

**Морфологическое и молекулярно-генетическое описание
Nymphomyia kannasatoi sp.n. (Diptera, Nymphomyiidae)
из Японии и Южного Сахалина, с данными по биологии вида**

Morphological description and DNA barcoding of *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. (Diptera, Nymphomyiidae) from Japan and South of Sakhalin Island, with data on biology of species

Е.А. Макарченко*, Л.И. Гундерина, С. Сато*****

E.A. Makarchenko*, L.I. Gunderina, S. Sato*****

* Биологический институт ДВО РАН, пр. 100-летия Владивостока 159, Владивосток 690022 Россия. E-mail: makarchenko@biosoil.ru.

* Institute of Biology and Soil Science, Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences, Prosp. 100-letiya Vladivostoka 159, Vladivostok 690022 Russia.

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

** Institute of Cytology & Genetics SB RAS, Acad. Lavrentyev Ave. 10, Novosibirsk, 630090, Russia.

*** Провинция Гумма, Маебashi, Япония.

*** Sinmaebashi-cho 1-17-705, Gunma Prefecture, Maebashi 371-0843 Japan.

Ключевые слова: Diptera, Nymphomyiidae, *Nymphomyia kannasatoi* sp.n., описание, ДНК-анализ, биология, Япония, Южный Сахалин.

Key words: Diptera, Nymphomyiidae, *Nymphomyia kannasatoi* sp.n., description, DNA barcoding, Japan, South Sakhalin.

Резюме. По материалу из Японии и Южного Сахалина приведено иллюстрированное описание самца и самки нового вида нимфомийид *Nymphomyia kannasatoi* sp.n., параллельно с анализом морфологических признаков имаго проведено секвенирование ДНК фрагмента митохондриального гена COI и показана видоспецифичность его нуклеотидных последовательностей. Это позволяет использовать нуклеотидные последовательности гена COI в качестве видоспецифического признака — молекулярного маркёра при идентификации *N. kannasatoi* sp.n. и дифференциации его от близкородственного вида *N. rohdendorfi* Makarchenko. Приведены данные по биологии нового вида.

Abstract. For the family Nymphomyiidae (Diptera) adults of male and female of *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. are described and illustrated by materials from Japan and South Sakhalin. The morphological analysis and the partial COI gene sequencing of *N. kannasatoi* sp.n. adults were carried out simultaneously. The species-specificity of *N. kannasatoi* sp.n. COI sequences was shown. These sequences could be used as diagnostic characters — molecular markers of *N. kannasatoi* sp.n., namely for separating from close related species *N. rohdendorfi* Makarchenko. Data on biology of a new species are given.

Введение

К настоящему времени в мировой фауне нимфомийид насчитывается 7 современных видов: *Nymphomyia alba* Tokunaga, 1932 (Япония: Хонсю, Хоккайдо, Российский ДВ: о-в Кунашир),

N. levanidovae Rohdendorf et Kalugina, 1974 (Российский ДВ: отроги хребта Чанбайшань, Центральный Сихотэ-Алинь), *N. rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (российский ДВ: басс. Верхней Колымы, басс. Нижнего и Среднего Амура до р. Бурея включительно), *N. walkeri* (Ide, 1965) (Канада, США), *N. dolichopeza* Courtney, 1994 (США), *N. brundini* (Kevan, 1970) (Индия, Западная Бенгалия), *N. holoptica* Courtney, 1994 (Гонконг), *N. kaluginae* Makarchenko, 2013 (российский ДВ: Амурская обл., басс. р. Зея) [Родендорф, Калугина, 1974; Courtney, 1994; Макарченко, 2013], а также один ископаемый вид *Nymphomyia succina* Wagner, Hoffeins et Hoffeins, 2000 из балтийского и биттерфельдского янтаря [Wagner et al., 2000]. Кроме этого, неидентифицированные куколки *Nymphomyia* sp. обнаружены на Северном Алтае в Монголии [Hayford, Bouchard, 2012].

В результате ревизии материала по нимфомийидам, хранящегося в коллекции Лаборатории пресноводной гидробиологии БПИ ДВО РАН, было установлено, что на Южном Сахалине обитает свой, новый для науки вид *N. kannasatoi* sp.n., который ранее ошибочно определялся как *N. rohdendorfi* [Макарченко и др., 1989]. Этот же вид под названием *Nymphomyia* sp. near *N. rohdendorfi* также указывался японскими коллегами из р. Канна на о-ве Хонсю (префектура Гумма) [Saigusa et al, 2009] и возможно по личинке как *N. rohdendorfi* — с о-ва Хоккайдо [Makarchenko, 1996].

Ниже по материалам с островов Хонсю и Сахалин приводится морфологическое и молекулярно-генетическое описание имаго самца и самки *N. kannasatoi* sp.n., сравнение их с соответствующими признаками *N. rohdendorfi*, а также представлены данные по биологии нового вида.

Материалы и методы

Основным материалом для морфологического и молекулярно-генетического исследования *N. kannasatoi* sp.n. послужили сборы имаго нимфомийид, сделанные С. Сато в Японии на р. Канна (о-в Хонсю, префектура Гунма). Материал, полученный Е.А. Макарченко и М.А. Макарченко на Южном Сахалине, частично использован при морфологическом описании, а также изучении жизненного цикла нового вида, для чего были обработаны качественные и количественные пробы зообентоса, взятые на р. Белая (окр. пос. Сокол Долинского р-на) с мая по октябрь 1986 г., а также в марте–апреле 1987 г. бентометром конструкции В.Я. Леванидова [1976]. Отбор проб производился на 7 станциях, расположенных в верхнем, среднем и нижнем течении реки, в апреле–августе через каждые 10 суток, в сентябре, октябре и марте — 1 раз в месяц.

Подробные данные о материале для морфологического описания приведены ниже, а геномную ДНК выделяли из индивидуальных самцов и самок имаго *N. kannasatoi* sp.n., собранных С. Сато в массе 29 марта и 9 апреля 2014 г. в р. Канна и фиксированных в 96 % этиловом спирте и хранившихся при -20°C , с использованием набора DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN), по прописи производителя, с модификациями, описанными ранее [Макарченко, Гундерина, 2012]. Для амплификации последовательностей митохондриального гена COI (цитохромоксидазы I) использовали праймеры LCO1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAGATATTGG-3') и HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') [Folmer et al., 1994]. Продукты амплификации были очищены с помощью набора для выделения ДНК из агарозного геля MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN). Очищенные продукты были секвенированы в обоих направлениях на приборе ABI PRISM 3100 analyzer с помощью набора BigDye Terminator kit. Секвенирование ДНК проведено с использованием ресурсов ЦКП «Геномика» СО РАН, г. Новосибирск (<http://sequest.niboch.nsc.ru>). Последовательности ДНК были депонированы в базу данных GenBank под номерами KP208867–KP208874.

