

**ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ
APHANTOPUS HYPERANTUS И *COENONYMPHA ARCANIA*
(LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) В ОКРЕСТНОСТЯХ
СРЕДНЕУРАЛЬСКОГО МЕДЕПЛАВИЛЬНОГО ЗАВОДА.
2. ФОРМА КРЫЛА И РАЗМЕР ГЛАЗЧАТЫХ ПЯТЕН**

© 2025 г. А. О. Шкурихин^а, *, Е. Ю. Захарова^а, Е. Л. Воробейчик^а

^а Институт экологии растений и животных УрО РАН,

Россия 620144 Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

*e-mail: ashkurikhin@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.08.2024 г.

После доработки 30.08.2024 г.

Принята к публикации 19.09.2024 г.

Тестировали гипотезы о том, что накопление потенциально токсичных металлов (Cu и Zn) в организме имаго бархатниц *Aphantopus hyperantus* и *Coenonympha arcania* коррелирует с формой крыла и размером глазчатых пятен крылового рисунка, а также увеличивает их флуктуирующую асимметрию. Это менее функционально нагруженные признаки по сравнению с длиной крыла, для которой ранее у этих видов не было обнаружено негативного влияния загрязнения. Поэтому теоретически их флуктуирующая асимметрия может лучше индцировать стресс. Бабочек отлавливали на разном удалении от Среднеуральского медеплавильного завода (г. Ревда, Россия). Форму переднего и заднего крыльев анализировали методами геометрической морфометрии. Размер пятен измеряли на вентральной стороне переднего и заднего крыльев. Во всех случаях (два вида, самцы и самки) форма крыла и ее флуктуирующая асимметрия не различались между участками, но в одном случае (самки *C. arcania*) коррелировали с концентрацией металлов. У одного из видов (*C. arcania*) обнаружены различия между участками по размеру глазчатых пятен; у самок этого вида размер двух из пяти анализировавшихся пятен отрицательно коррелировал с концентрацией Cu. У самцов *A. hyperantus* флуктуирующая асимметрия различалась между участками, но не была максимальной вблизи завода; у самок *C. arcania* она уменьшалась с увеличением концентрации Zn. Таким образом, тестируемые гипотезы не нашли однозначного подтверждения: хотя и на групповом (различия между участками), и на индивидуальном (корреляция с металлами) уровнях были обнаружены некоторые связи со степенью загрязнения, они оказались очень слабыми, специфичными в отношении признака, вида и пола и поэтому, скорее всего, случайными. Наши результаты добавляют аргументы к сомнениям об информативности флуктуирующей асимметрии как индикаторе стресса в природных популяциях насекомых.

Ключевые слова: флуктуирующая асимметрия, стабильность развития, геометрическая морфометрия, крыловой рисунок, дневные бабочки, атмосферные выбросы, тяжелые металлы, промышленное загрязнение

DOI: 10.31857/S0367059725010012 EDN: UTTFMX

В первой части нашей работы [1] было рассмотрено влияние загрязнения среды выбросами Среднеуральского медеплавильного завода на длину крыла и ее флуктуирующую асимметрию (ФА) у двух видов бархатниц – *Aphantopus hyperantus* L. и *Coenonympha arcania* L. Из всего многовидового таксоцена бархатниц только эти два вида сохраняются вблизи завода. Хотя мы ожидали обнаружить увеличение ФА в градиенте загрязнения, было продемонстрировано отсутствие ее связи с концентрациями Cu и Zn в теле имаго [1]. Однако этот отрицательный результат сам по себе не исключает

возможности негативного влияния загрязнения на стабильность развития у исследованных видов.

Во-первых, у одного и того же объекта величины асимметрии разных признаков обычно слабо коррелируют друг с другом [2, 3]. Во-вторых, ФА признаков с высокой функциональной нагрузкой, т.е. тесно связанных с жизнеспособностью, в частности локомоторных органов, как правило, ниже по сравнению с ФА нейтральных признаков, развитие которых слабо стабилизировано естественным отбором [3, 4]. Наконец, в-третьих, оценка

стабильности развития по FA нескольких признаков может быть более надежной по сравнению с оценкой на основе единственного признака [5, 6].

Во второй части нашей работы на той же выборке мы анализируем влияние загрязнения на менее функционально нагруженные признаки — форму крыла и размер глазчатых пятен крылового рисунка. Надежность оценки стабильности развития на основе FA этих признаков может быть выше по сравнению с асимметрией длины крыла, поскольку они многомерны: мы одновременно рассматриваем несколько пятен, а форма крыла описывается набором большого количества меток. Поэтому теоретически FA формы крыла и размера пятен может лучше индицировать вызванный накоплением металлов стресс, чем FA длины крыла.

Форма крыла влияет на скорость, маневренность и энергетическую эффективность полета насекомых [7, 8]. В пределах отряда чешуекрылых форма крыла чрезвычайно разнообразна, но на внутривидовом уровне ее изменчивость несоизмеримо ниже, чем различия на уровне родов и семейств. Для оценки обсуждаемого показателя мы использовали геометрическую морфометрию — эффективный инструмент для анализа формы организмов [9–12]. Одно из основных его преимуществ — возможность анализировать форму объекта «в чистом виде», исключив влияние размера.

