

На правах рукописи

Вишневская Мария Сергеевна

**Систематика и видовая диагностика мономорфных бабочек-голубянок
подрода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) на основе анализа
молекулярных маркеров**

03.02.05 – энтомология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Научный руководитель: **Лухтанов Владимир Александрович**,
доктор биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Горбунов Олег Григорьевич**,
доктор биологических наук,
Институт проблем экологии и эволюции
имени А.Н. Северцова Российской академии
наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории почвенной зоологии и общей
энтомологии

Аникин Василий Викторович,
доктор биологических наук, профессор,
Саратовский национальный
исследовательский государственный
университет имени Н.Г. Чернышевского,
профессор кафедры морфологии и экологии
животных

Ведущая организация: Институт систематики и экологии животных
СО РАН, Новосибирск

Защита состоится «__» _____ 2018 г. в __ часов __ минут на заседании диссертационного совета Д 002.223.01, созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Зоологический институт Российской академии наук по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, д. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Зоологического института РАН, <https://www.zin.ru/boards/00222301/theses.html>

Автореферат разослан «__» _____ 2018 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Овчинникова Ольга Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Подрод *Agrodiaetus* является обособленной монофилетической линией в роде *Polyommatus*, входящем в семейство бабочек-голубянок (Lycaenidae). Бабочки подрода небольшого размера, в размахе крыльев от 1.9 до 3.6 см. По окраске крыльев представители подрода могут быть диморфными (у самок крылья коричневые, у самцов – синие, оранжевые или серые) или мономорфными (крылья самцов и самок окрашены одинаково в коричневый цвет). Апоморфией подрода *Agrodiaetus* является наличие белой продольной полосы на исподе заднего крыла, хотя есть виды, у которых полоса вторично редуцирована или отсутствует (Eckweiler, Vozano, 2016). Подрод широко распространён в Западной Палеарктике (Kandul et al., 2007) и насчитывает 120 видов (Eckweiler, Vozano, 2016).

Подрод *Agrodiaetus* всегда привлекал внимание исследователей-систематиков (например, de Lesse, 1960; Häuser, Eckweiler, 1997; Carbonell, 2000, 2001; ten Hagen, Eckweiler, 2001; Schurian, ten Hagen, 2003; Lukhtanov, Dantchenko, 2002; Kandul et al., 2002, 2004, 2007; Wiemers, 2003; Vila et al., 2010; Talavera et al., 2013a; Eckweiler, Vozano, 2016). Однако его нельзя назвать хорошо изученным в силу наличия морфологически схожих таксонов, определение которых затруднительно. Эти таксоны практически не различаются по окраске и рисунку крыла (Eckweiler, Vozano, 2016), и по строению гениталий самцов (Coutsis, 1985, 1986).

Для решения проблем делимитации видов *Agrodiaetus* широко используются хромосомные (de Lesse, 1960; Lukhtanov, 1989) и молекулярные маркеры (Wiemers, 2003; Kandul et al., 2004, 2007; Lukhtanov et al., 2005; Stradomsky, Fomina, 2013), а также их комбинация (Lukhtanov et al., 2014, 2015; Lukhtanov, Tikhonov, 2015; Shapoval, Lukhtanov, 2015; Vila et al., 2010). Использование хромосомных маркеров считается эффективным, так как кариотипы большинства видов специфичны (гаплоидное число хромосом в пределах подрода варьирует от $n = 10$ у *P. caeruleus* до $n = 134$ у *P. shahrami* (Lukhtanov, Dantchenko, 2002; Lukhtanov et al., 2005)).

На основе молекулярных исследований было установлено, что подрод *Agrodiaetus* состоит из двенадцати клад (Kandul et al., 2002, 2004, 2007; Wiemers, 2003). Особый интерес представляют две клады, объединяющие виды, близкие к (1) *P. admetus* и к (2) *P. dolus*. На филогенетических реконструкциях эти клады образуют монофилетическую линию – «*Polyommatus admetus*». В этой линии сосредоточены почти все мономорфные виды подрода, которые представляют особую сложность в идентификации. Представители клады *admetus* и мономорфные представители клады *dolus* объединяются в так называемый комплекс мономорфных видов подрода *Agrodiaetus*. Большинство из них имеют локальные ареалы, сконцентрированные на Пиренейском полуострове, Балканском полуострове, в Передней и Средней Азии, и на Кавказе.

Представители мономорфного комплекса в основном изучены с территории Западной Европы. Гораздо менее изученными остаются представители комплекса,

обитающие восточнее: на Балканском полуострове и в Передней Азии. Особенно это касается исследований, основанных на применении молекулярных данных.

Степень разработанности. На данный момент известно немного публикаций, содержащих данные о нуклеотидных последовательностях гена *COI* и некодирующего спейсера *ITS2* для некоторых таксонов, обитающих на территории Балканского полуострова и Передней Азии (Wiemers, 2003; Wiemers et al., 2007, 2009, 2010; Dincă et al., 2013; Lukhtanov et al., 2009, 2015a; Vila et al., 2010; Przybyłowicz et al., 2014). Этих данных недостаточно для решения имеющихся в группе таксономических проблем, так как для большинства таксонов, обитающих на этих территориях, данные молекулярных исследований отсутствуют.

Цель и задачи исследования. Целью работы было исследование морфологического, хромосомного и молекулярного разнообразия в комплексе мономорфных видов голубянок *P. admetus* с территории Балканского полуострова, Ирана и Азербайджана, таксономическая интерпретация полученных данных и изучение возможности видовой идентификации с помощью морфологических признаков, а также хромосомных и молекулярных маркеров.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) изучение разнообразия крылового рисунка и выявление тех его элементов, которые можно потенциально использовать для делимитации видов и популяций;
- 2) анализ всех имеющихся в литературе данных по кариотипам, картирование хромосомных данных на молекулярные деревья и анализ того, насколько кластеры особей, выделяемых по кариотипам, конгруэнтны кластерам, выделяемым на основании молекулярных маркеров;
- 3) получение и анализ молекулярных данных; выявление митохондриальных гаплогрупп и молекулярных эволюционных линий в пределах комплекса, анализ родственных связей между популяциями, хромосомными расами и видами, основанный на методах молекулярной филогенетики;
- 4) тестирование гипотезы о том, что симпатрично обитающие хромосомные расы представляют собой репродуктивно изолированные биологические виды;
- 5) таксономическая интерпретация обнаруженного морфологического, хромосомного и молекулярного разнообразия в рамках концепций биологического и филогенетического вида;
- б) оценка применимости ДНК-баркодов для видовой диагностики.

