УДК 595.771

ОБЗОР АРХАИЧНЫХ ДВУКРЫЛЫХ НИМФОМИЙИД (DIPTERA, NYMPHOMYIIDAE) ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА И СОПРЕДЕЛЬНОЙ ТЕРРИТОРИИ С ПЕРЕОПИСАНИЕМ *NYMPHOMYIA ALBA* TOKUNAGA И *N. LEVANIDOVAE* ROHDENDORF ET KALUGINA НА ОСНОВЕ МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДАННЫХ

Е. А. Макаrenchенко^{1,2}, Л. И. Гундерина³

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии»
Дальневосточного отделения Российской академии наук, г. Владивосток
E-mail: makarchenko@biosoil.ru

²Дальневосточный государственный технический рыбохозяйственный университет,
г. Владивосток

³Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения
Российской академии наук, г. Новосибирск
E-mail: gund@bionet.nsc.ru

Приведен краткий обзор изученности архаичных двукрылых нимфомийид Дальнего Востока и сопредельной территории. По материалам с о. Кунашир (Курильские острова) дано иллюстрированное переописание имаго самца и самки *Nymphomyia alba* Tokunaga, а из заповедника «Кедровая Падь» (Южное Приморье) – *N. levanidovae* Rohdendorf et Kalugina. Впервые для этих видов одновременно с анализом морфологических признаков имаго проведено секвенирование ДНК фрагмента митохондриального гена COI (цитохром с оксидазы I) и установлена видоспецифичность нуклеотидных последовательностей. Это позволяет использовать нуклеотидные последовательности гена COI в качестве видоспецифического признака, молекулярного маркера, при идентификации *N. alba* и *N. levanidovae*, а также дифференциации их от изученных ранее видов *N. rohdendorfi* Makarchenko и *N. kannasatoi* Makarchenko et Gunderina.

Ключевые слова: Diptera, Nymphomyiidae, *Nymphomyia alba*, *N. levanidovae*, переописание, ДНК-анализ, Дальний Восток.

ВВЕДЕНИЕ

Нимфомийиды (Nymphomyiidae) – архаичное и плохо изученное семейство высокоспециализированных двукрылых насекомых, представители которого являются филогенетическими и географическими реликтами. Эти очень маленькие, длиной 1.5–2.8 мм, беспозвоночные животные населяют предгорные и горные реки Азии и Северной Америки.

Семейство Nymphomyiidae установлено в 1932 г. известным японским диптерологом М. Токунагой для монотипического рода *Nymphomyia* Tokunaga с типовым видом *N. alba* Tokunaga, описанным из Ботанического сада Киотского университета (о. Хонсю, Япония) (Tokunaga, 1932). В настоящее время в мировой фауне известно 9 видов нимфомийид единственного рода *Nymphomyia*: *N. alba* Tokunaga, 1932 (Япония, рос-

сийский Дальний Восток – о. Кунашир), *N. walkeri* Ide, 1964 (Восточная Канада и США), *N. brundini* Kevan, 1970 (Восточные Гималаи), *N. levanidovae* Rohdendorf et Kalugina, 1974 (российский Дальний Восток – Южное Приморье и верхнее течение р. Бикин), *N. rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (российский Дальний Восток – Приморье, бассейны рр. Амур и Колыма, Чукотка), *N. dolichopeza* Courtney, 1994 (восток США), *N. holoptica* Courtney, 1994 (Гонконг), *N. kaluginae* Makarchenko, 2013 (российский Дальний Восток – бассейн р. Зея, притока Амура), *N. kannasatoi* Makarchenko et Gunderina, 2014 (Япония – Хонсю, российский Дальний Восток – Южный Сахалин). Кроме этого, куколки *Nymphomyia* sp. обнаружены на Северном Алтае Монголии (Haufford, Bouchard, 2012). Также по имаго известен один ископаемый вид *N. succina* Wagner et al., 2000 из эоцена (балтийский янтарь) (Wagner et al., 2000) и по остаткам субфоссильных личинок из донных осадков оз. Орон Иркутской об-

ласти – *Nymphomyia* sp. (Енущенко, Макаренко, 2016).

До наших исследований наиболее хорошо была изучена биология североамериканского вида *N. walkeri* (Harper, Lauzon, 1989) и значительно меньше информации имелось по биологии *N. alba* (Takemon, Tanida, 1994; Saigusa et al., 2009). Мы впервые изучили жизненные циклы *N. levanidovae* (Макаренко, Макаренко, 1983), *N. kannasatoi* (Макаренко и др., 2014) и *N. rohdendorfi* (Яворская, Макаренко, 2015), установили число генераций и фенологию.

Дальневосточные нимфомийиды, как и другие виды, населяют холодные предгорные и горные водотоки с быстрым течением, высоким содержанием кислорода в воде, низкой удельной электропроводностью и pH от слабокислой до слабощелочной, поселяясь в основном на каменистом и гравийно-галечниковом грунте, которые в мае-июне часто покрыты водорослями. После вылета имаго нимфомийид роятся на высоте 1–5 м, создавая скопления, как минимум, из нескольких сотен особей; здесь же, в воздухе они копулируют. Затем копулирующие пары опускаются на сырые камни в водотоке или поверхность воды, теряют крылья, погружаются в воду и какое-то время живут на дне водотока или прибрежных камнях. В это время самка откладывает яйца, причем часто кладку яиц она приклеивает на конец брюшка самца. После массового роения по берегам водотока наблюдается скопление большого количества сброшенных крыльев. Роение нимфомийид происходит в вечерние часы, часто на закате при тихой погоде. Личинки ведут подвижный образ жизни, передвигаясь по камням с помощью ложноножек брюшка. Нимфомийиды ряда видов в ранних личиночных возрастах могут находиться в подрусловом потоке и только в последнем возрасте перед окукливанием «поднимаются» в водоток. Питаются личинки микроскопическими водорослями, которые соскабливают с поверхности камней. Куколки и взрослые насекомые не питаются.