Крыловой рисунок чешуекрылых представляет собой набор разнообразных элементов, как правило видоспецифичный. У семейства Nymphalidae он включает асимметричные и симметричные полосы, глазчатые пятна, парафокусные элементы и субмаргинальную полосу [13–15]. Глазчатые пятна — это концентрические круги контрастных цветов с четко определенным центральным пятном (фокусом). Их количество, размер и распределение по ячейкам крыла могут сильно различаться не только у разных видов, но и у разных полов или сезонных генераций в пределах вида [16]. Глазчатые пятна хорошо изучены: много работ посвящено анализу изменчивости их формы и размера [14, 17, 18], количества [19–21], эволюции [15, 22] и механизмов развития [16, 23, 24]. Изменчивость глазчатых пятен (число, размеры и форма) описаны и для рассматриваемых видов — *A. hyperantus* [25–27] и *C. arcania* [28].

Приписываемые глазчатым пятнам функции зависят от их размера и расположения на крыле. Ряд авторов [29–31] полагает, что крупные одиночные пятна могут отпугивать потенциальных

хищников. Мелкие пятна на вентральной стороне крыльев повышают вероятность при атаке хищника потерять лишь внешнюю часть крыла, отвлекая его внимание от жизненно важных отделов тела жертвы [32]. Помимо защитной, глазчатые пятна выполняют коммуникативную функцию [15, 16, 33].

Как и в первой части нашей работы, мы анализировали влияние загрязнения на двух уровнях — индивидуальном (связь показателя с концентрациями металлов в теле имаго) и групповом (сравнение нескольких участков с разным уровнем загрязнения). Частично совпадают и тестируемые гипотезы. Как и в случае длины крыла, во второй части работы мы проверяли гипотезу о том, что концентрации металлов в теле имаго положительно коррелируют с FA формы крыла и размера пятен. Гипотезу о влиянии загрязнения на собственно форму крыла и размер пятен нельзя сформулировать в терминах направленности корреляции с уровнем загрязнения. Поэтому для этих параметров она переформулирована в терминах «просто» наличия корреляции без учета ее знака: мы предположили, что форма крыла и размер пятен коррелируют с концентрациями металлов в теле имаго. Основанием для выдвижения этой гипотезы было следующее соображение: форма крыла, размер и расположение глазчатых пятен детерминируются каскадом генов, действующих на протяжении всего личиночного периода [16, 34–36]. Поэтому нельзя исключить, что небольшие нарушения в разворачивании программы развития крыла под влиянием вызванного токсической нагрузкой стресса могут приводить к заметным изменениям его формы и размера пятен.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Район исследований подробно описан ранее [1]. Повторим, что были выбраны 4 участка с травяной растительностью: контрольный, в 75 км к юго-востоку от Среднеуральского медеплавильного завода (СУМЗ, г. Ревда), фоновый (региональный уровень загрязнения, 14 км к западу от завода), буферный (среднее загрязнение, 4–5 км) и импактный (сильное загрязнение, 1–2 км).

Сбор материала. Методика также подробно описана ранее [1]. Кратко повторим: в период 29.06–7.07.2003 г. на всех участках было отловлено 225 имаго *C. arcania* и 559 — *A. hyperantus*. Для дальнейшего анализа случайным образом отбирали по 10–20 особей каждого пола обоих видов с каждого участка; общая выборка составила 183 экз.

Концентрации Cu и Zn измеряли в брюшке каждой особи. Обоснование выбора анализируемой части тела и металлов, подробности методики подготовки образцов и измерений приведены ранее [1].

Подготовка изображений крыльев. Крылья были отделены от груди и сфотографированы с вентральной стороны с помощью фотоаппарата Canon EOS 600D с макрообъективом Canon Macro Lens EF-S60 mm 1:2.8 USM. Высота и угол съемки были зафиксированы с помощью штатива. Анализировали изображения крыльев с разрешением 1100 dpi, на которых расставляли метки в программе tpsDig 2.31 [37]. Диаметр пятен измеряли по изображениям крыльев в программе ImageJ 1.48v [38].

Расстановку меток и измерения пятен проводил один и тот же оператор дважды, причем повторные измерения были разнесены во времени на 14 сут. Чтобы избежать эффекта наблюдателя, оператору не сообщали информацию о месте отлова бабочек. Погрешности измерений составили 0.07 мм при расстановке меток и 0.05 мм при измерении размера пятен.

