

УДК 595.773.4:591.463:575.83

ТРЕНДЫ ИЗМЕНЕНИЯ ФОРМЫ ПОСТГОНИТОВ В ЭВОЛЮЦИИ ЗЛАКОВЫХ МУХ РОДА *Meromyza* (Diptera, Chloropidae)

© 2021 г. А. А. Яцук*, @, А. Ф. Сафонкин*, Т. А. Триसेлева*

*Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, Ленинский просп., 33, Москва, 119071 Россия

@E-mail: sasha_djedi@mail.ru

Поступила в редакцию 28.07.2020 г.

После доработки 03.08.2020 г.

Принята к публикации 03.08.2020 г.

Установлено, что злаковые мухи рода *Meromyza* по изменчивости локуса *COI* мтДНК разделяются на кластеры, которым соответствуют особенности морфологии передних отростков постгонитов (ПОП) в половом аппарате самцов. Исследованы направления изменения формы ПОП, сложившиеся в процессе эволюции группы. Для изучения путей преобразования формы ПОП у 24 видов из 7 кластеров проведено сравнение контуров ПОП эволюционно более молодых видов с видами, близкими к предковым гаплотипам кластера, с выделением трех групп видов. Использован подход наложения филогенетического дерева (программа MrBayes) на результаты исследования формы постгонитов методами геометрической морфометрии (программа MorphoJ). Определены три области, соответствующие выделенным группам видов, и область видов, близких к предковым гаплотипам. Сопоставлением результатов примененных методов выявлены общие микроэволюционные направления преобразования формы ПОП, связанные с изменением его выступающей части.

DOI: 10.31857/S0002332921030176

При изучении эволюции морфологических структур насекомых особое внимание уделяется анализу изменчивости структур полового аппарата. В последние годы появились работы по изучению макроэволюционных преобразований полового аппарата у двукрылых насекомых. Так, для высших Terphritoidea изучены направления изменений формы полового аппарата и его мускулатуры (Галинская, Овчинникова, 2015; Негроров и др., 2016). Преобразования формы эдеагуса в процессе дивергенции группы близкородственных видов изучены на мухах рода *Drosophila* (Diptera, Drosophilidae) (Куликов и др., 2004). Для изучения процесса формообразования требуется установить связь между изученными морфологическими структурами и филогенетическими отношениями исследуемых таксонов. Метод квадратированной парсимонии Мэддисона (Maddison, 1991) позволяет оценить степень соответствия морфометрических параметров между таксонами структуре тестируемого филогенетического дерева. Так, на примере мышей *Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811 была показана связь между формой челюсти и межрасовыми взаимоотношениями (Городилова, 2011).

Мухи рода *Meromyza* (Meigen 1830) (Diptera, Chloropidae) являются хорошим модельным объектом для исследования закономерностей в изменении полового аппарата самцов благодаря характерной форме одного из его элементов — постгонита,

особенно его переднего отростка. Основываясь на изменчивости локуса *COI* мтДНК, показано, что виды рода разделяются на восемь кластеров (Сафонкин и др., 2016). Виды в кластерах соответствуют видам в группах, выделенным по морфологическим характеристикам переднего отростка постгонита. Наличие такой связи предполагает значимую роль постгонитов при копуляции из-за консервативности их структуры (Сафонкин и др., 2016; Яцук, Сафонкин, 2018). Различия между видами в форме постгонитов тесно связаны с различиями в размерах данных структур (Яцук, 2019). При сравнительном анализе структуры постгонитов были выявлены наиболее вариабельные части контура (Яцук, Сафонкин, 2018). Однако в данных исследованиях не рассматривали передний отросток постгонита как целостную морфологическую структуру, ограничиваясь изучением ее отдельных элементов.

В работе тестируется гипотеза об ограниченном числе трендов преобразования формы переднего отростка постгонитов.

Цель работы — выявление основных направлений преобразования формы передних отростков постгонитов в процессе эволюции злаковых мух рода *Meromyza*.

