На правах рукописи

ШАПОВАЛ

Назар Анатольевич

МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ И ГИБРИДНОЕ ВИДООБРАЗОВАНИЕ У БАБОЧЕК-ГОЛУБЯНОК РОДА *AGRODIAETUS* (LEPIDOPTERA, LYCAENIDAE): АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНЫХ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ

03.02.05 – Энтомология

03.02.07 – Генетика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург — 2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки

Зоологический институт Российской академии наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент
Лухтанов Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

Фролов Андрей Николаевич,
доктор биологических наук, профессор,
Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений Российской академии сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник лаборатории фитосанитарной диагностики и прогнозов

Сайфитдинова Алсу Фаритовна,
кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Санкт-Петербургский государственный университет, доцент кафедры цитологии и гистологии

Ведущая организация:
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «24» декабря 2013 г. в 16 часов на заседании диссертационного совета Д 002.223.01 при Зоологическом институте РАН по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., д. 1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Зоологического института РАН

Автореферат разослан «___» ноября 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук Овчинникова Ольга Георгиевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Межвидовая гибридизация и гибридное видообразование

Согласно концепции биологического вида, появившейся в начале XX века [Dobzhansky, 1937; Майр, 1968] виды у бисексуальных организмов представляют собой репродуктивно изолированные сообщества. Репродуктивная изоляция подразумевает, что или межвидовая гибридизация не происходит вследствие наличия прекопуляционных репродуктивных барьеров, или межвидовые гибриды не имеют шансов на дальнейшее успешное размножение вследствие пониженной фертильности и/или жизнеспособности. Поэтому ещё относительно недавно межвидовая гибридизация трактовалась скорее как некий «сбой в программе» и считалась явлением крайне редким и маловероятным, не играющим особой роли в процессе эволюции.

В последние годы интерес к межвидовой гибридизации возрос, и значительное число исследований свидетельствует, что гибридизация играет бóльшую, чем предполагалось ранее, роль процессах видообразования у растений и животных [Abbot et al., 2013], в том числе и у насекомых [Mavárez et al., 2006].

Во-первых, стало очевидно, что межвидовая гибридизация - достаточно регулярное событие. Во-вторых, влияние межвидовой гибридизации на процесс эволюции было ранее явно недооценено. Гибридизация может служить дополнительным (помимо мутаций) источником генетического разнообразия, принося новые, адаптивные аллели из одной популяции в другую [Kulmuni et al., 2010; Dittrich-Reed, Fitzpatrick, 2013], и может приводить к появлению комбинации признаков, которая позволит гибридной линии занять новую экологическую нишу [Gompert et al., 2006]. Наличие межвидовой гибридизации делает возможным существование скачкообразной эволюции, предполагающей резкий переход от одного эволюционного состояния к другому [Dittrich-Reed, Fitzpatrick, 2013]. Одновременно с этим, гибридизация может как косвенным образом влиять на процесс видообразования, так и непосредственно приводить к нему [Mallet, 2005]. Таким образом, изучение межвидовой гибридизации и гибридного видообразования является одной из приоритетных фундаментальных задач современной эволюционной биологии, что в значительной степени определяет актуальность настоящего исследования.

Проблемы таксономии рода Agrodiaetus

Модельными объектами для настоящего исследования стали бабочки-голубянки рода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae), который, по последним данным включает 128 видов [Данченко, 2010], обитающих преимущественно в Западной Палеарктике. Многие виды рода чрезвычайно схожи между собой по морфологическим признакам, что сильно затрудняет их определение.

В последние годы была продемонстрирована перспективность использования методов молекулярной филогенетики [Kandul et al., 2002, 2004; Wiemers, 2003; Lukhtanov et al., 2005; Wiemers, Fiedler, 2007; Лухтанов, Шаповал, 2008; Lukhtanov et al., 2008; Wiemers et al., 2009] для решения таксономических проблем в роде *Agrodiaetus*. В нашем исследовании мы показываем перспективность применения современных методов филогеографии и молекулярной цитогенетики для решения вопросов систематики и филогении этой группы бабочек. Таким образом, актуальность данного исследования состоит также в том, что оно позволяет решить ряд проблем систематики рода *Agrodiaetus*.

Степень разработанности темы исследования

Многие аспекты межвидовой гибридизации в настоящее время достаточно интенсивно изучаются. В частности, большое внимание уделяется исследованию формирования гибридных зон на границах популяций [Harrison, 1990], генным обменам между локально адаптированными популяциями, например, у специализированных к определенным кормовым растениям насекомых-фитофагов [Dres, Mallet, 2002]. Несмотря на это, факторы, определяющие те или иные последствия гибридизации, до сих пор остаются крайне плохо изученными [Abbot et al., 2013].

Ещё меньше разработан вопрос гомоплоидного гибридного видообразования, которое, сегодняшний день подтверждено лишь для небольшого числа растений [Gross, Rieseberg, 2005]. Свидетельства гомоплоидного гибридного видообразования для животных крайне малочисленны, причем большинство работ на эту тему опубликованы за последние годы [Schwarz et al., 2005; Gompert et al., 2006; Mavárez et al., 2006; Kuusela et al., 2007; Hermansen, 2010; Stemshorn et al., 2011]. Более того, большинство предложенных случаев гомоплоидного гибридного видообразования основаны на анализе малого числа признаков и не связаны с комплексным подходом к анализу данных, что не даёт возможности полностью отвергнуть другие, негибридные сценарии возникновения видов [Mavárez, Linares, 2008].

Тем не менее, по-видимому, гомоплоидное гибридное видообразование – явление не столь редкое, как может показаться на первый взгляд, о чём косвенно свидетельствуют данные о межвидовой интрогрессии генов [Mallet, 2008]. Скорее всего, малое число примеров гомоплоидного гибридного видообразования свидетельствует лишь о том, что выявление гибридных диплоидных видов является крайне сложной технической задачей, решение которой стало возможным относительно недавно в связи с появлением новых молекулярных и молекулярно-цитогенетических методов [Mavárez, Linares, 2008].

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы было изучение роли межвидовой гибридизации в эволюции и видообразовании бабочек-голубянок рода *Agrodiaetus*.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1) с помощью ядерных и митохондриальных молекулярных маркеров выявить случаи межвидовых обменов генами;
2) провести филогеографический анализ и установить эволюционную историю таксонов, участвовавших в гибридизации (выявить центры происхождения и пути расселения, а также оценить эволюционный возраст гибридных таксонов);
3) используя данные морфологического, молекулярного и молекулярно-цитогенетического анализа, выявить случаи гомоплоидного гибридного видообразования;
4) изучить структуру геномов гибридных видов, используя методы молекулярной цитогенетики (GISH);
5) используя комбинацию митохондриальных и ядерных молекулярных маркеров, провести поиск особей, являющихся результатом современной гибридизации и в случае их обнаружения установить, какие виды участвовали в их формировании;
6) провести морфологический анализ гибридных особей для проверки предположения, что гибриды уже в первом поколении могут иметь изменённую, по сравнению с родительскими формами, окраску крыльев.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное исследование межвидовой гибридизации у бабочек-голубянок рода *Agrodiaetus* на основе анализа филогеографических, экологических, морфологических, кариологических, молекулярных и цитомолекулярных данных.

Для 10 видов впервые изучены митохондриальные (*COI*) и ядерные (*ITS2*) молекулярные маркеры, что позволило установить их положение в системе рода *Agrodiaetus* и провести детальный филогенетический анализ отдельных групп видов.

Внесены существенные дополнения в существующую систему рода и уточнено систематическое положение для некоторых таксонов группы. Описан новый для науки вид *A. shahkuhensis*.

Метод анализа несцепленных генетических маркеров впервые применен для выявления криптических видов, обитающих симпатрично.

В рамках данного исследования метод геномной гибридизации *in situ* (GISH) впервые адаптирован для изучения гомоплоидного гибридного видообразования. Данный метод позволил выявить, что вид *A. peilei* возник в результате гомоплоидного гибридного видообразования. Наше исследование впервые документирует случай возникновения гибридного диплоидного генома за счёт сегрегации хромосом в мейозе, приводящей к изменению диплоидного числа хромосом.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическое значение работы определяется тем, что она посвящена одной из фундаментальных проблем современной биологии – процессу видообразования, а именно, гомоплоидному гибридному видообразованию, которое на сегодняшний день остаётся одним из самых малоизученных.

В рамках изучения данной проблемы разработана методология, позволяющая выявлять диплоидные гибридные виды, и описан случай гомоплоидного гибридного видообразования у бабочек-голубянок. Следует отметить, что модель гомоплоидного гибридного видообразования за счёт сегрегации хромосом в мейозе, обоснованная теоретически ещё в ранних работах [Müntzing, 1930; Stebbins, 1957; Grant, 1958], до сих пор имела очень слабую эмпирическую поддержку. Ранее, в экспериментах по межвидовой гибридизации некоторых растений было показано, что гомоплоидное гибридное видообразование возможно в лабораторных условиях, где искусственно производился подбор родителей [Coyne, Orr, 2004]. В настоящем исследовании впервые показано, что данная модель видообразования может осуществляться в природных условиях, а также впервые подобные данные получены для представителей царства животных.

В работе показана важность роли хромосомных перестроек в эволюции и видообразовании, дано теоретическое обоснование возможности использования комбинации несцепленных генетических маркеров для выявления причин гетерогенности генома.

Разработанные последовательности праймеров и полученные нуклеотидные последовательности различных генов могут быть использованы в молекулярно-филогенетических исследованиях данной группы. Опыт работы с коллекционным материалом, ДНК которого часто имеет высокую степень деградации, может быть полезен в дальнейших исследованиях как чешуекрылых, так и насекомых в целом.