Измерения формы крыла. На переднем крыле расставляли 13 меток, на заднем – 15 (рис. 1). Метки маркировали контур крыла и положение корней жилок M_3 , Cu_1 и Cu_2 , отходящих от медиальной ячейки, а также положение фокуса глазчатых пятен

(или их центра при его отсутствии). Поскольку для применения методов геометрической морфометрии необходимо, чтобы набор меток у всех объектов в выборке был одинаков, метки выставляли только на те пятна, которые присутствовали у всех особей в выборке. Такими пятнами были P2 переднего крыла у обоих видов, G1, G3, G4 и G5 заднего крыла у *C. arcania*, G2, G4, G5 и G6 заднего крыла у *A. hyperantus* (см. рис. 1). Номенклатура пятен крылового рисунка приведена по [39], жилкок – по [40]. Хотя набор пятен на заднем крыле (метки 12–15) не совпадал между видами, это не препятствовало анализу, поскольку в пределах каждого вида требование гомологии меток выполнялось, а межвидовые сравнения не входили в задачи работы.

Измерения размера пятен. У *C. arcania* измеряли диаметр глазчатых пятен P2, G1, G3, G4 и G5, у *A. hyperantus* – P2, G1, G2, G4, G5 и G6 (см. рис. 1). Эти пятна присутствовали у всех отловленных особей.

Типичное глазчатое пятно состоит из трех элементов: в центре находится белый фокус, вокруг него – черное кольцо, а на периферии – желтое. При наличии всех элементов пятна измеряли диаметр желтого кольца вдоль срединной линии ячейки крыла, в которой оно расположено (см. рис. 1). При редукции желтого кольца измеряли диаметр

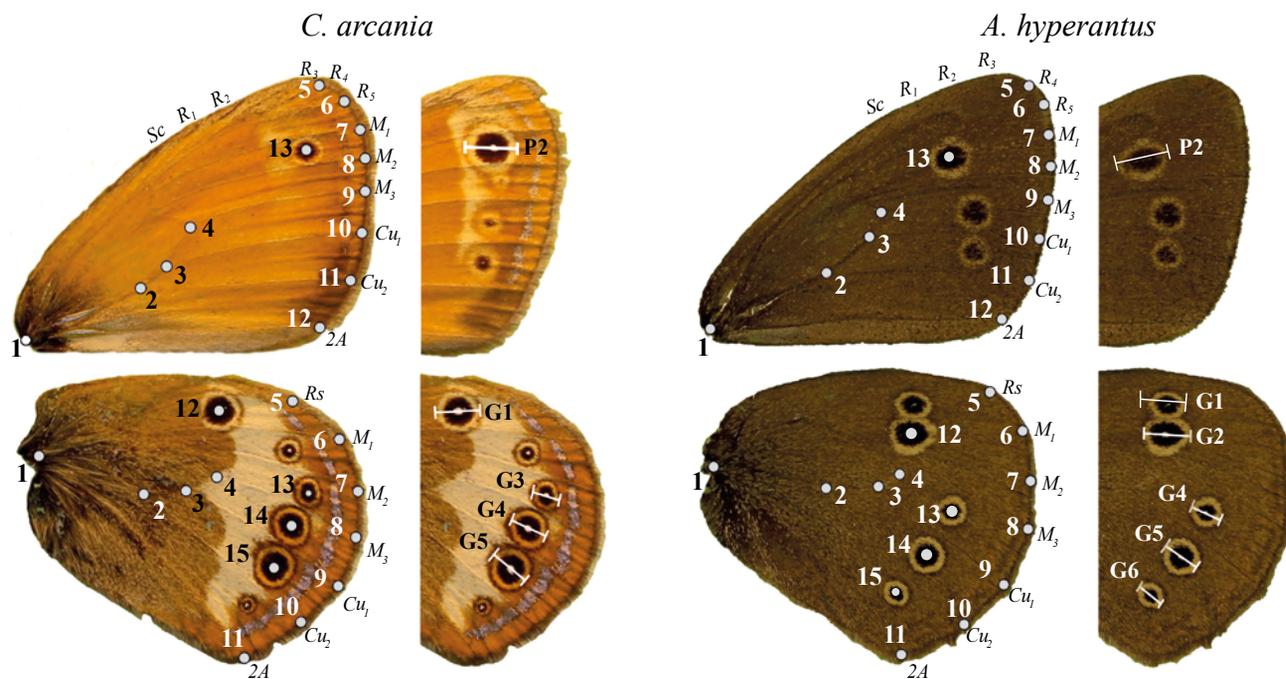


Рис. 1. Схема расстановки меток для геометрической морфометрии формы крыла (слева) и промеров пятен крылового рисунка (справа) у *C. arcania* и *A. hyperantus*. Номенклатура пятен приведена по [39], жилкок – по [40].

черного. В случае, когда пятно представляло собой несколько чешуек, отличных по цвету от фона крыла, измеряли размер оставшегося элемента.

Выбранный промер не всегда совпадал с наибольшим диаметром пятна из-за того, что пятна часто имели эллипсовидную или неправильную кляксообразную форму. Однако использование единого направления – вдоль срединной линии ячейки крыла – снижало субъективность измерений.