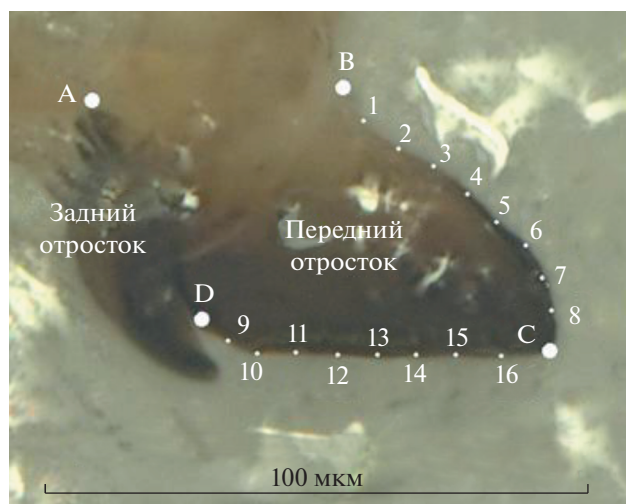


Рис. 1. Постгонит *Meromyza tshernovae*: схема расположения точек, отражающих контур переднего отростка постгонита. Точки А, В, С, D – реперные, 1–16 – промежуточные. А–В – линия прикрепления постгонита к гипандрию, В–(1–8)–С – верхний контур, D–(9–16)–С – нижний контур, А–D – задний контур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования формы переднего отростка постгонитов взяты 24 вида злаковых мух рода *Meromyza*, входящих в пять кластеров из восьми известных (Сафонкин и др., 2016). Для анализа выбраны кластеры, включающие в себя более одного вида (жирным шрифтом выделены виды, близкие к предковому гаплотипу каждого кластера; в скобках указано число экземпляров) (Сафонкин и др., 2016):

I – кластер “saltatrix”: *M. acuminata* Fed. 1964 (10), *M. nigrofasciata* Hendel, 1938 (5), *M. pallida* Fed. 1964 (2), *M. saltatrix* L. 1761 (30), *M. sibirica* Fed. 1961 (6), *M. stackelbergi* Fed. 1967 (2), *M. tshernovae* Fed. 1971 (10);

II – кластер “pratorum”: *M. brevifasciata* Fed. 1974 (2), *M. conifera* Fed. 1971 (10), *M. jacutica* Fed. 1979 (2), *M. ornata* Wiedmann 1817 (2), *M. pratorum* Mg. 1830 (5);

III – кластер “variegata”: *M. bohémica* Fed. 1962 (2), *M. femorata* Macq. 1835 (5), *M. laeta* Mg., 1838 (3), *M. mosquensis* Fed. 1960 (5), *M. rufa* Fed. 1962 (2), *M. variegata* Mg. 1830 (5);

IV – кластер “zachvatkini”: *M. palposa* Fed. 1960 (2), *M. triangulina* Fed. 1960 (4), *M. zachvatkini* Fed. 1960 (5);

V – кластер “pluriseta”: *M. nigriseta* Fed. 1960 (10), *M. nigriventris* Macq. 1835 (5), *M. pluriseta* Pet. 1961 (5).

Первоначально выделенные кластеры “nigriseta” и “pluriseta” (Сафонкин и др., 2016) были объединены в один кластер из-за филогенетической близости составляющих их видов. Название кла-

стера “laeta” из работы Сафонкина с соавт. (Сафонкин и др., 2016) изменено на “variegata” из-за большей предполагаемой близости вида *M. variegata* по комплексу внешних признаков к предковому гаплотипу (Safonkin *et al.*, 2020).

Для изучения формы постгониты вычленили из брюшка мухи и приклеивали на бумагу. С приготовленных препаратов на микроскопе VHX-1000 с объективом VH-Z100R/W (Keyence, Япония) при 1000-кратном увеличении были получены снимки внешних боковых сторон левого и правого постгонита каждой особи. По данным фотографиям была проведена геометрическая морфометрия с использованием пакета программ TPS (Rohlf, 2001a, b) и MorphoJ (Klingenberg, 2011). Для оцифровки формы в программе tpsDig2 были расставлены четыре реперные (landmarks) (A–D) и 16 промежуточных (semi-landmarks) (1–16) точек, отражающих контур переднего отростка постгонита (рис. 1). Во избежание ошибок при расстановке точек использованы усредненные значения по четырем повторностям.