Научная новизна. Впервые детально изучена фауна комплекса мономорфных видов подрода *Agrodiaetus* Балканского полуострова, Ирана и Азербайджана. Впервые получены нуклеотидные последовательности по участку гена *COI* и ядерному маркеру *ITS2* для таксонов подрода *Agrodiaetus*, обитающих на территории Балканского полуострова, Азербайджана и Ирана. Эти данные позволили реконструировать филогенетические отношения в группе *Polyommatus (Agrodiaetus) admetus*. При помощи анализа молекулярных и цитогенетических маркеров обнаружены виды-двойники: *P. pseudorjabovi*/*P. rjabovianus*/*P. valiabadi*,

P. timfristos/P. aroaniensis и *P. admetus/P. yeranyani*. Уточнены ареалы некоторых таксонов и описаны два новых для науки вида и один подвид. Впервые особенности окраски крыльев представлены в виде семи типов, соответствующих определённым таксонам *Agrodiaetus*.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты, полученные в ходе работы, вносят вклад в изучение систематики, филогении и распространения представителей комплекса *Polyommatus admetus*. Полученные молекулярные данные значительно дополняют накопленные ранее данные по нуклеотидным последовательностям участка гена *COI*, а также ядерной некодирующей последовательности *ITS2*. Эти данные, а также данные по кариотипам, картированные на полученную филогению комплекса, могут быть впоследствии использованы для разработки системы всего семейства *Lycaenidae*. Бабочки подрода *Agrodiaetus* являются модельным объектом в исследованиях по изучению механизмов видообразования и разработки методов изучения биологического разнообразия, поэтому изучение таксономии группы опосредованно может быть полезным для решения общих вопросов эволюционной биологии. Разработанные с использованием этой группы методы делимитации видов, в частности с использованием молекулярных и цитогенетических маркеров, могут быть использованы как прототипы для анализа биологического разнообразия других групп животных и растений. Некоторые виды подрода *Agrodiaetus* имеют точечные ареалы, и потенциально являются объектами охраны. Материалы работы могут быть также использованы в образовательных курсах на кафедрах энтомологии и зоологии беспозвоночных различных вузов.

Методология и методы исследования. Для осуществления поставленных задач были использованы современные методы молекулярной биологии, такие как выделение ДНК, ПЦР со специфичными праймерами по фрагменту гена *COI* и спейсера *ITS2*, очистка проб для секвенирования, и секвенирование. Для филогенетического анализа полученных последовательностей были использованы специальные программы, позволяющие производить выравнивание последовательностей, построение филогенетических деревьев и сетей.

Положения, выносимые на защиту:

- 1) Морфологические признаки не могут быть использованы для диагностики таксонов (за исключением *P. admetus*), так как их состояния либо одинаковы у разных видов, либо не фиксированы внутри видов.
- 2) Несмотря на большое значение признаков кариотипа в систематике группы, хромосомные числа не являются универсальным признаком для дифференциации видов, так как одинаковые хромосомные числа могут либо возникать независимо в разных группах, либо быть симплезиоморфиями.
- 3) Несмотря на слабый уровень дифференциации, ДНК-баркоды пригодны для видовой диагностики в комплексе *Polyommatus admetus*.

4) *Polyommatus valiabadi* sensu auctorum является триплетом видов, состоящим из *P. rjabovianus*, *P. pseudorjabovi* и *P. valiabadi* sensu stricto. Эти виды в значительной степени различаются по хромосомным числам и ДНК-баркодам.

5) *Polyommatus admetus* sensu auctorum является сборным видом. Он представлен *P. admetus* sensu stricto, обитающим на территории Европы и Турции, и *P. yeranyani*, обитающим на территории Армении и Азербайджана.

Апробация результатов. Результаты работы были представлены на восьми конференциях, шесть из которых являются международными: 12-я Международная Пущинская школа-конференция молодых учёных «Биология – наука 21 века», Россия, Москва, Пущино, 10-14 ноября 2008; Международная конференция «Кариосистематика беспозвоночных животных KARYO V», Россия, Новосибирск, 16-20 августа 2010; 14 съезд Русского энтомологического общества, Россия, Санкт-Петербург, 27 августа – 1 сентября 2012; 7th International Conference on the Biology of Butterflies, Finland, Turku, 11-14 August 2014; Международная конференция «Хромосома 2015», Россия, Новосибирск, 24-28 августа 2015; VI международная конференция по кариосистематике беспозвоночных животных, Россия, Саратов, 27-30 августа 2016; Всероссийская конференция «50 лет ВОГиС: успехи и перспективы», Россия, Москва, 8-10 ноября 2016; 15 съезд Русского энтомологического общества, Россия, Новосибирск, 31 июля – 7 августа 2017; а также результаты были представлены в виде короткого сообщения на практическом курсе по R-программированию в Испании в 2015 году: “The use of Phylogenies in the Study of Macroevolution”, Spain, Barcelona, 28 September-2 October 2015.

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 4 статьях, из которых три в изданиях, рекомендованных ВАК. Всего по материалам диссертации опубликовано 12 печатных работ.

Структура и объём работы. Работа состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка литературы и 2 приложений. Основная часть изложена на 129 страницах и содержит 7 таблиц и 24 рисунка. Список литературы включает 149 наименований, из которых 9 на русском языке и 140 на других языках. Приложения содержат дополнительные филогенетические реконструкции (6 иллюстраций) и видовые описания (с одной иллюстрацией). Общий объём диссертации с приложениями 144 страницы.

Личный вклад автора. Автор диссертационного исследования принимал активное участие во всех этапах изучения комплекса мономорфных видов на протяжении 10 лет: организация и сбор полевого материала в Алтайском крае; проведение лабораторных экспериментов (в т.ч. подбор подходящей методики выделения ДНК, разработка специфичных праймеров); обработка полученных сиквенсов; построение всех филогенетических реконструкций и медианных сетей; анализ полученных реконструкций и сетей; поиск и анализ всех литературных данных по хромосомным числам исследуемой группы; представлении результатов

на конференциях; написание и публикация статей и монографии; подготовка рукописи диссертации.

Благодарности. Я искренне благодарна моему научному руководителю В.А. Лухтанову за руководство проектом, ценные советы в выполнении работы и за предоставленный материал, а также А.Ф. Сайфитдиновой за помощь в освоении методов молекулярной биологии и руководство проектом в лаборатории. Я благодарна сотрудникам РЦ «Хромас», на базе которого проводилось исследование: А.В. Радаеву, И.В. Егияну, М.Д. Воронцову, М.Р. Кулешину и сотрудникам лаборатории «Структуры и функции хромосом» – Е.Р. Гагинской, С.А. Галкиной, Е.И. Кошель, А.Г. Дёмину – за помощь в вопросах филогенетики. Хочу поблагодарить А.П. Галкина – заведующего лабораторией генетики животных СПбГУ, где проходили первые этапы экспериментальной части исследования, за предоставленную возможность работы, и А.Э. Машарского и РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий» за подготовленные сиквенсы. Отдельно хочу поблагодарить А.В. Данченко, Н.А. Шаповала, Е.А. Паженкову, С.В. Недошивину и А.В. Барабанова – за собранный материал. В заключении, я хочу поблагодарить моего мужа – Пантелеева Юрия Юрьевича – за моральную поддержку на протяжении всей подготовки диссертационного исследования.

Исследования проводились при финансовой поддержке со стороны Российского фонда фундаментальных исследований (гранты РФФИ 18-04-00263а и РФФИ 15-29-02533_офи_м) и Российского научного фонда (грант РНФ 14-14-00541).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1 История изучения комплекса мономорфных видов из линии *Polyommatus admetus*

1.1 Изучение комплекса, основанное на анализе морфологии бабочек

С конца 18 века и до середины 20 на основе изучения морфологических признаков из комплекса мономорфных видов было описано всего три вида: *P. admetus* (Esper, 1783), *P. ripartii* (Freyer, 1830) и *P. rjabovi* (Forster, 1960).

