

УДК 595.789: 591.15 (470.1)

**ВИДОВОЙ СОСТАВ БЕЛЯНОЧЕК РОДА *LEPTIDEA* BILLBERG
(LEPIDOPTERA, PIERIDAE) НА СЕВЕРО-ВОСТОКЕ ЕВРОПЫ
ПО РЕЗУЛЬТАТАМ ДНК-ШТРИХКОДИРОВАНИЯ**

© 2022 г. О. И. Кулакова,* А. Г. Татаринев, Д. М. Шадрин

Институт биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН
ул. Коммунистическая, 28, Сыктывкар, 167982 Россия
*e-mail: kulakova@ib.komisc.ru

Поступила в редакцию 24.10.2022 г.
После доработки 18.11.2022 г.
Принята к публикации 25.11.2022 г.

Статья посвящена анализу распространения видов беляночек рода *Leptidea* на северо-востоке европейской части России. На основе изучения митохондриального ДНК-баркода (фрагмента гена цитохромоксидазы I длиной 658 пар нуклеотидов) подтверждено наличие в этом регионе трех видов: *L. sinapis* (Linnaeus, 1758), *L. morsei* (Fenton, 1881) и *L. juvernica* Williams, 1946. Выявлены видоспецифичные сайты изученной нуклеотидной последовательности.

Ключевые слова: Lepidoptera, Pieridae, *Leptidea*, COI, ДНК-баркодинг, северо-восток европейской части России.

DOI: 10.31857/S0367144522040104, **EDN:** NKOEQV

Род *Leptidea* Billberg, 1820 (русское название – беляночки) насчитывает 12 видов, распространенных в Евразии, преимущественно в пределах Палеарктической области. В Европе встречаются 5 видов: *L. sinapis* (Linnaeus, 1758), *L. duponcheli* (Staudinger, 1871), *L. morsei* (Fenton, 1881), *L. reali* (Reissinger, 1989) и *L. juvernica* Williams, 1946. По внешним признакам виды беляночек трудноразличимы, поэтому границы их распространения в Северной Евразии до последнего времени были неясны (Dincă et al., 2011, 2013; Solovyev et al., 2015; Shtinkov et al., 2016). Для фауны северо-востока европейской части России долгое время указывались два вида этого рода: *L. sinapis* и *L. morsei* (Седых, 1974; Татаринев, Долгин, 1999). Первый вид встречается по всей таежной зоне, а по интразональным местообитаниям проникает и в лесотундру. Исследования последних десятилетий показали не менее широкое распространение в регионе и второго вида, самые северные местонахождения которого известны на Приполярном и Полярном Урале (Моргун, 2017), а также на северо-западе Русской равнины вблизи Онежской губы (Большаков и др., 2008). Установлено, что на северо-востоке Европы *L. morsei* обычен в подзонах средней и северной тайги, а в крайне-северной и южной тайге редок. Оба вида имеют в регионе сходные экологические предпочтения и зачастую встречаются синтопично; весной и ранним летом они ле-

тают в одни сроки, однако развития второго (позднелетнего) поколения у *L. morsei* здесь пока не наблюдалось.

Относительно недавно на основе признаков строения копулятивных органов имаго было показано, что вид *L. sinapis* является сборным, и описан очень близкий к нему криптический вид *L. reali*. Самцы этого вида, имея практически идентичный с *L. sinapis* рисунок крыльев, заметно отличаются по длине эдеагуса и форме саккуса, а у самок проток копулятивной сумки более длинный. Вскоре после описания *L. reali* особи с признаками этого вида были обнаружены в большинстве стран Европы, в Западной и южной Сибири до Забайкалья, на Северном Кавказе и в Закавказье, в Малой и Средней Азии (Mazel, Eitschberger, 2003; Большаков, 2005; Львовский, Моргун, 2007; Малков и др., 2015). Изучение выборок с северо-востока европейской части России с использованием признаков строения гениталий позволило установить присутствие этого вида и в фауне этого региона (Большаков и др., 2007).

Накопление материала по *L. reali* из разных регионов Евразии выявило значительную географическую и внутривидовую изменчивость этого вида. Преимущественно на основе крылового рисунка для него было описано до пяти подвидов, однако надежных различий в строении их гениталий не найдено (Большаков, 2005; Цветков, 2008).