Для проверки видоспецифичности нуклеотидных последовательностей использовалась программа BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Выравнивание последовательностей проводилось с использованием программы MUSCLE [Edgar, 2004]. Для филогenetического и молекулярно-генетического анализа последовательностей использовались программы из пакета программ MEGA version 6 [Tamura et al., 2013]. Для определения модели, наиболее точно описывающей характер замен нуклеотидов в последователь-

ностях COI *N. kannasatoi*, использовался критерий максимального правдоподобия, представленный в этом пакете программ. Для оценки эволюционной дивергенции (дистанции d_K2P) последовательностей определялось число замен нуклеотидов на сайт, с использованием двухпараметрического метода Кимуры [Kimura, 1980]. Величина межвидовой дивергенции (d_K2P) определялась путём сравнения последовательностей COI *N. kannasatoi* sp.n. и *N. rohdendorfi* (GenBank — KP208867–KP208875 и JX196859–JX196862).

Голотип и паратипы нового вида хранятся в коллекции Лаборатории пресноводной гидробиологии Биологического почвенного института ДВО РАН, г. Владивосток.

Genomic DNA was isolated from individual *N. kannasatoi* adults, males and females, fixed with 96% ethanol and stored at -20°C using a DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol with some earlier described modifications [Makarchenko, Gunderina, 2012]. The mitochondrial COI (cytochrome c oxidase subunit I) gene sequences were amplified with the primers LCO1490 (5'-GGTCAA-CAAATCATAAGATATTGG-3') and HCO2198 (5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3') [Folmer et al., 1994]. The amplification products were purified using a MinElute Gel Extraction Kit (QIAGEN) to sequence the obtained products in both directions in an ABI PRISM 3100 analyzer with the help of a BigDye Terminator kit using the equipment of the SB RAS Genomics Core Facility (<http://sequest.niboch.nsc.ru>). The DNA sequences were deposited with GenBank under accession nos. KP208867–KP208874.

Species specificity of the nucleotide sequences were verified with BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). The sequences were aligned using the MUSCLE program [Edgar, 2004]. The MEGA v. 6 software package [Tamura et al., 2013] was used for phylogenetic and molecular biological analyses. Maximum likelihood criterion from this package was used for selecting the best model describing the nucleotide substitutions in *N. kannasatoi* sp.n. COI. Evolutionary divergence (d_K2P distance) of sequences was assessed by determining the number of nucleotide substitutions per site using the Kimura two-parameter method [Kimura, 1980]; interspecific divergence (d_K2P) was determined by comparing the *N. kannasatoi* sp.n. and *N. rohdendorfi* COI sequences (GenBank acc. nos. KP208867–KP208875 and JX196859–JX196862).

Морфологическое описание

Nymphomyia kannasatoi
Makarchenko et Gunderina, sp.n.

Рис. 1–21.

Nymphomyia rohdendorfi Makarchenko, 1979; Макарченко и др., 1989: 17 (misidentification); *Nymphomyia* sp. near *N. rohdendorfi* Saigusa et al., 2009: 6.

Материал. Япония, о-в Хонсю: голотип, ♂, префектура Гунма, Катсусайма, район Кавава, окр. города Уено, верхнее течение р. Канна, около 511 м н.у.м., 29.III.2014, С. Сато («Japan, Honshu Island, Gunma Prefecture, Katsuyama,

Kawawa area, Ueno Village, upper part of Kanna River, altitude ca 511 m a.s.l., 29.III.2014, leg. S. Sato); паратипы 12♂♂, 14♀♀ — там же, где голотип, 29.III.2014, С. Сато; ♂♂ и ♀♀ в массе, там же, где голотип, 9.IV.2014, С. Сато; **Российский Дальний Восток, о-в Сахалин: 40°0' с.ш., 29°0' в.д.** — Долинский р-н, окр. пос. Сокол, р. Белая, 10.VII.1986, Е. Макарченко, М. Макарченко («Russian Far East, Sakhalin Island, Dolinsk Region, Sokol Village, Belaya River, leg. E. Makarchenko and M. Makarchenko»); там же: 1♂, 1♀ — 12.VII.1986; 1♂, 1♀ — 20.VII.1986; куколки и личинки в массе, 1986—1987, Е. Макарченко, М. Макарченко (см. подробнее ниже в разделе о биологии).

Описание. Имаго самец (n = 8). Бледно-серый, слабо хитинизированный. Длина тела 2,0—2,5 мм; отношение длины тела к длине крыла 1,10—1,15.

Голова длиной 216—248 мкм, шириной 136—160 мкм, спереди постепенно сужается и заканчивается ростратором, длина которого 52—64 мкм, ширина — 40—44 мкм; он дистально немного расширен, его передний край волнистый, при виде сбоку немного загнут вентрально в виде клюва (рис. 1—2); рострум спереди с 3 парами щетинок и 2 парами щетинок с боков. Сложные глаза на дорсальной стороне головы широко расположенные, расстояние между ними в 1,3—1,8 раза больше ширины конца рострума; на вентральной стороне сложные глаза слиты друг с другом, по средней линии омматидии почти соприкасаются (рис. 1). Антenna 186—190 мкм длины, два базальных членника округлые, длина 1-го членника 36—38 мкм, 2-го — 22—24 мкм; 3-й членник длинный (108—112 мкм), к вершине немного расширяется, с терминальной сенсилией состоящей из трёх палочковидных структур, наибольшая из которых длиной 12—16 мкм (рис. 3); антenna в 1,16—1,31 раза короче головы. «Нижняя губа» с почти прямым или немного округлым передним краем, её передняя часть покрыта зубовидными шипиками, хорошо различимыми при виде сбоку (рис. 2), латерально с 2—3 парами длинных щетинок, медиально — с 1 парой коротких щетинок.

Грудь длиной 0,58—0,66 мм, несёт пару крыльев, жужжалца и 3 пары ног; крыло длиной 1,92—2,28 мм, бumerанговидной формы, с редуцированным жилкованием, по краю с длинными бичевидными щетинками длиной 0,34—0,46 мм; жужжалца длиной 0,24 мм; строение ног и груди такое же, как у детально описанного М. Токунагой вида *N. alba* [Tokunaga, 1935].

Длина брюшка 1,66—1,70 мм. Сегмент VIII с длинными, слабо загнутыми и округлыми на вершине паратергальными выростами длиной 70—72 мкм, которые базально с выпуклостью («бугром») (рис. 4—7). Последний сегмент брюшка дорсально несёт церки, вентрально — пару гонококситов, гоностилей и эдеагус (рис. 6—7); церки 52—68 мкм длиной дистально сужаются, пальцевидные; гоностиль длиной 48—56 мкм, покрыт многочисленными короткими волосовидными щетинками, направленными внутрь, часто в субапикальной части с 1—2 более длинными щетинками форма гоностиля варьирует от бобовидной до почти ланцетовидной (рис. 6—12, 14—16), что зависит от положения гениталий в препарате; эдеагус длиной 20—44 мкм, шириной — 40—48 мкм, с почти прямой вершиной (рис. 6, 11—13, 16).