Методология и методы исследования

В работе использовались актуальные на современном этапе методы, многие из которых были специально разработаны или модифицированы под поставленные цели и задачи. К ним относятся:

— методы сбора материала и его первичной обработки;
— спиртовая фиксация для анализа ДНК, фиксация семенников для цитогенетического исследования;
— методы молекулярной цитогенетики и флуоресцентной микроскопии;
— методы молекулярной биологии (выделение ДНК, ПЦР, гель-электрофорез, секвенирование ДНК).
— методы филогенетического анализа.

Детали используемых методов молекулярного и молекулярно-филогенетического анализа опубликованы в нашей работе [Kuznetsova et al., 2012].

Положения, выносимые на защиту

1. Межвидовая гибридизация в роде *Agrodiaetus* может приводить к митохондриальной интрогрессии.
2. Гибридизация между видами голубянок, различающимися по числу хромосом, возможна и может приводить к появлению диплоидного гибридного вида.
3. Гибридизация между видами, имеющими разные кариотипы, может приводить к быстрым, скачкообразным изменениям в хромосомных числах.
4. Новая, измененная окраска крыльев – признак, на основании которого самки распознают конспецифичных самцов и который, соответственно, играет важную роль в формировании презиготических барьеров, может возникать в результате гибридизации уже у гибридов первого поколения;
5. Комбинацию митохондриальных (*COI*) и рибосомальных (*ITS2*) последовательностей можно использовать в качестве несцепленных молекулярных маркеров для выявления криптических видов, обитающих в симпатрии.

Степень достоверности и апробация результатов

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на IV и V Международной конференции по кариосистематике беспозвоночных животных (Санкт-Петербург, 2006 и Новосибирск, 2010), XIII и XIV Съездах Русского энтомологического общества (Краснодар, 2007 и Санкт-Петербург, 2012), ежегодных чтениях памяти профессора А.С. Данилевского (Санкт-Петербург, 2007) и Международном конгрессе «Хромосома» 2012 (Новосибирск, 2012).

Апробация исследования была осуществлена на семинарах отделения кариосистематики Зоологического института РАН, диссертация была обсуждена на заседании лаборатории систематики насекомых Зоологического института РАН. Исследования по теме диссертации были поддержаны грантами РФФИ 12-04-00490-а, 11-04-01119-а, 11-04-00734-а, 09-04-01234-а, 06-04-49362-а.

Публикации

По теме исследования подготовлены и опубликованы три статьи в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, из них одна в российском и две в международных журналах. Имеется 8 публикаций в материалах конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения, выводов и списка литературы и приложений. Общий объем составляет 147 страниц. Работа проиллюстрирована 35 рисунками, включает 2 таблицы и 2 приложения. Список литературы содержит 202 источника, в том числе 14 русскоязычных.

Благодарности

Я глубоко признателен моему научному руководителю Владимиру Александровичу Лухтанову за терпение и отзывчивость в течение всего периода подготовки диссертации, а также за советы и опыт, которыми он всегда охотно делился во время работы в лаборатории и в экспедициях.

Искренние слова благодарности хочется сказать заведующей отделением кариосистематики лаборатории систематики насекомых ЗИН РАН Валентине Григорьевне Кузнецовой, благодаря которой в отделении создана дружеская и рабочая атмосфера, за её поддержку и колоссальную всестороннюю помощь.

Глубокую признательность за помощь в проведении исследований и ценные советы выражаю: Наталье Сергеевне Хабазовой, Алисе Олеговне Вершининой, Нинель Алексеевне Петровой, Наталии Викторовне Голуб, Борису Александровичу Анохину, Наталье Иосифовне Абрамсон, Алексею Юрьевичу Костыгову, Михаилу Владимировичу Фокину, Семену Юрьевичу Бодрову.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1 ВИДЫ, ГИБРИДИЗАЦИЯ И ГИБРИДНОЕ ВИДООБРАЗОВАНИЕ: ВВЕДЕНИЕ В ПРОБЛЕМУ

1.1 Межвидовая гибридизация

Согласно современному определению, гибридизация – это скрещивание представителей генетически дифференцированных групп или таксонов, приводящее к появлению жизнеспособных потомков (гибридов) [Mallet, 2005]. До конца XX века преобладала точка зрения, что межвидовая гибридизация является своего рода «репродуктивной ошибкой» и всегда имеет отрицательные последствия для гибридизирующих видов [Mayr, 1963; Arnold, 1997; Cyone, Orr, 2004]. Во многом такая негативная оценка являлась следствием широко распространенной на тот момент концепции биологического вида [Mayr, 1963]. Широкое внедрение в последние годы методов молекулярной биологии привело к тому, что взгляды на межвидовую гибридизацию в отношении её частоты и эволюционной роли претерпели значительные изменения [Abbot et al., 2013].

Частота встречаемости межвидовой гибридизации

Молекулярные данные показывают, что межвидовая гибридизация редка, если этот процесс рассматривается на уровне отдельных особей. В среднем, гибриды формируют менее 0,1% популяций [Mallet, 2005]. Такой низкий процент обусловлен, главным образом, репродуктивными барьерами, которые препятствуют успешной гибридизации. Следует отметить, что хотя гибриды редко встречаются в популяциях, даже небольшое количество гибридов могут обеспечить своего рода «мост», по которому от одного вида к другому могут передаваться аллели. Поэтому, даже низкая

частота появления гибридов в популяции может иметь важные эволюционные последствия [Mallet, 2005].

На уровне видов гибридизация – более обычное явление. Установлено, что примерно 25% видов растений и 10% видов животных вступают в межвидовую гибридизацию [Mallet, 2005].

Зависимость межвидовой гибридизации от времени дивергенции

Лабораторные эксперименты по межвидовой гибридизации показывают, что уровень пре- и постзиготической несовместимости коррелирует с генетическими дистанциями между таксонами и, таким образом, со временем, прошедшим с момента их разделения [Coyne, Orr, 1997, 2004; Edmands, 2002; Price, Bouvier, 2002]. Для природных гибридов подобных данных не так много, однако они подчиняются тому же правилу. Например, у бабочек-геликонид рода *Heliconius*, большинство случаев гибридизации отмечено между видами, различия по митохондриальной ДНК которых составляют менее 2%. Если различия составляют 2-6%, гибридизация происходит крайне редко, а между видами, различающимися по митохондриальной ДНК более чем на 10%, гибридизации не происходит вовсе [Mallet et al., 1998].

1.2 Гибридное видообразование

Новые виды живых организмов могут возникать не только в ходе дивергентной, дихотомической эволюции, когда исходная эволюционная линия разделяется на две, но и в результате гибридизации, когда две разошедшиеся линии скрещиваются и дают начало новому виду. Такой тип видообразования получил название гибридного [Rieseberg, et al., 1995; Rieseberg, 1997; Coyne, Orr, 2004; Mavárez et al., 2006].

Гибридное видообразование может осуществляться по двум принципиально различающимся генетическим механизмам: новый вид может возникать либо в результате аллополиплоидизации, либо путем гомоплоидного (рекомбинантного) видообразования [Coyne, Orr, 2004].

1.2.1 Аллополиплоидное гибридное видообразование

В ходе аллополиплоидного видообразования новый гибридный вид образуется в результате слияния двух целых родительских геномов [Coyne, Orr, 2004]. Этот способ видообразования широко распространен среди растений и редко встречается у животных [Otto, Whitton, 2000]. Видообразование по механизму аллополиплоидизации сразу решает проблему изоляции нового вида от родительских линий, поскольку при скрещивании гибридного полиплоида с диплоидными родительскими формами образуется потомство с нечётным уровнем плоидности. Такое потомство может быть жизнеспособно, но обычно производит стерильные гаметы с несбалансированными хромосомными наборами [Stebbins, 1950; Grant, 1981].

1.2.2 Гомоплоидное гибридное видообразование

Второй механизм гибридного видообразования, получивший название гомоплоидного, подразумевает, что вид может возникать за счёт комбинации частей геномов родительских видов без изменения уровня плоидности [Rieseberg, 1997; Rieseberg et al., 2003; Coyne, Orr, 2004; Mávarez, Linares, 2008].

Данный механизм изучен гораздо хуже, чем аллополиплоидное видообразование. Это связано с тем, что выявление гибридных диплоидных особей (а тем более видов) представляет собой значительно более сложную техническую задачу, чем выявление

полиплоидов, и до недавних пор было практически невозможно. Поэтому свидетельства, подтверждающие этот тип видообразования, немногочисленны и в большинстве своём получены для растений [Buerkle et al, 2000; Gross, Rieseberg, 2005].

Свидетельства гомоплоидного гибридного видообразования для животных единичны, причем большинство работ на эту тему опубликованы за последние годы [Schwarz et al., 2005; Gompert et al., 2006; Mavárez et al., 2006; Kuusela et al., 2007; Hermansen, 2010; Stemshorn et al., 2011]. Следует также отметить, что предложенные гипотезы о гомоплоидном гибридном видообразовании в большинстве основаны на изучении малого числа признаков и не всегда надежны, что не даёт возможности полностью отвергнуть другие сценарии [Mavárez, Linares, 2008].