Применение кариологических и молекулярно-генетических методов показало, что *L. reali* в своем первоначальном понимании также неоднороден, и в его составе было выявлено два криптических вида, которые хорошо различаются по хромосомным числам и по ДНК-баркодам (Dincă et al., 2011; Lukhtanov et al., 2011). При этом было установлено, что ареал собственно *L. reali* ограничен странами Центральной и Южной Европы, а также высказано предположение, что на территории Северной Евразии распространен вид *L. juvernica*, первоначально описанный в качестве подвида *L. sinapis* из Ирландии. В связи с этим прежние представления о составе рода *Leptidea* в фауне северо-востока европейской части России, согласно которым здесь, помимо *L. morsei*, обитают криптические виды *L. sinapis* и *L. reali*, требуют проверки.

Проблему разграничения видов-двойников группы *L. sinapis* можно решить с применением молекулярно-генетических методов, в частности ДНК-штрихкодирования (баркодинга), широко используемого для делимитации видов в самых разных группах насекомых (Лухтанов, 2019). Помимо мтДНК, в некоторых работах для разделения беляночек рода *Leptidea* на виды были попытки использовать и ядерные маркеры, такие как *Wg* (*wingless*), *CAD* (*carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, dihydroorotase*) и *ITS2* (*internal transcribed spacer 2*), однако с их помощью не удалось надежно охарактеризовать рассматриваемые нами виды (Dincă et al., 2011, 2013).

Цель настоящей работы – уточнить видовой состав беляночек рода *Leptidea* на северо-востоке европейской части России на основе анализа изменчивости митохондриальной ДНК.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Образцы для молекулярно-генетического анализа (всего 124) были взяты в выборках имаго из семи местонахождений на северо-востоке Русской равнины и Приполярном Урале (табл. 1). Биологический материал (брюшко бабочки) фиксировали в 96%-ном этаноле. Каждый образец помещался в 15 мкл 10%-ного раствора ионообменной смолы Chelex-100 («Sigma-Aldrich», США)

Таблица 1. Материал, использованный в филогенетическом анализе представителей рода *Leptidea* Billberg

Вид	Место и год сбора оригинального материала	Номер в Genbank, количество образцов (в скобках)	Автор образца, идентификатор в коллекции (в скобках)
<i>Leptidea sinapis</i>	Россия, Республика Коми, Сыктывдинский р-н, ур. Соколовка, 61.54° с. ш., 50.60° в. д., 2011, 2013, 2017 гг.	MG491401- MG491409 (9)	Кулакова О.И. (Komi Sokolovka)
	Россия, Республика Коми, Прилузский р-н, дер. Прокопьевка, 59.28° с. ш., 49.67° в. д., 2007 г.	ON175819- ON175828 (10)	Кулакова О.И. (Komi Prokopievka)
	Россия, Республика Коми, Койгородский р-н, с. Дон, 61.64° с. ш., 53.89° в. д., 2008 г.	ON175829- ON175840 (12)	Кулакова О.И. (Komi Don)
	Россия, Республика Коми, городской округ Ухта, Седьюсский заказник, 63.37° с. ш., 53.95° в. д., 2013 г.	MG491410- MG491418 (9)	Кулакова О.И. (Komi Sedyu)
	Россия, Республика Коми, Сыктывкар, местечко Радиобиология, 61.65° с. ш., 50.73° в. д., 2011, 2013, 2017 гг.	MG491419- MG491436 (18)	Кулакова О.И. (Komi RBK)
	Россия, Республика Коми, Усть-Куломский р-н, урочище Красный Яр, 61.57° с. ш., 55.01° в. д., 2012 г.	MG491437- MG491439, MG491441, MG491442, MG491445- MG491447, MG491449- MG491452, MG491455 (13)	Кулакова О.И. (Komi Krasny Yar)
	Россия, Республика Коми, городской округ Ухта, Чутьинский заказник, 63.75° с. ш., 53.37° в. д., 2013 г.	MG491457- MG491459, MG491461- MG491466, MG491468- MG491473, MG491484, MG491486, MG491487 (18)	Кулакова О.И. (Komi Chud)
	Россия, Республика Коми, Койгородский р-н, бассейн р. Кобра, ур. Кобра, 60.05° с. ш., 50.78° в. д., 2016 г.	MG491396, MG491398 (2)	Кулакова О.И. (Komi Kobra)
	Испания	JF512623	Dinca et al. (RVcoll.07-C470)

