

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Коваленко Маргарита Григорьевна

**Систематика и видовая диагностика шашечниц подрода *Mellicta*
Billberg, 1820 рода *Melitaea* Fabricius, 1807 (Lepidoptera,
Nymphalidae) на основе морфологических и молекулярно-
генетических методов**

Специальность 1.5.14 – энтомология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена на кафедре энтомологии биологического факультета
МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель:

Колесниченко Кирилл Анатольевич
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Аникин Василий Викторович
доктор биологических наук, профессор
ФГБОУ ВО Саратовский национальный
исследовательский государственный университет
имени Н.Г. Чернышевского, биологический
факультет, кафедра морфологии и экологии
животных, заведующий кафедрой

Горбунов Олег Григорьевич

доктор биологических наук
ФГБУН Институт проблем экологии и эволюции
им А.Н. Северцова РАН, лаборатория почвенной
зоологии и общей энтомологии, ведущий научный
сотрудник

Лухтанов Владимир Александрович

доктор биологических наук, доцент
ФГБУН Зоологический институт Российской
академии наук, лаборатория систематики
насекомых, главный научный сотрудник

Защита диссертации состоится «7» октября 2024 г. в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.8 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: ksenperf@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале:

<https://dissovet.msu.ru/dissertation/3021>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат _____ наук



К.С. Перфильева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Точная таксономическая идентификация объектов – основа экологических, биогеографических, эволюционных и других сравнительных исследований в биологии. Без нее также невозможно создание полноценных фаунистических и молекулярно-генетических баз данных, которые в настоящее время содержат множество неверных видовых определений. Все это обуславливает необходимость детальных исследований сложных в таксономическом отношении групп. Данная работа и представляет собой такое исследование. Ее предметом является широко распространенный в Палеарктике подрод *Mellicta* Billberg, 1820 рода *Melitaea* Fabricius, 1807 семейства Nymphalidae, видовая диагностика представителей которого весьма затруднительна, хотя некоторые из них достаточно обычны даже в европейской части России. Трудности идентификации вызваны главным образом сходством крылового рисунка у представителей группы, поэтому для надежного определения видов необходимо использовать строение копулятивного аппарата. Однако возникают ситуации, когда видовую принадлежность особи сложно определить и по генитальным структурам, поскольку те обладают изменчивостью, изученность которой является недостаточной. Проблема видовой идентификации самок в группе стоит особенно остро – в научной литературе практически не уделялось внимания морфологии их полового аппарата. Слабая изученность гениталий и их изменчивости приводит к ошибкам в диагностике видов и к противоречиям в суждениях о статусе и распространении тех или иных таксонов. Отдельным аспектом является отсутствие эмпирических данных о функциональном значении генитальных структур шашечниц, сведения о котором важны для понимания закономерностей эволюционных преобразований полового аппарата и оценки тех или иных систематических признаков. Появившиеся в последние годы и показавшие перспективность для диагностики видов шашечниц подрода *Mellicta* молекулярно-генетические методы были опробованы не на всех таксонах рассматриваемой группы, что в особенности касается наиболее сложных и спорных таксонов. Изучение преимагинальных стадий методами электронно-сканирующей микроскопии, ставшее еще одним важным направлением в современной энтомологии, к шашечницам подрода *Mellicta* в настоящее время не применялось. Очевидно, что на нынешнем этапе изучения данной группы необходимы комплексные исследования с применением молекулярно-генетических и морфологических методов, что и послужило причиной выбора соответствующей темы диссертационной работы.

Цели и задачи исследования. Целью работы является изучение морфологии шашечниц подрода *Mellicta* Billberg, 1820 рода *Melitaea* Fabricius, 1807 (Lepidoptera, Nymphalidae) в сочетании с молекулярно-генетическими данными и совершенствование на этой основе систематики и видовой диагностики исследуемой группы.

Задачи:

1. Изучить строение гениталий самцов и самок шашечниц подрода *Mellicta* и определить функциональное значение структур их полового аппарата;
2. Изучить внутривидовую изменчивость гениталий шашечниц подрода *Mellicta* и выявить наиболее надежные диагностические признаки;
3. Разработать систему подрода *Mellicta* на основе морфологии полового аппарата самцов и самок;

4. Изучить строение ультраструктуры хориона яиц подрода *Mellicta* с учетом значимости признаков для систематики;
5. Оценить значение метода сравнения баркодов гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы (COI) митохондриальной ДНК для видовой диагностики и системы шашечниц подрода *Mellicta* в сравнительном аспекте с морфологическими данными;
6. Оценить перспективность применения фрагмента ядерного гена 18S рРНК в качестве дополнительного молекулярно-генетического маркера для решения сложных таксономических вопросов в изучаемой группе шашечниц;
7. Проанализировать экологические особенности и распространение шашечниц подрода *Mellicta*, выявить центры их видовой разнообразия;
8. На основе комплексного анализа уточнить видовой состав подрода и составить определительные ключи.

Объект и предмет исследования. Объект исследования – шашечницы подрода *Mellicta* Billberg, 1820 рода *Melitaea* Fabricius, 1807 (Lepidoptera, Nymphalidae). Предмет исследования – сравнительная морфология гениталий в данной группе, закономерности их эволюционных преобразований и значение признаков их строения для видовой диагностики и системы группы в сочетании с молекулярно-генетическими данными и морфологией яиц.

Научная новизна. Впервые изучено взаимодействие гениталий шашечниц во время спаривания и определены функции их генитальных структур. На этом основании в сочетании с тщательным сравнительно-морфологическим анализом гениталий выдвинуты предположения о закономерностях эволюционных преобразований полового аппарата в данной группе. Изучена внутривидовая изменчивость полового аппарата самцов и самок, стабильность диагностических признаков проверена на обширном материале. В процессе изучения плохо видимых морфологических признаков предложен новый метод окрашивания фукорцином. Впервые разработана полноценная видовая идентификация группы по самкам и для ряда видов впервые приведено изображение полового аппарата. Составлены определительные ключи для идентификации самцов и самок всего подрода. Впервые осуществлено изучение яиц шашечниц подрода *Mellicta* при помощи электронно-сканирующей микроскопии. Для ряда таксонов впервые установлена перспективность идентификации путем метода сравнения баркодов гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы (COI) митохондриальной ДНК и кроме того показана перспективность применения фрагмента ядерного гена 18S рРНК в качестве дополнительного маркера для прояснения сложных случаев в систематике шашечниц изучаемой группы. Решены спорные вопросы, касающиеся таксономического статуса и идентификации типовых мест отдельных представителей подрода *Mellicta*. Обобщены и проанализированы данные по экологии и географическому распространению шашечниц изучаемой группы. Установлена новая, ранее неизвестная часть ареала *Melitaea ambigua* Ménériés, 1859, находящаяся в сильной изоляции от основного, в результате чего описан новый подвид *Melitaea ambigua kurmaevi* (Kolesnichenko et Bush, 2015). На основании морфологии, генетики, экологических особенностей и географического распространения статус таксона *Melitaea aurelia distans* (Higgins, 1955) повышен до видовой. Выделен лектотип *Melitaea ambigua ambigua* Ménériés, 1859, хранящийся в Зоологическом институте РАН.

Теоретическое и практическое значение работы. Результаты работы вносят вклад в изучение систематики, морфологии и филогении шашечниц. В связи со сложностью идентификации подрода *Mellicta* полученные данные будут в первую очередь полезны для

видовой диагностики, что важно, как для таксономических, так для фаунистических и прочих работ. Результаты молекулярно-генетических исследований дополняют общие знания о применении соответствующих методов в видовой идентификации и изучении филогении. Детальный анализ морфологии полового аппарата у ранее неизученных видов, а также исследование взаимодействия генитальных структур при спаривании вносят вклад в изучение морфологии и эволюции гениталий чешуекрылых. Результаты изучения яиц при помощи электронно-сканирующей микроскопии дополняют знания об использовании данной стадии развития в систематике. Новые и неожиданные находки, сделанные в работе, представляют интерес для зоогеографических исследований, гипотез и реконструкций. Кроме того, полученные сведения о распространении редких и эндемичных видов могут быть полезны в составлении региональных Красных книг. Предложенный новый метод окрашивания фукорцином плохо визуализируемых морфологических структур позволяет применять данный краситель в соответствующих целях и для других энтомологических групп.

Положения, выносимые на защиту. 1. Наибольшее значение для диагностики и системы шашечниц подрода *Mellicta* имеют генитальные структуры самцов и самок, взаимодействующие друг с другом во время спаривания;

2. Эволюционные преобразования полового аппарата у шашечниц подрода *Mellicta* связаны с совершенствованием фиксации при копуляции;

3. Деление подрода *Mellicta* на видовые группы на основе морфологических данных согласуется с данными молекулярно-генетических методов. Выделенные группы видов имеют свои экологические и зоогеографические особенности;

4. Метод сравнения баркодов гена COI позволяет идентифицировать подавляющее большинство видов шашечниц подрода *Mellicta*. В отдельных случаях требуется применение ядерных маркеров.

Степень достоверности работы. В исследовании применены методы морфологии и генетики, которые соответствуют задачам и специфике полученных данных, а объем данных достаточен для решения поставленных задач. Это позволяет судить о высокой степени достоверности результатов данной работы.

Личный вклад автора. План работы был разработан автором совместно с научным руководителем. Часть изученного материала собрана лично автором в экспедициях. Также автором лично осуществлены исследования коллекций музеев и других научных учреждений. Автором самостоятельно проведены: анализ научных публикаций по теме исследования; изготовление препаратов гениталий, зарисовка и фотографирование генитальных структур и других морфологических признаков, изучение взаимодействия гениталий во время спаривания, обработка и интерпретация полученных результатов. Молекулярно-генетические данные получены как в результате самостоятельной работы, так и в результате сотрудничества с коллегами из других научных учреждений. Изучение яиц при помощи электронно-сканирующей микроскопии проведено совместно с научным руководителем. Подготовка ряда публикаций осуществлена с научным руководителем и коллегами.

Апробация работы. Результаты работы были представлены в виде докладов на трех международных и четырех всероссийских конференциях: XVII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, Россия, 12–15 апреля 2010 г.; XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», Москва, Россия, 9–13 апреля 2012 г.; 2nd Global Conference on Entomology, Kuching, Sarawak, Malaysia, November 8–12, 2013; «Биосфера земли: прошлое,

настоящее и будущее». Екатеринбург, Россия, 21–25 апреля 2008 г.; «Эволюционная и популяционная экология (Назад в будущее)», конференция молодых ученых, посвященная 90-летию со дня рождения академика С.С. Шварца, Екатеринбург, Россия, 30 марта – 3 апреля 2009 г.; XV Съезд Русского энтомологического общества, Новосибирск, 31 июля – 7 августа 2017 г.; XVI Съезд Русского энтомологического общества, Москва, 22–26 августа 2022 г. Кроме того, результаты работы были апробированы на кафедре энтомологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова.

Публикации автора по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 7 статей, индексируемых в базах данных Scopus, WOS и RSCI. Личный вклад в каждую публикацию отражен в списке публикаций на стр. 25-26 автореферата.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 493 страницах, содержит 2 тома, 148 рисунков, 10 таблиц, введение, семь глав с описанием истории изучения шашечниц подрода *Mellicta*, методов и результатов исследования, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, семь приложений.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ТОМ 1

ВВЕДЕНИЕ

Во введении обоснована актуальность темы, степень ее разработанности, сформулированы цели и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, обозначены положения, выносимые на защиту.