Изоляция гомоплоидной гибридной линии экологическими барьерами

Модель гомоплоидного гибридного видообразования предполагает два принципиально различных механизма, с помощью которых стабилизируется гибридная форма. Один из них – изоляция гибридной линии внешними барьерами, которые возникают в результате экологической дифференциации между линиями [Grant, 1981]. Гибридизация с последующим расселением гибридной линии в новую экологическую нишу объясняет гибридное видообразование на диплоидном уровне у немногих изученных видов животных [Schwarz et al., 2005; Kuusela et al., 2007; Hermansen, 2010; Stemshorn et.al., 2011], включая бабочек-голубянок рода *Plebejus* [Gompert et al., 2006]. Последний род, хотя и близок к *Agrodiaetus* филогенетически [Talavera et al., 2013a], характеризуется хромосомным консерватизмом [Talavera et al., 2013b], и к нему неприменим механизм хромосомного рекомбинантного видообразования, изложенного ниже.

Изоляция гомоплоидной гибридной линии за счёт хромосомных перестроек

Второй механизм получил название рекомбинантного видообразования. Согласно этому механизму, в гибридизацию вступают два родительских вида, отличающиеся двумя или более хромосомными перестройками [Stebbins, 1957; Grant, 1958]. Если получаемые гибриды первого поколения частично фертильны, то скрещивания между ними могут дать начало новым, хромосомно сбалансированным генотипам с восстановленной фертильностью. Поскольку скрещивания с родительскими видами приведут к образованию гетерозиготного потомства, эти новообразованные гомозиготные хромосомные формы, по крайней мере, частично репродуктивно изолированы от родительских видов. Если такие линии сумеют закрепиться, их можно рассматривать как новые гибридные виды.

Осуществимость данного сценария была подтверждена в лабораторных экспериментах для растений, однако свидетельства того, что видообразование по этой модели может происходить в природе, а также у животных, до настоящего момента отсутствовали [Rieseberg, 1997; Coyne, Orr, 2004].

2 МЕТОДОЛОГИЯ

2.1 Выявление случаев гибридизации, имевших место в прошлом

Существует несколько подходов, позволяющих выявить случаи межвидовой гибридизации, которые происходили в прошлом. Один подход основан на методах мультилокусного генотипирования и включает в себя расчёты и сравнения времени

коалесценции различных аллелей для выявления несоответствий, которые могут свидетельствовать о происходившей гибридизации [Emelianov et al., 2004; Mallet, 2005].

Другой подход, использованный нами, основан на анализе дифференциальной интрогрессии митохондриальных и ядерных молекулярных маркеров [Avise, 2004; Ballard, Whitlock, 2004]. Суть дифференциальной интрогрессии состоит в том, что при межвидовой и межпопуляционной гибридизации ядерные геномы, как правило, не склонны к обмену генами, тогда как виды или линии могут относительно легко обмениваться митохондриями [Avise, 2004; Ballard, Whitlock, 2004]. Такое явление получило название митохондриальной интрогрессии.

Следует подчеркнуть, что митохондриальная интрогрессия в принципе невозможна, если гибриды первого поколения полностью стерильны. Это имеет важное значение для теории гомоплоидного видообразования, поскольку оно по умолчанию требует, чтобы гибридная линия, получившаяся в результате скрещивания родительских форм, могла оставить потомство.

2.2 Методология выявления гибридных видов при помощи геномной *in situ* гибридизации (GISH)

Геномная *in situ* гибридизация – молекулярно-цитогенетический подход, позволяющий выявлять геномы, имеющие гибридное происхождение. Этот метод основан на том, что хромосомные препараты предполагаемых гибридных видов анализируются при помощи молекулярных зондов. Каждый молекулярный зонд получают из тотальной ДНК одного из родительских видов, которая специфически маркирует на препаратах хромосомы данного родительского вида [Markova, Vyskot, 2009; Zaleśna et al., 2011; Rampin et al., 2012].

2.3 Выявление природных межвидовых гибридов первого поколения (современная гибридизация)

Гибридные особи можно выявлять на основании кариотипического анализа [Лухтанов, 1999], однако, этот подход неприменим для изучения сухого коллекционного материала. Другой подход основан на поиске особей, имеющих нетипичные для известных таксонов морфологические признаки. Изучение морфологии даёт возможность предварительно выявлять гибридные особи. Дальнейший анализ молекулярных маркеров позволяет подтвердить гибридную природу таких особей, а также выявить родительские виды. В отличие от кариотипического анализа, этот подход позволяет анализировать любой коллекционный материал.

3 МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

3.1 Материал и методы его сбора

В основе работы лежат сборы, сделанные автором в центральном Иране, а также в северо-западной и северо-восточной частях этой страны: в провинции Лорестан (Боруджерд, Сараванд, Даррех-Тахт); в провинции Хамадан (Нахаванд); в провинции Курдистан (Сенандадж, Ченарех, Саккез, Бест); в провинции Зенджан (к северо-востоку от Зенджана); в провинции Голестан (хребет Эльбурс, Шахкух, Дизин, Шахруд). Помимо собственных сборов, в работе использован материал, собранный в 2000-2006 годах В.А. Лухтановым и А.В. Данченко, а также данные по нуклеотидным последовательностям из базы Genbank (www.ncbi.nih.gov). Собирались самцы на стадии имаго. После поимки бабочек, из брюшка извлекался семенник и помещался в заранее

приготовленную пробирку со смесью этанола и ледяной уксусной кислоты (3:1). Этот материал использовался для кариотипирования и изготовления хромосомных препаратов. Крылья бабочки сохраняли в специальных конвертах для последующего анализа фенотипов. Тело бабочек помещали в пробирку с 96% этанолом для последующего анализа ДНК.

3.2 Выделение ДНК

Выделение ДНК осуществляли с помощью коммерческих наборов GenJet (Fermentas, Latvia) согласно протоколу производителя, а также методом фенол-хлороформной экстракции [Chomczynski, 1987]. Наличие ДНК в образцах проверяли на 2% агарозном геле, концентрацию ДНК определяли методом спектрофотометрии.

3.3 Амплификация и секвенирование ДНК

В качестве молекулярных маркеров были использованы митохондриальный ген *цитохром оксидазы I* (*COI*) и ядерная нуклеотидная последовательность *ITS2* – спейсерный участок между рибосомальными генами *5.8s rRNA* и *28s rRNA*.

Последовательность *ITS2* амплифицировали по возможности полностью, используя пару консервативных праймеров [White et al., 1990], или более специфичные праймеры, разработанные нами специально для голубянок рода *Agrodiaetus*. Полученные последовательности имели разную длину (~560-620 пар нуклеотидов), обусловленную вставками или, наоборот, делециями в вариабельных участках этой последовательности.

Для гена *COI* было отсеквенировано несколько перекрывающихся участков. В результате объединённая последовательность представляла собой начальный фрагмент гена *COI* длиной 1107 п.н. (без учета последовательностей праймеров, которые были удалены из анализа).

3.4 Амплификация и секвенирование деградированной ДНК

Секвенирование материала, собранного несколько десятилетий назад представляет собой достаточно трудную задачу ввиду сильной деградации ДНК. Деградированная ДНК представлена небольшими фрагментами длиной, в среднем, 100-150 п.н., и в таких случаях обычные методы подготовки к секвенированию не работают. Нами было разработано и протестировано 18 различных пар праймеров для гена *COI*, и 8 пар праймеров для последовательности *ITS2*, а также подобраны специальные условия ПЦР реакции. Это позволило подготовить и секвенировать короткие фрагменты, которые потом были объединены в более длинные, пригодные для анализа.

3.5 Приготовление хромосомных препаратов и геномная гибридизация *in situ* (GISH)

Для геномной *in situ* гибридизации использовались давленые препараты, полученные из неокрашенных семенников имаго бабочек. С использованием фазово-контрастного микроскопа отбирались препараты с подходящими мейотическими метафазными пластинками. Затем каждый препарат замораживался с помощью сухого льда, покровное стекло скалывалось, а предметное стекло вместе с содержащимися на нем метафазными пластинками проводились через серию спиртов разной концентрации.

Геномную ДНК для создания молекулярного зонда метили флюорохромом «16-dUTP биотин» с помощью набора Nick Translation Kit (Roche) согласно инструкции

производителя. Геномную ДНК для супрессии обрабатывали ДНКазой на протяжении 2-2.5 часов при комнатной температуре.

Длину фрагментов меченой (примерно 300-1500 п.н.) и супрессорной ДНК (примерно 100-1000 п.н.) проверяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

Геномную гибридизацию проводили по методике, описанной Траутом [Traut, 1999] с модификациями для нашего объекта исследований.

Хромосомные препараты после гибридизации анализировали под микроскопом Leica DM 4000B с объективом 100x. Снимки флюоресценции были сделаны фотокамерой Leica DFC 350 FX с использованием ПО Leica Application Suite 2.8.1.

3.6 Дизайн экспериментов по геномной гибридизации *in situ* (GISH)

В этом разделе детально описаны различные варианты геномной гибридизации *in situ* (GISH), сочетание которых позволяло выявлять кариотипы, имеющие гибридное происхождение.

3.7 Филогенетический анализ

Выравнивание нуклеотидных последовательностей было произведено с помощью программы BioEdit с применением алгоритма Clustal W [Hall, 1999]. В сложных случаях (вариабельный участок последовательности *ITS2*) нуклеотидное выравнивание проверялось и при необходимости дополнительно редактировалось вручную. Далее при помощи скорректированного критерия Акаике в программе Jmodeltest 0.1.1 [Posada, 2008] были подобраны модели эволюции для нуклеотидных данных. Во всех случаях параметры филогенетических анализов устанавливались в соответствии с подобранными моделями нуклеотидных замен.

Для каждой матрицы данных при помощи ПО Mega v. 5.2.2 [Tamura et al., 2011] были проведены: анализ нуклеотидного состава, сравнение частот нуклеотидных замен и проверка данных на гомогенность паттернов нуклеотидных замен.

