



<https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-2-480-485>  
<https://zoobank.org/References/FA8C26EB-F501-498E-999E-A9B86F45A9C7>

УДК 595.789

## Второе поколение редкой голубянки *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* (Eversmann, 1841) (Lepidoptera: Lycaenidae) в окрестностях г. Саратова

А. Г. Белик<sup>1</sup>✉, А. В. Гагарина<sup>2</sup>, В. А. Лухтанов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Независимый исследователь, г. Саратов, Россия

<sup>2</sup>Зоологический институт РАН, Университетская наб., д. 1, 199034, г. Санкт-Петербург, Россия

### Сведения об авторах

Белик Алексей Григорьевич  
E-mail: [cdr.jameson@mail.ru](mailto:cdr.jameson@mail.ru)

Гагарина Анастасия Владимировна  
E-mail: [Anastasiya.Gagarina@zin.ru](mailto:Anastasiya.Gagarina@zin.ru)  
SPIN-код: 6272-9586  
Scopus Author ID: 57203206266  
ResearcherID: AAE-1300-2022  
ORCID: 0000-0002-2866-4963

Лухтанов Владимир Александрович  
E-mail: [lukhtanov@mail.ru](mailto:lukhtanov@mail.ru)  
SPIN: 8394-5511  
Scopus Author ID: 6506326503  
ResearcherID: C-6740-2008  
ORCID: 0000-0003-2856-2075

**Права:** © Авторы (2024). Опубликовано Российским государственным педагогическим университетом им. А. И. Герцена. Открытый доступ на условиях лицензии CC BY-NC 4.0.

**Аннотация.** В окрестностях г. Саратова впервые обнаружена вторая генерация редкого вида голубянки *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* (Eversmann, 1841). Ранее отсюда вид был известен лишь по первой генерации. Видовая принадлежность подтверждена анализом ДНК. Описана методика и результаты ДНК-баркодинга гена *COI* (митохондриальной цитохром с-оксидазы). Описываются отличия самцов первой и второй генераций. Приводятся данные о распространении и фенологии вида в окрестностях г. Саратова и Нижнем Поволжье в целом.

**Ключевые слова:** Lycaenidae, *Polyommatus damone*, ДНК-баркодинг, распространение, фенология, окрестности г. Саратова

## The second generation of a rare Blue *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* (Eversmann, 1841) (Lepidoptera: Lycaenidae) in the vicinity of Saratov, Russia

A. G. Belik<sup>1</sup>✉, A. V. Gagarina<sup>2</sup>, V. A. Lukhtanov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Independent researcher, Saratov, Russia

<sup>2</sup>Zoological Institute of the RAS, 1 Universitetskaya Emb., 199034, Saint Petersburg, Russia

### Authors

Alexei G. Belik  
E-mail: [cdr.jameson@mail.ru](mailto:cdr.jameson@mail.ru)

Anastasia V. Gagarina  
E-mail: [Anastasiya.Gagarina@zin.ru](mailto:Anastasiya.Gagarina@zin.ru)  
SPIN: 6272-9586  
Scopus Author ID: 57203206266  
ResearcherID: AAE-1300-2022  
ORCID: 0000-0002-2866-4963

Vladimir A. Lukhtanov  
E-mail: [lukhtanov@mail.ru](mailto:lukhtanov@mail.ru)  
SPIN: 8394-5511  
Scopus Author ID: 6506326503  
ResearcherID: C-6740-2008  
ORCID: 0000-0003-2856-2075

**Copyright:** © The Authors (2024). Published by Herzen State Pedagogical University of Russia. Open access under CC BY-NC License 4.0.

**Abstract.** The second generation of a rare blue butterfly species *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* (Eversmann, 1841) was discovered in the vicinity of the city Saratov, Russia. Previously, the species was known from here only from the first generation. Species identification was confirmed by DNA analysis. The article describes the method and results of DNA barcoding of the *COI* gene (mitochondrial cytochrome c-oxidase). It also discusses the differences between males of the first and second generations. The paper also provides data on the distribution and phenology of the species in the vicinity of Saratov and in the Lower Volga region as a whole.

