

Морфологическое и молекулярно-генетическое переописание  
*Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979  
(Diptera, Nymphomyiidae) из бассейна р. Амур  
(российский Дальний Восток)

Morphological redescription and DNA barcoding  
of *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979  
(Diptera, Nymphomyiidae) from Amur River basin (Russian Far East)

Е.А. Макаrenchенко\*, Л.И. Гундерина\*\*  
Е.А. Makarchenko\*, L.I. Gunderina\*\*

\* Биолого-почвенный институт ДВО РАН, просп. 100 лет Владивостоку 159, Владивосток 690022 Россия. E-mail: makarchenko@biosoil.ru.

\* Institute of Biology and Soil Sciences, Russian Academy of Sciences, Far East Branch, 100 let Vladivostoku ave. 159, Vladivostok 690022 Russia.

\*\* Институт цитологии и генетики СО РАН, просп. Академика Лаврентьева 10, Новосибирск 630090 Россия. E-mail: gund@bionet.nsc.ru.

\*\* Institute of Cytology and Genetics, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch, Academician Lavrentyev ave. 10, Novosibirsk 630090 Russia.

**Ключевые слова:** Diptera, Nymphomyiidae, *Nymphomyia rohdendorfi*, переописание, секвенирование ДНК, российский Дальний Восток.

**Key words:** Diptera, Nymphomyiidae, *Nymphomyia rohdendorfi*, redescription, DNA barcoding, Russian Far East.

**Резюме.** По материалу из басс. р. Амур приведено иллюстрированное переописание самца и самки нимфомийид *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979, которые ранее были описаны только по незрелым особям, извлечённым из экзвивев куколок. Впервые для двукрылых насекомых семейства Nymphomyiidae и вида *N. rohdendorfi* одновременно с анализом морфологических признаков имаго проведено секвенирование ДНК-фрагмента гена COI и показана видоспецифичность его нуклеотидных последовательностей. Это позволяет использовать нуклеотидные последовательности гена COI в качестве видоспецифического признака — молекулярного маркера при идентификации *N. rohdendorfi*.

**Abstract.** Male and female adults of *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (family Nymphomyiidae, Diptera), based on material from Amur River basin are described and illustrated. For the first time in the family Nymphomyiidae, morphological analysis and partial COI gene sequencing of *N. rohdendorfi* adults were carried out simultaneously. The species-specificity of *N. rohdendorfi* COI sequences was shown; these sequences could be used as diagnostic characters — molecular markers of *N. rohdendorfi*.

## Введение

Нимфомийиды — высокоспециализированные двукрылые насекомые, возможно являются фило-

генетическими и географическими реликтами. Своеобразие нимфомийид настолько велико, что не позволяет их сближать с какими-либо известными современными двукрылыми. Б.Б. Родендорф [1977, 1980] выделял этих насекомых в составе отряда двукрылых в качестве особого подотряда Archidiptera и инфраотряда Nymphomyiomorpha.

Семейство установлено в 1932 г. М. Токунагой [Tokunaga, 1932] на основе единственного монотипического рода *Nymphomyia* из Центральной Японии.

Имаго нимфомийид редко превышает длину 2,5 мм и имеет удлинённую цилиндрическую форму тела. Сложные глаза широко расставлены дорсально и часто слиты вентрально позади ротового отверстия. Дистально голова вытянута в виде широкого, загнутого вниз рыльца (рострума), несущего на нижней поверхности ротовое отверстие, а на верхней — пару специализированных антенн. Грудь большая, удлинённая. Крылья узкие, длинные, бумеранговидные, жилкование редуцировано. Край крыла с опахалом из длинных бичевидных щетинок, которые, видимо, играют важную роль в своеобразном полёте насекомого, во время которого совершают не колебательные движения вверх – вниз, а круговые движения вокруг своей оси. Для брюшка характерно развитие на различных сегментах

особых парных паратергальных отростков, сильное развитие крупных церок, наряду с гонокситами и гоностиями.

Куколка удлинённая, червеобразная, с резко выраженной прогнатной головой, параллельно-крайними чехлами крыла, которые короче брюшка, прилегают к телу и не прикрывают чехлов ног. Чехлы ног расположены не рядом друг с другом. Сегменты брюшка покрыты тонкой скульптурой в виде сетки многоугольников и мелких шипов. Конец брюшка несёт чехлы для церок (у обоих полов) и кокситов (у самцов); чехлы церок оканчиваются склеротизованным остриём, чехлы кокситов несут по крупному треугольному острому шипу.

Личинка червеобразная, тело из 13 хорошо различимых сегментов. Три грудных сегмента лишены придатков. Брюшные сегменты I–VII и IX несут по паре длинных ложноножек, на вершине которых находятся коготки и крючья. Голова яйцевидная, бледно-жёлтая, несёт вблизи заднего края пару личиночных глазков. Антенны короче половины длины головы: их базальный членик прямой, цилиндрический, дистальный отдел состоит из 4 коротких и плоских придатков. Мандибулы в виде совков, по краю с 7 зубцами. Обращённый вперёд край ментума зубчатый: срединный зубец трёх- или пятилопастной, боковых зубцов по 5 с каждой стороны.

Ядра клеток личинок нимфомийид содержат длинные, сложно переплетённые политенные хромосомы. Диплоидное число хромосом у единственного кариологически изученного вида *N. levanidovae* Rohd. et Kalugina —  $2n=8$ . Из них на метафазных пластинках выявлены 3 пары крупных матацентрических и одна пара малых точечных хромосом [Макаrenchенко и др., 1989].

Нимфомийиды населяют предгорные и горные реки с быстрым течением, высоким содержанием кислорода в воде, каменистыми и гравийно-галечниковыми грунтами. После вылета, имаго нимфомийид роются на высоте 1–5 метров, 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. В это время самка откладывает яйца, причём часто кладку яиц она приклеивает на конец брюшка самца. После массового роевания по берегам водотока наблюдается скопление большого количества сброшенных крыльев. Роевание нимфомийид происходит в вечерние часы, часто на закате при тихой погоде. Личинки ведут подвижный образ жизни, передвигаясь по камням с помощью ложноножек брюшка. Питаются личинки микроскопическими водорослями, которые соскабливают с поверхности камней. Куколки и взрослые насекомые не питаются [Макаrenchенко, Макаrenchенко, 1983; Макаrenchенко и др., 1989; Saigusa et al., 2009].