Анализ формы крыла. Исходные XY-координаты меток содержат информацию о положении, ориентации, размерах и форме объекта. Однако для анализа формы часть этой информации избыточна, поэтому ее необходимо удалять. Это реализовано с помощью суперимпозиции конфигураций методом обобщенного прокрустового анализа (Generalized Procrustes Analysis, GPA) [9–12]. Полученные прокрустовы координаты можно непосредственно использовать в качестве переменных в многомерном анализе и для визуализации изменчивости формы. Из существовавших исходно нескольких альтернативных вариантов метод GPA утвердился в качестве стандартного, и именно он лежит в основе анализа FA формы [41].

Процедуру суперимпозиции проводили отдельно для самцов и самок каждого вида. Для каждой особи были получены прокрустовы координаты меток крыльев правой и левой сторон в двух повторностях. Прокрустовы координаты конспецифичных меток правой и левой сторон усредняли, получая обобщенную для особи (т.е. симметризованную) форму крыла [42]. Именно этот параметр использовали при анализе зависимости формы от концентраций металлов в теле имаго. Если хотя бы одно из двух крыльев имело препятствующие расстановке меток повреждения, то оба крыла исключали из анализа. Поэтому для 183 особей проанализировали только 172 пары передних и 168 пар задних крыльев (табл. 1).

Для двумерных объектов прокрустовы координаты дают $2k - 4$ переменных, описывающих форму, где k – число меток. Из-за небольшого объема выборок, особенно самок *C. arcania*, мощность статистического анализа по такому числу переменных была бы недостаточной для получения надежных результатов. Поэтому размерность данных была снижена: для этого использовали метод главных компонент, а в последующих расчетах анализировали только несколько первых главных компонент, описывающих основную часть изменчивости формы. Количество главных компонент определяли отдельно для каждой выборки по критерию сломанного стержня (broken stick) [43]. В результате изменчивость формы крыла анализировали по 4–7 первым главным компонентам, в сумме объясняющим 73–83% дисперсии.

Анализ размера глазчатых пятен. Для анализа зависимости размера конкретного пятна от концентрации металлов использовали усредненные значения для правого и левого крыльев. Исключили особей с повреждениями крыльев, из-за которых было невозможно измерение полного набора пятен. Также из дальнейшего анализа исключили экземпляры, у которых разница между крыльями по размеру какого-либо пятна статистически значимо превышала среднее значение для выборки. В соответствии с рекомендацией [6] для исключения статистических выбросов использовали критерий Граббса T_G . В итоге размер пятен проанализировали у 176 особей (см. табл. 1).

Анализ асимметрии признаков. Асимметрию размера пятен анализировали по стандартному протоколу [6], использованному в первом сообщении для длины крыльев [1]. Применили смешанную модель двухфакторного ANOVA, в котором сторону особи (правое или левое крыло) рассматривали как фиксированный фактор, а особь – как случайный. Вывод о наличии направленной асимметрии (DA) делали по статистической значимости фактора “сторона”, флуктуирующей – взаимодействия “особь×сторона”.

Таблица 1. Объем и структура материала

Участок	<i>C. arcania</i>				<i>A. hyperantus</i>			
	самцы		самки		самцы		самки	
	переднее крыло	заднее крыло	переднее крыло	заднее крыло	переднее крыло	заднее крыло	переднее крыло	заднее крыло
Контрольный	10 / 9	10 / 9	10 / 10	8 / 10	8 / 10	9 / 10	9 / 10	9 / 10
Фоновый	10 / 10	10 / 10	–	–	10 / 10	9 / 10	9 / 10	10 / 10
Буферный	9 / 10	9 / 10	9 / 9	8 / 9	10 / 9	9 / 9	9 / 10	10 / 10
Импактный	20 / 20	19 / 20	14 / 14	14 / 14	20 / 20	19 / 20	15 / 15	15 / 15

Примечание. В числителе – число пар крыльев, использованных при анализе формы крыла, в знаменателе – при анализе пятен.

Для анализа асимметрии формы крыльев использовали аналогичный подход, модифицированный применительно к прокрустовым координатам [41].

Статистическую значимость DA и FA оценивали отдельно для каждого пятна, формы переднего и заднего крыльев. Если выявляли статистически значимую DA, ее величину сравнивали с индексом FA4a [6]. Считается, что направленной асимметрией можно пренебречь, если ее величина не превышает FA4a. В случае обнаружения статистически значимой DA формы из прокрустовых координат меток одной из сторон вычитали усредненную по выборке асимметрию, тем самым удаляя DA из данных [44]. Воспроизводимость оценок FA характеризовали индексом ME5 [6].

Если величина FA была статистически значимой, т.е. существенно превышающей ошибку измерений, для каждой особи рассчитывали меру индивидуальной асимметрии. Для пятен такой мерой служил индекс $FA17 = \sum |\ln(R_j/L_j)|/T$, где R_j и L_j – диаметр j -го пятна на правой и левой сторонах, T – число пятен [6]. Необходимое условие для использования этой меры – отсутствие корреляции в проявлении асимметрии разных признаков [6, 45]. Предварительная проверка показала, что разницы ($R_j - L_j$) анализируемых пятен не коррелировали друг с другом (коэффициенты Пирсона лежали в диапазоне от -0.33 до 0.33 , во всех случаях $p > 0.05$). Хотя при использовании FA17 (т.е. при переходе от многомерного анализа к одномерному) часть информации теряется, это компенсируется большей мощностью статистического анализа и лучшей интерпретируемостью данных.

