

## Генетико-эволюционные и таксономические взаимоотношения у видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* Палеарктики

Г. Г. Гончаренко, А. А. Сурков, В. Г. Митрофанов, Л. И. Корочкин

### Введение

Более полувека виды-двойники *Drosophila* группы *virilis* являются одними из основных объектов для различных генетических исследований. Представители этой группы двойниковых видов успешно использовались в качестве модельной системы для изучения процессов видообразования (Patterson, Stone, 1952; Майр, 1963; Гончаренко и др., 1989), генетики развития (Корочкин и др., 1975), молекулярной эволюции (Nei, 1971; Throckmorton, 1982; Spicer, Bell, 2002), а также таксономии и систематики (Гончаренко, Емельянов, 1990; Goncharenko, Emeljanov, 1992). В пределах группы *virilis* в настоящее время насчитывается 14 видов-двойников, которые подразделяются на две филлады – филлада *virilis* и *montana*. Несмотря на то, что виды *Drosophila* группы *virilis* широко использовались в генетических экспериментах многие вопросы касающиеся таксономических и эволюционно-филогенетических взаимоотношений между ними остаются предметом дискуссий.

Целью данной работы является анализ генетико-эволюционных и таксономических взаимоотношений у видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*, обитающих в природных популяциях Палеарктики с использованием генов, кодирующих различные изоферменты.

### Материалы и методы

Ареалы распространения палеарктических видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* обитающих в природных популяциях на территории России, Беларуси и сопредельных стран, а также месторасположение проанализированных популяций показаны на рис. 1. *D. virilis* Sturtevant встречается только в южных районах Палеарктики на винных и соковых заводах. По данному виду проанализированы особи из 3 популяций (Украина – Закарпатье, Россия – Краснодарский край). Другие 4 вида обитают в естественных лесах, вблизи незагрязненных рек и водоемов. *D. lummei* Hackman распространена севернее *D. virilis*, однако ареалы этих двух видов отчасти перекрываются в районах Закарпатье, Кавказа и Японских островов. Особи *D. lummei* взяты для анализа из 7 популяций (Молдавия, Беларусь, Финляндия, Россия – Краснодарский край, Московская и Новосибирская обл.). *D. montana* Stone, Griffen, Patterson, по-видимому, имеет типичный бореомонтанный ареал. Выборка особей этого вида была сделана в 4 популяциях (Украина – Карпаты, Россия – Краснодарский край, Карелия, Камчатка). Представители вида *D. ezoana* Takada, Okada отловлены и проанализированы нами в 5 популяциях (Алтай, Приморский край, Камчатка, Сахалин). Подвид *D. littoralis littoralis* Meigen исследован в 20 популяциях (Украина, Беларусь, Финляндия, Кыргызстан, Россия – Карелия, Алтай, Московская и Новосибирская обл.). Особи другого подвида – *D. littoralis imeretensis* Goncharenko, Mitrofanov, Sokolov, обитающего только на Кавказе, исследованы в 8 популяциях (Россия – Краснодарский край, Грузия).

Название и расположение популяций *Drosophila* группы *virilis*\*. *D. virilis*: г. Краснодар, КК, 1981\*\*; г. Северский, КК, 1981; г. Мукачево, Укр, 1986. *D. lummei*: вблизи г. Тирасполь, Мл, 1984; вблизи г. Геленджик, КК, 1982; вблизи г. Гомель, Бл, 1983-1986; вблизи г. Орша, Бл, 1985; вблизи г. Москва, МО; вблизи г. Оулу, Фн; р. Обь в 100 км южнее г. Новосибирск, НО, 1985-1988. *D. montana*: вблизи г. Геленджик, КК, 1982; вблизи г. Мукачево, Укр, 1986; Карельское побережье Белого моря, Кр, 1985; р. Камчатка в 200 км от устья, КО, 1988. *D. ezoana*: р. Катунь, АК, 1988; Уссурийский заповедник, ПК, 1987; заповедник "Кедровая

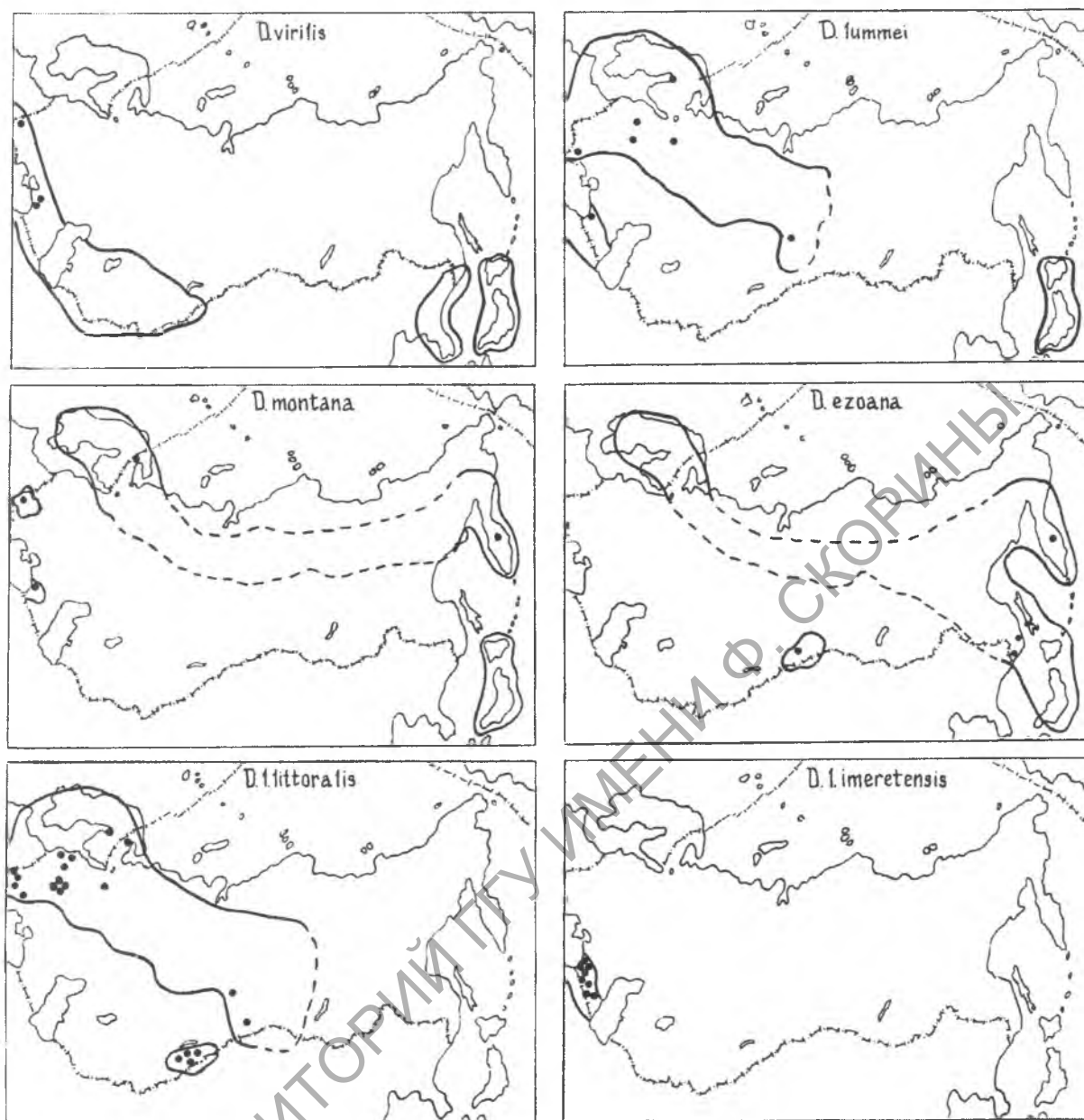


Рис. 1. Места взятия выборок и распространение палеарктических видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* на территории Беларуси, России и сопредельных стран (Гончаренко, Емельянов, 1990; Goncharenko, Emeļjanov, 1992). Зона обитания видов, группы *virilis* в Феноскандии, Японии, Китае, и Корее обозначены на основании данных Лаковаары с соавторами и Трокмортонна (Lakovaara et al., 1976; Throckmorton, 1982).

