

## **Аннотация**

В настоящей работе проведена оценка времени формирования дизъюнктивных ареалов у палеарктических ленточников *Limenitis camilla*, *L. sydyi*, *L. helmanni*, на основе последовательностей ДНК фрагментов гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (*COI*) и гена гистона H1. Фрагмент гена *COI* был расшифрован у 51 образца трех видов *Limenitis* из разных дизъюнктивных частей их ареалов и был использован для получения формальной оценки времени формирования дизъюнктивных ареалов с использованием байесовского подхода. Фрагмент гена гистона H1 был расшифрован у 64 образцов у восьми видов ленточников, была выявлена внутривидовая и внутригеномная гетерогенность среди последовательностей гена гистона H1. В ходе использования последовательностей фрагментов гена гистона H1 для построения филогенетических деревьев были получены оценки темпа замен для гена гистона H1 для различных ветвей. Отсутствие зафиксированных замен в последовательностях гена *COI* и гистона H1 у данных видов между восточными и западными частями ареалов, свидетельствуют о том, что дизъюнкции ареалов этих видов происходили относительно недавно и имели место не более чем 77–110 тыс. лет назад.

### **1. Тема работы:**

Оценка времени формирования дизъюнктивных ареалов у неморальных чешуекрылых в Палеарктике.

### **2. Состав коллектива:**

Костерин Олег Энгельсович, д.б.н., зав. лабораторией, Институт Цитологии и генетики СО РАН, доцент кафедры цитологии и генетики ФЕН НГУ;

Соловьев Владимир Игоревич, ст. преподаватель НГУ

Богданова Вера Сергеевна, д.б.н., с.н.с., Институт Цитологии и генетики СО РАН.

### **3. Информация о гранте:**

Бюджетные проекты: FNI-0247-2021-004, FWNR-2022-0019,  
грант РФФИ 16-34-00845

### **4. Научное содержание работы.**

#### *4.1. Постановка задачи.*

В ходе климатических изменений происходят движения границ ареалов видов растений и животных, в ряде случаев единые ареалы могут разрываться, при этом формируются так называемые дизъюнктивные (разорванные) ареалы. Ареалы подобного типа характерны для целого ряда неморальных (связанных с зоной широколиственных лесов) чешуекрылых в Евразии. Ранее рядом авторов полагалось, что данные разрывы сформировались в Плейстоцене, т.е. 1,6- 2,5 млн. лет назад (Матушкин, 1976; Бельшев и Харитонов, 1981; Положий и Крапивкина, 1985; Mikkola 1987; Логунов 1996; Ермаков 1998; Крапивкина, 2007). Однако, имеющиеся данные о существовании единого пояса широколиственных лесов в Евразии в эпоху климатического оптимума Голоцена, т. е. около 5–7,5 тыс. лет назад (см. Dubatolov, Kosterin, 2000), позволило предполагать сравнительно недавний характер данных дизъюнкций. Верификация данного предположения возможна с использованием молекулярных маркеров. Род Ленточник

(*Limenitis*) интересен тем, что целых три вида рода имеют подобные дизъюнктивные ареалы: *L. camilla* -амфипалеарктический, а *L. sydyi* и *L. helmanni* -алтайско-дальневосточный (Рис. 1). Известно, что североамериканские виды рода *Limenitis* являются сестринскими палеарктическому *L. populi*, т. е. имеет место амфиберингийская родовая дизъюнкция, датируемая около 9 млн. лет назад (Mullen et al., 2006,2010, Ebel et al., 2015). Оценка изменчивости молекулярных маркеров в паре *L. populi* и одного из неарктических видов и сравнение ее с изменчивостью между частями дизъюнктивных ареалов у трех вышеуказанных видов позволяет подтвердить или опровергнуть гипотезу о недавнем, голоценовом происхождении данных дизъюнкций. Целью настоящего исследования является оценка времени формирования дизъюнктивных ареалов палеарктических ленточников (*Limenitis*) с использованием фрагментов гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы и гена гистона H1.

#### 4.2. Современное состояние проблемы

В последние годы активно исследуется молекулярная филогеография и таксономия арктоальпийских видов чешуекрылых (Schmitt, Hewitt 2004; Schmitt et al., 2006; Huemer, Hausmann, 2009, Huemer, Hebert, 2011; Mutanen et al., 2012, Todisco et al., 2012, Huemer, Mutanen, 2012; Huemer et al, 2014; Kirichenko et al., 2015). Ныне существующие арктоальпийские дизъюнкции чаще всего привлекают исследователей, во-первых, в таксономическом отношении, например, выявление криптических видов, разделение единых дизъюнктивных видов на аллопатрические (Mutanen et al, 2012, Huemer et al., 2014, Kirichenko et al., 2015), во-вторых, в филогеографическом аспекте, т.е. в связи с вопросами о движениях биоты, границах ареалов этих видов в периоды оледенений, наличия дополнительных рефугиумов (например Schmitt et al., 2006, для обзора см. Schmitt, 2007, Shmitt, 2009, Varga & Schmitt, 2008; Schmitt, 2017).