Имаго самка (n = 10) в целом сходна с самцом. Длина тела 1,6—2,3 мм. Отношение длины тела к длине крыла 0,89—1,0.

Голова длиной 208—228 мкм, шириной 148 мкм. Длина рострума 48—52 мкм, ширина — 40 мкм; расстояние между сложными глазами дорсально 1,9—2,0 раза больше ширины конца рострума. Антenna 174—192 мкм длины, длина 1-го членника 36—40 мкм, второго — 22—24 мкм; 3-й

членник 92—104 мкм длиной, наибольшая длина апикальной сенсилии 14—16 мкм; антenna в 0,81—0,84 раза короче головы.

Грудь длиной 0,48—0,54 мм. Длина крыла 2,1—2,3 мм; наибольшая длина щетинок опахала 0,46—0,54 мм. Длина жужжалца 0,27 мм.

Длина брюшка 1,5—1,6 мм. Сегмент VIII несёт 2 пары латеральных паратергальных выростов, из которых проксимальная пара носовидной формы, длиной около 12 мкм, дистальная — округлая, 28 мкм длиной. Антеромедиально от нижнего паратергального выроста на вентральной стороне имеется также пара округлых выростов длиной 12—16 мкм (рис. 17). Стернит VIII в дистальной половине с парой пальцевидных выростов, каждый из которых с 2—3 короткими щетинками на вершине. Последний сегмент брюшка несёт церки длиной 48—64 мкм, субапикально с 2—4 парами длинных щетинок. Вентрально в проксимальной части расположена поперечная пластинка, по краю опущенная короткими волосовидными щетинками; форма этой пластинки варьирует и иногда она разделена на 2 доли (рис. 17, 19—21). Также, на вентральной стороне латерально с каждой стороны находится слабо выраженная округло-треугольная лопасть, покрытая короткими щетинками (рис. 17, 19—20).

Description. Adult male (n = 8). Pale grey, weak chitinized. Total length 2.0—2.5 mm. Total length/wing length 1.0—1.15.

Head length 216—248 μm long and $\sim 164 \mu\text{m}$ wide, gradually narrowed anteriorly and ends rostrum, 52—64 μm long and 40—44 μm wide and which is distally expanded, its anterior margin undulating, with a slightly curved ventral side in the beak-shape (Figs 1—2); rostrum anteriorly with 3 pairs of setae and with 2 pairs of lateral setae. Compound eyes on the dorsal side of the head are wide apart, the distance between them in 1.3—1.8 times the width of the end of rostrum; on the ventral side of the compound eyes are fused with each other, but at the midline of ommatidia do not touch (Fig. 1). Antenna 186—190 μm long, 1st segment 36—38 μm long, 2nd segment 22—24 μm long, 3rd segment long (108—112 μm), slightly extended to the top, with a terminal sensilla of three rod-like structures, most of which are 12—16 μm in length (Fig. 3); antenna 1.16—1.31 times shorter than the head. Labium with almost straight or slightly rounded front edge and with tooth-covered spines, very apparent when viewed from the side (Fig. 2), laterally with 2—3 pairs of long setae, medially with a pair of short setae.

Thorax length 0.58—0.66 mm; carries a pair of boomerang-shape wings, halters and 3 pairs of legs; wing length 1.92—2.28 mm, with reduced venation, on the edge with whip-shape setae 0.34—0.46 mm long; halters 0.24 mm long. Structure of the legs and thorax are the same as described in detail by M. Tokunaga [1935] for *N. alba*.

Terminalia (Figs 4—16). Abdomen 1.66—1.70 mm long. Segment VIII with one pair of large, elongate, posteriorly directed, lateral paratergal projections 70—72 μm long, that basally with bump (Figs 4—7). Last abdominal segment dorsally with cerci, in ventral side with of gonocoxites, gonostylus and aedeagus (Figs 6—7); cerci 60—76 μm long, distally narrowed, digitiform; gonocoxite length 140 μm , in 2.9—3.8 times as long as gonostylus, distally to the top with a little strength; gonostylus length 36—48 μm , shape varies from bean to lanceolate or rounded (depending on the position in preparation), covered with numerous hair-like setae directed inward, sometimes with 1—2 more long setae in apex (Figs 6—12, 14—16); aedeagus length of 44—60 μm , width — 40 μm , with straight apex (Figs 6, 11—13, 16).

