

УДК 595.754

**ДИАГНОСТИКА ГРУППЫ ВИДОВ РОДА *POLYMERUS* НАHN
(HETEROPTERA, MIRIDAE), ВКЛЮЧАЮЩЕЙ ВРЕДИТЕЛЕЙ
АГРОКУЛЬТУР В ВОСТОЧНОЕВРОПЕЙСКОЙ ЛЕСОСТЕПИ,
ПО МОРФОЛОГИЧЕСКИМ И МОЛЕКУЛЯРНЫМ ПРИЗНАКАМ**

В. Б. Голуб,^{1*} М. Ю. Сыромятников,^{1,2} А. В. Кокина,^{1***}
В. А. Соболева,^{1****} Е. В. Нестерова,^{1*****} В. Н. Попов,^{1,2*****}**

¹ Воронежский государственный университет
Университетская пл., 1, Воронеж, 394018 Россия

*e-mail: v.golub@inbox.ru, **e-mail: syromyatnikov@bio.vsu.ru,
e-mail: nastenka.kokina@mail.ru, *e-mail: soboleva@bio.vsu.ru,
*****e-mail: katya.nesterova.1997@mail.ru, *****e-mail: pvn@bio.vsu.ru

² Воронежский государственный университет инженерных технологий
проспект революции, 19, Воронеж, 394036 Россия

Поступила в редакцию 7.05.2020 г.

После доработки 1.08.2020 г.

Принята к публикации 1.08.2020 г.

В статье представлены усовершенствованная таблица для определения совместно обитающих видов рода *Polymerus* Hahn, 1831 (Heteroptera, Miridae) на основе морфологических признаков и полученных авторами данных о различиях между видами в нуклеотидной последовательности ДНК гена COI. Комплекс этих показателей с учетом хранящихся в GenBank данных обеспечивает возможность достоверной и оперативной идентификации *Polymerus unciniger* Gapon, 2014, *P. unifasciatus* (Fabricius, 1794), *P. cognatus* (Fieber, 1858), *P. vulneratus* (Panzer, 1806), и *P. brevicornis* (Reuter, 1879). Подроды *Poeciloscytus* Fieber, 1858 и *Pachycentrum* Gapon, 2014 характеризуются значительной обособленностью по морфологическим и молекулярно-генетическим признакам. Разработан ПЦР-ПДРФ-метод быстрой идентификации вредного вида *P. vulneratus*. Выявлена высокая внутривидовая изменчивость морфологических признаков *P. unifasciatus* и нуклеотидной последовательности гена COI у форм, депонированных в GenBank как *P. unifasciatus* и *P. microphthalmus* (Wagner, 1951). Выдвинуто предположение о том, что *P. microphthalmus* представляет собой форму *P. unifasciatus* с укороченными надкрыльями и более мелкими глазами по сравнению с полнокрылой формой того же вида, особи которой имеют более крупные глаза.

Ключевые слова: *Polymerus*, виды, вредители, определительная таблица, баркодирование ДНК, ПЦР-ПДРФ анализ, определение.

DOI: 10.31857/S0367144520030120

Род *Polymerus* Hahn, 1831 включает 20 палеарктических видов, относящихся по классификации Д. А. Гапона (Gapon, 2014) к трем под родам – *Polymerus* s. str. (4 вида), *Poeciloscytus* Fieber, 1858 (14 видов) и *Pachycentrum* Gapon, 2014 (3 вида) (Kerzhner, Josifov, 1999; Gapon, 2014). В европейской части России к настоящему времени из

подрода *Polymerus* известны 2 вида: *P. holosericeus* Hahn, 1831 (типовой вид) и *P. rus-satus* Gapon, 2014; из подрода *Poeciloscytus* указаны 6 видов: *P. asperulae* (Fieber, 1861), *P. brevicornis* (Reuter, 1879), *P. cognatus* (Fieber, 1858), *P. palustris* (Reuter, 1907), *P. unifasciatus* (Fabricius, 1794) (типовой вид) и *P. vulneratus* (Panzer, 1806); подрод *Pachycentrum* представлен в европейской части России всеми тремя видами (Gapon, 2014): *P. nigrita* (Fallén, 1807), *P. carpathicus* Horváth, 1882 (типовой вид) и *P. unciniger* Gapon, 2014.

Таксономии палеарктических видов рода *Polymerus* и выяснению различий между близкими видами, включая вредителей агрокультур, посвящено много публикаций (Wagner, 1951, 1961, 1971; Carvalho, Leston, 1952; Кержнер, Ячевский, 1964; Пучков, 1966, 1972; Голуб, 1983; Rinne, 1989; Herczek, 1991; Gapon, 2014, и др.). В статье М. Шварца с соавт. (Schwartz et al., 1991) впервые указаны из Северной Америки *P. cognatus* и *P. vulneratus*, а также уточнены особенности внешнего строения и гени-талий самцов, отличающие их от другого голарктического вида, *P. unifasciatus*, и неко-торых похожих неарктических видов.

Polymerus cognatus и *P. vulneratus* (свекловичные клопы), относятся к числу вреди-телей свеклы и бобовых культур (люцерны, эспарцета, клевера, гороха, фасоли и др.) в Европе, особенно в ее восточной части (Пучков, 1966, 1972; Голуб, 1983). Они оби-тают в природных ландшафтах и агроценозах совместно с другими видами этого рода (Пучков, 1966), что затрудняет их быструю идентификацию и прогнозирование чис-ленности. Перекрывание внутривидовой изменчивости морфологических признаков, обычно использующихся для идентификации палеарктических видов, ограничивает их пригодность для оперативного выявления вредителей. Наиболее надежно опреде-ление с использованием признаков выдутого эдеагуса по методике Д. А. Гапона (Gapon, 2001), но овладение ею требует длительной работы. Личинки ранних возра-стов, особенно видов подрода *Poeciloscytus*, достоверно не различаются, и таблиц для их определения нет, но именно идентификация личинок ранних возрастов необходима для своевременного выявления и прогнозирования численности вредных видов.

