

**Две формы *Melitaea trivia* ([Denis et Schiffermüller], 1775)
(Lepidoptera: Nymphalidae) с территории
Волгоградской области России: систематическое положение
на основе молекулярно-генетических исследований**

**Two forms of *Melitaea trivia* ([Denis et Schiffermüller], 1775)
(Lepidoptera: Nymphalidae) from Volgograd Region (Russia):
the systematic position on the basis of molecular genetic studies**

**Г.В. Кузнецов¹, Б.В. Страдомский², Е.С. Фомина²
G.V. Kuznetsov¹, B.V. Stradomsky², E.S. Fomina²**

¹Ул. Борьбы, 4–24, Волгоград 400006 Россия

²Институт аридных зон ЮНЦ РАН, пр. Чехова, 41, Ростов-на-Дону 344006 Россия

¹Bor'by str., 4–24, Volgograd 400006 Russia. E-mail: gen-mash@mail.ru

²Institute of Arid Zones SSC RAS, Chekhov str., 41, Rostov-on-Don 344006 Russia. E-mail: bvstr@yandex.ru

Ключевые слова: Lepidoptera, Nymphalidae, *Melitaea robertsi uvarovi*, *trivia*, COI и EF-1a последовательности ДНК, Волгоградская область, Россия.

Key words: Lepidoptera, Nymphalidae, *Melitaea robertsi uvarovi*, *trivia*, COI and EF-1a DNA sequences, Volgograd Region, Russia.

Резюме. Исследование молекулярно-генетических маркеров (COI и EF-1a) свидетельствует о том, что таксон *Melitaea robertsi uvarovi* Gorbunov, 1995 с территории Волгоградской области можно рассматривать только как форму *Melitaea trivia* ([Denis et Schiffermüller], 1775).

Abstract. The study of molecular genetic markers (COI and EF-1a) reveals that the taxon *Melitaea robertsi uvarovi* Gorbunov, 1995 from Volgograd Region (Russia) can be considered only as a form of *Melitaea trivia* ([Denis et Schiffermüller], 1775).

Из Сарепты (в настоящее время район Волгограда) были описаны два вида шашечниц: «*Papilio fascelis*» и «*Papilio phoebe*» [Esper, 1781–1783]. Эспер указывает, что «*P. fascelis*» – крупная и темная бабочка, а «*P. phoebe*» – самая мелкая из известных ему шашечниц, и летает она раньше других шашечниц. В работах другого исследователя Сарепты Беккера мы также находим две «вариации» из этой группы: «*Melitaea trivia*» (= «*P. phoebe* (Esper, [1783])») и «*Melitaea trivia* var. *fascelis*». Обращает на себя внимание тот факт, что «*Melitaea trivia*» летает на 2 недели раньше «*Melitaea trivia* var. *fascelis*» [Becker, 1855]. Таксон «*P. phoebe* (Esper, [1783])» был забыт, а «*fascelis*» в настоящее время считается южным подвидом *Melitaea trivia* ([Denis et Schiffermüller], 1775) [Львовский, Моргун, 2007]. Современные исследования на территории Волгоградской области также выявили наличие двух групп популяций с четкими и устойчивыми различиями имago и преимагинальных стадий. Также отмечалась значительная экологическая и фенологическая изоляция этих популяций [Кузнецов, 2009, 2011, 2012]. В связи с этим на тот момент не возникало сомнений, что мы имеем дело с двумя «хорошими» видами, и по некоторым признакам (кормовое растение, биотоп, сроки лёта) второй вид из этой группы, хотя

и с оговорками, чтобы не увеличивать количество синонимов, был отнесен к *Melitaea robertsi uvarovi* Gorbunov, 1995. Но было и немаловажное различие между волгоградскими и южноуральскими «*uvarovi*»: у волгоградских развивается одно поколение, а у южноуральских – два [Gorbunov, Kosterin, 2007; Кузнецов, 2011]. Таксон *M. uvarovi* был описан в 1995 году [Коршунов, Горбунов, 1995], но в 2007 году был переподчинен в качестве подвида афганскому *Melitaea robertsi* Butler, 1880 [Gorbunov, Kosterin, 2007]. Однако о статусе этого таксона не было единого мнения: подчеркивалась недоказанность статуса *uvarovi* Gorbunov, 1995 [Корб, Большаков, 2011] или выражались сомнения в правильности комбинации *M. robertsi uvarovi* [Кузнецов, 2012]. Некоторые авторы считали видовой статус *M. robertsi uvarovi* необоснованным [Львовский, Моргун, 2007]. Для выяснения статуса этих двух групп популяций с территории Волгоградской области нами были проведены молекулярно-генетические исследования.

Материал и методы

Исследованные экземпляры хранятся в музее Института аридных зон Южного научного центра Российской академии наук (Ростов-на-Дону). Экземплярам присвоены идентификационные музейные номера.