Падь", ПК, 1987; р. Камчатка в 200 км от устья, КО, 1988; вблизи г. Южносахалинск, СО, 1990. *D. l. littoralis*: вблизи г. Мукачево, Укр, 1986; р. Латорица в 10 км восточнее Мукачево, Укр, 1985; г. Воловец, Укр, 1986; вблизи г. Черновцы, Укр, 1985; Галые болота восточнее г. Гомель, Бл, 1981-1984; ручей в 10-км южнее г. Гомель, Бл, 1984-1987; вблизи г. Речица, Бл, 1985; п. Гаголи, недалеко от устья р. Березина, Бл, 1985; вблизи г. Орша, Бл, 1985; вблизи

\* – используемые сокращения: КК – Краснодарский кр.; Укр – Украина; Мл-Молдавия; Бл – Белоруссия; МО – Московская обл.; Фн – Финляндия; НО – Новосибирская обл.; Кр – Карелия; КО – Камчатская обл.; АК – Алтайский кр.; ПК – Приморский кр.; СО – Сахалинская обл.; Лт – Латвия; Кз – Киргизия; Гр – Грузия; Кх – Казахстан; ЧАО – Чукотский АО; КрК – Красноярский кр.; СК – Ставропольский кр.

\*\* – год сбора. Если год отсутствует, то особи были собраны до 1980г.

г. Цесие, Лт, 1989; национальный парк "Гауя", Лт, 1989; вблизи п. Кропотово, МО; вблизи г. Оулу, Фн; Карельское побережье Белого моря, КР, 1985; вблизи г. Талас, Кз, 1986-1987; Таш-Арык в 15 км восточнее г. Талас, Кз, 1987; Киргизский хребет р. Кен-Кол, Кз, 1986; Чаткальский хребет в верховьях р. Чаткал, Кз, 1988; р. Обь в 100 км южнее г. Новосибирск, НО, 1887-1989; р. Катунь, АК, 1989. *D. l. imeretensis*: вблизи г. Геленджик, КК, 1982; п. Лермонтовка побережье Черного моря, КК, 1981; п. Мирный в 45 км севернее п. Лермонтовка, КК, 1981; п. Убинка в 60 км севернее п. Лермонтовка, КК, 1982; р. Безымянка в 30 км севернее п. Лермонтовка; вблизи п. Гумати, Гр; вблизи п. Мцхета, Гр; п. Кеда восточное побережье Черного моря, Гр.

Отловленных взрослых самок отсаживали в отдельные пробирки для откладки яиц, а самцов подвергали электрофоретическому исследованию. Через несколько дней после откладки яиц самок также анализировали на изоферментный состав. Для определения генотипа самца, оплодотворившего самку, исследовали от 2 до 10 взрослых потомков от каждой самки. Данные по популяциям Грузии, Московской обл. и Финляндии получены на основании анализа лабораторных линий. В этих случаях считалось, что каждая линия несет только один ген дикого типа.

Взрослые особи палеарктических видов *Drosophila* группы *virilis* исследовались методом электрофореза. Каждая особь гомогенизировалась в 25 мкл дистиллированной воды или гелевого буфера. Электрофоретическое фракционирование гомогенизированных экстрактов индивидуальных особей проводилось нами по 11 ферментам в 13-14% крахмальном геле с использованием двух буферных систем: А) трис-ЭДТА-боратная, рН 8.6; В) трис-цитрат, рН 6.2. Все параметры электрофоретического фракционирования, а также экстракция и гистохимическое выявление ферментов подробно приведены нами ранее (Гончаренко и др., 1984; Гончаренко, 1987; Goncharenko et al., 1985). Название ферментов, их кодовый номер, предпочитаемая для анализа буферная система, а также количество используемых локусов приведены в табл.1. Каждая муха была исследована по 15 генам, кодирующим 11 ферментов (табл.1.). Обозначение выявленных электрофоретических вариантов дано по общепринятой номенклатуре Пракаша с соавторами (Prakash et al., 1969), в соответствии с которой наиболее часто встречающийся электроморф по каждому локусу у *D. virilis* и кодирующий его аллель обозначались символом 1.00, а все другие аллельные варианты, встреченные у проанализированных нами видов *Drosophila* группы *virilis* обозначены цифровыми символами в зависи-

Таблица 1. Ферменты и количество локусов, использованные для анализа видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* Палеарктики

Фермент	Аббревиатура	Буферная система	Кодовый номер	Количество локусов
Алкогольдегидрогеназа	ADH	А	1.1.1.1.	1
Гексокиназа	HK	А	2.7.1.1.	2
Изоцитратдегидрогеназа	IDH	В	1.1.1.42.	1
Кислая фосфатаза	ACPH	А	3.1.3.2.	1
Малатдегидрогеназа	MDH	В	1.1.1.37.	2
Малик	ME	А	1.1.1.40	1
Октанолдегидрогеназа	ODH	А	1.1.1.1.	1
Фосфоглюкомутаза	PGM	А	2.7.5.1.	1
Эстераза	EST	А	3.1.1.1.	3
Фумараза	FUM	А	4.2.1.2.	1
$\alpha$ -Глицерофосфатдегидрогеназа	GPDH	В	1.1.1.8.	1

мости от их электрофоретической подвижности относительно 1.00. Нулевые аллели обозначены символом 0.

Для оценки генетической близости и дифференциации среди представителей *Drosophila* группы *virilis* использовался коэффициент генетической дистанции Неи,  $D_N$  (Nei, 1972), который учитывает различия в аллельных частотах всех проанализированных локусов:

$$D_N = - \ln I_N, \quad I_N = \frac{\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R x_{ij} y_{ij}}{\sqrt{(\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R x_{ij}^2) (\sum_{j=1}^L \sum_{i=1}^R y_{ij}^2)}}$$

где  $x_{ij}$  и  $y_{ij}$  — частоты  $i$ -того аллеля  $j$ -того локуса сравниваемых таксонов.

Если  $D_N$  равно 0, то таксоны идентичны. Чем больше значение  $D_N$ , тем менее они родственны. Считается, что коэффициент дистанции Неи дает наиболее точные оценки генетической дифференциации, и поэтому он широко используется практически всеми исследователями. Дендрограмма отражающая картину генетических взаимоотношений между исследованными видами *Drosophila* группы *virilis* на основании коэффициентов  $D_N$  была построена путем невзвешенного парногруппового метода кластерного анализа (UPGMA) (Sneath, Sokal, 1973).