Большое количество исследований посвящено филогеографии видов, обладающих огромными транспалеарктическими ареалами, преимущественно в таежной зоне. При этом особое внимание уделялось фрагментации ареалов в прошлом, во время последних похолоданий климата, а именно выяснению местоположения «ледниковых рефугиумов» и путей заселения современных ареалов в голоцене (de Lattin, 1967; Babik et al., 2004; Ursenbacher et al., 2006; Zink et al., 2002; Oshida et al., 2005; Fedorov et al., 2005; Saitoh et al., 2010; Uimaniemi et al., 2000; Hundertmark et al., 2002; Goropashnaya et al., 2004; Joedicke et al, 2004; Bernard et al., 2011; Schmitt, Varga, 2012).

Исследований, посвященных молекулярной филогеографии бореальных видов с дизъюнктивными ареалами известно не так много: для бореомонтанных жуков-листоедов (Mardulyn et al., 2009, Quinzin & Mardulyn, 2014, Quinzin et al., 2017), для амфипалеарктической бореальной стрекозы, *Nehalennia speciosa* (Bernard et al., 2011, Suvorov, 2011), для амфиберингийской толстоголовки *Hesperia comma* (Forister et al., 2004). Генетическая изменчивость между популяциями исследовалась между изолятами бореомонтанного вида с фрагментированным ареалом *Lycaena helle* (Finger et.al, 2009, Habel et al, 2011).

Исследований же дизъюнкций неморальных видов практически не проводилось, в качестве исключения можно привести наши собственные работы, где мы получили оценки времени формирования дизъюнкций у субнеморального вида *Eversmannia exornata* (Solovyev et al., 2015), которое оказалось сравнительно малым (менее 100 тыс. лет), а также исследования неморального вида *Lythosia quadra* (Dubatolov et. al, 2016).

Таким образом, исследование дизъюнкций у неморальных видов и оценка времени их возникновения представляет собой актуальную научную задачу.

#### 4.3. Подробное описание работы, включая используемые алгоритмы.

Выравнивание полученных последовательностей для филогенетического анализа проводилось с использованием алгоритма ClustalW (Larkin, 2007) в составе пакета MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Программа BEAST 1.8.4 (Drummond, Rambaut, 2007) была использована для: (i) построения филогенетического дерева и оценки темпов замен в гене гистона H1 для 8 видов ленточников, (ii) для формальной оценки времени формирования дизъюнктивных ареалов у трех видов ленточников на основе последовательности фрагмента гена первой субъединицы цитохром-с-оксидазы (*COI*). С помощью программы jModelTest 2.1.10 (Darriba et al., 2012; Guindon, Gascuel, 2003) в качестве наиболее подходящей модели в обоих случаях была выбрана модель замен НКУ+G. Для первой цели в качестве модели видообразования были выбраны модель Юла, во-втором случае использовалась модели видообразования Юлы и birth-and-death. Анализ МСМС проводился в ходе 6 независимых запусков с длиной цепи 10 миллионов поколений.

#### 4.4. Полученные результаты.

(i) Расшифрованы последовательности фрагмента гена цитохром-с-оксидазы *COI* у 51 образца трех видов *Limenitis* из различных дизъюнктивных частей ареала, и показали небольшую степень изменчивости между представителями разных частей дизъюнктивных ареалов. Выявлено 10 полиморфных сайтов у *L. helmanni*, 2 полиморфных сайта у *L. sydyi*. Наибольшую изменчивость продемонстрировали последовательности *L. helmanni* и были использованы для получения формальной оценки времени формирования дизъюнкций у *L. helmanni* с помощью байесовского подхода – 194 тыс. лет (для модели Юла) и 247 тыс. лет (для модели birth-and-death).

(ii) Выявлен вариант гена цитохром-с-оксидазы у *L. camilla*, отличающаяся от митохондриальной по 39 синонимичным и 4 несинонимичным позициям и, вероятно, представляющий ядерную копию митохондриального гена (NUMT).

(iii) Расшифрованы последовательности фрагмента гена гистона H1 у 64 образцов для восьми видов *Limenitis* (*L. camilla*, *L. sydyi*, *L. helmanni*, *L. populi*, *L. moltrechti*, *L. amphysa*, *L. reducta*, *L. arthemis*).