В качестве меры индивидуальной асимметрии формы используют прокрустову дистанцию между конфигурациями правой и левой сторон [41, 42], т.е. корень квадратный из суммы квадратов разностей прокрустовых координат одноименных меток правой и левой сторон. В обзоре [6] прокрустова дистанция приведена как индекс FA18. Она характеризует абсолютную разницу формы между правым и левым крыльями [41, 44]. Поскольку мы анализировали асимметрию формы передних и задних крыльев, то для каждой особи было получено по два индекса FA18. Просуммировав индексы FA18 передних и задних крыльев одной особи, мы получили общий показатель индивидуальной асимметрии – $FA18_{tot}$. Насколько нам известно, использованная индивидуальная мера асимметрии не имеет общепотребимого названия. Мы применяем ее по аналогии с индексом FA11 для традиционных измерений, который рассчитывается по формуле $FA11 = \sum |R_j - L_j|$ [6].

Анализ зависимости параметров от концентраций металлов. Для оценки связи одномерных признаков ($FA17$, $FA18_{tot}$) с индивидуальной токсической нагрузкой использовали одномерный ковариационный анализ (ANCOVA), для многомерных признаков (совокупность пятен, первые главные компоненты формы) – многомерный ковариационный анализ (MANCOVA). Дизайн модели в обоих случаях был одинаков: две ковариаты – десятичный логарифм концентрации меди ($\log_{10} Cu$) и цинка ($\log_{10} Zn$), категориальный фактор – участок. Ковариаты друг с другом не коррелировали [1]. Для сравнения силы влияния факторов в модели использовали величину эффекта – частное корреляционное отношение $\eta^2 = SS_{effect} / (SS_{effect} + SS_{error})$, где SS_{effect} – сумма квадратов, объясняемая фактором, SS_{error} – сумма квадратов ошибки.

Поскольку MANCOVA основывается на значениях главных компонент, невозможно указать, за счет каких именно меток может проявиться связь формы крыла с индивидуальной токсической нагрузкой. Поэтому для визуализации изменений формы при увеличении концентрации металла дополнительно выполнили многомерный регрессионный анализ прокрустовых координат по полному набору меток. Из-за того, что различия между участками также могли вносить вклад в зависимость формы крыла от концентрации металла, дизайн модели соответствовал ковариационному анализу: ковариата – концентрация металла, категориальный фактор – участок. Детальное описание метода приведено в [46, 47].

Ординацию выборок по размеру пятен провели с использованием канонического анализа (canonical variates analysis, CVA).

Расчеты выполнены в программах Statistica 10.0 (Statsoft, inc.), Past [48] и MorphoJ [49]. Исходные фотографии крыльев размещены в репозитории Figshare (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.26531386.v1>).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Форма крыла. Статистически значимые различия между участками по форме крыла не обнаружены (табл. 2). Также форма крыла не зависела от концентрации Zn. Только в одном случае – передние крылья самок *C. arcania* – была обнаружена статистически значимая связь формы с концентрацией Cu. Для этой выборки были использованы четыре первые главные компоненты, которые

в сумме объясняли 80% дисперсии. Многомерная регрессия прокрустовых координат полного набора меток объясняла лишь 5.1% дисперсии, причем была статистически незначима ($p = 0.119$). Изменения формы оказались столь незначительны, что установить их локализацию на крыле можно лишь при большом «увеличении» – экстраполяции зависимости в область экстремально больших и малых (и отсутствующих в выборке) значений предиктора (рис. 2). Только тогда можно «разглядеть», что с увеличением концентрации Cu крылья самок *C. arcania* становятся чуть более узкими, а их апекс немного притупляется.

Асимметрия формы крыла. Во всех выборках была выявлена статистически значимая FA формы крыла (Приложение, табл. S1, S2). Следовательно, точность расстановки меток оказалась достаточной

для анализа влияния факторов на FA. Воспроизводимость расстановки меток (т.е. ME5) в среднем составила 0.77 (от 0.68 до 0.83), что свидетельствует о приемлемой надежности результатов (см. Приложение, табл. S1, S2).

Для большинства выборок (передние и задние крылья самцов и самок *A. hyperantus*, передние крылья самок *C. arcania*) была выявлена статистически значимая DA формы. В половине случаев величина DA превышала FA4a. Поскольку наличие слабой (хотя и статистически значимой) DA формы у животных считают, скорее, нормой, чем аномалией [44], признаки с DA не исключали из анализа. В соответствии с рекомендациями [41] DA была удалена из данных перед анализом влияния факторов на FA формы крыла.