Для реконструкции филогенетических отношений и филогеографического анализа были использованы методы максимальной парсимонии (MP), объединения ближайших соседей (NJ), максимального правдоподобия (ML), метод Байеса (BI) и метод медианных сетей гаплотипов.

Оценку возраста митохондриальной интрогрессии в группе видов *A. karindus – A. morgani – A. peilei* осуществляли с помощью программы BEAST v.1.7.1 [Drummond et al., 2012] по методу, описанному в работах Лухтанова с соавторами [Lukhtanov, et al., 2011] и Динки с соавторами [Dinca et al., 2011].

4 МЕЖВИДОВАЯ ГИБРИДИЗАЦИЯ И МИТОХОНДРИАЛЬНАЯ ИНТРОГРЕСССИЯ В РОДЕ *AGRODIAETUS*

4.1 Анализ комплекса видов, близких к *A. cyaneus*

Первый случай вероятной межвидовой гибридизации был зафиксирован в группе таксонов, близких к *A. cyaneus*.

4.1.1 Собственные данные

Для анализа предполагаемой гибридизации в группе *A. cyaneus* было использовано 26 нуклеотидных последовательностей гена *COI*, полученных в ходе данного исследования, и ещё 11 последовательностей были взяты из Генбанка. Для

анализа спейсера *ITS2* было использовано 17 оригинальных последовательностей, и 5 последовательности были взяты из Генбанка.

Изученные образцы представляли, во-первых, группу симпатрично обитающих, морфологически неразличимых особей из комплекса *A. kendevani*, и, во-вторых, популяционные выборки *A. kendevani* и *A. cyaneus* из соседних регионов Ирана. Последние два вида согласно молекулярным реконструкциям филогенетически близки, а их ареалы в районе Шахкуха в северном Иране соприкасаются.

Анализируемые таксоны образовали 3 группы гаплотипов гена *COI* (MIT1, MIT2 и MIT3 на рисунке 1а).

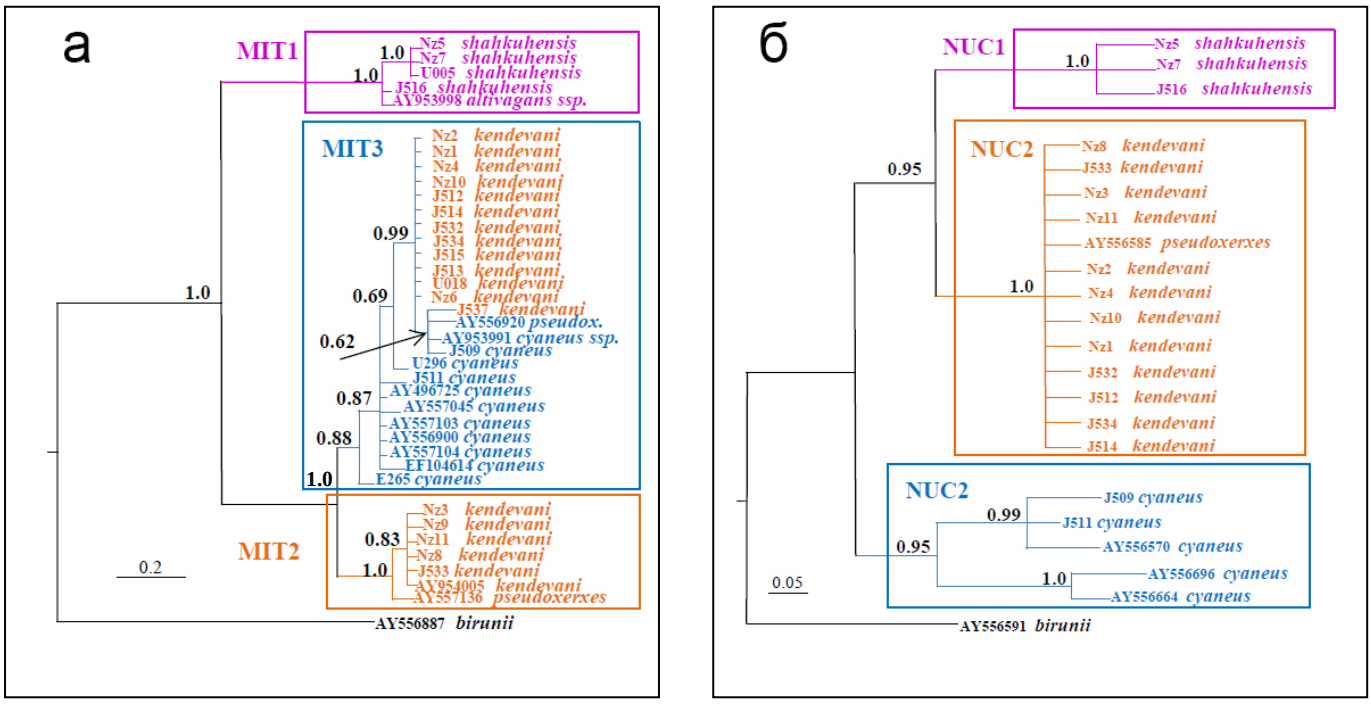

Рисунок 1. Филогенетический анализ группы *A. cyaneus* с использованием метода Байеса. Числа у основания клад показывают значения статистической поддержки (в виде постериорной вероятности соответствующих клад).

Во всех случаях хорошо кластеризовалась группа особей, впоследствии описанных нами в качестве самостоятельного, нового для науки вида под названием *A. shahkuhensis* (кластер MIT1) [Лухтанов, Шаповал, 2008; Lukhtanov, Shapoval, Dantchenko, 2008]. Анализ показал, что *A. shahkuhensis* имеет значительные отличия как от других обитающих с ним в симпатрии таксонов, так и от всех прочих таксонов группы *A. cyaneus* и занимает в ней базальное положение.

В группу MIT2 попали особи, относящиеся к виду *A. kendevani*, а также один экземпляр из ГенБанка, определенный Вимерсом [Wiemers, 2003] как *A. pseudoxerxes*. Важно отметить, что сюда входят особи *A. kendevani* лишь из одной географической точки – из Шахкуха. Наиболее интересной оказалась группа MIT3, в которую попали как представители вида *A. kendevani*, так и *A. cyaneus*.

Деревья, построенные для спейсерной последовательности *ITS2*, (рисунок 2б) также с высокой достоверностью поддерживают кладу *A. shahkuhensis* (кластер NUC1). Однако кластеризация остальных особей по *ITS2* принципиально отличалась от таковой по гену *COI*. Остальные последовательности образовывали два ясно выраженных дискретных кластера, каждый из которых чётко соответствовал таксономическому

определению. Один кластер образовали нуклеотидные последовательности особей, определённых как *A. kendevani,* а другой – особи, относящиеся к таксону *A. cyaneus*.

4.1.2 Обсуждение

Интерпретация полученных митохондриальных кластеров (рисунок 1а) может быть различной. Во-первых, наличие дискретных митохондриальных гаплотипов позволяет предположить, что *A. kendevani* (sensu lato) – полифилетический таксон, включающий в себя три криптических вида. Во-вторых, такая кластеризация может быть обусловлена не межвидовыми различиями, а быть следствием внутрипопуляционного генетического полиморфизма. В-третьих, наличие нескольких митохондриальных гаплотипов может быть следствием митохондриальной интрогрессии – заимствованию митохондрий от другого вида (или других видов).

Проблему различения между этими тремя сценариями может решить анализ двух несцепленных молекулярных признаков [Лухтанов, Шаповал, 2008]. В качестве второго маркера, заведомо несцепленного с геном *COI,* мы использовали ядерную нуклеотидную последовательность *ITS2*.

Анализ внутреннего транскрибируемого спейсера *ITS2* для тех же таксонов позволил выявить только 2 дискретных кластера (рисунок 1б). Все особи с митохондриальным гаплотипом MIT1 по последовательности *ITS2* образуют ядерный кластер NUC1. Учитывая, что:

1) исследуемые митохондриальные и ядерные маркеры не сцеплены друг с другом;
2) между кластерами нет пространственной и временной изоляции (представители разных кластеров были собраны в один день и на одной поляне);
3) представители разных кластеров не являются сибсами (сборы проводились в разные годы),

такое соответствие митохондриального (MIT1) и ядерного (NUC1) кластеров свидетельствует о репродуктивной изоляции данных особей от представителей других кластеров, т.е. о том, что эти особи представляют собой самостоятельный биологический вид.

Ядерный кластер NUC2 представлен особями, имеющими как митохондриальный гаплотип MIT2, так и MIT3 (рисунок 1).

Исходя из выше изложенного и учитывая, что носители гаплотипов из групп MIT2 и MIT3:

1) неразличимы по ядерному спейсеру *ITS2;*
2) неразличимы по кариотипам [Lukhtanov, Shapoval, 2008];
3) неразличимы по морфологии;
4) согласно нашим полевым наблюдениям в Иране встречаются совместно и синхронно в одних и тех же биотопах;

можно сделать вывод, что мы, скорее всего, имеем дело с одним видом, митохондриальный геном которого представлен двумя вариантами.