Филогенетическое дерево построено в программе MrBayes 3.0 (Ronquist, Huelsenbeck, 2003) (рис. 2) на основе анализа участка *COI* мтДНК у 26 видов злаковых мух с использованием модели GTR (1set nst=6 rates=gamma и invgamma для 990000 генераций при частоте записи параметров 100). Нуклеотидные последовательности зарегистрированы в GenBank (Триселева и др., 2014, Сафонкин и др., 2016, Safonkin *et al.*, 2020). В качестве внешней группы взят вид *Campiglossa pygmaea*.

Для изучения преобразования формы переднего отростка постгонита у конкретного вида по сравнению с видом, наиболее близким к предковому гаплотипу кластера, применен метод дискриминантного анализа. Для переднего отростка постгонита в кластере “pratorum” (рис. 2, II) характерна несклеротизованная область по нижнему краю постгонита (более выраженная у видов, близких к предковым гаплотипам), поэтому в сравнительном анализе использована форма контура склеротизованной части нижнего края. Для адекватного сравнения изменения формы объектов контуры передних отростков постгонитов совмещали по линии прикрепления к гипандрию (рис. 1, А–В).

Для определения общих направлений изменения формы постгонитов филогенетическое дерево было помещено в пространство форм, полученное с помощью анализа главных компонент (PCA). Порог значимости компоненты – 10% общей вариации, приходящейся на нее.

Оценка уровня филогенетического сигнала была проведена с помощью вычисления суммы квадратов парсимонии Мэддисона (squared-changed parsimony). Для этого были построены вспомогательные деревья с минимальной и максимальной длиной в программе Mesquite (Maddison, Maddison,