До настоящего времени в мировой фауне нимфомийид насчитывалось 7 современных видов,

*Nymphomyia alba* Tokunaga, 1932 (Япония: Хонсю, Хоккайдо, Российский ДВ: о-в Кунашир), *N. levanidovae* Rohdendorf et Kalugina, 1974 (Российский ДВ: Хасанский р-н Приморского кр.), *N. rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (Япония: Хоккайдо, Российский ДВ: Приморье, Южный Сахалин, басс. р. Амур, Верхней Колымы и Чаунской губы), *N. walkeri* (Ide, 1965) (Канада, США), *N. dolichopeza* Courtney, 1994 (США), *N. brundini* (Kevan, 1970) (Индия, Западная Бенгалия), *N. holoptica* Courtney, 1994 (Гонконг) [Родендорф, Калугина, 1974; Макаrenchенко, 2010; Courtney, 1994], а также один ископаемый вид *Nymphomyia succina* Wagner, Hoffeins et Hoffeins из балтийского и биттерфельдского янтаря [Hoffeins, Hoffeins, 1995; Wagner et al., 2000].

Анализ материала, собранного за последние 10 лет на Дальнем Востоке и сопредельной территории, позволил расширить и изменить данные по распространению известных видов, выявить новый для науки вид, а также определить неточности в идентификации некоторых таксонов. Так, считавшийся субэндемиком вид *N. levanidovae*, обитающий только в реках Хасанского р-на Приморского края (Чёрные горы — отроги гор Чанбайшань), был обнаружен на Сихотэ-Алине, где пойман в басс. р. Бикин. Сравнение сахалинского и японского материала по *N. rohdendorfi* совместно с д-ром Т. Сайгусой (Dr. T. Saigusa) показало, что на Южном Сахалине и о-ве Хонсю живёт свой, новый для науки вид, но его имаго самец, куколка и личинка плохо отличаются от *N. rohdendorfi*. Таким образом, достоверным остаётся нахождение *N. rohdendorfi* в басс. Верхней Колымы (типовое местообитание), басс. р. Раздольная (Приморский кр.) и басс. р. Амур — от Комсомольского р-на Хабаровского края до басс. р. Бурея.

Летом 2008 г. в басс. р. Зея был обнаружен новый для науки вид, описание которого будет опубликовано в отдельной статье. Этот вид хорошо отличается по гениталиям самца и самки от *N. rohdendorfi*, но личинки этих видов также плохо различимы.

Таким образом, полученная новая информация вызывает необходимость уточнить определение личинок нимфомийид *N. rohdendorfi* из басс. Верхнего Амура и Чаунской губы, достоверность которого сможет подтвердить лишь нахождение в этих районах взрослых насекомых, а также проведение молекулярно-генетического изучения и сравнения последовательностей гена, кодирующего субъединицу I митохондриальной цитохром с оксидазы (COI), известных видов. Именно одновременное изучение насекомых на морфологическом и молекулярном уровнях позволит безошибочно определять в будущем видовую принадлежность имаго, куколок, личинок и даже яйцекладок. Также, поскольку COI используется в качестве маркерного гена в общебиологической программе Barcoding для создания филогении всего живого от прокариот до человека, то появляется возможность прове-

дения сравнения нимфомийид с другими представителями двукрылых, то есть с любыми видами, у которых изучен этот ген.

К настоящему времени в Международном банке генов GenBank представлены нуклеотидные последовательности только четырёх генов — PGD (фосфоглюконат дегидрогеназы), 28S r RNA (28S рибосомной РНК), CAD (карбонилфосфат синтазы) и TPI (триозофосфат изомеразы) — и только у одного североамериканского вида нимфомийид *Nymphomyia dolichocheza* Courtney [Bertone et al., 2008]. К сожалению, авторы этой работы не исследовали ген COI.

Ниже для нимфомийиды *N. rohdendorfi* по материалам из басс. р. Амур мы приводим переописание имаго самца и самки, которые ранее были описаны только по незрелым особям, извлечённым из экзубиев куколок, а также даём первую информацию о молекулярно-генетическом изучении вида.

## Материалы и методы

Основным материалом как для морфологического, так и молекулярно-генетического исследования *N. rohdendorfi* послужили сборы имаго нимфомийид, сделанные в бассейне р. Амур в пределах Хабаровского края. Подробные данные о материале для морфологического описания приведены ниже, а геномную ДНК выделяли из индивидуальных комаров *N. rohdendorfi*, собранных в массе Н.М. Яворской 3 июня 2011 г. в р. Половинка Хабаровского р-на, Хабаровского кр., фиксированных в 96 % этиловом спирте и хранившихся при  $-20^{\circ}\text{C}$ , с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), по прописи производителя, с некоторыми модификациями. Во-первых, время инкубации образцов в экстрагирующем растворе с протеиназой К было увеличено до двух суток. Это позволило экстрагировать ДНК, не разрушая комаров и сохраняя образцы для морфологического анализа. Во-вторых, из-за малых размеров комаров, для получения оптимальной концентрации геномной ДНК использовали меньший, чем в стандартном протоколе, объём буфера для элюции ДНК (70 мкл).

ПЦР проводили на амплификаторе BIS в объёме 25 мкл. Реакционная смесь содержала 65 мМ Трис-НСl (рН 8,9), 16 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0,05 % твин-20, 1,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , по 0,2 мМ dNTP каждого, 1 мкл ДНК матрицы, по 0,5 мкМ каждого из праймеров, 1 ед. Taq-полимеразы (BIOSAN). Для амплификации ДНК использовали праймеры LCO1490 — 5'-GGTCAACAATCATAAGATATTGG-3' и HCO2198 — 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAA AAATCA-3' [Folmer et al., 1994]. ПЦР проходила в следующих условиях: 5 циклов:  $92^{\circ}\text{C}$  — 30 сек,  $45^{\circ}\text{C}$  — 30 сек,  $72^{\circ}\text{C}$  — 1 мин, затем 35 циклов:  $92^{\circ}\text{C}$  — 30 сек,  $51^{\circ}\text{C}$  — 30 сек,  $72^{\circ}\text{C}$  — 1 мин и один цикл  $72^{\circ}\text{C}$  — 7 мин. Продукты амплификации были очищены с помощью набора для выделе-

ния ДНК из агарозного геля «БиоСилика». Очищенные продукты были секвенированы в обоих направлениях с использованием набора BigDye Terminator и анализатора ABI PRISM 3100. Нуклеотидные последовательности редактировали с помощью программ ChromasLite\_2.0 (Technelysium Pty. Ltd.). Последовательности ДНК были депонированы в базу данных GenBank под номерами JX196859–JX196862.