**Keywords:** Lycaenidae, *Polyommatus damone*, DNA-barcoding, distribution, phenology, vicinity of Saratov (SE European Russia)

## Введение

Голубянка *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* (Eversmann, 1841) является одним из редких видов фауны России. Идентификация этого вида может быть затруднена тем, что он морфологически изменчив, например, помимо особей с типичным фенотипом, характеризующимся наличием белого луча на исподе задних крыльев, могут встречаться экземпляры без белого луча. Кроме того, на значительной части европейского ареала он встречается совместно с морфологически сходным видом *P. damocles*. Биология *P. damone* на севере Саратовской (окрестности городов Хвалынский и Вольск) и севере Волгоградской областей (Камышинский р-н) была изучена А. В. Данченко, который показал, что в этих районах вид развивается в двух генерациях, хотя в Крыму и в азиатской части ареала вид имеет только одну генерацию в течение года (Dantchenko 1997).

В данном сообщении мы приводим информацию по встречаемости и фенологии *P. damone* в окрестностях г. Саратова (примерно посередине между вышеуказанными локациями), в том числе подтверждение возможности появления бабочки второй генерации, выявленное с использованием метода ДНК-баркодинга.

## Методы

Молекулярный анализ образца VL698, собранного А. Г. Беликом 2 сентября 2023 г. в окрестностях Саратова, был осуществлен в отделении кариосистематики Зоологического института РАН. ДНК была выделена из двух ножек этого экземпляра СТАВ-методом (Doyle, Doyle 1987) с модификациями. Попытка амплификации стандартного для ДНК-баркодинга фрагмента гена COI длиной 658 п. н. с использованием стандартных праймеров (Folmer et al. 1994) не привела к успеху, вероятно, вследствие деградации ДНК в процессе размачивания экземпляра для его расправления, поэтому был амплифицирован более короткий фрагмент (311 п. н.) с использованием праймеров LepF (5'-ATTCA

ACCAATCATAAAGATATTGG-3') и MH-MR1 (5'-CCTGTTCCAGCTCCATTTTC-3') (Hajibabaei et al. 2006).