Таблица 1 (продолжение)

Вид	Место и год сбора оригинального материала	Номер в Genbank, количество образцов (в скобках)	Автор образца, идентификатор в коллекции (в скобках)
<i>Leptidea juvernica</i>	Словения	EF599637	Verovnik R., Glogovcan P. (BA11)
	Румыния: Молдавия, Сучава, Рэдэуци	HQ004608	Dinca et al. (RV-07-C307)
	Германия: Бавария, Тёльц, 2 км С Фордеррис	KX044401	Mutanen et al. (BC ZSM Lep 64692)
	Россия, Республика Коми, Койгородский р-н, ур. Кобра, 60.05° с. ш., 50.78° в. д., 2016 г.	MG491390- MG491395 (6)	Кулакова О.И. (Komi Kobra)
	Россия, Республика Коми, Ухтинский р-н, Чутьинский заказник, 63.75° с. ш., 53.37° в. д., 2013 г.	MG491467, MG491480, MG491456, MG491478, MG491479 (5)	Кулакова О.И. (Komi Chud)
	Россия	JF512576	Dinca et al. (RVcoll.08-Y010)
	Румыния	JF512573	Dinca et al. (RVcoll.08-M325)
	Россия: Западная Сибирь, Новосибирск	HG969220	Solovyev et al. (L12)
	Франция	MN142361	Dapporto et al. (RVcoll12R529)
	Россия: С.-Петербург	MW503181	Dinca et al. (RVcoll08Y003)
<i>Leptidea reali</i>	Россия: Калининград	MT210323	Kuftina et al. (Lp18)
	Франция	JF512607	Dinca et al. (RVcoll.10-A411)
	Испания	JF512617	Dinca et al. (RVcoll.03-H535)
	Испания: Барселона, Каталония, Виладрау, Монтсени, Осона	MN141594	Dapporto et al. (RVcoll07C279)
	Франция: Прованс, Флассан	MN138592	Dapporto et al. (RVcoll09T249)
	Испания	MW750512	Lukhtanov et al. (VLColl.08-x3)
	Франция: Дром, Ла Мот-Шаланкон	MW500908	Dinca et al. (OXB-TGS-1295)

Таблица 1 (продолжение)

Вид	Место и год сбора оригинального материала	Номер в Genbank, количество образцов (в скобках)	Автор образца, идентификатор в коллекции (в скобках)
<i>Leptidea morsei</i>	Россия, Республика Коми, Койгородский р-н, ур. Кобра, 60.05° с. ш., 50.78° в. д., 2016 г.	MG491397 (1)	Кулакова О.И. (Komi Kobra)
	Россия, Республика Коми, Прилузский р-н, дер. Прокопьевка, 59.28° с. ш., 49.67° в. д., 2007 г.	ON175844 (1)	Кулакова О.И. (Komi Prokopievka)
	Россия, Республика Коми, Койгородский р-н, с. Дон, 61.64° с. ш., 53.89° в. д., 2008 г.	ON175841- ON175843 (3)	Кулакова О.И. (Komi Don)
	Россия, Республика Коми, Приполярный Урал, оз. Пономаревское, 64.89° с. ш., 59.26° в. д., 2011 г.	MG491399, MG491400 (2)	Кулакова О.И. (Prepolar_Ural)
	Россия, Республика Коми, Усть-Куломский р-н, ур. Красный Яр, 61.57° с. ш., 55.01° в. д., 2012 г.	MG491440, MG491443, MG491444, MG491448, MG491453, MG491454 (6)	Кулакова О.И. (Komi Krasny Yar)
	Россия, Республика Коми, городской округ Ухта, Чутынский заказник, 63.75° с. ш., 53.37° в. д., 2013 г.	MG491460, MG491474- MG491477, MG491481- MG491483, MG491485 (9)	Кулакова О.И. (Komi Chud)
	Россия: Западная Сибирь, Новосибирск	HG969243	Solovyev et al. (L62)
	Румыния: Трансильвания, Клуж, Бадени	HQ004593	Dinca et al. (RV-08-A026)

и инкубировался в твердотельном термостате при температуре 55 °С в течение 30 мин при периодическом перемешивании, после чего еще в течение 10 мин инкубировался при температуре 99 °С. Выделенная ДНК хранилась при температуре –20 °С.