Материал. 1♀, Россия, Волгоградская обл., Городищенский р-н, пос. Царицино, ex ovo 8.06.2013, ex pupa 3.07.2013 (Г.В. Кузнецов), музейный номер ILN01, accession №№ GenBank KJ638698 (COI), KJ638707 (EF-1a); 1♀, Россия, Волгоградская обл., Дубовский р-н, Дубовка, ex ovo 20.05.2011, ex pupa 9.06.2011 (Г.В. Кузнецов), музейный номер ILN02, accession №№ GenBank KJ638699 (COI), KJ638708 (EF-1a).

Суммарная геномная ДНК выделялась из исследуемых экземпляров с использованием стандартного фенол-хлороформного метода органической экстракции в соответствующей

модификации [Маниатис и др., 1984].

Участки гена цитохромоксидазы I (COI) митохондриальной ДНК и ядерного гена elongation factor 1 alpha (Ef-1a) амплифицировали с использованием метода полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для получения ПЦР-продуктов COI использовали следующие праймеры: прямой (5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G -3') и обратный (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA -3'); для Ef-1a – прямой праймер (5'-TAC CAT CGA GAA GTT CGA GAA G 3') и обратный праймер (5'-GCC ACC CCT TGA ACC AGG GCA T -3').

Амплификацию проводили с помощью термоциклера Mastercycler[®] gradient («Eppendorf») с использованием следующей программы:

94 °C – 4 мин;
94 °C – 40 сек;
56 °C – 40 сек, 36 циклов;
72 °C – 40 сек;
4 °C – Hold.

Для подтверждения чистоты получения ПЦР-продуктов их разделяли методом гель-электрофореза в 2%-й агарозе в присутствии бромида этидия.

Секвенирование амплифицированных фрагментов проводили с использованием флуоресцентно меченных ddNTP («DNA Sequencing Kit, BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction», Applied Biosystems, USA). Разделение амплифицированных фрагментов проводили с помощью автоматического секвенатора ABI 3500 (Applied Biosystems). Анализ первичных нуклеотидных последовательностей проводили с использованием прикладной программы BioEdit Sequence Alignment Editor [Hall, 1999].

Результаты и обсуждение

Наши исследования показали, что Ef-1a нуклеотидные последовательности исследованных экземпляров, один из которых был идентифицирован как *M. trivialis* (музейный номер ILN01), а другой как «*M. robertsi uvarovi*» (музейный номер ILN02), идентичны между собой. COI-последовательности митохондриальной ДНК имели различия около 1.4%, что попадает в рамки внутривидовой изменчивости. Таким образом, принимая во внимание результаты этих исследований, необходимо признать, что таксон *M. robertsi uvarovi* с территории Волгоградской области не следует рассматривать в качестве самостоятельного вида. Кроме того, следует отметить, что обсуждаемые два таксона на территории области обитают симпатрично, поэтому в рамках современных представлений не приходится говорить о двух подвидах. Для того чтобы подчеркнуть экологические и фенологические отличия, мы указываем, что на территории Волгоградской области обитают две формы вида *M. trivialis* ([Denis et Schiffermüller], 1775): *Melitaea trivialis f. fascialis* (Esper, [1783]) (**stat. n.**, non subsp.) и *Melitaea trivialis f. xerophila* (nov.; = *P. phoebe* (Esper, [1783]; *robertsi uvarovi* auct., nec Gorbunov, 1995). (По причине того, что существует вид *Melitaea phoebe* ([Denis et Schiffermüller], 1775), мы не можем использовать «*P. phoebe* (Esper, [1783])», а различия в биологии не дают нам основания использовать «*uvarovi*».)

Форма *fascialis* (размах крыльев самцов первого поколения 35–37 мм, самок – 40–42 мм, испод крыльев желтый) населяет поляны и опушки пойменных, байрачных и нагорных лесов, закустаренные балки. Кормовое растение – коровяк восточный *Verbascum orientale* Vieb. За год развиваются два поколения. Первое поколение летает с конца мая (23.05) до середины июля (11.07). Второе поколение немногочисленное, летает с конца июля (31.07) до конца августа (21.08).

Форма *xerophila* (размах крыльев самцов 31–33 мм, самок – 37–39 мм, испод крыльев беловатый, рисунок верхней поверхности крыльев светлее и тоньше) населяет склоны балок в целинной степи. Кормовое растение – коровяк фиолетовый *Verbascum phoeniceum* L. За год развивается одно поколение. Лёт наблюдается с начала мая (9.05) до начала июня (6.06). Однако указанные сроки лёта характерны для всего многолетнего периода наблюдения и для разных популяций. В конкретных случаях лёт продолжается не более двух недель. За все время наблюдений не было отмечено перекрытия сроков лёта этих двух форм. Лабораторные исследования показывают, что форма *xerophila* может давать два поколения, но из-за особенностей фенологии кормового растения эта возможность не реализуется [Кузнецов, 2011].

