

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Южный Научный Центр

RUSSIAN ACADEMY OF SCIENCES
Southern Scientific Centre

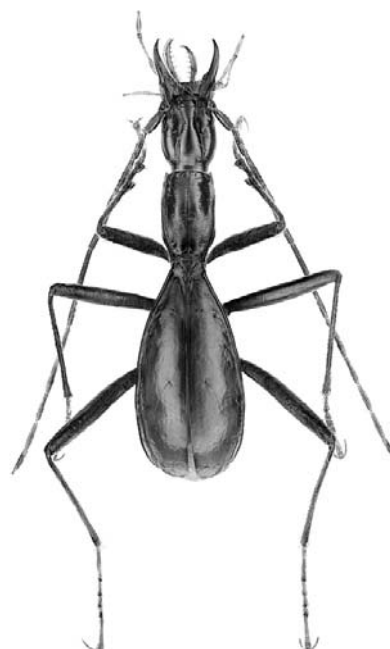


Кавказский Энтомологический Бюллетень

CAUCASIAN ENTOMOLOGICAL BULLETIN

Том 6. Вып. 1

Vol. 6. No. 1



Ростов-на-Дону
2010

Идентификация гибридного экземпляра *Polyommatus (Lysandra)* (Lepidoptera: Lycaenidae) с помощью генетических маркеров COI и ITS2

Identification of the hybrid specimen of *Polyommatus (Lysandra)* (Lepidoptera: Lycaenidae) by genetic markers COI and ITS2

Д.И. Водолажский¹, Б.В. Страдомский², Г.В. Кузнецов³
D.I. Vodolazhsky¹, B.V. Stradomsky², G.V. Kuznetsov³

¹Южный научный центр РАН, пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону 344006 Россия

²Ростовское отделение Русского энтомологического общества, а/я 3318, Ростов-на-Дону 344092 Россия

³Ул. Борьбы, 4–24, Волгоград 400006 Россия

¹Southern Scientific Center of RAS, Chekhov str., 41, Rostov-on-Don 344006 Russia. E-mail: vodolazhski@ssc-ras.ru

²Rostov branch of Russian Entomologic Society, PO Box 3318, Rostov-on-Don 344092 Russia. E-mail: bvstr@yandex.ru

³Borby str., 4–24, Volgograd 400006 Russia. E-mail: gen-mash@mail.ru

Ключевые слова: *Polyommatus (Lysandra)*, *bellargus*, *coridon*, гибрид, гены COI и ITS2.

Key words: *Polyommatus (Lysandra)*, *bellargus*, *coridon*, hybrid, COI and ITS2 genes.

Резюме. Был обнаружен гибридный экземпляр *Polyommatus (Lysandra)*. Проведен сравнительный анализ двух несцепленных между собой генетических маркеров голубянок подрода *P. (Lysandra)*: митохондриального гена COI и ядерной нуклеотидной последовательности ITS2. Исследования показали, что гибридный экземпляр имеет ген COI, характерный для *P. (L.) coridon*, а ITS2 – для *P. (L.) bellargus*. Таким образом, обнаруженный экземпляр является гибридом *P. (L.) bellargus* × *P. (L.) coridon*.

Abstract. The authors studied a hybrid specimen of *Polyommatus (Lysandra)*. A comparative analysis of two independent genetic markers of specimens of subgenus *P. (Lysandra)*, the mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) and the nuclear internal transcribed spacer 2 (ITS2), revealed that the hybrid specimen has the COI gene specific for *P. (L.) coridon* and ITS2 specific for *P. (L.) bellargus*. Therefore, the specimen is a hybrid of *P. (L.) bellargus* × *P. (L.) coridon*.

Введение

При исследовании лепидоптерофауны Волгоградской области в промежуток с 2001 по 2009 год Г.В. Кузнецовым было обнаружено 5 экземпляров *Polyommatus (Lysandra)*, имеющих определенное морфологическое сходство с *P. (L.) corydonius* (Herrich-Schäffer, 1852) (Color plate 13: рис. 1). В то же время *P. (L.) bellargus* f. *polonus* Zeller, 1845, являющийся гибридом *P. (L.) bellargus* (Rottemburg, 1775) и *P. (L.) coridon* (Poda, 1761) [Higgins, Riley, 1978], также имеет аналогичный габитус. Для выяснения таксономической принадлежности нами было проведено изучение нуклеотидных последовательностей молекулярных маркеров (митохондриального – COI и ядерного – ITS2) одного из отмеченных выше экземпляров в сравнении

с *P. (L.) bellargus*, *P. (L.) coridon* и *P. (L.) corydonius*.