ГЛАВА 1. ИСТОРИЯ ИЗУЧЕНИЯ ШАШЕЧНИЦ ПОДРОДА *MELLICTA*

В главе приводится критический обзор исследований по теме диссертации и современного состояния сведений о ее предмете. Резюмируя проанализированные данные можно заключить, что систематике и диагностике шашечниц подрода *Mellicta* посвящено немало научных публикаций, однако основное внимание в них уделено определенным аспектам, без проведения комплексного анализа систематических признаков. В работах, посвященных морфологии *Mellicta*, основной фокус сосредоточен на рисунке крыла и строении гениталий самцов (Verity, 1940; Higgins, 1955; Devyatkin, 2000; Oorshot, Coutsis, 2014). В публикациях по филогении шашечниц молекулярно-генетические данные приводятся не для всех видов и без сравнительного анализа морфологии полового аппарата (Leneveu et al., 2009; Long et al., 2014). Имеются работы по отдельным видам шашечниц подрода *Mellicta*, затрагивающие сочетание морфологических и молекулярно-генетических методов (Batori et al., 2012; Tahami et al., 2021). Вопросу использования признаков строения полового аппарата самок для идентификации видов и вовсе не уделяется практически никакого внимания. В научной литературе приводятся данные по гениталиям самок видов подрода *Mellicta* для определенных территорий, но либо без указания диагностических признаков (Higgins, 1955), либо без иллюстративного сопровождения (Дубатовол и др., 2005). Небольшая часть работ посвящена изучению гениталий самок отдельных представителей подрода *Mellicta* (Urbahn, 1952; Некрутенко, 1985; Churkin, Devyatkin, 2005). Исследования морфологии преимагинальных стадий шашечниц подрода *Mellicta* с помощью методов

электронно-сканирующей микроскопии отсутствуют. В публикациях обычно содержатся общие описания яиц и гусениц (преимущественно старших возрастов) и приводятся их рисунки или фотографии (Urbarn, 1952; Hesselbarth et al., 1995; Wahlberg, 2000; Коршунов, 2002; Тихонов и др., 2023). Таким образом проведение комплексных исследований, затрагивающих морфологические признаки самцов и самок в сочетании с преимагинальными стадиями и молекулярно-генетическими методами является важной и перспективной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы и использованные методы морфологических исследований

Сбор материала проводили в экспедициях в следующие регионы: Московская, Тульская, Белгородская, Волгоградская, Новосибирская области, Республика Крым, Карачаево-Черкесская республика, Республика Дагестан, Республика Алтай, Приморский край, Армения, Сербия. Кроме того, были исследованы коллекции музеев и других научных учреждений, а также экземпляры, полученные от коллег. Сбор материала, его постановку и препарирование полового аппарата осуществляли при помощи стандартных энтомологических методов. Для исследования прозрачных плохо видимых генитальных структур использовали метод окрашивания фукорцином, изначально разработанный нами для гусениц (Lovtsova et al., 2023). Для этого гениталии погружали на одну минуту в пробирку, наполненную фукорцином, после чего извлекали и исследовали под микроскопом. Визуализацию половых структур осуществляли при помощи зарисовки и послойного фотографирования. Яйца для сканирующей электронной микроскопии получали как от живых самок, так и извлекали из сухого материала методом ферментативной обработки или обезжиривания брюшка самки (Junker et al., 2006). Затем яйца очищали от жирового налета и фиксировали в 75%-ном этаноле. Полученные яйца, а также гусениц первого возраста обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и ацетоне, затем высушивали в критической точке (Hitachi HCP-1) и покрывали золотом (Hitachi IB-3). Фотографии были сделаны с помощью сканирующего электронного микроскопа Jeol JSM-6380. Матрицу состояний морфологических признаков гениталий строили в программе Mesquite 3.70. В качестве внешних групп были использованы *Melitaea cinxia* (Linnaeus, 1758) и *M. arcesia* Bremer, 1861 – близкие виды к представителям подрода *Mellicta*, при этом не являющиеся их сестринскими группами (Long et al., 2014). Филогенетические деревья были построены методом ближайшей экономии в программе TNT анализом Traditional search и в программе Asado (ver. 1.61) анализом Ratchet с числом репликаций 10000 с сохранением 10 деревьев после каждой репликации. Анализ проводили с равным весом всех отобранных признаков. Всего было исследовано 1767 экземпляров подрода *Mellicta*. Были зарисованы гениталии для 719 экземпляров самцов, также было сделано более 1000 фотографий генитальных структур самцов и самок. Было исследовано 37 типовых экземпляров, принадлежащих к десяти таксонам. Кроме того, было изучено 103 экземпляра, относящихся к другим группам *Melitaea*, а также к родам *Euphydryas*, *Chlosyne* и *Tegosa* в качестве сравнительного материала. Было изучено 44 яйца 8 видов шашечниц подрода *Mellicta* и 29 яиц 6 видов Melitaeini из других групп.

2.2. Молекулярно-генетические методы

Выделение ДНК, амплификация и секвенирование

ДНК выделяли из 1-2 ног коммерческими наборами «DIAtom tm DNA Prer» («Изоген», Россия) согласно протоколу фирмы-производителя, а также с использованием буфера СТАВ

(Murray, Thompson, 1980) или солей аммония (Сидорук и др., 2020). В качестве основного молекулярно-генетического маркера был выбран т.н. ДНК-баркод – участок митохондриального гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы (COI) длиной 658 п.н. Для амплификации фрагмента гена COI использовали праймеры LCO1490/HCO2198 (Folmer et al., 1994). В случае старых образцов, ДНК которых сильно деградировала, полноразмерный ДНК-баркод был получен из двух перекрывающихся фрагментов, амплифицированных с помощью праймеров LCO/МН-MR1 и МН-MF1/HCO (Folmer et al., 1994; Lukhtanov et al., 2009). В качестве дополнительного молекулярно-генетического маркера был выбран фрагмент гена 18S рРНК длиной 814 п.н., который амплифицировали, используя праймеры, разработанные И.В. Мануховым и А.А. Кудрявцевой: 18SMKF (CGGGTTCGATGAAGAACGCAGTTAA) и 18SMKR (TCGCTCGCCGCTACTAAGGAAAT). Для амплификации целевых фрагментов ДНК был использован следующий температурный профиль ПЦР: (1) начальная денатурация при 95 °С в течение 5 мин, (2) 33 цикла денатурации при 95 °С в течение 20 сек, отжиг при 52 °С в течение 20 сек и элонгация при 72 °С в течение 1 мин, (3) окончательная элонгацией при 72°С в течение 3 мин. Визуализацию результатов ПЦР проводили при помощи горизонтального электрофореза в 1%-ном агарозном геле. Очистку ПЦР-продукта для последующего секвенирования проводили набором CleanUp mini kit («Евроген», Москва) в соответствии с инструкциями фирмы-производителя. Секвенирование продуктов амплификации проводили по методу Сэнгера (Sanger et al., 1977) с обоих праймеров с использованием ДНК-анализатора ABI PRISM 3500 xl.

Филогенетический анализ

Корректировку сиквенсных хроматограмм и их анализ проводили в программе Vector NTI 9. Множественное выравнивание последовательностей осуществляли в программе MEGA-X с использованием алгоритмов ClustalW и затем MUSCLE. Выбор модели нуклеотидных замен осуществляли в программе ModelFinder с критерием Corrected Akaike Information Criterion (AICc) для улучшения выбора модели. В результате была использована модель General Time Reversible (GTR) с оценённой долей неизменных участков (I) и изменением скорости среди участков, следующих гамма-распределению (Г) – GTR+I+Г. Итоговое выравнивание включало 126 последовательностей фрагмента гена COI и 10 последовательностей фрагмента гена 18S рРНК. 22 последовательности фрагмента гена COI и 1 последовательность 18S рРНК были взяты из баз данных GenBank и BOLD. Филогенетические деревья строили, используя Байесовский подход (ВА) с помощью программы MrBayes3.2.7, а также методами максимальной экономии – Maximum Parsimony (MP) и максимального правдоподобия – Maximum Likelihood (ML) (Tamura, Nei, 1993; Kumar et al., 2018) в программе MEGAX. Расчет апостериорных вероятностей для ВА проводили методом Монте-Карло с четырьмя марковскими цепями (три разогретых и одна холодная) для 1.000.000 повторов с построением деревьев каждые 1000 итераций. Первые 25% деревьев были отброшены, остальные участвовали в построении консенсусного Байесовского дерева. Устойчивость ветвлений для ML и MP проверяли методом bootstrap анализа (10000 повторов) (Felsenstein, 1985). Генетические K2P-расстояния рассчитывали в MEGA-X. В качестве внешней группы использовался вид из подсемейства Nymphalinae – *Nymphalis antiopa* (Linnaeus, 1758).

ГЛАВА 3. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОДРОДА *MELLECTA* И ЕГО ОТЛИЧИЯ ОТ ДРУГИХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ MELITAEINI

3.1 Систематическое положение

Триба Melitaeini, или шашечницы, куда входит изучаемая нами группа, относится к подсемейству Nymphalinae семейства Nymphalidae (Leraut, 1980; Harvey, 1991; Wahlberg et al., 2003; Freitas, Brown, 2004). Основными морфологическими отличиями шашечниц от других нимфалид являются резко модифицированные гениталии с редуцированным ункусом (Кузнецов, Стекольников, 2005) и преобразование IX стернита в мощную структуру под названием «рингуолл» (ringwall), соединяющую латерально вальвы и придающую гениталиям цилиндрическую форму (Zander, 1903; Higgins, 1941; Колесниченко, 2007). Шашечницы включают двадцать один род, почти все из которых сосредоточены в Новом Свете. В Палеарктике обитают только два рода – *Euphydryas* Scudder, 1872 и *Melitaea* Fabricius, 1807, причем первый является голарктическим, второй – исключительно палеарктический. В настоящей работе принята концепция деления *Melitaea* на два подрода – *Melitaea* и *Mellicta*.

3.2. Характеристика полового аппарата подрода *Mellicta*

В качестве основных отличительных признаков подрода *Mellicta* от подрода *Melitaea* мы выделяем следующие: остиум-киль эдеагуса, особый вентральный зубец каудального отростка вальвы, расположенный параллельно главному, и мощный тегумен, который часто несет пару хитинизированных зубцов субункуса (не путать со складками тегумена видов из группы *Melitaea didyma*). У большинства видов присутствуют минимум два из этих признаков, а у ряда представителей – все три. Также нами были найдены менее очевидные отличительные признаки: в гениталиях самок подрода *Melitaea* дуктус полностью склеротизован на протяжении не менее, чем в три раза превышающем ширину дуктуса, после чего склеротизация становится вилкообразной. В гениталиях самок *Mellicta* вилкообразная склеротизация начинается практически сразу у основания дуктуса или же склеротизация отсутствует.

3.3. Рисунок крыла

Большинство представителей подрода *Melitaea* отличается от *Mellicta* наличием у основания испода заднего крыла черных точек. *M. diamina* (Lang, 1789) и *M. protomedia* Ménétriés, 1859, образующие сестринскую группу по отношению к *Mellicta* (Long et al., 2014), обладают с ними определенным внешним сходством, отличаясь такими особенностями рисунка, как присутствием внутри рыжих пятен субмаргинальной перевязи темных точек. В целом рисунок крыла внутри подрода *Mellicta* сильно изменчив: представители одного вида внешне могут отличаться сильнее, чем представители разных видов. Однако в отдельных случаях те или иные особенности крылового рисунка могут применяться для диагностики в качестве дополнительных признаков, например, одинарная линия вдоль маргинального края испода заднего крыла у *M. asteria*, расширенные и слитые пятна дискального ряда ближе к внутренней поверхности крыла и расширенная срединная перевязь испода у *M. distans*, затемнение заднего крыла у *M. caucasogenita*.