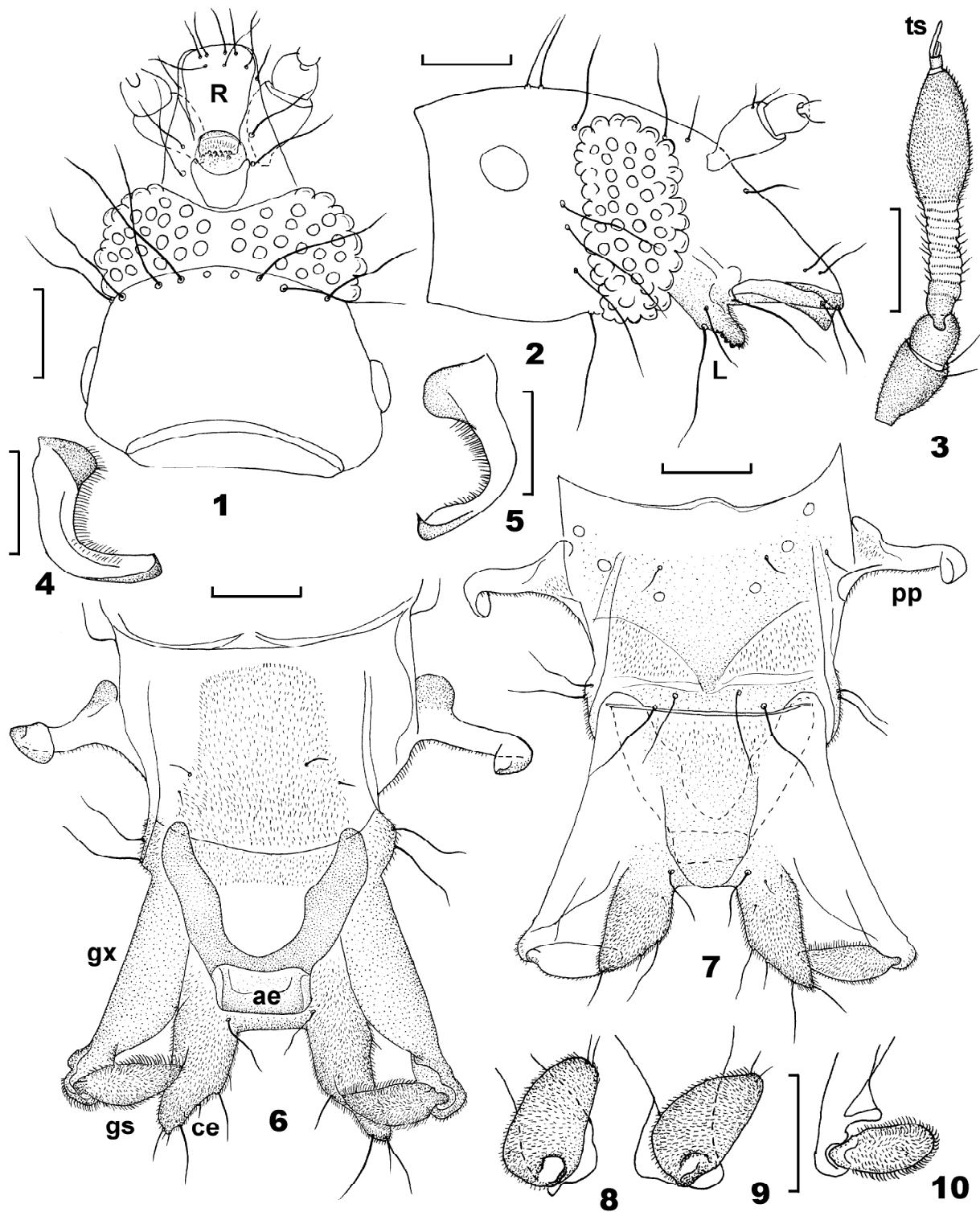


Рис. 1–10. Детали строения имаго самца *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. из Японии. 1–2 — голова, снизу (1) и сбоку (2); 3 — антenna; 4–5 — паратергальный отросток; 6–7 — сегмент VIII и гениталии, вид снизу (6) и сверху (7); 8–10 — геностили. R — рострум, L — «нижняя губа», ts — сенсилла терминального членика антенн, ae — эдеагус; ce — церки; gs — геностиль; gx — гонококсит; pp — паратергальный отросток. Масштабная линейка — 50 мкм.

Figs 1–10. Male imagines of *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. from Japan. 1 — head, ventral view; 2 — the same, lateral view; 3 — antenna; 4–5 — paratergal projection; 6 — male terminalia, ventral view; 7 — the same, dorsal view. R — rostrum, L — labium, ts — terminal antennal sensilla, ae — aedeagus; ce — cerci; gs — gonostylus; gx — gonocoxite; pp — paratergal projection. Scale bars are 50 µm.

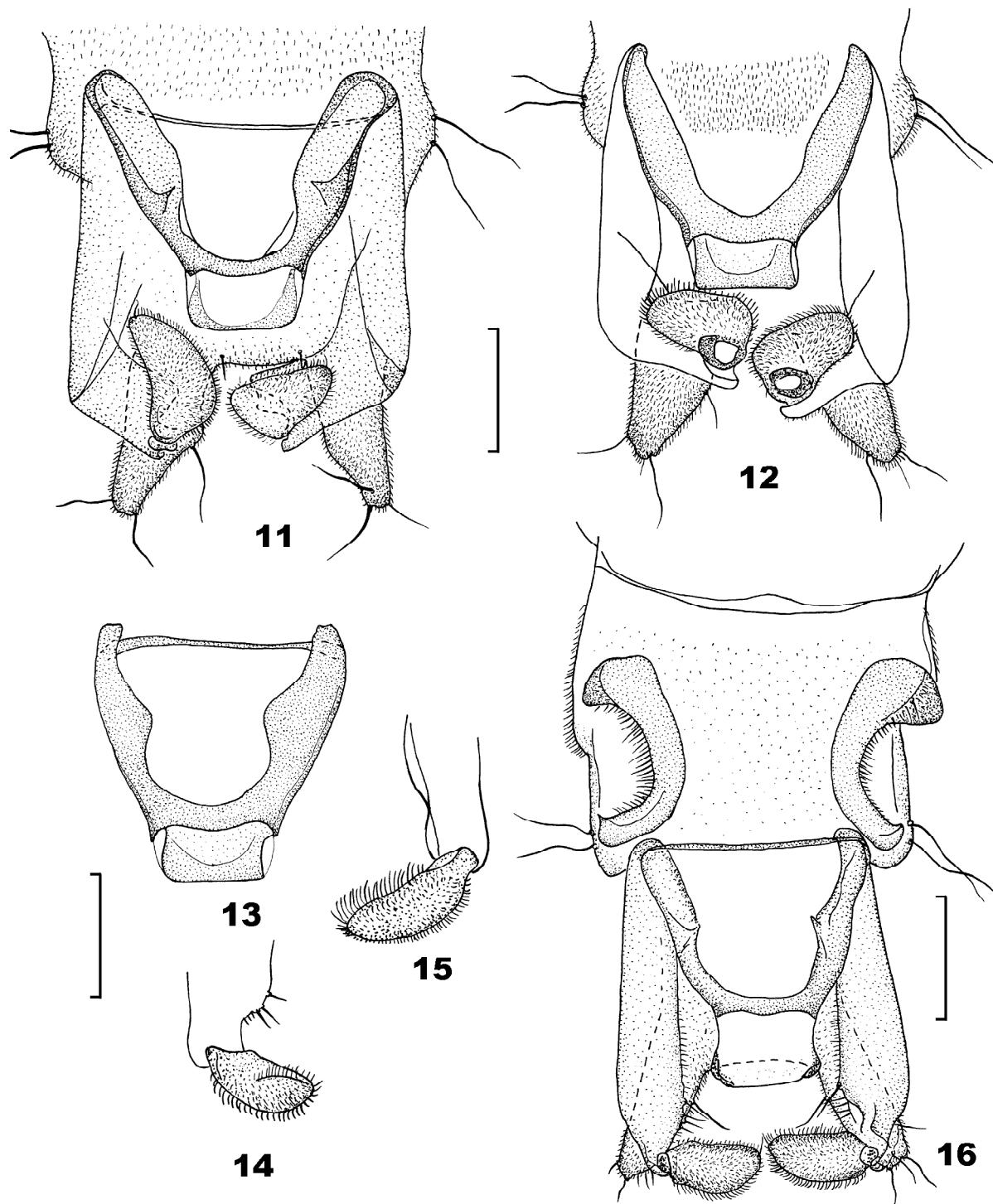


Рис. 11–16. Гениталии самцов *Nympomyia kannasatoi* sp.n. из Японии (11–13) и с о-ва Сахалин (14–16). 11–12, 16 — общий вид, снизу; 13 — эдеагус; 14–15 — гоностили. Масштабная линейка — 50 мкм.

Figs 11–16. Male genitalia of *Nympomyia kannasatoi* sp.n. from Japan (11–13) and Sakhalin Island (14–16). 11–12, 16 — total view from below; 13 — aedeagus; 14–15 — gonostylus. Scale bars are 50 μ m.