Еще одним достоинством коэффициента генетической дистанции Неи ( $D_N$ ) является то, что он позволяет рассчитывать время дивергенции ( $t$ ) таксонов различного ранга исходя из следующего соотношения:

$$t = \frac{D_N}{2 c n \lambda}$$

где  $c$  — доля аминокислотных замещений, которая может быть определена посредством электрофореза,  $n$  — общее количество кодонов, связанных с синтезом полипептида, и  $\lambda$  — средняя скорость аминокислотных замещений (Nei, 1971). Согласно Неи (1971),  $t = 7.4 \times 10^5 D_N$ . Имеется также другая оценка временной шкалы, предложенная Неи в более поздней работе, где  $t = 5 \times 10^6 D_N$  (Nei, 1975).

### Результаты и обсуждение

В ходе электрофоретического исследования особей пяти видов *Drosophila* группы *virilis* из 47 природных популяций удалось выявить 89 различных электрофоретических вариантов. В результате проведенного нами всестороннего генетического анализа было установлено, что эти 89 электрофоретических вариантов, выявленных по 11 ферментным системам у представителей *Drosophila* группы *virilis*, находятся под генетическим контролем 15 локусов. Наглядное изображение электрофоретических спектров диагностических локусов кислой фосфатазы-1, эстеразы и малик энзима у исследованных видов *Drosophila* группы *virilis* с выявленными электрофоретическими вариантами приведено на рис. 2, 3 и 4. Все обнаруженные нами 89 аллельных вариантов шести видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* из

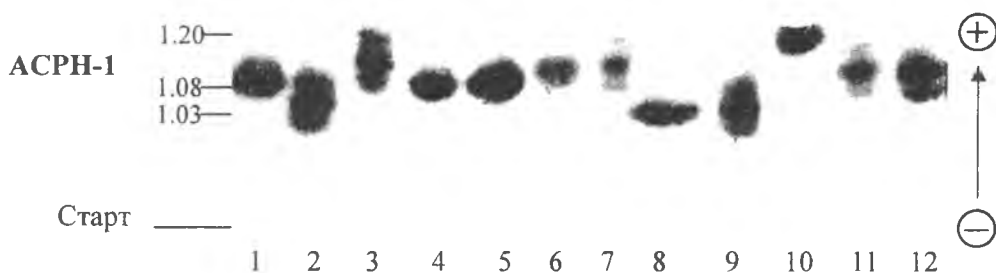


Рис. 2. Электрофореграмма кислой фосфатазы-1 у взрослых особей *D. littoralis*: 8 —  $ASPH-1^{1.03}$ ; 2, 9 —  $ASPH-1^{1.03/1.08}$ ; 1, 4, 5, 6 —  $ASPH-1^{1.08}$ ; 3, 7, 11, 12, —  $ASPH-1^{1.08/1.20}$ ; 10 —  $ASPH-1^{1.20}$

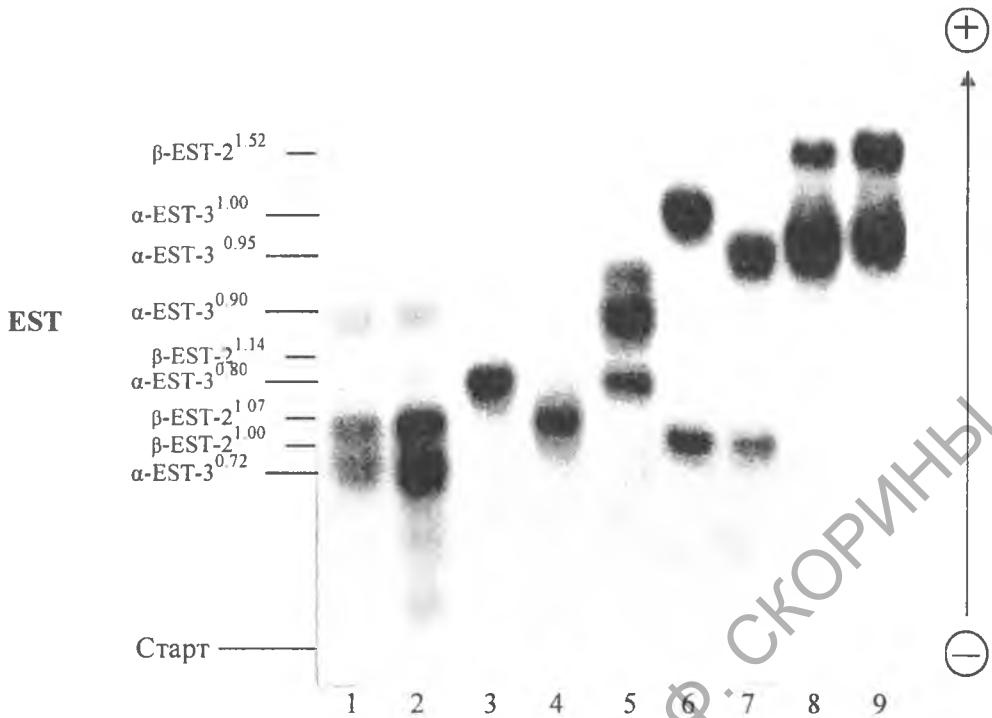


Рис. 3. Электрофореграмма эстеразы *Drosophila* рода *virilis*: *D. texana* – 1, 2; *D. americana* – 3; *D. novomexicana* – 4; *D. virilis* – 5, 6, 7; *D. l. imeretensis* – 8, 9; 1, 2 –  $\alpha$ -EST-3<sup>0.72</sup>; 3, 4 –  $\alpha$ -EST-3<sup>0.80</sup>; 5 –  $\alpha$ -EST-3<sup>0.90</sup>; 7, 8, 9 –  $\alpha$ -EST-3<sup>0.95</sup>; 6 –  $\alpha$ -EST-3<sup>1.00</sup>; 1, 2, 6, 7 –  $\beta$ -EST-2<sup>1.00</sup>; 4 –  $\beta$ -EST-2<sup>1.07</sup>; 3, 5 –  $\beta$ -EST-2<sup>1.14</sup>; 8, 9 –  $\beta$ -EST-2<sup>1.51</sup>

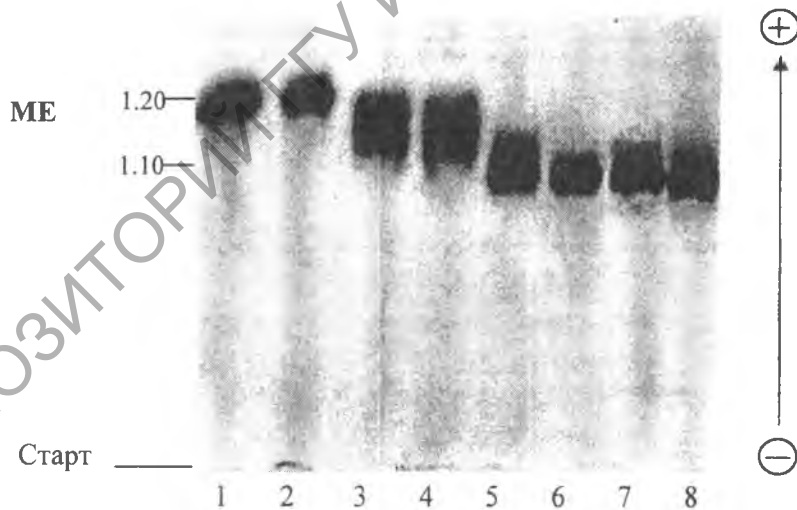


Рис. 4. Электрофореграмма малик энзима у взрослых особей *D. littoralis*: 5-8 — ME<sup>1.10</sup>; 3, 4 — ME<sup>1.10/1.20</sup>; 1, 2 — ME<sup>1.20</sup>

природных популяций и их относительная электрофоретическая подвижность схематически изображены на рис. 5.