Анализ материала, собранного за последние 15 лет на Дальнем Востоке и сопредельной территории, позволил уточнить распространение известных видов, выявить новые виды и определить ошибки в идентификации некоторых видов. Так, новый материал из верховьев р. Анадырь, бассейна рр. Малый Ануй, Интриган (басс. Верхней Колымы) и с о. Хонсю (Япония), вместе с результатами молекулярно-генетического анализа, позволил уточнить видовую диагностику и распространение *N. rohdendorfi*. Было установлено, что на Южном Сахалине обитает свой, новый для науки вид, который ранее мы ошибочно определяли как *N. rohdendorfi* (Макаренко и др.,

1989). Этот же вид под названием «*Nymphomyia* sp. near *N. rohdendorfi*» указывался японскими коллегами из р. Канна на о. Хонсю (префектура Гунма) (Saigusa et al., 2009). Мы описали его как *N. kannasatoi* Макаренко et Gunderina, причем одновременно с анализом морфологических признаков имаго было проведено секвенирование ДНК фрагмента гена COI и показана видоспецифичность его нуклеотидных последовательностей (Макаренко и др., 2014). Ранее мы считали, что *N. rohdendorfi* достоверно обитает в бассейнах рр. Колыма (верхнее течение) и Амур (от Комсомольского района Хабаровского края до басс. р. Буря), а также в Приморском крае (басс. р. Раздольная) (Макаренко, Гундерина, 2012). Однако нахождение имаго *N. rohdendorfi* в р. Макча (басс. р. Зея) изменило наше представление о западной границе распространения этого вида. Кроме того, оказалось, что в басс. р. Зея обитают 2 вида – *N. kaluginae* и *N. rohdendorfi*. Также после находки имаго *N. rohdendorfi* в верховьях р. Анадырь уточнилась северная граница его обитания.

В дополнение к морфологическим исследованиям дальневосточных нимфомийид для видов *N. kannasatoi* и *N. rohdendorfi* Л. И. Гундерина провела частичное секвенирование генов COI имаго, куколок и личинок. Полученные последовательности использованы в качестве диагностических признаков – молекулярных маркеров исследуемых видов, а именно для разделения личинок близкородственных видов, а также для уточнения видового статуса при «таксономических сомнениях». А такие сомнения у систематиков возникают нередко. В нашем случае, после сравнения обширного имажинального материала *N. rohdendorfi* с Чукотки, басс. Колымы и Амура, были выявлены отличия в строении гениталий самок из «северных» и «амурских» популяций. У них оказались церки разной длины и формы, а также иной формы внутренние лопасти гонококситы. Самцы по строению гениталий практически не отличались. Полученные результаты по изменчивости генитальных структур самок склоняют нас к обязательному проведению в будущем молекулярно-генетических исследований особей из басс. Верхней Колымы, который является типовым местообитанием вида, и с Чукотки для сравнения с полученными ранее данными на амурском материале.

В настоящей работе для нимфомийид *N. alba* по материалам с о. Кунашир (Курильские острова) и *N. levanidovae* из заповедника «Кедровая Падь» (Южное Приморье) мы приводим переописание имаго самцов и самок, а также даем первую информацию о молекулярно-генетическом изучении этих видов.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материалом для морфологического и молекулярно-генетического исследований *N. alba* послужили сборы имаго нимфомийид, сделанные на о. Кунашир, а для *N. levanidovae* – в заповеднике «Кедровая Падь» в Южном Приморье. Подробные данные о материалах для морфологического описания приведены ниже, а геномную ДНК выделяли из индивидуальных особей имаго *N. alba*, собранных Ю. Н. Сундуковым при роении в безымянном ручье басс. р. Филатовка в районе кордона Филатовский Курильский заповедника 26 июня 2013 г., а *N. levanidovae* – из куколок и имаго, собранных Е. А. Макаrenchенко в р. Кедровая заповедника «Кедровая Падь» 3 июня 2012 г., фиксированных в 96%-ном этиловом спирте и хранившихся при температуре -20°C , как описано ранее (Макаrenchенко, Гундерина, 2012; Макаrenchенко и др., 2014). Для амплификации ДНК митохондриального гена, кодирующего субъединицу I цитохром оксидазы (COI), использовали праймеры LCO1490 и HCO2198 (Folmer et al., 1994). Условия проведения ПЦР, очистки и секвенирования полученных продуктов описаны в предыдущих работах (Макаrenchенко, Гундерина, 2012; Макаrenchенко и др., 2014). Последовательности ДНК были депонированы в базу данных GenBank под номерами MK144520 – MK144533. Для проверки видоспецифичности нуклеотидных последовательностей использовали программу BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Выравнивание последовательностей проводили с помощью программы MUSCLE (Edgar, 2004). Для молекулярно-генетического анализа последовательностей использовали программы из пакета программ MEGA version 6 (Tamura et al., 2013). Для определения модели, наиболее точно описывающей характер замен нуклеотидов в последовательностях COI *N. alba* и *N. levanidovae*, применяли тест иерархического правдоподобия, представленный в этом пакете программ. Для оценки эволюционной дивергенции (дистанции d_K2P) последовательностей определяли число замен нуклеотидов на сайт, используя двухпараметрический метод Кимуры (Kimura, 1980). Величину межвидовой дивергенции (d_K2P) определяли путем сравнения последовательностей COI *N. alba* и *N. levanidovae*.

Морфологическое и молекулярно-генетическое описание *Nymphotyia alba* Tokunaga

Рис. 1–5, 11, 12, 14, 15.