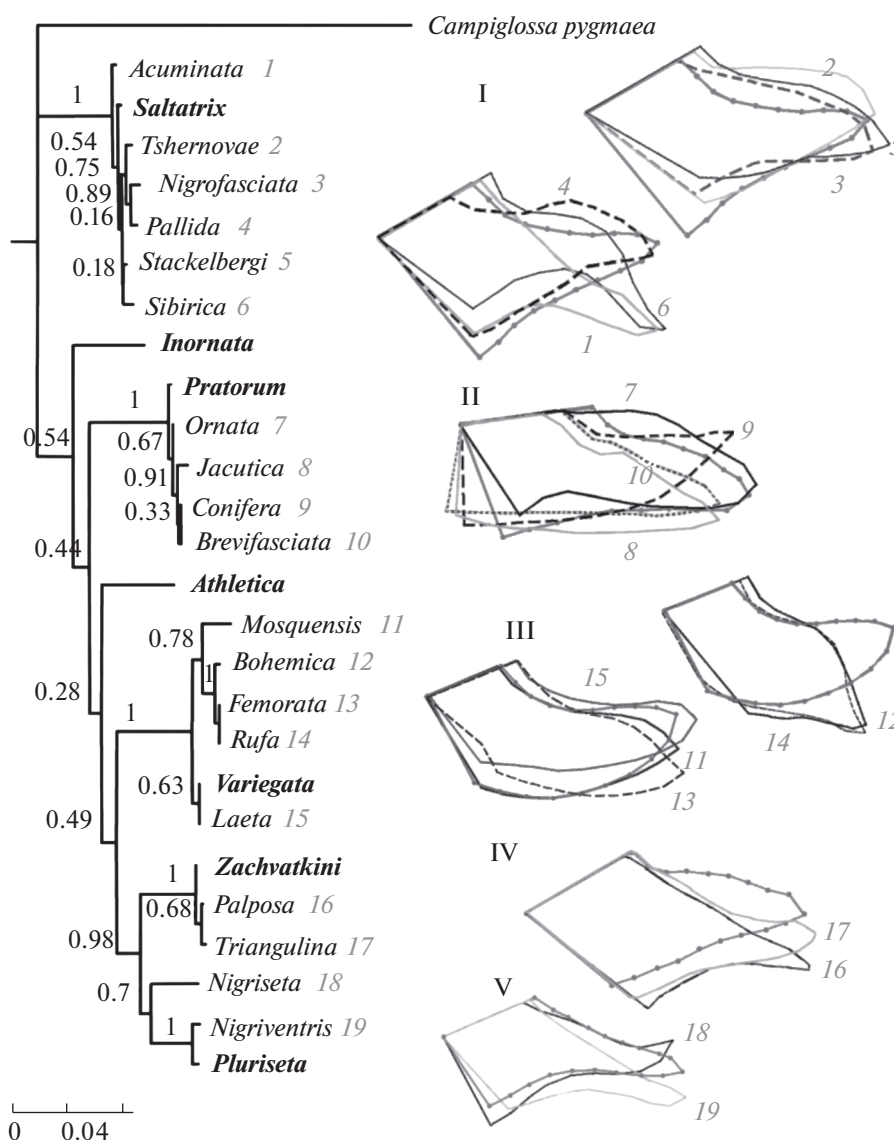


Рис. 2. Дендрограмма кластеризации, построенная в программе MrBayes, и схема изменения формы переднего отростка постгонита злаковых мух рода *Meromyza* между молодыми видами и видом, близким к гипотетическому предку по результатам дискриминантного анализа. Кластеры I–V – “saltatrix”, “pratorum”, “variegata”, “zachvatkini”, “pluriseta” соответственно. Вид, наиболее близкий к гипотетическому предку кластера, выделен жирным шрифтом и отмечен на схеме линией с точками. Цифры в основании ветвей – апостериорные вероятности. Цифра за названием вида соответствует контуру данного вида на схеме. Шкала – генетическая дистанция между гаплотипами. Внешняя группа – *Campiglossa pygmaea*.

2009) и вычислены индексы для оценки уровней гомоплазии (Consistency index (CI)) и синапоморфии (Retention index (RI)). В работе применяли метод ресэмплинга – перестановочный тест (кросс-валидация – 10 000).

Дополнительная статистическая обработка материала (*t*-критерий Стьюдента) проведена с помощью программы Statistica 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ главных компонент выявил 4 значимые компоненты, описывающие разнообразие

формы переднего отростка постгонита. Результаты метода наложения филогенетического дерева на пространство главных компонент представлены на диаграмме (рис. 3а–3в). Первая компонента (42% общей изменчивости) отражает общее растяжение контура (ABCD на рис. 1 и 3а–3в). Вторая компонента (23%) показывает степень изгибания его нижнего края (отрезок DC на рис. 1 и 3а), третья компонента (13%) демонстрирует изменение длины заднего края (отрезок AD на рис. 1 и 3б), а четвертая компонента (10%) показывает степень изгибания верхнего края (отрезок BC на рис. 1 и 3в).

При вычислении суммы квадратов парсимонии Мэдиссона с помощью перестановочного теста была оценена вероятность устойчивости деревьев с минимальной длиной (TL = 0.307, $p < 0.0001$), максимальной длиной (TL = 0.832, $p < 0.0001$) и байесовского дерева (TL = 0.317, $p < 0.0001$). Уровень гомоплазии данных низок, поскольку значение индекса CI близко к единице (0.97), а уровень синапоморфии высок, так как индекс RI тоже близок к единице (0.98). Это указывает на проявление отчетливого филогенетического сигнала, содержащегося в морфометрических данных. Результат наложения филогении, полученной байесовским методом, на пространство форм, представленный на графике (рис. 3а–в), показывает, что кластеры отделены один от другого, чем также подтверждается наличие филогенетического сигнала.