Материал и методы

Все исследованные экземпляры *Polyommatus (Lysandra)* хранятся в музее Южного Научного Центра Российской Академии наук (ЮНЦ РАН, Ростов-на-Дону). Экземплярам присвоены идентификационные музейные номера.

Материал:

- P. (L.)* hybrid: ♂, Russia: Starosel' e vill., Mikhajlovsky distr., Volgograd area, 19-Jul-2009, G. Kuznetsov (идентификационный номер ILL111);
P. (L.) coridon: ♂, Russia: Belokalitvensky distr., Rostov-on-Don area, 8-Aug-2008, B. Stradomsky (ILL109)
P. (L.) bellargus: ♂, Russia: Ust-Donetsky distr., Rostov-on-Don area, 26-Jun-2004, B. Stradomsky (ILL106);
♀, Russia: Kislovodsk., Stavropol area, 2-Aug-2003, B. Stradomsky (ILL107);
♂, Russia: Belokalitvensky distr., Rostov-on-Don area, 5-Jun-2004, B. Stradomsky (ILL108);
P. (L.) corydonius: ♂, Russia: Gelendzhiksky distr., Krasnodar area, 26-Aug-2007, V. Shchurov (ILL101);
♂, Russia: Gonachkhir (1900 m), Karachaj-Cherkesia, 6-Aug-2007, B. Stradomsky (ILL102);
P. (P.) icarus: ♂, Russia: Dugino, Azov, Rostov-on-Don, 04-Jun-2006, B. Stradomsky (ILL041).

Обработка материала и амплификация

Образцы тканей *P. (Lysandra)* охлаждали до –20°C и хранили в банке тканей отдела молекулярной биологии Института аридных зон Южного научного центра РАН вплоть до проведения экстракции ДНК.

Обработку образцов тканей *Lysandra*, амплификацию изучаемых участков ДНК, а также секвенирование амплифицированных фрагментов проводили аналогично процедурам, описанным нами ранее [Водолажский, Страдомский, 2008].

Для получения ПЦР-продуктов гена COI использовали следующие праймеры: прямой (PolF 5'- TAG CGA AAA TGA CTT TTT TCT A -3') и обратный (PolR2 5'- TTG CTC CAG STA ATA CAG GTA A -3'); для получения ПЦР-продуктов ядерной последовательности ITS2 применяли следующие праймеры: прямой (PiF 5'- GGG CCG GCT GTA TAA AAT CAT A -3') и