1.2 Изучение комплекса, основанное на исследовании хромосом

В середине 20 века французский исследователь де Лесс открыл существенные различия в хромосомных числах у представителей подрода (de Lesse, 1960). Де Лесс показал, что мономорфный комплекс состоит из дифференцированных хромосомных рас и установил, что хромосомные расы могут существовать в симпатрии и не смешиваться. Де Лесс выдвинул гипотезу о том, что каждая хромосомная раса является самостоятельным видом. Работы де Лесса оказали сильное влияние на дальнейшее развитие исследований группы. Начали появляться работы других авторов, которые также описывали новые виды

на основе анализа кариотипов (Brown, Coutsis, 1978; Lukhtanov, 1989; Coutsis, De Prins, 2007; Vila et al., 2010; Vishnevskaya et al., 2016). В подроде *Agrodiaetus* число хромосом обычно стабильно внутри видов и дифференцировано между видами, представляя надёжный признак для делимитации видов (de Lesse 1960a,b; Lukhtanov, Dantchenko, 2002a,b). Тем не менее, существуют исключения, когда кариологические данные не демонстрируют достаточной разрешающей способности для разделения видов.

1.3 Изучение комплекса, основанное на исследовании молекулярных маркеров

Изучению комплекса мономорфных видов на основе анализа молекулярных маркеров посвящено порядка 11 работ (Kandul et al., 2004, 2007; Wiemers, 2003; Lukhtanov et al., 2005, Lukhtanov et al., 2006; Dincă et al., 2013, 2017; Vershinina, Lukhtanov, 2010; Vodolazhsky et al., 2011; Przybyłowicz et al., 2014; Lovrenčić et al., 2016). Практически все работы включают анализ либо несколько маркеров (ядерные и митохондриальные), либо анализ маркеров молекулярных вместе с маркерами цитогенетическими (хромосомные числа). Эти работы направлены на изучение западноевропейской фауны. В то же время остаётся неохваченной фауна Балканского полуострова и Передней Азии.

1.4 Видовая диагностика при помощи митохондриальных ДНК-баркодов

Предложенный в 2003 году Полом Эбером метод видовой идентификации при помощи коротких фрагментов митохондриального гена цитохром оксидазы I (*COI*) (Hebert, 2003), встретил критику среди учёных (Will, Rubinoff, 2004; Ebach, Holdrege, 2005; Wiemers, Fiedler, 2007). Среди аргументов были такие, как вероятность ложноположительных или ложноотрицательных результатов, использование только одного маркера, отсутствие так называемого баркодинг-гэпа у ряда представителей *Agrodiaetus*. Тем не менее, метод широко используется для видовой диагностики (Vila et al., 2010; Dincă et al., 2015; Lukhtanov et al., 2016). В большинстве исследований метод применяется как дополнительный инструмент наряду с анализом данных по другим признакам.

Глава 2 Материал и методы

2.1 Материал

Для исследования был использован коллекционный материал, который хранится в отделении Кариосистематики Зоологического института РАН. Материал специально собирался и хранился так, чтобы его можно было использовать для молекулярного анализа. Коллекция содержит сборы из Ирана и Азербайджана за период с 2002 по 2007 год, из России (Алтайский край, Западный Алтай) за 2007 год (Лухтанов и др., 2007; Волынкин и др., 2011), из Греции и Болгарии за 2008 год и из Болгарии (Хвойна) за 2016 год. Исследованный коллекционный материал содержит сборы из типовых мест обитания изученных таксонов.

2.2 Методы

2.2.1 Анализ крылового рисунка

Крылья балканских особей были отсканированы на сканере Epson Perfection 4870 photo, а крылья бабочек из Передней Азии были сфотографированы с помощью камеры Nikon D600. На основе морфологического анализа были выделены типы крыловых рисунков, которые затем были картированы на филогенетическую схему.

2.2.2 Анализ кариотипов

Были использованы все доступные литературные данные по видам линии *Polyommatus admetus*, включая наши собственные опубликованные данные (Lukhtanov et al., 2015a, Vishnevskaya et al. 2016). Хромосомные числа для всех видов комплекса были картированы на построенные филогенетические деревья и медианную сеть для проведения сравнительного анализа.

2.2.3 Пробоподготовка

Выделение ДНК производилось методом фенол-хлороформной экстракции в соответствии со стандартным протоколом (Sambrook, Russel, 2006). Для **амплификации** фрагмента гена *COI* (длиной 657 п.н.) и спейсера *ITS2* (длиной около 440 п.н.) были использованы специфичные праймеры, разработанные специально для данного исследования. **Визуализация результатов** выделения ДНК и ПЦР проводилась при помощи гель-электрофореза. Для **подготовки образцов к секвенированию** использовали методику очистки ДНК из геля на магнитных частицах, покрытых SiO₂ в соответствии с протоколом производителя (www.sileks.com). Все эксперименты по подготовке ДНК к секвенированию проводились на базе РЦ «Хромас» Научный парк, СПбГУ и «Лаборатории генетики животных» Биологического факультета СПбГУ. Секвенирование проводилось в РЦ «Развитие молекулярных и клеточных технологий».

Всего нами было получено 155 новых сиквенсов – 78 по гену *COI* и 77 по спейсеру *ITS2*.

2.2.3 Филогенетический анализ

Для филогенетического анализа были использованы собственные данные и литературные (последовательности из открытой базы данных ГенБанк www.ncbi.nlm.nih.gov). Выравнивание осуществляли при помощи ПО BioEdit v7.2.5. (Hall, 1999) и Chromas v2.6.5 (Technelysium Pty Ltd). Итоговое выравнивание по гену *COI* содержало 221 сиквенс, по спейсеру *ITS2* – 117 сиквенсов. Для усиления филогенетического сигнала в части анализов сиквенсы *COI* и *ITS2* были объединены. Общая длина полученного конкатенированного выравнивания составляла 1039 п.н. Филогенетические реконструкции были построены методами максимального правдоподобия (ML), максимальной парсимонии (MP) (ПО MEGA v6.0 (Tamura et al., 2013)) и Байеса (BI) (ПО MrBayes v3.2 (Ronquist et al., 2012)). Изменение формата выравнивания для работы в программе MrBayes 3.2 проводилось при помощи программы Mesquite (Maddison, Maddison, 2017). Для определения оптимальной модели нуклеотидных замен для ML использовали программу jModelTest (Posada, 2008). На базе маркера

COI была также построена медианная сеть с использованием ПО Network v4.6.1.3 (Fluxus Technology, fluxus-engineering.com).

Глава 3 Морфология имаго: типы крылового рисунка

Традиционными признаками при описании видов бабочек являются окраска крыльев, крыловой рисунок и структура генитального аппарата самцов. В исследуемой группе чешуекрылых строение генитального аппарата практически идентично у разных видов (Coutsis, 1986), а одной из основных особенностей является сходная коричневая окраска верхней стороны крыльев. Что касается испода крыльев, то между таксонами и популяциями существуют небольшие различия, которые позволили выделить семь типов крылового рисунка (рис. 1).

(1) Тип *Polyommatus ripartii*: испод заднего крыла с хорошо развитой белой продольной полосой, пятна небольшие или среднего размера, маргинальный рисунок редуцирован. Характерен для *P. orphicus orphicus*, *P. orphicus eleniae*, *P. nephohiptamenos*, *P. ripartii pelopi* и *P. timfristos*.

(2) Тип *Polyommatus valiabadi*: испод заднего крыла с хорошо развитой белой продольной полосой, пятна крупные и яркие, маргинальный рисунок присутствует. Характерен для *P. valiabadi*, *P. rjabovianus* и *P. pseudorjabovi*.

(3) Тип *Polyommatus admetus*: на исподе заднего крыла отсутствует белая продольная полоса, пятна небольшие или среднего размера, маргинальный рисунок очень чёткий. Характерен для *P. admetus*.