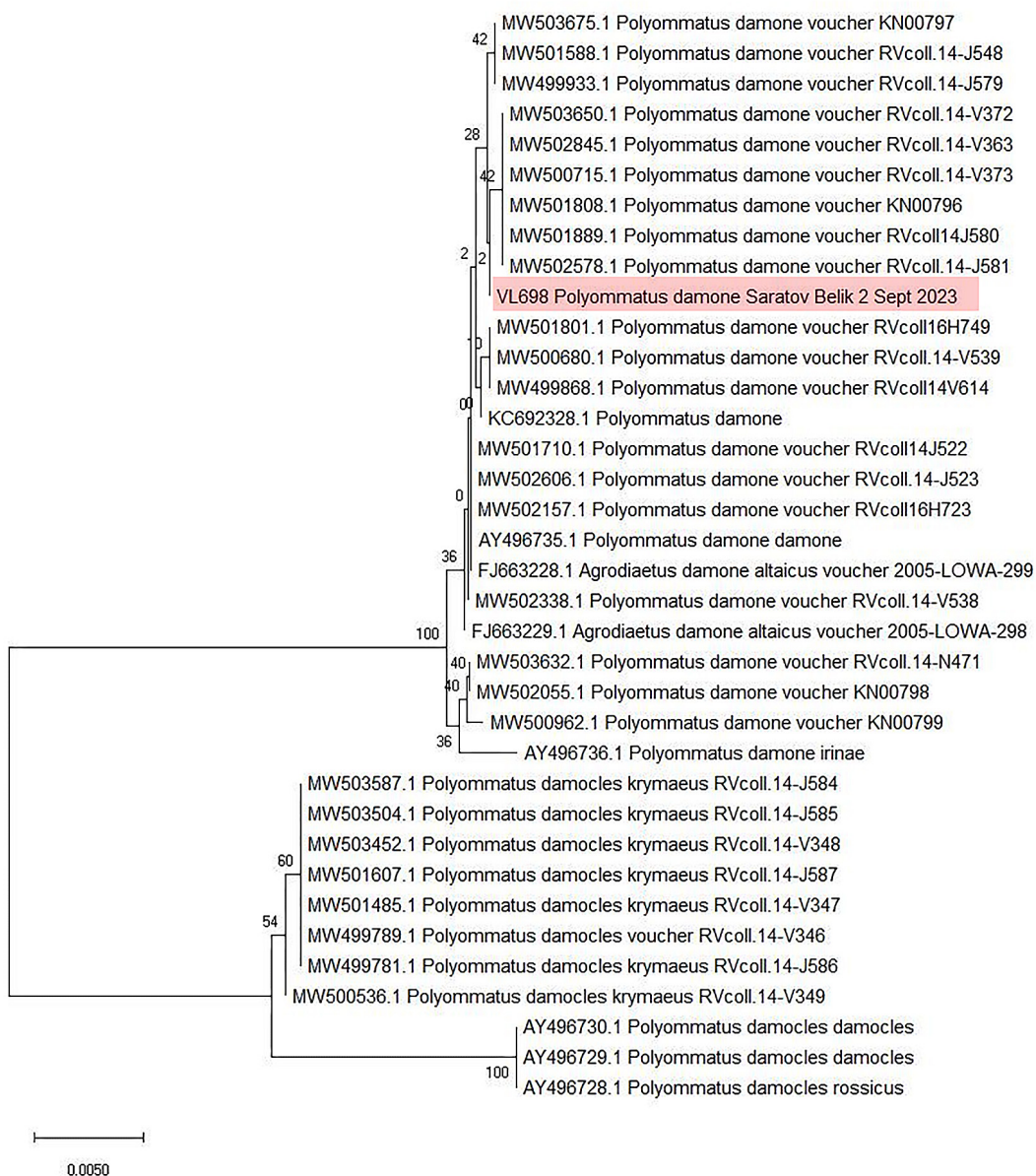
Реакционная смесь для ПЦР объемом 50 мкл содержала 20 нг геномной ДНК, 0,5 мкМ каждого праймера и 10 мкл 5X ScreenMix-HS (Евроген, Москва, Россия). Амплификацию проводили в соответствии со следующим температурным профилем: начальная денатурация при 94°C 5 мин; далее 35 циклов, включающих в себя денатурацию при 94°C 1 мин, отжиг праймеров при 50°C 30 сек, элонгацию при 72°C 1 мин; и финальная элонгация при 72°C 10 мин. Оценку успешности ПЦР проводили при помощи электрофореза продуктов амплификации в 1,5%-ном агарозном геле. Секвенирование ДНК осуществлено в компании Евроген (Москва). Полученная нуклеотидная последовательность депонирована в Международном генетическом банке под номером PP425898 (GenBank Overview 2024).

Для проведения сравнительного анализа были использованы доступные из Международного генетического банка последовательности митохондриального ДНК-баркода для видов *P. damone* и *P. damocles* (всего 35 последовательностей). Филограмма, включающая эти 35 последовательностей, а также полученную последовательность VL698, была построена с использованием метода ближайшего соседа (Neighbor-Joining) (Saitou, Nei 1987) в программе Mega X (Kumar et al. 2018), при этом для расчета эволюционных дистанций был использован метод максимального правдоподобия (Tamura et al. 2004). Для оценки устойчивости полученной топологии был использован бутстреп-тест (500 повторов) (Felsenstein 1985). Полученное неукорененное дерево показано на рис. 1.

Изученный экземпляр находится в личной коллекции А. Г. Белика.

## Результаты и обсуждение

*Polyommatus (Agrodiaetus) damone* (Eversmann, 1841) был обнаружен первым автором в окрестностях г. Саратова на холме Буданова гора, примерно в 2.5 км к СЗ от



**Рис. 1.** Филограмма, показывающая кластеризацию фрагментов гена COI для особей *P. damone* и *damocles*. Образец из Саратовского района выделен розовой заливкой. Длина ветвей, соответствующая накоплению различий 0.5% с учетом используемой модели, показана в виде линии в левой нижней части рисунка