В качестве молекулярного маркера был выбран стандартный ДНК-баркод (фрагмент гена COI длиной 658 пар нуклеотидов), для амплификации которого использовались праймеры HCO2198 (5' TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA 3') и LCO1490 (5' GGTCAACAATCATAAAGATATGG 3') (Folmer et al., 1994). Амплификацию фрагмента проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, содержащей 10 мкл ScreenMix («Евроген», Россия), 10 мкл каждого праймера (0.3 мкМ) («Евроген», Россия), 9.0 мкл ddH₂O («Ambion», США) и 2.0 мкл геномной ДНК. Амплификацию проводили в термоциклере T-100 («Биорад», США) по следующей схеме: предварительная денатурация – 95 °С (5 мин); следующие пять циклов: денатурация – 90 °С (30 сек), отжиг – 45 °С (60 сек), элонгация – 72 °С (90 сек); затем

27 циклов: денатурация 90 °С (30 сек), отжиг – 55 °С (45 сек), элонгация – 72 °С (60 сек) и финальная элонгация – 72 °С (2 мин). Продукты реакции амплификации разгонялись электрофорезом в 1.3%-ном агарозном геле с трис-ацетатным (ТАЕ) буферным раствором с бромистым этидием и визуализировались при помощи трансиллюминатора UVT-1 («Биоком», Москва). Для очистки полученного ПЦР продукта использовался набор CleanUp Standart («Евроген», Россия). Концентрацию ДНК и ПЦР продуктов измеряли на флуориметре Qubit 3 («Invitrogen», USA). Секвенирование проводилось на базе центра коллективного пользования «Молекулярная биология» ИБ ФИЦ Коми НЦ УрО РАН на приборе НАНОФОР 05 (Синтол, Россия) с использованием набора реагентов BigDye Terminator v. 3.1 (Invitrogen, США). Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с применением алгоритма ClustalW в программе Mega X (Thompson et al., 1994; Kumar et al., 2018). Филогенетическое древо построено с использованием метода максимального правдоподобия (ML) в программе Mega X (Thompson et al., 1994; Kumar et al., 2018). Идентификация полученных последовательностей проводилась с использованием ресурсов GenBank, BLAST (NCBI, 2022) и BOLD Systems (BOLD Systems, 2022). Полученные последовательности гена депонированы в базе данных GenBank и доступны под номерами MG491390-MG491487 и ON175819-ON175844 (см. табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа последовательностей COI мтДНК представителей рода *Leptidea*, распространенных на северо-востоке европейской части России, удалось выявить две четко обособленные группы образцов (рис. 1). В первую (I) попали 22 образца из четырех выборок, особи которых по признакам крылового рисунка и строения гениталий были определены как *L. morsei*. Принадлежность к данному виду подтверждается совпадением полученных последовательностей COI с имеющимися для *L. morsei* в международных базах данных BOLD Systems и NCBI. Таким образом, молекулярные данные согласуются с морфологическими и подтверждают присутствие этого вида на территории северо-востока европейской части России.

Во вторую группу (II, см. рис. 1) попали 102 образца из нескольких выборок. Особи из этих выборок были предварительно определены по внешним признакам как *L. sinapis*, однако проведенный молекулярно-генетический анализ выявил их неоднородность. В составе изученных выборок обособились три линии (a, b и c). Достаточно компактную кладу сформировали образцы двух выборок из региона исследования и образцы *L. juvernica* из Франции, Румынии, а также с запада Русской равнины и Западной Сибири (a). Сравнение образцов из остальных восьми выборок с образцами, представленными в международных базах данных (BOLD Systems и NCBI), подтвердило их соответствие *L. sinapis* (c), а также отсутствие в собранном материале *L. reali* (b). Таким образом, проведенная молекулярная идентификация представителей региональных популяций рода *Leptidea* с помощью ДНК-штрихкодирования подтверждает точку зрения, что на востоке Европы видом-двойником *L. sinapis* является *L. juvernica*, а *L. reali*, скорее всего, распространен только в Центральной Европе и Средиземноморье (Dincă et al., 2011, 2013; Lukhtanov et al., 2011, 2018; Talla et al., 2017, 2019).