3.4. Преимагинальные стадии

В разделе дается общая характеристика преимагинальных стадий подрода *Mellicta* и приводится описание хетотаксии гусеницы первого возраста. Общая схема хетотаксии в пределах рода отличается постоянством, отличия могут лежать в более частных деталях,

например, в разнице углов между щетинками. Основным диагностическим признаком яиц на уровне видовых групп является форма. В качестве дополнительных признаков могут использоваться также диаметр яйца и длина продольных ребер относительно высоты яйца.

ГЛАВА 4. ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ЭВОЛЮЦИОННЫЕ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ГЕНИТАЛЬНЫХ СТРУКТУР ШАШЕЧНИЦ ПОДРОДА *MELLECTA*

Очевидно, что знания о функциях тех или иных морфологических признаков имеют важное значение для систематики. Взаимодействие гениталий во время спаривания изучалось у разных групп чешуекрылых и функциональное значение основных генитальных структур件нятно, однако в каждой группе бабочек существуют свои преобразования тех или иных

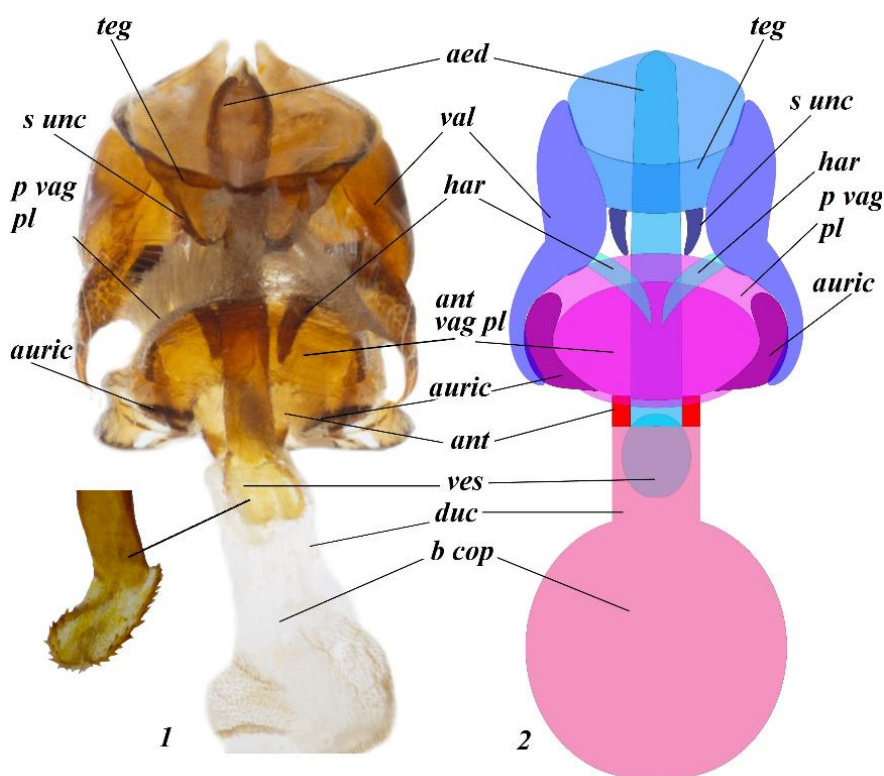


Рисунок 1. Фото (1) и схема (2) взаимодействия гениталий самки и самца *M. menetriesi* во время спаривания в дорсальной проекции. Синими тонами на схеме обозначены структуры самца, красно-розовыми тонами – структуры самки; *aed* – эдеагус, *teg* – тегумен, *s unc* – субункус, *val* – вальва, *har* – гарпа, *ves* – везика, *p vag pl* – поствагинальная пластинка, *ant vag pl* – антевагинальная пластинка, *auric* – аурикулы, *ant* – антрум, *duc* – дуктус, *b cop* – копулятивная сумка.

элементов полового аппарата и их функции могут различаться в зависимости от группы (Кузнецов, Стекольников, 2001; Cordero, Baixeras, 2015). Взаимодействие гениталий при спаривании как у подрода *Mellicta*, так и у остальных шашечниц ранее фактически не изучалось, а генитальные структуры обсуждались с систематической точки зрения. Нами было изучено взаимодействие гениталий при спаривании на примере *M. menetriesi* (пойманного в природе в состоянии *in copula*) путем анатомирования и

установлено взаимодействие различных частей половых аппаратов самца и самки. На основании сравнительно-морфологического анализа гениталий всего подрода

сделаны дополнительные выводы касательно функций половых структур. На рисунке 1 представлена схема сцепления гениталий самца и самки шашечниц подрода *Mellicta* в дорсальной проекции, на рисунке 2 (1, 2) – в латеральной. Нами установлено, что субункус сцепляется с вершиной поствагинальной пластинки, каудальные отростки вальв с аурикулами – склеротизованными образованиями, расположенными латерально от генитальных пластин, эдеагус проходит через антрум и выворачивание везики происходит в области дуктуса. Гарпы выполняют роль фиксации и направления эдеагуса в половые пути самки (рисунок 2, 3).

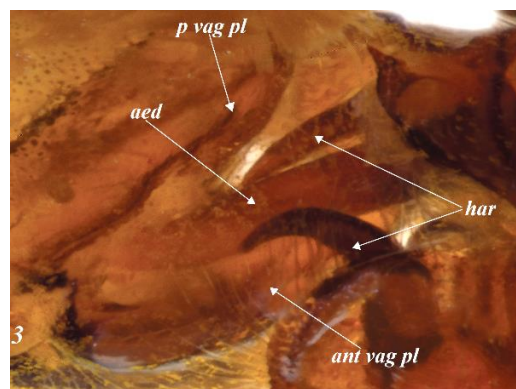
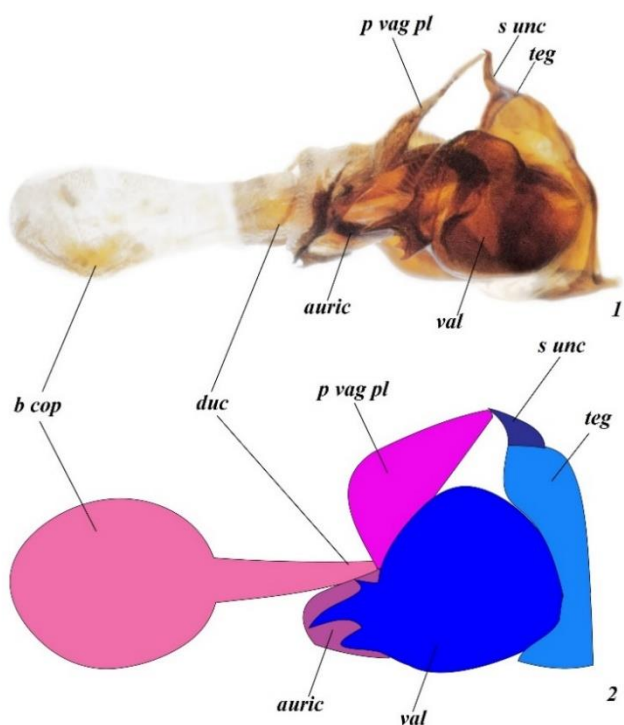


Рисунок 2. Фото (1, 3) и схема (2) взаимодействия гениталий самки и самца *M. menetriesi* во время спаривания в латеральной проекции. Синими тонами на схеме обозначены структуры самца, красно-розовыми тонами – структуры самки. *teg* – тегумен, *s unc* – субункус, *val* – вальва, *har* – гарпа, *ant vag pl* – антевагинальная пластинка, *p vag pl* – поствагинальная пластинка, *auric* – аурикулы, *duc* – дуктус, *b cop* – копулятивная сумка, *aed* – эдеагус.

Наибольшее значение для диагностики шашечниц подрода *Mellicta* имеют структуры гениталий самцов и самок, взаимодействующие друг с другом во время спаривания. Одними

из таких элементов являются субункус самца и поствагинальная пластинка самки. Их сцепление друг с другом обеспечивает дополнительную фиксацию при спаривании. В связи с этим закономерной является выявленная нами четкая корреляция между строением данных структур: у видов с коротким или редуцированным субункусом (рисунок 3, 2) поствагинальная пластинка укорочена – то есть не выступает или едва выступает за пределы антевагинальной пластинки в вершинной части (рисунок 3, 1), у видов с развитым субункусом (рисунок 3, 4) поствагинальная пластинка длинная и значительно выступает за пределы антевагинальной пластинки в вершинной части (рисунок 3, 3), то есть длина выступающей части составляет не менее половины длины антевагинальной пластинки вместе с антрумом. Строение зубцов субункуса имеет важное диагностическое значение. Например, у *M. ambigua* субункус в вершинной части имеет дополнительные зубчики (рисунок 3, 4), а у *M. plotina* зубчики располагаются на внутренней стороне субункуса, за счет чего тот приобретает пильчатое строение. Очевидно, что

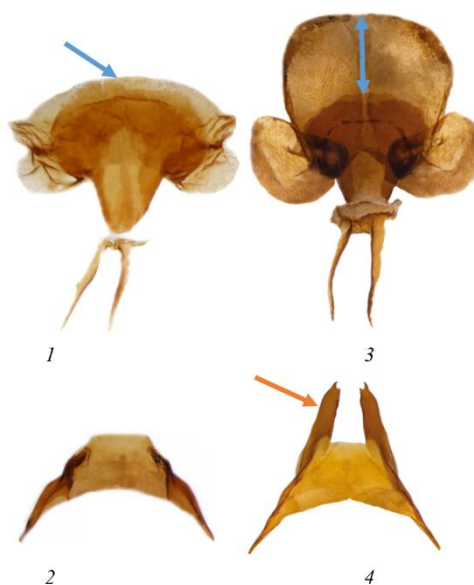


Рисунок 3. Примеры гениталий самок шашечниц подрода *Mellicta* с укороченной (1) и длинной (3) поствагинальной пластинкой (показаны голубыми стрелками) и соответствующие им тегумены самцов (2, 4). 1, 2 – *M. asteria*, 3, 4 – *M. ambigua*. Красной стрелкой показан развитый субункус.

подобные эволюционные преобразования субункуса обеспечивают дополнительное сцепление с самкой во время спаривания. В отличие от подрода *Melिताea* эдеагус почти у всех видов подрода *Mellicta* несет на вершине остиум-киль. При копуляции остиум-киль переводится из горизонтального положения в вертикальное за счет инвагинации везики. Остиум-киль, очевидно, предназначен для облегчения прохождения эдеагуса через половые пути самки, а также для дополнительного закоривания с целью улучшения фиксации при спаривании. Строение остиум-киля имеет важное значение в идентификации видов. У самок диагностическим значением обладает строение дуктуса, который может нести вилкообразную склеротизацию (бациллу) или же быть прозрачным. Нами обнаружена связь между строением эдеагуса самца и дуктуса самки: у видов, самки которых имеют прозрачный дуктус без вилкообразной склеротизации (рисунок 4, 1), остиум-киль самцов тонкий и прозрачный (рисунок 4, 2) или же вовсе редуцирован, у видов с развитым бациллуом (рисунок 4, 3) имеется мощный склеротизованный остиум-киль эдеагуса (рисунок, 4).

