	0.793	0.803	0.870	0.556	0.630	1	0.959
DH	0.748	0.790	0.763	0.729	0.835	0.527	0.621	0.959	1
Самцы / Males $p<0.05$	DKL	DKV	DKN	VK	RR	DC	SHC	DK	DH
DKL	1	0.879	0.814	0.603	0.530	0.308	0.332	0.401	0.442
DKV	0.879	1	0.891	0.665	0.617	0.379	0.502	0.463	0.537
DKN	0.814	0.891	1	0.588	0.709	0.344	0.292	0.699	0.760
VK	0.603	0.665	0.588	1	0.492	0.407	0.441	0.149	0.221
RR	0.530	0.617	0.709	0.492	1	0.641	0.525	0.536	0.685
DC	0.308	0.379	0.344	0.407	0.641	1	0.457	0.031	0.199
SHC	0.332	0.502	0.292	0.441	0.525	0.457	1	-0.059	0.038
DK	0.401	0.463	0.699	0.149	0.536	0.031	-0.059	1	0.944
DH	0.442	0.537	0.760	0.221	0.685	0.199	0.038	0.944	1

образом, эта пара параметров может позволить разделить птенцов степного орла на какие-либо группы по этому признаку (например, «широкотылые» и «узкостылые» особи). Между длиной цевки и её диаметром явная корреляция отсутствует ($r=0,64$, $p<0,05$), что говорит о наличии в популяциях степного орла как «коротколапых», так и «длиннолапых» птиц вне зависимости от пола (рис. 3). Корреляция иных параметров между собой составила менее 0,40 при $p<0,05$ – это может свидетельствовать как о возможности разделения по этим параметрам степных орлов на группы по полу и популяционной принадлежности, так и о бессистемном варьировании данных параметров в популяциях вида.

Корреляция между параметрами в группах самцов и самок отражена в табл. 2. Корреляционные зависимости показали сцепленность таких параметров, как все три измерения длины клюва друг относительно друга и относительно разреза рта, длина крыла и размеры клюва, длина хвоста и разрез рта, длина крыла и хвоста в группе самок, в то время как у самцов сцепленными признаками оказались лишь измерения длины клюва друг относительно друга и длина крыла и хвоста (табл. 2, рис. 4).

Проверка нормальности распределений морфометрических параметров показала, что все они распределены нормально. Т-критерий Стьюдента показал достоверность различий средних значений среди

The recent studies showed that in many breeding populations of Steppe Eagles individuals could be attributed to two size-classes – small birds and big birds (fig. 8). We assumed that it could be explained by either common origin of big-sized birds from populations inhabited Altai-Sayan Ecoregion, or by some adaptive features that facilitate breeding of a big-sized individuals in mountainous regions (Karyakin et al., 2016b).

Our attempt to separate nestlings from the training sample ($n=40$) by four groups – females from Central Kazakhstan ($n=8$), males from Central Kazakhstan ($n=7$), females from Altai ($n=13$), and males from Altai ($n=12$) via linear discriminant analysis with forward stepwise variable selection was also successful. In the resulting analysis were included 19 variables (table 10) that showed a clear separation on four groups (fig. 9). The first root separates males from females (values above zero – females, below zero – males), second root separates males from KZ from males from Altai (values above zero – Altai, below – KZ if the nestling is male), and third root separates females from Altai from females from KZ (above zero – KZ, below – Altai if the nestling is female) (table 11). We obtained 100 % correct classification for the training sample.

We apply the result of DA (see table 11) to the other 28 nestlings whose sex was not determined genetically. The difference

самцов и самок по 7 промерам из 9. Значимыми по t-критерию Стьюдента оказались следующие параметры (самцы – $n=19$, самки – $n=21$): диаметр цевки – $12,91 \pm 0,74$ мм для самок и $11,27 \pm 0,62$ мм для самцов (t -value=7,53, $p<0,0005$), длина цевки – $107,35 \pm 6,71$ мм для самок и $99,94 \pm 4,45$ мм для самцов (t -value=4,07, $p<0,0005$), длина клюва от лба – $50,48 \pm 2,99$ мм для самок и $46,21 \pm 2,53$ мм для самцов (t -value=4,85, $p<0,0005$), длина клюва от восковицы – $35,53 \pm 1,89$ мм для самок и $32,94 \pm 1,56$ мм для самцов (t -value=4,70,

in sex determination between the current analysis and the previous one (table 6) was found in 3 cases (table 12: nestlings number 43, 44, 46 and 64). Birds whose sex we failed to identify with classification formula were all classified as females in the current analysis. All nestlings that was ID as females were correctly separated by the region of their origin. Among nestlings classified as males we found 5 misplacements (table 12: nestlings number 45, 62, 63, 67, 68). All misplacements were due to incorrect clas-

Рис. 4. Корреляционные зависимости между параметрами птенцов степного орла в группах самок и самцов.

Fig. 4. Correlations between morphometric parameters of nestlings of the Steppe Eagle in groups of females and males.

Табл. 3. Размеры птенцов степного орла разного пола (жирным курсивом выделена значимая переменная по t-критерию Стьюдента).

Table 3. Morphometric values of nestlings of the Steppe Eagle of different sex (variable significant in the Student's t-test are marked with bold italic).

Переменная (мм) Variable (mm) n=40	Пол / Sex		Критерий Стьюдента t-test	
	Самка / Female (n=21)	Самец / Male (n=19)	t-value	p-level
DKL	50.48±2.99 (45.4–56.0)	46.21±2.53 (41.5–51.8)	4.85	<0.0005
DKV	35.53±1.89 (32.0–38.5)	32.94±1.56 (29.2–35.4)	4.70	<0.0005
DKN	31.00±1.59 (27.6–34.0)	28.54±1.33 (25.7–30.5)	5.28	<0.0005
VK	24.79±1.48 (22.5–28.6)	22.89±0.96 (21.4–24.6)	4.73	<0.0005
RR	71.20±3.43 (66.0–78.1)	66.82±3.80 (59.2–72.0)	3.84	=0.0005
DC	107.35±6.71 (97.0–121.7)	99.94±4.45 (91.3–107.3)	4.07	<0.0005
SHC	12.91±0.74 (11.1–14.2)	11.27±0.62 (10.4–12.4)	7.53	<0.0005
DK	377.38±52.98 (305.0–480.0)	364.21±45.38 (305.0–460.0)	0.84	=0.4
DH	191.90±36.31 (135.0–250.0)	186.84±24.90 (150.0–230.0)	0.51	=0.6

$p < 0,0005$), длина клюва от ноздри – 31,00±1,59 мм для самок и 28,54±1,33 мм для самцов (t -value=5,28, $p < 0,0005$), высота клюва – 24,79±1,48 мм для самок и 22,89±0,96 мм для самцов (t -value=4,73,

sification of nestlings originated from KZ to the group of Altai birds.

To illustrate the belonging of eagles to two size-classes and to test our morphometric method of sex identification we run

Рис. 5. Диаграмма размаха параметров птенцов степного орла.**Fig. 5.** Box plots of morphometric parameters of nestlings of the Steppe Eagle.

Рис. 6. Средние размеры клюва самок и самцов птенцов степного орла.

Fig. 6. Means of the bill size of Steppe Eagle nestlings in groups of females and males.

$p < 0.0005$), разрез рта – $71,20 \pm 3,43$ мм для самок и $66,82 \pm 3,80$ мм для самцов (t -value=3,84, $p=0,0005$) (табл. 3, рис. 5, б). Достоверных различий между длиной крыла у самок и самцов, а также длиной хвоста, найдено не было (t -value=0,84, $p=0,4$ и t -value=0,51, $p=0,6$ соответственно), что было ожидаемо, так как крылья и хвост у изученных птенцов всё ещё находились в стадии роста. В период роста помимо возраста, длина крыла и хвоста у птенцов сильно зависит от первенства птенца в выводке, если выводок состоит из 2–3-х птенцов: младший птенец в выводке, вне зависимости от пола, как правило, отстаёт от старшего в развитии на несколько дней.

the method over the set of measurements of nestlings from Western Kazakhstan breeding population. This breeding population inhabited Orenburg region of Russia and Western-Kazakhstan and Aktyubinsk regions of Kazakhstan (Karyakin et al., 2013; Karyakin et al., 2016a; Migration..., 2016). This territory is characterized by small-sized individuals breed in plains (same size-class as in Central Kazakhstan) and big-sized individuals that resembling birds from Altai population breed in mountainous areas (Mugodzhary and quartzite ridges of Southern Ural and Trans-Ural area). Thus, this population was very promising to test the method capability in classification in both sex and size-class of eagles. Measurements of eaglets were obtained in 2010 and 2016.