Первая попытка создания способа оперативной и точной идентификации вредного вида клопов на основе комплекса морфологических и молекулярных признаков был сделана нами для вредной черепашки *Eurygaster integriceps* Puton, 1881 и других видов этого рода (Syromyatnikov et al., 2017). В настоящей статье представлены резуль-таты попытки использования комплекса морфологических и молекулярных особен-ностей для идентификации 5 видов рода *Polymerus*: 4 из подрода *Poeciloscytus* – *P. (P.) unifasciatus*, *P. (P.) brevicornis*, *P. (P.) vulneratus*, *P. (P.) cognatus* – и *P. (Pa-chycentrum) unciniger*. Кроме того, нами рассмотрена внутривидовая изменчи-вость морфологических признаков и нуклеотидных последовательностей гена COI массового вида *P. unifasciatus*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Материал для морфологических и молекулярных исследований был собран в 20 км СВ г. Во-ронез: Усманский бор, окр. биологического учебно-научного центра Воронежского государ-ственного университета «Веневитиново», 51°49' с. ш., 39°23' в. д.; высота – 97–102 м над ур. м. Всего исследовано 280 экз. Изученный материал хранится в коллекции кафедры экологии и си-стематики беспозвоночных животных Воронежского государственного университета.

Морфологические признаки были исследованы у *P. unifasciatus*, *P. brevicornis*, *P. vulneratus*, *P. cognatus* и *P. unciniger*, встречающихся обычно совместно в природных ландшафтах и в агроценозах (в последних *P. unciniger* чаще отсутствует). Идентификация видов проводилась с помощью определителей (Wagner, 1951, 1957; Кириченко, 1951; Кержнер, Ячевский, 1964; Rinne, 1989; Garon, 2014) и проверена по коллекции Зоологического института РАН (С.-Петербург). Морфологическая терминология принята по определителю И. М. Кержнера и Т. Л. Ячевского (Кержнер, Ячевский, 1964), для структур эдеагуса – по работе Д. А. Гапона (Garon, 2014).

Для проведения сравнительно-морфологического анализа были использованы традиционные методы сбора и хранения энтомологического материала (Голуб и др., 2012). Снимки имаго клопов сделаны камерой Canon методом послойного фотографирования на разной глубине резкости под стереоскопическим микроскопом МБС-10; снимки эдеагусов сделаны под микроскопом с использованием камеры DCM 800; все первичные фотографии скомбинированы с использованием программы CombineZP, находящейся в свободном доступе, и отретушированы в программе Adobe Photoshop CS5. Рисунки параметров сделаны с использованием рисовального аппарата РА-6. Параметры и эдеагус предварительно подвергались обработке в 4%-ном растворе КОН (Кержнер, Ячевский, 1964; Голуб и др., 2012). При проведении морфометрического анализа *P. unifasciatus* были использованы по 20 самцов и самок из указанного выше пункта (20 км СВ Воронежа).

Для баркодинга ДНК были использованы те же виды, что и для проведения морфологического анализа (*P. unifasciatus*, *P. brevicornis*, *P. vulneratus*, *P. unciniger*; рис. 1), кроме *P. cognatus*; численность последнего вида в пунктах отбора проб при проведении исследований оказалась недостаточной для получения достоверных результатов. Собранные насекомые помещались индивидуально в пробирки с 96%-ным этиловым спиртом и этикетировались. До проведения анализов образцы хранились при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ для замедления деградации ДНК.

ДНК выделяли из ног и головы насекомых с помощью набора ZR Tissue & Insect DNA MicroPrep (Zymo Research, США). ДНК из образцов исследованных видов использовали для амплификации гена COI. Фрагменты гена длиной в 455 п. н. амплифицировали с помощью праймеров mHemF1/LepR1 и затем секвенировали. Полимеразную цепную реакцию проводили на Eppendorf MasterCycler Personal Cyclus (Eppendorf, Германия). Реакционная смесь для ПЦР содержала 5 мкл 5X ScreenMix-HS (Евроген, Россия), 1 мкл 10 мкМ прямого праймера, 1 мкл 10 мкМ обратного праймера, 2 мкл ДНК и 16 мкл деионизированной воды. Режим ПЦР включал начальную денатурацию при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 3 мин; 35 циклов: денатурация при $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек, отжиг праймеров при $51\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек, элонгация при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 45 сек; конечная элонгация при $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 мин. При проведении ПЦР использовались следующие праймеры: прямой mHemF1 (5'-GCATTYCCACGAATAAATAAYATAAG) и обратный LepR1 (5'-TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA) (Hebert et al., 2004; Wilson, 2012). Продукты ПЦР разделяли электрофорезом в 2.5%-ном агарозном геле, окрашивали бромидом этидия и визуализировали с помощью трансиллюминатора TCP-20LM. Размер продуктов ПЦР определяли с использованием стандартов длин ДНК (Евроген, Россия).

Продукты ПЦР очищали от агарозного геля с помощью набора Cleanup Standard (Евроген, Россия) и секвенировали с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500 с использованием BigDye Terminator v3.1 Kit. Для секвенирования использовали те же праймеры, что и для баркодинга ДНК – mHemF1 и LepR1. Полученные нуклеотидные последовательности для проверки на отсутствие стоп-кодонов и «пробелов» транслировали в аминокислотные последовательности с помощью EMBOSS Transeq на сайте European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq/).

При проведении ПЦР-ПДРФ-анализа для видовой дифференциации были выбраны эндонуклеазы рестрикции с использованием теоретических диаграмм расщепления ДНК, доступных на сайте научно-производственного объединения «СибЭнзим» (<http://www.sibenzyme.com/products/restrictases>). ПЦР проводили с использованием праймеров LepF1 и mHemR1 (см. выше).