Adult female ($n = 10$) in general similar to male. Total length 1.6–2.3 mm. Total length/wing length 0.89–1.0.

Head length 208–228 μm , width — 148 μm . Rostrum length 48–52 μm , width 40 μm . The distance between the compound eyes dorsally 1.9–2.0 times the width of the end of the rostrum. Antenna 174–192 μm long; length of 1st segment 36–40 μm , length of 2nd segment 22–24 μm ; 3rd segment 92–104 μm long; terminal sensilla maximum length 14–16 μm ; antenna 0.81–0.84 times shorter than the head.

Thorax length 0.48–0.54 mm. Wing length 2.1–2.3 mm, on the edge with whip-shape setae 0.46–0.54 mm long; halters 0.27 mm long.

Terminalia (Figs 17–21). Segment VIII with 2 pairs of lateral paratergal projections of which proximal pair nose-shaped, ca 12 μm long, distal pair roundish, 28 μm long. Anteromedial from distal pair of projections also has a pair of rounded projections 12–16 μm long (Fig. 17). Sternite VIII in distal part with pair fingerlike projections with 1–2 short setae in apex. The last abdominal segment with cerci, 48–64 μm long, in subapical part with 2–4 pairs of long setae. In proximal part ventrally located transverse margin which covered short hair-like setae; shape of this ventral margin varies and sometimes consists of two parts (Figs 17, 19–21). Also on the ventral side laterally on each side is weakly expressed rounded-triangular lobe covered with short setae (Figs 17, 19–20).

Куколка и личинка не отличаются от таковых *N. rohdendorfi*.

Диагноз. Самец и самка нового вида очень близки к *N. rohdendorfi*, от которого отличаются в основном строением сегмента VIII брюшка и гениталиями. Так, паратергальные выросты самца базально с «бугром», вершина эдеагуса прямая, геностили от бобовидной формы до ланцетовидной, на вершине часто с 1–2 относительно длинными щетинками. Сегмент VIII самки с 2 парами латеральных паратергальных выростов, из которых проксимальная пара носовидной формы, дистальная — округлая. Антеромедиально от нижнего паратергального выроста на вентральной стороне имеется также пара округлых выростов. В проксимальной части гениталий самки вентрально расположена поперечная пластинка, по краю опущенная короткими волосовидными щетинками. Церки длинные пальцевидные, без «пятки» во внутренних углах. У самца *N. rohdendorfi* паратергальные выросты сегмента VIII базально без «бугра». Вершина эдеагуса округлая. Геностили иной формы, обычно короткие и округлые, без относительно длинных щетинок на вершине. Сегмент VIII самки только с одной парой паратергальных выростов. Поперечная вентральная пластинка иной формы, хитинизирована и не покрыта короткими щетинками. Церки короткие, во внутренних углах с «пяткой».

Diagnosis. Adults of *N. kannasatoi* sp.n. is closely related to *N. rohdendorfi* and can be separated from latter mainly by characters of terminalia. Thus, paratergal projections of a new species on segment VIII basally with bump. Aedeagus with straight apex. Shape of gonostylus from bean to lanceolate or rounded, sometimes with 1–2 more long setae in apex. Segment VIII of female with 2 pairs of lateral paratergal projections of which proximal pair nose-shaped, distal pair roundish. Anteromedial from distal pair of projections also has a pair of rounded projections. In proximal part of female genitalia ventrally located transverse margin which covered short hair-like setae. Cerci long and fingerlike, without «heel» in inner angles. Paratergal projections on segment VIII of *N. rohdendorfi* basally without bump. Aedeagus with roundish apex. Shape of gonostylus is different, usually more short and roundish, without any long setae in apex. Segment VIII of

female only with a pair of lateral paratergal projections. Ventral transverse margin of female genitalia is different shape not covered short seta. Cerci short, with «heel» in inner angles.

Примечание. Весь сахалинский имагинальный материал собран после роения, в водотоке во время взятия проб бентоса. В связи с этим у самцов и самок уже были «сброшены» крылья.

Этимология. Название вида *kannasatoi* состоит из двух частей — первая часть носит имя реки Канна (Kanna River), где был собран новый вид; вторая часть происходит от имени Сейджи Сато (Seiji Sato), собравшего типовой материал нового вида и сделавшего интереснейшие наблюдения и фотографии по поведению нимфомийид.

Species name *kannasatoi* consists from two parts: *kanna* — from Kanna River where type material was collected; *satoi* — in honour of Seiji Sato, who collected type material and prepared photos of species in nature.

Результаты молекулярно-генетического анализа

Нуклеотидный состав последовательностей изученного фрагмента митохондриального гена COI *N. kannasatoi* sp.n. отклонялся от равновесного. Доли нуклеотидов составляли: А — 27,7 %, Т — 42,7 %, С — 14,0 %, Г — 15,5 %. Число А+Т пар нуклеотидов (70,4 %) в этих последовательностях превышало число Г+С пар (29,5 %) больше, чем в два раза.

Анализ показал существование внутривидового полиморфизма нуклеотидных последовательностей изученных фрагментов гена COI *N. kannasatoi* sp.n. В восьми последовательностях фрагмента COI длиной 658 нуклеотидов было обнаружено 8 замен нуклеотидов. Все замены нуклеотидов происходили в третьей позиции кодонов и не приводили к изменениям аминокислотных последовательностей белка. Последовательности COI самок *N. kannasatoi* sp.n. не отличались от последовательностей самцов. Характер нуклеотидной изменчивости в последовательностях COI *N. kannasatoi* sp.n. наиболее точно описывала модель HKY+G (Hasegawa-Kishino-Yano) [1985].

Эволюционные дистанции (d_{K2P}) между последовательностями COI индивидуальных особей *N. kannasatoi* sp.n. варьировали от 0 до 0,009 замен нуклеотидов на сайт, составляя в среднем 0,005 (табл. 1). Это значение хорошо соответствует средней внутривидовой дистанции между последовательностями COI *N. rohdendorfi* (0,006 замен нуклеотидов на сайт). В то же время дистанции между последовательностями COI *N. kannasatoi* sp.n. и *N. rohdendorfi* на порядок величины больше, чем между последовательностями каждого из видов, и составили в среднем 0,068 замен нуклеотидов на сайт (табл. 1).