Выравнивание последовательностей проводили с использованием программы ClustalW2 [Larkin et al., 2007]. Для филогенетического и молекулярно-генетического анализа последовательностей использовали программы из пакета программ MEGA version 5 [Tamura et al., 2011]. Для определения модели, наиболее точно описывающей характер замен нуклеотидов в последовательностях COI *N. rohdendorfi*, использовали тест иерархического правдоподобия, представленный в этом пакете программ. Влияние отбора на полиморфизм нуклеотидных последовательностей определяли с помощью теста нейтральности Таджимы [Tajima, 1989]. Для оценки эволюционной дивергенции последовательностей определяли число замен нуклеотидов на сайт, используя метод Tamura and Nei [1993], учитывающий соотношение транзиций и трансверсий, а также неравновесность содержания G+C пар нуклеотидов.

Genomic DNA was isolated from individual *N. rohdendorfi* adult females fixed with 96 % ethanol and stored at a temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$  using a DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol with the following modifications. First, the sample incubation time in the extraction solution with proteinase K was extended to 2 days, which allowed for DNA extraction without grinding specimens preserving them for morphological analysis. Second, because of a small specimen size, a smaller volume of DNA elution buffer (70  $\mu\text{l}$ ) as compared with the standard protocol was used to obtain an optimal genomic DNA concentration.

PCR was conducted using a BIS amplifier in a volume of 25  $\mu\text{l}$ . The reaction mixture contained 65 mM Tris-HCl (pH 8.9), 16 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.05 % Tween 20, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM of each dNTP, 1  $\mu\text{l}$  of DNA template, 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer, and 1 U of Taq polymerase (BIOSAN). The primers LCO1490 (5'-GGTCAACAATCATAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAA AAATCA-3') [Folmer et al., 1994] were used for amplification. The PCR mode comprised five cycles of  $92^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $45^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min; 35 cycles of  $92^{\circ}\text{C}$  for 30 s,  $51^{\circ}\text{C}$  for 30 s, and  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min; and the final stage at  $72^{\circ}\text{C}$  for 7 min. The amplification products were purified with a BioSilika kit for DNA extraction from agarose gel. The purified products were sequenced in both directions with the help of a BigDye Terminator kit and an ABI PRISM 3100 analyzer. The nucleotide sequences were edited using the ChromasLite\_2.0 (Technelysium Pty Ltd.)

software and deposited with the GenBank database under accession numbers JX196859–JX196862.

The sequences were aligned using the ClustalW2 program [Larkin et al., 2007]; phylogenetic and molecular genetics analyses were performed with the help of the MEGA version 5 [Tamura et al., 2011] software package. The best-fit model of the nucleotide substitution in *N. rohdendorfi* COI sequences was chosen based on the BIC scores (Bayesian Information Criterion). The effect of selection on nucleotide sequence polymorphism was assessed using Tajima's neutrality test [Tajima, 1989]. To estimate the evolutionary divergence of analyzed sequences, the number of nucleotide substitutions per site was determined according to the method of Tamura and Nei [1993], which takes into account the transition-transversion and G+C-content biases.

## Морфологическое и молекулярно-генетическое переописание

### *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979

Рис. 1–9.

*Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979: 1070; Макаrenchенко, Макаrenchенко, 1983: 92; Courtney, 1994: 16; Макаrenchенко, 1996: 23; Макаrenchенко, 1999: 82; Макаrenchенко, 2006: 739.

**Типовой материал.** Голотип: ♂, извлечённый из экзuvia зрелой куколки, Магаданская обл.: Тенькинский р-н, окр. пос. Сибит-Тыэлах, руч. Анюрадот (басс. р. Колыма), 3.VII.1977, Е. Макаrenchенко, С. Кочарина; паратипы: 6 зрелых куколок, 4 шкурки личинок, там же, где голотип, 3.VII.1977, Е. Макаrenchенко, С. Кочарина.

**Новый материал** (подтверждённый идентификацией имаго). Хабаровский кр., басс. р. Амур: 2 зрелых куколки, 1 экзувий куколки, 1 личинка, ключ Фартовый, приток р. Кия (басс. р. Уссури), р-н имени Лазо, окр. пос. Переясловка, 10.VI.1982, Е. и М. Макаrenchенко; ♂♂ и ♀♀ в массе, Хабаровский р-н, р. Половинка, окр. с Новотроицкое, N 48°30.732'; E 134°83.607', 6.VI.2010, 3.VI.2011, 3.VI.2012, Н. Яворская; 10♂♂, 12♀♀, там же, р. Левая (впадает в пр. Амурская), окр. пос. Корсаковка-2, N 48°20.095'; E 134°57.010', 15.VI.2012, Н. Яворская; 1♂, там же, р. Матрёниха, N 48°20.386'; E 134°00.048', 15.VI.2012, Н. Яворская; 1♂, 1♀, Комсомольский р-н, р. Цуркуль, приток р. Силинка, 7.VII.2010, Н. Яворская; 1♂, там же, р. Б. Хурба, 9.VII.2010, Н. Яворская; 1♂, там же, р. Поха, 12.VII.2010, Н. Яворская; 1♂, 1♀ (in copula), 3 личинки, Вяземский р-н, р. Аван, 26.V.2011, С. Сиротский; 4 личинки, 1 куколка, там же, р. Вторая Седьмая, 26.V.2011, С. Сиротский; 2 зрелых куколки, ручей Сатанский (басс. р. Бурей), окр. пос. Чегдомын, Верхнебуреинский р-н, 8.VII.1994, Е. Макаrenchенко. Амурская обл., басс. р. Амур: 1♂, Бурейский р-н, р. Пайканчик, басс. р. Бурей (нижнее течение), N 50°11.518'; E 130°294', 11.VII.2012, В. Тесленко, Т. Тиунова. Приморский кр., басс. р. Раздольная: 2 личинки, р. Малая Каменка, 2.V.1982, Т. Вшивкова; 3 зрелых куколки, 24 личинки, р. Правая Комаровка, Уссурийский заповедник им. В.А. Комарова, 31.V.1984, Т. Вшивкова.