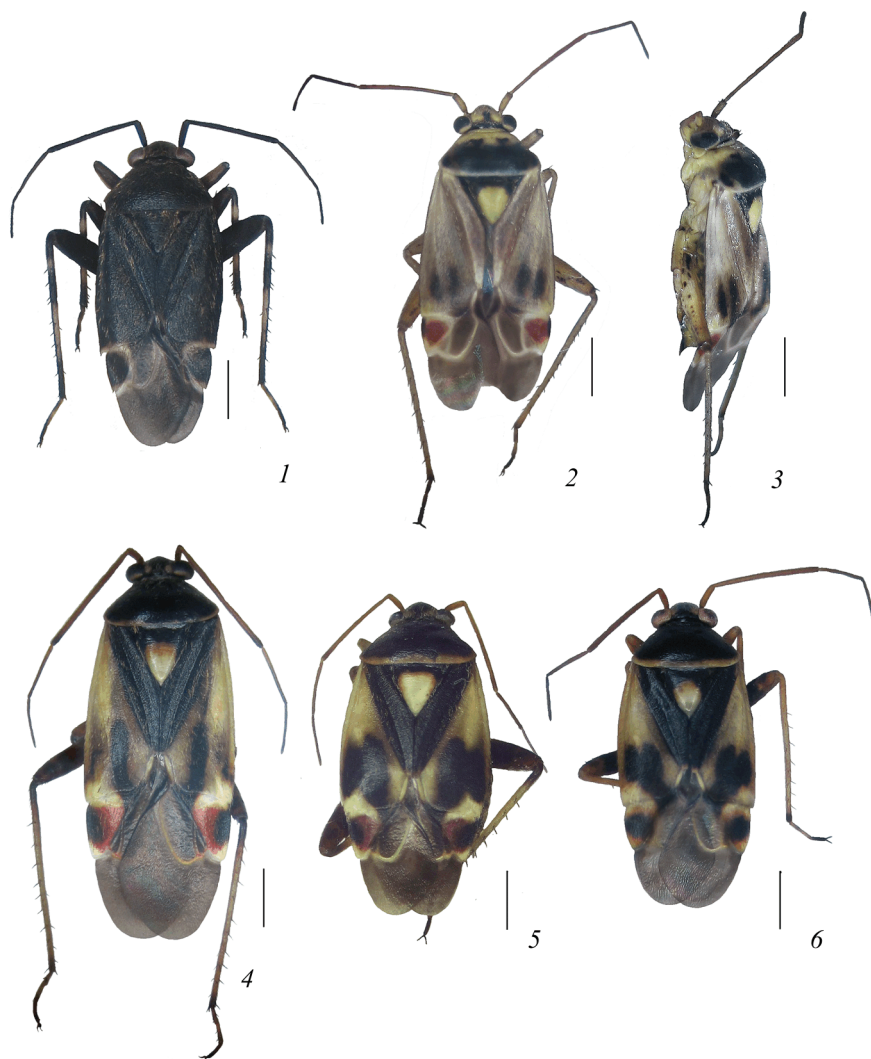


Рис. 1. *Polymerus* Hahn.

1 – *P. unciniger* Gapon, самец; 2, 3 – *P. vulneratus* (Panzer), самец (2 – вид сверху, 3 – вид сбоку); 4, 5 – *P. unifasciatus* (F.) (4 – самец, форма *macroptera*; 5 – самка, форма *submacroptera*); 6 – *P. brevicornis* (Reuter), самец (Россия, 20 км СВ Воронежа, Усманский бор).

Шкала: 1 мм. (Ориг.).

Продукты ПЦР (10 мкл) расщепляли в реакционной смеси, содержащей 1.5 мкл 10X реакционного буфера (СибЭнзим, Россия) и 10 ед. эндонуклеазы рестрикции (СибЭнзим, Россия) в общем объеме 15 мкл (при необходимости объем до нужного значения доводили стерильной водой). Смесь инкубировали в течение 2 ч при температуре +37 °С. Фермент инактивировали при температуре +75 °С в течение 15 мин. После электрофореза продукты рестрикции визуализировали окрашиванием бромидом этидия в 2.5%-ном агарозном геле.

Анализ степени филогенетической близости видов по молекулярным показателям проводился с использованием программного обеспечения MEGA6 (Center for Evolutionary Medicine and Informatics, США). Анализируемые последовательности ДНК были усечены до 412 пар нуклео-

тидов (п. н.). Парные генетические расстояния между образцами были рассчитаны с использованием модели Kimura-2-Parameter (K2P) (Kimura, 1980). Реконструкция генетического дерева была осуществлена с использованием метода ближайших соседей (Saitou, Nei, 1987). Процент дублирующих деревьев, в которых таксоны сгруппированы в «bootstrap» тесте (500 повторов), показаны рядом с ветвями (Felsenstein, 1985). Было проанализировано 27 нуклеотидных последовательностей. Реконструкция генетических деревьев была проведена в программе Molecular Evolutionary Genetics Analysis 6 (MEGA6) (Tamura et al., 2013). В качестве внешней группы был выбран *Stenotus binotatus* (Heteroptera, Miridae).

Эволюционное расхождение между видами было оценено как число нуклеотидных замен на сайт, рассчитанное путем усреднения всех пар последовательностей между анализируемыми группами. Анализ проводился с использованием модели K2P (Saitou, Nei, 1987).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Морфологические особенности имаго *Polymerus (Poeciloscytus)* и *P. (Pachycentrum)*, обитающих совместно в природных ландшафтах и агроэкосистемах восточноевропейской лесостепи, приведены в определительной таблице. Длина члеников усиков, их соотношение и другие пропорции тела, часто используемые для идентификации видов, в ней не используются из-за перекрывания границ их внутривидовой изменчивости; кроме того, у большинства коллекционных экземпляров 3-й и 4-й членики усиков обломаны. Особенности окраски тела и его опушения пригодны для идентификации только полностью окрепших и окрашенных имаго.