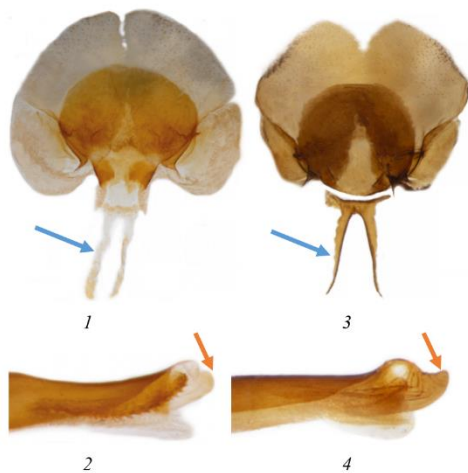


Рисунок 4. Примеры гениталий самок шашечниц подрода *Mellicta* с прозрачным дуктусом (1) и дуктусом, имеющим бациллу (3), а также соответствующие им эдеагусы самцов с мембранозным остиум-килем (2) и склеротизованным остиум-килем (4). 1, 2 – *M. menetriesi*; 3, 4 – *M. athalia*. Голубыми стрелками показан дуктус, красными – остиум-киль эдеагуса.

уменьшение склеротизации остиум-киля связано с тем, чтобы не повредить мембранозный дуктус во время копуляции. Морула (часть везики, покрытая корнутусами) закоривает эдеагус в половых путях самки. У некоторых близких видов особенности строения морулы являются основным диагностическим признаком. В качестве примера можно привести *M. aurelia* и *M. distans* (рисунок 5): у первого морула в состоянии покоя имеет прямую форму и направлена вверх, у второго – изогнутую и направлена вниз. У самок диагностическое значение также имеет строение антрума, который вместе с антевагинальной пластинкой образует структуру грибовидной (рисунок 6, 1), грушевидной (рисунок 6, 2) или округлой формы (рисунок 6, 3). У подрода *Melिताea* каудальный отросток вальвы резко загнут в проксимальном направлении (рисунок 7, 1, 2) – загиб образует прямой или острый угол. По всей видимости это связано с тем, что у его представителей гениталии самцов лишены дополнительных сцепляющих структур, присутствующих у подрода *Mellicta*, и функция удержания самки ложится главным образом на каудальный отросток вальвы, что, очевидно, и обуславливает его сильную изогнутость. У подрода *Mellicta* резкий изгиб отростка также свойственен видам с обедненным набором генитальных структур (рисунок 7, 3), что, очевидно, является закономерной компенсацией для качественного захвата самки. У видов с полным набором дополнительных генитальных структур, участвующих в фиксации, каудальные отростки загнуты слабо в проксимальном направлении под углом от тупого до практически развернутого (рисунок 7, 4).

структур, присутствующих у подрода *Mellicta*, и функция удержания самки ложится главным образом на каудальный отросток вальвы, что, очевидно, и обуславливает его сильную изогнутость. У подрода *Mellicta* резкий изгиб отростка также свойственен видам с обедненным

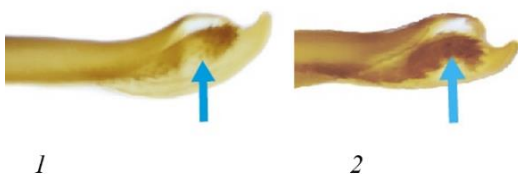


Рисунок 5. Пример диагностического значения морулы у близких видов *M. aurelia* (1) и *M. distans* (2).

набором генитальных структур (рисунок 7, 3), что, очевидно, является закономерной компенсацией для качественного захвата самки. У видов с полным набором дополнительных генитальных структур, участвующих в фиксации, каудальные отростки загнуты слабо в проксимальном направлении под углом от тупого до практически развернутого (рисунок 7, 4).

Строение каудального отростка вальвы является важным диагностическим признаком (рисунки 10, 11). Гарпы имеют слабое значение для диагностики близких видов подрода *Mellicta*, что, очевидно, связано с взаимодействием этой структуры с участками эдеагуса,

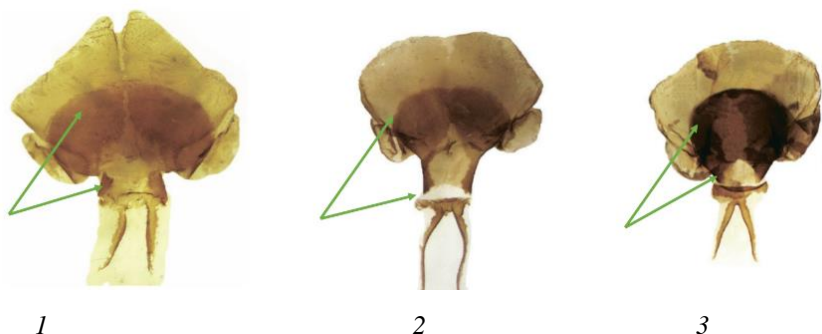


Рисунок 6. Гениталии самок шашечниц подрода *Mellicta* грибовидной (1), грушевидной (2) и округлой (3) формы. 1 – *M. parthenoides*, 2 – *M. britomartis*, 3 – *M. athalia*.

сумка несет ярко выраженные диагностические признаки у многих полиандрических видов (Cordero, Vaixeras, 2015). К таким признакам относится в частности строение сигн,



Рисунок 7. Примеры гениталий с сильной (1–3) и слабой (4) изогнутостью каудального отростка вальвы в проксимальном направлении. 1 – *M. trivialis* (подрод *Melitaea*), 2 – *M. phoebe* (подрод *Melitaea*), 3 – *M. varia* (подрод *Mellicta*), 4 – *M. athalia* (подрод *Mellicta*). Стрелками показана изогнутость каудального отростка в проксимальном направлении.

разнообразие которых выработалось благодаря половому отбору: основная функция сигн состоит во вскрытии сперматофоров (Galicia-Mendoza et al., 2008) и они эволюционировали в ответ на утолщение оболочки сперматофоров самцов в результате конкуренции. Исследования говорят о наличии у шашечниц преимущественно моноандрии (Duplouy et al., 2018), и по этой причине, видимо, у этой группы отсутствуют дополнительные склеротизованные структуры копулятивной сумки. Анальные сосочки, являющиеся элементами яйцевыводной части полового аппарата самок, также имеют однообразное строение в пределах группы. Таким образом, исходя из изложенного в данной главе, можно заключить, что основными диагностическими признаками шашечниц подрода *Mellicta* обладают структуры самцов и самок, взаимодействующие друг с другом во время спаривания. Структуры, не взаимодействующие со структурами противоположного пола при копуляции, имеют слабое диагностическое значение. Эволюционные преобразования полового аппарата шашечниц подрода *Mellicta* связаны с совершенствованием фиксации при копуляции: ослабление одних структур, участвующих в фиксации самки, влечет за собой усиление других и наоборот. Важную роль в эволюции полового аппарата шашечниц подрода *Mellicta*, судя по всему, играл механизм «замка-и-ключа». Во второй половине XX века большую популярность получила идея полового отбора путем скрытого выбора самки (Cryptic female choice, CFC), усиливающего отбор самцов с наиболее предпочтительными для самки гениталиями во время

однородными у всех представителей подрода. Однако гарпы могут различаться у видов из далеких видовых групп. Что касается копулятивной сумки, то наши исследования говорят и о ее слабом диагностическом значении. Сумки имеют мембранозную структуру, без каких-либо склеротизованных элементов. Копулятивная

сумка несет ярко выраженные диагностические признаки у многих полиандрических видов (Cordero, Vaixeras, 2015). К таким признакам относится в частности строение сигн, разнообразие которых выработалось благодаря половому отбору: основная функция сигн состоит во вскрытии сперматофоров (Galicia-Mendoza et al., 2008) и они эволюционировали в ответ на утолщение оболочки сперматофоров самцов в результате конкуренции. Исследования говорят о наличии у шашечниц преимущественно моноандрии (Duplouy et al., 2018), и по этой

копуляции, в то время как гипотеза «замка-и-ключа» рассматривалась как малозначимая (Eberhard, 1985). В настоящее время половой отбор считается основной причиной высокого разнообразия и коэволюции генитальных структур у самцов и самок, включающий помимо скрытого выбора самки половой конфликт и конкуренцию сперматофоров (Simmons, 2013; Cordero, Baixeras, 2015). Вместе с тем появляется все больше данных о том, что правило «замка-и-ключа» тоже вносит свой вклад в разнообразие гениталий (Masly, 2012; Simmons, 2013) и выбор самки часто действует как раз в качестве такого видоизолирующего механизма (Simmons, 2013). Таким образом, дивергенция полового аппарата может обуславливаться комплексом причин и отличаться в разных систематических группах. Очевидно, что немаловажную роль в эволюции полового аппарата играет стратегия репродуктивной изоляции: в группах с химической или визуальной репродуктивной изоляцией необходимость в структурной изоляции не так выражена, как в группах со слабо развитой феромонной коммуникацией и сходным обликом близких видов и их брачных ритуалов. Тот факт, что в полиандрических группах с хорошо развитой химической коммуникацией (к которым относятся, например, многие семейства разноусых чешуекрылых и молей) основным движущим фактором разнообразия генитальных структур служит половой отбор, является логичным и закономерным. В моноандрических группах с развитой химической коммуникацией (например, семейство Psychidae) или визуальной коммуникацией (например, различные группы трибы Nymphalini) прослеживается низкое разнообразие диагностических признаков гениталий. Шашечницы подрода *Mellicta* моноандричны, при этом развитая химическая коммуникация для них неизвестна, а их внешний облик весьма однообразен. Таким образом, предположение, что коэволюция и разнообразие половых аппаратов самцов и самок шашечниц подрода *Mellicta* являются в немалой степени следствием действия механизма «замка-и-ключа», представляется весьма закономерным.

ГЛАВА 5. ВНУТРИВИДОВАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ШАШЕЧНИЦ ПОДРОДА *MELLICTA*.

В данной главе дается обзор с описанием внутривидовой, а для отдельных видов и внутривидовой изменчивости диагностических признаков гениталий самцов и самок, сопровождаемый иллюстративным материалом. Для видов, у которых это имеет значение, затрагивается и окраска крыла. Представлено пятнадцать видов подрода *Mellicta*, характеризующихся уникальными комбинациями признаков. Наиболее показательным с точки зрения внутривидовой изменчивости является каудальный отросток вальвы, его изменчивость выражается главным образом в числе и расположении мелких вторичных зубцов. Тем не менее форма и общий габитус отростка являются характерными и видоспецифичными.