По расположению видов на диаграмме филогенетического дерева в пространстве форм выделяется несколько областей изменения формы (рис. 3а–3в). Первая область включает в себя виды *M. rufa*, *M. palposa*, *M. acuminata* и *M. sibirica*, сходные по утончению, наклону и изгибу выступающей части переднего отростка по отношению к виду, близкому к предковому гаплотипу (рис. 2, I, III, V). Вторая область (рис. 3а–3в) также объединяет виды из разных кластеров, сходные по наклону выступающей части переднего отростка постгонита: *M. tshernovae*, *M. nigrofasciata*, *M. stackelbergi* и *M. pallida* (рис. 2, I), *M. ornata* (рис. 2, II), *M. bohémica*, *M. femorata* (рис. 2, III), *M. triangulina* (рис. 2, IV) и *M. nigriventris* (рис. 2, V). Вторую область можно подразделить на две подобласти, в одну из которых входят *M. tshernovae*, *M. pallida* и *M. ornata* по особой степени изгибания верхнего края (подобласть 1 на рис. 3). Третья область (рис. 3) включает в себя виды *M. jacutica*, *M. conifera* и *M. brevifasciata*, близкие один к другому по степени изгибания нижнего края и изменениям по заднему контуру постгонитов (рис. 2, II). Сюда же по аналогичному изменению формы включается *M. nigriseta* (рис. 2, V). В отдельную область (рис. 3) входят виды *M. laeta*, *M. mosquensis*, *M. variegata*, *M. saltatrix*, *M. zachvatkini*, *M. pratorum* и *M. pluriseta*, наиболее близкие к предковым гаплотипам кластеров.

По результатам дискриминантного анализа типы изменения формы постгонитов внутри кластеров можно объединить в три группы, две из которых полностью совпадают с выделенными областями на диаграмме филогенетического дерева в пространстве форм, полученного с помощью анализа PCA. В группе 1 (*M. acuminata* и *M. sibirica*, *M. rufa*, *M. palposa*) выступающая часть становится узкой и направленной вниз. В группе 2 (*M. nigriventris*, *M. brevifasciata*, *M. jacutica*, *M. triangulina*, *M. nigrofasciata*, *M. stackelbergi*, *M. bohémica* и *M. femorata*) конец выступающей части направлен вниз. В группе 3 (*M. ornata*, *M. pallida* и

M. tshernovae) выступающая часть расширяется. Исключениями являются виды *M. conifera* и *M. nigriseta*, у которых конец выступающей части направлен вверх (рис. 2, II, V).

Исследование относительного вклада каждой из 20 точек контура (рис. 1) в общее изменение формы контура показало, что для видов группы 1 характерно смещение точки 5 от 2.1 до 8.54%, точки 12 от 0.5 до 0.9% и точки 13 от 0.7 до 5.1%. В результате происходит изгиб вниз выступающей части переднего отростка постгонита. Для видов группы 2 характерно смещение точки А от 0.06 до 0.46%. Положение данной точки влияет на ориентацию основной части постгонита относительно выступающей. Направления изменения формы постгонитов видов из групп 1 и 2, несмотря на сходную форму переднего отростка, достоверно различаются по относительному вкладу точки А ($t = -2.28$, $df = 10$, $p < 0.48$). У видов из группы 3 в основном отмечается уровень вклада точки С от 5.80 до 2.34%. У представителей данной группы положение этой точки определяет положение конца выступающей части переднего отростка постгонита.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Морфологическое соответствие отдельных элементов половых структур самцов и самок, как было показано на некоторых видах двукрылых (Yassin, Orgogozo, 2013), или функционально активных элементов полового аппарата у чешуекрылых (Lepidoptera, Noctuidae, Tortricidae) (Mikkola, 2008; Сафонкин, 2010, 2012) предполагает быстрое изменение половых структур самца и самки в процессе эволюции с последующим действием стабилизирующего отбора. Как было показано ранее, размеры ПОП внутри кластера достоверно различаются. Благодаря изменениям формы, приводящей к изменению размера, существует комплементарность половых структур самца и самки одного вида. Данная комплементарность во многом определяет защиту генома вида от проникновения чужеродных генов на начальном этапе спаривания. Можно предположить, что передние отростки постгонитов самца как функционально активные элементы, с одной стороны, способствуют успешной морфологической совместимости структур половых аппаратов самца и самки, с другой — препятствуют спариванию особей, имеющих морфологические различия по данным структурам.