Аллельные частоты по 15 локусам для всех шести исследованных представителей *Drosophila* группы *virilis* отображены в табл. 2. Следует подчеркнуть, что в популяционных исследованиях использованы только локусы с установленной нами генетической детерминацией. При анализе особей шести видов оказалось, что локусы *Fum*,  $\alpha$ -*Gpdh*, *m-Mdh* являются мономорфными поскольку по этим генам у всех видов группы *virilis* найден только один аллель. Наибольшая изменчивость обнаружена по генам, кодирующим  $\alpha$ -эстеразу-3,  $\beta$ -эстеразу-2, кислоту фосфатазу-1. В каждом из этих локусов встретилось более 10 аллелей. Из таблицы 2 следует, что самыми близкими генетическими структурами обладают *D. l.*

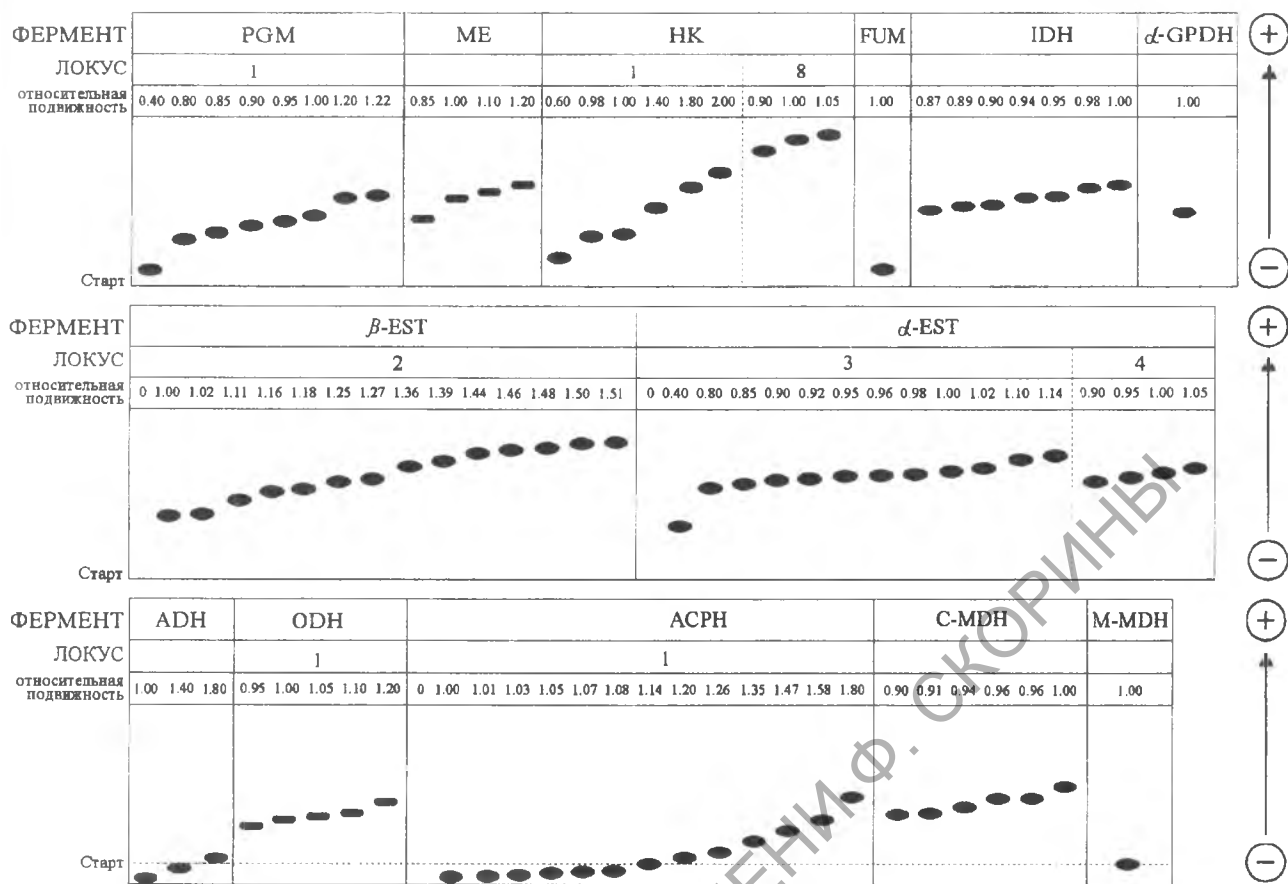


Рис. 5. Схематическое изображение и обозначение электрофоретических аллельных вариантов 15 локусов у представителей *Drosophila* группы *virilis*

*littoralis* и *D. l. imeretensis*. Эти аллопатрические подвиды (Гончаренко и др., 1989) существенно различаются по трем генам Me, β-Est-2, α-Est-3, хотя даже в этом случае качественного уровня разница между подвидами достигла только по локусу Me (табл.2). Качественно различающиеся локусы, по которым можно определять видовую принадлежность особи с ошибкой менее 5%, Айялой, Пауэллом и Левонтиным было предложено называть диагностическими (Ayala, Powell, 1972; Левонтин 1978).

Из табл. 2 видно, что ни один ген не является диагностическим для всех пяти видов. Наиболее информативным оказался локус Me, по которому высоко диагностические различия в аллельных частотах имеются даже у аллопатрических подвидов *D. l. littoralis* и *D. l. imeretensis*. Достаточно удобными для диагностики видов-двойников группы *virilis* являются гены AcpH-1, Pgm, β-Est-2 и α-Est-3. Что касается гена α-Est-4, то этот локус имеется только у *D. montana*. Однако он позволяет легко отнести каждую исследуемую особь к *D. montana* или к другим видам двойникам группы *virilis*.

В табл. 3 ниже диагонали приведены числа высоко диагностических локусов по каждой паре исследованных видов. Как и следовало ожидать, наименьшее количество высоко диагностических локусов (один) обнаружено у подвидов *D. l. littoralis* и *D. l. imeretensis*. Виды *D. virilis* и *D. lummei*, которые входят в филладу *virilis* (Throckmorton, 1982), различаются только по трем диагностическим генам Pgm, AcpH-1, Idh, (табл. 3). Подвиды *D. l. imeretensis*, *D. l. littoralis* и виды *D. montana*, *D. ezoana* входящие в другую филладу двойниковых видов – филладу *montana*, отличаются между собой несколько больше. Здесь различия найдены по 5 – 6 высоко диагностическим генам. В целом разница между видами из разных филлад достигает семи диагностических генов и превышает внутрифилладные различия. Если экстраполировать результаты, полученные по 15 локусам на весь геном, то можно предположить, что у видов-двойников группы *virilis* из разных филлад более 60% структурных генов несут видоспецифи-

Таблица 2. Аллельные частоты по 15 локусам у *D. virilis*, *D. lummei*, *D. l. littoralis*, *D. l. imeretensis*, *D. montana* и *D. ezoana*