Последовательности *N. kannasatoi* sp.n. и *N. rohdendorfi* различались консервативными заменами нуклеотидов в 33 позициях. Двадцать замен были трансверсиями, триадцать — транзициями. Большинство замен нуклеотидов происходило в третьей позиции кодонов. Четыре из 33 замен наблюдались в первой позиции кодонов. Однако, лишь одна из них (в позиции 68) привела к замене валина в аминокислотной последовательности COI *N. rohdendorfi* на изолейцин в последовательности *N. kannasatoi*. Замены нуклеотидов в остальных трёх кодонах были синонимичными и не приводили к замещению аминокислот. Различия нуклеотидных последовательностей в изученном фрагменте гена COI *N. kannasatoi* sp.n. и *N. rohdendorfi*, позволяют безошибочно различать эти

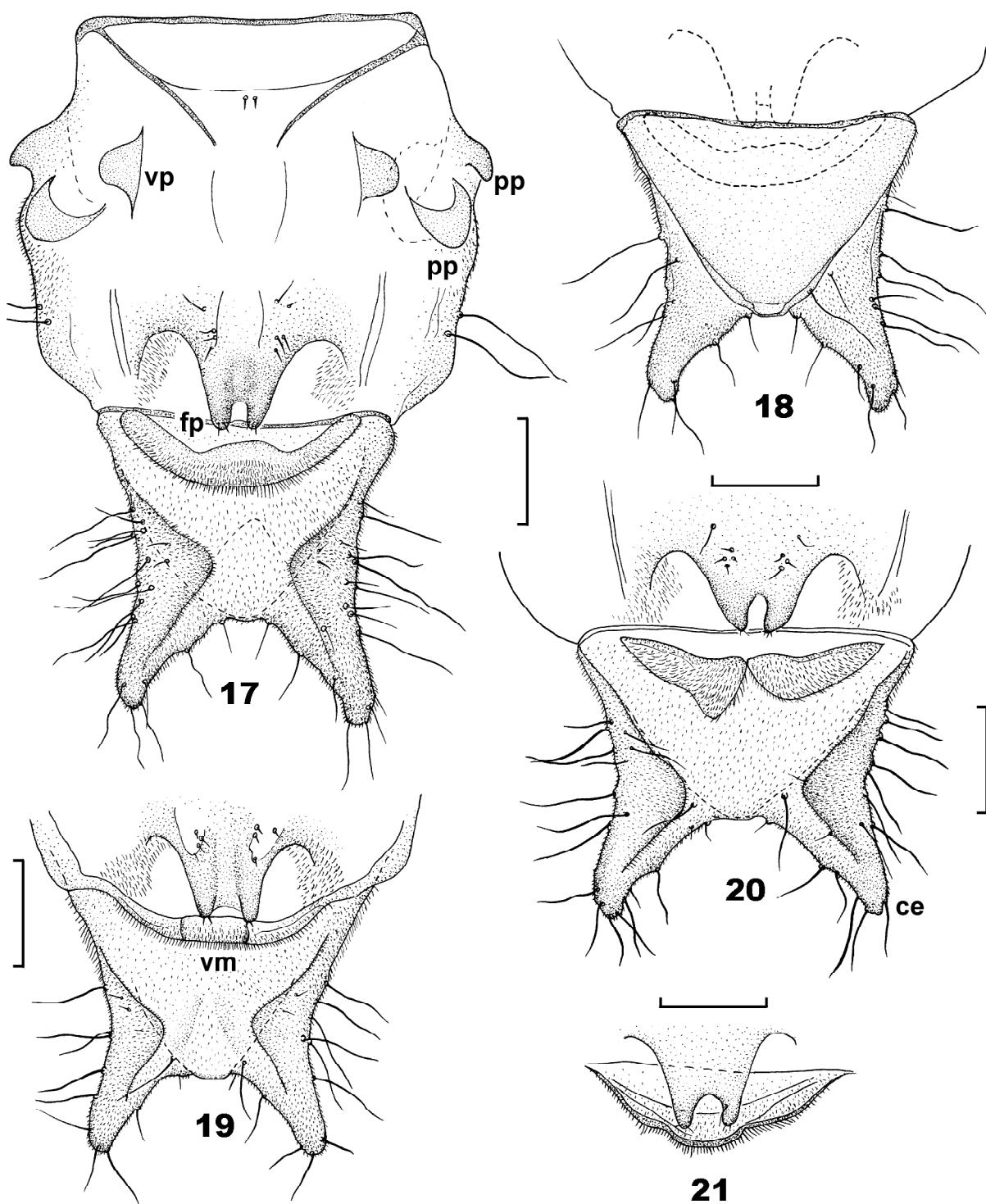


Рис. 17–21. Сегмент VIII и гениталии самки *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. из Японии (17–20) и с о-ва Сахалин (21). 17, 19–20 — общий вид, снизу; 18 — гениталии, сверху; 21 — вентральная пластина и пальцевидные выросты стернита VIII. pp — паратергальные выросты, vp — вентральные выросты, fp — пальцевидные выросты, vm — вентральная пластина, ce — церки. Масштабная линейка — 50 мкм.

Figs 17–21. Female terminalia of *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. from Japan (17–20) and Sakhalin Island (21). 17, 19–20 — total view from below; 18 — genitalia from above; 21 — ventral margin and fingerlike projections of sternite VIII. pp — paratergal projections, vp — ventral projection, fp — fingerlike projection, vm — ventral margin, ce — cerci. Scale bars are 50 µm.

Таблица 1. Эволюционные дистанции (d_{K2P}) (число замен нуклеотидов на сайт) между нуклеотидными последовательностями COI *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. и *N. rohdendorfi* Makarchenko

Table 1. The evolutionary divergence (the number of base substitution per site) between COI sequences of *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. and *N. rohdendorfi* Makarchenko (Kimura-2 parameter method, d_{K2P})

Виды		<i>N. kannasatoi</i>								<i>N. rohdendorfi</i>			
		KP208 873	KP208 874	KP208 871	KP208 872	KP208 869	KP208 870	KP208 867	KP208 868	JX196 859	JX196 860	JX196 861	JX196 862
<i>N. kannasatoi</i>	KP208 874	0,003											
	KP208 871	0,002	0,002										
	KP208 872	0,009	0,006	0,008									
	KP208 869	0,003	0,000	0,002	0,006								
	KP208 870	0,009	0,006	0,008	0,000	0,006							
	KP208 867	0,006	0,003	0,005	0,009	0,003	0,009						
	KP208 868	0,008	0,005	0,006	0,002	0,005	0,002	0,008					
<i>N. rohdendorfi</i>	JX196 859	0,070	0,066	0,068	0,068	0,066	0,068	0,068	0,070				
	JX196 860	0,072	0,068	0,070	0,070	0,068	0,070	0,070	0,072	0,006			
	JX196 861	0,072	0,068	0,070	0,070	0,068	0,070	0,070	0,072	0,005	0,008		
	JX196 862	0,070	0,066	0,068	0,064	0,066	0,064	0,068	0,066	0,003	0,009	0,008	
	KP208 875	0,070	0,066	0,068	0,068	0,066	0,068	0,068	0,070	0,003	0,006	0,002	0,006

виды. 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. kannasatoi* sp.n.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что нуклеотидные последовательности фрагмента митохондриального гена COI, изученные в настоящей работе, являются специфическими для *N. kannasatoi* sp.n. и могут служить в качестве дополнительного диагностического признака при идентификации этого вида.