(4) Тип *Polyommatus nephohiptamenos*: белая полоса на исподе заднего крыла явная и очень широкая, состоит из основной полосы и дополнительного короткого штриха между постдискальной и субмаргинальной областью крыла, сразу под основной полосой; пятна небольшие или среднего размера, маргинальный рисунок редуцирован. Характерен для *P. nephohiptamenos*, *P. ripartii*, *P. orphicus orphicus* и *P. timfristos*.

(5) Тип *Polyommatus humedasaе*: на исподе заднего крыла белой полосы нет, пятна небольшие или среднего размера, маргинальный рисунок редуцирован, бледный. Характерен для *P. aroaniensis*, *P. timfristos*, *P. orphicus*, *P. ripartii* из Западной Европы (но не с Балканского полуострова).

(6) Тип *Polyommatus aroaniensis*: белая полоса на исподе заднего крыла в разной степени редуцирована, пятна небольшие или среднего размера, маргинальный рисунок редуцирован. Характерен для *P. aroaniensis*, *P. timfristos*, *P. orphicus orphicus*, *P. orphicus eleniae*, *P. ripartii* из Крыма.

(7) Тип *Polyommatus orphicus*: на исподе переднего крыла присутствует белый постдискальный штрих, расположенный между дискальным пятном и субмаргинальным рисунком, белая продольная полоса на исподе заднего крыла заметная, часто с дополнительным маленьким штришком. Характерен для *P. orphicus orphicus*, но, основная особенность этого типа – белый постдискальный штрих на переднем крыле – может быть встречен у *P. aroaniensis* и *P. nephohiptamenos*.

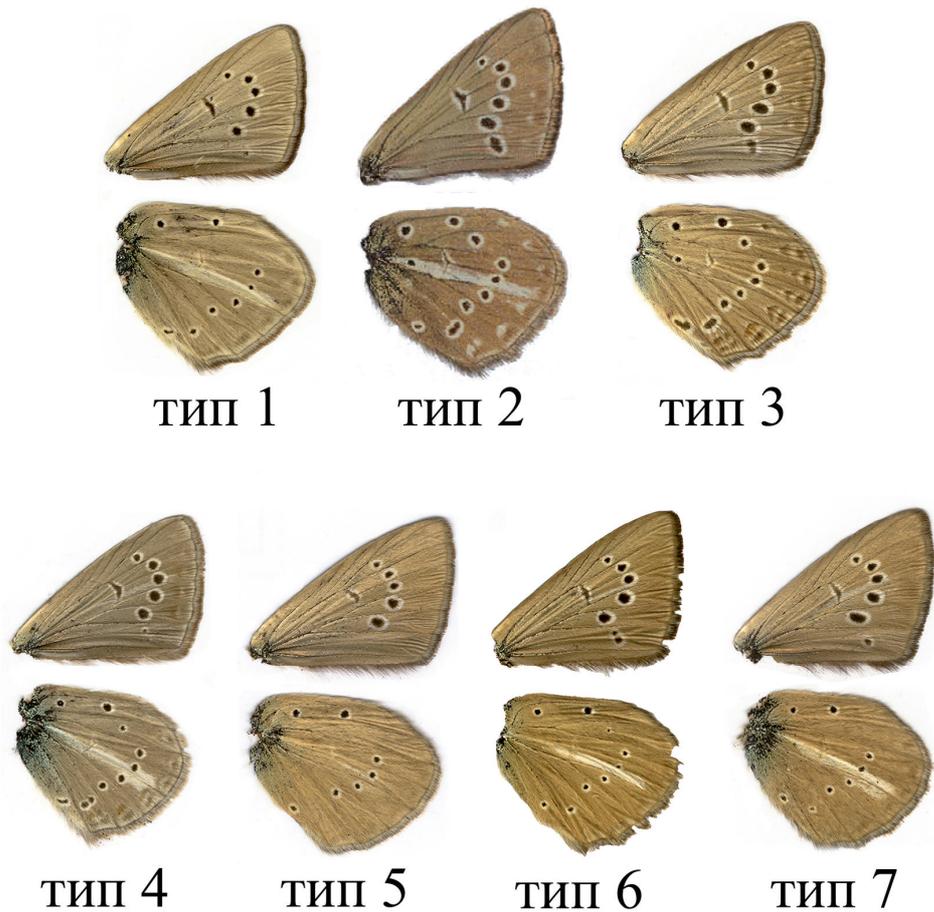


Рисунок 1. Типы крылового рисунка представителей мономорфного комплекса видов линии *Polyommatus admetus*.

Глава 4 Анализ хромосомного разнообразия

Подавляющее большинство изученных видов семейства Lycaenidae имеет стабильное хромосомное число, в гаплоидном наборе равное $n=23-24$ (de Lesse, 1960b; Lorković, 1990). Особенностью представителей подрода *Agrodiaetus* является чрезвычайно высокий уровень межвидовых различий в хромосомных числах (Lukhtanov et al., 2005). На основе этих различий в разное время были выдвинуты различные таксономические гипотезы и описаны новые виды (например: de Lesse 1960a,b; Brown, Coutsis, 1978; Lukhtanov, 1989; Coutsis, De Prins, 2007; Vila et al., 2010; Vishnevskaya et al., 2016). На основе подробного исследования всех имеющихся литературных данных по кариотипам представителей подрода *Agrodiaetus*, нам удалось выяснить, что представителям комплекса мономорфных видов соответствуют следующие хромосомные числа в гаплоидном наборе:

P. admetus $n=80$, *P. yeranyani* $n=79$, *P. ripartii* $n=90$, *P. fabressei* $n=90$, *P. violetae* $n=90$, *P. nephohiptamenos* $n=90$, *P. demavendi* $n=67-74$, *P. aroaniensis* $n=47$, *P. humedasmae* $n=39$, *P. alcestis* $n=20-21$, *P. karacetinae* $n=19$, *P. eriwanensis* $n=32-34$, *P. interjectus* $n=29-32$, *P. dantchenkoi* $n=40-42$, *P. orphicus orphicus* и *P. orphicus*

eleniae n=41-42, *P. timfristos* sp. n. n=38, *P. khorasanensis* n=84, *P. pseudorjabovi* sp. n. n=79, *P. rjabovianus rjabovianus* n=49, *P. rjabovianus masul* n=43, *P. valiabadi* n=23.

Глава 5 Анализ молекулярных маркеров

5.1 Анализ филогенетических реконструкций

В результате анализа фрагмента *COI* длиной 657 п.н. с использованием методов ВІ (рис. 2), МL и МР мы получили филограммы с высокими значениями постериорной вероятности (для метода ВІ) и бутстреп-поддержек (для методов МL и МР) для большинства клад. На реконструкции чётко выделяются две клады – *P. admetus* и *P. dolus*, что соответствует литературным данным (Wiemers 2003; Kandul et al. 2004, 2007; Lukhtanov et al. 2005, 2015; Vila et al. 2010, Dincă et al., 2013).

В кладе *P. admetus* вид *P. ripartii* появляется в качестве полифилетической группы, образованной четырьмя кладами: «балканской» (образцы *P. ripartii pelopi* из Греции и Болгарии), «западноевропейской» (*P. ripartii ripartii* из Франции, Италии и Испании), «евроазиатской» (*P. ripartii ripartii* с ареалом от Испании до Монголии), а также «переднеазиатской» (*P. ripartii paralcestis* из Армении и Турции). Последняя кладка на дереве располагается как сестринская по отношению к виду *P. demavendi*. С высокой поддержкой *P. admetus* образует две независимые кладки: в одну входят бабочки из Европы и Западной Турции, в другую – из Восточной Турции и Кавказа. *P. nephohiptamenos* появляется на Байесовом дереве обособленно, но не формирует монофилетическую группу. Образцы, из Азербайджана, определенные в поле как *P. rjabovianus*, на дереве образовывали два отдельных кластера: один в кладе *P. dolus* – *P. rjabovianus*, и один в кладе *P. admetus* – *P. pseudorjabovi* sp.n. Последний образует монофилетическую кладку с высокой поддержкой на всех деревьях.