We applied discrimination models obtained on training sample to nestlings ($n=14$) originated from Western Kazakhstan population. Classification by sex (5 variables) gave us 7 males and 4 females in the sample, and for three birds values of the function were close to zero, so we consider these three classifications as not

Табл. 4. Переменные ($n=9$), включенные в дискриминантный анализ по обучающей выборке ($n=40$), где в роли группирующей переменной выступал пол птенцов, и классификационные коэффициенты для этих переменных. Наиболее значимые переменные выделены жирным курсивом.

Table 4. Variables ($n=9$) in the model obtained via discriminant analysis on training sample of nestlings ($n=40$) with sex as grouping variable (the most significant variables are emphasized with bold italic), and classification coefficients.

Переменная Variable $n=40$	Итоги анализа дискриминантных функций Discriminant function analysis results						Функция классификации Classification functions	
	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (1.30)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)	Самка Female ($n=21$) $p=0.525$	Самец Male ($n=19$) $p=0.475$
DKL	0.20	1.00	0.00	0.96	0.25	0.75	-1.23	-1.20
DKV	0.23	0.86	4.69	0.04	0.12	0.88	-10.21	-7.53
DKN	0.29	0.68	14.04	0.00	0.08	0.92	34.67	28.77
VK	0.20	1.00	0.00	0.99	0.43	0.57	2.54	2.56
RR	0.21	0.93	2.24	0.14	0.20	0.80	-0.39	0.32
DC	0.21	0.94	1.83	0.19	0.53	0.47	2.37	2.12
SHC	0.35	0.56	23.66	0.00	0.50	0.50	30.16	24.14
DK	0.20	1.00	0.06	0.81	0.09	0.91	0.28	0.27
DH	0.21	0.93	2.41	0.13	0.08	0.92	-1.48	-1.35
Константа / Constant							-576.19	-464.26
Процент правильных классификаций Percent of correct classifications							85,71% (18 верных / correct, 3 ошибочных / errors)	94,74% (18 верных / correct, 1 ошибочный / error)

Далее по имеющимся данным был проведён дискриминантный анализ. В анализ было включено 9 основных переменных – длина клюва от лба, длина клюва от восковицы, длина клюва от ноздри, высота клюва, разрез рта, длина цевки, диаметр цевки, длина хвоста, длина крыла (табл. 4). Попытка уменьшить число переменных приводила к значительному ухудшению качества разделения.

identified (table 13). Applying classification by both sex and size (19 variables) gave us distribution by sex (7 females and 7 males) and among them 3 males were classified as Altai group that is equal to big-size class, 4 males – as Kazakhstan group that is equal to small-size class; 5 females were classified as big-size class and 2 as small-size (table 14). Depicting canonical scores on a

Табл. 5. Определение пола птенцов из обучающей выборки (n=40) с помощью классификационной функции и сравнение с результатами определения пола молекулярно-генетическими методами.

Table 5. Sex prediction for nestlings from the training set (n=40) via classification function and its comparison with molecular-genetic sex definition.

№	Регион Region	Sf	Пол, МГМ Sex, MGM	Пол, ДА Sex, DA
1	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-0.24	Самка / Female	?
2	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	6.35	Самка / Female	Самка / Female
3	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	8.78	Самка / Female	Самка / Female
4	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	5.57	Самка / Female	Самка / Female
5	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	2.78	Самка / Female	Самка / Female
6	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	8.14	Самка / Female	Самка / Female
7	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	7.32	Самка / Female	Самка / Female
8	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	3.37	Самка / Female	Самка / Female
9	Алтай / Altai Mts.	-1.17	Самка / Female	Самец / Male
10	Алтай / Altai Mts.	3.88	Самка / Female	Самка / Female
11	Алтай / Altai Mts.	2.69	Самка / Female	Самка / Female
12	Алтай / Altai Mts.	6.20	Самка / Female	Самка / Female
13	Алтай / Altai Mts.	4.42	Самка / Female	Самка / Female
14	Алтай / Altai Mts.	7.04	Самка / Female	Самка / Female
15	Алтай / Altai Mts.	8.55	Самка / Female	Самка / Female
16	Алтай / Altai Mts.	6.30	Самка / Female	Самка / Female
17	Алтай / Altai Mts.	13.93	Самка / Female	Самка / Female
18	Алтай / Altai Mts.	13.03	Самка / Female	Самка / Female
19	Алтай / Altai Mts.	11.30	Самка / Female	Самка / Female
20	Алтай / Altai Mts.	10.44	Самка / Female	Самка / Female
21	Алтай / Altai Mts.	9.52	Самка / Female	Самка / Female
22	Алтай / Altai Mts.	-12.17	Самец / Male	Самец / Male
23	Алтай / Altai Mts.	-7.90	Самец / Male	Самец / Male
24	Алтай / Altai Mts.	-12.83	Самец / Male	Самец / Male
25	Алтай / Altai Mts.	-4.90	Самец / Male	Самец / Male
26	Алтай / Altai Mts.	-10.14	Самец / Male	Самец / Male
27	Алтай / Altai Mts.	-5.95	Самец / Male	Самец / Male
28	Алтай / Altai Mts.	-9.22	Самец / Male	Самец / Male
29	Алтай / Altai Mts.	-14.73	Самец / Male	Самец / Male
30	Алтай / Altai Mts.	-10.99	Самец / Male	Самец / Male
31	Алтай / Altai Mts.	-12.39	Самец / Male	Самец / Male
32	Алтай / Altai Mts.	-5.40	Самец / Male	Самец / Male
33	Алтай / Altai Mts.	-4.39	Самец / Male	Самец / Male
34	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-0.51	Самец / Male	?
35	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-6.17	Самец / Male	Самец / Male
36	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-12.83	Самец / Male	Самец / Male
37	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-4.68	Самец / Male	Самец / Male
38	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-13.62	Самец / Male	Самец / Male
39	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-9.97	Самец / Male	Самец / Male
40	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-9.94	Самец / Male	Самец / Male

В группу, по которой проводился анализ, попали 21 самка и 19 самцов, у которых пол был определён генетически. Наиболее значимыми переменными в модели для разделения по половому признаку оказались диаметр цевки, длина клюва от ноздри и длина клюва от восковицы.

По результатам анализа удалось добиться следующей доли верных классификаций в группах: самки – 95,24 % (20 случаев верной классификации из 21), самцы – 94,74 % (18 случаев верной классификации из 19), при уровне дискриминации: Лямбда Уилкса: 0,20, приобл. $F(9,30)=13,59$, $p<0,0005$ (табл. 5).

Полученная функция классификации (1) для определения пола птенцов степного орла может быть представлена в следующем виде:

$$Sf = Ff - Fm,$$

$$Ff = -576,19 + -1,23 * DKL + -10,21 * DKV + 34,67 * DKN + 2,54 * VK + -0,39 * RR + 2,37 * DC + 30,16 * SHC + 0,28 * DK + -1,48 * DH,$$

$$Fm = -464,26 + -1,20 * DKL + -7,53 * DKV + 28,77 * DKN + 2,56 * VK + 0,32 * RR + 2,12 * DC + 24,14 * SHC + 0,27 * DK + -1,35 * DH$$

где Sf – итоговая классификационная функция, которая классифицирует птицу как самца, при значениях менее -1, и как самку, при значениях более 1. При пограничных значениях функции от -1 до 1 надёжность классификации представляется недостоверной, Ff – значение функции классификации для группы самок, Fm – значение функции классификации для группы самцов.

Для повышения точности метода были дополнительно рассчитаны отношения всех промеров птенцов друг к другу. В итоге в анализ помимо 9 основных переменных – длина клюва от лба, длина клюва от восковицы, длина клюва от ноздри, высота клюва, разрез рта, длина цевки, диаметр цевки, длина хвоста, длина крыла, были также включены и их отношения друг к другу (всего 45 переменных). Анализ проводился с применением Forward Stepwise модели отбора значимых для разделения переменных. Наиболее значимыми переменными в модели для разделения по половому признаку оказались: диаметр цевки, длина хвоста, отношение длины клюва от ноздри к длине хвоста, отношение длины клюва от восковицы к длине хвоста и

plot showed that all birds from Western KZ population lay inside clusters obtained for training sample consists of nestlings from Central KZ and Altai, without major increase of overlap between clusters (fig. 10) – only one female (classified as small-sized bird) was found in between of two female's size clusters. That means that in the population of the Steppe Eagle there actually are birds of two size classes, and an analysis by the set of morphometric parameters allows discriminating between small females and huge males even in one breeding population.