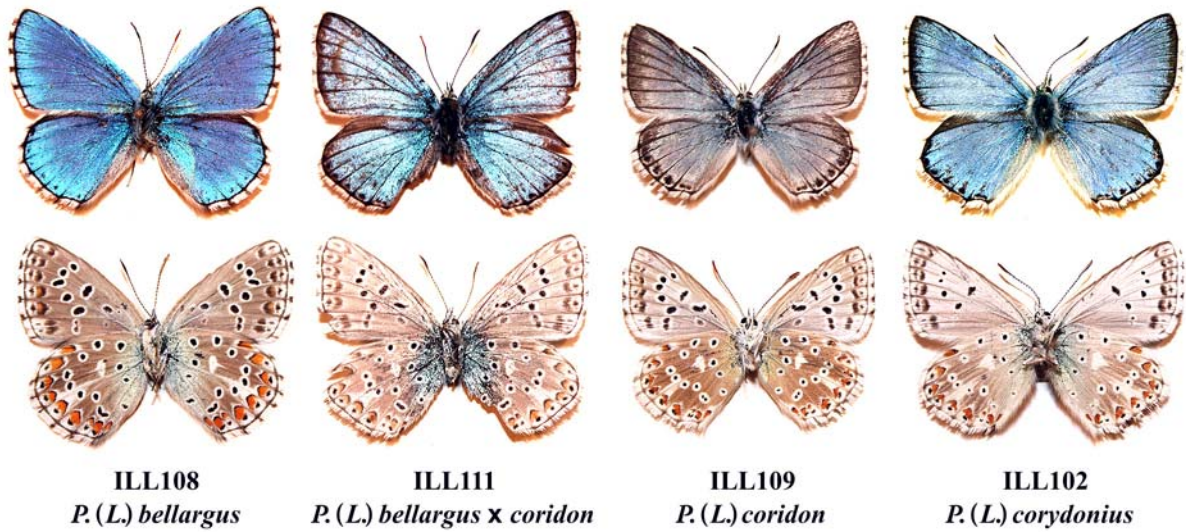


Рис. 1. Изученные экземпляры *Polyommatus (Lysandra)*, самцы, верхняя и нижняя сторона: *P. (L.) bellargus*, гибрид *P. (L.) bellargus* x *P. (L.) coridon*, *P. (L.) coridon*, *P. (L.) corydonius*.

Fig. 1. Studied specimens of *Polyommatus (Lysandra)*, males, upperside and underside: *P. (L.) bellargus*, hybrid of *P. (L.) bellargus* x *P. (L.) coridon*, *P. (L.) coridon*, *P. (L.) corydonius*.

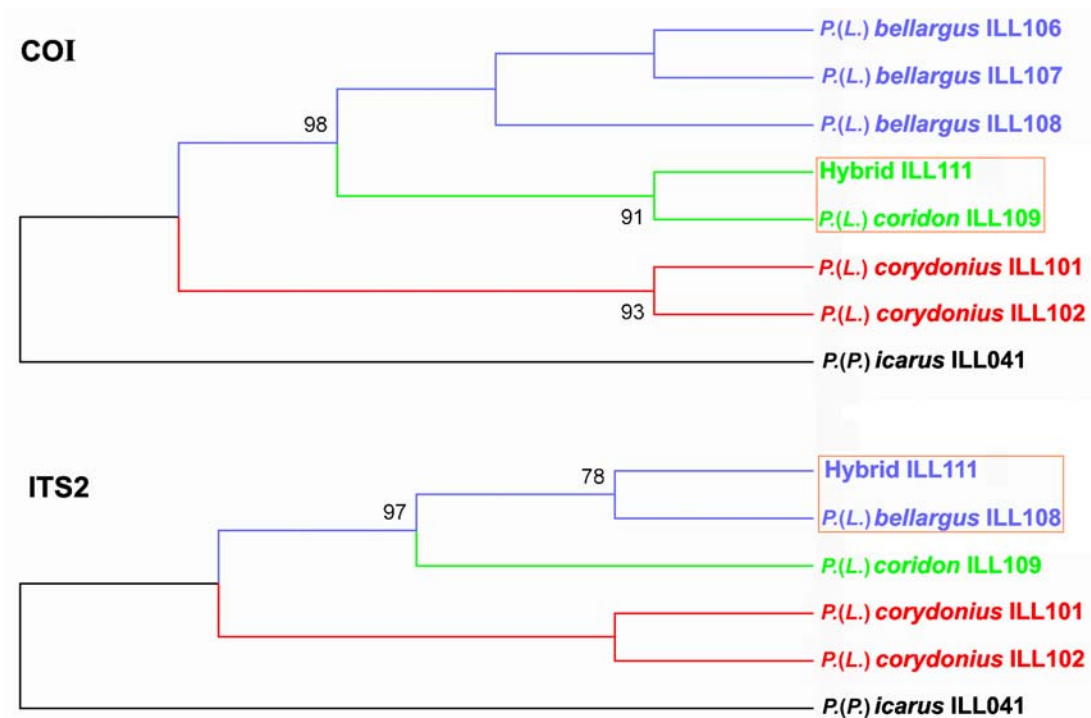


Рис. 2. Дендрограмма гаплотипов *Polyommatus (Lysandra)* на основе анализа митохондриального гена COI и ядерной нуклеотидной последовательности ITS2 с использованием метода максимальной парсимонии.

Fig. 2. The tree of *Polyommatus (Lysandra)* haplotypes based on analysis of the COI mitochondrial gene and of the nuclear ITS2 nucleotide sequence with the use of the maximum parsimony method.

обратный (PiR 5'- AAA AAT TGA GGC AGA CGC GAT A -3').

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 метода максимальной парсимонии (Maximum Parsimony) и графически представлялись в виде дендрограммы. В качестве таксона сравнения был использован *P. icarus* (Rottemburg, 1775).