Для таксономической интерпретации полученных молекулярных данных (чтобы установить, каким таксонам соответствуют полученные кластеры) мы сравнили полученные в ходе работы последовательности с нуклеотидными данными из Генбанка. Сравнение показало, что митохондриальный гаплотип MIT3 идентичен гаплотипу таксона *A. cyaneus* из Северного Ирана; митохондриальный гаплотип MIT2 идентичен гаплотипу *A. kendevani,* известному из Центрального Эльбурса. Ядерный гаплотип NUC2 также оказался идентичен ядерному гаплотипу таксона *A. kendevani.*

Таким образом, обнаруженный нами паттерн распределения митохондриальных и ядерных гаплотипов целиком соответствует картине, ожидаемой в случае дифференциальной интрогрессии: таксон *A. kendevani* сохраняет в Шахкухе ядерный маркер *ITS2*, характерный для данного вида и в то же время характеризуется диморфизмом по митохондриальному маркеру *COI*. Обнаруженную картину трудно объяснить чем-либо иным, чем произошедшей межвидовой гибридизацией, которая привела к интрогрессии митохондрий от вида *A. cyaneus* к виду *A. kendevani*.

Анализ уровня дивергенции по последовательности *ITS2*, которая составляет 1,7% ± 0.08%, показывает, что таксоны *A. cyaneus* и *A. kendevani* разошлись достаточно давно и прошли значительный эволюционный путь. Это подтверждает и дивергенция гена *COI* между линиями *A. cyaneus* и *A. kendevani*, которая, по данным Н. Кандула с соавторами, составляет 1.18% [Kandul et al., 2007], а по нашим данным - 1.2% ± 0.05%.

В то же время, гаплотипы таксона *A. kendevani* из кластера MIT3 отличаются от наиболее близких гаплотипов таксона *A. cyaneus* из того же кластера MIT3 лишь на 1-2 замены (уровень дивергенции 0.1-0.2%). Такое высокое сходство трудно объяснить тем, что оно сохранилось с момента разделения эволюционных линий, или возникло заново как конвергенция. Все обнаруженные различия между последовательностями гена *COI* у *A. cyaneus* и *A. kendevani* касаются лишь нуклеотидов в третьей позиции кодона и селективно нейтральны, так как они не приводят к замене аминокислотного состава кодируемого белка. Нейтральная молекулярная эволюция строго дивергентна и происходит по принципу молекулярных часов [Page, Holmes, 1998], поэтому в ходе достаточно глубокой нейтральной дивергенции (1.2%), как сохранение идентичной (или близкой) молекулярной структуры, так и конвергентное появление идентичных структур в разных эволюционных линиях, является крайне маловероятным событием. Поэтому межвидовая гибридизация, приведшая к интрогрессии митохондрий от *A. cyaneus* к *A. kendevani*, является наиболее вероятным объяснением выявленной картины. Это подтверждает ещё один факт: диморфизм по митохондриальной ДНК наблюдается только у особей, пойманных в Шахкухе, но не в других местах обитания этого вида.

Полученные данные дают возможность реконструировать картину межвидовой гибридизации. В настоящее время не известно ни одной точки, где бы ареалы *A. cyaneus* и *A. kendevani* перекрывались. Однако следует отметить, что именно в районе Шахкуха-Шахруда они максимально сближаются и практически соприкасаются. Вид *A. cyaneus* в пределах своего ареала генетически (по гену *COI*) полиморфен, однако, знаменательно, что именно из Шахруда происходит гаплотип J509 *A. cyaneus*, который отличается лишь на одну нуклеотидную замену от наиболее массового гаплотипа MIT3, обнаруженного у *A. kendevani* в Шахкухе. Высокое генетическое сходство гаплотипа J509 у *A. cyaneus* и MIT3 у *A. kendevani* в Шахкухе, а также отсутствие диморфизма по митохондриальной ДНК у таксона *A. kendevani* в других точках ареала позволяет с высокой долей уверенности говорить о том, что интрогрессия произошла недавно и именно в этом районе.

4.2 Анализ межвидовой гибридизации в группе таксонов, близких к *A. carmon*

Второй случай межвидовой гибридизации был зафиксирован в монофилетической группе видов, близких к *A. carmon*.

4.2.1 Собственные данные

4.2.1.1 Филогенетический анализ таксонов группы *A. carmon*

В анализе было использовано 140 нуклеотидных последовательностей гена *COI*, полученных в ходе данного исследования, и ещё 10 последовательностей были взяты из Генбанка. Для спейсерного участка *ITS2* было получено 34 нуклеотидные последовательности. Ещё 12 последовательностей *ITS2* были взяты из Генбанка. Филогенетические деревья были построены с использованием методов максимальной парсимонии, объединения ближайших соседей, максимального правдоподобия и методом Байеса (рисунок 2). Помимо этого все полученные в ходе исследования нуклеотидные последовательности таксонов *A. karindus, A. peilei, A. morgani* и *A. morgani femininoides* были использованы для построения сети гаплотипов (рисунок 3).

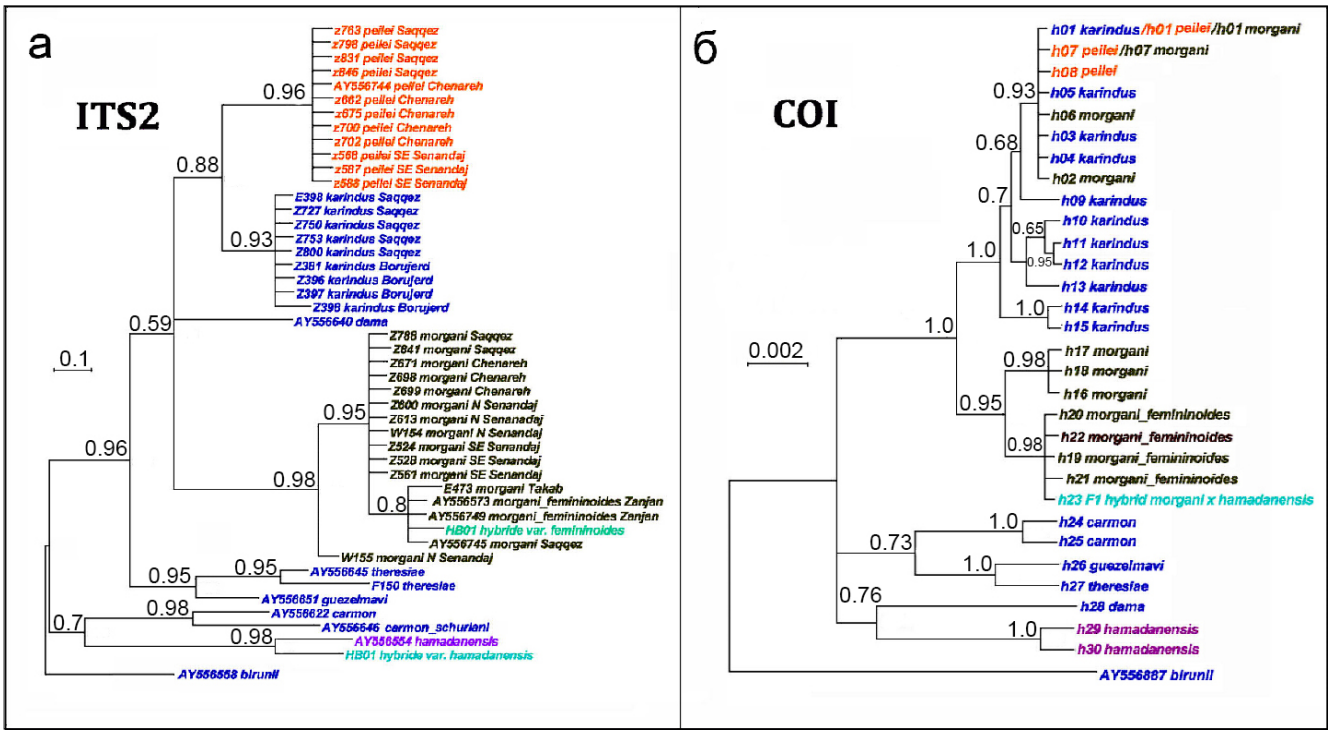

Рисунок 2. Филогенетический анализ группы *A. carmon* с использованием метода Байеса. Числа у основания клад показывают значения статистической поддержки (в виде постериорной вероятности соответствующих клад).

Необходимо отметить следующие обнаруженные особенности кластеризации особей на основании анализа гена *COI*.

(1) Все особи изучаемой группы, симпатрично обитающие в Саккезе (*A. peilei, A. karindus, A. morgani*), независимо от их видовой принадлежности, имеют идентичные или почти идентичные гаплотипы и с высокой поддержкой образуют один кластер. Однако это не является следствием недифференцированности таксонов в отношении гена *COI*, так как

(2) *A. morgani* образуют в пределах ареала две сильно дивергировавшие группы гаплотипов. Это группа H1 из западного Ирана (Саккез) и группа H6 из Восточного Сенандаджа. Восточная группа гаплотипов оказалась близка к группе H7, которую сформировали представители таксона *A. morgani femininoides.*

(3) Носители этих двух гаплогрупп (H1 и H7) *A. morgani* встречаются совместно в Ченарехе и Западном Сенандаже, то есть в местах, географически расположенных между Восточным Сенандаджем и Саккезом.

(4) Таксон *A. karindus* имеет ещё более сложную структуру гаплотипов. Проведённый анализ выявил 5 гаплогрупп. Это группа H1, куда вошли особи из Западного Ирана и группы H2-H5, куда вошли бабочки, собранные в Центральном Иране. Однако стоит отметить, что дивергенция групп H2-H5 от общего для трех таксонов гаплотипа H1 менее сильная, чем у гаплотипа H6, выявленного у таксона *A. morgani*.