Conclusion

Discriminant analysis on training set of 40 nestlings of the Steppe Eagle showed the possibility to determine sex of 45–55 days-old nestlings by means of morphometry even in populations where breeding eagles belong to two size classes. The minimal set of variables that is necessary for discrimination with more than 90 % correct cases – is 5 variables: tarsus's diameter (SHC), length of tail (DH), ratio of bill's length from the tip to the cere to the length of tail (DKV/DH), ratio of bill's length from the tip to the anterior edge of the nostrils to the length of tail (DKN/DH) and ratio of gape's size to the tarsus's length (RR/DC). Classification function is described in the text.

Возраст птенцов степного орла, в котором погрешности при определении пола по их размерам стремятся к минимальным – старше 45 дней. Фото И. Карякина.

Age of the Steppe Eagle nestlings for which the errors in determining the sex by their size will be minimal is over 45 days. Photo by I. Karyakin.

Табл. 6. Переменные ($n=5$), включённые в дискриминантный анализ по обучающей выборке ($n=40$), где в роли группирующей переменной выступал пол птенцов, и классификационные коэффициенты для этих переменных. Наиболее значимые переменные выделены жирным курсивом.

Table 6. Variables ($n=5$) in the model obtained via discriminant analysis on training sample of nestlings ($n=40$) with sex as grouping variable (the most significant variables are emphasized with bold italic), and classification coefficients.

Переменная Variable $n=40$	Wilks's Lambda = 0.19, $F(5,34) = 29.42, p < 0.0000$						Функция классификации Classification functions	
	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (1.35)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)	Самка / Female $n=21, p=0.525$	Самец / Male $n=19, p=0.475$
SHC	0.394388	0.476074	37.41753	0.000001	0.606999	0.393001	32.60	26.51
DH	0.226866	0.827615	7.08192	0.011800	0.074592	0.925408	4.61	4.40
DKV/DH	0.214274	0.876251	4.80167	0.035382	0.015909	0.984091	1832.00	2328.12
DKN/DH	0.283108	0.663202	17.26646	0.000207	0.015574	0.984426	5153.82	4199.15
RR/DC	0.202500	0.927201	2.66951	0.111515	0.755866	0.244134	388.82	432.15
Константа / Constant							-1385.47	-1237.94
Процент правильных классификаций Percent of correct classifications							95.24% (20 верных / correct, 1 ошибочный / errors)	100% (19 верных / correct, 1 ошибочный / errors)

отношение длины рта к длине цевки (табл. 6). Результат анализа приведён на рис. 7.

Для проверки отобранных переменных была проведена проверка методом кросс-валидации leave-one-out. Проверка выявила три случая, где дискриминантный анализ давал ошибку по некоторым выборкам: одна самка из Центрального Казахстана (табл. 7: птица № 1), одна самка с Алтая (табл. 7: птица № 10 – наиболее часто выявлялась ошибка в определении пола этой самки) и один самец из Центрального Казахстана (табл. 7: птица № 36). Доля надёжных классификаций в группах для рассматриваемой выборки была получена следующая: самки – 90,48 % (19 случаев верной классификации из 21), самцы – 100 % верной классификации из 19, суммарно – 95,0 % (38 случаев верной классификации из 40)

при уровне дискриминации: Лямбда Уилкса: 0,19, $F_{5,34}=29,42, p<0,0000$ (табл. 7).

Полученная функция классификации (2) для определения пола птенцов степного орла может быть представлена в следующем виде:

$$Sf = Ff - Fm,$$

$$Ff = -1385,47 + 32,60 * SHC + 4,61 * DH + 5153,82 * DKN/DH + 1832,00 * DKV/DH + 388,82 * RR/DC,$$

$$Fm = -1237,94 + 26,51 * SHC + 4,40 * DH + 4199,15 * DKN/DH + 2328,12 * DKV/DH + 432,15 * RR/DC,$$

где Sf – итоговая классификационная функция, которая классифицирует птицу как самца, при значениях менее -1,5, и как самку, при значениях более 1,5. При близких к нулю значениях (от -1,5 до +1,5) надёжность классификации представляется недостоверной согласно проведённой проверке. Ff – значение функции классификации для группы самок, Fm – значение функции классификации для группы самцов.

Рис. 7. Гистограмма распределения канонических значений дискриминантной функции по обучающей выборке ($n=40$); группирующий признак – пол птенца; 5 переменных в модели.

Fig. 7. Histogram of canonical scores of discriminant function obtained on training sample ($n=40$); grouping variable – sex of a nestling; 5 variables in a model.

Табл. 7. Определение пола птенцов из обучающей выборки (n=40) с помощью классификационной функции и сравнение с результатами определения пола молекулярно-генетическими методами.

Table 7. Sex prediction for nestlings from the training set (n=40) via classification function and its comparison with molecular-genetic sex definition.

№	Регион / Region	Sf	Пол, МГМ / Sex, MGM	Пол, ДА / Sex, DA
1	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-1.08	Самка / Female	Самец / Male
2	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	7.04	Самка / Female	Самка / Female
3	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	11.52	Самка / Female	Самка / Female
4	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	11.04	Самка / Female	Самка / Female
5	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	5.80	Самка / Female	Самка / Female
6	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	6.71	Самка / Female	Самка / Female
7	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	5.84	Самка / Female	Самка / Female
8	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	4.28	Самка / Female	Самка / Female
9	Алтай / Altai Mts.	2.84	Самка / Female	Самка / Female
10	Алтай / Altai Mts.	-1.72	Самка / Female	Самец / Male
11	Алтай / Altai Mts.	4.81	Самка / Female	Самка / Female
12	Алтай / Altai Mts.	7.46	Самка / Female	Самка / Female
13	Алтай / Altai Mts.	3.75	Самка / Female	Самка / Female
14	Алтай / Altai Mts.	5.62	Самка / Female	Самка / Female
15	Алтай / Altai Mts.	9.82	Самка / Female	Самка / Female
16	Алтай / Altai Mts.	4.78	Самка / Female	Самка / Female
17	Алтай / Altai Mts.	12.97	Самка / Female	Самка / Female
18	Алтай / Altai Mts.	13.07	Самка / Female	Самка / Female
19	Алтай / Altai Mts.	8.28	Самка / Female	Самка / Female
20	Алтай / Altai Mts.	8.47	Самка / Female	Самка / Female
21	Алтай / Altai Mts.	11.62	Самка / Female	Самка / Female
22	Алтай / Altai Mts.	-13.28	Самец / Male	Самец / Male
23	Алтай / Altai Mts.	-8.25	Самец / Male	Самец / Male
24	Алтай / Altai Mts.	-13.52	Самец / Male	Самец / Male
25	Алтай / Altai Mts.	-7.24	Самец / Male	Самец / Male
26	Алтай / Altai Mts.	-11.14	Самец / Male	Самец / Male
27	Алтай / Altai Mts.	-4.90	Самец / Male	Самец / Male
28	Алтай / Altai Mts.	-8.25	Самец / Male	Самец / Male
29	Алтай / Altai Mts.	-15.39	Самец / Male	Самец / Male
30	Алтай / Altai Mts.	-12.70	Самец / Male	Самец / Male
31	Алтай / Altai Mts.	-12.30	Самец / Male	Самец / Male
32	Алтай / Altai Mts.	-6.70	Самец / Male	Самец / Male
33	Алтай / Altai Mts.	-3.39	Самец / Male	Самец / Male
34	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-6.83	Самец / Male	Самец / Male
35	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-14.55	Самец / Male	Самец / Male
36	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-1.55	Самец / Male	Самец / Male
37	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-6.24	Самец / Male	Самец / Male
38	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-13.32	Самец / Male	Самец / Male
39	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-12.59	Самец / Male	Самец / Male
40	Центральный Казахстан / Central Kazakhstan	-10.85	Самец / Male	Самец / Male

Табл. 8. Определение пола птенцов из тестовой выборки с помощью классификационной функции ($n=28$, молекулярно-генетические методы для определения пола не применялись – пол неизвестен).

Table 8. Sex prediction for nestlings from the test set via classification function ($n=28$, molecular methods were not implemented – sex is unknown).