**Fig. 1.** Phylogenetic tree showing the clusterization of the COI fragments of *P. damone* and *P. Damocles* specimens. The specimen from the Saratov District is highlighted pink. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The scale is shown as a line at the bottom left of the figure

с. Багаевка Саратовского района Саратовской области. Этот крайне локальный вид регистрировался здесь в единственной точке в 1997, 2000, 2001, 2013 и 2018 гг. Необходимо отметить, что обнаруженная популяция крайне малочисленна, несмотря на то что на восточном и отчасти на юж-

ном склонах холма существует мощная популяция кормового растения гусениц, копеечника крупноцветкового (*Hedysarum grandiflorum* Pallas, 1773) (Fabaceae). Лишь в 1997 г. здесь был отмечен массовый лёт бабочек (09.06.1997, 12–13.06.1997), в остальные годы были отмечены единичные наход-





**Рис. 2.** Голубянки *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* из окрестностей г. Саратова, 1-я и 2-я генерации: 1–2 — 2-я генерация, самец (1 — верхняя сторона крыльев, 2 — нижняя сторона крыльев); 3–4 — 1-я генерация, самец (3 — верхняя сторона крыльев, 4 — нижняя сторона крыльев). Фото: А. Г. Белик

**Fig. 2.** The Blues *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* from the vicinity of Saratov. The 1<sup>st</sup> and the 2<sup>nd</sup> generations: 1–2 — 2<sup>nd</sup> generation, male (1 — upperside, 2 — underside); 1<sup>st</sup> generation, male (3 — upperside, 4 — underside). Photos by A. G. Belik

ки (08.06.2000 — 1♂, 1♀; 14.06.2001 — 2♀; 31.05.2013 — 3♂, 1♀ и 05.06.2013 — 2♂, 1♀; 18.06.2018 — 1♂). Однако 02.09.2023 неподалеку от Будановой горы первый автор собрал одного самца голубянки, которого он предварительно определил как *Polyommatus (Agrodiaetus) sp.* Определение до вида по внешним признакам оказалось затруднительным, поскольку бабочка отличалась от особей известных с территории Саратовской области видов *Polyommatus (Agrodiaetus)*, в то же время будучи сходной с имеющимися в наличии изображениями голубянок комплекса *P. (A.) damone — damocles* (Dantchenko, Lukhtanov 1993; Ту-

зов et al. 2000). Обсуждаемый экземпляр оказался заметно мельче самцов первой генерации *P. damone*: длина переднего крыла — 13 мм, размах крыльев — 22 мм, в то время как у самцов первой генерации *P. damone* длина переднего крыла в среднем — 15.8 мм, размах крыльев в среднем — 25.8 мм (размер выборки — 38 самцов первой генерации). Бабочка выглядит темнее самцов первой генерации *P. damone* за счет расширенной черной маргинальной каймы на верхней стороне крыльев и несколько более темного синего фона крыльев. С нижней стороны крыльев дискальные пятна заметно меньше, чем у самцов первой генера-

ции *P. damone*, а также примерно в два раза меньше площадь голубого прикорневого опыления задних крыльев.

Для идентификации этого экземпляра было принято решение провести ДНК-баркодинг. Хотя полученный фрагмент митохондриального гена COI был коротким (311 п. н.), он оказался достаточно информативным, чтобы однозначно отнести его к роду *Polyommatus*. Этот фрагмент оказался идентичным или почти идентичным аналогичному фрагменту для особей *P. damone* из разных частей ареала. В то же время он отличался множественными нуклеотидными заменами от этого фрагмента гена COI у *P. damocles* (рис. 1), единственного вида рода *Polyommatus* из Поволжья, имеющего крыловой рисунок, сходный с таковым у *P. damone*.

Анализ положения изученного экземпляра на полученном филогенетическом дереве (рис. 1), а также идентификация при помощи алгоритмов и базы данных системы BOLD (Barcode of life data system 2024) также однозначно показали, что экземпляр VL698 относится к *P. damone* (рис. 2.1–2.2). Для сравнения публикуем фотографии типичного самца первой генерации *P. damone* с Будановой горы (рис. 2.3–2.4).