Локус	Аллели	<i>D. virilis</i>	<i>D. lummei</i>	<i>D. littoralis</i>	<i>D. imeretensis</i>	<i>D. montana</i>	<i>D. ezoana</i>
<b>Pgm</b>	n <sup>1)</sup>	196	99	570	819	32	44
	0.40	.000	.000	.018	.011	.000	.000
	0.80	.000	.929	.958	.879	.000	.251
	0.85	.000	.000	.000	.001	.000	.000
	0.95	.000	.000	.000	.006	.000	.000
	1.00	.964	.071	.019	.097	1.000	.704
	1.20	.036	.000	.005	.002	.000	.045
	1.22	.000	.000	.000	.004	.000	.000
<b>Me</b>	n	172	98	605	487	38	42
	0.85	.000	.000	.000	.000	.974	.000
	1.00	1.000	1.000	.000	.000	.026	1.000
	1.10	.000	.000	.002	.990	.000	.000
<b>Hk-1</b>	n	196	96	539	819	32	44
	0.60	.005	.000	.000	.000	.000	.000
	0.98	.000	.000	.000	.000	.000	.978
	1.00	.995	1.000	.011	.001	1.000	.000
	1.40	.000	.000	.978	.991	.000	.022
	1.80	.000	.000	.007	.002	.000	.000
<b>Hk-8</b>	n	192	96	539	819	30	44
	0.90	.000	.000	.000	.000	.266	.000
	1.00	1.000	1.000	.998	1.000	.734	1.000
	1.05	.000	.000	.002	.000	.000	.000
<b>β-Est-2</b>	n	192	100	609	821	37	60
	0	.000	.050	.000	.000	.000	.000
	1.00	.578	.000	.000	.000	.000	.000
	1.02	.000	.870	.000	.000	.000	.000
	1.11	.250	.010	.000	.000	.000	.000
	1.16	.000	.070	.000	.000	.000	.000
	1.18	.172	.000	.000	.000	.000	.000
	1.25	.000	.000	.000	.000	.000	.350
	1.27	.000	.000	.000	.000	.054	.000
	1.36	.000	.000	.002	.000	.027	.000
	1.39	.000	.000	.002	.000	.054	.567
	1.44	.000	.000	.074	.001	.135	.083
	1.46	.000	.000	.021	.000	.000	.000
	1.48	.000	.000	.575	.008	.297	.000
	1.50	.000	.000	.000	.000	.352	.000
1.51	.000	.000	.326	.991	.081	.000	
<b>α-Est-3</b>	n	192	95	594	782	37	21
	0	.000	.042	.000	.000	.000	.000
	0.84	.453	.000	.000	.000	.000	.000
	0.85	.000	.000	.000	.076	.000	.239
	0.90	.151	.905	.002	.235	.000	.285
	0.92	.000	.000	.000	.000	.162	.000
	0.95	.000	.053	.178	.492	.108	.476
	0.96	.042	.000	.000	.000	.000	.000
	0.98	.182	.000	.000	.000	.108	.000
	1.00	.172	.000	.052	.000	.244	.000
	1.02	.000	.000	.332	.087	.081	.000
1.10	.000	.000	.296	.110	.297	.000	
1.14	.000	.000	.140	.000	.000	.000	

Окончание таблицы 2

Локус	Аллели	<i>D. virilis</i>	<i>D. lummei</i>	<i>D. littoralis</i>	<i>D. imeretensis</i>	<i>D. montana</i>	<i>D. ezoana</i>
<b><math>\alpha</math>-Est-4</b>	n	128	95	558	782	34	21
	0.90	.000	.000	.000	.000	.029	.000
	0.95	.000	.000	.000	.000	.147	.000
	1.00	.000	.000	.000	.000	.677	.000
	1.05	.000	.000	.000	.000	.147	.000
<b>Acph-1</b>	n	172	98	603	785	34	77
	0	.000	.000	.000	.001	.000	.000
	1.00	.994	.000	.000	.000	.000	.259
	1.01	.000	.020	.000	.000	.000	.000
	1.03	.000	.000	.017	.006	.000	.000
	1.05	.006	.000	.000	.000	.000	.129
	1.07	.000	.051	.000	.000	.000	.000
	1.08	.000	.643	.869	.979	.000	.611
	1.14	.000	.000	.071	.010	.000	.000
	1.20	.000	.000	.053	.004	.000	.000
	1.26	.000	.276	.000	.000	.000	.000
	1.35	.000	.000	.000	.000	.883	.000
	1.45	.000	.000	.000	.000	.029	.000
	1.58	.000	.000	.000	.000	.088	.000
	1.80	.000	.010	.000	.000	.000	.000
<b>Adh</b>	n	192	96	535	717	34	22
	1.00	1.000	1.000	.002	.001	.000	.000
	1.40	.000	.000	.998	.994	1.000	1.000
	1.80	.000	.000	.000	.005	.000	.000
<b>L-Gpdh</b>	n	38	66	34	62	30	26
	1.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<b>Odh</b>	n	126	32	133	180	4	0
	0.95	.000	.031	.015	.005	.000	.000
	1.00	.976	.969	.917	.941	1.000	.000
	1.05	.024	.000	.023	.016	.000	.000
	1.10	.000	.000	.038	.033	.000	.000
	1.20	.000	.000	.007	.005	.000	.000
<b>Fum</b>	n	128	44	525	819	28	4
	1.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<b>C-Mdh</b>	n	92	90	188	4	40	26
	0.90	.000	.044	.000	.000	.000	.000
	0.91	.000	.000	.952	1.000	.000	.000
	0.94	.000	.000	.048	.000	1.000	.000
	0.96	.000	.056	.000	.000	.000	.000
	0.98	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
	1.00	1.000	.900	.000	.000	.000	.000
<b>M-Mdh</b>	n	92	90	188	4	40	26
	1.00	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
<b>Idh</b>	n	4	90	34	0	40	56
	0.87	.000	.000	.000	.000	.975	.000
	0.89	1.000	.000	.000	.000	.000	.000
	0.90	.000	.000	.000	.000	.025	.000
	0.94	.000	.000	.000	.000	.000	1.000
	0.95	.000	.011	.000	.000	.000	.000
	0.98	.000	.000	.912	.000	.000	.000
	1.00	.000	.989	.088	.000	.000	.000

Примечание: <sup>1)</sup>n – число проанализированных геномов.



**Таблица 3.** Число диагностических генов для каждой пары шести представителей *Drosophila* группы *virilis* Палеарктики

№ вида	Виды	№ вида					
		1	2	3	4	5	6
1	<i>D. virilis</i>		4	7	7	7	6
2	<i>D. lummei</i>	3		4	5	8	7
3	<i>D. l. littoralis</i>	6	3		3	7	6
4	<i>D. l. imeretensis</i>	7	5	1		7	6
5	<i>D. montana</i>	6	5	6	6		6
6	<i>D. ezoana</i>	5	5	4	6	5	

Примечание. Ниже диагонали – гены, по каждому из которых ошибка в определении вида не превышала 1 %; выше диагонали – все гены, по которым имеется возможность установить видовую принадлежность особей (включая высокодиагностические)

ческие аллели. В настоящее время это самый большой процент диагностических различий, найденный у двойниковых видов *Drosophila* (Kojima et al., 1970; Ayala, Powell, 1972; Anderson et al., 1977; Pinsker, Buruga, 1982).

Некоторые гены еще не достигли уровня диагностических, хотя и по ним с высокой вероятностью можно определить, к какому виду относится та или иная особь группы *virilis* (табл. 3). Количество таких генов вместе с диагностическими по каждой паре видов приведены в табл. 3 выше диагонали.