Результаты и обсуждение

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что изученный спорный экземпляр *P. (Lysandra)* имеет значительные отличия в нуклеотидных последовательностях как митохондриального маркера COI, так и ядерной последовательности ITS2 от экземпляров *P. (L.) corydonius* (Color plate 13: рис. 2). При этом исследуемая особь по строению гена COI была очень близка к *P. (L.) coridon* (Color plate 13: рис. 2). Известно, что митохондриальные гены наследуются по материнской линии, передаваясь через цитоплазму

яйцеклетки. Следовательно, материнская особь исследуемого экземпляра принадлежала к виду *P. (L.) coridon*. В то же время, по ядерной последовательности ITS2, передаваемой хромосомами, обсуждаемый экземпляр соответствовал *P. (L.) bellargus* (Color plate 13: рис. 2).

Таким образом, необходимо заключить, что обнаруженная особь неясной таксономической принадлежности является гибридом *P. (L.) bellargus* x *P. (L.) coridon* (= *polonus* Zeller, 1845).

Литература

- Водолажский Д.И., Страдомский Б.В. 2008. Исследование филогенеза подрода *Polyommatus* (s. str.) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae) с использованием маркеров мтДНК. Часть I // Кавказский энтомологический бюллетень. 4(1): 123-130.
- 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.
- Higgins L.G., Riley N.D. 1978. Die Tagfalter Europas und Nordwestafrikas. Hamburg, Berlin. 377 p.

Приложение 1. Последовательности ДНК митохондриального гена COI изученных экземпляров *Polyommatus*.

Appendix 1. The COI DNA sequences from the studied specimens of *Polyommatus*.

Voucher No. ILL041: GenBank number FJ428822

Voucher No. ILL101: GenBank number FJ943965

Voucher No. ILL102: GenBank number FJ943962

Voucher No. ILL106

```
1 TGGAAATTGA GCGGGAATAG TGGGAACATC CCTAAGAATT TTAATTCGTA TAGAATTAAG
61 AACCCCTGGG TCTTTAAITG GGGATGATCA AATTTATAAT ACTATTGTTA CAGCTCATGC
121 ATTTATATATA ATTTTTTTTIA TAGTTATACC TATTTATAAT GGAGGATTTG GCAACTGATT
181 AGTACCTTTA ATATTAGGGG CACCTGATAT AGCATTCCCT CGATTAATAA ATATAAGATT
241 TTGATATTATA CTTCCATCAT TAATACITTT AATTTCTAGA AGAATTGTAG AAAATGGAGC
301 AGGAACAGGA TGAACAGITTT ACCCCCACT TCCATCTAAT ATTGCTCATA GAGGATCATC
361 TGTAGATTTA GCAATTTTCT CACTTCATTT AGCTGGAATT TCCTCAATTT TAGGAGCTAT
421 TAACITTTAT ACAACTATCA TTAATATACG AGTAAATAAT TTATCTTTTG ATCAAAATATC
481 ATTTATTTAT TGAGCGGTAG GAATTACAGC AT
```

Voucher No. ILL107

```
1 TGGAAATTGA GCGGGAATAG TGGGAACATC CCTAAGAATT TTAATTCGTA TAGAATTAAG
61 AACCCCTGGG TCTTTAAITG GGGATGATCA AATTTATAAT ACTATTGTTA CAGCTCATGC
121 ATTTATATATA ATTTTTTTTIA TAGTTATACC TATTTATAAT GGAGGATTTG GCAACTGATT
181 AGTACCTTTA ATATTAGGGG CACCTGATAT AGCATTCCCT CGATTAATAA ATATAAGATT
241 TTGATATTATA CTTCCATCAT TAATACITTT AATTTCTAGA AGAATTGTAG AAAATGGAGC
301 AGGAACAGGA TGAACAGITTT ACCCCCACT TCCATCTAAT ATTGCTCATA GAGGATCATC
361 TGTAGATTTA GCAATTTTCT CACTTCATTT AGCTGGAATT TCCTCAATTT TAGGAGCTAT
421 TAACITTTAT ACAACTATCA TTAATATACG AGTAAATAAT TTATCTTTTG ATCAAAATATC
481 ATTTATTTAT TGAGCGGTAG GAATTACAGC AT
```