**Описание.** Имаго, ♂ (n=10). Бледно-серый, слабо хитинизированный. Длина тела 2,50–2,72 мм; отношение длины тела к длине крыла 1,22–1,24.

Голова длиной 232–316 мкм, шириной 156–164 мкм, спереди постепенно сужается и заканчивается рострумом, который дистально расширен, его передний край волнистый, при виде сбоку немного загнут вентрально в виде клюва (рис. 1, 3); рострум дорсально с 3–4 парами

щетинок. Сложные глаза на дорсальной стороне головы широко расставленные, расстояние между ними в 3,9–4,1 раза больше ширины конца рострума; на вентральной стороне сложные глаза слиты друг с другом, но по средней линии омматидии не соприкасаются (рис. 2). Антенна 168–196 мкм длины, два базальных членика округлые, длина 1-го членика 36–44 мкм, 2-го — 24–28 мкм; 3-й членик длинный (104–116 мкм), к вершине немного расширяется, с терминальной сенсиллой, состоящей из трёх палочковидных структур, наибольшая из которых длиной 12–14 мкм (рис. 4–5); антенна в 0,80–0,85 раза короче головы. «Нижняя губа» с почти прямым или немного округлым передним краем, её передняя часть покрыта зубовидными шипиками, хорошо различимыми сбоку (рис. 3), латерально с 2–3 парами длинных щетинок, медиально — с 1 парой коротких щетинок.

Грудь длиной 0,64–0,67 мм, несёт пару крыльев, жужжальца и 3 пары ног; крыло длиной 2,12–2,20 мм, наибольшей шириной 0,28–0,32 мм, бумеранговидной формы, с редуцированным жилкованием, по краю с длинными бичевидными щетинками длиной 0,46–0,49 мм; жужжальца длиной 0,14 мм; строение ног и груди такое же, как у детально описанного М. Токунагой вида *N. alba* [Tokunaga, 1935].

Длина брюшка 1,65–1,80 мм. Сегмент VIII с длинными, слабо загнутыми и округлыми на вершине паратергальными придатками длиной 52–72 мкм, без базальных бугров. Последний сегмент брюшка дорсально несёт церки, вентрально — пару гонокситов, гоностилей и эдеагус; церки 60–76 мкм длиной, сужены дистально, пальцевидные; гоноксит длиной 140 мкм, длинный, в 2,9–3,8 раза длиннее гоностилей, дистально к вершине немного расширяется; гоностиль длиной 36–48 мкм, ланцетовидной или округлой формы (в зависимости от положения в препарате), покрыт многочисленными волосовидными щетинками, направленными внутрь; эдеагус длиной 44–60 мкм, шириной — 40 мкм, с округлой вершиной (рис. 6–7).

**Имаго, ♀** (n=10, в том числе 4 экземпляра, из которых была экстрагирована ДНК) в целом сходна с самцом. Длина тела 2,50–2,60 мм. Длина крыла 1,90–1,96 мм; отношение длины тела к длине крыла 1,30–1,33.

Голова длиной 204–228 мкм, шириной 152 мкм. Расстояние между сложными глазами дорсально 3,5–4,0 раза больше ширины конца рострума. Антенна 170–184 мкм длины, длина 1-го членика 32–38 мкм, второго — 24–28 мкм; 3-й членик 110–116 мкм длиной, наибольшая длина апикальной сенсиллы 12–16 мкм; антенна в 0,71–0,74 раза короче головы.

Грудь длиной 0,45–0,48 мм. Длина крыла 1,92–1,96 мм, наибольшая ширина около 0,30 мм.

Сегмент VIII несёт небольшие латеральные выросты длиной 12–16 мкм. Стерниты V–VII простые, без выростов или придатков. Стернит VIII состоит из широкой срединной пластинки, у заднего края с выемкой посредине, над которой находится пара лопастей длиной 48–64 мкм, каждая из них с 2 короткими (около 8 мкм длины) щетинками на вершине. Последний сегмент брюшка несёт церки, сужающиеся апикально к наружному краю и с «пяткой» по внутреннему краю; проксимальнее, по внутреннему краю церки, с длинными и тонкими лопастями, по краю густо опушёнными волосовидными щетинками; субапикально церки с 4 парами длинных щетинок (рис. 8–9).

**Description.** Adult ♂ (n=10). Pale grey, weak chitinized. Total length 2.50–2.72 mm. Total length/wing length 1.22–1.24.

Head length 232–316 µm long and 156–164 µm wide, evenly sinuate anteriorly and apically with rostrum, which is distally expanded, its anterior margin undulating, with a slightly curved ventral side in the beak-shape (Figs 1, 3); rostrum dorsally with 3–4 pairs of setae. Compound eyes widely disposed on the dorsal side of the head, interval

between them 3.9–4.1 times wider than the end of rostrum; eyes conjugate on the ventral side, and separate at the midline of ommatidia (Fig. 2). Antenna 168–196 µm long, with two rounded basal segments, 1<sup>st</sup> segment 36–44 µm long, 2<sup>nd</sup> segment 24–28 µm long, 3<sup>rd</sup> segment long (104–116 µm), slightly extended to the top, with a terminal sensilla of three rod-like structures, most of which are 12–14 microns in length (Figs 4–5); antenna 0.80–0.85 times shorter than the head. Labium with almost straight or slightly round-