Nymphotyia alba Tokunaga, 1932: 561; 1935: 127; Макаrenchенко и др., 1989: 15; Courtney, 1994: 14; Makarchenko, 1996: 23; Saigusa, 2014: 80.

Материал: 23 самца, 14 самок, Курильские острова, о. Кунашир, Государственный природ-

ный заповедник «Курильский», руч. Балышева (басс. р. Филатовка), около 100 м выше устья, 19.VI.1989, Т. Тиунова; 46 самцов, 24 самки там же, безымянный ручей басс. р. Филатовка (нижнее течение), в р-не кордона Филатовский, 26.VI.2013, N 44°10'21.9", E 145°59'11.72", Ю. Сундуков; 1 самец, 1 самка, 1 экзувий куколки, о. Кунашир, Тихоокеанское побережье, руч. Прозрачный (басс. бух. Космодемьянской), 24–25.VIII.2016, N 44°05'41", E 145°53'27", дрефтовая ловушка, М. Астахов.

Описание

Имаго самец (n = 10). Бледно-серый, слабо хитинизированный. Длина тела 2.1–2.2 мм; отношение длины тела к длине крыла 1.04–1.05.

Голова длиной 232–316 мкм, шириной 148–152 мкм, в 1.3–1.4 раза длиннее ширины, кпереди постепенно сужается и заканчивается рострумом, который дистально почти не расширен, его передний край прямой или слегка округлый, при виде сбоку немного загнут вентрально в виде клюва; рострум дорсально с 5 парами щетинок (см. рис. 11). Сложные глаза на дорсальной стороне головы широко расставленные, расстояние между ними в 1.9–2.1 раза больше ширины конца рострума; на вентральной стороне сложные глаза не слиты друг с другом. Длинна антенны 170–178 мкм, два базальных членика округлые, длина 1-го членика 36 мкм, 2-го – 20–24 мкм; 1-й флагелломер длинный (88–100 мкм), к вершине немного расширяется, 2-й флагелломер очень короткий (6 мкм), 3-й флагелломер узкий, длиной 12–16 мкм, рядом с ним находится терминальная сенсилла, состоящая из трех палочковидных структур (см. рис. 11); антенна в 0.80–0.89 раза короче головы. «Нижняя губа» с округлым передним краем, латерально – с 2–3 парами длинных щетинок, медиально – с одной парой коротких щетинок.

Грудь длиной 0.60–0.64 мм, несет пару крыльев, жужжальца и 3 пары ног; крыло длиной 2.0–2.1 мм, наибольшей шириной 0.26–0.31 мм, бумеранговидной формы, с редуцированным жилкованием, по краю с длинными бичевидными щетинками длиной 0.32–0.34 мм; жужжальца длиной 0.24–0.28 мм; строение ног и груди типичное для рода (Tokunaga, 1935).

Длина брюшка 1.39–1.43 мм. Сегмент VIII с дорсальной и вентральной парами паратергальных выростов (см. рис. 1, 2); дорсальная пара длиной 84–100 мкм, шире вентральной, густо опушена микротрихиями; вентральная пара без микротрихий, длиной 72–76 мкм, с базальным бугром высотой 20 мкм. Последний сегмент брюшка дорсально несет церки, вентрально – пару гонококситов, гоностилей и эдеагус; церки в виде расширенных базально треугольных выростов 84–100 мкм длиной; гонококсит длиной 132–156 мкм, в 3.0–3.8 раза длиннее гоностиля; гоностиль длиной 36–

Рис. 1–5. Сегмент VIII и гениталии самца (1, 2) и самки (3–5) *Nymphomyia alba* Tokunaga: 1 – вид сверху; 2, 3 – вид сбоку; 4 – срединный вырост стернита IX; 5 – вид снизу. ae – эдеагус; ce – церки; gs – гоностиль; gx – гонококсит; pp – паратергальные выросты; sp – срединный вырост стернита IX. Масштабная линейка – 50 мкм

Figs 1–5. Male (1, 2) and female (3–5) terminalia of *Nymphomyia alba* Tokunaga: 1 – dorsal view; 2, 3 – lateral view; 4 – sternite IX process; 5 – ventral view. ae – aedeagus; ce – cerci; gs – gonostylus; gx – gonocoxite; pp – paratergite projections; sp – sternite IX median process. Scale bars are 50 µm

52 мкм, слабо изогнутый, более широкий и опушенный базально, голый и узкий дистально; эдеагус длиной 20–32 мкм, шириной – 24–36 мкм, с округлой вершиной (см. рис. 2, 12, 14).

Имаго самка ($n = 10$) в целом сходно с имаго самца. Длина тела 2.1–2.4 мм; отношение длины тела к длине крыла 1.0–1.1.

Голова длиной 197–205 мкм, шириной 146–150 мкм. Расстояние между сложными глазами дорсально в 2.0–2.1 раза больше ширины конца рострума. Антенна, как у самца, длиной 156–170 мкм, в 0.79–0.85 раза короче головы.

Грудь длиной 0.45–0.48 мм. Длина крыла 2.0–2.4 мм, наибольшая ширина 0.25–0.30 мм.

Длина брюшка 1.48–1.70 мм. Сегмент VIII дистально с парой бугров, длиной около 20 мкм и парой латеральных отростков, направленных вниз и длиной 32–70 мкм (рис. 3, 5, 15). Срединный вырост стернита IX трапециевидный, без щетинок, у заднего края с небольшой выемкой посередине (рис. 4), его длина 53 мкм, ширина 64 мкм. Последний сегмент брюшка несет церки

длиной 80–116 мкм, немного расширенные базально, в остальной части узкие палочковидные и параллельно-сторонние, редко покрыты щетинками (см. рис. 3, 5, 15).