№	Регион / Region	Sf	Пол, ДА / Sex, DA
41	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	3.88	Самка / Female
42	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	0.04	??? (значение близкое к нулю)
43	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-3.45	Самец / Male
44	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-2.48	Самец / Male
45	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-14.30	Самец / Male
46	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-2.04	Самец / Male
47	Алтай / Altai Mts.	-0.30	??? (значение близкое к нулю)
48	Алтай / Altai Mts.	3.18	Самка / Female
49	Алтай / Altai Mts.	6.05	Самка / Female
50	Алтай / Altai Mts.	4.31	Самка / Female
51	Алтай / Altai Mts.	3.17	Самка / Female
52	Алтай / Altai Mts.	10.26	Самка / Female
53	Алтай / Altai Mts.	15.87	Самка / Female
54	Алтай / Altai Mts.	9.19	Самка / Female
55	Алтай / Altai Mts.	-14.43	Самец / Male
56	Алтай / Altai Mts.	-9.88	Самец / Male
57	Алтай / Altai Mts.	-9.55	Самец / Male
58	Алтай / Altai Mts.	-6.90	Самец / Male
59	Алтай / Altai Mts.	-14.93	Самец / Male
60	Алтай / Altai Mts.	-18.99	Самец / Male
61	Алтай / Altai Mts.	-11.30	Самец / Male
62	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-12.95	Самец / Male
63	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-13.11	Самец / Male
64	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-15.63	Самец / Male
65	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-12.82	Самец / Male
66	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-8.89	Самец / Male
67	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-17.89	Самец / Male
68	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	-15.11	Самец / Male

Мы применили полученную функцию классификации к птенцам, пол которых не был определён генетически ($n=28$). При этом 18 из них оказались отнесёнными к самцам и 8 – к самкам и 2-х птиц не удалось разнести по группам по причине пограничного значения классификационной функции (одна птица из Центрального Казахстана и одна – из Республики Алтай). Таким образом, удалось разнести по группам 92,86 % птиц (табл. 8).

Результаты недавних исследований показали отсутствие в гнездовом ареале степного орла строгой клинальной изменчивости у птиц. У этого вида увеличение размеров идёт со всех сторон ареала в современном его контуре к его центру, где в Алтае-Саянском регионе сосредоточены самые крупные птицы. При этом в горных группах (Мугоджары, Южный Урал, Казахстанский мелкосопочник) как на западе, так и на юге ареала степного орла, встречаются гнездящиеся крупные птицы (часто в парах!), размер которых достаточно сильно выделяется на фоне «мелких соседей» (см. рис. 8). Было сделано предположение, что во многих популяциях степные орлы представлены птицами двух размерных классов – мелкого и крупного, и мы предполагаем, что крупные птицы либо происходят из популяций Алтае-Саянского региона, либо несут в себе адаптивные признаки к размножению в горных условиях (Карякин и др., 2016b).

Для определения значимости различий между средними значениями ряда измерений птенцов степного орла в 4-х группах (самки из Центрального Казахстана $n=8$, самцы из Центрального Казахстана $n=7$, самки с Алтая $n=13$, самцы с Алтая $n=12$) был проведён дисперсионный анализ (ANOVA). Критерий наименьшей значимой разности (НЗР или LSD-тест) показал, что по длине клюва от лба, длине клюва от восковицы, высоте клюва, длине и диаметру цевки не выявлено достоверных различий между самцами из Центрального Казахстана и самцами с Алтая, по высоте клюва, длине хвоста и длине крыла – между самцами из Центрального Казахстана и самками из Центрального Казахстана, зато по длине клюва от лба, длине клюва от восковицы, длине клюва от ноздри, разрезу рта, размерам цевки, имеются достоверные различия между самцами из Центрального Казахстана и самками из обоих регионов, по длине клюва от ноздри, разрезу рта, крылу и хвосту – между самцами из Центрального Казахстана и Алтая, а по длине клюва от лба,

Рис. 8. Регистрации крупных степных орлов в разных популяциях. Условные обозначения: BP – гнездящиеся пары крупных птиц, 1b – популяции и гнездовые группировки, 1a – контур гнездового ареала, 2 – основная область гнездования, 3 – границы стран. По: Карякин и др., 2016.

Fig. 8. Registrations of big-size Steppe Eagles in different populations. Legend: BP – breeding pairs of big-size birds, 1b – breeding populations and nesting groups, 1a – border of the breeding range, 2 – main breeding areas, 3 – countries borders. From: Karyakin et al., 2016.

длине клюва от восковицы, высоте клюва, разрезу рта, диаметру цевки, длине крыла и хвоста – между самками из Центрального Казахстана и Алтая (табл. 9).

Попытка разделить с помощью дискриминантного анализа птенцов из обучающей выборки ($n=40$) по четырём группам (самки из Центрального Казахстана $n=8$, самцы из Центрального Казахстана $n=7$, самки с Алтая $n=13$, самцы с Алтая $n=12$) также увенчалась успехом. В анализе также были использованы морфометрические

характеристики и их отношение друг к другу. Отбор переменных проводился с помощью алгоритма Forward Stepwise. В результирующий анализ были отобраны 19 переменных (табл. 10), которые показали очень хорошее разделение птиц на 4 группы по трём корневым векторам (рис. 9). Первый вектор делит выборку по половой принадлежности птицы (больше нуля – самки, меньше – самцы), второй вектор разделяет казахстанских и алтайских самцов (больше нуля – Алтай, меньше нуля –

Разница в визуальных размерах самца и самки в зависимости от разницы в их возрасте: слева самка старше самца на несколько дней, справа – самец старше самки на несколько дней. Фото И. Карякина и Э. Николенко.

The difference in the visual dimensions of the male and female, depending on the difference in their age: at the left – female is older than the male on several days, at the right – male is older than the female on several days. Photos by I. Karyakin and E. Nikolenko.

Табл. 9. Результаты LSD-теста по 9 промерам птенцов степного орла с группировкой по полу и области происхождения – Центральный Казахстан (ЦК) или Алтай.**Table 9.** Results of LSD-test for the set of 9 measurements of nestlings of the Steppe Eagle with sex and area of origin – Central Kazakhstan (CKZ) or Altai as grouping variables.

	Самки из ЦК Females from CK	Самки с Алтая Females from Altai	Самцы с Алтая Males from Altai	Самцы из ЦК Males from CK
<i>DKL</i>	<i>M=48.688</i>	<i>M=51.577</i>	<i>M=46.942</i>	<i>M=44.943</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.016394	0.142910	0.007504
Самки с Алтая / Females from Altai	0.016394		0.000062	0.000003
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.142910	0.000062		0.108525
Самцы из ЦК / Males from CK	0.007504	0.000003	0.108525	
<i>DKV</i>	<i>M=34.388</i>	<i>M=36.231</i>	<i>M=33.483</i>	<i>M=32.000</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.013059	0.215351	0.005747
Самки с Алтая / Females from Altai	0.013059		0.000101	0.000002
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.215351	0.000101		0.054723
Самцы из ЦК / Males from CK	0.005747	0.000002	0.054723	
<i>DKN</i>	<i>M=30.325</i>	<i>M=31.415</i>	<i>M=29.033</i>	<i>M=27.700</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.087142	0.047604	0.000767
Самки с Алтая / Females from Altai	0.087142		0.000120	0.000002
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.047604	0.000120		0.049602
Самцы из ЦК / Males from CK	0.000767	0.000002	0.049602	
<i>VK</i>	<i>M=24.075</i>	<i>M=25.223</i>	<i>M=22.858</i>	<i>M=22.943</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.044571	0.036560	0.083175
Самки с Алтая / Females from Altai	0.044571		0.000027	0.000336
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.036560	0.000027		0.885690
Самцы из ЦК / Males from CK	0.083175	0.000336	0.885690	
<i>RR</i>	<i>M=69.287</i>	<i>M=72.385</i>	<i>M=68.542</i>	<i>M=63.857</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.033846	0.604165	0.001864
Самки с Алтая / Females from Altai	0.033846		0.004028	0.000001
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.604165	0.004028		0.003255
Самцы из ЦК / Males from CK	0.001864	0.000001	0.003255	
<i>DC</i>	<i>M=105.11</i>	<i>M=108.72</i>	<i>M=100.93</i>	<i>M=98.229</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.165585	0.115536	0.024784
Самки с Алтая / Females from Altai	0.165585		0.001540	0.000356
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.115536	0.001540		0.323167
Самцы из ЦК / Males from CK	0.024784	0.000356	0.323167	
<i>SHC</i>	<i>M=12.262</i>	<i>M=13.312</i>	<i>M=11.363</i>	<i>M=11.121</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.000296	0.001738	0.000564
Самки с Алтая / Females from Altai	0.000296		0.000000	0.000000
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.001738	0.000000		0.390144
Самцы из ЦК / Males from CK	0.000564	0.000000	0.390144	
<i>DK</i>	<i>M=340.63</i>	<i>M=400.00</i>	<i>M=385.00</i>	<i>M=328.57</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.002924	0.024421	0.577087
Самки с Алтая / Females from Altai	0.002924		0.371272	0.000755
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.024421	0.371272		0.006884
Самцы из ЦК / Males from CK	0.577087	0.000755	0.006884	
<i>DH</i>	<i>M=168.75</i>	<i>M=206.15</i>	<i>M=198.75</i>	<i>M=166.43</i>
Самки из ЦК / Females from CK		0.003766	0.019448	0.868347
Самки с Алтая / Females from Altai	0.003766		0.495632	0.003245
Самцы с Алтая / Males from Altai	0.019448	0.495632		0.015945
Самцы из ЦК / Males from CK	0.868347	0.003245	0.015945	

Табл. 10. Переменные, включённые в дискриминантный анализ по обучающей выборке (n=40), где в роли группирующей переменной выступало разделение птенцов на 4 группы по полу и популяции (самки из Центрального Казахстана, самки с Алтая, самцы с Алтая, самцы из Центрального Казахстана) и классификационные коэффициенты для этих переменных. Наиболее значимые переменные выделены жирным курсивом.