Дистанция между нуклеотидными последовательностями гена COI, превышающая 2–2.5 %, часто рассматривается у чешуекрылых как показатель потенциального наличия криптических видов, однако в некоторых семействах она не превышает 1 %, что характерно и для рода *Leptidea* (Dincă et al., 2021). В настоящей работе на основании сравнения последовательностей COI у *L. juvernica*, *L. sinapis* и *L. reali* нами было выявлено 16 уникальных сайтов, четко разграничивающих виды этой группы (табл. 2). Восемь таких сайтов имеет *L. juvernica* – 15 (T/C), 84 (C/T), 159 (G/A), 402 (C/T),

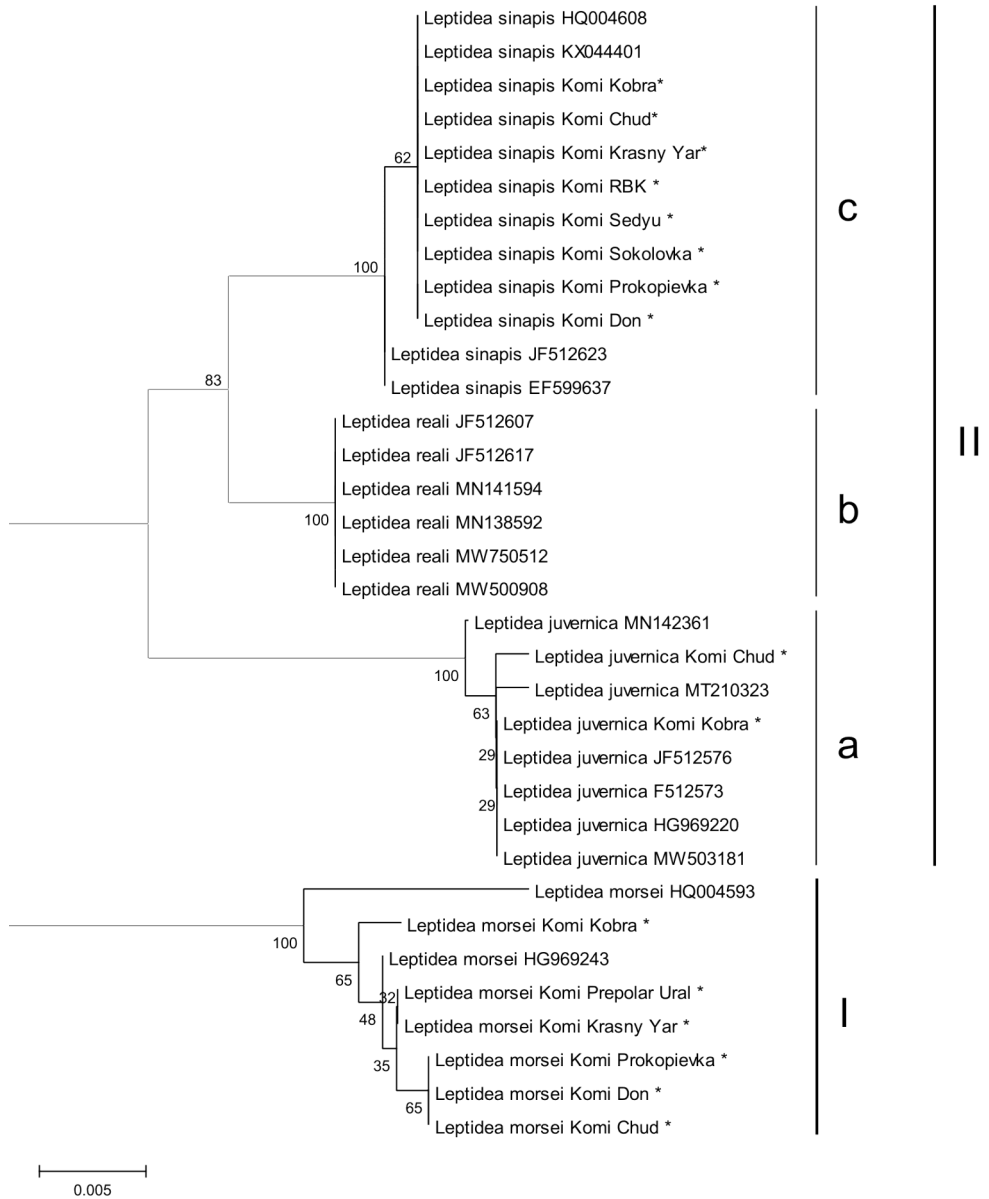


Рис. 1. Филогенетическое древо беляночек рода *Leptidea* Billberg по данным анализа последовательностей COI мтДНК.

Филогенетическое древо построено с использованием дискретного метода максимального правдоподобия (ML), в качестве поддержки узлов представлены значения коэффициента бутстрепа.

I – группа образцов *L. morsei*, IIa – группа образцов *L. juvernica*, IIb – группа образцов *L. reali*, IIc – группа образцов *L. sinapis*. * – образцы, собранные авторами на северо-востоке Европы.

Таблица 2. Полиморфные позиции в последовательности гена COI мтДНК у *Leptidea sinapis* (L.), *L. reali* (Reissinger) и *L. juvernica* Williams

Образец/номер нуклеотида в последовательности	Регион COI															
	15	84	109	159	205	345	402	432	411	444	513	606	618	627	630	633
<i>Leptidea sinapis</i> EF599637, HQ004608, KX044401, JF512623, наши данные	C	T	G	A	T	G	T	G	T	T	C	A	A	A	G	T
<i>Leptidea reali</i> MN138592, MN141594, MN143990, MW500908, MW502220, MW750512, JF512607, JF512617, JF512681, KC866116	C	T	A	A	C	A	T	A	T	C	T	A	A	G	A	T