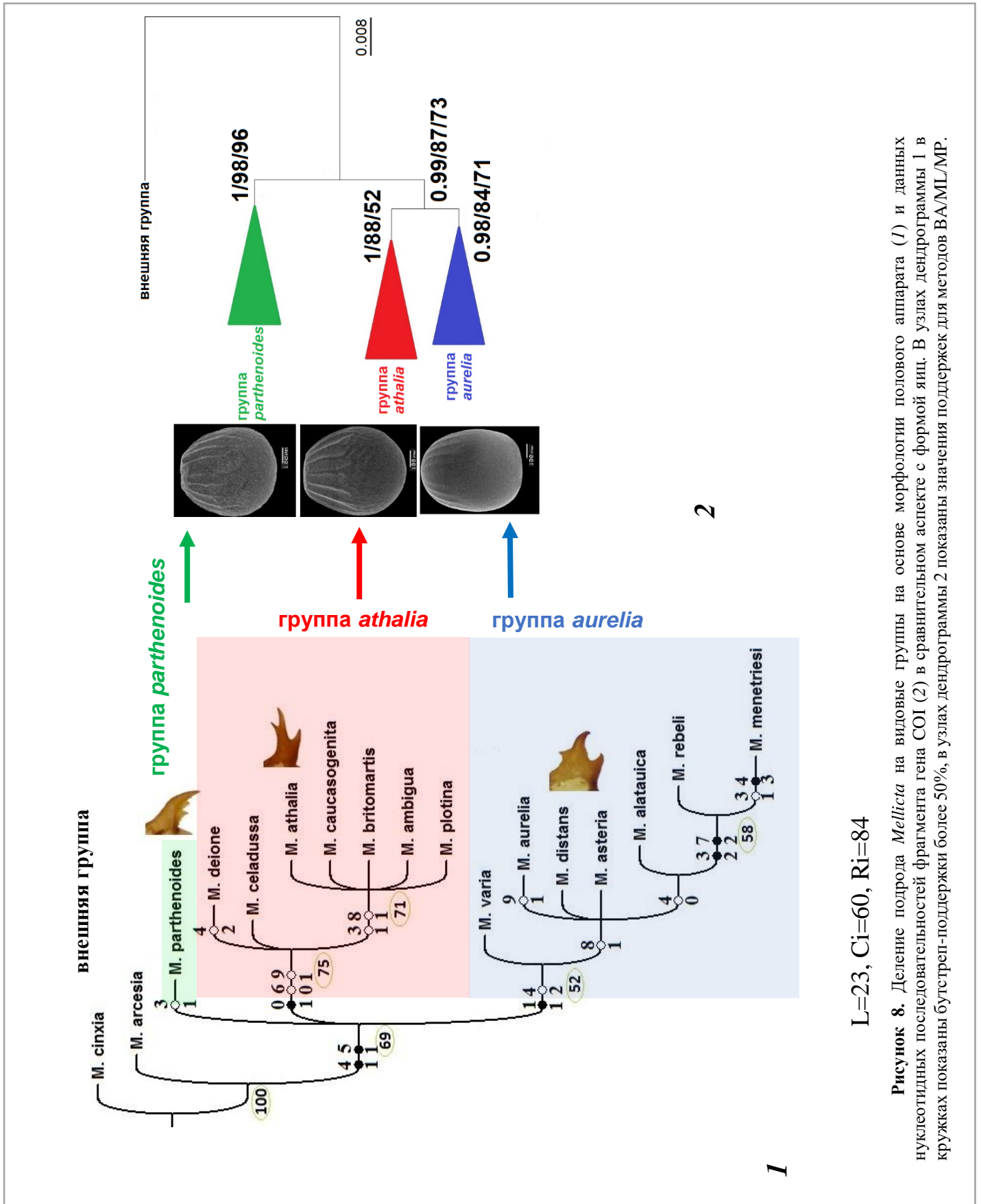
ГЛАВА 6. ФИЛОГЕНИЯ ПОДРОДА *MELLICTA*

6.1. Выделение видовых групп внутри подрода на основе морфологии и молекулярно-генетических данных

Нами впервые проведен филогенетический анализ на основе молекулярно-генетических данных (COI) всех известных видов подрода *Mellicta*, а также построена дендрограмма по данным морфологии. На рисунке 8 представлена филогенетическая дендрограмма на основе морфологии и в сравнении с ней приведена дендрограмма на основе

баркодинга, а также соответствующее каждой группе строение яйца. Детализация молекулярно-генетической дендрограммы рассмотрена при обзоре видовых групп. Результаты показали высокую степень согласованности морфологических и молекулярно-генетических данных. В подроде *Mellicta* дифференцируются три видовые группы: *parthenoides*, *athalia* и *aurelia*. Группа *parthenoides* представлена одним видом *M. parthenoides*; группа *athalia*, включает семь видов: *M. athalia*, *M. caucasogenita*, *M. ambigua*, *M. celadussa*, *M. deione*, *M. britomartis* и *M. plotina*; группа *aurelia*, включает также семь видов: *M. varia*, *M. alatauica*, *M. asteria*, *M. aurelia*, *M. distans*, *M. menetriesi* и *M. rebeli*. Для группы *athalia* характерен длинный каудальный отросток прямой формы, слабое развитие зубцов морулы и узкая антевагинальная пластинка. Также для всех видов группы *athalia* характерен развитый остиум-киль эдеагуса и для большинства видов – длинный субункус и развитый вентральный зубец каудального отростка вальвы. Эти три признака являются апоморфиями *Mellicta*. Исключениями в группе *athalia* являются *M. celadussa* и *M. deione*, тегумен которых не несет зубцов субункуса, а каудальный отросток вальвы не имеет вентрального зубца. В группе *aurelia* у большинства видов происходит обеднение набора сцепляющих структур, что мы связываем с такой морфологической особенностью, как резкая изогнутость каудального отростка вальвы. Благодаря этой черте происходит более крепкое сцепление с самкой и необходимость в других сцепляющих структурах, очевидно, не так выражена, как в группе *athalia*, у представителей которой каудальный отросток загнут слабо. Для группы *aurelia* характерен широкий резко загнутый вниз каудальный отросток вальвы, ярко выраженные зубцы морулы, широкая антевагинальная пластинка и тонкий бациллус, имеющий тенденцию к редукции. У большинства видов отсутствуют зубцы субункуса. Единственным представителем группы *aurelia*, имеющим мощное развитие данной структуры, является *M. menetriesi*; у *M. rebeli* субункус укорочен, у остальных он отсутствует. У *M. alatauica* и *M. rebeli* отсутствует остиум-киль эдеагуса, а у *M. varia* – вентральный зубец каудального отростка вальвы. *M. menetriesi* и *M. rebeli* имеют такую общую особенность как полностью редуцированный бациллус. Выделение *M. parthenoides* в самостоятельную видовую группу поддержано молекулярно-генетическими данными, но не имеет статистической поддержки на морфологической дендрограмме, что по-видимому обусловлено ограниченным набором пригодных для филогенетического анализа признаков. К своеобразным чертам данного вида относится каудальный отросток вальвы без дорсального зубца с рядом мелких зубчиков на вентральной поверхности основного зубца. Мы рассматриваем данный таксон как базальную группу подрода, обладающую как признаками группы *athalia*, так и признаками группы *aurelia*. Из признаков группы *athalia* *M. parthenoides* имеет сочетание склеротизованного остиум-киля эдеагуса с развитыми зубцами субункуса. Такое сочетание не встречается в группе *aurelia* (исключением являются популяции с промежуточным строением гениталий на стыке ареалов парапатрических видов *M. aurelia* и *M. menetriesi*). Также *M. parthenoides* имеет узкую форму каудального отростка вальвы, что является признаком группы *athalia* и не встречается в группе *aurelia*. С группой *aurelia* *M. parthenoides* сближает резкая изогнутость каудального отростка, расширенная антевагинальная пластинка, высокая степень развития зубцов морулы и утонченность бациллуса. Очень вероятно, что общий предок групп *athalia* и *aurelia* был сходен с современным *M. parthenoides* и дал начало двум линиям: с обогащенным набором сцепляющих структур, за счет чего каудальный отросток вальвы имеет прямую форму, и с обедненным набором сцепляющих структур, за счет чего каудальный отросток сильно изогнут для улучшения сцепления с самкой. Первая линия соответствует группе

athalia, вторая – группе *aurelia*. Каждая видовая группа подрода *Mellicta* характеризуется своей формой яиц: *M. athalia* – бочонковидной, *M. aurelia* – овальной, *M. parthenoides* – бочонко-грушевидной.



L=23, Ci=60, Ri=84

Рисунок 8. Деление подрода *Mellicta* на видовые группы на основе морфологии полового аппарата (1) и данных нуклеотидных последовательностей фрагмента гена COI (2) в сравнительном аспекте с формой яиц. В узлах дендрограммы 1 в кружках показаны бутстреп-поддержки более 50%, в узлах дендрограммы 2 показаны значения поддержки для методов BA/ML/MP.

6.2. Использование метода сравнения баркодов гена COI для видовой диагностики в подроде *Mellicta*

В каждой группе промежутков между уровнем межвидовой и внутривидовой дивергенции (barcoding gap) имеет свои показатели. Внутривидовые K2P-дистанции в изученных последовательностях фрагмента гена COI *M. parthenoides* колеблются от 0.45 до 1.07%. Дистанции между *M. parthenoides* и другими видами подрода *Mellicta* составляют от 3.3% до 5.7%. *M. parthenoides*, образует обособленную кладу, которую мы рассматриваем как отдельную видовую группу (рисунок 8, 2, рисунок 9). На рисунке 10 представлен фрагмент дендрограммы 8, 2, включающий кладу группы *athalia*. Все виды группируются в поддержанные клады, что говорит об эффективности метода сравнения баркодов гена COI для идентификации видов данной группы. Межвидовые K2P-дистанции в группе *athalia*

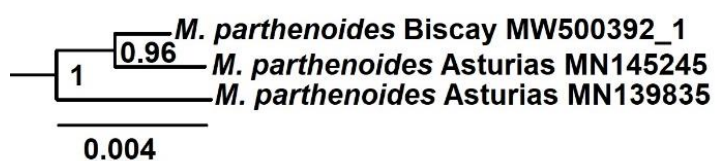


Рисунок 9. Фрагмент VA-дендрограммы, представленной на рисунке 8, 2. Клада, включающая группу *parthenoides*. В узлах показаны апостериорные вероятности.

составляют от 1.59 до 6.93%. Минимальные дистанции наблюдаются между *M. athalia* и *M. caucasogenita*, что согласуется с их морфологической близостью. Внутривидовые K2P-дистанции для большинства видов группы *athalia* не превышают 1%. Исключением является *M. plotina* – вид, обладающий высокими значениями как

межвидовых, так и внутривидовых K2P-дистанций. K2P-дистанции у *M. plotina* с другими видами *Mellicta* составляют от 4.39 до 6.93%. Внутривидовые дистанции – 1.96%. Возможно, столь высокие внутривидовые дистанции у *M. plotina* вызваны изолированным обитанием популяций: эта бабочка встречается локально по сырым долинным луговинам, в связи с чем поток генов между популяциями существенно ограничен. Также следует отметить японский подвид *M. ambigua nippona* Butler, 1878: K2P-дистанции между ним и популяциями *M. ambigua* с основной части материка составляют 1.58–1.90%. Тем не менее данный подвид надежно кластеризуется вместе с остальными популяциями *M. ambigua*, явные отличия в генитальных структурах между ними также отсутствуют. При помощи баркодинга была подтверждена принадлежность описанного нами из Северной Якутии изолированного подвида *M. ambigua kurmaevi* (Kolesnichenko et Bush, 2015) к этому виду. K2P-дистанции между данным подвидом и популяциями из основной части ареала *M. ambigua* составили 0.15–0.77%. Анализ популяций *M. britomartis* от Европы до Приморья, включая популяции из Монгольского Алтая (Аршантын-Нуруу), описанные в качестве отдельного вида *Melitaea elenae* Yakovlev, 2007, не выявил существенных отличий как по данному маркеру, так и по генитальным структурам. В группе *aurelia* (рисунок 11) наиболее обособленными являются *M. varia* и *M. alatautica*, что согласуется с их морфологическим своеобразием. Достоверно монофилетическую группу образуют *M. aurelia*, *M. distans*, комплекс *M. menetriesi*, *M. asteria* и *M. rebeli*. Эндемик Северо-Западного Тянь-Шаня *M. distans* долгое время считался подвидом *M. aurelia* (Higgins, 1955; Lukhtanov, Lukhtanov, 1994; Devyatkin, 2000; Toropov, Zhdanko, 2015; Буш, Колесниченко, 2016b). Нами была доказана его видовая самостоятельность (Kovalenko et al., 2020). Молекулярно-генетические данные подтвердили найденные нами морфологические отличия (рисунок 5), что является успешным примером использования данного метода для решения сложных таксономических вопросов. *M. distans* группируется отдельно от *M. aurelia* и отстоит от нее дальше (K2P составляют 1.70%), чем эндемик европейских Альп *M. asteria*. *M. asteria* также группируется в самостоятельную кладу, но при этом имеет низкие межвидовые генетические дистанции с *M. aurelia*, составляющие 0.76%. Тем не менее видовой статус *M. asteria* никогда не вызывал сомнений у исследователей: этот вид имеет не только отличительные черты в половом аппарате, но и является единственным представителем

подрода *Mellicta* с одной полосой на маргинальном крае испода заднего крыла (у остальных видов таких полос две).