ТАБЛИЦА ДЛЯ РАЗЛИЧЕНИЯ *POLYMERUS UNCINIGER*, *P. VULNERATUS*, *P. COGNATUS*, *P. UNIFASCIATUS* И *P. BREVICORNIS*

(по признакам, использованным в работах: Кержнер, Ячевский, 1964; Schwartz et al., 1991; Gapon, 2014, с изменениями)

- 1(2). Переднеспинка, щиток и надкрылья одноцветно-черные, только кунеус часто окаймлен узкой желтой полосой; задний край переднеспинки по бокам иногда также с узкой желтой полосой. Левый (крупный, г-образно изогнутый) парамер с явственно заостренной вершиной (рис. 2, 1). Медиальная спикула везики эдеагуса головчато утолщенная вблизи вершины (рис. 3, 1). 4.6–5.0 мм. Рис. 1, 1 (подрод *Pachycentrum*) **P. unciniger.**
- 2(1). Щиток и надкрылья не одноцветно-черные, а с крупными желтыми и черными пятнами; щиток обычно почти весь желтый, иногда (у *P. vulneratus*) желтый цвет преобладает и в окраске надкрылий. Левый парамер со слегка притупленной вершиной (рис. 2, 2–5). Медиальная спикула везики постепенно утончается к вершине, вблизи нее без головчатого утолщения (рис. 3, 2–5) (Подрод *Poeciloscytus*).
- 3(6). У полностью окрашенных особей с окрепшими после линьки на имаго покровами боковой край надкрылий по всей длине или на большей его части с очень тонкой черной или буровато-черной линией (см. сбоку); у молодых особей темная линия часто заметна только в базальной половине надкрылья. Тело сверху преимущественно в серебристых волосках.
- 4(5). Большая часть верхней стороны тела темная; большая часть надкрылий обычно черная (у молодых, недоокрашенных особей черная окраска может быть слабо развита). Передние углы переднеспинки у полностью окрашенных особей с черным, нередко слабо блестящим пятном. Кунеус нередко с буро-красным и чер-

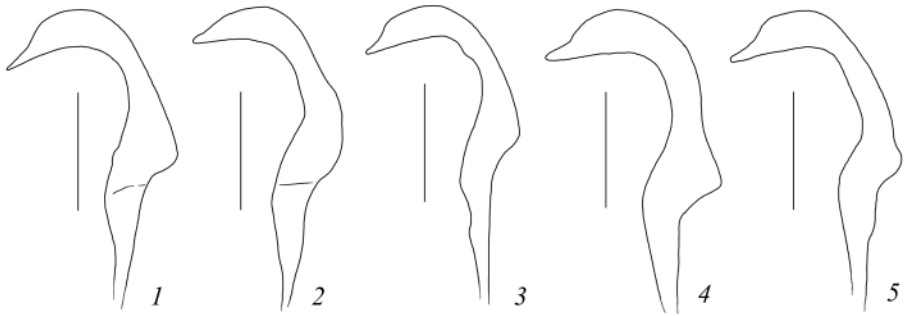


Рис. 2. *Polymerus* Hahn, левый парамер.

1 – *P. unciniger* Gapon, 2 – *P. cognatus* (Fieber), 3 – *P. vulneratus* (Panzer), 4 – *P. unifasciatus* (F.),
5 – *P. brevicornis* (Reuter) (Россия, 20 км СВ Воронежа, Усманский бор).

Шкала: 0.2 мм. (Ориг.).

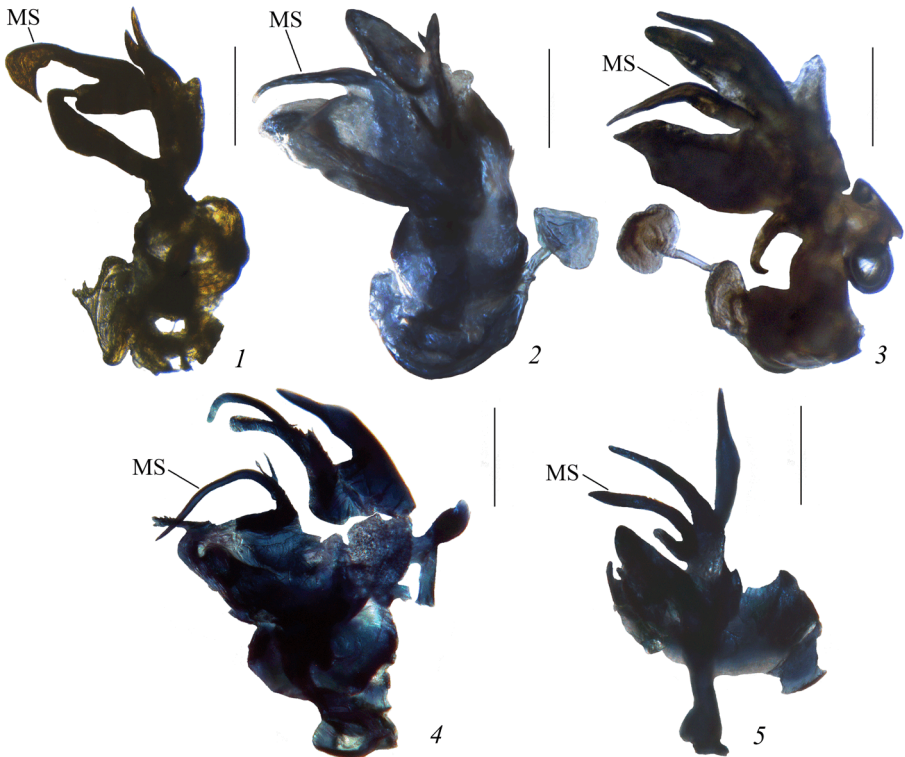


Рис. 3. *Polymerus* Hahn, везика эдеагуса.

1 – *P. unciniger* Gapon, 2 – *P. cognatus* (Fieber), 3 – *P. vulneratus* (Panzer), 4 – *P. unifasciatus* (F.),
5 – *P. brevicornis*. MS – медиальная спикула (Россия, 20 км СВ Воронежа).

Шкала: 0.2 мм. (Ориг.).

ным пятном. Левый парамер и везика – см. рис. 2, 2; 3, 2. 3.8–4.7 мм

..... **P. cognatus.**

5(4). Большая часть верхней стороны тела светлая, желтая или зеленовато-желтая; надкрылья обычно почти целиком светлые, лишь с отдельными черными продольными пятнами. Передние углы переднеспинки без черного пятна. Кунеус с большим красным пятном и обычно с черной полоской по наружному краю. Левый парамер и везика – см. рис. 2, 3; 3, 3. 4.3–4.9 мм. Рис. 1, 2, 3

..... **P. vulneratus.**

6(3). Боковой край надкрылий без черной линии или она есть только в основании надкрылий. Тело сверху преимущественно в желтоватых волосках.