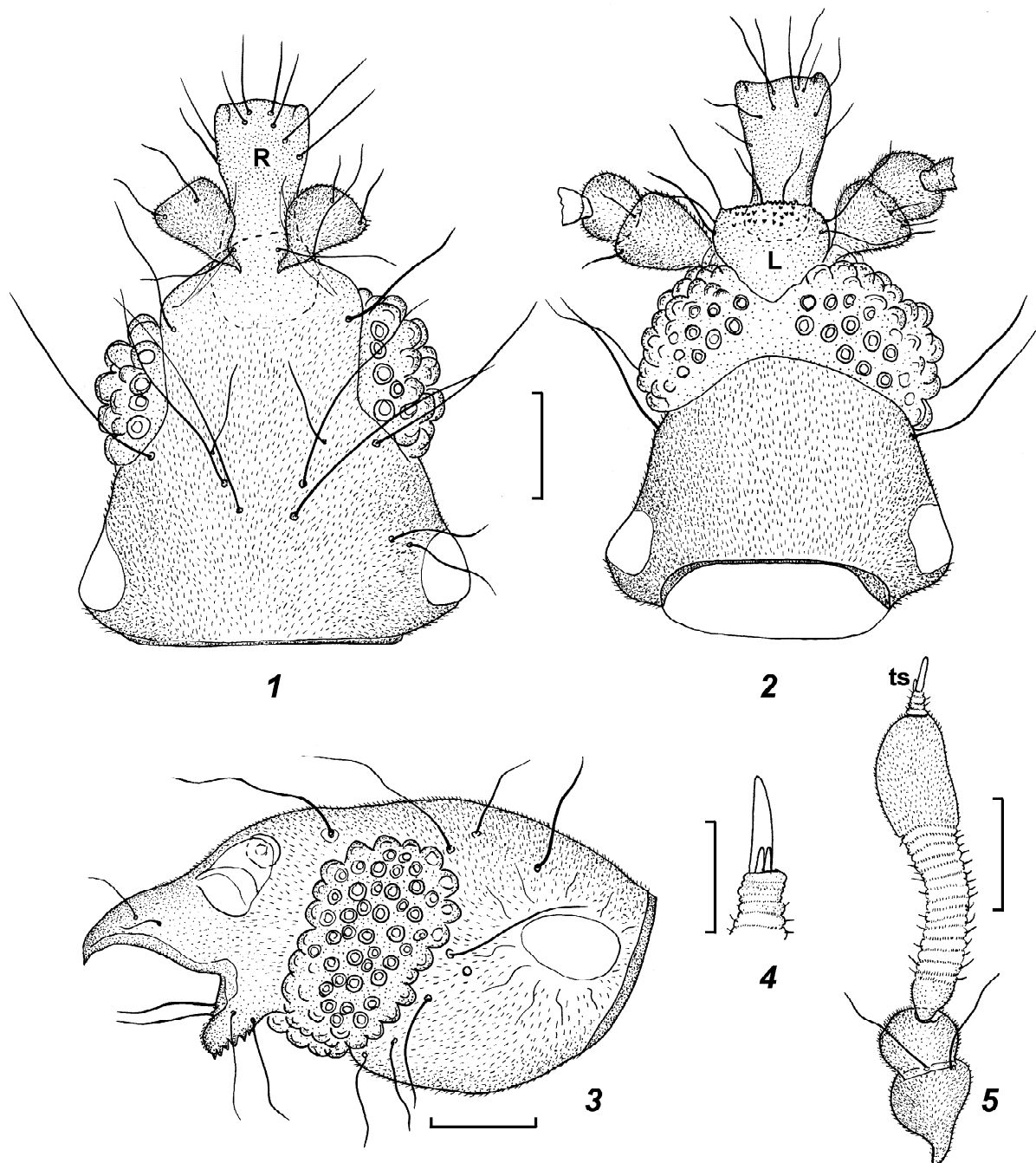


Рис. 1–5. Детали строения имаго самца *Nymphomyia rohdendorfi* Makar. 1–3 — голова, сверху (1); снизу (2) и сбоку (3); 4 — сенсилла терминального членика антенны; 5 — антенна. R — рострум, L — «нижняя губа», ts — сенсилла терминального членика антенны. Масштабные линейки для рис 1–3, 5 — 50 мкм; рис. 4 — 20 мкм.

Figs 1–5. Male imagines of *Nymphomyia rohdendorfi* Makar. 1 — head, dorsal view; 2 — the same, ventral view; 3 — the same, lateral view; 4 — terminal antennal sensilla; 5 — antenna. R — rostrum, L — labium, ts — terminal antennal sensilla. Scale bars are as follows: Figs 1–3, 5 — 50 µm; Fig. 4 — 20 µm.

ed front edge and with tooth-covered spines, distinct on side (Fig. 3), laterally with 2–3 pairs of long setae, medially with a pair of short setae.

Thorax length 0.64–0.67 mm; bears a pair of boomerang-shape wings, halteres and 3 pairs of legs; wing length 2.12–2.20 mm, maximum width 0.28–0.32 mm, venation reduced, on the edge with whip-shape setae 0.46–0.49 mm long; halteres 0.14 mm long. Structure of the legs and thorax are the same as described in detail by M. Tokunaga [1935] for *N. alba*.

Terminalia (Figs 6–7). Abdomen 1.65–1.80 mm long. Sternites V and VI simple. Segment VIII with a pair of large, slightly elongate, rounded posteriorly lateral processes (paratergal projections) 52–72  $\mu$ m long; dorsal paratergal projection absent. Last abdominal segment dorsally with cerci, in ventral side with gonocoxites, gonostylus and aedeagus; cerci 60–76  $\mu$ m long, distally narrowed, digitiform; gonocoxite 140  $\mu$ m in length, 2.9–3.8 times longer than gonostylus, slightly expanded posteriorly; gonostylus 36–48  $\mu$ m in length, lanceolate or rounded (depending on the position in preparation), covered with numerous hair-like setae directed inward; aedeagus with rounded apex, 44–60  $\mu$ m in length, and 40  $\mu$ m in width.

Adult ♀ (n = 10, including 4 specimens of which had been extracted DNA) in general similar to male. Total length 2.50–2.60 mm. Wing length 1.90–1.96 mm. Total length/wing length 1.30–1.33.

Head length 204–228  $\mu$ m, width — 152  $\mu$ m. The distance between the compound eyes dorsally 3.5–4.0 times the width of the end of the rostrum. Antenna 170–184  $\mu$ m long; length of 1<sup>st</sup> segment 32–38  $\mu$ m, length of 2<sup>nd</sup> segment 24–28  $\mu$ m; 3<sup>rd</sup> segment 110–116  $\mu$ m long; terminal sensilla maximum length 12–16  $\mu$ m; antenna 0.71–0.74 times shorter than the head.

Thorax length 0.45–0.48 mm. Wing length 1.92–1.96 mm, maximum width about 0.30 mm.