<i>Leptidea juvernica</i> KT782668, KU355286, MW501240, JF512573, MT210323, MN139694, MK559290, MG491444, HG969220, наши данные	T	C	A	G	C	A	C	A	C	C	C	T	G	A	G	C

Примечание. *Полужирным курсивом* выделены уникальные для вида нуклеотидные позиции.

411(C/T), 606 (T/A), 618 (G/A), 633 (C/T), пять сайтов отмечены для *L. sinapis* – 109 (G/A), 205 (T/C), 345 (G/A), 432 (G/A) и 444 (T/C), а три сайта уникальны для *L. reali* – 513(T/C), 627 (G/A) и 630 (A/G). Таким образом, процентная доля уникальных сайтов, рассчитанная от общего числа нуклеотидов в сравниваемой последовательности COI, составила 1,2, 0,8 и 0,5 % для *L. juvernica*, *L. sinapis* и *L. reali* соответственно. Такое соотношение может свидетельствовать в пользу более позднего происхождения *L. reali* от общего с *L. sinapis* предка, что полностью согласуется с мнением ряда авторов (Dincă et al., 2011, 2013).

Выделение уникальных позиций в маркерах, используемых в ДНК-штрихкодировании, является очень важным и необходимым условием для правильной идентификации особей, позволяя установить их принадлежность к определенному виду и под-

твердить его присутствие на изучаемой территории. С помощью этой информации можно скорректировать ряд заключений, сделанных некоторыми исследователями в отношении распространения *L. reali* до 2011 г.; примерами ошибочного определения материала, использованного для баркодинга, могут служить последовательности GU707187 и GU655014 (Hausmann et al., 2011) и EF599637 (Verovnik, Glogovcan, 2007).