Анализ PCA выявил “горячие зоны”, ответственные за разделение видов (нижние и верхние края основной и выступающей частей, а также линия прикрепления постгонита). Видовые различия по активным точкам контура переднего отростка постгонита совпадают с таковыми, выявленными методом канонических переменных (CVA) (Яцук, Сафонкин, 2018).

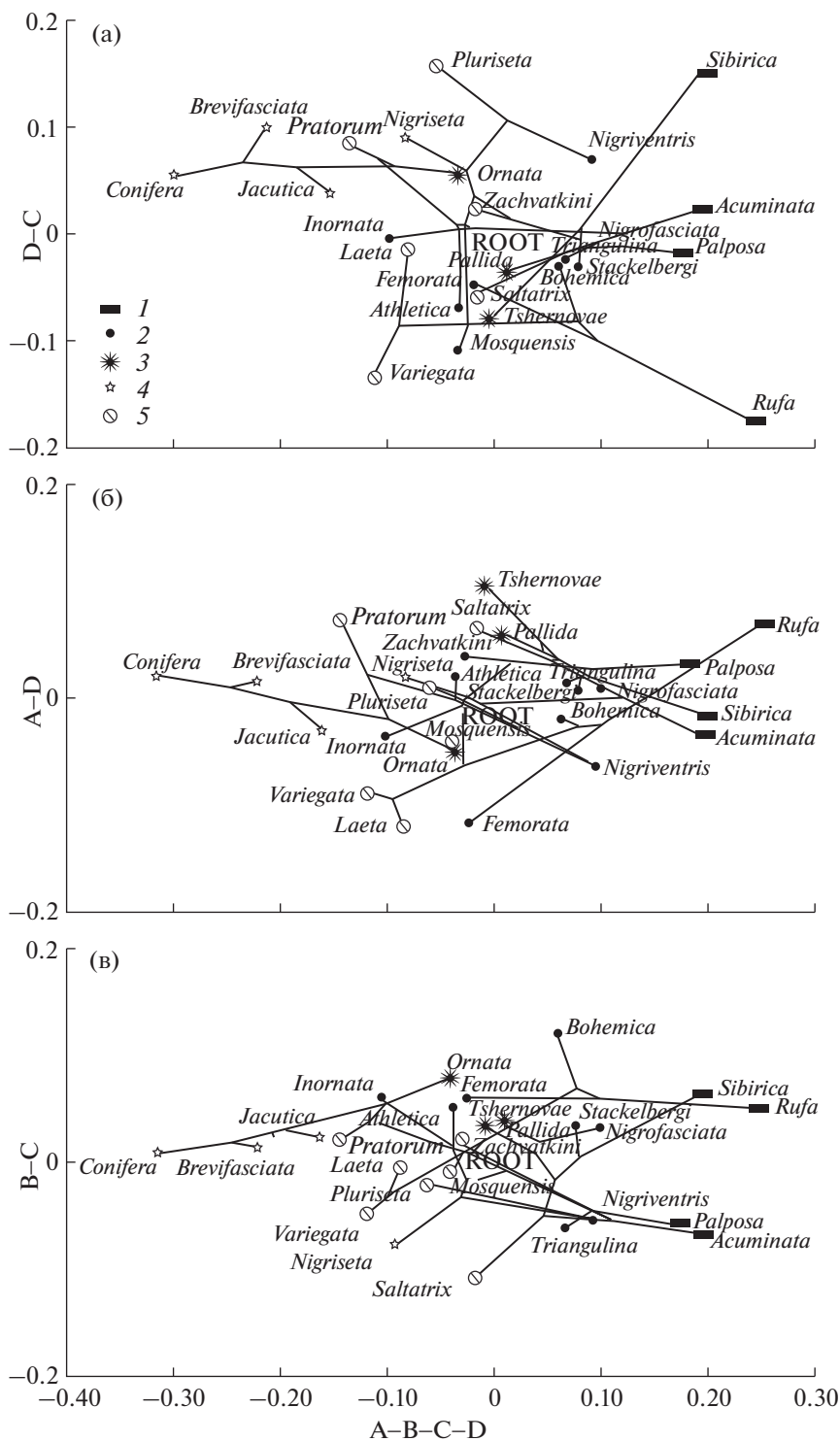


Рис. 3. Диаграмма наложения филогенетического дерева мух рода *Meromyza* на пространство главных компонент. Ось абсцисс – общее растяжение контура (A–B–C–D). Ось ординат: а – изменение нижнего края (D–C), б – заднего края (A–D), в – верхнего края (B–C). Области изменения формы: 1 – I, 2 – II, 3 – II, подобласть 1, 4 – III, 5 – IV. Root – внешняя группа.

Наличие отчетливого филогенетического сигнала, связанного с формой постгонитов, значимость которого была определена методом квадратированной парсимонии Мэддисона, свидетельствует о воз-

можности прослеживания путей эволюции формы по полученным с помощью морфологического картирования графикам. Оценка взаимного расположения видов и кластеров относительно друг