(iv) При изучении последовательностей гена гистона H1 для шести видов *Limenitis* обнаружена гетерогенность по инсерциям-делециям как на внутривидовом уровне, так и цис-гетерогенность в паралогичных копиях в пределах одного организма.

(v) С помощью метода количественного ПЦР в реальном времени определена количество копий генов гистона H1 у изученных видов: 70–80 у *L. camilla*, *L. sydyi*, *L. populi* и около 30–50 у *L. helmanni*.

(vi) У трех исследованных видов с дизъюнктивными ареалами в фрагменте гена гистона H1 не выявлено зафиксированных нуклеотидных различий между дизъюнктивными частями, которые свидетельствовали об давней, плейстоценовой датировке формирования разорванных ареалов. За время дивергенции рода ген гистона H1 накопил достаточную степень изменчивости, чтобы использовать его для датировок плейстоценовых событий. С применением байесовского подхода было построено

филогенетическое дерево на основе последовательностей фрагмента гена гистона H1 (Рис. 2) и была произведена оценка скорости замен в гене гистона H1 у *Limenitis*, которая составила  $6,2 \cdot 10^{-9}$  замен на сайт на год, что является близким к оценке скорости COI  $7,5 \cdot 10^{-9}$  замен на сайт на год и позволяет использовать ген гистона H1 на сходных эволюционных дистанциях в качестве филогенетического маркера.