Table 10. Variables in the model obtained via discriminant analysis on training sample of nestlings (n=40) with combination of sex and population of origin as grouping variable (4 groups: females from Central Kazakhstan – CKZ, females from Altai, males from Altai, males from CKZ) and classification coefficients. The most significant variables are emphasized with bold italic.

Переменная Variable n=40	Wilks's Lambda = 0.003, F (57.54) = 6.07, p < 0.000						Функция классификации Classification functions			
	Wilks' Lambda	Partial Lambda	F-remove (3.18)	p-level	Toler.	1-Toler. (R-Sqr.)	Центральный Казахстан Central Kazakhstan		Русский Алтай Russian Altai	
							Самка Female (n=8)	Самец Male (n=7)	Самка Female (n=13)	Самец Male (n=12)
							p=0.200	p=0.175	p=0.325	p=0.300
SHC	0.00293	0.89295	0.71933	0.55335	0.00349	0.99651	32681	32677	32639	32597
VK/DK	0.00359	0.72883	2.23236	0.11945	0.00014	0.99986	8208861	8175418	8149974	8163414
DKV/DKN	0.00304	0.85983	0.97815	0.42494	0.00092	0.99908	1532938	1534189	1532554	1535853
RR/DK	0.00655	0.39936	9.02404	0.00073	0.00005	0.99995	-3506123	-3495944	-3476252	-3445704
DKN/DH	0.00468	0.55846	4.74382	0.01312	0.00003	0.99997	-4464525	-4458705	-4437933	-4401111
DH	0.00541	0.48372	6.40398	0.00384	0.00508	0.99492	145	144	145	142
VK/SHC	0.00313	0.83477	1.18760	0.34243	0.00058	0.99942	358735	359242	359905	359362
SHC/DK	0.00347	0.75453	1.95194	0.15744	0.00013	0.99988	-19121748	-19081202	-19027805	-19035929
DKN/SHC	0.00430	0.60907	3.85106	0.02728	0.00011	0.99989	78597	79007	77349	80320
DKN/VK	0.00371	0.70423	2.51998	0.09053	0.00045	0.99955	1029229	1027562	1029502	1026047
VK	0.00658	0.39774	9.08511	0.00070	0.00044	0.99956	13047	12949	13011	12833
DKN	0.00322	0.81174	1.39153	0.27761	0.00035	0.99965	7622	7701	7705	7740
DKV/SHC	0.00460	0.56887	4.54726	0.01534	0.00014	0.99986	-267881	-268410	-267225	-269957
DK	0.00366	0.71506	2.39086	0.10245	0.00227	0.99773	-59	-58	-59	-57
VK/DH	0.00349	0.74995	2.00051	0.15003	0.00012	0.99989	-2467571	-2455607	-2446819	-2442970
RR/DH	0.00668	0.39176	9.31539	0.00062	0.00003	0.99997	1862962	1857684	1848389	1831418
DKN/DK	0.00492	0.53177	5.28314	0.00864	0.00005	0.99995	8759425	8748615	8696886	8630044
DKV	0.00329	0.79567	1.54083	0.23829	0.00052	0.99948	-27723	-27720	-27754	-27656
SHC/DH	0.00322	0.81366	1.37409	0.28263	0.00014	0.99986	5893031	5881462	5866803	5857374
Константа / Constant							-1590079	-1589945	-1590485	-1588815
Процент правильных классификаций Percent of correct classifications							100 %	100 %	100 %	100 %

Казахстан, при условии, что птица – самец), а третий – казахстанских и Алтайских самок (больше нуля – Казахстан, меньше нуля – Алтай, при условии, что птица – самка), что отображено на графиках и в табл. 11. Для обучающей выборки получена 100 % верная классификация по группам.

Результат дискриминантного анализа (см. табл. 11) был применён к оставшимся 28 птицам, у которых пол не был определен генетически. Результаты приведены в табл. 12. Разница в определении пола у птиц между текущим анализом и классификационной формулой, полученной ранее (табл. 6),

составила 4 случая (табл. 12: птицы № 43, № 44, № 46 и № 64), без учёта птиц, чье определение пола по формуле мы сочли ненадёжным. Птицы, которым ранее не удалось установить пол, в этом анализе все были отнесены к самкам. Все птицы, определённые в текущем анализе как самки, были правильно распределены по группам, согласно региону происхождения. Среди птиц, определённых в текущем анализе как самцы, было выявлено пять ошибок (табл. 12: № 45, № 62, № 63, № 67, № 68), все они связаны с неправильным определением популяционной принадлежности самцов из

Рис. 9. Распределение канонических значений дискриминантной функции, полученной для разделения обучающей выборки ($n=40$) на 4 группы согласно полу и региону происхождения птенцов, в пространстве трёх корневых векторов. 19 переменных в модели. Синие круги – самки из Центрального Казахстана, красные квадраты – самки с Алтая, зелёные ромбы – самцы с Алтая, розовые треугольники – самцы из Центрального Казахстана. Расположение точек: (A) в плоскости 1 и 2 векторов (вектор 1 отделяет самцов от самок, вектор 2 отделяет самцов из Центрального Казахстана от самцов из Алтая); (B) в плоскости 1 и 3 векторов (вектор 1 отделяет самцов от самок, вектор 2 отделяет самок из Центрального Казахстана от самок из Алтая); (C) в плоскости 2 и 3 векторов – все 4 группы лежат отдельно.

Fig. 9. Scatterplot for canonical scores of discriminant function calculated on training sample of nestlings divided on groups by sex and region of origin. 19 variables in the model. Blue circles – females from Central Kazakhstan (CKZ), red squares – females from Altai, green rums – males from Altai, purple triangles – males from CKZ. Positioning of points in the plane: (A) of roots 1 and 2 (root 1 separates males from females, root 2 separates males from CKZ from males from Altai); (B) of roots 1 and 3 (root 1 separates males from females, root 3 separates females from CKZ from females from Altai); (C) of roots 2 and 3 – all 4 groups are separated from each other.

гнезд Центрального Казахстана – это были крупные птицы, померенные в горных группах, размерный класс которых соответствовал алтайским.

В подтверждение описанной выше гипотезы о двух размерных классах степных орлов в популяции, а также для апробирования разработанной морфометрической методики определения пола птенцов степных орлов, нами был проведён анализ размеров птиц из западноказахстанской популяции. Промеры птенцов сделаны в 2010 и 2016 гг. в рамках проектов по мониторингу степного орла в Оренбургской области (Россия), а также в Западно-Казахстанской и Актыбинской областях Казахстана (Карякин и др., 2013; Карякин и др., 2016а; Изучение..., 2016). В этих регионах на равнине сосредоточены гнездовые группировки степных орлов, близких по размерам к таковым из Центрального Казахстана, а в горных группах (Мугоджары и кварцитовые гряды Южного Урала и Зауралья в бассейне Ори) встречаются крупные птицы, близкие по размерам к алтайским. Поэтому крайне интересно было оценить возможности классификации по полу и размерным классам западноказахстанских орлов, на основании модели, полученной по промерам птиц из других регионов ареала вида.

Применение классификационной формулы, разделяющей птиц по полу, показав-

Табл. 11. Канонические значения дискриминантной функции по трём коревым векторам, полученной для классификации обучающей выборки птенцов (n=40, генетически определённый пол) степного орла по четырём группам согласно их половой и популяционной принадлежности. См. описание в тексте.

Table 11. Canonical scores of discriminant function separated training sample of nestlings (n=40, sex determined genetically) on 4 groups according their sex and place of origin. See description in the text.