В кладе *P. dolus* вид *P. aroaniensis* образует монофилетическую линию отдельно от вида *P. timfristos*, который также образует монофилетическую линию. Образцы *P. orphicus orphicus* и *P. orphicus eleniae* расположены на дереве рядом, но не образуют одну кладку. Что касается образцов, определённых, как *P. rjabovianus* и попавших в кладку *P. dolus*, то на всех деревьях (ВІ, МL и МР) они с высокой поддержкой образовывали монофилетическую линию. Образцы, собранные рядом с городом Масуле в Иране, образовывали монофилетическую кладку внутри *P. rjabovianus*. Четыре образца *P. valiabadi*, собранные в северном Иране, образовывали монофилетическую линию, сестринскую к *P. rjabovianus*.

Ядерный маркер *ITS2* продемонстрировал низкую межвидовую изменчивость. Поэтому данные по фрагментам маркеров *COI* и *ITS2* были объединены для построения конкатенированного дерева. Для этого использовали 75 образцов, для которых известны последовательности по обоим маркерам. Общая длина объединённого выравнивания составила 1039 п. н. Байесово дерево, построенное на основе конкатенированных последовательностей, имело такую же топологию, что и дерево, построенное по маркеру *COI*, однако, некоторые кладки имели более высокие значения поддержки, а *P. orphicus orphicus* + *P. orphicus*

Глава 6 Видовая идентификация, делимитация видов и классификация группы

6.1 Картирование морфологических данных на молекулярную филогению

Данные по типам окраски крыльев были картированы на филогенетическую схему, построенную методом BI. Мы обнаружили, что только один тип рисунка является видоспецифичным: это тип 3, характерный для *P. admetus*. Остальные типы рисунка крыльев были характерны для двух и более таксонов. Тип 2 соответствовал кластеру *P. valiabadi* + *P. rjabovianus*, а также *P. pseudorjabovi*. Этот тип рисунка не характерен для европейских бабочек. Тип 6 характерен для видов *P. humedasaе*, *P. timfristos*, *P. aroaniensis* и *P. orphicus*. На конкатенированном дереве со средней поддержкой эти виды образуют общую кладу. Остальные типы рисунка встречаются у представителей таксонов даже разных клад. Самыми распространёнными типами крылового рисунка являются типы 1 и 4. Таким образом, признаки крылового рисунка недостаточны для делимитации видов внутри изучаемого комплекса мономорфных видов линии *Polyommatus admetus*.

6.2 Картирование хромосомных данных на молекулярную филогению

Данные по хромосомным числам были картированы на филогенетические деревья, построенные методами BI, MP и ML, а также на медианную сеть и на конкатенированное дерево. Практически все хромосомные кластеры соответствовали молекулярным кластерам. Однако были исключения. Некоторым молекулярным кластерам, представляющим виды, различающиеся по морфологии и по фрагменту гена *COI*, соответствовали одинаковые хромосомные числа. Например, таксоны *P. fabressei*, *P. violetae*, *P. nephohiptamenos* и *P. ripartii* имеют одинаковое хромосомное число $n=90$. Виды *P. fabressei* и *P. violetae* входят в состав клады *P. dolus*, в то время как *P. nephohiptamenos* и *P. ripartii* относятся к кладе *P. admetus*. Внутри клад данные пары видов также не образуют монофилетических групп. Другой пример – таксоны *P. pseudorjabovi* и *P. yeranyani*, для которых известно хромосомное число, равное $n=79$. Таксоны при этом не образуют монофилетическую группу ни на одном из деревьев, но образуют самостоятельные монофилетические несестринские клады. Ещё один пример – таксоны *P. orphicus* и *P. dantchenkoi*, которые также имеют одинаковые хромосомные числа, но вместе не образуют монофилетическую группу ни на одном дереве. Таким образом, анализ кариотипов не всегда достаточен для идентификации видов. Ещё одним подтверждением этого вывода может служить наличие таксонов, отличающихся в значениях хромосомных чисел всего на единицу (например, *P. humedasaе* и *P. timphristos*, *P. menalcas* и *P. khorasanensis*, *P. alcestis* и *P. karacetinae*, *P. admetus* и *P. yeranyani*), при этом имеющих значительные различия в исследуемом фрагменте гена *COI*.

Одинаковые хромосомные числа могут быть результатом разных эволюционных событий. Это может быть следствием параллелизма (как это,

скорее всего, было у неродственных видов *P. fabressei* и *P. ripartii*), или это может быть следствием наследования признака от общего предка (как это, скорее всего, было в случае *P. ripartii* и *P. nephohiptamenos*). Нам не всегда удаётся отличить параллелизм от гомологии. Независимо от этого, приведенные примеры говорят о том, что в исследуемой группе хромосомные числа не обладают достаточной разрешающей способностью для делимитации таксонов.

6.3. Видоспецифичность фрагмента *COI*

Изученные таксоны демонстрировали относительно низкий уровень межвидовой дифференциации по гену *COI*. Для 73 пар из 210 минимальное значение *p*-дистанции (доля нуклеотидных сайтов, по которым различаются две сравниваемые последовательности) составляет менее 3%, из них для 8 пар – меньше 1%. Для одной пары видов *P. fabressei*/*P. fulgens* минимальное значение *p*-дистанции равно нулю. Эти виды имеют общий гаплотип и кластеризуются вместе на дереве. Это довольно интересный результат, так как оба вида имеют чёткие различия в морфологии и в кариотипе. В медианной сети наблюдалось относительно невысокое число эволюционных шагов между таксонами. Низкий уровень генетических различий также отразился на относительно низкой поддержке некоторых клад (например, *P. timfristos*), а также на том, что некоторые таксоны (*P. nephohiptamenos*, *P. orphicus*) не образовывали монофилетические кластеры. Комбинация низкой межвидовой дифференциации и низкого уровня внутривидовой изменчивости говорит о том, что наиболее вероятным механизмом, объясняющим сложившуюся картину, являются сохранение анцестрального полиморфизма и неполная сортировка линий. Следует отметить, что, несмотря на очевидную парафилетичность, таксоны *P. nephohiptamenos* и *P. orphicus* являются дискретными. В итоге, несмотря на указанные выше недостатки, анализ фрагмента гена *COI* показал его видоспецифичность (Вишневецкая, Лухтанов, 2008; Вишневецкая и др., 2010, 2012, 2016а, б; Vishnevskaya et al., 2014, 2015). Поэтому при наличии выверенной базы данных, можно использовать ДНК-баркоды для определения видов, несмотря на низкие значения межвидовой дистанции.