Для точной оценки уровня генетической дифференциации видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* мы использовали коэффициент генетической дистанции Неи (Nei, 1972), который учитывает различия по всем исследованным локусам, а не только по диагностическим и сильно различающимся. Значения коэффициентов генетической дистанции полученные нами для 5 палеарктических видов группы *virilis* приведены в табл. 4. Как и следовало ожидать исходя из сравнения аллельных частот, наименьшие значения коэффициентов дистанции Неи выявлены между аллопатрическими подвидами *D. l. littoralis* и *D. l. imeretensis* средняя величина  $D_N$  для которых равна 0.141 (табл. 4). Дистанция Неи между *D. virilis* и *D. lummei* входящих в одну филладу составила 0,334. Наибольшие значения коэффициентов дистанции Неи у видов из разных филлад – *D. virilis* и *D. l. littoralis* средняя величина  $D_N$  равна 0.909. Следовательно, у двух видов двойников произошло более 90 аллельных замен на 100 локусов.

**Таблица 4.** Значения коэффициентов генетической дистанции Неи для шести представителей *Drosophila* группы *virilis* Палеарктики

Виды	<i>D. lummei</i>	<i>D. l. littoralis</i>	<i>D. l. imeretensis</i>	<i>D. montana</i>	<i>D. ezoana</i>
<i>D. virilis</i>	0.334	0.909	0.843	0.608	0.627
<i>D. lummei</i>		0.645	0.580	0.764	0.636
<i>D. l. littoralis</i>			0.141	0.687	0.617
<i>D. l. imeretensis</i>				0.668	0.511
<i>D. montana</i>					0.684

Для наглядного изображения полученных результатов на базе данных табл. 4 с использованием невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) построена дендрограмма, иллюстрирующая степень генетической дифференциации у 6 исследованных видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* (рис. 6). Из дендрограммы хорошо видно, что *D. ezoana*, *D. montana*, и *D. littoralis*, которые входят в филладу *montana* замыкаются в собствен-

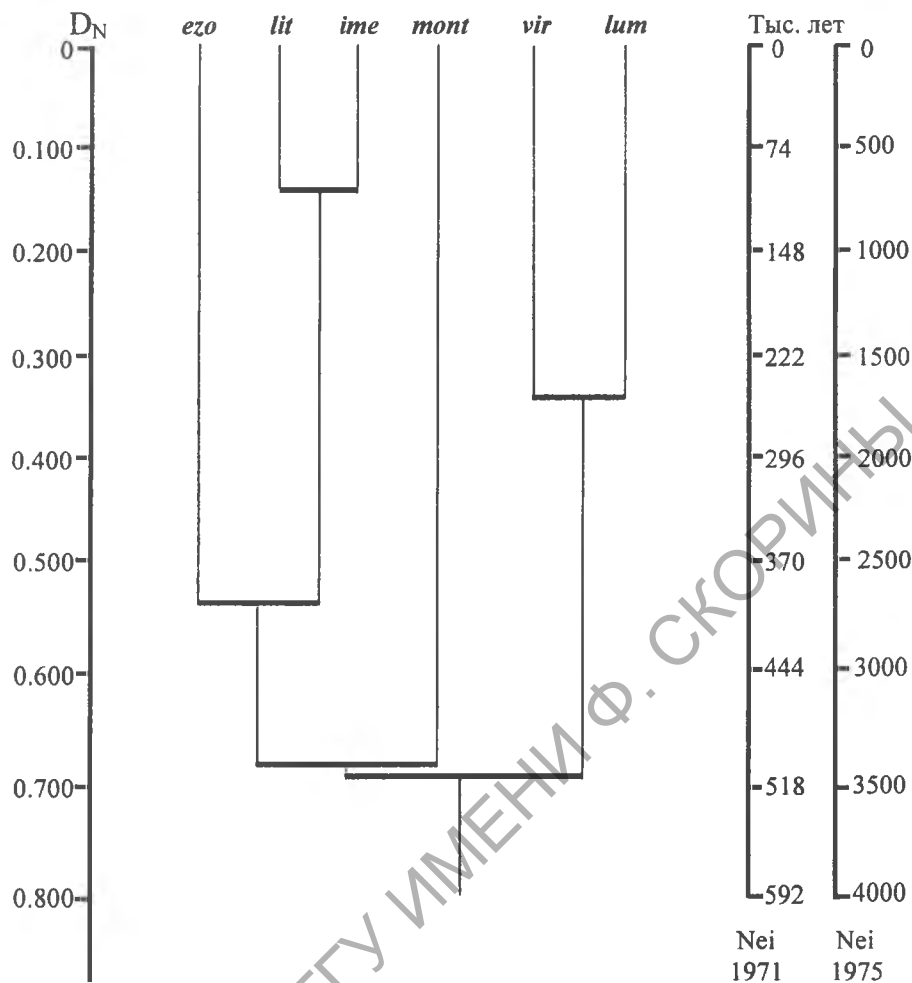


Рис. 6. Филогенетическое дерево пяти видов группы *virilis*, построенные методом невзвешенного парно-группового анализа на основе электрофоретических различий в 15 локусах, кодирующих изоферменты.

ный кластер, отделённый от представителей филлады *virilis*. Дистанция Ней как между видами филлады *montana*, так и видами из разных филлад, превышает значение 0,55 (табл. 4). Иными словами разница в генотипах между этими видами превысила 50%. Вместе со столь внушительной разницей появилась и практически полная репродуктивная изоляция, так как среди немногочисленных межвидовых гибридов фертильны только некоторые самки. Причём, особи *D. littoralis*, *D. montana*, и *D. ezoana* в природных популяциях часто встречаются вместе, однако нам ни разу не удалось обнаружить межвидовых гибридов. Это говорит о том, что наряду с постзиготической репродуктивной изоляцией между этими видами уже сформировались и действуют презиготические изолирующие механизмы.

Сходная ситуация имеет место и при сравнении видов и разных филлад. В этом случае разница в геномах превышает 70% (табл. 4) и среди межвидовых гибридов фертильны только отдельные самки. Следовательно, мы наблюдаем 5-ый уровень генетической дифференциации, когда после завершения процесса видообразования генетические различия и репродуктивный барьер продолжают углубляться, но морфологические отличия ещё крайне не значительны и визуально не обнаруживаются.

Установленные нами на основании генетической близости филогенетические взаимоотношения 5 видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* (рис.6) в целом согласуются с результатами цитологического анализа (Throckmorton, 1982), по которым виды группы *virilis* распадаются на две филлады и возникают путём классической дивергентной эволюции. В то же время, исходя из наших данных (рис. 6), распад общей предковой формы произошёл около миллиона лет назад сразу на 3 ветви: ветвь *virilis*, которая затем претерпела собственную

эволюцию на территории Евразии; ветвь *littoralis*, позднее распавшуюся на *D. littoralis* и *D. ezoana* и широко распространившиеся по всей Полярктике; и, наконец, ветвь *montana*, которая дала *D. montana*, обитающую как в Евразии, так и в Северной Америке.