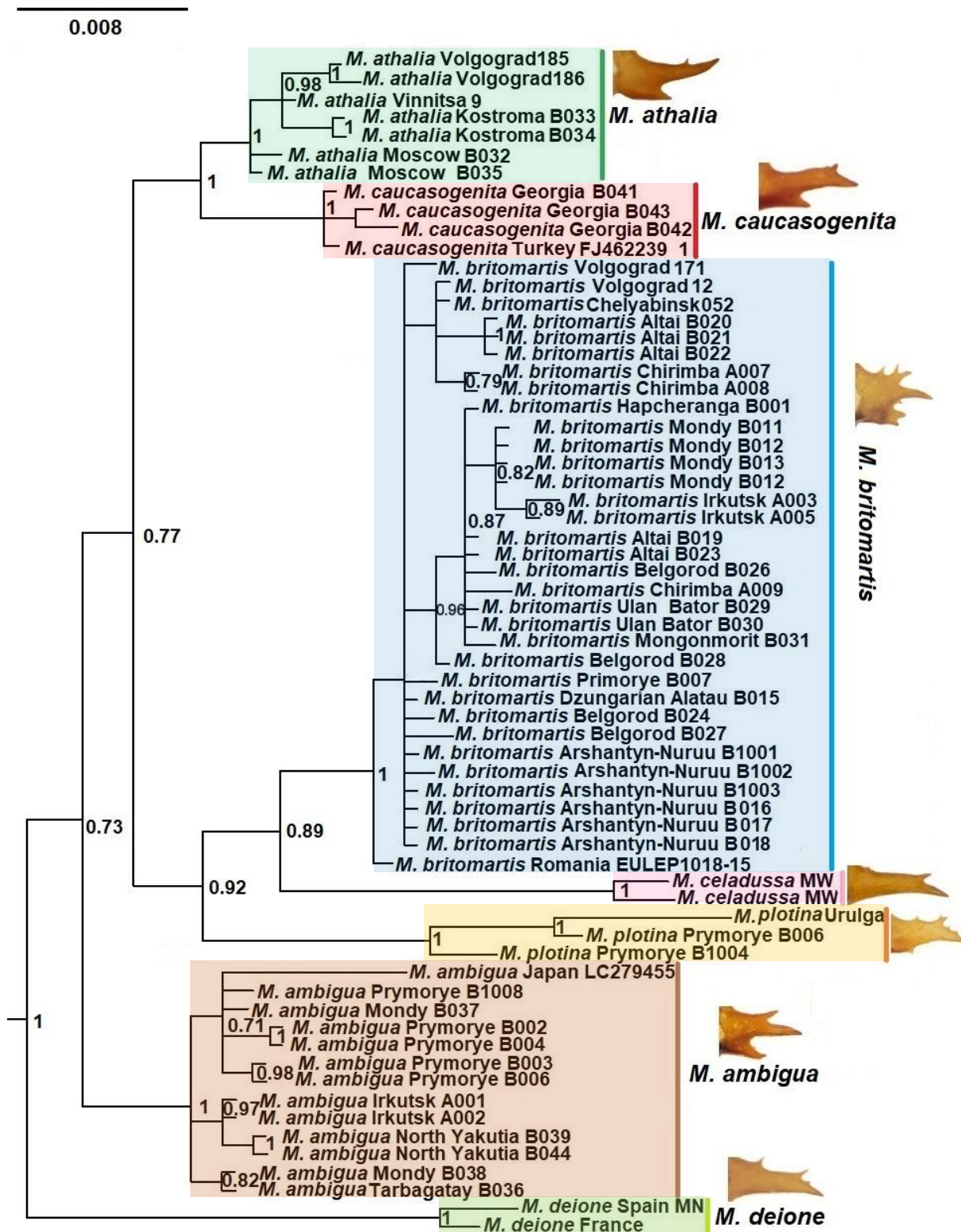


Рисунок 10. Фрагмент ВА-дендрограммы, представленной на рисунке 8, 2. Клада, включающая группу *athalia*. В узлах показаны апостериорные вероятности >0.6.

Одним из самых сложных вопросов в систематике подрода *Mellicta* является взаимоотношение *M. menetriesi* Caradja, 1895 и близких таксонов. Существует множество концепций на этот счет, начиная от разделения *M. menetriesi* на отдельные виды (Devyatkin, 2000) – собственно *M. menetriesi* (камчатские популяции), *M. centralasiae* Wnukowsky, 1929 (популяции с основной части материка от Алтая до северо-востока Евразии) и *M. westsibirica* [Korshunov et Dubatolov], 1998 (популяции из Западной Сибири, несущие в половом аппарате черты *M. aurelia*), и заканчивая объединением *M. menetriesi* и близких таксонов с западноевразийским видом *M. aurelia* в один вид на основании промежуточного строения гениталий в контактной зоне (Ивонин и др., 2013). Метод сравнения баркодов гена COI показал наличие двух комплексов *M. menetriesi*. Первый, который мы назвали восточный комплекс, включает популяции, распространенные от Забайкалья и сопредельных территорий до Камчатки. Данный комплекс характеризуется низкой изменчивостью гениталий самок и самцов. К2P-дистанции между восточным комплексом *M. menetriesi* и *M. aurelia* составили 2.01–2.75%. К2P-дистанции в пределах восточного комплекса составили от 0 до 0.96%. Вторую группу, основной ареал которой лежит в Алтае-Саянской горной стране, мы обозначили как западный комплекс. Западный комплекс *M. menetriesi* обладает высокой изменчивостью гениталий и кластеризуется вместе с *M. aurelia* и близкими таксонами, а изученные экземпляры из Западной Сибири (таксон *M. menetriesi westsibirica*), где проходят границы ареалов *M. aurelia* и *M. menetriesi*, и вовсе оказались идентичными *M. aurelia* по данному генетическому маркеру. К2P-дистанции между остальными представителями западного комплекса и *M. aurelia* составляют 0.30–0.61%. Мы полагаем, что подобная картина обусловлена интрогрессией между *M. aurelia* и *M. menetriesi*. Данное явление известно для шашечниц рода *Melitaea* (Pazhenkova, Lukhtanov, 2021; Hinojosa et al., 2024), в том числе и для представителей подрода *Mellicta*, к которым относятся парapatрические виды *M. athalia* и *M. celadussa* с зоной контакта в юго-западной Европе, (Tahami et al., 2021). Восточный и западный комплексы *M. menetriesi* не имеют стабильных и четких отличий в половом аппарате, и на данном этапе исследований мы рассматриваем все популяции *M. menetriesi* в качестве одного комплексного вида. С западным комплексом *M. menetriesi* тесно связан алтайский высокогорный эндемик *M. rebeli*, представляющий собой его ветвь – значительно дивергировавшую морфологически и обладающую видовыми признаками. Изученные популяции *M. rebeli* из Российского и Монгольского Алтая по фрагменту гена COI образуют достоверно монофилетическую группу, что подтверждается их стабильными морфологическими отличиями, основными из которых являются укороченные зубцы субункуса, отсутствие остиум-киля эдеагуса и специфическое строение каудального отростка вальвы. Изученные особи из типовой серии таксона *M. rhea* (Churkin et Devyatkin, 2005) с хребта Алагхайрхан оказались идентичными по указанному маркеру особям из более северных частей Монгольского Алтая, а также с хребта Сайлюгем Российского Алтая. Бабочки с плато Укок показали от них слабые отличия в 0.15%. Все эти популяции не имеют четких отличий в строении гениталий: крошечные зубцы субункуса, указанные как основной отличительный признак *M. rhea*, были обнаружены также у некоторых экземпляров *M. rebeli* с плато Укок и из других регионов Российского и Монгольского Алтая. На настоящем этапе исследований мы рассматриваем данные популяции в качестве одного вида *M. rebeli*. Тем не менее популяции с хребта Алагхайрхан обладают определенным уровнем своеобразия по сравнению с остальными: их крылья имеют рыжую окраску с редукцией темных элементов рисунка, каудальный отросток вальвы характеризуется тенденцией к редукции вентрального

зубца, а антевагинальная пластинка самок расширена. Хребет Алагхайрхан лежит в Юго-Западной Монголии и географически изолирован от северных хребтов Монгольского Алтая, более засушлив, с явным климатическим влиянием лежащей неподалеку пустыни Гоби. Алагхайрхан является западной границей Южно-Монгольского зоогеографического района (Яковлев, Гуськова, 2013). Ботаники оценивали своеобразие этого района еще более высоко и рассматривали его в качестве отдельной провинции (Камелин, 2005). С учетом всего этого мы рассматриваем таксон *rhea* как отдельный подвид, находящийся, вероятно, в процессе видообразования.