Nymphomyia levanidovae Rohdendorf et Kalugina

Рис. 6–10, 13, 16, 17.

Nymphomyia levanidovae Rohdendorf et Kalugina; Родендорф, Калугина, 1974: 687; Макаренченко, Макаренченко, 1983: 92; Макаренченко и др., 1989: 15; Courtney, 1994: 15; Makarchenko, 1996: 23.

Материал: 58 самцов, 46 самок, Приморский край, Хасанский район, заповедник «Кедровая Падь», р. Кедровая в районе усадьбы, 27.VIII.1986, Т. Арефина; 14 самцов, 12 самок, там же, 3.VI.2012, Е. Макаренченко; 23 самца, 16 самок, там же, 26.VIII.2013, Е. Макаренченко.

Описание

Имаго самец ($n = 10$). Бледно-серый, слабо хитинизированный. Длина тела 2.0–2.6 мм; отношение длины тела к длине крыла 1.09–1.45.

Рис. 6–8. Сегмент VIII и гениталии самца (6) и самки (7, 8) *Nymphomyia levanidovae* Rohdendorf et Kalugina, вид снизу. Обозначения те же, что на рис. 1–5. Масштабная линейка – 50 мкм

Figs 6–8. Male (6) and female (7, 8) terminalia of *Nymphomyia levanidovae* Rohdendorf et Kalugina, ventral view. For abbreviations see Figs 1–5. Scale bars are 50 μ m

Голова длиной 180–213 мкм, шириной 136–148 мкм, в 1.3–1.4 раза длиннее ширины, кпереди постепенно сужается и заканчивается роострумом, который дистально не расширен, его передний край прямой или слегка округлый, как и у предыдущего вида, при виде сбоку немного загнут вентрально в виде клюва; роострум дорсально с 7 парами щетинок. Сложные глаза на дорсальной стороне головы широко расставленные, расстояние между ними в 2.5–2.6 раза больше ширины конца роострума; на вентральной стороне сложные глаза не слиты друг с другом (см. рис. 9, 10). Длина антенны 154–172 мкм, два базальных членика округлые, длина 1-го членика 28–40 мкм, 2-го – 20–22 мкм; 1-й флагелломер длинный (86–92 мкм), к вершине немного расширяется, 2-й флагелломер очень короткий (6–8 мкм), 3-й флагелломер узкий, длиной 12–14 мкм, рядом с ним находится терминальная сенсилла, состоящая из трех палочковидных струк-

тур; антенна в 0.78–0.81 раза короче головы. «Нижняя губа» с округлым передним краем, как у предыдущего вида.

Грудь длиной 0.61–0.62 мм, несет пару крыльев, жужжальца и 3 пары ног; крыло длиной 1.7–1.8 мм, наибольшей шириной 0.26–0.31 мм, бумеранговидной формы, с редуцированным жилкованием, по краю с длинными бичевидными щетинками длиной 0.28–0.39 мм; жужжальца длиной 0.19–0.22 мм; строение ног и груди типичное для рода (Tokunaga, 1935).

Длина брюшка 1.32–1.82 мм. Сегмент VIII с парой несклеротизованных, широких и коротких внутренних паратергальных выростов, снабженных у основания 2–3 сближенными округлыми склеротизованными бугорками, а также с парой склеротизованных голых и длинных (112–116 мкм), слабо загнутых и округлых на вершине боковых паратергальных выростов, с крупными базальными буграми длиной 24–32 мкм и торчащими в стороны (см. рис. 6, 16). Последний сегмент брюшка дорсально несет церки, вентрально – пару гонококситов, гоностилей и эдеагус; церки треугольные, опушенные, длиной 92–96 мкм; гонококсит дуговидно изогнут, длиной 140–160 мкм, в 1.7–2.0 раза длиннее гоностиля; гоностиль длиной 72–84 мкм, слабо изогнутый, более широкий и опушенный базально, голый и узкий дистально; эдеагус длиной 20–24 мкм, шириной – 32–36 мкм, с округлой вершиной (см. рис. 6, 13, 16).

Имаго самка (n = 8) в целом сходно с имаго самца. Длина тела 2.2–2.8 мм; отношение длины тела к длине крыла 1.25–1.77.

Голова длиной 197–205 мкм, шириной 140 мкм. Расстояние между сложными глазами дорсально в 3.5–4.0 раза больше ширины конца роострума.

Антенна, как у самца, длиной 110–116 мкм, в 0.75–0.80 раза короче головы.

Длина груди 0.57–0.64 мм. Длина крыла 1.56–1.76 мм, наибольшая ширина 0.20–0.24 мм.

Длина брюшка 1.52–1.61 мм. Сегмент VIII дистально с парой паратергальных носовидных выростов, длиной 26–28 мкм и парой широких и длинных латеральных лопастевидных выростов длиной 68–70 мкм, направленных назад (рис. 7, 8, 17). Срединный вырост стернита IX вытяну-

тый, с округлой вершиной, по краю которой сидят 4 короткие щетинки (см. рис. 7). Последний сегмент брюшка несет вытянуто-треугольные, с округлыми вершинами церки, длиной 84–88 мкм, с редкими щетинками (см. рис. 7, 8, 17).

Таксономические замечания.