В ходе исследования природных популяций *Drosophila* группы *virilis* выявлено 5 уровней генетической дифференциации табл.5. На первом уровне находятся географически связанные популяции, поток генов между которыми нивелирует все генетические различия; на

**Таблица 5.** Генетическая дифференциация между популяциями *Drosophila* группы *virilis*, находящихся на разных уровнях эволюционной дивергенции. Уровни 3 и 4 отвечают значениям коэффициентов генетической дистанции Неи для шести представителей Палеарктики

Уровни сравнения	Значения дистанции Неи
1. Географически связанные популяции	0.022
2. Географически разделенные популяции	0.065
3. Подвиды	0.141
4. Молодые виды-двойники одной филалды	0.334
5. Виды-двойники разных филалд	0.682

втором уровне находятся географически изолированные популяции одного вида; на третьем – кавказский и северный подвиды *D. littoralis*, у которых появились первые признаки репродуктивного барьера; на четвертом – двойниковые виды *D. virilis* и *D. lummei* из одной филалды, между которыми ещё возможны фертильные гибриды обоего пола; и, наконец, на пятом уровне находятся виды-двойники из разных филалд, репродуктивный барьер между которыми сформировался почти полностью. Показано, что эволюционный процесс у евроазиатских видов группы *virilis* начался более миллиона лет назад с распада сразу на 3 ветви: *virilis*, *littoralis* и *montana*, которые затем эволюционировали самостоятельно.

#### Электрофоретический ключ для типирования взрослых особей

Изоферментные маркеры постепенно начали применяться и для выяснения ряда таксономических вопросов (Ayala, Powell, 1972; Pinsker, Buruga, 1982; Geiger, Scholl, 1985). Ранее предпринимались попытки построения электрофоретических ключей, которые позволяют быстро и надежно устанавливать видовую принадлежность отдельных особей (Miles, 1979; Berlocher, 1980; Novard, Furth, 1986; Menken, Ulenberg, 1986).

На основании представленного выше электрофоретического анализа изоферментов нами составлен точный и относительно недорогой определительный ключ, позволяющий легко и быстро идентифицировать особей пяти палеарктических видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*.

Из таблицы аллельных частот (табл. 2) хорошо видно, что локус *Adh* делит виды на две группы. К первой относятся виды, входящие в филалду *virilis* – *D. lummei* и *D. virilis*, у которых встречается только аллель 1.00. Вторую группу составляют три вида филалды *montana*, практически все особи которых несут аллель 1.40.

Ген, кодирующий фосфоглюкомутазу, является наиболее изменчивым из трех локусов, тем не менее он позволяет нам легко отличить особей *D. virilis*, гомозиготных или гетерозиготных только по аллелям 1.00 и 1.20, от представителей *D. lummei*, гомозиготных по аллелю 0.80 или гетерозиготных по аллелям 0.80/1.00.

По ME можно легко протипировать особей *D. montana*, имеющих "медленные" электрофоретические фенотипы, а также особей *D. l. littoralis* и *D. l. imeretensis*, которые отличаются своими аллелями не только от остальных видов группы, но и между собой.

На рис. 7 дана схема, показывающая основные электрофоретические фенотипы исследованных нами видов-двойников группы *virilis*. Представлены фенотипы, которые встречаются в природных популяциях не реже чем один на тысячу особей. На основании данных содержащихся в табл. 2 и рис. 7 нами составлен электрофоретический ключ, позволяющий быстро и надежно определять особей пяти видов-двойников. Необходимым условием использо-

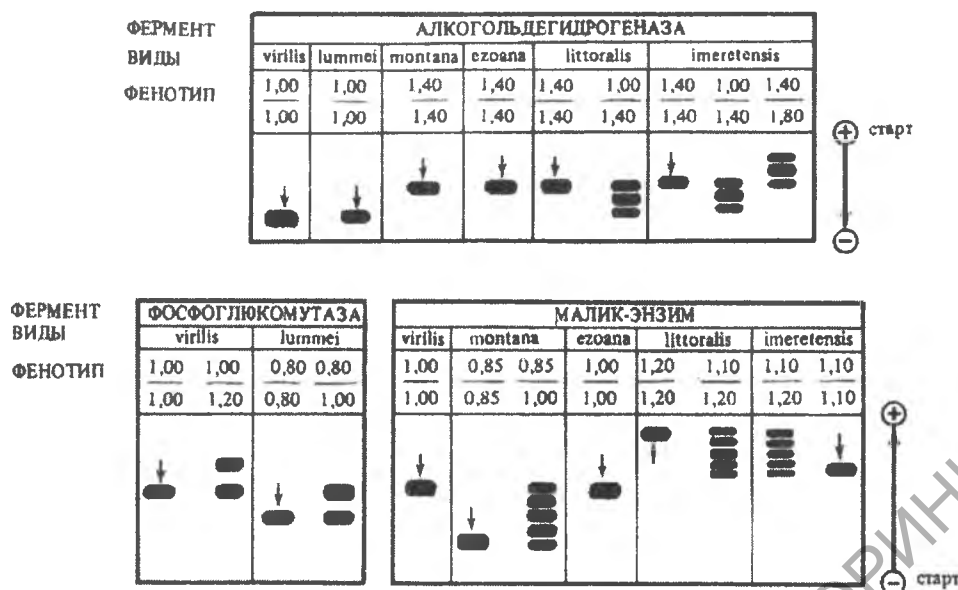


Рис. 7. Основные электрофоретические фенотипы 5 палеарктических видов *Drosophila* рода *virilis* использованные для построения определительного ключа. Стрелками обозначены наиболее часто встречающиеся фенотипы каждого вида

вания данного ключа является наличие особей вида-стандарта. В нашем ключе стандартом является *D. virilis*, которая легко культивируется в лабораторных условиях.

На начальном этапе использования ключа анализируется фермент ADH (табл. 6). На одном электрофоретическом блоке вместе с образцами мух неизвестных видов ставится стандартный образец. Если электрофоретический фенотип определяемой мухи совпадает со стандартом, то данная особь относится либо к *D. virilis*, либо к *D. lummei*. Следует отметить, что стандартный фенотип по ADH может встретиться также и у *D. littoralis* (см. табл. 2), однако вероятность этого события не превышает  $4 \times 10^{-6}$ . Иными словами, при определении видовой принадлежности одного миллиона особей *D. littoralis* на данном этапе ошибочно будут определены только 4 мухи (т.е. ошибка менее 0,0004%). Для того чтобы точно установить видовую принадлежность особей, стандартных по ADH, следует проанализировать их

Таблица 6. Электрофоретический ключ для палеарктических видов группы *virilis*

№ этапа определения	Фермент	Подвижность относительно стандарта	Диагноз	Максимальная ошибка диагноза. %
1	ADH	стандарт	2	0,0004
	ADH	быстрее стандарта	3	0,0000
2	PGM	стандарт, или быстрее стандарта	<i>D. virilis</i>	0,0441
	PGM	медленнее стандарта	<i>D. lummei</i>	0,0445
3	ME	стандарт	<i>D. ezoana</i>	0,1225
	ME	не стандарт	4	0,0000
4	ME	медленнее стандарта	<i>D. montana</i>	0,1225
	ME	быстрее стандарта	5	0,0000
5	ME	самый быстрый электрофоретический фенотип в	<i>D. l. littoralis</i>	0,4100
	ME	быстрее стандарта, но медленнее <i>D. l. littoralis</i>	<i>D. l. imeretensis</i>	0,4096

фенотип по фосфофруктофузазе. Если электрофоретический фенотип по PGM у таких особей совпадает или выше стандарта, то это *D. virilis*, а если ниже стандарта, то – *D. lummei*. При этом ошибка определения на данном этапе не превышает 0,05%. Особи, оказавшиеся нестандартными по АДН, должны быть исследованы по ферменту малик-энзиму. Мухи, стандартные по МЕ, относятся к *D. ezoana*, показавшие более медленный фенотип – к *D. montana*, а более быстрый – к *D. littoralis*. Причем особи, относящиеся к подвиду *D. l. littoralis*, отличаются от *D. l. imeretensis* более быстрым электрофоретическим фенотипом по малик-энзиму.