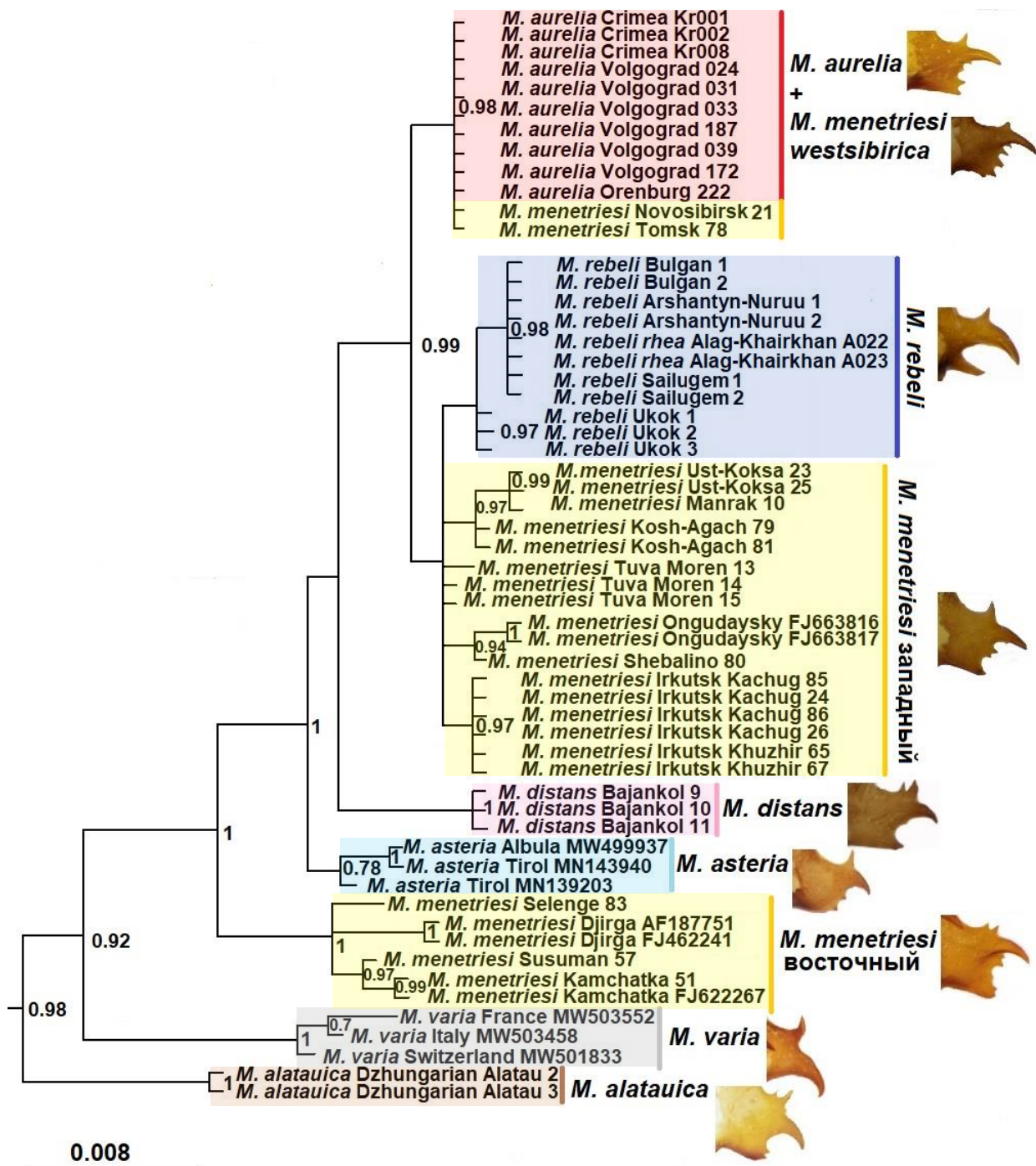


Рисунок 11. Фрагмент ВА-дендрограммы, представленной на рисунке 8, 2. Клада, включающая группу *aurelia*. В узлах показаны апостериорные вероятности >0.6.

Нами получены данные нуклеотидных последовательностей фрагмента ядерного гена 18S рРНК *M. aurelia*, представителей *M. menetriesi* из восточного комплекса (аймак Сэлэнгэ в Монголии) и западного комплекса (Алтай, Тува), а также таксона *M. menetriesi westsibirica* из Томской области (с. Лучаново). На рисунке 12 показаны в сравнении филогенетические взаимоотношения этих таксонов на основе указанного ядерного маркера (рисунок 12, 1) и COI (рисунок 12, 2). Методы ВА, ML и МР дали дендрограммы с идентичной топологией. Популяции *M. menetriesi*, разошедшиеся по фрагменту гена COI, оказались собранными в монофилетическую группу по данным фрагмента гена 18S рРНК. Полученный результат свидетельствует в пользу нашей гипотезы о митохондриальной интрогрессии между *M. menetriesi* и *M. aurelia*. Данный вопрос требует более глубокой проработки и на нынешнем этапе мы можем констатировать перспективность выбранного ядерного маркера для дальнейших исследований. С учетом всех полученных на настоящий момент данных предложена следующая внутривидовая дифференциация комплекса *M. menetriesi*: *M. menetriesi westsibirica* [Korshunov et Dubatolov], 1998 (Западная Сибирь), *M. menetriesi saurica* Yakovlev, 2007 (Алтае-Саянская горная страна), *M. menetriesi centralasiae* Wnukowsky, 1929 (Забайкалье и прилежащие территории), *M. menetriesi kolymskya* Higgins, 1955 (северо-восточная часть Евразии), номинативный подвид (Камчатка).

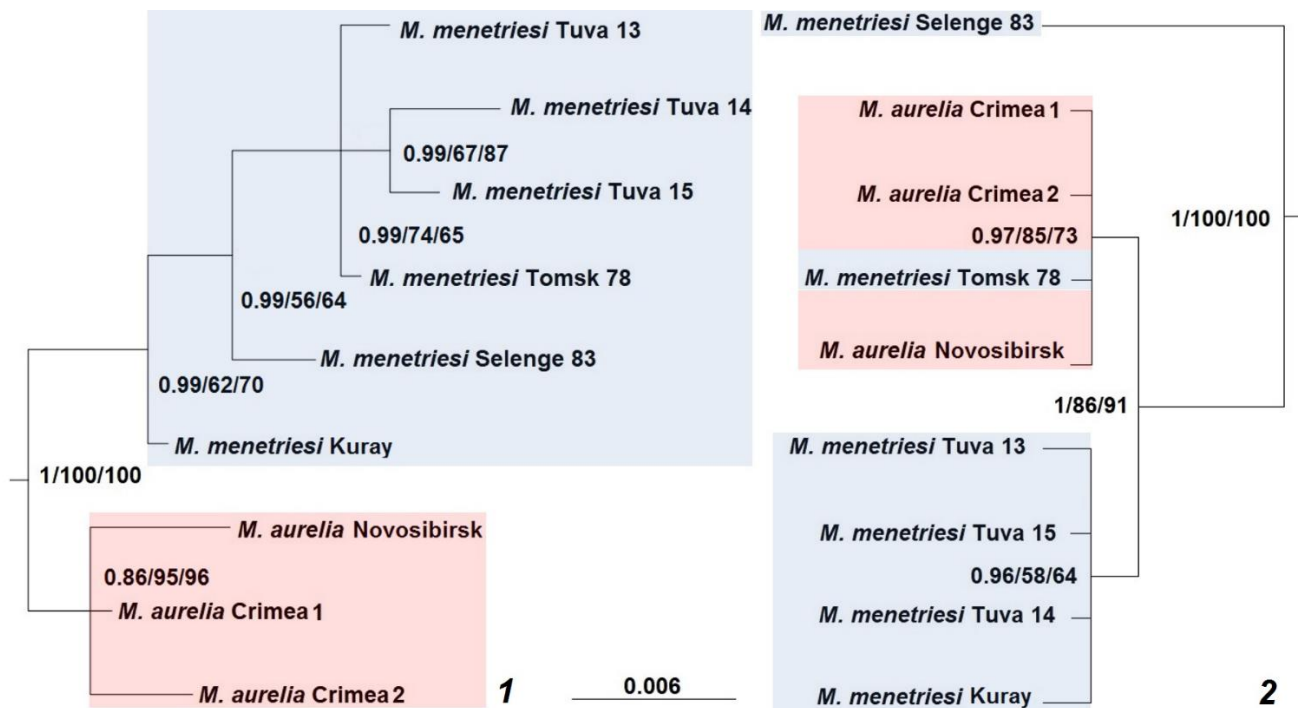


Рисунок 12. Филогенетические связи между парapatрическими видами *M. aurelia* и *M. menetriesi* по данным анализа фрагмента гена 18S рРНК (1) и COI (2). В узлах показаны поддержки для методов ВА/ML/МР.

ГЛАВА 7.

Биология и распространение шашечниц подрода *Mellicta*

Шашечницы данной группы являются мезофилами и трофически связаны с двадцатью четырьмя родами растений, относящихся к восьми семействам. Спектр кормовых растений внутри подрода достаточно сходен, большинство видов развивается на представителях родов *Plantago*, *Veronica* и *Melampyrum*. Шашечницы подрода *Mellicta* имеют два центра видовой разнообразия – Альпы и Алтае-Саянскую горную страну, в первом

встречается восемь видов, во втором – семь. Группы *parthenoides* и *athalia* обладают бóльшей экологической пластичностью по сравнению с группой *aurelia*: у них нет четкой приуроченности к высотам, в зависимости от условий они способны переходить от моновольтинности к бивольтинности и характеризуются широкими ареалами, в то время, как для группы *aurelia* свойственна высокая степень эндемизма и имеется лишь два широкоареальных вида – *M. aurelia* и *M. menetriesi*. В виде отдельных обсуждений вынесены новые оригинальные данные, полученные в ходе настоящей работы, к основным из которых относится уточнение типового местонахождения *M. distans*, расположенное близ устья р. Кок-Терек на территории Китая, для которой вид указывается впервые (ранее типовое место этого таксона трактовалось как территория Юго-Восточного Казахстана), а также другие новые точки. Кроме того, нами была установлена ранее неизвестная часть ареала *M. ambigua*, расположенная в бассейне р. Яна Северо-Восточной Якутии и лежащая в сильной изоляции от основного ареала. Данные популяции были описаны нами как новый подвид *M. ambigua kurmaevi* (Kolesnichenko et Bush, 2015).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые проведена комплексная работа, включающая сочетание морфологических и молекулярно-генетических методов применительно ко всем известным видам шашечниц подрода *Mellicta*. В морфологической части работы существенное внимание было уделено внутривидовой (включая внутривидовую) изменчивости полового аппарата самцов и самок, что позволяет сделать достоверные выводы о надежности тех или иных структур для видовой диагностики. Новым и важным аспектом в исследовании шашечниц стало изучение взаимодействия гениталий во время спаривания, и таким образом были установлены функции соответствующих структур, что позволило сделать дополнительные выводы об эволюции полового аппарата в подрode *Mellicta*, а также о значимости тех или иных признаков для систематики группы. Деление подрода на видовые группы на основе морфологических признаков самцов и самок подтверждено методом сравнения баркодов фрагмента гена COI, что отражает высокое значение применения данного молекулярно-генетического маркера в разработке системы изучаемой группы бабочек. Выявленные видовые группы имеют также свои экологические и зоогеографические особенности, что было установлено на основе впервые проведенного анализа для всех видов подрода. Фрагмент гена COI показал высокую эффективность в видовой диагностике подрода *Mellicta*: подавляющее большинство видов надежно определяется при помощи баркодинга. Ограничения применения данного метода для диагностики наблюдаются в зоне контакта парапатрических видов, где мы предполагаем интрогрессию. Тем не менее, для подобных случаев остается морфологический метод, а также возможное применение ядерных маркеров, первые шаги к чему уже сделаны в нашей работе на примере фрагмента гена 18S рРНК. Применение молекулярно-генетических методов в сочетании с морфологией (в том числе ранее неизвестных диагностических признаков), а также экологических и зоогеографических данных позволило решить ряд спорных таксономических вопросов, что еще раз подчеркивает эффективность комплексных исследований в систематике. В рамках данной работы впервые осуществлено изучение преимагинальных стадий шашечниц подрода *Mellicta* при помощи электронно-сканирующей микроскопии и описана хетотаксия гусениц первого возраста.