Таблица 2. Результаты MANCOVA для формы крыльев

Крыло	Предиктор	Частное η^2	Λ Уилкса	F	df_1	df_2	p
<i>Самцы C. arcania</i>							
Переднее	Участок	0.17	0.60	1.45	15	108.1	0.14
	Log_{10} Cu	0.08	0.92	0.66	5	39	0.66
	Log_{10} Zn	0.08	0.92	0.66	5	39	0.66
Заднее	Участок	0.14	0.66	1.13	15	105.3	0.34
	Log_{10} Cu	0.09	0.91	0.72	5	38.0	0.61
	Log_{10} Zn	0.10	0.90	0.87	5	38.0	0.51
<i>Самки C. arcania</i>							
Переднее	Участок	0.18	0.68	1.33	8	50.0	0.25
	Log_{10} Cu	0.34	0.66	3.27	4	25.0	0.03
	Log_{10} Zn	0.14	0.86	0.99	4	25.0	0.43
Заднее	Участок	0.10	0.81	0.47	10	42.0	0.90
	Log_{10} Cu	0.25	0.75	1.42	5	21.0	0.26
	Log_{10} Zn	0.19	0.80	1.03	5	21.0	0.43
<i>Самцы A. hyperantus</i>							
Переднее	Участок	0.15	0.63	1.17	15	97.0	0.31
	Log_{10} Cu	0.10	0.90	0.78	5	35.0	0.57
	Log_{10} Zn	0.11	0.89	0.86	5	35.0	0.52
Заднее	Участок	0.22	0.50	1.33	21	101.1	0.17
	Log_{10} Cu	0.10	0.90	0.58	7	35.0	0.77
	Log_{10} Zn	0.19	0.81	1.16	7	35.0	0.35
<i>Самки A. hyperantus</i>							
Переднее	Участок	0.19	0.71	0.77	15	88.7	0.71
	Log_{10} Cu	0.11	0.89	0.81	5	32.0	0.55
	Log_{10} Zn	0.18	0.82	1.41	5	32.0	0.25
Заднее	Участок	0.15	0.65	1.08	15	94.3	0.39
	Log_{10} Cu	0.05	0.95	0.39	5	34.0	0.85
	Log_{10} Zn	0.15	0.85	1.22	5	34.0	0.32

FA формы крыла обоих полов *A. hyperantus* и самцов *C. arcania* не зависела от участка и концентраций металлов. У самок *C. arcania* FA фор-

мы на всех участках положительно коррелировала с концентрацией Zn, но не Cu (табл. 3, рис. 3). Также выявлено статистически значимое влияние фактора “участок”, но во взаимодействии “участок × log₁₀Zn” оказалось незначимым ($F(2, 24) = 0.41, p = 0.67$), т.е. коэффициенты наклона регрессии не различались между участками. Вклад фактора “участок” в FA формы крыла ($\eta^2 = 0.26$) был сопоставим с вкладом log₁₀Cu ($\eta^2 = 0.28$).

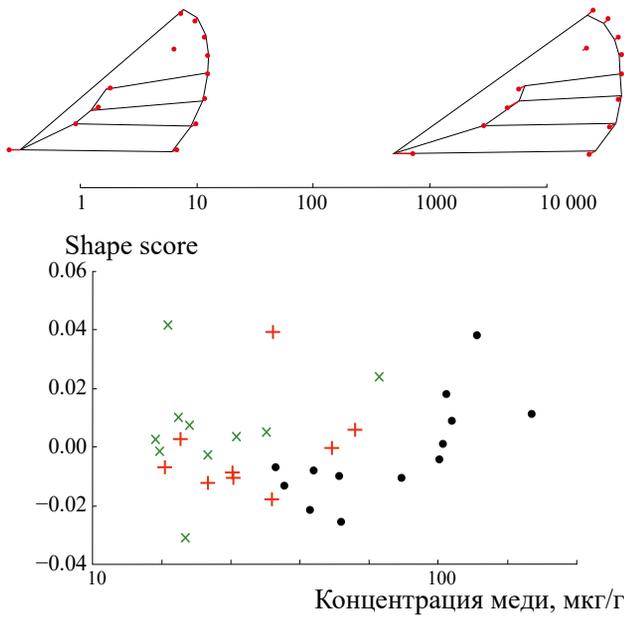


Рис. 2. Зависимость формы крыла самок *C. arcania* от концентрации меди: зеленым цветом обозначен контрольный участок, красным – буферный, черным – импактный. Shape score – это проекция координаты объекта на ось в многомерном пространстве, совпадающую с направлением вектора регрессии формы крыла от предиктора [43, 44]. Сверху показаны различия в конфигурации крыла, соответствующие 10000-кратной разнице в концентрации меди.

Размер глазчатых пятен. Статистически значимые различия между участками по размеру пятен обнаружены только у *C. arcania* (табл. 4). Канонический анализ был выполнен отдельно для самцов и самок этого вида (рис. 4). У самцов наиболее сильно дистанцированы от других выборок особи с контрольного участка: пятно P2 у них относительно мельче, а G4 – крупнее. У самок от других выборок несколько дистанцированы особи с буферного участка: у них крупнее пятно P2, тогда как на контрольном участке все пятна мельче.