The nucleotide composition of the sequences of the studied *N. kannasatoi* sp.n. mitochondrial COI gene fragment deviated from equilibrium with the A rate amounting to 27.7 %; T, to 42.7 %; C, to 14.0 %; and G, to 15.5 %. The amount of A + T nucleotide pairs (70.4 %) in these sequences more than twofold exceeded that of G + T pairs (29.5 %).

Analysis has shown an intraspecific polymorphism of nucleotide sequences in the examined *N. kannasatoi* sp.n. COI gene fragments. Eight nucleotide substitutions were detected in the eight 658-nucleotide COI fragments. All nucleotide substitutions were localized to the third codon position and did not cause a change in the protein amino acid sequences. The COI sequences of *N. kannasatoi* sp.n. females did not differ from the male sequences. The HKY + G (Hasegawa–Kishino–Yano) [1985] model most adequately describes the nucleotide variation pattern in *N. kannasatoi* sp.n. COI sequences.

The evolutionary divergence (d_{K2P}) between the COI sequences of *N. kannasatoi* sp.n. individuals varied in the range of 0 to 0.009 nucleotide substitutions per site, amounting on the average to 0.005 (Table 1). This value fits well an average intraspecific distance between the *N. rohdendorfi* COI sequences (0.006 nucleotide substitutions per site). On

the other hand, the distances between *N. kannasatoi* sp.n. and *N. rohdendorfi* COI sequences are by one order of magnitude larger as compared with the intraspecific distances of each of the species, and amount on the average to 0.068 nucleotide substitutions per site (Table 1).

There were 33 fixed nucleotide differences between *N. kannasatoi* sp.n. and *N. rohdendorfi* sequences; of them, 20 substitutions were transversions and 13, transitions. Most of nucleotide substitutions were localized to the third codon position. Four of the 33 substitutions were at the first codon position. However, only one of them (at position 68) resulted in an amino acid substitution, namely, replacement of valine in the *N. rohdendorfi* COI sequence by isoleucine in the *N. kannasatoi* sp.n. sequence. The nucleotide substitutions in the remaining three codons were synonymous and did not lead to an amino acid substitution. The differences between the nucleotide sequences in the examined *N. kannasatoi* sp.n. and *N. rohdendorfi* COI gene fragments allow these species to be exactly distinguished. A BLAST comparison of the COI sequences determined in this study with the COI sequences of other species available in international databases (GenBank, BOLD, and ENA) has demonstrated the absence of nonspecific contaminations in the analyzed samples, which allows these sequences to be regarded as specific for *N. kannasatoi* sp.n.

Thus, our data demonstrate that the nucleotide sequences of mitochondrial COI gene fragments analyzed in this work are specific for *N. kannasatoi* sp.n. and can be used as an additional diagnostic characteristic for identifying this species.

Биология

Личинки и куколки *N. kannasatoi* sp.n., как и других представителей семейства, населяют предгорные и горные реки с быстрым течением и высоким содержанием кислорода в воде, поселяясь в основном на каменистом и гравийно-галечниковом грунтах, зачастую покрытых во-

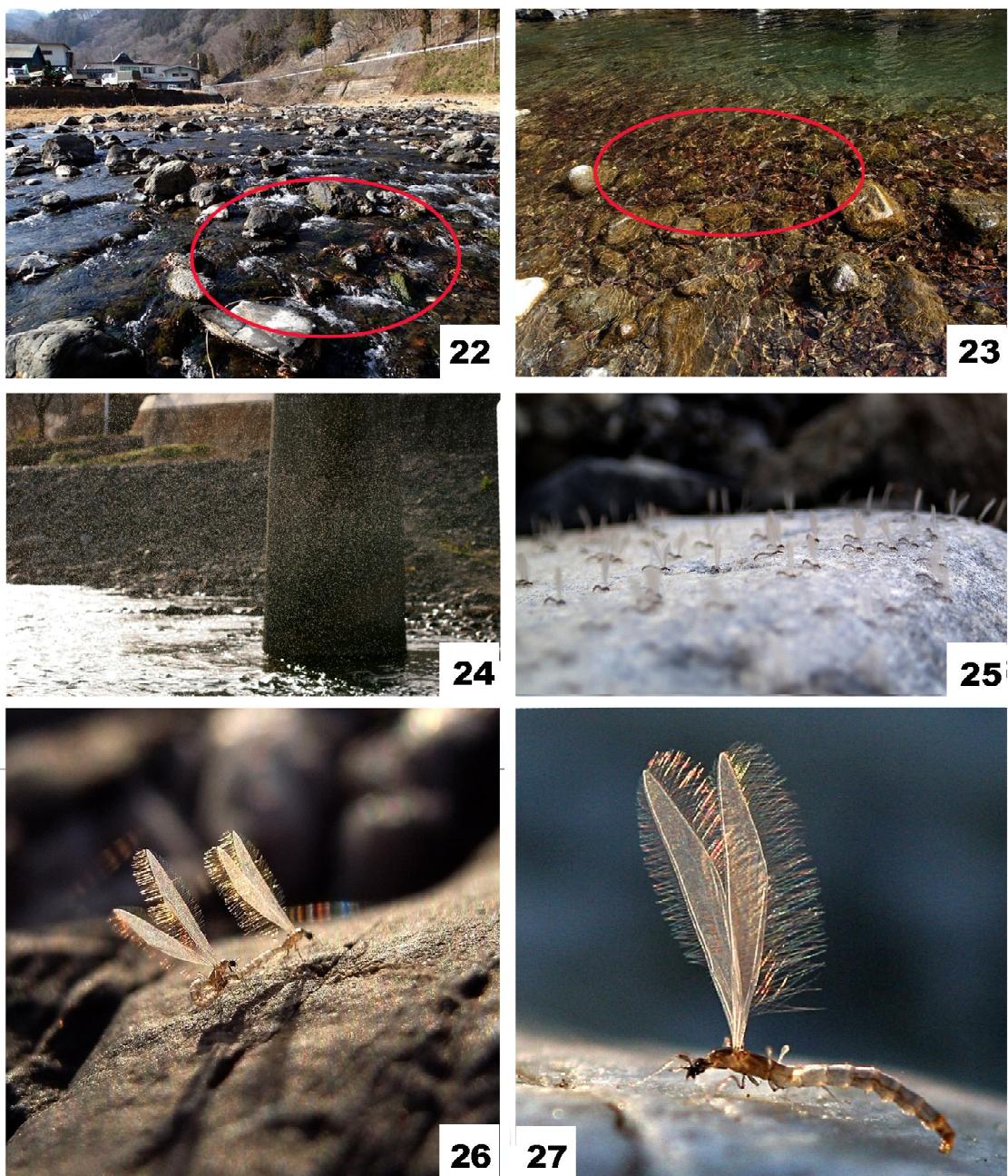


Рис. 22–27. *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. в типовом местообитании (р. Канна, о-в Хонсю, Япония). 22–23 — места обитания личинок и куколок (красными кругами показаны локальные биотопы); 24 — роение имаго; 25 — имаго, пережидающие перед вылетом сильный ветер; 26 — копулирующая пара на прибрежном камне; 27 — имаго самец на камне. Фото Сейдзи Сато.