Получены результаты, свидетельствующие о перспективности использования признаков яиц в качестве дополнительных для систематики и диагностики группы. Данная стадия развития диагностична по меньшей мере на уровне видовых групп. Основным практическим результатом нашей работы стало создание определительных ключей, охватывающих все виды группы и снабженных большим количеством иллюстраций. Наиболее важной составляющей определительных ключей стал раздел по самкам, определение по которым ранее было фактически не разработано. В качестве перспектив дальнейшего развития темы можно выделить в первую очередь продолжение изучения взаимодействия гениталий во время спаривания, которое в нашей работе изучалось на примере одного вида и на основании сравнительно-морфологического анализа было экстраполировано на остальные. Перспективным направлением является использование фрагмента гена 18S рРНК в систематике сложных таксонов группы (что осуществлено нами в виде первых шагов), а также других ядерных маркеров для детального изучения взаимодействия парапатрических видов *M. aurelia* и *M. menetriesi*. В отношении данных видов высокий интерес представляют и цитогенетические исследования. Отдельным перспективным направлением является продолжение изучения преимагинальных стадий шашечниц подрода *Mellicta*.

ВЫВОДЫ

1. У шашечниц подрода *Mellicta* при копуляции зубцы суббункуса взаимодействуют с поствагинальной пластинкой, каудальные отростки вальв – с аурикулами, остиум-киль эдеагуса и морула закрепляются в дуктусе самки. Гарпы выполняют функцию фиксации и направления в половые пути самки эдеагуса. Основными диагностическими признаками гениталий самцов и самок являются особенности структур, взаимодействующих друг с другом при спаривании.

2. Эволюционные преобразования полового аппарата у шашечниц подрода *Mellicta* связаны с совершенствованием фиксации при копуляции. Виды со слабо загнутым каудальным отростком вальвы обладают большим набором иных сцепляющих генитальных структур по сравнению с видами, имеющими резко загнутый каудальный отросток.

3. На основании морфологии в подрode выделяются три видовые группы: *parthenoides*, *athalia* и *aurelia*. Основными отличительными признаками групп являются особенности строения каудального отростка вальвы, сочетание набора структур, участвующих в сцеплении, а также строение генитальных пластинок и антрума самок.

4. Стадия яйца обладает диагностическим значением на уровне видовых групп: для группы *parthenoides* характерна бочонко-грушевидная форма яиц, для группы *athalia* – бочонковидная, для группы *aurelia* – овальная.

5. Деление подрода на видовые группы на основании нуклеотидной последовательности фрагмента гена первой субъединицы цитохром *c*-оксидазы (COI) совпадает с системой, основанной на данных морфологии.

6. Фрагмент ядерного гена 18S рРНК является перспективным молекулярно-генетическим маркером в спорных вопросах систематики шашечниц подрода *Mellicta*.

7. Шашечницы подрода *Mellicta* имеют два центра видового разнообразия – Альпы и Алтае-Саянскую горную страну. Группы *parthenoides* и *athalia* характеризуются большей экологической пластичностью по сравнению с группой *aurelia*: у них нет четкой приуроченности к высотам, в зависимости от условий они способны переходить от

моновольтинности к бивольтинности и среди них много широкоареальных видов, в то время как для группы *aurelia* характерна высокая степень эндемизма.

8. Подрод *Mellicta* включает восемь политипических и семь монотипических видов. Каждый вид характеризуется уникальной комбинацией морфологических признаков.

Благодарности. Я выражаю глубокую благодарность своему научному руководителю К.А. Колесниченко за руководство и неоценимую помощь при подготовке данной работы. Также я очень признательна своим покойным учителям – А.В. Свиридову и А.Л. Девяткину, внесших большой вклад в формирование меня как специалиста по изучаемой группе. За предоставленную возможность работы с материалом при подготовке данной работы выражаю признательность А.В. Свиридову (ЗММУ), С.Ю. Синеву и А.Л. Львовскому (ЗИН РАН), П.В. Богданову (ГДМ), А.С. Лелею (ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН), В.К. Тузову, С.В. Чуркину, А.В. Курмаеву, А.В. Крупицкому, Д.В. Моргуну, И.А. Юдакову (Москва), Н.А. Шаповалу и Г.Н. Шаповал (Санкт-Петербург); О.Э. Костерину (Новосибирск), Р.В. Яковлеву, Е.Р. Свиринову (Барнаул), Е.Ю. Захаровой (Екатеринбург), И.Г. Плющу (Киев), А.В. Филиппову (Улан-Удэ), Р.Э. Максимова (Красноярск), С.А. Князеву (Омск). Хочу сказать большое спасибо Дж. Х. Бозано (Италия) за помощь в изучении типового материала. За помощь в переводе литературных источников с немецкого языка выражаю благодарность С.М. Колчановой. За сотрудничество в осуществлении молекулярно-генетической части данной работы я выражаю благодарность А.А. Кудрявцевой, И.В. Манухову (Лаборатория молекулярной генетики Московского физико-технического института), Н.А. Шаповалу и Г.Н. Шаповал (Отделение кариосистематики Лаборатории систематики насекомых ЗИН РАН), а также руководителям проекта «Barcode of Life» – А. В. Борисенко (Dr. Alex Borisenko), Меган Мильтон (Megan Milton) (Канадский Центр ДНК-штрихкодирования) и Полу Эберу (Dr. Paul Hebert) (Гуэлфский университет). За ценные замечания, консультации, поддержку и всестороннюю помощь на разных этапах работы я выражаю благодарность А.Г. Бушу, Т.В. Галинской, И.О. Камаеву, Я.Н. Коваленко, С.К. Корбу, К.П. Корневу, А.В. Крупицкому, С.А. Курбатову, Ю.А. Ловцовой, С.Н. Лысенкову, Д.В. Моргуну, А. А. Намятовой, Н.А. Пояркову, В.В. Проклову, А.В. Сидорову, Е.Н. Соловьевой, А.В. Суворову, А.С. Хижняковой и А.В. Шипулину, а также всему коллективу кафедры энтомологии биологического факультета МГУ.

ТОМ 2 (приложения к ТОМУ 1)

Приложение А. Этикеточные данные изученного материала.

Приведены этикеточные данные (без изменений) всех исследованных экземпляров с указанием мест хранения.

Приложение Б. Внутривидовая вариабельность половых структур самцов шашечниц подрода *Mellicta*.

Представлены ряды изменчивости генитальных структур в различных популяциях видов, выполненные путем зарисовки.

Приложение В. Определительные ключи шашечниц подрода *Mellicta*.

Приведены определительные ключи шашечниц изучаемой группы по самцам и самкам, составленные на основании всех полученных данных.

Приложение Г. Морфологическое описание яиц изученных видов *Melitaeini* с этикеточными данными и количеством исследованного материала.

Приведены морфологические описания яиц для каждого изученного вида трибы Melitaeini с указанием этикеточных данных и количества исследованных яиц.

Приложение Д. Видовые группы подрода *Mellicta*.

Приведен таксономический состав подрода с указанием распространения и типовых местонахождений таксонов.

Приложение Е. Полученные нуклеотидные последовательности.

Приведены полученные сиквенсы фрагментов генов COI и 18S рРНК.

Приложение Ж. Дендрограммы, построенные при помощи методов максимального сходства (ML) и ближайшей экономии (MP).

Представлены дендрограммы филогенетических связей между представителями подрода *Mellicta* по данным анализа фрагмента гена COI, построенные при помощи методов максимального сходства (ML) и ближайшей экономии (MP).

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых в международных базах данных Scopus, Web of Science, RSCI

1. Буш М.Г. Шашечницы рода *Mellicta* (Lepidoptera, Nymphalidae) Европейской России: изменчивость гениталий и молекулярная диагностика // Бюллетень Московского общества испытателей природы. Отдел биологический. 2011. Т. 116, №5, с. 21–31. РИНЦ: 0.371. 1,3 усл. печ. л.

2. Колесниченко К.А., Буш М.Г., 2015. Географическое распространение и подвидовая структура шашечницы *Mellicta ambigua* (Ménétriés, 1859) (Lepidoptera, Nymphalidae) // Зоологический журнал. Т. 94. № 9. С. 1051–1064. SJR: 0.162. [Английский перевод: Kolesnichenko K.A, Bush M.G. Geographical Distribution and Subspecies Structure of *Mellicta ambigua* (Ménétriés, 1859) (Lepidoptera, Nymphalidae) // Entomological Review. 2015. V. 95 №6, p. 752–765. SJR: 0.346]. 1,6/0,8 усл. печ. л.: концепция, сбор и обработка данных, текст.

3. Буш М.Г., Колесниченко К.А. Возможности использования строения полового аппарата самок для видовой диагностики и классификации видов шашечниц рода *Mellicta* Billberg, 1820 (Lepidoptera, Nymphalidae). 1. Виды группы *M. athalia* (Rottensburg, 1775) // Зоологический журнал. 2016. Т. 95, № 5. с. 557–566. SJR: 0.162. [Английский перевод: Bush M.G., Kolesnichenko K.A. The Possibility of Using Characters of the Female Genital Armature for Species Diagnostics and Classification of the Genus *Mellicta* Billberg, 1820 (Lepidoptera, Nymphalidae): 1. *Mellicta athalia* (Rottensburg, 1775) Species Group // Entomological Review. 2016. V. 96, №4, p. 462–471. SJR: 0.346]. 1,1/0,7 усл. печ. л.: концепция, сбор и обработка данных, текст.

4. Буш М.Г., Колесниченко К.А. Возможности использования строения полового аппарата самок для видовой диагностики и классификации видов шашечниц рода *Mellicta* Billberg, 1820 (Lepidoptera, Nymphalidae). 2. Виды группы *M. aurelia* (Nickerl, 1850) // Зоологический журнал. 2016. Т. 95, № 8, с. 945–954. SJR: 0.162. [Английский перевод: Bush M.G., Kolesnichenko K.A. The Possibility of Using Characters of the Female Genital Armature for Species Diagnostics and Classification of the Genus *Mellicta* Billberg, 1820 (Lepidoptera, Nymphalidae): 2. *M. aurelia* (Nickerl, 1850) Species Group // Entomological Review. 2016. V. 96, №7, p. 902–910. SJR: 0.346]. 1,1/0,7 усл. печ. л.: концепция, сбор и обработка данных, текст.

5. **Kovalenko M.G.**, Kolesnichenko K.A., Kudryavtseva A.A. Revealing the specific status of *Mellicta distans* Higgins, 1955, stat. n. (Lepidoptera, Nymphalidae) with morphological and molecular characters // Zootaxa. 2020. V. 4853, №3, p. 353-368. SJR: 0.526. 1,8/0,9 усл. печ. л.: концепция, сбор и обработка данных, текст.

6. Lovtsova J.A., **Kovalenko M.G.**, Gura N.A., Shipulin A.V., Kochiev M.V. 2023. A new method of staining larvae of Lepidoptera using carbol fuchsin // Russian Entomological Journal. 2023. V.32, №2, p.194–197. SJR: 0.416. 0,4/0,1 усл. печ. л.: концепция, сбор и обработка данных, текст.

7. **Коваленко М.Г.**, Колесниченко К.А. Новые данные о распространении малоизвестной шашечницы *Melitaea (Mellicta) distans* (Higgins, 1955) (Lepidoptera, Nymphalidae) с уточнением типового местонахождения // Энтомологическое обозрение. 2023. Т. 102, №3, с. 510-516. РИНЦ: 0.385. [Английский перевод: **Kovalenko M.G.**, Kolesnichenko K.A. New Data on the Distribution of the Little Known Fritillary *Melitaea (Mellicta) distans* (Higgins, 1955) (Lepidoptera, Nymphalidae) with Clarification of Its Type Locality. 2023. Entomological Review 103 (6), 666–670. SJR: 0.346]. 0,5/0,3 усл. печ. л.: концепция, сбор и обработка данных, текст.