Вопрос о времени и путях проникновения трех рассматриваемых видов *Leptidea* на северо-восток Русской равнины и в северные области Урала остается открытым. Представители температурного комплекса, к которому эти виды принадлежат, судя по характеру изменения природной обстановки в последние 15–17 тыс. лет, в состав региональной фауны вошли в позднем голоцене или даже антропоцене. Многие в данном вопросе могли бы прояснить результаты филогенетического анализа с привлечением выборок еще и с северо-запада Русской равнины. В настоящее время появляется все больше данных об экологических и этологических различиях между *L. juvernica* и *L. sinapis*, подтверждающих репродуктивную изолированность их популяций (Friberg, Olofsson et al., 2008; Friberg, Vongvanich et al., 2008; Friberg, Wiklund, 2009; Dincă et al., 2013; Friberg et al., 2013). Должное внимание к биологии изучаемых видов, наряду с материалами по их морфологии и молекулярно-генетическим особенностям, будет способствовать построению более обоснованных филогеографических сценариев, в том числе и для севера Европы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе изучения фрагмента гена цитохромоксидазы I были определены уникальные сайты этого гена для *L. juvernica*, *L. sinapis* и *L. reali*, являющиеся маркерами видовой принадлежности изученных экземпляров. В результате удалось подтвердить присутствие на территории европейского Севера России трех видов белянок рода *Leptidea*: *L. juvernica*, *L. sinapis* и *L. morsei*.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в Институте биологии Коми НЦ УрО РАН в рамках государственного задания по теме «Разнообразие фауны и пространственно-экологическая структура животного населения европейского северо-востока России и сопредельных территорий в условиях изменения окружающей среды и хозяйственного освоения» (№122040600025-2).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Большаков Л. В. 2005. Изменчивость и проблемы внутривидовой систематики *Leptidea reali* Reissinger, 1989 (Lepidoptera: Pieridae) в Европейской России и соседних регионах (с обсуждением синонимии и новых находок некоторых близких видов). Эверсманния **1**: 4–12.
- Большаков Л. В., Татаринцов А. Г., Кулакова О. И. 2007. Самые северные местонахождения видов рода *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) в Республике Коми. Эверсманния **11–12**: 88–89.
- Большаков Л. В., Татаринцов А. Г., Кулакова О. И., Болотов И. Н. 2008. Самые северные местонахождения видов рода *Leptidea* Billberg, 1820 (Lepidoptera: Pieridae) в Архангельской области. Эверсманния **15–16**: 90–91.
- Лухтанов В. А. 2019. Делимитация видов и анализ криптического видового разнообразия в XXI веке. Энтомологическое обозрение **98** (2): 358–370.
- Львовский А. Л., Моргун Д. В. 2007. Булавоусые чешуекрылые Восточной Европы. М.: Товарищество научных изданий КМК, 443 с. + 8 цв. вкладок.