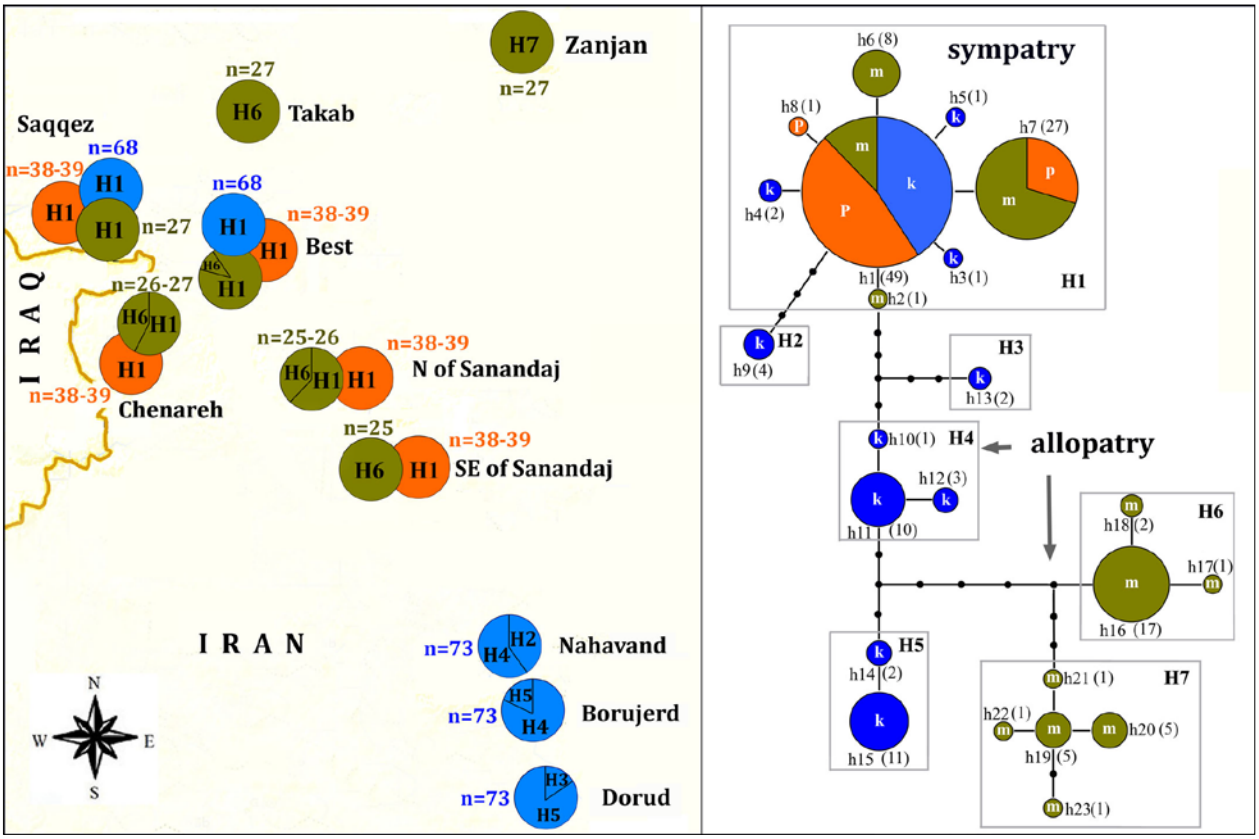

Рисунок 3. Точки сбора представителей *A. morgani* (отмечены зелёным), *A. peilei* (отмечены оранжевым) и *A. karindus* (отмечены голубым) и сеть митохондриальных гаплотипов (h1-h23 – гаплотипы; H1-H7 – гаплогруппы; в скобках указано число обнаруженных особей с данным гаплотипом).

Топология деревьев, построенных для спейсерной последовательности *ITS2* (рисунок 2а), принципиально отличалась от топологии, полученной с использованием гена *COI*, тем, что во всех случаях кластеризация гаплотипов не противоречила видовым границам.

Следует также отметить глубокую молекулярную дифференциацию клады *A. morgani*, которая отличается от остальных таксонов изучаемого комплекса не только большим числом нуклеотидных замен, но и уникальной 24-нуклеотидной делецией в средней части спейсера *ITS2*.

4.2.1.2 Оценка возраста митохондриальной интрогрессии

Время до ближайшего общего предка было рассчитано в программе BEAST v.1.7.1 [Drummond et al., 2012] для *A. peilei*, для клады H1 в целом, а также для клады *A. peilei* + *A. morgani* + *A. karindus* (рисунок 4) на основе полученных данных о последовательностях гена *COI* согласно методам калибровки, описанным ранее [Dinca et al., 2011]. Результаты анализа показали, что возраст клады H1 (и, соответственно, возраст митохондриальной интрогрессии) лежит в интервале от 2 500 до 42 600 лет, а

клады *A. peilei* + *A. morgani* + *A. karindus* - в интервале от 900 000 до 2 100 000 лет. Вероятность, что этот возраст выходит за пределы полученных интервалов меньше 5%.

4.2.2 Обсуждение

Сходство или даже полная идентичность особей *A. karindus*, *A. peilei* и *A. morgani* по митохондриальному гену *COI*, обнаруженные в зоне симпатрии этих трех видов в Саккезе и Бесте может теоретически объясняться как митохондриальной интрогрессией, так и неполной сортировкой линий (сохранением анцестрального полиморфизма) после недавних событий видообразования.

Однако против неполной сортировки линий свидетельствуют следующие факты:

(1) Филогенетические деревья, построенные на основе ядерной последовательности *ITS2*, демонстрируют совсем иную топологию. Нуклеотидные последовательности образуют 3 кластера, что хорошо согласуется с данными морфологии (окраской крыльев) и подтверждает принадлежность *A. karindus*, *A. peilei* и *A. morgani* к трем разным эволюционным линиям в пределах данной группы видов.

(2) Тот факт, что в зонах симпатрии все три таксона имеют одинаковые (h1) или очень близкие (h2-h8) гаплотипы, едва ли может быть объяснён сохранением анцестрального полиморфизма, так как линия *peilei – morgani - karindus*, достаточно древняя (0.9-2.1 млн. лет), тогда как клада H1 очень молода (0.0025-0.0426 млн. лет). Если даже предположить, что ген *COI* у этих голубянок эволюционирует с наименьшей скоростью, известной по литературным данным – 1,3% за 1 млн. лет [Quek et al., 2004], эволюционирующие независимо от общего предка *peilei – morgani - karindus* должны были накопить от 7 до 17 нуклеотидных замен в исследуемом фрагменте гена *COI*, а не 0-1, как наблюдается у этих таксонов в Саккезе и Бесте.

Аллопатрические популяции *A. morgani* и *A. karindus* имеют сложную генетическую структуру по молекулярному маркеру *COI*, что отражает длительную эволюционную историю этих таксонов. Таксон *A. peilei*, наоборот, оказался чрезвычайно гомогенным в отношении гена *COI*. Он представлен одной группой гаплотипов H1, общей в зоне симпатрии для всех трех рассматриваемых таксонов. Датировка, основанная на времени коалесценции показывает, что *A. peilei* образовался недавно - 2 100 – 36 000 лет назад.

Перечисленные факты убедительно свидетельствуют, что такая общность митохондриальных гаплотипов является следствием гибридизации, которая произошла относительно недавно (~ 2 500 - 46 000 лет назад). В ходе этой гибридизации, которая происходила на западе Ирана, где-то в районе Саккеза, *A. peilei* и *A. morgani* получили митохондрии от популяции *A. karindus*, обитавшей на северо-западе Ирана. Затем *A. morgani* с интрогрессированными митохондриями начал двигаться на восток, где вступил в контакт с популяцией, имеющей исходные митохондрии *A. morgani*. Картину расселения наглядно демонстрирует распределение гаплогрупп (рисунок 3): на западе (Саккез) всё особи *A. morgani* имеют интрогрессированные митохондрии, восточнее обитают особи как с интрогрессированными, так и с исходными митохондриями, причём доля особей с интрогрессированными митохондриями клинально уменьшается, а в популяции, обитающей к востоку от Сенандаджа, был обнаружен только исходный митохондриальный гаплотип *A. morgani*. Таким образом, в ходе внутривидовой гибридизации между этими популяциями возникла и существует в настоящее время гибридная зона, характеризующаяся диморфизмом по митохондриальному гену *COI*.

5 ГОМОПЛОИДНОЕ ГИБРИДНОЕ ВИДООБРАЗОВАНИЕ В РОДЕ *AGRODIAETUS*

Таксоны *A. morgani, A. karindus* и *A. peilei* хорошо различаются по кариотипам: *A. morgani* имеет относительно небольшое число хромосом (n=25-27), все они имеют относительно крупные размеры; *A. karindus* имеет очень большое число хромосом (n=68), почти все они имеют мелкие размеры; *A. peilei* имеет промежуточное число хромосом (n=38-39), среди которых есть как крупные, так и мелкие хромосомы.

Принимая во внимание, что а) *A. peilei, A. morgani* и *A. karindus* имеют дискретные различия в кариотипах; б) хромосомный анализ не выявил случаев современной гибридизации между этими тремя таксонами (было изучено 136 особей); в) существует полное соответствие между морфологическими (окраска крыльев), хромосомными (кариотипы), ядерными (*ITS2*) молекулярными маркерами, мы заключили, что *A. peilei, A. morgani* и *A. karindus* являются самостоятельными дискретными видами, а не просто морфами одного вида.

Ряд особенностей, характерных для таксона *A. peilei* (необычная оранжевая окраска крыльев, кариотип с промежуточным числом хромосом, митохондриальные гаплотипы, идентичные с таковыми у *A. morgani* и *A. karindus*) позволил предположить, что вид *A. peilei* имеет гибридное происхождение и образовался в результате гибридизации двух родительских видов *A. morgani* и *A. karindus.*

Для проверки этой гипотезы нами была проведена серия экспериментов по геномной *in situ* гибридизации.