Следует отметить, что форма не регулируется Международным кодексом зоологической номенклатуры [2000], и формально мы должны установить следующую синонимию: *Melitaea trivialis* = *fascialis* syn. n. = *xerophila* syn. n., но в данном случае на основании всего вышеизложенного такой подход, на наш взгляд, был бы ошибочным и неоправданно упрощал бы ситуацию. *Melitaea trivialis* как вид характеризуется весьма высоким уровнем вариабельности по COI-гену. В то же время внутри популяций обсуждаемая нуклеотидная последовательность весьма стабильна. Отмеченный уровень различий в 1.4% может свидетельствовать в пользу весьма давней и устойчивой изоляции между популяциями *M. trivialis f. fascialis* и *M. trivialis f. xerophila*.

Литература

- Корб С.К., Большаков А.В. 2011. Каталог булавоусых чешуекрылых (Lepidoptera: Papilioniformes) бывшего СССР. Издание второе, переработанное и дополненное. *Эверсманния*. Отд. вып. 2: 1–124.
- Коршунов Ю., Горбунов П. 1995. Дневные бабочки азиатской части России. Екатеринбург: Изд-во Уральского госуниверситета. 202 с.
- Кузнецов Г.В. 2009. Материалы к изучению фауны надсемейства Papilionoidea (Lepidoptera) Волгоградской области. *Кавказский энтомологический бюллетень*. 5(2): 257–267.
- Кузнецов Г.В. 2011. Некоторые данные по биологии *Melitaea telona* Fruhstorfer, 1908 и *Melitaea robertsi uvarovi* Gorbunov, 1995 (Lepidoptera: Nymphalidae) в Волгоградской области. *Кавказский энтомологический бюллетень*. 7(1): 83–84.
- Кузнецов Г.В. 2012. Papilionoidea (Lepidoptera) Волгоградской области. *Кавказский энтомологический бюллетень*. 8(1): 127–140.
- Львовский А.Л., Моргун Д.В. 2007. Булавоусые чешуекрылые Восточной Европы. М.: Товарищество научных изданий КМК. 443 с.
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. 1984. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с.
- Международный кодекс зоологической номенклатуры. 2000. СПб. 222 с.
- Becker A. 1855. Einige naturhistorische Mitteilungen von dem Jahre 1854. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou*. 28: 460–481.
- Esper E. 1781–1783. Der Europäischen Schmetterlinge. Leipzig: Weigel. 190 p.
- Gorbunov P., Kosterin O. 2007. The Butterflies (Hesperioidea and Papilionoidea) of North Asia (Asian part of Russia) in Nature. Vol. 2. Moscow: Rodina, Fodio and Aidis Production House. 408 p.
- 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.

References

- Becker A. 1855. Einige naturhistorische Mittheilungen von dem Jahre 1854. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou*. 28: 460–481.
- Esper E. 1781–1783. *Der Europaeischen Schmetterlinge*. Leipzig: Weigel. 190 p.
- Gorbunov P., Kosterin O. 2007. The Butterflies (Hesperioidea and Papilionoidea) of North Asia (Asian part of Russia) in Nature. Vol. 2. Moscow: Rodina & Fodio and Aidis Production House. 408 p.
- 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.
- Korb S.K., Bolshakov L.V. 2011. A catalogue of butterflies (Lepidoptera: Papilioniformes) of the former USSR. Second edition, reformatted and updated. *Eversmannia*. Supplement Number 2: 1–124 (in Russian).
- Korshunov Yu.P., Gorbunov P.Yu. 1995. *Dnevnye babochki aziatskoy chasti Rossii* [Butterflies of the Asian part of Russia]. Ekaterinburg: Ekaterinburg State University Publ. 202 p. (in Russian).
- Kuznetsov G.V. 2009. Materials to study of Papilionoidea butterflies (Lepidoptera) from Volgograd region. *Caucasian Entomological Bulletin*. 5(2): 257–267 (in Russian).
- Kuznetsov G.V. 2011. Some data about biology *Melitaea telona* Fruhstorfer, 1908 and *Melitaea robertsi uvarovi* Gorbunov, 1995 (Lepidoptera: Nymphalidae) on Volgograd region. *Caucasian Entomological Bulletin*. 7(1): 83–84 (in Russian).
- Kuznetsov G.V. 2012. Papilionoidea butterflies (Lepidoptera) from Volgograd region. *Caucasian Entomological Bulletin*. 8(1): 127–140 (in Russian).
- Lvovsky A.L., Morgun D.V. 2007. *The Butterflies of Eastern Europe*. Moscow: KMK Scientific Press Ltd. 443 p. (in Russian).
- Maniatis T., Fritch E., Sembruk J. 1984. *Metody gennoy inzhenerii. Molekulyarnoye klonirovaniye* [Methods of genetic engineering. Molecular cloning]. Moscow: Mir. 480 p. (in Russian).