Самцы и самки *N. alba* и *N. levanidovae* по ряду морфологических признаков очень близки и хорошо различаются только по вооружению тергита VIII и строению гениталий. Так, сегмент VIII самца *N. alba* с дорсальной и вентральной парами паратергальных выростов примерно сходной длины, но дорсальная пара шире вентральной, густо опушена микротрихиями; вентральная пара без микротрихий, с базальным бугром высотой 20 мкм. Гонококсит в 3.0–3.8 раза длиннее гоностилья; гоностиль короткий, слабо изогнутый, более широкий и опушенный базально, голый и узкий дистально. У самца *N. levanidovae* сегмент VIII с парой несклеротизованных, широких и коротких внутренних паратергальных выростов, снабженных у основания 2–3 сближенными округлыми склеротизованными бугорками, а также с парой склеротизованных голых и длинных, слабо загнутых и округлых на вершине боковых паратергальных выростов, с крупными базальными буграми длиной 24–32 мкм и торчащими в стороны. Гонококсит дуговидно изогнут, в 1.7–2.0 раза длиннее гоностилья; гоностиль длинный, слабо изогнутый, более широкий и опушенный базально, голый и узкий дистально. Сегмент VIII самки *N. alba* дистально с парой бугров и парой латеральных паратергальных выростов. Срединный вырост стернита IX низкий трапециевидный, без щетинок, на вершине с небольшой выемкой посередине. Церки узкие палочковидные и параллельно-сторонние. Самка *N. levanidovae* с парой паратергальных носовидных выростов дистально на сегменте VIII и парой широких и длинных латеральных лопастевидных выростов, направленных назад. Срединный вырост стернита IX вытянутый, с округлой

9

10

11

12

13

Рис. 9–13. Детали строения самца имаго *Nymphomyia levanidovae* Rohdendorf et Kalugina (9, 10, 13) и *N. alba* Tokunaga (11, 12): 9 – голова, снизу; 10 – то же, сбоку; 11 – антенна и рострум; 12 – гениталии, вид снизу; 13 – гоностили. R – рострум, L – «нижняя губа», ts – сенсилла терминального членика антенны

Figs 9–13. Adult male of *Nymphomyia levanidovae* Rohdendorf et Kalugina (9, 10, 13) and *N. alba* Tokunaga (11, 12): 9 – head, ventral view; 10 – the same, lateral view; 11 – antenna and rostrum; 12 – genitalia, lateral view; 13 – gonostylus. R – rostrum, L – labium, ts – terminal antennal sensilla

вершиной, по краю которой сидят 4 короткие щетинки. Церки вытянуто-треугольные, с округлой вершиной.

Результаты

молекулярно-генетического анализа

Фрагмент гена COI, изученный у *N. levanidovae* и *N. alba*, имел длину 657 нуклеотидов. Нуклеотидный состав этого фрагмента был сходным у обоих видов. Доли нуклеотидов в последовательностях *N. levanidovae* и *N. alba* составляли, соответственно: А – 27.6 и 28.0%, Т – 42.8 и 43.2%, С – 13.9 и 13.6%, G – 15.7 и 15.2%. Вместе с тем как у *N. levanidovae*, так и у *N. alba* нуклеотидный состав был неравно-

Рис. 14–17. Сегмент VIII и гениталии самца (14, 16) и самки (15, 17) *Nymphomyia alba* Tokunaga (14, 15) и *N. levanidovae* Rohdendorf et Kalugina (16, 17): 14, 16 – вид снизу; 15, 17 – вид сбоку

Figs 14–17. Male (14, 16) and female (15, 17) terminalia of *Nymphomyia alba* Tokunaga (14, 15) and *N. levanidovae* Rohdendorf et Kalugina (16, 17): 14, 16 – ventral view; 15, 17 – lateral view

весным: доля А + Т пар нуклеотидов (70.4 и 71.2%, соответственно) больше, чем в 2 раза превышала долю G + C пар (29.6 и 28.8% соответственно).

Анализ показал существование внутривидового и межвидового полиморфизма нуклеотидных последовательностей изученных фрагментов гена COI *N. levanidovae* и *N. alba*. В восьми последовательностях фрагмента COI *N. levanidovae* было обнаружено девять замен нуклеотидов в семи позициях (шесть замен – транзиции, три – трансверсии), а в шести последовательностях COI *N. alba* – три замены нуклеотидов (одна трансверсия и две транзиции). Нуклеотидные последовательности COI *N. levanidovae* и *N. alba* различаются двенадцатью консервативными заменами. Четыре из них – трансверсии, восемь – транзиции. Как внутривидовые, так и межвидовые замены нуклеотидов произошли

в третьей позиции кодонов и не привели к изменению аминокислотных последовательностей белка COI у этих видов. Характер нуклеотидной изменчивости в последовательностях COI *N. levanidovae* и *N. alba* наиболее точно описывала модель HKY (Hasegawa – Kishino – Yano) (1985).

Внутривидовые эволюционные дистанции (d_K2P) между последовательностями COI индивидуальных особей *N. levanidovae* варьировали от 0 до 0.008, составляя в среднем 0.003 замен нуклеотидов на сайт. У *N. alba* они варьировали от 0 до 0.003, составляя в среднем 0.002. Межвидовые дистанции между последовательностями COI *N. levanidovae* и *N. alba* на порядок величины больше, чем между последовательностями каждого из видов. Эти значения варьировали от 0.019 до 0.024 замен нуклеотидов на сайт и составляли в среднем 0.022 замен нуклеотидов на сайт (табл. 1, 2).

Значения внутривидовых дистанций между последовательностями COI *N. levanidovae* и *N. alba* соответствуют тем, которые были обнаружены у *N. rohdendorfi* (0.006 замен нуклеотидов на сайт) и *N. kannasatoi* (0.005 замен нуклеотидов на сайт) (см. табл. 2).

