

Анализ последовательностей митохондриальной и ядерной ДНК некоторых представителей подрода *Polyommatus* (s. str) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae) Афганистана

Analysis of mitochondrial and nuclear DNA sequences in some butterflies of subgenus *Polyommatus* (s. str) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae) of Afghanistan

Д.И. Водолажский¹, Б.В. Страдомский¹, И.Г. Плющ²
D.I. Vodolazhsky¹, B.V. Stradomsky¹, I.G. Pljushtch²

¹Институт аридных зон ЮНЦ РАН, пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону 344006, Россия

²Институт зоологии НАН Украины им. Шмальгаузена, ул. Б. Хмельницкого, 15, Киев 01601, Украина

¹Institute of Arid Zones SSC RAS, Chekhov str., 41, Rostov-on-Don 344006 Russia. E-mail: dvodolazhsky@gmail.com; bvstr@yandex.ru

²Schmalhausen Institute of Zoology NAS, B.Chmielnicky str., 15, Kyiv 01601, Ukraine. E-mail: loxias001@gmail.com

Ключевые слова: *P. icadius*, *P. bilucha*, COI и ITS2 последовательности ДНК, Афганистан.

Key words: *P. icadius*, *P. bilucha*, COI and ITS2 DNA Sequences, Afghanistan.

Резюме. С помощью изучения первичных нуклеотидных последовательностей ядерной (ITS2) и митохондриальной (COI) ДНК показано наличие в энтомофауне Афганистана вида *Polyommatus icadius* (Grum-Grshimailo, 1890). Также молекулярно-генетические исследования показали, что *Polyommatus bilucha* (Moore, 1884) является самостоятельным видом, генетически более близким *P. icadius*, а не *P. eros* (Ochsenheimer, 1808).

Abstract. Using the study of nuclear (ITS2) and mitochondrial DNA primary nucleotide sequences, authors demonstrated that species of *Polyommatus icadius* (Grum-Grshimailo, 1890) are presented in the entomofauna of Afghanistan. In addition, the molecular genetic studies show that *Polyommatus bilucha* (Moore, 1884) is an independent species, which is genetically closer to *P. icadius* rather than to *P. eros* (Ochsenheimer, 1808).

Фаунистические исследования имеют научную ценность только при условии абсолютно достоверного определения первичного материала. Одним из наиболее современных методов объективной идентификации видовой принадлежности является изучение первичных последовательностей ДНК, как ядерной, так и митохондриальной (так называемого ДНК-баркода – последовательности участка митохондриальной ДНК, кодирующей первую субъединицу фермента цитохромоксидазы (COI), используемой в качестве молекулярного маркера [Hebert et al., 2003]). В этой связи, нами было проведено сравнительное изучение ДНК ядерного локуса ITS2, а также митохондриального гена COI нескольких экземпляров, принадлежащих подроду *Polyommatus* (s. str), отловленных при изучении лепидоптерофауны Афганистана. Таксономический статус этих экземпляров вызывает особый интерес. В настоящее время принято считать, что подрод *Polyommatus* (s. str) в Афганистане представлен такими видами, как *P. icarus* (Rottemburg, 1775), а также *P. eros*

(Ochsenheimer, 1808), подвидом *bilucha* (Moore, 1884) [Sakai, 1981]. В то же время, обнаруженные экземпляры «*P. icarus*» в большей степени морфологически соответствовали *P. icadius* (Grum-Grshimailo, 1890), а подчиненность таксона *bilucha* виду *P. eros* также вызвала определенные сомнения. В связи с такой неоднозначной трактовкой целесообразным представилось уточнение таксономической принадлежности обсуждаемых экземпляров с использованием молекулярных маркеров ядерной и митохондриальной ДНК.

Материал и методы исследования

Исследованные экземпляры подрода *Polyommatus* (s. str) хранятся в музее Южного Научного Центра Российской Академии наук (ЮНЦ РАН, г. Ростов-на-Дону). Экземплярам присвоены идентификационные музейные номера. Полученные последовательности митохондриальной и ядерной ДНК представлены в международной базе GenBank.

Материал: *P. icadius*: ♂, Afghanistan, 10 km S.Bamian, 2800 m., 20.05.2010, I. Pljushtch – музейный номер ILL096, accession №№ GenBank JQ026942 – COI, JQ026945 – ITS2.

P. bilucha: ♂, Afghanistan, 10 km S.Bamian, 2800 m., 20.05.2010, I. Pljushtch – музейный номер ILL097, accession №№ GenBank JQ026943 – COI, JQ026946 – ITS2; ♂, Afghanistan, Kabul, Paghman Dara, 2500-2900 m., 13.07.2009, I. Pljushtch – музейный номер ILL097, accession №№ GenBank JQ026944 – COI, JQ026947 – ITS2.

Обработку образцов тканей экземпляров *Polyommatus* (s. str), амплификацию участков гена COI митохондриальной ДНК, а также секвенирование амплифицированных фрагментов проводили аналогично процедурам, описанным ранее [Водолажский, Страдомский, 2008].

Параметры методов экстракции ДНК, ПЦР-амплификации и секвенирования описаны в работах [Водолажский, Страдомский, 2008a, b].