5. 1 Результаты геномной *in situ* гибридизации (GISH)

5.1.1 Геномная *in situ* гибридизация без супрессорной ДНК (положительный контроль)

В первой серии экспериментов меченая проба обоих родительских и гибридного вида гибридизовалась с хромосомными препаратами без супрессорной ДНК. Во всех случаях наблюдались четкие сигналы на всех хромосомах у всех трех видов. Такой результат является положительным контролем, показывающим применимость метода GISH для решения поставленных задач.

5.1.2 Геномная *in situ* гибридизация с супрессорной ДНК (негативный контроль)

Во второй серии экспериментов на хромосомный препарат каждого из трех видов гибридизовались: 1) меченая проба того же самого вида; 2) немеченая супрессорная ДНК того же самого вида в градиентной концентрации.

В экспериментах для каждого из трех видов мы наблюдали, что в определённой концентрации супрессорная ДНК препятствует гибридизации меченой пробы, что выражается в отсутствии сигналов на хромосомном препарате. Эти результаты, во-первых, являются «негативным контролем», показывающим, что метод ДНК супрессии действительно работает, а во-вторых, дают возможность подобрать оптимальную концентрацию меченой пробы и супрессорной ДНК для каждого из видов.

5.1.3 Сравнительная геномная гибридизация (CGH)

Сравнительная геномная гибридизация (CGH) является разновидностью GISH, при которой меченые разными флуорохромами пробы от обоих родительских видов гибридизуют с хромосомным препаратом гибридного вида. Эта техника позволяет

одновременно наблюдать сигналы на одном препарате, в отличие от простой геномной гибридизации (GISH). Мы предприняли попытку одновременно гибридизировать меченые пробы обоих родительских видов на хромосомы гибридного вида без добавления супрессорной ДНК. В результате наблюдалась смесь гибридизационных сигналов на хромосомах гибридного вида, которые было трудно интерпретировать. Этот вполне ожидаемый результат свидетельствует о том, что неспецифические повторы, общие для обоих родительских видов маскируют специфические сигналы и техника CGH (гибридизация без супрессорной ДНК) в нашем случае неприемлема.

5.1.4 Тестирование гипотезы о гибридном происхождении *A. peilei*

Хромосомные препараты *A. peilei* были использованы для гибридизации в прямом эксперименте, когда на хромосомный препарат гибридизировался молекулярный зонд, полученный из ДНК *A. karindus*, в присутствии супрессорной ДНК *A. morgani* и в обратном эксперименте, когда на хромосомный препарат гибридизировался молекулярный зонд, полученный из ДНК *A. morgani*, в присутствии супрессорной ДНК *A. karindus*.

Когда меченый молекулярный зонд, полученный из ДНК *A. morgani,* гибридизировался с хромосомным препаратом *A. peilei*, большинство гибридизационных сигналов располагалось на крупных хромосомах, локализованных в центре метафазной пластинки. Когда меченый молекулярный зонд, полученный из ДНК *A. karindus,* гибридизировался с хромосомным препаратом *A. peilei*, гибридизационные сигналы располагались только на мелких хромосомах, локализованных на периферии метафазной пластинки. Такая картина гибридизации молекулярных зондов может иметь только одно объяснение: геном *A. peilei* получил мелкие хромосомы от А. *karindus*, а крупные – от *A. morgani*.

5.1.5 selfGISH

В этой серии экспериментов, полученный из ДНК *A. peilei* молекулярный зонд гибридизировался с хромосомным препаратом *A. peilei*, а в качестве супрессора одновременно использовалась ДНК *A. morgani* и *A. karindus*. Анализ хромосомных препаратов показал, что гибридизационные сигналы чрезвычайно сильно подавлены, хотя отсутствуют не полностью.

Такая картина соответствует сценарию, согласно которому таксон *A. peilei* произошел путём гомоплоидного гибридного видообразования. Присутствие редких слабых сигналов, наиболее вероятно, объясняется дивергенцией повторов, произошедшей у *A. peilei* после гомоплоидного гибридного видообразования.

5.2 Обсуждение

Кариотипы *A. morgani* (n=25-27) и *A. karindus* (n=68) сильно различаются не только по числу, но и по размеру хромосом. Поэтому в мейозе у гибридных особей каждая из крупных хромосом *A. morgani* должна была конъюгировать с двумя или более хромосомами мелкими хромосомам *A. karindus*. Таким образом, рекомбинация между хромосомами, полученными от *A. morgani* и полученными от *A. karindus,* физически была возможна. Тот факт, что ни одна из крупных хромосом *A. peilei* (полученных от *A. morgani*) не несёт сигналов от молекулярного зонда *A. karindus,* а подавляющее большинство мелких хромосом *A. peilei* (в основном полученных от *A. karindus*) не несут сигналы от молекулярного зонда *A. morgani,* говорит о том, что рекомбинация отсутствовала, или, по крайней мере, была подавлена.

Отсутствие (или низкий уровень) рекомбинации свидетельствует об отсутствии (или низком уровне) генных обменов между гибридизирующими геномами и, соответственно, о важной роли хромосом в формировании пост-зиготической изоляции между возникшим видом *A. peilei* и родительскими видами. Таким образом, непосредственно сам процесс гибридизации может приводить к возникновению пост-зиготической репродуктивной изоляции гибридного вида от родительских форм.

Гибридизация между *A. karindus* и *A. morgani* привела к формированию нового хромосомного числа (n=38-39), которое кардинально отличается от хромосомных чисел, обнаруженных у родительских видов (n=25-27 у *A. morgani* и n=68 *A. karindus*). Хромосомные числа играют важную роль в эволюции, поскольку от них зависит уровень мейотической рекомбинации. Ранее предполагалось, что эволюция хромосомных чисел происходит постепенно, за счет накопления слияний\фрагментаций хромосом внутри или между видами [Lukhtanov et al., 2011]. Наши данные показывают, что возможны быстрые, скачкообразные изменения в хромосомных числах, как результат гибридизации между видами, имеющими различия по хромосомным перестройкам.

5.3 Анализ современной (текущей) межвидовой гибридизации (природные межвидовые гибриды первого поколения и беккроссы)

5.3.1 Анализ литературных данных

Нами были собраны и проанализированы все доступные литературные данные по кариотипам с целью выявления современной гибридизации [de Lesse, 1952, 1957, 1959a-g, 1960a-b, 1961a-c, 1962a-b, 1963a-c, 1964, 1966, 1969; Lukhtanov, 1989; Kandul, Lukhtanov, 1997; Lukhtanov et al., 1997, 1998, 2003, 2006, 2008; Lukhtanov, Dantchenko, 2002a-b, 2003; Данченко, Лухтанов, 2004; Dantchenko, Lukhtanov, 2005; Лухтанов, Будашкин, 2007; Vershinina, Lukhtanov, 2010]. Данные по кариотипам известны для большого числа особей и популяций, представляющих практически все известные виды рода *Agrodiaetus*. На данный момент кариотипически изучено около 1300 особей из районов, где симпатрически обитают два и более вида, и при этом не обнаружено ни одной хромосомной гетерозиготы [Lukhtanov, 2002a; Лухтанов, Шаповал, 2008]. Сходные данные получены Вимерсом [Wiemers, 2003], обнаружившим лишь одну хромосомную гетерозиготу (1 экземпляр): гибрид F_1 между самкой *A. dantchenkoi* (n=40-42) и самцом *A. menalcas* (n=85).

5.3.2 Собственные данные и обсуждение

В ходе исследования нами была обнаружена одна особь, предположительно гибрид первого поколения, анализ окраски крыльев которой показал, что она могла появиться в результате скрещивания таксонов *A. hamadanensis* и *A. morgani femininoides*. Секвенирование гена *COI* показало, что эта особь получил митохондрии от *A. hamadanensis.* Анализ маркера *ITS2* показал, что данная особь оказалась гетерозиготой, получившей один аллель *ITS2* от *A. hamadanensis*, а второй аллель – от *A. morgani femininoides.* Таким образом, молекулярный анализ полностью подтвердил морфологическое определение. Изученный нами гибрид имеет значительные отличия от обоих родительских видов в окраске крыльев и его вполне можно принять за самостоятельный вид, если не знать о его гибридной природе. Этот пример показывает, что при скрещивании разных видов, новая (или изменённая) окраска крыльев – признак,

который служит основным фактором, обеспечивающим презиготическую изоляцию [Lukhtanov et al., 2005] – может появляться уже в одном из первых поколений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Митохондриальная интрогрессия долгое время считалась невозможной для чешуекрылых [Kandul et., 2004]. Дело в том, что митохондриальная интрогрессия вообще маловероятна для бисексуальных организмов с гетерогаметным женским полом. Это объясняется тем, что митохондрии почти всегда наследуются по материнской линии, поэтому в случае митохондриальной интрогрессии в качестве первого звена на пути передачи митохондрий должны выступать самки – гибриды первого поколения. Однако эмпирическое правило Холдейна [Coyne, Orr, 2004] предсказывает, что в случае межвидовой гибридизации особи гетерогаметного пола имеют тенденцию к пониженной (по сравнению с гомогаметным полом) выживаемости и фертильности. Так как у чешуекрылых именно самки являются гетерогаметным полом [Robinson, 1971], то можно полагать, что самки межвидовых гибридов должны иметь пониженную жизнеспособность, что может блокировать дальнейшую передачу митохондрий [Kandul et., 2004].