Figs 22–27. *Nymphomyia kannasatoi* sp.n. in the type locality (Kanna River, Honshu, Japan). 22–23 — inhabitation of larvae and pupae (local biotopes are shown by red circles); 24 — swarming of adults; 25 — adults, to wait before swarming strong wind; 26 — adult male and female on the coastal stone; 27 — adult male on the stone. Photo by Seiji Sato.

дорослями (рис. 22–23). Роение происходит на закате при тихой погоде на высоте от 0,5 до нескольких метров над водотоком (рис. 24). Сильный ветер может задержать роение имаго, которые ждут установления «плётной погоды» на камнях у уреза воды (рис. 25, 27). Копуляция насекомых происходит во время роения и заканчивается

гам (рис. 26). После завершения спаривания копулирующая пара теряет крылья и какое-то время имаго живут без них, погружаясь в воду, где самка откладывает яйца. Нам не удалось установить продолжительность жизни взрослых нимфомийид на дне в прибрежной зоне реки, но бескрылые особи, попавшие в орудия сбора бентоса, продолжали жить как минимум 1–2 часа.

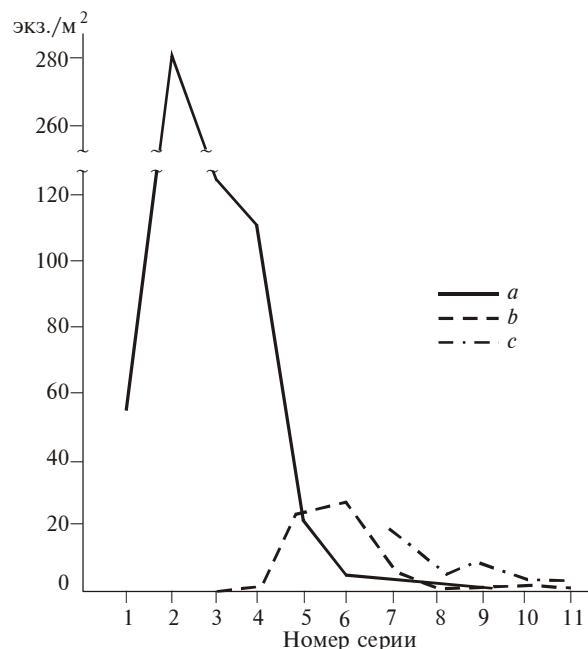


Рис. 28. Сезонная динамика численности (экз./м²) личинок (а), куколок (б) и имаго (с) *N. kannasatoi* сп.н. в р. Белая (о. Сахалин). Номера серий соответствуют следующим датам: 1 — 10.V, 2 — 20.V, 3 — 30.V, 4 — 8.VI, 5 — 28.VI, 6 — 8.VII, 7 — 18.VII, 8 — 28.VII, 9 — 7.IX, 10 — 20.IX, 11 — 16.X.

Fig. 28. Seasonal dynamics of density (ind/m²) of larvae (a), pupae (b) and adults (c) of *N. kannasatoi* sp.n. in the Belya River (Sakhalin Island). Serial numbers correspond to the following dates: 1 — 10.V, 2 — 20.V, 3 — 30.V, 4 — 8.VI, 5 — 28.VI, 6 — 8.VII, 7 — 18.VII, 8 — 28.VII, 9 — 7.IX, 10 — 20.IX, 11 — 16.X.

Вылет имаго *N. kannasatoi* sp.n. в р. Канна в Японии происходит весной — с конца марта до первой половины апреля. На Южном Сахалине в р. Белая этот процесс начинается в середине июня и массовый вылет заканчивается в конце июля; в это время температура воды в реке составляет 8–15,4 °C. Однако, судя по данным количественного учёта зообентоса р. Белая в 1986–1987 гг., вылет имаго может продолжаться до середины октября. Изменение численности *N. kannasatoi* sp.n. за период исследований в указанные годы показано на рис. 28. Личинки в массе появляются весной, достигая в апреле максимальной численности (280 экз./м²). В это время они находятся в III, IV возрастах. К концу мая численность личинок постепенно снижается за счёт их оккулирования и выедания донными беспозвоночными. Первые куколки были обнаружены 21 мая при температуре воды 5 °C и продолжали встречаться до середины октября. Роение имаго на р. Белая наблюдать не удалось. Все сборы взрослых насекомых (бескрылых) были сделаны с камней, находящихся в воде. Анализ продольного распределения нимфомийид показал, что их численность на верхних участках реки выше, чем на нижних. Так, в середине апреля численность личинок в верхнем течении реки была от 346 до 1179 экз./м², в среднем и нижнем течении — от 3,2 до 12,5 экз./м². Жизненный цикл *N. kannasatoi* sp.n. из р. Белая в отличие от жизненного цикла *N. levanidovae* унивальтинный.

Благодарности

Работа поддержана грантом РФФИ 14-04-01126.
Авторы благодарны Г.Б. Чириковой за английский перевод молекулярной части работы.
The authors are grateful to G. Chirikova for English translation of the manuscript.

Литература

- Леванидов В.Я. 1976. Биомасса и структура донных биоценозов малых водотоков Чукотского полуострова // Пресноводная фауна Чукотского полуострова. Владивосток: ДВНИЦ АН СССР. С.104–122.
- Макарченко Е.А., Гундерина Л.И. 2012 Морфологическое и молекулярно-генетическое переописание *Nymphomyia rohdendorfi* Makarchenko, 1979 (Diptera, Nymphomyiidae) из бассейна р. Амур (российский Дальний Восток) // Евразиатский энтомологический журнал. Т.11. Прил.2. С.17–25.
- Макарченко Е.А. 2013. *Nymphomyia kaluginae* sp.n. — новый представитель архаичных двукрылых (Diptera, Nymphomyiidae) из бассейна реки Амур (российский Дальний Восток) // Евразиатский энтомологический журнал. Т.12. №.3. С.291–296.
- Макарченко Е.А., Чубарева Л.А., Макарченко 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: ДВНИЦ АН СССР. С.15–19.
- Родендорф Б.Б., Калугина Н.С. 1974. Нахodka своеобразных двукрылых нимфомийид (Diptera, Nymphomyiidae) в Приморье // Энтомологическое обозрение. Т.53. №.3. С.686–694.
- 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.
- Edgar R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput // Nucleic Acids Research. Vol.32. P.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. Vol.3. P.294–299.
- 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.
- 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. Vol.114. No.2. P.186–193.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journal of Molecular Evolution. Vol.16. P.111–120.
- 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.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0 // Molecular Biology and Evolution. Vol.30. P.2725–2729.
- 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.