Концентрации Zn не коррелировали с размером пятен, тогда как для Cu в одном случае корреляция была выявлена – у самок *C. arcania* (см. табл. 4). Влияние участка на изменчивость размера пятен оказалось сопоставимо ($\eta^2 = 0.36$) с влиянием Cu ($\eta^2 = 0.39$). С увеличением концентрации Cu статистически значимо уменьшался размер только двух пятен – P2 и G1 (рис. 5, Приложение, табл. S3).

Таблица 3. Результаты ANCOVA для флуктуирующей асимметрии формы крыла (FA18₁₀₀)

Предиктор	Частное η^2	SS	df	F	p	Коэффициент наклона (\pm ошибка)
Самцы <i>C. arcania</i> : $R^2 = 0.13, F(5, 42) = 1.29, p = 0.29$						
Участок	0.13	0.00106	3	2.07	0.12	–
Log ₁₀ Cu	0.02	0.00001	1	0.07	0.80	0.002 \pm 0.007
Log ₁₀ Zn	<0.01	<0.00001	1	0.01	0.94	0.001 \pm 0.008
Самки <i>C. arcania</i> : $R^2 = 0.36, F(4, 25) = 3.52, p = 0.02$						
Участок	0.26	0.00071	2	4.30	0.02	–
Log ₁₀ Cu	<0.01	<0.00001	1	0.02	0.88	0.002 \pm 0.010
Log ₁₀ Zn	0.28	0.00080	1	9.68	<0.01	0.029 \pm 0.009
Самцы <i>A. hyperantus</i> : $R^2 = 0.22, F(5, 39) = 2.21, p = 0.07$						
Участок	0.19	0.00061	3	2.97	0.04	–
Log ₁₀ Cu	0.06	0.00017	1	2.50	0.12	– 0.011 \pm 0.007
Log ₁₀ Zn	0.01	0.00002	1	0.22	0.64	0.003 \pm 0.005
Самки <i>A. hyperantus</i> : $R^2 = 0.03, F(5, 36) = 0.23, p = 0.95$						
Участок	0.03	0.00031	3	0.33	0.80	–
Log ₁₀ Cu	<0.01	0.00002	1	0.05	0.82	0.003 \pm 0.013
Log ₁₀ Zn	<0.01	<0.00001	1	0.01	0.91	0.002 \pm 0.016

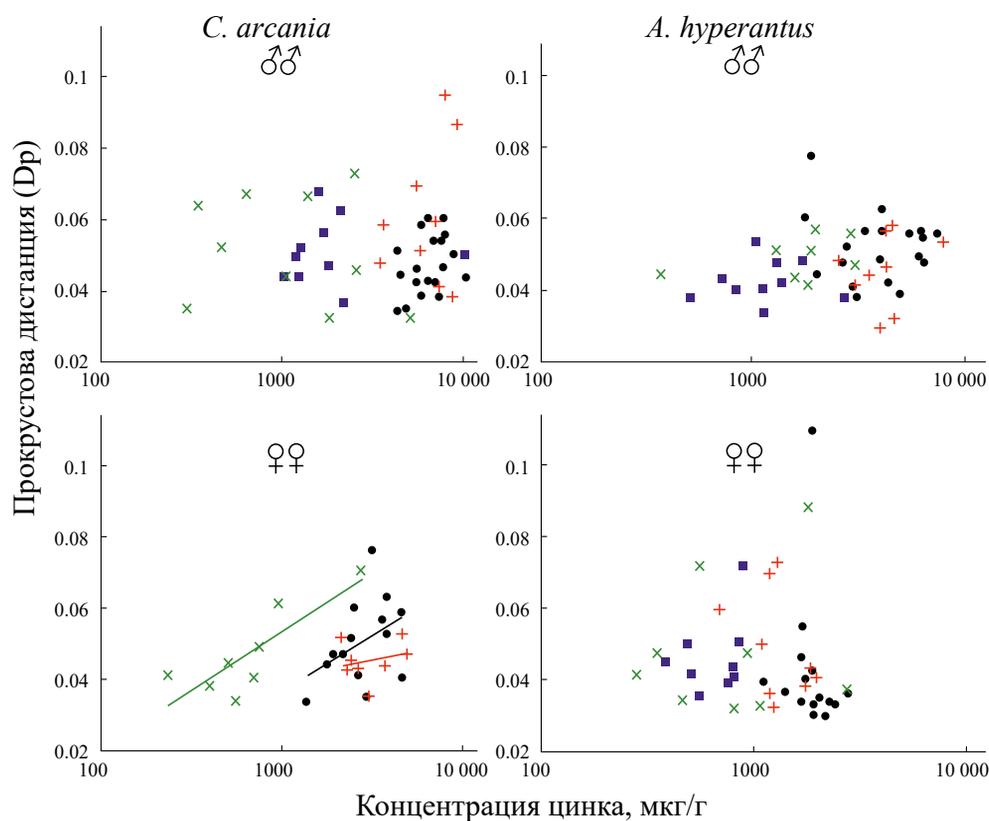


Рис. 3. Зависимость флуктуирующей асимметрии формы крыла ($FA_{18_{tot}}$) от концентрации цинка: зеленым цветом обозначен контрольный участок, синим – фоновый, красным – буферный, черным – импактный.