Voucher No. ILL108

```
1 TGGAAATTGA GCGGGAATAG TGGGAACATC CCTAAGAATT TTAATTCGTA TAGAATTAAG
61 AACCCCTGGG TCTTTAAITG GGGATGATCA AATTTATAAT ACTATTGTTA CAGCTCATGC
121 ATTTATATATA ATTTTTTTTIA TAGTTATACC TATTTATAAT GGAGGATTTG GCAACTGATT
181 AGTACCTTTA ATATTAGGGG CACCTGATAT AGCATTCCCT CGATTAATAA ATATAAGATT
241 TTGATATTATA CTTCCATCAT TAATACITTT AATTTCTAGA AGAATTGTAG AAAATGGAGC
301 AGGAACAGGA TGAACAGITTT ACCCCCACT TCCATCTAAT ATTGCTCATA GAGGATCATC
361 TGTAGATTTA GCAATTTTCT CACTTCATTT AGCTGGAATT TCCTCAATTT TAGGAGCTAT
421 TAACITTTAT ACAACTATCA TTAATATACG AGTAAATAAT TTATCTTTTG ATCAAAATATC
481 ATTTATTTAT TGAGCGGTAG GAATTACAGC AT
```

Voucher No. ILL109: GenBank number FJ943961

Voucher No. ILL111

```
1 TGGAAATTGA GCGGGAATAG TGGGAACATC CCTAAGAATT TTAATTCGTA TAGAATTAAG
61 AACCCCTGGG TCTTTAAITG GGGATGATCA AATTTATAAT ACTATTGTTA CAGCTCATGC
121 ATTTATATATA ATTTTTTTTIA TAGTTATACC TATTTATAAT GGAGGATTTG GCAACTGATT
181 AGTACCTTTA ATATTAGGGG CACCTGATAT AGCATTCCCT CGATTAATAA ATATAAGATT
241 TTGATATTATA CTTCCATCAT TAATACITTT AATTTCTAGA AGAATTGTAG AAAATGGAGC
301 AGGAACAGGA TGAACAGITTT ACCCCCACT TCCATCTAAT ATTGCTCATA GAGGATCATC
361 TGTAGATTTA GCAATTTTCT CACTTCATTT AGCAGGAATT TCCTCAATTT TAGGAGCTAT
421 TAACITTTAT ACAACTATCA TTAATATACG AGTAAATAAT TTATCTTTTG ATCAAAATATC
```

Приложение 2. Последовательности ДНК ядерного гена ITS2 изученных экземпляров *Polyommatus*.

Appendix 2. The ITS2 DNA sequences from the studied specimens of *Polyommatus*.

Voucher No. ILL041: GenBank number GQ885165

Voucher No. ILL101

```
1 GCCGCCTCC GTCCGGTCCG TTCAAAAATA GACATAAATA TAATATAACG TTACGTGTGG
61 TGTGGTGTGT GTGTACGGTA GCGCGCTCCG GTCCGCGCAG TCCGCGCTCC CCCACCGAGC
121 CTCCTGTGAAG GTGAAAAAAT TCGGAGAGCG ATTATCGGTG ACGCGGGCGT GCACGCAGCT
181 CGAAGCTGTG TCGTCAAGCG GCGCAGAATG CGCTCGGTAC TCGTGTTCGG TTGCTTGGCA
241 ACGCCGCAAC ACCGTGCAAA ACACCTGGTA TTGTTATACGA ATTAACGAAC AGTAGGCGGGA
301 CTCGACGTCC GAAGGGCCGG TCGTCAAGCG CGACGTACCG AITGATTTCC GTCGCGGA
```

Voucher No. ILL102

```
1 GCGCACGGCG GTCAACAAT TGATGGTTC GCGCGGTGTA GAGCGCGCGC GCGTGTGTGT
61 GCGGCTTCTT CCGCACGGCG GCGCGCTCCT GTGCGGCCCG TTCAAAAATA GACATAAATA
121 TAATATAACG TTACGTGTGT TGATGTGTGT GTGTACGGTA GCGCGCTCCG GTCGCGGAGG
181 TCGCGCGCTC CCCACCGAGC CTCCGTGAAG GTGAAAAAAT TCGGAGAGCG ATTATCGGTG
241 AGCGGGGCGT GCACGCAGCT CGAAGCTGTG TCGTCAAGCG GCGCAGAATG CGCTCGGTAC
301 CTCTGTGTTC TTCTGTGCGA ACGCCGCAAC ACCGTGCAAA ACACCTGGTA TTGTTATACGA
361 ATTAACGAAC AGTAGGCGGA CTCGACGTCC GAAGGGCCGG TCGTCAAGCG CGACGTACCG
421 ATTTATTTAT
```