	Регион, полевые данные Region, field data	Пол, МГМ Sex, MGM	Root 1	Пол, ДА Sex, DA	Root 2	Регион, ДА Region, DA	Root 3	Регион, ДА Region, DA
1	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка / Female	3,83905	Самка / Female	-0,76690	-----	3,68580	ЦК / CKZ
2	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка / Female	2,80713	Самка / Female	0,14019	-----	1,30483	ЦК / CKZ
3	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка / Female	3,86135	Самка / Female	0,25485	-----	3,27084	ЦК / CKZ
4	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка / Female	4,57427	Самка / Female	0,57091	-----	4,24512	ЦК / CKZ
5	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка / Female	2,73217	Самка / Female	-1,27306	-----	3,48136	ЦК / CKZ
6	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка / Female	3,22791	Самка / Female	0,04841	-----	1,50444	ЦК / CKZ
7	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка / Female	2,41609	Самка / Female	0,39997	-----	1,39604	ЦК / CKZ
8	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка / Female	5,06661	Самка / Female	1,15519	-----	2,15034	ЦК / CKZ
9	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	2,96002	Самка / Female	0,02488	-----	-1,13612	Алтай / Altai
10	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	1,90655	Самка / Female	0,43822	-----	-1,16956	Алтай / Altai
11	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	2,13453	Самка / Female	-0,32715	-----	-1,10463	Алтай / Altai
12	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	3,99533	Самка / Female	-0,21103	-----	-2,46075	Алтай / Altai
13	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	2,52556	Самка / Female	0,05228	-----	-2,91184	Алтай / Altai
14	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	2,41621	Самка / Female	-1,99212	-----	-0,71443	Алтай / Altai
15	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	2,69984	Самка / Female	0,49797	-----	-2,93831	Алтай / Altai
16	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	2,77963	Самка / Female	1,49382	-----	-1,20924	Алтай / Altai
17	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	3,96309	Самка / Female	0,19109	-----	-3,77517	Алтай / Altai
18	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	4,44039	Самка / Female	0,78604	-----	0,27383	Алтай / Altai
19	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	2,73504	Самка / Female	-0,37298	-----	-1,05538	Алтай / Altai
20	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	3,94507	Самка / Female	-0,46664	-----	-2,37941	Алтай / Altai
21	Алтай / Altai Mts.	Самка / Female	2,68725	Самка / Female	1,04890	-----	-2,21428	Алтай / Altai
22	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-4,77518	Самец / Male	3,55248	Алтай / Altai	0,72780	
23	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-2,98845	Самец / Male	0,92869	Алтай / Altai	-0,17129	
24	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-3,75905	Самец / Male	3,91747	Алтай / Altai	-0,38438	
25	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-2,85644	Самец / Male	1,41047	Алтай / Altai	-0,68649	
26	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-3,18655	Самец / Male	3,14715	Алтай / Altai	-1,17038	
27	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-3,22256	Самец / Male	2,46300	Алтай / Altai	-0,67506	
28	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-4,00447	Самец / Male	1,77646	Алтай / Altai	0,95245	
29	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-3,52016	Самец / Male	3,38074	Алтай / Altai	1,16863	
30	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-3,69311	Самец / Male	1,43179	Алтай / Altai	1,17761	
31	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-5,03755	Самец / Male	4,39837	Алтай / Altai	0,06662	
32	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-3,37589	Самец / Male	2,28129	Алтай / Altai	-0,11188	
33	Алтай / Altai Mts.	Самец / Male	-3,90987	Самец / Male	2,56533	Алтай / Altai	0,32566	
34	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец / Male	-2,60409	Самец / Male	-5,85093	ЦК / CKZ	0,99721	
35	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец / Male	-3,49286	Самец / Male	-4,59346	ЦК / CKZ	-0,35298	
36	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец / Male	-0,32320	Самец / Male	-4,47019	ЦК / CKZ	-0,09184	
37	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец / Male	-2,70444	Самец / Male	-4,10991	ЦК / CKZ	-0,61431	
38	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец / Male	-4,95857	Самец / Male	-6,83860	ЦК / CKZ	-1,03392	
39	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец / Male	-5,39342	Самец / Male	-4,23560	ЦК / CKZ	0,19054	
40	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец / Male	-3,90726	Самец / Male	-2,84739	ЦК / CKZ	1,44253	

Табл. 12. Применение дискриминантной функции, полученной для разделения обучающей выборки на 4 группы согласно их половой и популяционной принадлежности, к тестовой группе (n=28, пол не определен генетически): канонические значения дискриминантной функции по трем корневым векторам. Жирным шрифтом выделены расхождения в определении пола между классификационной формулой и текущим анализом, жирным курсивом – неправильно определенный регион происхождения по сравнению с полевыми данными. См. описание в тексте.

Table 12. Applying of DF calculated on training sample with sex and place of origin (4 groups in total) as a grouping variable to a test sample (n=28, sex is not determined genetically): canonical scores of discriminant function. Bold text marks discrepancy in sex ID between classification formula and current DA; bold italics text marks mistakes of the current DA in defining the place of nestling's origin comparing to the field data. See description in the text.

№	Регион, полевые данные Region, field data	Пол, класс. формула Sex, classif. formula	Root 1	Пол, ДА Sex, DA	Root 2	Регион, ДА Region, DA	Root 3	Регион, ДА Region, DA
41	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самка Female	4,56349	Самка Female	2,46271	-----	0,68718	ЦК / CKZ
42	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	??? (значение близкое к нулю)	1,02194	Самка Female	3,53580	-----	3,16488	ЦК / CKZ
43	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	0,23527	Самка Female	3,26962	-----	4,38741	ЦК / CKZ
44	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	1,68127	Самка Female	-3,38245	-----	1,01641	ЦК / CKZ
45	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	-1,64668	Самец Male	11,21308	Алтай Altai	1,96926	-----
46	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	3,21466	Самка Female	3,45327	-----	1,06913	ЦК / CKZ
47	Алтай / Altai Mts.	??? (значение близкое к нулю)	1,69297	Самка Female	0,03479	-----	-1,35962	Алтай Altai
48	Алтай / Altai Mts.	Самка Female	1,58263	Самка Female	-0,19655	-----	-1,24069	Алтай Altai
49	Алтай / Altai Mts.	Самка Female	3,20191	Самка Female	0,14188	-----	-2,35072	Алтай Altai
50	Алтай / Altai Mts.	Самка Female	2,83012	Самка Female	-0,32569	-----	-2,98479	Алтай Altai
51	Алтай / Altai Mts.	Самка Female	2,13482	Самка Female	1,75973	-----	-1,39578	Алтай Altai
52	Алтай / Altai Mts.	Самка Female	3,68605	Самка Female	-0,04339	-----	-2,43805	Алтай Altai
53	Алтай / Altai Mts.	Самка Female	6,37894	Самка Female	-1,44266	-----	-1,86952	Алтай Altai
54	Алтай / Altai Mts.	Самка Female	3,15754	Самка Female	-0,17613	-----	-1,07164	Алтай Altai
55	Алтай / Altai Mts.	Самец Male	-5,93323	Самец Male	3,96883	Алтай Altai	0,29369	-----
56	Алтай / Altai Mts.	Самец Male	-4,10761	Самец Male	0,13900	Алтай Altai	0,24405	-----
57	Алтай / Altai Mts.	Самец Male	-4,02705	Самец Male	2,09125	Алтай Altai	-2,30970	-----
58	Алтай / Altai Mts.	Самец Male	-2,83684	Самец Male	1,88567	Алтай Altai	-0,73911	-----
59	Алтай / Altai Mts.	Самец Male	-4,38052	Самец Male	2,02281	Алтай Altai	1,13206	-----
60	Алтай / Altai Mts.	Самец Male	-7,31528	Самец Male	10,41170	Алтай Altai	-1,71643	-----
61	Алтай / Altai Mts.	Самец Male	-2,59576	Самец Male	8,49239	Алтай Altai	-1,31807	-----
62	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	-3,62392	Самец Male	5,82035	Алтай Altai	0,43661	-----
63	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	-1,06570	Самец Male	7,47740	Алтай Altai	-0,45395	-----
64	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	1,33061	Самка Female	13,48064	-----	6,14355	ЦК / CKZ
65	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	-3,01657	Самец Male	-2,16699	КЗ / KZ	0,36447	-----
66	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	-3,84887	Самец Male	-6,31041	КЗ / KZ	1,35000	-----
67	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	-9,17318	Самец Male	7,02242	Алтай Altai	-0,64667	-----
68	Центральный Казахстан Central Kazakhstan	Самец Male	-5,80795	Самец Male	3,40741	Алтай Altai	0,06897	-----

Табл. 13. Определение пола птенцов степного орла из Западного Казахстана (n=14, пол не определён генетически, размерный класс – не известен) по классификационной формуле (5 переменных), рассчитанной для разделения обучающей выборки на 2 группы, согласно полу птенцов: канонические значения (значения больше нуля – самки, меньше нуля – самцы).

Table 13. Defining sex of nestlings originated from Western Kazakhstan (n=14, sex is not determined genetically, size class is unknown) by classification formula (5 variables) calculated on training sample of nestlings: canonical scores. Values above zero – females, below zero – males.