Terminalia (Figs 8–9). Segment VIII with small lateral paratergal projection 12–16  $\mu$ m long. Sternites V–VII simple, without appendages. Sternite VIII consists of a broad middle plate; posterior edge with hollow in the middle, above which is a pair of lobes 48–64  $\mu$ m long, each with 2 short (about 8  $\mu$ m long) setae at the apex. The last abdominal segment with cerci, tapering apically to the outer edge and the «heel» at the inner edge, subapical with 4 pairs of long setae.

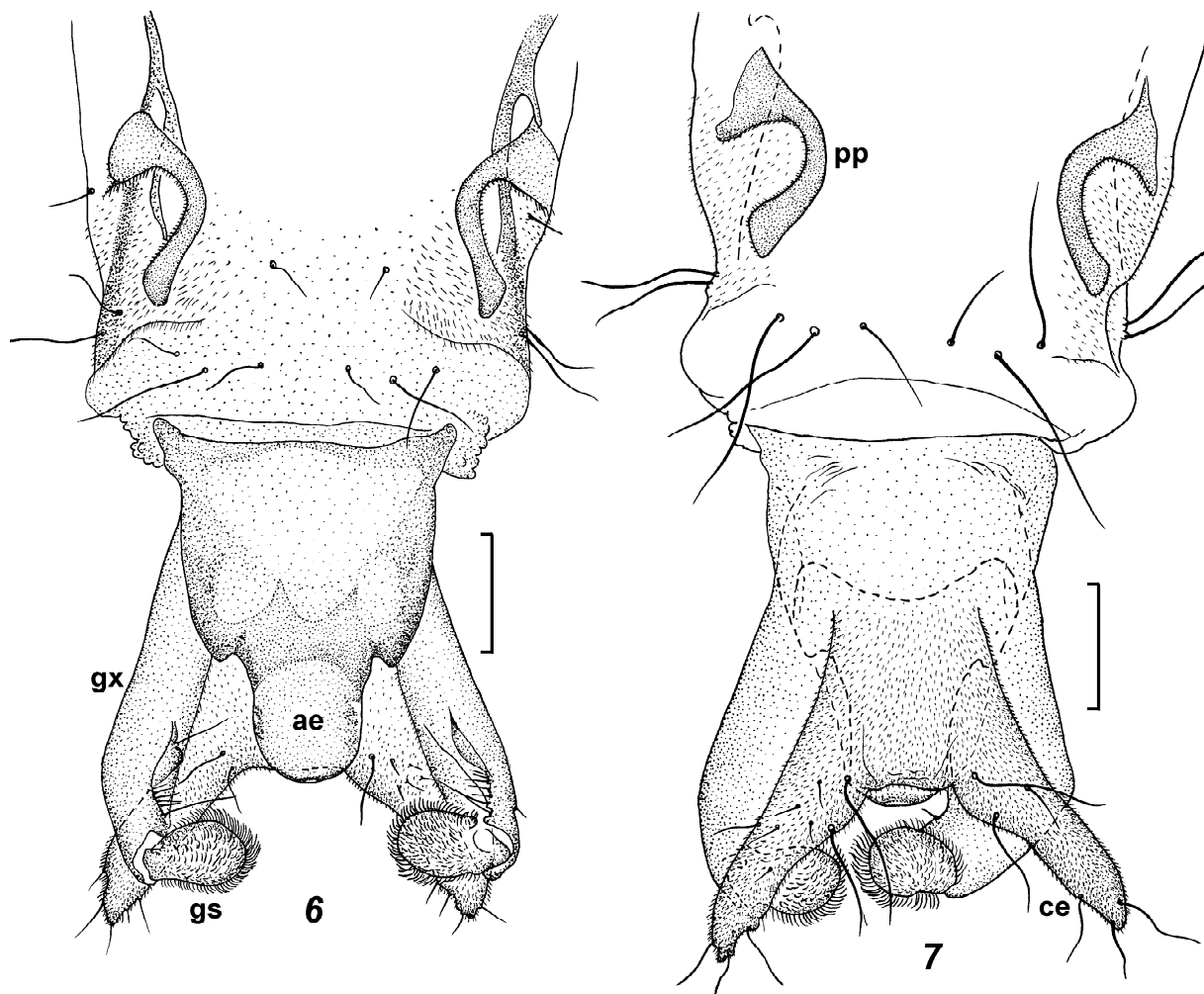


Рис. 6–7. Сегмент VIII и гениталии самца *Nymphomyia rohdendorfi* Мака. снизу (6) и сверху (7). ae — эдеагус; ce — серки; gs — гоностиль; gx — гонококсит; pp — паратергальный отросток. Масштабная линейка — 50 мкм.

Figs 6–7. Male terminalia of *Nymphomyia rohdendorfi* Makar. 6 — ventral view; 7 — dorsal view. ae — aedeagus; ce — cerci; gs — gonostylus; gx — gonocoxite; pp — paratergal projection. Scale bars are 50  $\mu$ m.