7(8). Кунеус с большим или маленьким (нередко очень узким, в виде полоски) черным пятном, прилегающим к его наружному краю и не достигающим до внутреннего края, и с красным пятном, прилегающим к его внутреннему краю, часто не полностью окружающим черное пятно; иногда кунеус почти полностью черный. Левый парамер и везика эдеагуса – см. рис. 2, 4; 3, 4. 4.3–4.9 мм. Рис. 1, 4, 5

..... **P. unifasciatus.**

8(7). Кунеус с черным пятном, достигающим до его внутреннего края, и с желтым или красноватым окаймлением черного пятна. Левый парамер и везика эдеагуса – см. рис. 2, 5; 3, 5. 4.2–4.8 мм. Рис. 1, 6

..... **P. brevicornis.**

При разработке метода ПЦР-ПДРФ для быстрой идентификации вредного вида *P. vulneratus* установлено, что специфичные для этого вида фрагменты ДНК образуются под действием семи рестриктаз (*AcsI*, *BstF5I*, *FokI*, *PpsI*, *RsaI*, *RsaNI* и *SspMI*). Для дальнейших лабораторных процедур была выбрана рестриктаза *RsaI*, поскольку она имеет сайт рестрикции у всех исследуемых видов, но только у *P. vulneratus* образуется фрагмент размером 131 п. н., который хорошо регистрируется в 2.5%-ном агарозном геле при проведении электрофореза. Электрофореграмма продуктов ПЦР с праймерами *mHemF* и *LepR1*, обработанных рестриктазой *RsaI*, представлена на рис. 4.



Рис. 4. Электрофореграмма продуктов рестрикции *RsaI*.

К – продукт ПЦР до рестрикции, R – после рестрикции.

Таким образом, обработка рестриктазой RsaI продукта ПЦР, полученного с помощью праймеров mHemF1/LepR1, обеспечивает достоверную идентификацию *P. vulneratus*.

Нуклеотидные последовательности, полученные нами секвенированием гена COI у исследованных видов, были зарегистрированы в системе GenBank под следующими номерами: *P. unciniger* – MH752746–MH752750; *P. vulneratus* – MH607428, MH607436; *P. unifasciatus* – MH607420–MH607427, MH607440, MH607441; *P. brevicornis* – MH607415–MH607419. Баркодирование ДНК *P. brevicornis* и *P. unciniger* был выполнен впервые.

Генетические расстояния между изученными видами *Polymerus* на основе полученных нами данных о последовательности генов COI (VSU («Voronezh State University»); пункт отбора проб: Россия, 20 км СВ Воронежа) и с использованием данных в системе NCBI GenBank представлены соответственно на рис. 5 и 6.

Результаты секвенирования гена COI показали значительную дистанционность кластера, включающего два вида подрода *Pachycentrum* (*P. (P.) nigrita* и *P. (P.) unciniger*), от всех видов подрода *Poeciloscytus* (рис. 5, 6). Морфологические различия между двумя подродами по окраске тела и признакам гениталий (Gapon, 2014; см. таблицу для определения видов и рис. 1, 1–5; 2, 1–5) также более значительны, чем различия между видами подрода *Poeciloscytus*. Таким образом, комплекс морфологических и молекулярных различий обеспечивает возможность точной идентификации двух подродов и, соответственно, видов подрода *Pachycentrum* на стадиях имаго и личинок.

Морфологические различия между видами подрода *Poeciloscytus* не всегда обеспечивают точную идентификацию видов. На основе материала из восточноевропейской лесостепи (Воронежская обл.) и с других территорий России и сопредельных стран (материал ЗИН) установлено, что наличие тонкой темной линии на боковом крае надкрылий *P. vulneratus* и *P. cognatus* проявляется только у полностью окрепших и окрашенных особей. У недавно линявших на имаго особей темная линия обычно слабо выражена и присутствует только в базальной части надкрылий. Напротив, боковой край надкрылий у особей *P. unifasciatus* в базальной половине часто с темной линией, как у *P. cognatus* и *P. vulneratus*. Сравнительный анализ особенностей везики позволяет констатировать, что ее медиальные спикеры у *P. cognatus*, *P. vulneratus* и *P. brevicornis* (рис. 3, 2, 5), различаются почти исключительно степенью изогнутости. Однако результаты секвенирования гена COI показали отчетливость кластера *P. vulneratus* и *P. cognatus* (рис. 5, 6): его генетическая дистанционность от других изученных нами видов *Polymerus* составила не менее 0.123, что обеспечивает надежную идентификацию этой пары видов среди встречающихся совместно с ними.

Медиальная спикера *P. unifasciatus* длиннее, чем у других изученных видов подрода *Poeciloscytus* (рис. 3, 4), форма ее слабо изменчива. По результатам секвенирования гена COI этот вид, с учетом внутривидовой вариабельности, примерно равноудален от других видов рода (рис. 5, 6). Таким образом, комплекс признаков *P. unifasciatus*, включающих особенности строения эдеагуса и сиквенса гена COI, также обеспечивает его надежную идентификацию.

Некоторые нуклеотидные последовательности, полученные нами (MH607429, MH607437, MH607438, MH607439, MH607442), соответствуют таковым *P. microphthalmus* (Wagner, 1951), зарегистрированным прежде в базе данных GenBank. Одна-