6.4 Анализ молекулярных и хромосомных кластеров, обнаруженных в симпатрии

Нам удалось установить, что таксон, обычно определяемый систематиками, как *P. rjabovianus* (Dantchenko, 2000; Tshikolovets et al, 2014), представлен в Тальше в Азербайджане двумя резко дифференцированными молекулярными кластерами (Lukhtanov et al., 2015; Vishnevskaya et al., 2014, 2015). Анализ хромосомных данных показал, что представители этих кластеров имеют разные хромосомные числа: $n = 49$ для одного кластера и $n=79$ для другого кластера. Существует два теоретических объяснения подобных случаев отсутствия монофилии: во-первых, наличие невыявленных криптических видов (Dincă et al., 2011, 2013), во-вторых, межвидовая митохондриальная интрогрессия (Lukhtanov et al., 2015) и смешение глубоко дивергировавших митохондриальных линий, эволюционировавших в аллопатрии (Pazhenkova, Lukhtanov, 2016). Случай, с

которым мы столкнулись в Талыше, относится к ситуации, ожидаемой для двух симпатричных криптических видов, но не для внутривидового полиморфизма. Во-первых, потому что разные кариотипы сопровождалась разными митохондриальными гаплогруппами, то есть существует неравновесное сцепление между этими физически несвязанными маркерами. Во-вторых, отсутствуют хромосомные гетерозиготы (Lukhtanov et al., 2015). Поэтому мы делаем вывод о том, что данные кластеры представляют два разных вида, а не случай внутривидовой изменчивости. Один из этих видов – ранее описанный *P. rjabovianus*. Второй вид, криптический по отношению к *P. rjabovianus*, был описан нами как новый для науки вид *P. pseudorjabovi* (Lukhtanov et al., 2015).

Другая ситуация описана ранее (Dincă et al., 2013) и подтверждена нашим анализом для вида *P. ripartii* в Европе. *P. ripartii ripartii* не является монофилетичным по гену *COI* и представлен двумя кластерами – западноевропейским и евроазиатским. Западноевропейский кластер представлен бабочками из Италии, Испании и Франции. Евроазиатский кластер – бабочками, обитающими на территории от Испании до Монголии. Различия баркодов могут быть вызваны не видообразованием, а другими причинами, влияющими на сильную внутривидовую изменчивость баркода (Pazhenkova, Lukhtanov 2016). Мы можем назвать сложившуюся ситуацию двухпиковым распределением гаплотипов. Это значит, что две популяции, по каким-либо причинам, допустим, в результате образования географического барьера, некоторое время эволюционировали самостоятельно. В результате накопления мутаций появились два чётко различимых гаплотипа. После исчезновения барьера популяции снова перемешались, стали обитать в симпатрии. Для *P. ripartii ripartii* из обоих кластеров известно хромосомное число, равное $n=90$. При этом структура хромосом у представителей обоих кластеров одинаковая. То есть, несмотря на наличие двух разных гаплогрупп, хромосомных перестроек нет. В окраске крыльев также нет никаких особенностей, позволивших бы дифференцировать один кластер от другого. Следовательно, в данной ситуации наличие разницы в баркодах можно трактовать, как внутривидовую изменчивость. Представители разных молекулярных кластеров обитают в симпатрии, имеют одинаковую окраску крыльев и не отличаются по кариотипу. На данном этапе исследования и наших знаний, следуя принципу консервативности (Lukhtanov et al., 2016) правильным будет оставить классификацию *P. ripartii* в том виде, в котором она есть сейчас.

6.5 Анализ молекулярных и хромосомных кластеров, обнаруженных в аллопатрии

Мы установили (Vishnevskaya et al., 2016), что таксон, обычно определяемый как *P. admetus*, не образует монофилетическую линию на построенных реконструкциях. Таксон *P. admetus* не представлял никакой сложности для идентификации и морфологически всегда отличался от других таксонов комплекса. Описанные подвиды *P. admetus yeranyani* и *P. admetus malyevi* отличались от номинативного подвида морфологически. В результате анализа фрагмента гена *COI* мы выяснили, что таксоны *yeranyani* и *malyevi*

образуют две отдельные несестринские клады. Минимальная р-дистанция между таксонами *admetus* и *yeranyani* + *malyevi* составляет больше 2%. В медианной сети таксон *admetus* образует свою гаплогруппу, отдельную от гаплогруппы в *yeranyani* + *malyevi*. Известно, что эти две группы (*admetus* и *yeranyani* + *malyevi*) не идентичны по числу хромосом (Vishnevskaya et al., 2016): для *admetus* характерно хромосомное число $n=80$, в то время как для *yeranyani* и *malyevi* типично $n=79$. Также мы знаем, особи, образующие кладу *admetus* обитают на территории Европы и Западной Турции, в то время как особи, образующие кладу *yeranyani* + *malyevi* обитают на территории Восточной Турции, Армении и Азербайджана. Мы полагаем, что рассмотренный нами здесь случай отсутствия монофилии говорит о наличии невыявленных видов, то есть *P. admetus* s. auct., вероятнее всего, состоит из двух аллопатрических видов, *P. admetus* s.str. и *P. yeranyani* (смотри главу Таксономия), подвидом которого является таксон *P. yeranyani malyevi*.

Похожий случай описан для *P. valiabadi*. Ранее *P. rjabovianus* считался подвидом *P. valiabadi* (Rose, Schurian, 1977; Eckweiler, Hauser, 1997; Dantchenko, 2000; Tshikolovets et al., 2014) из-за их внешнего сходства и аллопатрического распространения (*P. valiabadi* обитает на территории Северного Ирана, а *P. rjabovianus* на территории Азербайджана). В нашем исследовании (Lukhtanov et al., 2015, Vishnevskaya et al., 2014, 2015) мы обнаружили высокий уровень генетической дифференциации между *P. valiabadi* и *P. rjabovianus*. Минимальная р-дистанция для них равна 3.2%. Кариотипы данных таксонов сильно различаются: для *P. valiabadi* хромосомное число равно $n = 23$, а для *P. rjabovianus* и *P. rjabovianus masul* $n = 49$ и 43 соответственно. Разница между *P. rjabovianus* и *P. valiabadi* слишком высока, чтобы считать их конспецифичными популяциями. На дереве оба таксона образуют самостоятельные сестринские клады с высокой поддержкой.

6.6 Возможность альтернативных классификаций

В соответствии с биологической концепцией вида (Poulton, 1904; Mayr, 1963) популяции считаются отдельными видами, если они репродуктивно изолированы друг от друга. Эта изоляция может не быть полной, но должна быть достаточной, чтобы предотвратить смешение таксонов в случае перекрывания их ареалов (Mayr, 1963; Coyne, Orr, 2004). Биологические виды могут быть политипичными (Poulton, 1904; Mayr, 1963), то есть состоять из морфологически и молекулярно различающихся групп популяций. В соответствии с политипической концепцией вида таксоны в аллопатрии можно считать подвидами одного вида, если нет доказательств репродуктивной изоляции между ними. В соответствии с филогенетической концепцией вида (Cracraft, 1989; Coyne, Orr, 2004) разными видами могут считаться дискретные филогенетические линии. Иными словами, вид – наименьшая монофилетическая группа с уникальной комбинацией признаков. Обе концепции совместимы, так как подвиды в рамках биологической концепции вида могут быть классифицированы как виды в рамках филогенетической концепции вида. То есть в терминах практической таксономии можно считать, что филогенетический вид – это линия

(клада), а биологический политипический вид – максимально возможная совокупность аллопатрических популяций, образующих монофилетическую группу, для которой не показано, что это искусственный комплекс. Существование разных определений вида говорит о вероятности разных классификаций. В общепринятой системе европейских дневных бабочек (см. Tolman, Levington, 2002) есть и политипические виды, и узко локальные виды, которые удовлетворяют концепции филогенетического вида. В наших публикациях мы используем разные концепции вида. В работе 2015 года (Lukhtanov et al., 2015) локальная хромосомная раса *P. rjabovianus masul* была интерпретирована как подвид более широко распространенного вида *P. rjabovianus* (использована политипическая концепция вида). В работе 2016 года (Vishnevskaya et al., 2016) в сходной ситуации таксон *P. timfristos* был интерпретирован как локальный вид (филогенетическая концепция вида).