друга при наложении филогенетического дерева на пространство форм позволяет, как было показано на мухах семейства Dolichopodinae (Чурсина, Негробов, 2018), найти общие эволюционные закономерности. Поскольку виды злаковых мух различаются по близости к предковым гаплотипам (Сафонкин и др., 2016), сопоставление изменчивости формы постгонитов с результатами молекулярно-генетического анализа по локусу *COI* мтДНК в пространстве форм позволяет обсуждать эволюционные тенденции преобразования формы передних отростков постгонитов внутри кластеров.

Обобщая результаты анализов CVA (Яцук, Сафонкин, 2018), PCA и дискриминатного анализа, можно предположить, что три выявленных направления изменения формы передних отростков постгонитов – основные стратегии изменения формы в процессе эволюции репродуктивного аппарата злаковых мух рода *Meromyza*. Однотипная изменчивость формы постгонитов у видов из разных кластеров (например, *M. palposa* и *M. acuminata*; *M. nigriventris* и *M. stackelbergi*) может свидетельствовать о существовании направленного отбора по изменению постгонитов в определенных “горячих зонах”.

Таким образом, проведенный анализ главных компонент в сопоставлении с филогенией рода на основе локуса *COI* мтДНК и результатами сравнения формы переднего отростка постгонитов демонстрируют ограниченное число стратегий изменения таковой в процессе эволюции злаковых мух.