Таким образом, проведен анализ генетико-эволюционных и таксономических взаимоотношений у видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*, обитающих в природных популяциях Палеарктики, с использованием генов, кодирующих различные изоферменты, который показал, что, в ходе электрофоретического исследования особей шести представителей *Drosophila* группы *virilis* из 47 природных популяций удалось выявить по 11 ферментным системам 89 различных электрофоретических вариантов, находящихся под генетическим контролем 15 локусов. Проанализированы диагностические гены. Наиболее информативными оказались локусы Me, Acph-1, Pgm, β-Est-2 и α-Est-3. Для точной оценки уровня генетической дифференциации видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* использован коэффициент генетической дистанции Неи. Составлен точный и относительно недорогой электрофоретический ключ, позволяющий легко и быстро идентифицировать особей пяти палеарктических видов-двойников *Drosophila* группы *virilis*.

Работа выполнялась в рамках программ ГПОФИ “Радиация и антропоэкология” и программ по преодолению последствий катастрофы на ЧАЭС и поддержана различными научными грантами, такими как ISF “Биоразнообразие” и др. Авторы выражают благодарность сотрудникам биологического факультета Гомельского госуниверситета, а также аспирантам и стажерам из стран СНГ и Восточной Европы, которые оказывали содействие на различных этапах генетических исследований.

#### Abstract

The authors analyzed genetic, evolutionary and taxonomic mutual relations between species-doubles *Drosophila* of the group *virilis* of Palaearctic.

#### Литература

1. Гончаренко Г.Г. Аллозимная диагностика видов-двойников *Drosophila* группы *virilis* // ДАН СССР. – 1987. – Т. 295. N 4. – С. 976-980.
2. Гончаренко Г.Г., Емельянов И.М. Электрофоретический ключ для типировки взрослых особей двойниковых видов *Drosophila* группы *virilis*, обитающих в Палеарктике // Докл. АН СССР. – 1990. – Т. 313. N 2. – С. 448-452.
3. Гончаренко Г.Г., Митрофанов В.Г., Катохин А.Н. Изучение биохимического полиморфизма у *Drosophila imeretensis* в природных популяциях Краснодарского края // Генетика. – 1984. – Т. XX. № 4. – С. 620-627.
4. Гончаренко Г.Г., Митрофанов В.Г., Корочкин Л.И., Савицкий Б.П. Первый этап видообразования у двух подвидов *Drosophila* группы *virilis* // ДАН СССР. – 1989. – Т. 304. № 2. – С. 448-451.
5. Левонтин Р. Генетические основы эволюции: Пер. с англ. М.: Мир, 1978. – 352 с.
6. Майр Э. Зоологический вид и эволюция. Пер. с англ. М.: Мир, 1968. – 462 с.
7. Anderson W.W., Ayala F.J., Michod R.E. Chromosomal and allozymic diagnosis of three species of *Drosophila*. // J. Hered., 1977. – vol. 68, p. 71-74.
8. Ayala F.J., Powell J.R. Allozymes as diagnostic characters of sibling species of *Drosophila* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. – P. 1094-1096.
9. Berlocher S.M. An electrophoretic key for distinguishing species of the genus *Rhagoletis* (*Diptera*; *Tephritidae*) as larvae, pupae or adults // Ann. Entomol. Soc. Amer. 1980. – Vol.73. – P.131-137.
10. Geiger H., Scholl A. Systematic and evolution of Holarctic Pierinae (Lepidoptera). An enzyme electrophoretic approach // Experientia. – 1985, vol. 41, p. 24-29.

11. Goncharenko G.G., Emelianov I.M. An electrophoretic key to adult members of the sibling species belonging to the *Drosophila virilis* group (*Diptera, Drosophilidae*) inhabiting Soviet Union and adjacent countries // *Z. zool. Syst. Evolut.-forsch.* – 1992. – V. 30. – P. 281-286.
12. Goncharenko G.G., Mitrofanov V.G., Korochkin L.I. Localization of genes coding for biochemical traits on the second chromosome of *Drosophila imeretensis* Sokolov (*D. littoralis* Meigen) // *Biochemical Genetics.* – 1985. – V. 23. N 3-4. – P. 329-335.
13. Hovard D.J., Furth D.G. Review of the *Allonemobius fasceatus* (Orthoptera: Grillidae) complex with the description of two new species separated by electrophoresis, songs and morphometrics. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 79, 1986. – p. 472-481.
14. Kojima K., Gillespie J., Tobari Y.N. A profile of *Drosophila* species enzymes assayed by electrophoresis. I. Number of alleles, heterozygosity and linkage disequilibrium in glucose-metabolizing systems and some other enzymes. – *Biochem. Genet.* – 1970. – Vol.4. – N4. – P.627.
15. Korochkin L.I. Genetic control and development expression of esterase isozymes in *Drosophila* of the *virilis* group. In C. Markert [ed.], *3.ISOZYMES: Developmental biology.* Academic Press Inc., London. – 1975. – P. 99-117.
16. Lakovaara S., Saura A., Lankinen P., Pohjola L., Lokki P. The use of isoenzymes in tracing evolution and in classifying *Drosophilidae* // *Zool. Scr.*, 1976. V.5. – P.173-179.
17. Menken S., Ulenberg S. Allozymatic diagnosis of four economically important *Liriomyza* species (*Diptera, Agromyzidae*). – *Ann. appl. Biol.*, 1986, vol. 109. – p. 41-47.
18. Miles S. A biochemical key to adult members of the *Anopheles gambiae* group of species (*Diptera: Culicidae*). *J. Med. Entomol.* 15, 1979. – p. 297-299.
19. Nei M. Interspecific gene differences and evolutionary time estimated from electrophoretic data on protein identity // *Am. Nat.* 1971. V. 105. – P. 385-398.
20. Nei M. Genetic distance between populations // *Am. Nat.* 1972. V. 106. – P. 283-292.
21. Nei M. *Molecular Population Genetics and Evolution* // Amsterdam: Holland Press, 1975. – 278 p.
22. Patterson S.T., Stone W.S. *Evolution in the genus Drosophila* N. Y.: McMillan. – 1952 – P.610.
23. Pinsker W., Buruga J. Comparative study of allozyme variation in six species of the *Drosophila obscura* group. – 1982, vol.20, p.53-63.
24. Prakash S., Lewontin R. C., Hubby J. L. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of *Drosophila pseudoobscura* // *Genetics.* 1969. V. 61. – P. 841-858.
25. Sneath P. H. A., Sokal R. R. *Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification.* San Francisco: W. H. Freeman, 1973. – 573 p.
26. Spicer G. S., Bell C.D. Molecular phylogeny of the *Drosophila virilis* species group (*Diptera: Drosophilidae*) inferred from mitochondrial 12S and 16S ribosomal RNA gene // *Genes Ann. Entomol. Soc. Am.* 95(2). – 2002. – P. 156-161.
27. Throckmorton L. H. The *virilis* species group In M. Ashburner and E. Novitsky [eds.], *The genetics and biology of Drosophila*, vol. 3B. Academic, London. – 1982. – P. 227-297.

Гомельский государственный  
университет им. Ф. Скорины,

Поступило 15.01.04

Институт биологии развития  
им. Н.К.Кольцова, Москва

Институт биологии гена, Москва