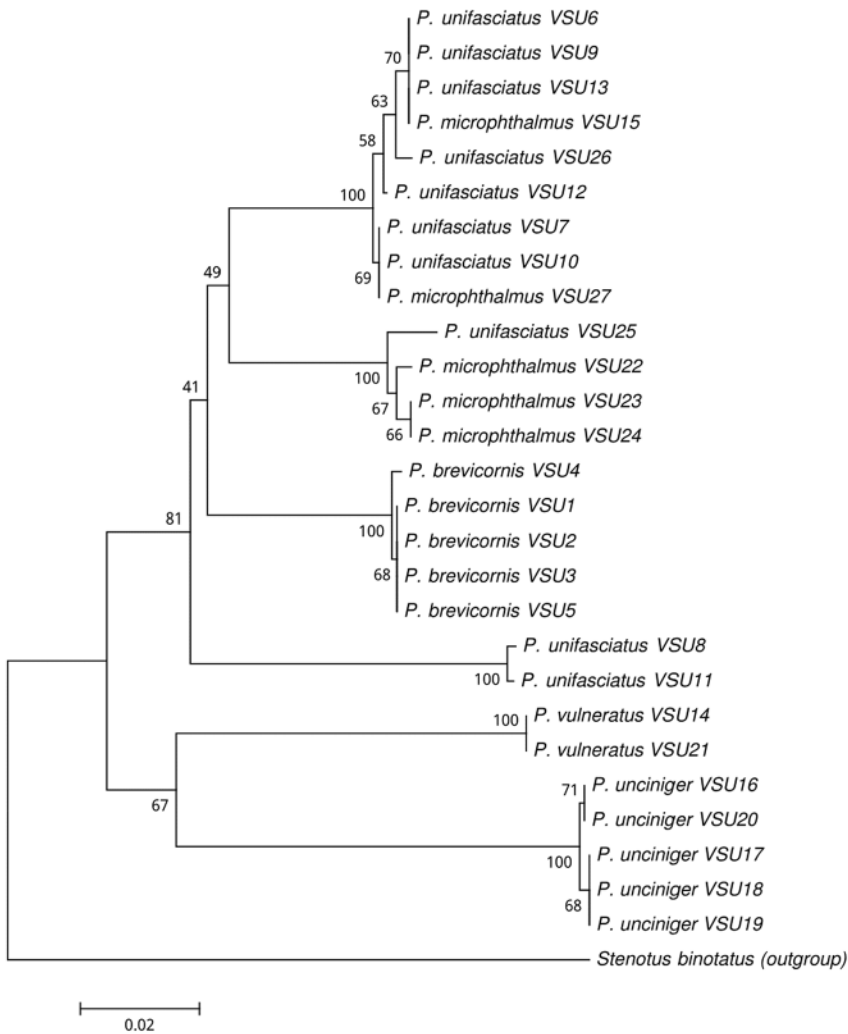


Рис. 5. Кладограмма нуклеотидных последовательностей гена COI видов рода *Polymerus* Hahn, полученных авторами.

ко различия между нуклеотидными последовательностями гена COI *P. unifasciatus* и *P. microphthalmus* настолько малы, что эти таксоны не могут быть достоверно дифференцированы классическим методом баркодинга ДНК (см. рис. 5, 6). Очень высокая вариабельность нуклеотидных последовательностей гена COI у *P. unifasciatus* (0.0519) и *P. microphthalmus* (0.0341) (рис. 5, 6) не позволяет различить их по этому признаку. При этом нуклеотидная вариабельность *P. unciniger* не превышала 0.001, а у *P. brevicornis* и *P. vulneratus* она вообще отсутствовала (рис. 5, 6).

В связи с тем, что *P. microphthalmus* прежде не указывался из европейской части России, мы провели морфометрический анализ внутривидовой изменчивости признаков *P. unifasciatus*, которые наиболее часто использовались ранее для дифференциации его от *P. microphthalmus* (табл. 1).

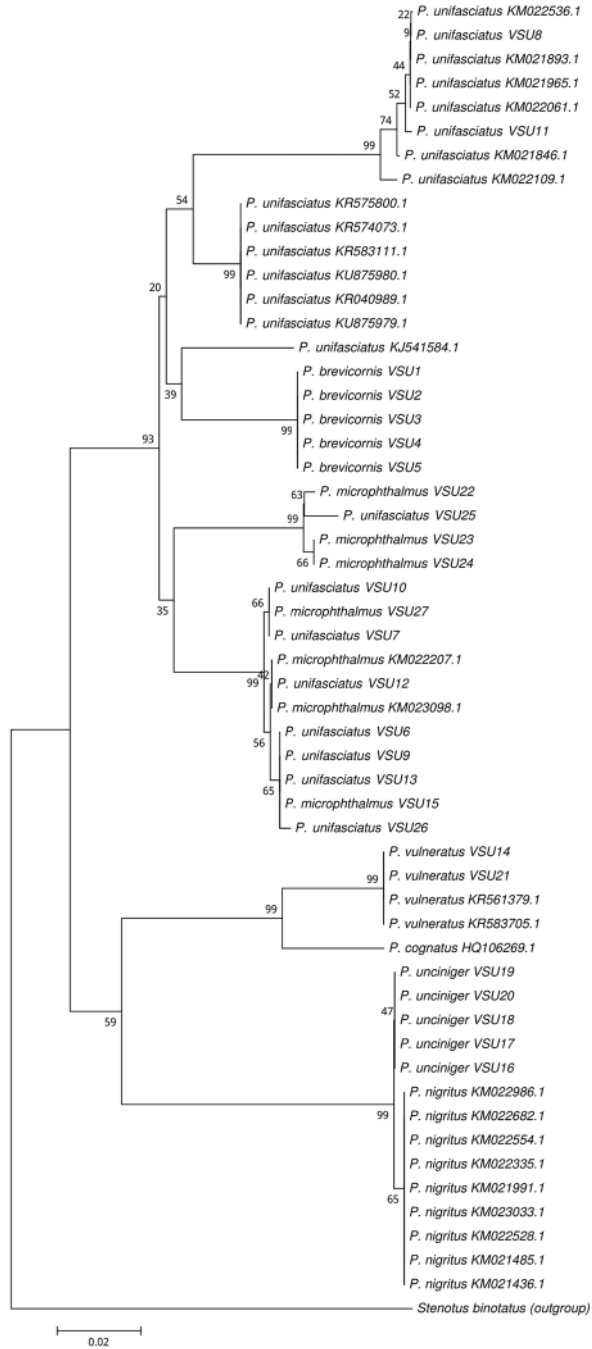


Рис. 6. Кладограмма нуклеотидных последовательностей гена COI видов рода *Polymerus* Hahn, полученных авторами и депонированных в системе NCBI GenBank.