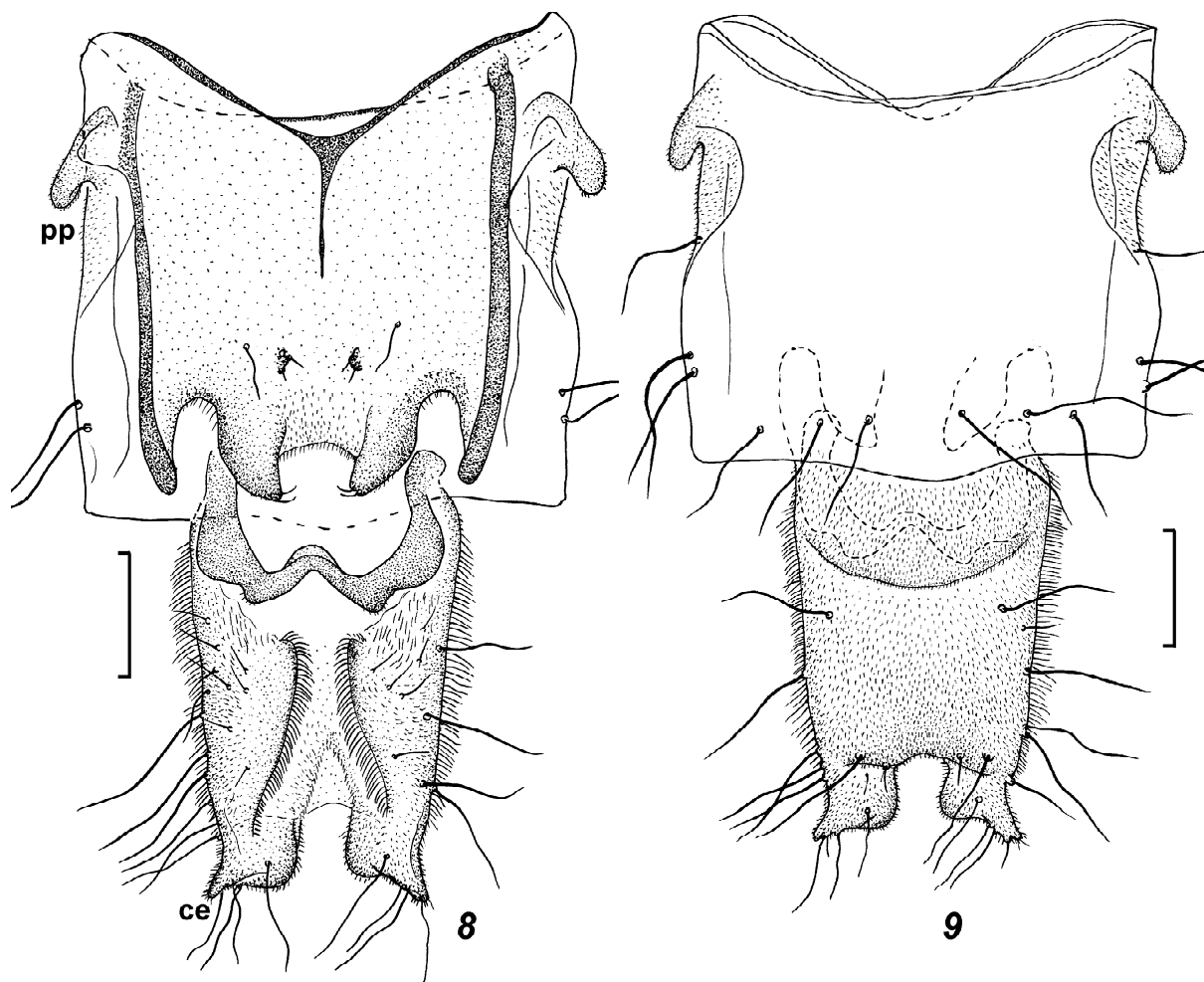


Рис. 8–9. Сегмент VIII и гениталии самки *Nymphomyia rohdendorfi* Makar. снизу (8) и сверху (9). Обозначения те же, что на рис. 6–7. Масштабная линейка — 50 мкм.

Figs 8–9. Female terminalia of *Nymphomyia rohdendorfi* Makar. 8 — ventral view; 9 — dorsal view. Abbreviations are the same as in Figs 6–7. Scale bars are 50  $\mu$ m.

## Результаты молекулярно-генетического анализа

Нуклеотидный состав последовательностей фрагмента гена COI *N. rohdendorfi* отклонялся от равновесного: А (27,7 %), Т (41,7 %), С (14,4 %), G (16,2 %). В последовательностях преобладали А+Т пары нуклеотидов (69,4 %). Замены нуклеотидов наблюдались только в третьей позиции кодонов. Все замены были синонимичными и не приводили к изменениям аминокислотных последовательностей. Большинство замен нуклеотидов — транзиции. Отношение транзиций к трансверсиям ( $R = 3,17$ ), а также тест Таджимы (Tajima's D) показали, что внутривидовой полиморфизм нуклеотидных последовательностей COI является нейтральным. Характер нуклеотидной изменчивости в последовательностях COI *N. rohdendorfi* наиболее точно описывала модель НКУ (Hasegawa-Kishino-Yano) [1985]. Дивергенция  $d$  между индивидуальными последовательностями COI *N. rohdendorfi* варь-

ровала от 0,003 до 0,009 замен нуклеотидов на сайт, составляя в среднем 0,007, что соответствует дивергенции нуклеотидных последовательностей как этого, так и других генов внутри вида [Gunderina, Katokhin, 2011]. Отсутствие аналогичных данных для других видов нимфомийид не позволяет определить величину дивергенции последовательностей COI между разными видами этого семейства. Однако можно оценить степень дивергенции последовательностей COI нимфомийид и видов из других семейств насекомых. Между последовательностями COI *N. rohdendorfi* и видов рода *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) она составила 0,233 замен нуклеотидов на сайт, тогда как межвидовые различия этих последовательностей в роде *Chironomus* почти в два раза меньше — 0,138 замен нуклеотидов на сайт. Эти значения существенно больше тех, которые установлены в настоящей работе для последовательностей COI *N. rohdendorfi* (0,007). Учитывая эти данные, а также результаты изучения морфологии имаго, можно заключить, что после-

довательности COI, полученные в настоящей работе, являются видоспецифическими для *N. rohdendorfi*, и могут рассматриваться как дополнительные диагностические признаки при идентификации этого вида.

## Results of DNA barcoding

The nucleotide composition of the studied sequences of *N. rohdendorfi* COI gene fragments deviated from an equilibrium one, comprising 27.7 % of A, 41.7 % of T, 14.4 % of C, and 16.2 % of G. The A + T nucleotide pairs were predominant (69.4 %) in the sequences. Nucleotide substitutions were observed only in the third codon positions. All the substitutions were synonymous and did not lead to any changes in amino acid sequences. Transitions were the most abundant type of nucleotide substitutions. The transition-to-transversion ratio as well as Tajima's test (*D*) suggests that the intraspecific polymorphism of COI nucleotide sequences is neutral. The HKY (Hasegawa–Kishino–Yano) [1985] model was the best-fit in describing the pattern of nucleotide variation in the *N. rohdendorfi* COI sequences. The divergence *d* between individual *N. rohdendorfi* COI sequences varied from 0.003 to 0.009 nucleotide substitutions per site, amounting on the average to 0.007, which matches the level of an intraspecific nucleotide sequence divergence of this and other genes [Gunderina, Katokhin, 2011]. The lack of similar data for another Nymphomyiidae species does not permit us to evaluate the divergence of the COI sequences between different species of this family. However we can estimate the divergence of COI sequences between *N. rohdendorfi* and species of different insect families. The divergence between COI sequences of *N. rohdendorfi* and species of the genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) is 0.233 substitutions per site. This value is larger than the divergence of COI sequences between different species of the genus *Chironomus* (0.138) and between different individuals of *N. rohdendorfi* (0.007). The difference in the level of interspecific and intraspecific divergence of COI sequences along with the analysis of the morphology of *N. rohdendorfi* adults allows us to conclude that the COI sequences obtained in this work are species specific to *N. rohdendorfi* and could be considered as species specific diagnostic characters of this species.