Вместе с тем межвидовые дистанции между *N. levanidovae* и *N. alba* почти в 3 раза меньше, чем между этими и другими изученными видами нимфомийид (см. табл. 2). С одной стороны, такая величина межвидовых дистанций может указывать на то, что различие нуклеотидных последовательностей COI между этими группами особей не достигает уровня генетического различия видов. С другой – возможно, что дивергенция *N. levanidovae* и *N. alba* произошла относительно недавно, и за время их независимой эволюции в последовательностях COI не успело накопиться достаточное число замен нуклеотидов. Необходимо, однако, отметить, что сравнение внутривидовых и межвидовых эволюционных дистанций, проведенное в различных группах животных, позволило предложить стандартный порог, дифференцирующий внутривидовые и межвидовые дистанции: межвидовые дистан-

Таблица 1. Эволюционные дистанции (d_K2P) (число замен нуклеотидов на сайт) между нуклеотидными последовательностями COI *Nymphomyia alba* Tokunaga и *N. levanidovae* Rohdendorf et Kalugina

Table 1. Evolutionary distances (number of base substitutions per site) among COI sequences of *Nymphomyia alba* Tokunaga and *N. levanidovae* Rohdendorf et Kalugina

Вид	<i>N. alba</i>						<i>N. levanidovae</i>					
	МК144520	МК144522	МК144523	МК144521	МК144524	МК144525	МК144532	МК144530	МК144531	МК144533	МК144527	МК144529
<i>N. alba</i>	МК144522	0.003										МК144528
	МК144523	0.003										
	МК144521	0.002	0.002									
	МК144524	0.002	0.002	0.000								
	МК144525	0.002	0.002	0.000	0.000							
<i>N. levanidovae</i>	МК144532	0.024	0.024	0.022	0.022	0.022						
	МК144530	0.024	0.024	0.022	0.022	0.022	0.006					
	МК144531	0.024	0.024	0.022	0.022	0.022	0.006	0.000				
	МК144533	0.020	0.020	0.020	0.019	0.019	0.006	0.003	0.003			
	МК144527	0.022	0.022	0.020	0.020	0.020	0.005	0.002	0.002	0.002		
	МК144529	0.022	0.022	0.020	0.020	0.020	0.005	0.002	0.002	0.002	0.000	
	МК144528	0.025	0.025	0.024	0.024	0.024	0.008	0.005	0.005	0.005	0.003	0.003
	МК144526	0.024	0.024	0.022	0.022	0.022	0.006	0.003	0.003	0.003	0.002	0.002

Таблица 2. Эволюционные дистанции (d_K2P) (число замен нуклеотидов на сайт) между нуклеотидными последовательностями COI видов рода *Nymphomyia*

Table 2. Evolutionary distances (d_K2P) (the number of base substitutions per site) among COI sequences of the genus *Nymphomyia* species

Вид	n	<i>N. alba</i>	<i>N. levanidovae</i>	<i>N. rohndendorfi</i>	<i>N. kamasatoii</i>
<i>N. alba</i>	6	6	8	5	7
<i>N. levanidovae</i>	8	0.002	0.003		
<i>N. rohndendorfi</i>	5	0.073	0.073	0.006	
<i>N. kamasatoii</i>	7	0.063	0.057	0.069	0.005

Примечание. Жирным шрифтом выделены эволюционные дистанции между последовательностями COI внутри вида, n – число последовательностей.

ции должны превышать внутривидовые в 10 раз (Hebert et al., 2003, 2004). Данные, представленные в табл. 2, показывают, что эволюционные дистанции между последовательностями COI *N. levanidovae* и *N. alba* на порядок величины больше, чем внутривидовые дистанции каждого из видов, что позволяет считать эти виды независимыми. Морфологические различия как самцов, так и самок *N. levanidovae* и *N. alba*, описанные в настоящем сообщении, также подтверждают второе предположение. Сравнение с помощью программы BLAST последовательностей COI, полученных в настоящей работе, с последовательностями COI других видов, представленных в международных базах данных (GenBank, BOLD, ENA), показало отсутствие в изученных образцах неспецифических загрязнений, что позволяет считать их специфичными для *N. levanidovae* и *N. alba*.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности фрагмента гена COI, изученного в настоящей работе, являются специфическими для *N. levanidovae* и *N. alba* и могут служить в качестве дополнительного диагностического признака при идентификации этих видов.

Авторы глубоко признательны д. б. н. Т. М. Тиуновой, к. б. н. Ю. Н. Сундукову и к. б. н. М. В. Астахову за имажинальные сборы *Nymphomyia alba* с о. Кунашир, а также Т. И. Арефиной за материалы по *N. levanidovae* из заповедника «Кедровая Падь», которые легли в основу переописания самцов и самок этих видов, а также ДНК-анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке бюджетного проекта № 0324-2018-0019, а также гранта РФФИ (№14-04-01126) и программы «Дальний Восток» (проект № 18-5-104).

Секвенирование ДНК проведено с использованием ресурсов ЦКП «Геномика» СО РАН, г. Новосибирск (<http://sequest.niboch.nsc.ru>).