Таблица 1. Морфометрические показатели *Polymerus unifasciatus* (F.) (20 км СВ Воронежа, Усманский бор, 2016–2018 гг.)

Пол, форма	Число изученных экземпляров	Длина тела, мм	Ширина темени, мм	Ширина глаза, мм	Отношение ширины темени к ширине глаза	Отношение ширины головы к ее высоте
Самцы, <i>f. macroptera</i>	21	<u>5.50–7.60</u> 5.9 ± 0.123	<u>0.40–0.50</u> 0.43 ± 0.006	<u>0.26–0.35</u> 0.30 ± 0.005	<u>1.14–1.93</u> 1.43 ± 0.046	<u>1.05–1.30</u> 1.17 ± 0.015
Самки, <i>f. submacroptera</i>	20	<u>4.50–6.10</u> 5.23 ± 0.096	<u>0.47–0.57</u> 0.51 ± 0.006	<u>0.25–0.33</u> 0.28 ± 0.005	<u>1.58–2.12</u> 1.86 ± 0.032	<u>1.10–1.28</u> 1.22 ± 0.011

Примечание. Над чертой – минимальное и максимальное значения признака, под чертой – среднее значение и ошибка.

Кроме того, изучено отношение длин III и IV члеников усиков у особей с полностью сохранившимися усиками (8 самцов и 8 самок), которое составило у самцов 0.96–1.0, у самок – 0.9–1.0.

Установлено, что значения всех включенных в табл. 1 показателей полнокрылых самцов (*forma macroptera*) полностью соответствуют таковым *P. unifasciatus*, приведенным Э. Вагнером при описании *P. microphthalmus* и в более поздних публикациях (Wagner, 1951, 1961, 1971), а также дополненным последующими авторами (Rinne, 1989; Herczek, 1991). В отличие от самцов, у исследованных самок перепонка надкрылий слегка или заметно укорочена (*forma submacroptera*). При этом теменная часть головы у них шире, а глаза меньше, чем у самцов (табл. 1), что соответствует описанным Э. Вагнером признакам *P. microphthalmus* (Wagner, 1951, 1961, 1971). Особенности параметров и спикул эдеагуса (включая медиальную), которые указывали бы на присутствие в изученной выборке двух видов, не выявлены.

Полученные данные об изменчивости морфологических и молекулярно-генетических показателей свидетельствуют о том, что мы, вероятнее всего, имеем дело с одним видом, *P. unifasciatus*, с довольно широкой изменчивостью размеров тела и пропорций его частей. Эти различия усиливаются половым диморфизмом с проявлением у самок укороченности надкрылий и, несомненно, коррелирующими с ней меньшими размерами глаз и, соответственно, большей шириной темени. Высокая морфологическая изменчивость (табл. 1) и половой диморфизм *P. unifasciatus*, очевидно, обусловлены значительной генотипической изменчивостью, затрагивающей и ген COI (рис. 5, 6). Окончательно вопрос о самостоятельности *P. microphthalmus* может быть решен на основании результатов изучения его межпопуляционных различий и детального изучения эдеагуса в его различных проекциях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Совместно обитающие в природных ландшафтах и агроценозах восточноевропейской лесостепи *Polymerus unifasciatus*, *P. cognatus*, *P. vulneratus*, *P. brevicornis* и *P. unciniger* могут достоверно идентифицироваться по разработанному нами комплексу особенностей внешнего строения, гениталий и результатам баркодинга ДНК.

2. Почти полностью черная окраска тела (см. рис. 1, 1), острая вершина левого парамера (рис. 2, 1) и головчато утолщенная близ вершины медиальная спикула везики (рис. 3, 1) *P. (Pachycentrum) unciniger* в сочетании с обособленностью кластера подрода *Pachycentrum* в кладограмме сиквенсов гена COI изученных таксонов (рис. 6) обеспечивают возможность точной идентификации двух подродов *Polymerus*.

3. Разработанный нами ПЦР-ПДРФ-метод быстрой и надежной идентификации вредителя сельскохозяйственных культур *P. vulneratus* заключается в разрезании амплифицированных фрагментов ДНК эндонуклеазой RsaI, в результате чего формируется уникальная картина рестрикции (см. рис. 4).

4. *Polymerus (Poeciloscytus) unifasciatus* характеризуется наиболее длинной медиальной спикулой везики среди изученных видов этого подрода (рис. 3, 4), что в сочетании с данными баркодинга ДНК (рис. 5, 6) позволяет достоверно определять этот массовый вид.

5. Внутрипопуляционная изменчивость признаков строения головы *P. unifasciatus* связана с проявлением полового диморфизма, при котором у особей (чаще – самок) с укороченными надкрыльями глаза немного меньше, а ширина темени, соответственно, больше, чем у полнокрылых особей, обычно самцов. Высокая внутрипопуляционная изменчивость внешних морфологических признаков *P. unifasciatus* сопутствует очень высокой изменчивости нуклеотидной последовательности гена COI у форм, представленных в базе данных GenBank под названиями *P. unifasciatus* и *P. microphthalmus*. Не исключено поэтому существование всего одного вида, *P. unifasciatus*, крайние проявления генетической и морфологической изменчивости которого относятся авторами к разным видам – *P. unifasciatus* и *P. microphthalmus*.

6. Впервые выполненный баркодинг ДНК *P. brevicornis* и *P. unciniger* расширяет представления о межвидовых различиях в нуклеотидной последовательности гена COI в роде *Polymerus*. Полученные авторами данные о нуклеотидных последовательностях COI всех исследованных видов *Polymerus* зарегистрированы в базе данных GenBank.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00464-а) и гранта президента для ведущих научных школ (соглашение НШ-2535.2020.11).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голуб В. Б. 1983. Отряд Полужесткокрылые, или Клопы, – Hemiptera. В кн.: Л. М. Копанева (составитель). Определитель вредных и полезных насекомых и клещей однолетних и многолетних трав и зернобобовых культур в СССР. Л.: Колос, Ленинградское отделение, с. 73–84.
- Голуб В. Б., Цуриков М. Н., Прокин А. А. 2012. Коллекции насекомых: сбор, обработка и хранение материала. М.: Товарищество научных изданий КМК, 334 с.
- Кержнер И. М., Ячевский Т. Л. 1964. Отряд Hemiptera (Heteroptera) – полужесткокрылые, или клопы. В кн.: Г. Я. Бей-Биенко (ред.). Определитель насекомых европейской части СССР в 5 томах. Т. 1. М.; Л.: Наука, с. 655–845.
- Кириченко А. Н. 1951. Настоящие полужесткокрылые европейской части СССР (Hemiptera). Определитель и библиография. М.; Л.: Издательство АН СССР, 423 с.