Достаточно странно, что бабочка была найдена на удалении примерно 1 км к югу

от локальной популяции вида на Будановой горе, в том месте, где не произрастает кормовое растение гусениц и *P. damone* ранее не наблюдался.

О том, что на севере Саратовской (окрестности городов Хвалынский и Вольск) и севере Волгоградской областей (Камышинский р-н) голубянка *P. damone* (Eversmann, 1841) развивается в двух генерациях, известно достаточно давно (Dantchenko 1997). Все указанные выше сборы для окрестностей Саратова (кроме образца VL628), несомненно, относятся к первой генерации. Однако поимка свежего самца *P. damone* в начале сентября 2023 г. указывает, что вылет бабочек второй генерации в окрестностях Саратова также возможен.

### Финансирование

Таксономический анализ сделан в рамках гостемы № 122031100272-3. Молекулярные исследования поддержаны Российским научным фондом (грант № 24-14-00047).

### Funding

Molecular research is done within the scope of the state research project 122031100272-3 and with the support of the Russian scientific fund (grant № 24-14-00047).

### References

- Barcode of life data system (BOLD) (2024) *BOLD systems, v4*. [Online]. Available at: [https://www.boldsystems.org/index.php/IDS\\_OpenIdEngine](https://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine) (accessed 14.03.2024). (In English)
- Dantchenko, A. V. (1997) Notes on the biology and distribution of the *damone* and *damocles* species-complexes of the subgenus *Polyommatus (Agrodiaetus)* (Lepidoptera: Lycaenidae). *Nachrichten des Entomologischen Vereins Apollo*, suppl. 16, pp. 23–42. (In English)
- Dantchenko, A. V., Lukhtanov, V. A. (1993) Zur systematik und verbreitung der arten der *Polyommatus (Agrodiaetus) damone*-Gruppe Südosteuropas und Südwestbiriens (Lepidoptera, Lycaenidae). *Atalanta*, vol. 24, no. 1-2, pp. 75–83. (In German)
- Doyle, J. J., Doyle, J. L. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, vol. 19, no. 1, pp. 11–15. (In English)
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, vol. 39, no. 4, pp. 783–791. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x> (In English)
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W. et al. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, vol. 3, no. 5, pp. 294–299. PMID: 7881515. (In English)
- GenBank Overview (2024) *National Library of Medicine. National Center for Biotechnology Information*. [Online]. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (accessed 14.03.2024). (In English)
- Hajibabaei, M., Janzen, D. H., Burns, J. M. et al. (2006) DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 103, no. 4, pp. 968–971. <https://doi.org/10.1073/pnas.051046610> (In English)



- Kumar, S., Stecher, G., Li, M. et al. (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 35, no. 6, pp. 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096> (In English)
- Saitou, N., Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 4, no. 4, pp. 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454> (In English)
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004) Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 101, no. 30, pp. 11030–11035. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404206101> (In English)
- Tuzov, V. K. (ed.). (2000) *Guide to the butterflies of Russia and adjacent territories (Lepidoptera, Rhopalocera)*. Vol. 2. *Lybitheidae, Danaidae, Nymphalidae, Riodinidae, Lycaenidae*. Sofia: Pensoft Publ., 580 p. (In English)

**Для цитирования:** Белик, А. Г., Гагарина, А. В., Лухтанов, В. А. (2024) Второе поколение редкой голубянки *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* (Eversmann, 1841) (Lepidoptera: Lycaenidae) в окрестностях г. Саратова. *Амурский зоологический журнал*, т. XVI, № 2, с. 480–485. <https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-2-480-485>

**Получена** 7 марта 2024; прошла рецензирование 17 апреля 2024; принята 25 апреля 2024.

**For citation:** Belik, A. G., Gagarina, A. V., Lukhtanov, V. A. (2024) The second generation of a rare Blue *Polyommatus (Agrodiaetus) damone* (Eversmann, 1841) (Lepidoptera: Lycaenidae) in the vicinity of Saratov, Russia. *Amurian Zoological Journal*, vol. XVI, no. 2, pp. 480–485. <https://www.doi.org/10.33910/2686-9519-2024-16-2-480-485>

**Received** 7 March 2024; reviewed 17 April 2024; accepted 25 April 2024.