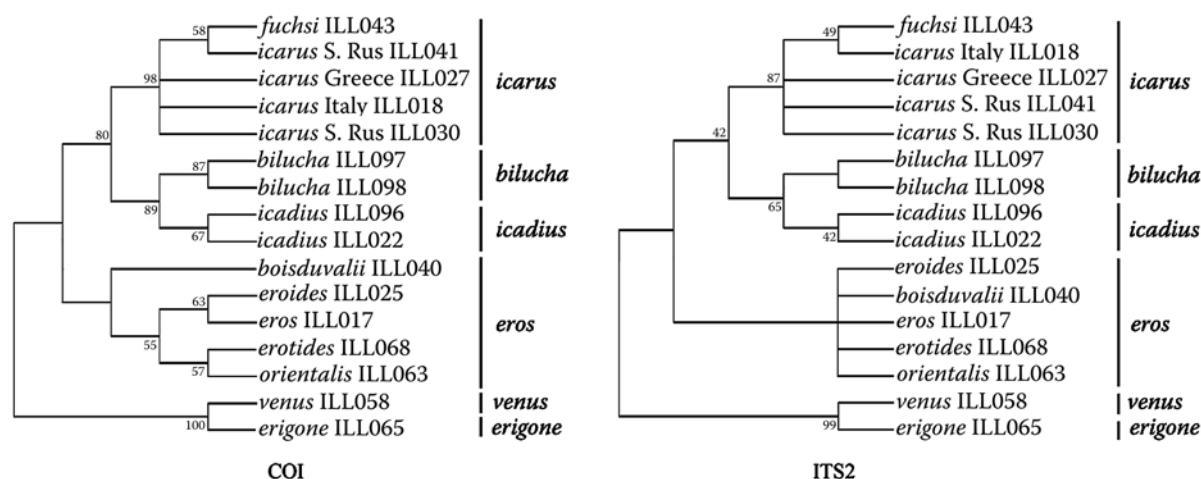


Рис. *Polyommatus* (s. str.): ME-кладограммы, построенные с использованием метода минимальной эволюции при анализе различий нуклеотидных последовательностей ДНК генетических локусов ITS2 и COI.

Fig. *Polyommatus* (s. str.): ME-cladograms based on the Minimum Evolution method of analysis of distances for COI and ITS2 DNA sequences.

Анализ первичных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием программы BioEdit Sequence Alignment Editor версии 7.0.5.3 [Hall, 1999]. Отличия первичных нуклеотидных последовательностей определялись количественно с использованием количественных алгоритмов по параметрической модели Kimura-2 [Kimura, 1980] и графически представлялись в виде ME-кладограммы.

В качестве сравнительных данных использовались ITS2- и COI-последовательности ДНК видов *P. icarus* (идентификационные музейные номера ILL018, ILL027, ILL030, ILL041, ILL041), *P. icadius* (идентификационный номер ILL022), *P. eros* (идентификационные номера ILL017, ILL025, ILL040, ILL063, ILL068), *P. venus* (идентификационный номер ILL058) и *P. erigone* (идентификационный номер ILL065), представленные в базе данных GenBank под номерами EU597138, EU597139, EU597143, EU597146, FJ428804, FJ428818, FJ428819, FJ428821, FJ428822, FJ435341, GQ885152, GQ885154-GQ885156, GQ885157, GQ885159, GQ885161-GQ885163, GQ885165, GQ885166, GQ885171, GU354249, GU354250, GU354255, GU354256.

Результаты и обсуждение

Сравнительный анализ полученных нуклеотидных последовательностей локусов ITS2 ядерной ДНК и митохондриальной ДНК гена COI изученных образцов представлен на ME-кладограммах (Рис.). Полученные результаты свидетельствуют об очень высоком уровне сходства последовательностей митохондриального гена COI (0,998) и ядерной последовательности ITS2 (0,996) афганского экземпляра из группы "*P. icarus*" и номинативного представителя *P. icadius* (ILL022) из высокогорья восточного Памира. Эти экземпляры образовывали самостоятельные ветви на полученных кладограммах, явно обособленные от ветвей, образованных экземплярами *P. icarus*. Таким образом, необходимо признать, что молекулярно-генетические исследования подтверждают предварительное заключение, основанное на морфологическом анализе, о наличии в фауне Афганистана такого представителя

подрода *Polyommatus* (s. str.), как *P. icadius*.

Также наши исследования показали, что сестринские *P. icadius* ветви на кладограммах образовывали представители таксона *bilucha*. Причем подвиды *P. eros* объединялись в совершенно отдельные ветви, как по ядерным, так и митохондриальным нуклеотидным последовательностям ДНК. Следовательно, необходимо признать, что таксон *bilucha* является самостоятельным видом, близко родственным *P. icadius* и при этом значимо отличающимся от *P. eros* по использованным в нашем исследовании молекулярно-генетическим маркерам:

–*P. bilucha* (Moore, 1884) **stat. rev.:**

"*Lycena bilucha*" [Moore, 1884: 24].

"*Polyommatus eros bilucha* Moore" [Sakai, 1981: 128, 233].

Таким образом, проведенные молекулярно-генетические исследования свидетельствуют о том, что в энтомофауне Афганистана присутствует такой представитель подрода *Polyommatus* (s. str.) как *P. icadius*, а *P. bilucha* необходимо признать хорошим видом.

Литература

- Водолажский Д.И., Страдомский Б.В. 2008a. Исследование филогенеза подрода *Polyommatus* (s. str.) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae) с использованием маркеров мтДНК. Часть I // Кавказский энтомологический бюллетень. 4(1): 123-130.
- Водолажский Д.И., Страдомский Б.В. 2008b. Исследование филогенеза подрода *Polyommatus* (s. str.) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae) с использованием маркеров мтДНК. Часть II // Кавказский энтомологический бюллетень. 4(2): 237-242.
- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp. Ser. 41: 95–98.
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L., deWaard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 270: 313–322.
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // Journ. Mol. Evol. 16: 111–120.
- Moore F. 1884. Descriptions of some new Asiatic diurnal Lepidoptera; chiefly from specimens contained in the Indian Museum, Calcutta // Journal of the Asiatic Society of Bengal. V.53 (1): 16-52.
- Sakai S. 1981. Butterflies of Afghanistan. Tokyo: Koudansha: 272 pp.