#### 4.5. Иллюстрации, визуализация результатов.

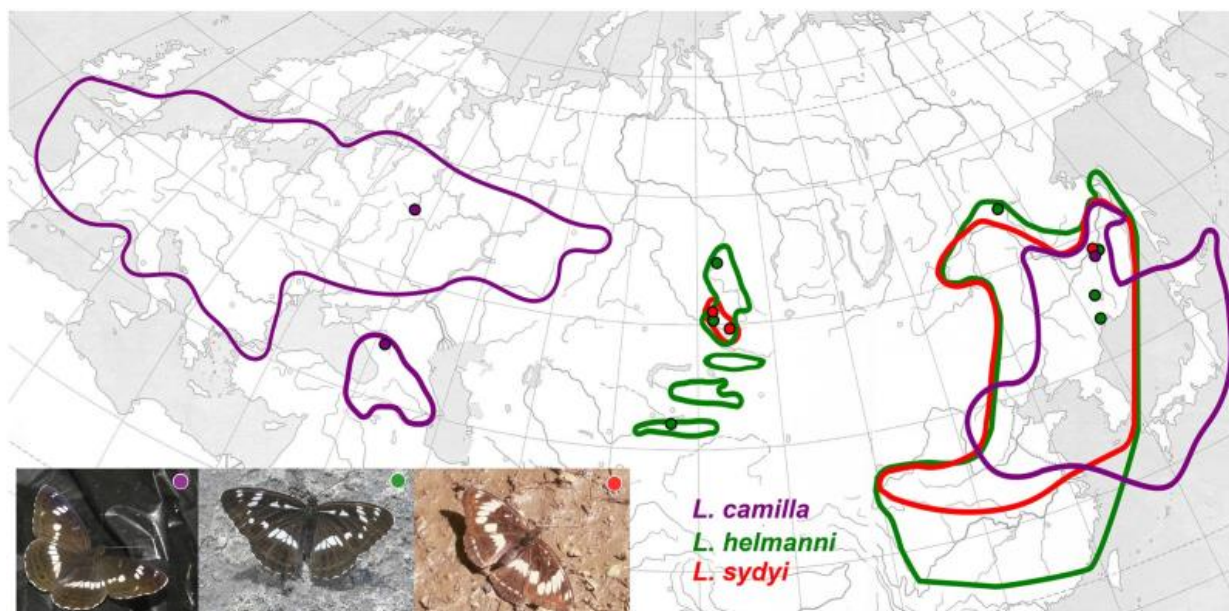


Рис. 1. Дизъюнктивные ареалы у представителей *Limenitis* в Палеарктике

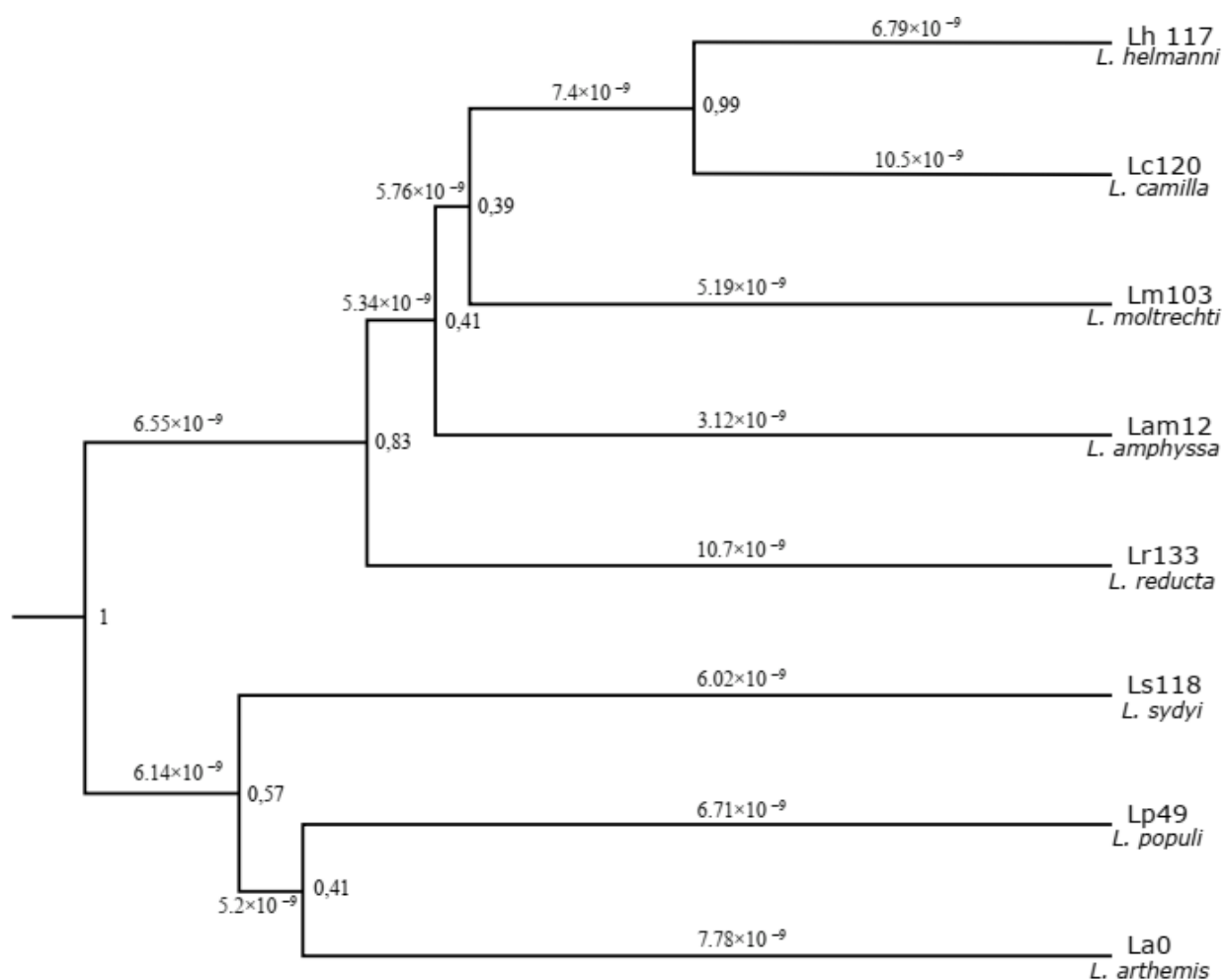


Рис. 2. Консенсусное байесовское дерево для *Limenitis* spp, полученное на основании анализа фрагментов гена гистона H1. В узлах дерева приведена постериорная вероятность, над ветвями указаны оценки скорости замен в гене гистона H1. Все представленные виды, за исключением неарктического *L. arthemis* населяют Палеарктику. Наиболее близким к *L. arthemis* из палеарктических видов является *L. populi*.

## **5. Эффект от использования кластера в достижении целей работы.**

Байесовские алгоритмы для реконструкции филогенетических отношений между видами подразумевает численные расчеты с помощью марковских цепей (MCMC) и позволяют достичь хороших результатов при проведении десятков и сотен миллионов испытаний, что и делает необходимым использование высокопроизводительных компьютеров.

## **6. Перечень публикаций, содержащих результаты работы**

**Solovyev, V. I., Dubatolov, V. V., Vavilova, V. Y., & Kosterin, O. E. (2022).** Estimating range disjunction time of the Palearctic Admirals (*Limenitis* L.) with *COI* and histone H1 genes. *Organisms Diversity & Evolution*. (Импакт-фактор 2,663)  
<https://doi.org/10.1007/s13127-022-00565-9>