№	Регион, полевые данные Region, field data	Sf	Пол / Sex
69	Западный КЗ / Western KZ	-14.04	Самец / Male
70	Западный КЗ / Western KZ	-12.90	Самец / Male
71	Западный КЗ / Western KZ	-9.25	Самец / Male
72	Западный КЗ / Western KZ	-9.35	Самец / Male
73	Западный КЗ / Western KZ	-15.09	Самец / Male
74	Западный КЗ / Western KZ	-13.56	Самец / Male
75	Западный КЗ / Western KZ	-11.87	Самец / Male
76	Западный КЗ / Western KZ	6.25	Самка / Female
77	Западный КЗ / Western KZ	6.58	Самка / Female
78	Западный КЗ / Western KZ	-0.57	??? (значение близкое к нулю)
79	Западный КЗ / Western KZ	-0.46	??? (значение близкое к нулю)
80	Западный КЗ / Western KZ	6.90	Самка / Female
81	Западный КЗ / Western KZ	12.19	Самка / Female
82	Западный КЗ / Western KZ	-1.12	??? (значение близкое к нулю)

ло наличие 7 самцов и 4 самок в выборке из 14 орлов, ещё у трёх птиц пол не определён – значение классификационной функции оказалось близким к нулю (табл. 13). Применение метода разделения на 4 группы дало деление птиц по полу – 7 самцов и 7 самок. А также отнесло 5 самок к размерному классу птиц из Казахстана, а двух – к Алтайским, а самцов поделило в соотношении 3 крупных (группа Алтайских самцов) и 4 мелких (группа Казахстан) (табл. 14). Отображение канонических значений дискриминантной функции в виде графика показало, что фактически все птицы из западно-казахстанской популяции лежат внутри кластеров, полученных для ЦК и Алтая, лишь незначительно увеличивая зону перекрытия между кластерами за счёт одной самки, оказавшейся на границе между группами крупных и мелких самок (рис. 10). Это говорит о том, что в популяции действительно присутствуют два размерных класса, а анализ по совокупности морфометрических параметров позволяет отличать мелких самок от крупных самцов, как внутри одной популяции, так и между популяциями, с точностью выше 85 %.

Заключение

Дискриминантный анализ по обучающей выборке состоящей из 40 птенцов степного орла с генетически определённым полом показал, что на основе морфометрических данных возможно определять пол птенцов в возрасте 45–55 дней, даже в тех гнездовых группировках, в которых размножающиеся птицы представлены 2-мя размерными классами. Минимальным набором переменных, необходимым для достоверной классификации более 90 % выборки, являются следующие пять переменных: диаметр цевки (SHC), длина хвоста (DH), отношение длины клюва до восковицы к длине хвоста (DKV/DH), отношение длины клюва от ноздри к длине хвоста (DKN/DH) и отношение длины (разреза) рта к длине цевки (RR/DC). На основе дискриминантной функции была выведена классификационная формула, которая характеризует птенцов как самок при значениях больше нуля и как самцов при значениях меньше нуля. Ограничением формулы, с которым связаны все случаи ошибочной классификации, является то, что при близких к нулю значениях результат теряет свою надёжность.

При использовании 19 переменных (DKV, DKN, VK, SHC, DK, DH, VK/DK, DKV/DKN, RR/DK, DKN/DH, VK/SHC, SHC/DK, DKN/SHC, DKN/VK, DKV/SHC, VK/DH, RR/DH, DKN/DK, SHC/DH) удалось добиться более точного разделения по полу и размерному классу птиц: мелкие самки, крупные самки, мелкие самцы, крупные самцы, что крайне актуально для определения пола птиц в гнездовых группировках степных орлов в западной части гнездового ареала на пространстве от Волги до Алтая.

Птенцы степного орла из одного выводка с большой разницей в возрасте. Фото И. Карякина.

A brood of the Steppe Eagle in which nestlings with a large age difference. Photo by I. Karyakin.

Рис. 10. Применение результатов дискриминантного анализа (19 переменных) для разделения обучающей выборки на 4 группы, согласно полу и популяционной принадлежности, к объединённому множеству птенцов из Западного Казахстана (n=14, пол не определен генетически, размерный класс – не известен) и птенцов из Центрального Казахстана и Алтая из обучающей выборки (n=40): отображение канонических значений в пространстве трёх векторов. Синие круги – мелкие самки из Центрального Казахстана, красные квадраты – крупные самки с Алтая, зелёные ромбы – крупные самцы с Алтая, розовые треугольники – мелкие самцы из Центрального Казахстана, черные фигуры – птенцы из Западного Казахстана. См. пояснения в тексте. Расположение точек: (A) в плоскости 1 и 2 векторов (вектор 1 отделяет самцов от самок, вектор 2 отделяет самцов из Центрального Казахстана от самцов из Алтая); (B) в плоскости 1 и 3 векторов (вектор 1 отделяет самцов от самок, вектор 2 отделяет самок из Центрального Казахстана от самок из Алтая); (C) в плоскости 2 и 3 векторов – все 4 группы лежат отдельно.

Fig. 10. Applying of discriminant function (19 variables in the model) calculated on training sample with sex and place of origin (4 groups in total) as a grouping variable to a united set of samples of nestlings originated from Western Kazakhstan (n=14, sex is not determined genetically, size class is unknown) and training samples (n=40): scatterplot for canonical scores. Blue circles – small females from CKZ, red squares – big females from Altai, green rums – big males from Altai, purple triangles – small males from CKZ, black figures – nestlings from Western KZ. See description in the text. Positioning of points in the plane: (A) of roots 1 and 2 (root 1 separates males from females, root 2 separates males from CKZ from males from Altai); (B) of roots 1 and 3 (root 1 separates males from females, root 3 separates females from CKZ from females from Altai); (C) of roots 2 and 3 – all 4 groups are separated from each other.

Благодарности

Авторы благодарят Эльвиру Николенко, Евгения Ракина, Марину Алексеенко, Генриетту Пуликову и Романа Голяшова за помощь в полевых исследованиях. Особая благодарность АСБК и лично Вере Вороновой и Сергею Сляренко, за финансовую и организационную помощь в работе группы в Казахстане, Сайлюгемскому нацпарку за организационную помощь в работе на Алтае, а также ТНК «Казхром», Алтае-Саянскому отделению WWF, Фонду «Мир вокруг тебя» корпорации «Сибирское здоровье» и The Altai Project/Earth Island Institute за финансирование экспедиций.

Литература

Бабушкин М.В., Шербинин Д.Н., Турутина М.А. Предварительные результаты идентификации пола птенцов скопы (*Pandion haliaetus*) методами генетического анализа ДНК из крови. –

Табл. 14. Применение результатов дискриминантного анализа (19 переменных) для разделения обучающей выборки на 4 группы, согласно полу и популяционной принадлежности птенцов, к выборке птенцов из Западного Казахстана (n=14, пол не определен генетически, размерный класс – не известен): канонические значения, сравнение с результатами, полученными по классификационной формуле, определение размерного класса. См. описание в тексте.

Table 14. Applying of discriminant function (19 variables) calculated on training sample with sex and place of origin (4 groups in total) as a grouping variable to a sample of nestlings originated from Western Kazakhstan (n=14, sex is not determined genetically, size class is unknown): canonical scores, comparison with classification formula, prediction of size class. See description in the text.

№	Регион, полевые данные Region, field data	Пол, класс. формула Sex, classif. formula							Размерный класс Size class
			Root 1	Пол, ДА	Root 2	Регион, ДА	Root 3	Регион, ДА	
69	Западный КЗ Western KZ	Самец Male	-4,51130	Самец Male	6,26584	Алтай / Altai	0,35364	-----	Большой / Big
70	Западный КЗ Western KZ	Самец Male	-4,15095	Самец Male	3,88517	Алтай / Altai	0,77956	-----	Большой / Big
71	Западный КЗ Western KZ	Самец Male	-3,13706	Самец Male	0,66593	Алтай / Altai	-0,01639	-----	Большой / Big
72	Западный КЗ Western KZ	Самец Male	-3,94235	Самец Male	-4,88939	КЗ / KZ	0,72853	-----	Мелкий / Small
73	Западный КЗ Western KZ	Самец Male	-5,95491	Самец Male	-4,91790	КЗ / KZ	-1,84769	-----	Мелкий / Small
74	Западный КЗ Western KZ	Самец Male	-3,49512	Самец Male	-4,38597	КЗ / KZ	1,01530	-----	Мелкий / Small
75	Западный КЗ Western KZ	Самец Male	-3,29138	Самец Male	-2,78298	КЗ / KZ	0,83024	-----	Мелкий / Small
76	Западный КЗ Western KZ	Самка Female	2,45075	Самка Female	-0,30293	-----	-1,09401	Алтай / Altai	Большой / Big
77	Западный КЗ Western KZ	Самка Female	3,81736	Самка Female	0,42873	-----	-1,91047	Алтай / Altai	Большой / Big
78	Западный КЗ Western KZ	???	1,21169	Самка Female	2,31204	-----	-1,01307	Алтай / Altai	Большой / Big
79	Западный КЗ Western KZ	???	1,28152	Самка Female	1,69193	-----	-1,63930	Алтай / Altai	Большой / Big
80	Западный КЗ Western KZ	Самка Female	2,57054	Самка Female	-0,70410	-----	0,38592	КЗ / KZ	Мелкий / Small
81	Западный КЗ Western KZ	Самка Female	4,34331	Самка Female	0,99543	-----	4,75545	КЗ / KZ	Мелкий / Small
82	Западный КЗ Western KZ	???	0,70634	Самка Female	-0,75687	-----	-0,19107	Алтай / Altai	Большой / Big