ЛИТЕРАТУРА

- Енущенко И. В., Макаrenchенко Е. А. Находка остатков личинок нимфомийид (Diptera, Nymphomyiidae) в донных осадках озера Орон (Иркутская область) // Жизнь пресных вод. Владивосток : Дальнаука, 2016. Вып. 2. С. 180–184.
- Макаrenchенко Е. А., Макаrenchенко М. А. Архаичные двукрылые нимфомийиды (Diptera, Nymphomyiidae) Дальнего Востока СССР // Двукрылые насекомые, их систематика, географическое распространение и экология. Л. : Зоол. ин-т АН СССР, 1983. С. 92–95.
- Макаrenchенко Е. А., Гундерина Л. И., Сато С. Морфологическое и молекулярно-генетическое описание *Nymphomyia kannasatoi* sp. n. (Diptera, Nymphomyiidae) из Японии и Южного Сахалина, с данными по биологии вида // Евразият. энтомол. журн. 2014. Т. 13. Вып. 6. С. 535–544.
- Макаrenchенко Е. А., Гундерина Л. И. Морфологическое и молекулярно-генетическое переописание *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (Diptera, Nymphomyiidae) из бассейна р. Амур (российский Дальний Восток) // Евразият. энтомол. журн. 2012. Т. 11. Прил. 2. С. 17–25.
- Макаrenchенко Е. А., Чубарева Л. А., Макаrenchенко М. А. Новые данные по распространению, кариологии и биологии архаичных двукрылых нимфомийид (Diptera, Nymphomyiidae) с советского Дальнего Востока // Систематика и экология речных организмов. Владивосток : ДВНЦ АН СССР, 1989. С. 15–19.
- Родендорф Б. Б., Калугина Н. С. Находка своеобразных двукрылых нимфомийид (Diptera, Nymphomyiidae) в Приморье // Энтомол. обозрение. 1974. Т. 53, № 3. С. 686–694.
- Яворская Н. М., Макаrenchенко Е. А. Новые данные по таксономии, распространению и биологии архаичных двукрылых *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (Diptera, Nymphomyiidae) // Евразият. энтомол. журн. 2015. Т. 6. Вып. 14. С. 523–531.
- Courtney G. W. Biosystematics of the Nymphomyiidae (Insecta, Diptera): life history, morphology, and phylogenetic relationships // Smithsonian Contributions to Zoology. 1994. No. 550. P. 1–39.
- Edgar R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Research. 2004. Vol. 32, No. 5. P. 1792–1797.
- Folmer O., Black M., Hoeh W. et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Molecular Marine Biology and Biotechnology. 1994. Vol. 3. P. 294–299.
- Harper P. P., Lauzon M. Life cycle of the nymph fly *Palaeodipteron walkeri* Ide 1965 (Diptera, Nymphomyiidae) in the White Mountains of southern Quebec // Can. Ent. 1989. Vol. 121. P. 603–607.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // Journal of Molecular Evolution. 1985. Vol. 22. P. 160–174.
- Hayford B., Bouchard W. First record of Nymphomyiidae (Diptera) from Central Asia with notes on novel habitat for Nymphomyiidae // Proceedings of the Entomological Society of Washington. 2012. Vol. 114, No. 2. P. 186–193.
- Hebert P. D. N., Cywinska A., Ball S. L., de Waard J. R. Biological identification through DNA barcodes // Proceedings of the Royal Society B. 2003. Vol. 270. P. 313–321.
- Hebert P. D. N., Stoeckle M. Y., Zemlak T. S., Francis C. M. Identification of birds through DNA barcodes // PLoS Biol. 2004. Vol. 2. P. 1657–1663.
- Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. 1980. Vol. 16. P. 111–120.
- Makarchenko E. A. Some remarks on distribution of the Far Eastern Nymphomyiidae (Diptera) // Makunagi / Acta Dipterologica. 1996. Vol. 19. P. 22–25.
- Saigusa T. Family Nymphomyiidae / Eds. T. Nakamura, T. Saigusa, M. Suwa : Catalogue of the Insects of Japan. Vol. 8, Diptera. Part 1: Nematocera – Brachycera Aschiza. The Entomological Society of Japan. Touka Shobo, Fukuoka. 2014. P. 80–81.
- Saigusa T., Nakamura T., Sato S. Insect mist-swarming of *Nymphomyia* species in Japan // Fly Times. 2009. No. 43. P. 2–8.

Takemon Y., Tanida K. New data on *Nymphomyia alba* (Diptera, Nymphomyiidae) from Japan with notes on the larvae and the micro-habitat // *Aquatic Insects*. 1994. Vol. 16. P. 119–124.

Tamura K., Stecher G., Peterson D. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // *Molecular Biology and Evolution*. 2013. Vol. 30, No. 12. P. 2725–2729.

Поступила в редакцию 14.12.2018 г.

Поступила после доработки 25.01.2019 г.

Tokunaga M. A remarkable Dipterous insect from Japan, *Nymphomyia alba*, gen. et sp. nov. // *Annot. Zool. Jpn.* 1932. Vol. 13. P. 559–569.

Tokunaga M. A Morphological Study of a Nymphomyiid Fly // *Philippine Journal of Science*. 1935. Vol. 56. P. 127–214.

Wagner R., Hoffeins C., Hoffeins H. W. A fossil nymphomyiid (Diptera) from the Baltic and Bitterfeld amber // *Systematic Entomology*. 2000. Vol. 25. P. 115–120.

REVIEW OF THE ARCHAIC NYMPHOMYIID FLY (DIPTERA, NYMPHOMYIIDAE) IN THE FAR EAST AND THE ADJACENT TERRITORY, WITH *NYMPHOMYIA ALBA* TOKUNAGA AND *N. LEVANIDOVAE* ROHDENDORF ET KALUGINA MORPHOLOGICALLY AND MOLECULAR-GENETICALLY REDESCRIBED

E. A. Makarchenko^{1,2}, L. I. Gunderina³

¹ Federal Research Center for Terrestrial Biota Biodiversity of East Asia,
Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Vladivostok

² Far Eastern State Technical Fisheries University, Vladivostok

³ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk

Brief review of the fauna, systematics, distribution and biology of the archaic nymphomyiid fly in the Russian Far East and the adjacent territory is given. Adults of male and female of *Nymphomyia alba* Tokunaga, 1932 from Kunashir Island (Kuril Islands) and *N. levanidovae* Rohdendorf et Kalugina, 1974 from the *Kedrovaya Pad'* Nature Reserve (Southern Primorye) are redescribed and illustrated. For the first time, the morphological analysis and the partial COI gene sequencing of these species have been carried out simultaneously. The species specificity of COI sequences has been shown. These sequences could be used as additional diagnostic characters, molecular markers, for identifying of *N. alba* and *N. levanidovae* and differentiating them from previously studied *N. rohdendorfi* Makarchenko and *N. kannasatoi* Makarchenko et Gunderina species.