- Малков П. Ю., Копылов М. А., Хайдаров М. Р. 2015. Многомерный анализ морфологии гениталий самцов видов-двойников *L. sinapis* и *L. juvernica* (Lepidoptera, Pieridae): сравнение алтайской и австрийской выборок. Евразийский энтомологический журнал **14** (6): 518–522.
- Моргун Д. В. 2017. Новые данные о распространении булавоусых чешуекрылых арктической тундры в бассейне р. Кара (Полярный Урал). Russian Entomological Journal **26** (4): 343–347.
- Седых К. Ф. 1974. Животный мир Коми АССР. Беспозвоночные. Сыктывкар: Коми книжное издательство, 192 с.
- Татаринов А. Г., Долгин М. М. 1999. Фауна европейского Северо-Востока России. Т. 7. Ч. 1. Булавоусые чешуекрылые. СПб.: Наука, 183 с.
- Цветков Е. В. 2007. Об изменчивости строения копулятивного аппарата *Leptidea reali* Reissinger, 1989 (Lepidoptera: Pieridae) в Ленинградской и Воронежской областях. Эверсманния **11–12**: 19–23.
- BOLD Systems. 2022. Published on the Internet. [URL: <http://www.boldsystems.org/>] (Accessed 25 March 2022).
- Dincă V., Lukhtanov V. A., Talavera G., Vila R. 2011. Unexpected layers of cryptic diversity in wood white *Leptidea* butterflies. Nature Communications **2**: 324. <https://doi.org/10.1038/ncomms1329>
- Dincă V., Wiklund A. C., Lukhtanov V. A., Kodandaramaiah U., Noren K., Dapporto L., Wahlberg N., Vila R., Friberg M. 2013. Reproductive isolation and patterns of genetic differentiation in a cryptic butterfly species complex. Journal of Evolutionary Biology **26**: 2095–2106.
- Dincă V., Dapporto L., Somervuo P., Vodá R., Cuvelier S., Gascoigne-Pees M., Huemer P., Mutanen M., Hebert P. D. N., Vila R. 2021. High resolution DNA barcode library for European butterflies reveals continental patterns of mitochondrial genetic diversity. Communications Biology **4** (315): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01834-7>
- Folmer O., Black M., Hoeh W., Lutz R., Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular Marine Biology and Biotechnology **3**: 294–299.
- Friberg M., Leimar O., Wiklund C. 2013. Heterospecific courtship, minority effects and niche separation between cryptic butterfly species. Journal of Evolutionary Biology **26**: 971–979. <https://doi.org/10.1111/jeb.12106>
- Friberg M., Olofsson M., Berger D., Karlsson B., Wiklund C. 2008. Habitat choice precedes host plant choice – niche separation in a species pair of a generalist and a specialist butterfly. Oikos **117**: 1337–1344. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2008.16740.x>
- Friberg M., Vongvanich N., Borg-Karlsson A.-K., Kemp D. J., Merilaita S., Wiklund C. 2008. Female mate choice determines reproductive isolation between sympatric butterflies. Behavioral Ecology and Sociobiology **62**: 873–886. <https://doi.org/10.1007/s00265-007-0511-2>
- Friberg M., Wiklund C. 2009. Host plant preference and performance of the sibling species of butterflies *Leptidea sinapis* and *Leptidea reali*: A test of the trade-off hypothesis for food specialisation. Oecologia **159**: 127–137. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1206-8>
- Hausmann A., Haszprunar G., Segerer A.H., Speidel W., Behounek G., Hebert P.D.N. 2011. Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany. Spixiana **34** (1): 47–58.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution **35** (1): 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lukhtanov V. A., Dincă V., Talavera G., Vila R. 2011. Unprecedented within-species chromosome number cline in the Wood White butterfly *Leptidea sinapis* and its significance for karyotype evolution and speciation. BMC Evolutionary Biology **11** (109): 1–11.
- Mazel R., Eitschberger U. 2003. Biogéographie de *Leptidea reali* Reissinger, 1989 en Europe et en Turquie (Lepidoptera: Pieridae). Revue de l'Association Roussillonnaise d'Entomologie **11** (3): 91–109.
- NCBI. 2022. National Center for Biotechnology Information. Published on the Internet. [URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] (Accessed 25 March 2022).
- Shtinkov N., Kolev Z., Vila R., Dincă V. 2016. The sibling species *Leptidea juvernica* and *L. sinapis* (Lepidoptera, Pieridae) in the Balkan Peninsula: ecology, genetic structure, and morphological variation. Zoology **119**: 11–20.
- Solovyev V. I., Ilinsky Y., Kosterin O. E. 2015. Genetic integrity of four species of *Leptidea* (Pieridae, Lepidoptera) as sampled in sympatry in West Siberia. Comparative Cytogenetics **9** (3): 299–234.
- Thompson J. D., Higgins D. G., Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research **22** (2): 4673–4680. <https://doi.org/10.1093/nar/22.22.4673>
- Verovnik R., Glogovcan P. 2007. *Leptidea sinapis* isolate BA11 cytochrome oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial. GenBank: EF599637.1. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/EF599637>.

SPECIES COMPOSITION OF THE WOOD WHITES OF THE GENUS *LEPTIDEA*
BILLBERG (LEPIDOPTERA, PIERIDAE) IN NORTHEASTERN EUROPE
BASED ON THE DNA BARCODING

O. I. Kulakova, A. G. Tatarinov, D. M. Shadrin

Key words: Lepidoptera, Pieridae, *Leptidea*, COI, DNA barcoding, Northeastern Europe.

S U M M A R Y

The article is deals with the problem of identification of the wood whites of the *Leptidea sinapis* group in Northeastern Europe using DNA barcoding. The presence of three species has been confirmed: *L. sinapis* (Linnaeus, 1758), *L. morsei* (Fenton, 1881) and *L. juvernica* Williams, 1946. Based on a comparison of their COI sequences, 16 unique sites have been revealed that clearly distinguish these species.