Варианты интерпретации спорных классификаций:

1) *rjabovianus/ masul*

Вид *P. rjabovianus* s.str. представлен двумя аллопатричными популяциями: популяция из Талыша (Азербайджан) и популяция из Масуле (Иран). Фенотипически особи из обеих популяций сходны. На филогенетическом дереве, построенном по фрагменту гена *COI*, представители обеих популяций с высокой поддержкой кластеризовались вместе, хотя особи из Масуле внутри кластера образовывали монофилетическую группу также с высокой поддержкой. Анализ данных по кариотипам продемонстрировал различия в хромосомных числах двух популяций: для представителей из Талыша характерно хромосомное число, равное $n=49$, в то время как для представителей из Масуле характерно хромосомное число $n=43$. В нашем исследовании (Lukhtanov et al., 2015) мы предложили рассматривать популяцию из Масуле в качестве подвида – *rjabovianus masul*, то есть была использована концепция биологического политипического вида. Тем не менее, если мы будем придерживаться филогенетической концепции вида, то популяцию с отличным хромосомным числом (хромосомную расу), можно считать и обособленным видом *Polyommatus masul*, с точечным ареалом обитания в Северном Иране. Незначительные различия в баркоде можно объяснить невысокой скоростью эволюции этого участка гена в данной популяции (Vishnevskaya et al., 2017).

2) *timfristos/ humedasae/ aroaniensis/ orphicus*

Если придерживаться концепции биологического политипического вида, то таксоны *P. humedasae* – *P. orphicus* – *P. timfristos* – *P. aroaniensis* можно интерпретировать как один политипический вид. Все они аллопатричны, а на конкатенированном дереве со средним значением поддержки кластеризуются вместе. В этом контексте, данную группу можно рассматривать, как линию с различающимися популяциями, каждая из которых имеет уникальный генетический маркер (кариотип). Различия в числах хромосом не обязательно приводят к полной репродуктивной изоляции, и в некоторых случаях не препятствуют межвидовой гибридизации и генетической интрогрессии

(Lukhtanov et al., 2015). Но даже если последнее утверждение справедливо, это не значит, что хромосомные перестройки не имеют отношения к образованию генетических барьеров между популяциями. В исследованиях других авторов было продемонстрировано, что хромосомные изменения играют важную роль в видообразовании у голубянок (Lukhtanov et al., 2005, 2015; Kandul et al., 2007; Talavera et al., 2013). Даже слабое снижение фертильности у гетерозигот может привести к формированию границы между гомозиготными популяциями. Следовательно, эту группу (*P. humedasmae* – *P. orphicus* – *P. timfristos* – *P. aroaniensis*) можно также интерпретировать в качестве 4-х видов.

3) *alcestis/ karacetinae/ dantchenkoi/ eriwanensis/ interjectus*

Теоретически, следуя предыдущей схеме, а именно концепции биологического политипического вида, мы можем объединить в один вид и группу таксонов *alcestis/ karacetinae/ dantchenkoi/ eriwanensis/ interjectus*. Все эти таксоны обитают в аллопатрии. На дереве, построенном методом VI по фрагменту гена *COI*, они образуют кладу с поддержкой 96, а на конкатенированном дереве – с поддержкой 99. По фенотипу таксоны схожи, различаются хромосомными числами. Но если руководствоваться утверждением, что различия в числах хромосом не обязательно приводят к полной репродуктивной изоляции, и в некоторых случаях не препятствуют межвидовой гибридизации и генетической интрогрессии (Lukhtanov et al., 2015b), данную группу таксонов можно рассматривать как один вид с несколькими подвидами, каждый из которых имеет уникальный кариотип.

В итоге мы предлагаем два варианта классификации для группы *P. dolus*. В случае группы *P. admetus* обе классификации – как основанная на филогенетической концепции вида, так и основанная на политипической концепции вида – будут одинаковыми.

Не существует объективных критериев для выбора между этими двумя классификациями в качестве единственной системы. В этой ситуации нам кажется целесообразным в качестве наиболее предпочтительной использовать ту систему, которая в наибольшей степени соответствует традиционным (общепринятым) представлениям об объеме видов в изучаемом комплексе. Эти представления даны в последней полной опубликованной сводке по подроду *Agrodiaetus* (Eckweiler, Vozano, 2016). В этой системе такие таксоны как *P. dantchenkoi*, *P. eriwanensis*, *P. interjectus*, *P. rjabovianus*, *P. valiabadi*, *P. aroaniensis* и *P. humedasmae* рассматриваются в качестве самостоятельных видов, что соответствует первой классификации (филогенетическая концепция вида). Поэтому предлагаем использовать эту классификацию в качестве основной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплекс мономорфных видов линии *Polyommatus (Agrodiaetus) admetus* являлся камнем преткновения при решении таксономических задач внутри рода *Polyommatus*. Сложность в определении видов по морфологическим признакам, а также наличие видов-двойников в группе приводили к таксономической путанице. Исследование кариотипов бабочек не всегда давало возможность правильно оценить видовую принадлежность того или иного экземпляра.

Несмотря на то, что в большинстве случаев определённое хромосомное число соответствует определённому виду, есть случаи, когда очевидно разные таксоны обладают одинаковыми хромосомными числами. В нашей работе мы использовали данные молекулярных исследований. Были построены филогенетические деревья, на основе анализа нуклеотидных последовательностей *COI* и *ITS2*, и митохондриальные сети гаплотипов. Наша работа показала, что для вынесения таксономических решений невозможно опираться только на данные молекулярных исследований. Пример такой ситуации был обнаружен при изучении генетической структуры вида *P. ripartii*, который на реконструкциях не образует монофилетический кластер. Попытка обнаружить какие-либо тенденции в рисунке крыла привела к выделению 7 типов рисунка, характерных для представителей комплекса, и к выводу о том, что за редким исключением (*P. admetus*) по рисунку крыльев практически невозможно идентифицировать виды. Поэтому важным заключением в отношении изучаемой группы является то, что для их исследования необходимо использовать совокупность признаков – данные по кариотипам, данные молекулярных исследований, морфологию (типы крылового рисунка), а также данные по распространению и местам обитания (симпатрия/ аллопатрия). Только при учёте всех этих параметров мы имеем возможность выдвигать гипотезы о таксономическом положении исследуемых нами экземпляров.

Кроме того, на интерпретацию таксономического положения таксонов может влиять используемая концепция вида. В нашем исследовании на примере трёх групп таксонов – *rjabovianus rjabovianus/rjabovianus masul, timfristos/orphicus/aroaniensis/humedasae* и *alcestis/karacetinae* – мы демонстрируем, что в зависимости от используемой концепции вида (биологическая политипическая концепция вида и филогенетическая концепция вида) исследуемые нами таксоны могут быть интерпретированы как виды или как подвиды.