Исследование выполнено при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 41 “Биоразнообразие природных систем и биологические ресурсы России”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Галинская Т.В., Овчинникова О.Г. Склериты и мускулатура гениталий самцов высших Tephritoidea (Diptera: Tephritidae, Otitidae, Ulidiidae и Platystomatidae) // Науч.-исслед. публикации. 2015. Т. 1. № 7(27). С. 30–34.
- Городилова Ю.В. Морфологическая изменчивость хромосомных рас малой лесной мыши: геометрическая морфометрия нижней челюсти // Материалы конф. молодых ученых “Экология: сквозь время и расстояние”. 11–15 апреля 2011 г. ИЭРиЖ УрО РАН. Екатеринбург: Голицынский, 2011. С. 212.
- Куликов А.М., Мельников А.И., Горностаев Н.Г., Лазебный О.Е., Митрофанов В.Г. Морфометрический анализ половых органов самцов видов-двойников *Drosophila virilis* Sturt. // Генетика. 2004. Т. 40. № 2. С. 180–194.
- Негробов О.П., Чурсина М.А., Селиванова О.В. Морфометрические признаки гипогиния Dolichopodidae (Diptera) и их значение для разработки систематики семейства // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 3. С. 314–326.
- Сафонкин А.Ф. Гипотеза “Ключ–замок” в свете влияния ионизирующего излучения на кутикулярные структуры гениталий всеядной листовертки (*Archips podana*, lepidoptera, tortricidae) // Зоол. журн. 2010. Т. 89. № 11. С. 1331–1339.
- Сафонкин А.Ф. Разнообразие сообщества листоверток: вклад репродуктивного поведения. М.: КМК, 2012. 136 с.
- Сафонкин А.Ф., Триселева Т.А., Яцук А.А., Акентьева Н.А. Эволюция постгонитов злаковых мух рода *Meromyza* (Diptera: Chloropidae) // Зоол. журн. 2016. Т. 95. № 11. С. 1334–1342.
- Триселева Т.А., Акентьева Н.А., Сафонкин А.Ф. Филогенетические отношения между группами злаковых мух рода *Meromyza* на основе генетического и морфологического анализа // Изв. РАН. Сер. биол. 2014. № 3. С. 213–218.
- Чурсина М.А., Негробов О.П. Филогенетический сигнал формы крыла в подсемействе Dolichopodinae (Diptera, Dolichopodidae) и их значение для разработки систематики семейства // Зоол. журн. 2018. Т. 97. № 4. С. 1–13.
- Яцук А.А. Морфологическое и генетическое разнообразие злаковых мух рода *Meromyza* Meigen, 1830 (Diptera, Chloropidae): Автореф. дис. канд. биол. наук. М.: ИПЭЭ РАН, 2019. 25 с.
- Яцук А.А., Сафонкин А.Ф. Закономерности изменения формы постгонитов у мух рода *Meromyza* (Diptera, Chloropidae) // Журн. общ. биологии. 2018. Т. 79. № 1. С. 18–27.
- Klingenberg C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometric // Mol. Ecol. Res. 2011. V. 11. P. 353–357.
- Maddison W.P. Squared-change parsimony reconstructions of ancestral states for continuous-valued characters on a phylogenetic tree // Syst. Zool. 1991. V. 40. P. 304–314.
- Maddison W.P., Maddison D.R. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.2. 2009. URL: <http://mesquiteproject.org> (дата обращения: 1.02.2020).
- Mikkola K. Lock-and-key mechanisms of the internal genitalia of the Noctuidae (Lepidoptera): How are they selected for? // Eur. J. Entomol. 2008. V. 105. P. 13–25.
- Rohlf F.J. TPSrelw: relative warps, version 1.23. [Электронный ресурс] // N.Y.: State Univ. at Stony Brook (program). 2001a. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> (дата обращения: 1.07.2016).
- Rohlf F.J. TPSdig, version 1.31. [Электронный ресурс] // N.Y.: State University at Stony Brook (program). 2001b. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/> (дата обращения: 1.07.2016).
- Ronquist F., Huelsenbeck G.P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models // Bioinformatics. 2003. V. 19. P. 1575–1574.
- Safonkin A.F., Yatsuk A.A., Triseleva T.A. Variability of the key features and revision of a group of closely related species of grassflies (Diptera, Chloropidae, *Meromyza*) // ZooKeys. 2020. V. 942. P. 65–75.
- Yassin A., Orgogozo V. Coevolution between male and female genitalia in the *Drosophila melanogaster* species subgroup // PLoS One. 2013. V. 8. № 2. e57158.

Trends in Changes of the Form of Postgonites in the Evolution of Grass Flies of the Genus *Meromyza* (Diptera, Chloropidae)

A. A. Yatsuk^{1, #}, A. F. Safonkin¹, and T. A. Triseleva¹

¹*Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Leninsky prosp. 33, Moscow, 119071 Russia*

[#]*e-mail: sasha_djedi@mail.ru*

Grass flies of the genus *Meromyza* grouped by the *COI* mtDNA locus into several clusters, which corresponds to the morphological characteristics of the anterior processes of postgonites (AP) in the male genital apparatus. In the present study, the strategies of changes in the form of AP that have developed during the evolution of the group were investigated. To study the ways of transformation of the AP form in 24 species from seven clusters, the AP contours of evolutionarily younger species were compared with species close to the ancestral haplotypes of the group. Three groups of species were revealed. The approach of applying the phylogenetic tree (MrBayes program) to the results of geometric morphometry (MorphoJ program) was used. The areas corresponding to the previously found species groups, and the area of the species close to the ancestral haplotypes were identified on the phylogenetic tree placed in the shape space. The comparison of the results of the applied methods showed common microevolutionary directions in the transformation of the AP form associated with transformation of its projecting part (PAP).