## Благодарности

Авторы глубоко благодарны научному сотруднику ХФТИНРО-центра (г. Хабаровск), к.б.н. Н.М. Яворской за собранный в массе имагинальный материал из басс. р. Амур, который лёг в основу переописания самца и самки, а также ДНК-анализа. Также, мы признательны Т.С. Вшивковой и С.Е. Сиротскому за возможность использовать в работе предоставленный ими материал по нимфомийидам и Г.Б. Чириковой за перевод «молекулярной» части статьи с русского на английский язык.

Работа поддержана грантом РФФИ 10-04-00899, программой Президиума РАН «Биологическое разнообразие» а также частично поддержана грантами Президиума Дальневосточного отделения РАН № 12-III-Д-06-005 и № 12-I-П30-01.

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

## Литература

- Макаrenchенко Е.А. 1979. *Nymphomyia rohdendorfi* sp.n. — новый представитель архаичных двукрылых (Diptera, Nymphomyiidae) из верховьев Колымы // Зоологический журнал. Вып. 58. No. 7. С. 1070–1073.
- Макаrenchенко Е.А. 1999. Nymphomyiidae — Нимфомийиды // Определитель пресноводных беспозвоночных России и сопредельных территорий. Под ред. С.Я. Цалолыхина. Т. 4. Высшие насекомые. Двукрылые. Санкт-Петербург: Зоологический институт РАН. С. 81–83, 458–463.
- Макаrenchенко Е.А. 2006. 8. Сем. Nymphomyiidae — Нимфомийиды // Определитель насекомых Дальнего Востока России. Т. 6. Ч. 4. Владивосток: Дальнаука. С. 734–739.
- Макаrenchенко Е.А. 2010. Архаичные двукрылые нимфомийиды (Diptera, Nymphomyiidae) Дальнего Востока России и сопредельной территории // Энтомологические исследования в Северной Азии. Материалы VIII Межрегионального совещания энтомологов Сибири и Дальнего Востока с участием зарубежных учёных. 4–7 октября 2010 г. Новосибирск: КМК. С. 132–133.
- Макаrenchенко Е.А., Макаrenchенко М.А. 1983. Архаичные двукрылые нимфомийиды (Diptera, Nymphomyiidae) Дальнего Востока СССР // Двукрылые (Insecta, Diptera). Их систематика, географическое распространение и экология. Л.: ЗИН АН СССР. С. 92–95.
- Макаrenchенко Е.А., Чубарева Л.А., Макаrenchенко М.А. 1989. 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. С. 15–19.
- Родендорф Б.Б. 1977. Система и филогенез двукрылых // Систематика и эволюция двукрылых насекомых. Л.: ЗИН АН СССР. С. 81–88.
- Родендорф Б.Б. 1980. Отряд Muscida. Двукрылые // Историческое развитие класса насекомых. Труды Палеонтологического института АН СССР. Т. 178. С. 112–122.
- Родендорф Б.Б., Калугина Н.С. 1974. Находка своеобразных двукрылых нимфомийид (Diptera, Nymphomyiidae) в Приморье // Энтомологическое обозрение. Т. 53. No. 3. С. 686–694.
- Bertone M.A., Courtney G.W., Wiegmann B.M. 2008. Phylogenetics and temporal diversification of the earliest true flies (Insecta, Diptera) based on multiple nuclear genes // Systematic Entomology. Vol. 33. P. 668–687.
- Courtney G.W. 1994. Biosystematics of the Nymphomyiidae (Insecta, Diptera): life history, morphology, and phylogenetic relationships // Smithsonian contributions to zoology. No. 550. P. 1–39.
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates // Molecular Marine Biology and Biotechnology. Vol. 3. P. 294–299.
- Gunderina L.I., Katokhin A.V. 2011. Variation and divergence of rDNA ITS-1 region in species of genus *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) // Wang X., Liu W. (Eds): Contemporary chironomid studies – Proceedings of the 17<sup>th</sup> International Symposium on Chironomidae (July 6–9, 2009 Nankai University, China). Nankai University Press. P. 22–35.
- Hasegawa M., Kishino H., Yano T. 1985. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA // Journal of Molecular Evolution. Vol. 22. P. 160–174.
- Hoffeins C., Hoffeins H.W. 1995. Erstfund von Nymphomyiidae im Baltischen Bernstein // Fossilien. Vol. 4. No. 95. P. 207–210.



- Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. 2007. ClustalW and ClustalX version 2 (2007) // Bioinformatics. Vol.23. P.2947–2948.
- Makarchenko E.A. 1996. Some remarks on distribution of the Far Eastern Nymphomyiidae (Diptera) // Makunagi. Acta Dipterologica. Vol.19. P.22–25.
- Saigusa T., Nakamura T., Sato S. 2009. Insect mist-swarming of *Nymphomyia* species in Japan // Fly Times. Issue 43. P.2–8.
- Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism // Genetics. Vol.123. P.585–595.
- Tamura K., Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees // Molecular Biology and Evolution. Vol.10. P.512–526.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011 MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution (submitted).
- Tokunaga M. 1932. A remarkable Dipterous insect from Japan, *Nymphomyia alba*, gen. et sp. nov. // Annotationes zoologicae Japonenses. Vol.13. P.559–569.
- Tokunaga M. 1935. A morphological study of nymphomyiid fly // Philippine Journal of Science. Vol.56. P.127–214.
- Wagner R., Hoffeins C., Hoffeins H.W. 2000. A fossil nymphomyiid (Diptera) from the Baltic and Bitterfeld amber // Systematic Entomology. Vol.25. P.115–120.

Поступила в редакцию 5.07.2012