Орлы Палеарктики: изучение и охрана – тезисы международной научно-практической конференции, Елабуга (Татарстан, Россия), 20–23 сентября 2013 г. / ред. А.А. Каюмов, И.В. Карякин, Э.Г. Николенко, Е.П. Шнайдер. Елабуга, 2013. С. 54. [Babushkin M.V., Sherbinin D.N., Turutina M.A. Preliminary Results of Identification of Sex of Osprey *Pandion haliaetus* Nestlings Using Genetic Analysis of DNA From Blood. – Eagles of Palearctic: Study and Conservation – Abstracts of the International Scientific and Practical Conference, Elabuga, Tatarstan Republic, Russia, 20–23 September 2013 / Eds. A.A. Kayumov, I.V. Karyakin, E.G. Nikolenko, E.P. Shnyder. Elabuga, 2013: 54]. URL: <http://irrcn.ru/ru/archives/19978> Дата обращения: 10.12.2017.

Бабушкин М.В., Шербинин Д.Н., Демина О.А. Половой состав выводков скопы в Дарвинском заповеднике и национальном парке «Русский Север». – Хищные птицы Северной Евразии. Проблемы и адаптации в современных условиях: материалы VII Международной конференции РГСС, г. Сочи, 19–24 сентября 2016 г. / Отв. ред. В.П. Белик. Ростов-на-Дону: изд. Южного федерального университета, 2016. С. 363–367. [Babushkin M.V., Sherbinin D.N., Demina O.A. The sex structure of the Osprey broods in the Darwin State Nature Reserve and the National Park "Russkiy Sever" (Russian North). – Birds of Prey in the Northern Eurasia: Problems and adaptations in current environment: Proceedings of the VII International Conference on Birds of Prey

and Owls of Northern Eurasia, Sochi, 19–24 September 2016 / Ed. V.P. Belik. Rostov-on-Don, 2016: 363–367. (in Russian). URL: <http://rrcn.ru/ru/archives/27385> Дата обращения: 10.12.2017.

Изучение миграций орлов в Волго-Уральском регионе в 2016–2017 годах. – Российская сеть изучения и охраны пернатых хищников. 2017. [Migration Study of Eagles in the Volga-Ural region in 2016–2017. – Russian Raptor Research and Conservation Network. 2017.]. URL: <http://rrcn.ru/migration/eagles2016> Дата обращения: 10.12.2017.

Карякин И.В. Пернатые хищники (методические рекомендации по изучению соколообразных и совообразных). Нижний Новгород, 2004. 351 с. [Karyakin I.V. Raptors (methods on the study of birds of prey and owls). Nizhny Novgorod, 2004: 1–351. (in Russian)]. URL: <http://rrcn.ru/ru/archives/11151> Дата обращения: 10.12.2017.

Карякин И.В. Методические рекомендации по организации мониторинга популяций степного орла в России и Казахстане. Новосибирск: Академическое издательство «Гео», 2012. 89 с. [Karyakin I.V. Methods on the organization of monitoring of the Steppe Eagle populations in Russia and Kazakhstan. Novosibirsk, 2012: 1–89 (in Russian).]. URL: <http://rrcn.ru/ru/archives/12822> Дата обращения: 10.12.2017.

Карякин И.В., Зиневич Л.С., Николенко Э.Г. Современное состояние популяции степного орла в Оренбургской области, Россия. – Пернатые хищники и их охрана. 2016а. № 33. С. 90–119. DOI: 10.19074/1814-8654-2016-33-90-119 [Karyakin I.V., Zinevich L.S., Nikolenko E.G. Modern Status of the Steppe Eagle Population in the Orenburg Region, Russia. – Raptors Conservation. 2016а. 33: 90–119. DOI: 10.19074/1814-8654-2016-33-90-119]. URL: <http://rrcn.ru/ru/archives/28162> Дата обращения: 12.12.2017.

Карякин И.В., Зиневич Л.С., Шепетов Д.М., Сорокина С.Ю. Популяционная структура ареала степного орла и предварительные данные по генетическому разнообразию его популяций и статусу подвидов. – Пернатые хищники и их охрана. 2016б. № 32. С. 67–88. DOI: 10.19074/1814-8654-2016-32-67-88. [Karyakin I.V., Zinevich L.S., Schepetov D.M., Sorokina S.Yu. Population Structure of the Steppe Eagle Range and Preliminary Data on the Population Genetic Diversity and Status of Subspecies. – Raptors Conservation. 2016б. 32: P. 67–88. DOI: 10.19074/1814-8654-2016-32-67-88]. URL: <http://rrcn.ru/ru/archives/26941> Дата обращения: 10.12.2017.

Карякин И.В., Коваленко А.В., Барашкова А.Н. Мониторинг гнездовых группировок степного орла в трансграничной зоне России и Казахстана в 2012 году. – Пернатые хищники и их охрана. 2013. № 26. С. 61–83. [Karyakin I.V., Kovalenko A.V., Barashkova A.N. Monitoring of the Steppe Eagle Populations in the Trans-Border

Zone of Russia and Kazakhstan in 2012. – Raptors Conservation. 2013. 26: 61–83]. URL: <http://rrcn.ru/ru/archives/19591> Дата обращения: 10.12.2017.

Мастеров В.Б., Романов М.С. Тихоокеанский орлан *Haliaeetus pelagicus*: экология, эволюция, охрана. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. 384 с. [Masterov V.B., Romanov M.S. The Steller's sea eagle *Haliaeetus pelagicus*: ecology, evolution, conservation. Moscow: KMK Scientific Press Ltd. 2014: 1–384 (in Russian with English summary).].

Нестеренко О.Н. Новый генетический метод определения пола птиц. – Орнитологические исследования в зоопарках и питомниках. М., 2003. С. 52–54. [Nesterenko O.N. A new genetic method of sex identification of birds. – Ornithological research in zoos and nurseries. Moscow, 2003: 52–54 (in Russian)]. URL: <http://earaza.ru/wp-content/uploads/ornit1.pdf> Дата обращения: 10.12.2017.

Спицын В.В., Богданович Г.Г., Вишневская Л.М., Остапенко В.А. Искусственная инкубация и выращивание хищных птиц в Московском зоопарке. – Первое всесоюзное совещание по проблемам зоокультуры. Тезисы докладов. Ч. 2. Москва, 1986. С. 255–258. [Spitsyn V.V., Bogdanovich G.G., Vishnevskaya L.M., Ostapenko V.A. Artificial incubation and cultivation of birds of prey in the Moscow Zoo. – The First All-Union Conference on Problems of Zooculture. Theses of reports. Part 2. Moscow, 1986: 255–258 (in Russian).].

Ellegren H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. – Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 1996. 263: 1635–1641. DOI: 10.1098/rspb.1996.0239 URL: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/263/1377/1635> Дата обращения: 10.12.2017.

Fridolfsson A., Ellegren H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. – Journal of Avian Biology. 1999. 30 (1): 116–121. DOI: 10.2307/3677252 URL: <http://www.jstor.org/stable/3677252> Дата обращения: 10.12.2017.

Griffiths R., Daan S., Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. – Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. 1996. 263: 1251–1256. DOI: 10.1098/rspb.1996.0184 URL: <http://rspb.royalsocietypublishing.org/content/263/1374/1251> Дата обращения: 10.12.2017.

Griffiths R., Double M.C., Orr K., Dawson R.J. A DNA test to sex most birds. – Molecular Ecology. 1998. 7: 1071–1075.

StatSoft, Inc. Электронный учебник по статистике. Москва: StatSoft, 2012. URL: <http://www.statsoft.ru/home/textbook/default.htm> [StatSoft, Inc. Electronic Statistics Textbook. Tulsa, Moscow: StatSoft, 2012. URL: <http://www.statsoft.ru/home/textbook/default.htm> (in Russian).]. Дата обращения: 20.12.2017.