Voucher No. ILL108

```
1 ACTGTTCTGC GTCGTCGTGC TCTCACGAGC TCGAACAAT GACGGTTCGG GCGGTTGTAG
61 AGCGCGCGCG TGTGTGTGCG GGTTCGTCCG CACGCGCGCC GCCTCCCGTG CCGTCCGTTT
121 AAAAATAGAC ATAAATGTAA TATAAGCTTA CGTGTGTGTG GGTGTGTGTG TACGGTAGCG
181 CGCTCGCGCT GCGCACGTGC GCGCGTCCCG ACCGACGCTC CGTGAAAGTG AAAAGTTTTG
241 CGAGAGCGAT TATCGGTGAG CCGGGCTGCG ACCGACGCTC AACTTGTGTC GTCGACCGCC
301 CGGAAATGCG CTGCGTACTC GTTCTGTCGT TCGCAACGCC GCACCACTCG GAAAAACACT
361 GGTATTGTGA TACGAATTA CGAACAGTAG GCGGACTCGA CGTCCGAAGG GCGCGTCTGC
421 GACGCCGACG TACCGATTGA TTTCTGTCGG GAGGCGCGAG TCGTTCGCGCT GACGGA
```

Voucher No. ILL109

```
1 ACGGCGCAGC GCGTCAACA ATTGACGGTT GCGGCGCGTG TAGAGCGCGC GCGTGTGTGT
61 GCGGTTCTGT CCGTCCGGTC CGTTCAAAA TAGACATAAA TATAATATAA CGTTACGTGT
121 TGTGTGGTGT GTGTGTACGG TAGCGCGCTC GCGTCCGGCA CGTGCCCGCG TCCCCACCGA
181 CGCTCGCGTG AGGTGAAAAA TTTGCGAGAG CGATTATCGG TGAGCGGGCG GTCGACCGAC
241 GTCGAATCTG TGTGTCGAC GCGCGCAGAA TCGCCTCGCT ACTCGTTCGT TCGTGTGGAA
301 GCGGCGCACC CCGTCAAAA CACTGTTAT GTTATACGAA TTAACGAACA ATAGGCGGAC
361 TCGACGTCGG AAGGCGCGGT CGTCAAGGCC GACGTACCGA TTGATTTCCG TCGCGGAGCG
421 GAGGTGCTGG CGCTGACGGA
```

Voucher No. ILL111

```
1 ACTGTTCTGC GTCGTCGTGC TCTCACGAGC TCGAACAAT GACGGTTCGG GCGGTTGTAG
61 AGCGCGCGCG TGTGTGTGCG GGTTCGTCCG CACGCGCGCC GCCTCCCGTG CCGTCCGTTT
121 AAAAATAGAC ATAAATGTAA TATAAGCTTA CGTGTGTGTG GGTGTGTGTG TACGGTAGCG
181 CGCTCGCGCT GCGCACGTGC GCGCGTCCCG ACCGACGCTC CGTGAAGTG AAAAGTTTTG
241 CGAGAGCGAT TATCGGTGAG CCGGGCTGCG ACCGACGCTC AACTTGTGTC GTCGACCGCC
301 GCGAATGCGC CTGCGTACTC GTTCTGTCGT TCGCAACGCC GCACCACTCG GAAAAACACT
361 GGTATTGTGA TACGAATTA CGAACAGTAG GCGGACTCGA CGTCCGAAGG GCGCGTCTGC
421 GACGCCGACG TACCGATTGA TTTCTGTCGG GAGGCGCGAG TCGTTCGCGCT GACGGA
```

References

- Hall T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95–98.
- Higgins L.G., Riley N.D. 1978. Die Tagfalter Europas und Nordwestafrikas. Hamburg, Berlin: Verlag Paul Parey. 377 p.
- Vodolazhsky D.I., Stradomsky B.V. 2008. Phylogenetic analysis of subgenus *Polyommatus* (s. str.) Latreille, 1804 (Lepidoptera: Lycaenidae) based on mtDNA markers. Part I. *Caucasian Entomological Bulletin*. 4(1): 123–130 (in Russian).