Действительно, правило Холдейна соблюдается для чешуекрылых [Presgraves, 2002]. Однако полученные нами эмпирические данные показывают, что гетерогаметность самок не является непреодолимым препятствием для межвидовой передачи митохондриальных генов. Более того, нами показано, что митохондриальная интрогрессия возможна даже в тех случаях, когда вступающие в гибридизацию виды резко различаются по числу хромосом, и можно ожидать, что против гибридов первого поколения будет действовать не только генетически обусловленная несовместимость, но и отбор против хромосомных гетерозигот [King, 2003].

Поскольку митохондриальная интрогрессия невозможна в отсутствие возвратных скрещиваний (см. раздел 2.1), то сам факт митохондриальной интрогрессии говорит о том, что межвидовая гибридизация приводила к появлению особей, которые были, по крайней мере, частично, фертильны. Эта находка показала, что реализация модели гомоплоидного гибридного видообразования, основанной на сегрегации хромосом у гибридов, полученных в результате скрещивания видов с дивергировавшими кариотипами [Coyne, Orr, 2004], в роде *Agrodiaetus* в принципе возможна. Для реализации этой модели требуются две предпосылки: 1) наличие хромосомно дифференцированных видов, вступающих в гибридизацию, и 2) фертильность гибридов, позволяющая возвратные скрещивания. Обе предпосылки были обнаружены в роде *Agrodiaetus*, что побудило нас предпринять попытки поиска гомоплоидных гибридных видов.

В качестве основной мишени была выбрана система, состоящая из трех видов: *A. karindus, A. morgani* и *A. peilei*. Следующие обнаруженные нами факты позволили сделать предположение, что *A. peilei* является гибридным диплоидным видом. Во-первых, было установлено, что между видами *A. morgani* и *A. karindus* происходила гибридизация, приведшая к митохондриальной интрогрессии. Во-вторых, *A. peilei* имеет крайне необычную окраску крыльев, а хорошо известно, что необычные морфотипы нередко являются следствием гибридизации [Malet, 2007]. В-третьих, *A. peilei* имеет необычную структуру кариотипа и число хромосом, промежуточное между числами, найденными у *A. morgani* и *A. karindus*. Наконец, крайне молодой возраст *A. peilei,* наряду с сильной морфологической и кариотипической дифференциацией также наводил на мысль о гибридном происхождении.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы осуществили ряд экспериментов по геномной гибридизации *in situ*, которые подтвердили, что *A. peilei* является гибридным диплоидным видом и показали, что в ходе гибридизации между *A. karindus* и *A. morgani* геном *A. peilei* получил мелкие хромосомы от *A. karindus*, а крупные – от *A. morgani*.

Для сохранения существования гибридной линии в симпатрии с родительскими видами важны оба компонента репродуктивной изоляции: как пост-, так и презиготическая изоляция [Buerkle, 2000]. Различия в кариотипах могут быть фактором, ограничивающим обмен генами с родительскими формами, и, таким образом, выступающим в роли постзиготического барьера. В качестве презиготических барьеров у бабочек рода *Agrodiaetus* выступает окраска крыльев самцов, на основании которой самки выбирают для спаривания конспецифичных партнеров [Lukhtanov et al., 2005]. Полученные нами данные показывают, что гибридный вид *A. peilei* имеет измененную окраску крыльев, а анализ природного межвидового гибрида между *A. hamadanensis* и *A. morgani femininoides* показал, что измененная окраска крыльев может возникать очень быстро, вероятно, уже у гибридов первого поколения.

ВЫВОДЫ

1. В эволюционной истории таксонов голубянок, близких к *A. cyaneus*, происходила межвидовая гибридизация, в ходе которой митохондрии *A. cyaneus* были переданы близкородственному виду *A. kendevani*. В результате интрогрессии популяция *A. kendevani* из Шахкуха в Северном Иране (но не другие популяции этого вида) сохраняет ядерный маркер *ITS2*, характерный для данного вида, и в то же время характеризуется диморфизмом по митохондриальному маркеру *COI*.
2. Высокое генетическое сходство митохондриальных гаплотипов *A. cyaneus* из Шахруда и одной из митохондриальных гаплотипических групп *A. kendevani* из Шахкуха, а также отсутствие этих гаплотипов в других регионах Ирана указывает на то, что интрогрессия произошла относительно недавно в восточной части хребта Эльбурс в Северном Иране.
3. Неконгруэнтность топологий, основанных на митохондриальной и ядерной последовательностях, свидетельствует о межвидовой гибридизации, произошедшей в недалёком прошлом между таксонами *A. karindus* и *A. morgani*. В ходе этой гибридизации митохондрии, свойственные *A. morgani* в популяциях из Курдистана (Западный Иран), были утрачены и заменены митохондриями *A. karindus*.
4. Гибридизация между *A. morgani* и *A. karindus* привела к появлению диплоидного гибридного вида *A. peilei*. В ходе гибридизации этот вид унаследовал крупные хромосомы от *A. morgani*, а мелкие от *A. karindus*.
5. Молекулярно-цитогенетический анализ не выявили заметных следов рекомбинации между геномами *A. morgani* и *A. karindus* в ходе межвидовой гибридизации, что косвенно свидетельствует о важной роли хромосом в формировании пост-зиготической изоляции между возникшим видом *A. peilei* и родительскими видами.
6. Гибридизация между видами *A. morgani* и *A. karindus*, различающимися по большому числу хромосомных слияний/разделений, привела к появлению нового кариотипа, характеризующегося резко измененным числом хромосом.
7. Анализ окраски крыльев природного гибрида между *A. hamadanensis* и *A. morgani femininoides* показывает, что новый тип окраски крыльев, признака, который играет важную роль в формировании презиготических барьеров, может возникнуть в ходе гибридизации, вероятно, уже у гибридов первого поколения.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Лухтанов, В. А. Выявление симпатрично обитающих видов-двойников бабочек из комплекса *Agrodiaetus kendevani* (Lepidoptera, Lycaenidae) с помощью популяционного анализа несцепленных генетических маркеров / В. А. Лухтанов, **Н. А. Шаповал** // Доклады Российской академии наук. – 2008. – Т. 423. – № 3. – С. 421–426.

Lukhtanov, V.A. *Agrodiaetus shahkuhensis* sp. n. (Lepidoptera, Lycaenidae), a cryptic species from Iran discovered by using molecular and chromosomal markers / V. A. Lukhtanov, **N. A. Shapoval**, A. V. Dantchenko // Comparative Cytogenetics. – 2008. – V. 2. – № 2. – P. 99–114.

Cacopsylla fraudatrix sp.n. (Hemiptera: Psylloidea) recognized from testis structure and mitochondrial gene *COI* / V. G. Kuznetsova, E. S. Labina, **N.A. Shapoval**, A. Maryańska-Nadachowska, V. A. Lukhtanov // Zootaxa. – 2012. – № 3547. – P. 55–63.

Шаповал, Н. А. Виды-двойники чешуекрылых комплекса *Agrodiaetus cyaneus* (Insecta, Lepidoptera, Lycaenidae), выявленные с помощью митохондриальных и хромосомных маркеров / Н. А. Шаповал, В. А. Лухтанов, А. В. Данченко // IV Международная конференция по кариосистематике беспозвоночных животных. – Санкт-Петербург. – 2006. – С. 58.

Шаповал, Н. А. Анализ криптического видового разнообразия у чешуекрылых рода *Agrodiaetus* (Lepidoptera, Lycaenidae) с помощью молекулярных и хромосомных маркеров / Н. А. Шаповал, В. А. Лухтанов // Проблемы и перспективы общей энтомологии. Тезисы докладов XIII Съезда Русского энтомологического общества. – Краснодар. – 2007. – С. 403-404.

Шаповал, Н.А. Филогеография бабочек-голубянок группы *Agrodiaetus cyaneus* (Lepidoptera, Lycaenidae) по данным молекулярно-генетического и цитогенетического анализа / Н. А. Шаповал, В. А. Лухтанов // V Международная конференция по кариосистематике беспозвоночных животных. – Новосибирск. – 2010. – С. 77.

Молекулярно-цитогенетические исследования беспозвоночных животных с использованием методов флуоресцентной (FISH) и геномной (GISH) гибридизации ДНК *in situ* / В. Г. Кузнецова, В. А. Лухтанов, **Н. А. Шаповал**, Б. А. Анохин // Отчетная научная сессия по итогам работ 2010 г. Тезисы докладов. Зоологический институт Российской академии наук. – Санкт-Петербург. – 2011. – С. 19-20.

Гибридное видообразование у насекомых: анализ молекулярных и цитогенетических данных / В. А. Лухтанов, В. Г. Кузнецова, **Н. А. Шаповал**, Б. А. Анохин // Материалы XIV съезда Русского энтомологического общества. – Санкт-Петербург. – 2012. – С. 257.

Обнаружение нового вида листоблошек *Cacopsylla* (Homoptera: Psyllinea) на основании изучения семенников и митохондриального гена *COI* / Е. С. Лабина, В. Г. Кузнецова, **Н. А. Шаповал**, В. А. Лухтанов // Материалы XIV съезда Русского энтомологического общества. – Санкт-Петербург. – 2012. – С. 238.

Хромосомы и гибридное видообразование у насекомых / В. А. Лухтанов, В. Г. Кузнецова, **Н. А. Шаповал**, Б. А. Анохин // Материалы Международной научной конференции «Хромосома 2012». – Новосибирск. – 2012. – С. 130.

Шаповал, Н. А. Вторичная структура рибосомальной ДНК в филогенетике и систематике насекомых / Н. А. Шаповал // Материалы XIV съезда Русского энтомологического общества. – Санкт-Петербург. – 2012. – С. 473.