Keywords: Diptera, Nymphomyiidae, *Nymphomyia alba*, *N. levanidovae*, redescription, DNA analysis, Far East.

REFERENCES

- Courtney, G. W., 1994, Biosystematics of the Nymphomyiidae (Insecta, Diptera): Life History, Morphology, and Phylogenetic Relationships, *Smithsonian Contributions to Zoology*, 550, 1–39.
- Edgar, R. C., 2004, MUSCLE: Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput, *Nucleic Acids Research*, 32, 5, 1792–1797.
- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek R., 1994, DNA Primers for Amplification of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I from Diverse Metazoan Invertebrates, *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294–299.
- Harper, P. P.; Lauzon M., 1989, Life Cycle of the Nymph Fly *Palaeodipteron walkeri* Ide 1965 (Diptera, Nymphomyiidae) in the White Mountains of Southern Quebec, *Can. Ent.*, 121, 603–607.
- Hasegawa, M., Kishino, H.; Yano T., 1985, Dating of the Human-Ape Splitting by a Molecular Clock of Mitochondrial DNA, *Journal of Molecular Evolution*, 22, 160–174.
- Hayford, B.; Bouchard, W., 2012, First Record of Nymphomyiidae (Diptera) from Central Asia with Notes on Novel Habitat for Nymphomyiidae, *Proceedings of the Entomological Society of Washington*, 114, 2, 186–193.
- Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; de Waard J. R., 2003, Biological Identification through DNA Barcodes, *Proceedings of the Royal Society B*, 270, 313–321.
- Hebert, P. D. N.; Stoeckle, M. Y.; Zemlak, T. S.; Francis, C. M., 2004, Identification of Birds through DNA Barcodes, *PLoS Biol.*, 2, 1657–1663.
- Kimura, M., 1980, A Simple Method for Estimating Evolutionary Rate of Base Substitutions through Comparative Studies of Nucleotide Sequences, *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111–120.
- Makarchenko, E. A., 1996, Some Remarks on Distribution of the Far Eastern Nymphomyiidae (Diptera), *Makunagi, Acta Dipterologica*, 19, 22–25.
- Makarchenko, E. A.; Chubareva, L. A.; Makarchenko, M. A., 1989, New Data on Distribution, Karyology, and Biology of Archaic Nymphomyiidae (Diptera) from the Soviet Far East, *Systematics and Ecology of the River Organisms*, Vladivostok, DVNC AN USSR, 15–19 [In Russian].

- Makarchenko, E. A.; Gunderina, L. I., 2012, Morphological Redescription and DNA Barcoding of *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (Diptera, Nymphomyiidae) from the Amur River Basin (Russian Far East), *Euroasian Entomological Journal*, 11, Suppl. 2, 17–25 [In Russian].
- Makarchenko, E. A.; Gunderina, L. I.; Sato, S., 2014, Morphological Description and DNA Barcoding of *Nymphomyia kannasatoi* sp. n. (Diptera, Nymphomyiidae) from Japan and Southern Sakhalin, with Data on Biology of Species, *Ibid.*, 13, Iss. 6, 535–544 [In Russian].
- Makarchenko, E. A.; Makarchenko, M. A., 1983, Archaic Nymphomyiidae (Diptera) of the Soviet Far East. *Diptera Insects, Systematics, Geographical Distribution and Ecology*, Leningrad, ZIN AN USSR, 92–95 [In Russian].
- Rohdendorf, B. B.; Kalugina, N. S., 1974, Discovery of Peculiar Nymphomyiidae (Diptera) in Primorye, *Entomological Review*, 53, 3, 686–694 [In Russian].
- Saigusa, T., 2014, Family Nymphomyiidae, Eds. T. Nakamura, T. Saigusa, M. Suwa, *Catalogue of the Insects of Japan.*, 8, *Diptera, Part 1, Nematocera – Brachycera Aschiza*, The Entomological Society of Japan, Touka Shobo, Fukuoka, 80–81.
- Saigusa, T.; Nakamura, T.; Sato S., 2009, Insect Mist-Swarming of *Nymphomyia* Species in Japan, *Fly Times*, 43, 2–8.
- Takemon, Y.; Tanida, K., 1994, New Data on *Nymphomyia alba* (Diptera, Nymphomyiidae) from Japan with Notes on the Larvae and the Micro-Habitat, *Aquatic Insects*, 16, 119–124.
- Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipski, A.; Kumar, S., 2013, MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, 30, 12, 2725–2729.
- Tokunaga, M., 1932, A Remarkable Dipterous Insect from Japan, *Nymphomyia alba*, gen. et sp. nov., *Annot. Zool. Jpn.*, 13, 559–569.
- Tokunaga, M., 1935, A Morphological Study of a Nymphomyiid Fly., *Philippine Journal of Science*, 56, 127–214.
- Wagner, R.; Hoffeins, C.; Hoffeins, H. W., 2000, A Fossil Nymphomyiid (Diptera) from the Baltic and Bitterfeld Amber, *Systematic Entomology*, 25, 115–120.
- Yavorskaya, N. M.; Makarchenko, E. A., 2015, New Data on Taxonomy, Distribution and Biology of Archaic Diptera *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (Diptera, Nymphomyiidae), *Euroasian Entomological Journal*, 6, Iss. 14, 523–531 [In Russian].
- Yenushchenko, I. V.; Makarchenko, E. A., 2016, Finding of the Fossil Nymphomyiid Larvae (Diptera, Nymphomyiidae) in Bottom Sediments of Lake Oron (Irkutsk Region), *Freshwater Life*, Iss. 2, Vladivostok, Dalnauka, 180–184 [In Russian].