ВЫВОДЫ

- 1) Морфологические признаки не могут быть использованы для диагностики таксонов (за исключением *P. admetus*), так как их состояния либо одинаковы у разных видов, либо не фиксированы внутри видов.
- 2) Несмотря на большое значение кариотипических особенностей в систематике группы, хромосомные числа не являются универсальным признаком для дифференциации видов, так как они могут либо возникать независимо в разных группах, либо быть симплезиоморфиями.
- 3) Короткие ДНК-баркоды (фрагмент гена *COI*) в большинстве случаев можно применять для видовой диагностики в комплексе *Polyommatus admetus*, несмотря на слабый уровень дифференциации по этому гену и наличие таксонов, парафилетичных и даже полифилетичных по отношению к этому гену.
- 4) На примере видов *P. rjabovianus* и *P. pseudorjabovi* была протестирована гипотеза о том, что симпатрично обитающие хромосомные расы представляют собой репродуктивно изолированные биологические виды. *P. rjabovianus* и *P. pseudorjabovi*, обитающие в симпатрии на территории Талышка (Азербайджан),

демонстрировали не только разные хромосомные числа ($n=49$ и $n=79$ соответственно), но и разные гаплотипы, а также принадлежность разным кладам на филогенетической реконструкции, что несовместимо с идеей обмена генами между ними.

5) *Polyommatus valiabadi* sensu auctorum является триплетом видов, состоящим из *P. rjabovianus*, *P. pseudorjabovi* и *P. valiabadi* s.str. Эти виды в значительной степени различаются по хромосомным числам и ДНК-баркодам.

6) *Polyommatus admetus* sensu auctorum является сборным видом. Он представлен *P. admetus* s.str., обитающим на территории Европы и Турции, и *P. yeranyani*, обитающим на территории Армении и Азербайджана.

7) В зависимости от принимаемой видовой концепции, мы можем по-разному с точки зрения таксономии интерпретировать обнаруженное хромосомное и молекулярное разнообразие. Если принимается концепция биологического политипического вида, то популяции с разными хромосомными числами, обитающие в аллопатрии, но сходные морфологически и по молекулярным маркерам, могут интерпретироваться как подвиды одного вида. Если принимается концепция филогенетического вида, то такие популяции можно интерпретировать как разные виды, в особенности, если принимать во внимание тот факт, что хромосомные перестройки являются серьезным репродуктивным барьером.

Список публикаций по теме диссертации.

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК:

Vishnevskaya, M.S. Karyosystematics and molecular taxonomy of the anomalous blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae) from the Balkan Peninsula / **M.S. Vishnevskaya**, A.F. Saifitdinova, V.A. Lukhtanov // Comparative Cytogenetics. – 2016. – Vol. 10 (5) – 85p.

Lukhtanov, V.A. Detecting cryptic species in sympatry and allopatry: analysis of hidden diversity in *Polyommatus (Agrodiaetus)* butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae) / V.A. Lukhtanov, A.V. Dantchenko, **M.S. Vishnevskaya**, A.F. Saifitdinova // Biological Journal of the Linnean Society. – 2015. – Vol. 116. – Pp. 468–485.

Лухтанов, В.А. Булавоусые чешуекрылые (Lepidoptera, Rhopalocera) Западного Алтая / В.А. Лухтанов, **М.С. Вишневская**, А.В. Волынкин, Р.В. Яковлев // Энтомологическое обозрение. – 2007. – 86 (2): 347–369.

Публикации в прочих научных изданиях, сборниках и материалах конференций:

Волынкин, А.В. Беспозвоночные животные Тигирекского заповедника (аннотированный список видов) / А.В. Волынкин, Л.А. Триликаускас, Р.Т.-О. Багиров, М.В. Бурмистров, А.М. Бывальцев, С.В. Василенко, **М.С. Вишневская**, Ю.Н. Данилов, А.Ю. Дудко, Р.Ю. Дудко, А.А. Кнышов, О.В. Косова, Д.В. Костров, Т.М. Кругова, Р.О. Кузнецова, Д.В. Кузменкин, А.А. Легалов, А.Л. Львовский, А.А. Намятова, С.В. Недошивина, Ю.Е. Перунов, А.В. Рещиков, С.Ю. Синев, В.В. Соловаров, З.И. Тюмасаева, И.А. Удалов, П.Я. Устюжанин, Р.В. Филимонов, С.Э. Чернышев, С.В. Чеснокова, С.Д. Шейкин, М.В. Щербаков, Л.В. Яныгина // Труды Тигирекского заповедника. – 2011. – 4: 165-226.

Вишневская, М.С. Разработка систематики комплекса мономорфных видов у голубянок рода *Agrodiaetus* Hübner, 1822 (Lepidoptera, Lycaenidae, *Agrodiaetus ripartii*-complex). / **М.С. Вишневская**, В.А. Лухтанов // Биология – наука 21 века: сборник тезисов 12-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых учёных. – Москва, Пушкино. – 2008. – С. 286.

Вишневская, М.С. Кариосистематика и молекулярная филогенетика бабочек-голубянок рода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) Балканского полуострова. / **М.С. Вишневская**, В.А. Лухтанов, А.Ф. Сайфитдинова // Кариосистематика беспозвоночных животных V (KARYO V): сборник тезисов Международной конференции. – Новосибирск. – 2010. – С. 30.

Вишневская, М.С. Исследование видового разнообразия у голубянок группы *Agrodiaetus admetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) с использованием молекулярных маркеров. / **М.С. Вишневская**, В.А. Лухтанов, А.Ф. Сайфитдинова // Материалы XIV съезда Русского энтомологического общества. – Санкт-Петербург. – 2012. – С. 91.

Вишневская, М.С. Молекулярная филогенетика и кариосистематика бабочек комплекса *Polyommatus ripartii* (Lepidoptera, Lycaenidae) Балканского полуострова. / **М.С. Вишневская**, В.А. Лухтанов, А.Ф. Сайфитдинова // VI международная конференция по кариосистематике беспозвоночных животных. – Бюллетень медицинских Интернет-конференций (ISSN 2224-6150). – 2016 а. – Т. 6, № 9. – С. 1485.

Вишневская, М.С. Молекулярная филогенетика как инструмент для делимитации видов двойников (на примере бабочек-голубянок комплекса *Polyommatus ripartii* (Lepidoptera, Lycaenidae)). / **М.С. Вишневская**, В.А. Лухтанов, А.Ф. Сайфитдинова // 50 лет ВОГиС: успехи и перспективы: сборник тезисов Всероссийской конференции с международным участием. – Москва. – 2016 б. – С. 113.

Vishnevskaya, M.S. Hidden diversity of Caucasian blues of the *Polyommatus (Agrodiaetus) ripartii* species complex (Lepidoptera, Lycaenidae): Assessing species taxa by chromosomal and molecular data. / **M.S. Vishnevskaya**, V.A. Lukhtanov, A.V. Dantchenko, A.F. Saifitdinova // 7th International conference on the biology of butterflies. – Turku, University of Turku. – 2014. – P. 85

Vishnevskaya, M.S. The study of karyotype evolution helps to identify cryptic species: a case study in *Agrodiaetus* butterflies / **M.S. Vishnevskaya**, V.A. Lukhtanov, A.V. Dantchenko, A.F. Saifitdinova. // Chromosome 2015: abstracts of the international conference. – Novosibirsk. – 2015. – P. 51.

Vishnevskaya, M.S. Alternative classification of the blue butterflies from the *Polyommatus rjabovianus* group (Lepidoptera, Lycaenidae). / **M.S. Vishnevskaya**, V.A. Lukhtanov, A.F. Saifitdinova // Материалы XIV съезда Русского энтомологического общества. – Новосибирск. – 2017. – С. 109.