- Пучков В. Г. 1966. Главнейшие клопы-слепняки – вредители сельскохозяйственных культур. Киев: Наукова думка, 172 с.
- Пучков В. Г. 1972. Отряд Hemiptera (Heteroptera) – полужесткокрылые. В кн.: О. Л. Крыжановский, Е. М. Данциг (ред.). Насекомые и клещи – вредители сельскохозяйственных культур. Т. 3. Л.: Наука, с. 222–262.
- Carvalho J. C. M., Leston D. 1952. The classification of the British Miridae (Hem.), with keys to the genera. *Entomologist's Monthly Magazine* **88**: 231–251.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39** (4): 783–791.
- Gapon D. A. 2001. Inflation of heteropteran aedeagi using microcapillaries (Heteroptera: Pentatomidae). *Zoosystematica Rossica* **9** (1): 157–160.
- Gapon D. A. 2014. Revision of the genus *Polymerus* (Heteroptera: Miridae) in the Eastern Hemisphere. Part 1: Subgenera *Polymerus*, *Pachycentrum* subgen. nov. and new genus *Dichelocentrum* gen. nov. *Zootaxa* **3787** (1): 1–87.
- Hebert P. D., Penton E. H., Burns J. M., Janzen D. H., Hallwachs W. 2004. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic diversity in the Neotropical skipper butterfly *Astraptus fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101** (41): 14812–14817.
- Herczek A. 1991. Notes on three species of *Polymerus* Westwood (Heteroptera, Miridae). *Polskie Pismo Entomologiczne* **61**: 23–29.
- Kerzhner I. M., Josifov M. 1999. Family Miridae Hahn, 1833. In: B. Aukema, Ch. Rieger (eds). *Catalogue of the Heteroptera of the Palaearctic Region. Vol. 3. Cimicomorpha II. Amsterdam, The Netherlands: The Netherlands Entomological Society, 577 p.*
- Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111–120.
- Rinne V. 1989. Review of the European *Polymerus* subgenus *Poeciloscytus* (Heteroptera, Miridae), with two new species and special reference to the Finnish fauna. *Annales Entomologici Fennici* **55**: 89–101.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.
- Schwartz M. D., Scudder G. E., Henry T. J. 1991. The first Nearctic records of two Holarctic species of *Polymerus* Hahn, with remarks on a monophyletic species-group (Heteroptera: Miridae: Mirinae). *Canadian Entomologist* **123** (4): 721–743.
- Syromyatnikov M. Y., Golub V. B., Kokina A. V., Soboleva V. A., Popov N. V. 2017. DNA barcoding and morphological analysis for rapid identification of most economically important crop-infesting Sunn pests belonging to *Eurygaster* Laporte, 1833 (Hemiptera, Scutelleridae). *ZooKeys* **706**: 51–71.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipowski A., Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30** (12): 2725–2729.
- Wagner E. 1951. On the genus *Poeciloscytus* Fieb. (Hem. Het., Miridae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* **26** (351): 1–8.
- Wagner E. 1961. Unterordnung: Ungleichflügler, Wanzen, Heteroptera (Hemiptera). In: *Die Tierwelt Mitteleuropas, Vol. 4, p. 1–173.*
- Wagner E. 1971. Die Miridae Hahn, 1831, des Mittelmeerraumes und der Makaronesischen Inseln (Hemiptera, Heteroptera). Teil 1. *Entomologische Abhandlungen Staatliches Museum für Tierkunde Dresden* **37**, suppl., 484 p.
- Wilson J. J. 2012. DNA barcodes for insects. In: W. J. Kress, D. L. Erickson (eds). *Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol. 858. Totowa, NJ: Humana Press, p. 17–46.

DIAGNOSTICS OF A GENUS *POLYMERUS* HAHN (HETEROPTERA, MIRIDAE)
SPECIES GROUP INCLUDING AGRICULTURAL PESTS IN THE EAST
EUROPEAN FOREST-STEPPE, BASED ON THE MORPHOLOGICAL
AND MOLECULAR CHARACTERS

V. B. Golub, M. Yu. Syromyatnikov, A. V. Kokina, V. A. Soboleva,
E. V. Nesterova, V. N. Popov

Key words: *Polymerus*, species, pests, key, DNA barcoding, PCR-RFLP method, identification.

SUMMARY

The paper presents an improved key to the co-occurring species of *Polymerus* Hahn, 1831 (Heteroptera, Miridae) based on morphological characters and authors' data on the differences in the DNA sequences between the COI gene of the same species. The complex of these characters, together with the data stored in the NCBI GenBank, enables accurate and rapid identification of imagoes and larvae of *Polymerus unciniger* Gapon, 2014, *P. unifasciatus* (Fabricius, 1794), *P. cognatus* (Fieber, 1858), *P. vulneratus* (Panzer, 1806) and *P. brevicornis* (Reuter, 1879). Correspondence of the differences between the subgenera *Poeciloscytus* Fieber, 1858 and *Pachycentrum* Gapon, 2014 in the morphological and molecular genetic characteristics was established. A PCR-RFLP method for rapid identification of the pests, *P. vulneratus* and *P. cognatus*, was developed. High intrapopulation variability of morphological characters of *P. unifasciatus* and the DNA sequences of the COI gene in the forms registered in GenBank as *P. unifasciatus* and *P. microphthalmus* (Wagner, 1951) was revealed. It has been suggested that *P. microphthalmus* is a submacropterous form of *P. unifasciatus* with shortened hemelytra and smaller eyes, in comparison with the macropterous form of the same species, whose individuals have larger eyes.