Таблица 4. Результаты MANCOVA для размера глазчатых пятен

Предиктор	Частное η^2	Λ Уилкса	F	df_1	df_2	p
<i>Самцы C. arcania</i>						
Участок	0.25	0.45	2.42	15	108.1	0.005
Log_{10} Cu	0.08	0.92	0.71	5	39.0	0.620
Log_{10} Zn	0.11	0.88	0.95	5	39.0	0.461
<i>Самки C. arcania</i>						
Участок	0.36	0.41	2.73	10	48.0	0.010
Log_{10} Cu	0.39	0.61	3.03	5	24.0	0.030
Log_{10} Zn	0.25	0.75	1.60	5	24.0	0.199
<i>Самцы A. hyperantus</i>						
Участок	0.21	0.52	1.57	18	108.0	0.081
Log_{10} Cu	0.16	0.84	1.17	6	38.0	0.344
Log_{10} Zn	0.19	0.81	1.47	6	38.0	0.216
<i>Самки A. hyperantus</i>						
Участок	0.15	0.64	0.92	18	96.7	0.552
Log_{10} Cu	0.17	0.83	1.20	6	34.0	0.330
Log_{10} Zn	0.15	0.85	1.03	6	34.0	0.426

Асимметрия размера глазчатых пятен. Во всех выборках выявлена статистически значимая FA размера всех пятен (Приложение, табл. S4–S7).

Воспроизводимость измерений ($ME5$) составляла в среднем 0.69 (от 0.57 до 0.88), что, как и в случае с FA формы, свидетельствует о надежности результатов.

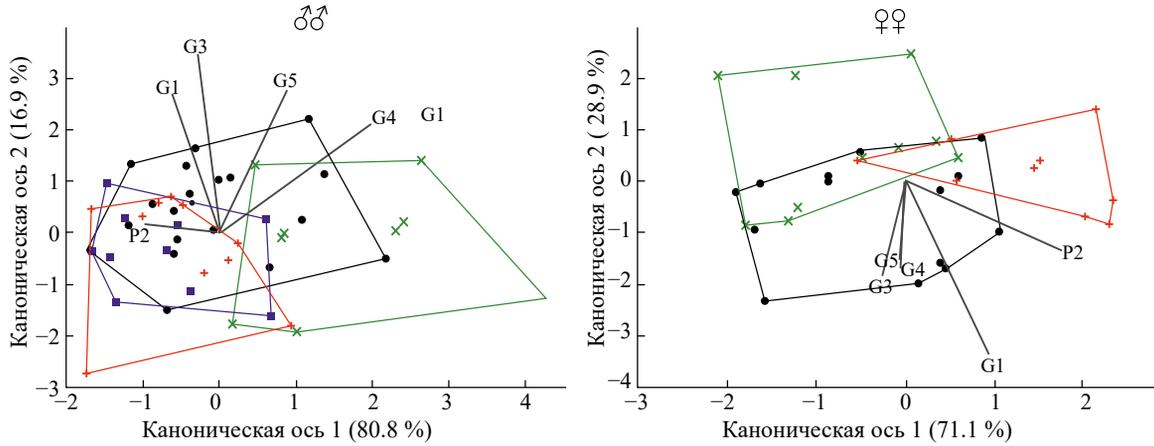


Рис. 4. Ординация участков на основе канонического анализа по размеру глазчатых пятен самцов и самок *C. arcania*: зеленым цветом обозначен контрольный участок, синим – фоновый, красным – буферный, черным – импактный. Векторы показывают вклад исходных признаков в канонические оси. В скобках – доля объясняемой дисперсии.

В двух случаях у *A. hyperantus* была выявлена статистически значимая DA: у самцов – пятна G2, у самок – P2 (Приложение, табл. S6, S7). Однако сравнение величины DA с индексом FA4a показало, что в обоих случаях направленной асимметрией можно пренебречь (для самцов DA = 0.05 мм, FA4a = 0.11; для самок DA = 0.05 мм, FA4a = 0.13).

(табл. 5). На контрольном участке индекс равен 0.070 ± 0.009 , фоновом – 0.069 ± 0.006 , буферном – 0.105 ± 0.013 , импактном – 0.072 ± 0.005 . Другими словами, наиболее асимметричны по размеру пятен самцы с буферного участка: только эта группа статистически значимо отличается от других (критерий Тьюки, $p < 0.05$).

Статистически значимые различия между участками обнаружены по FA17 у самцов *A. hyperantus*

Концентрации Cu не коррелировали с FA17. Только в одном случае – самки *C. arcania* – выявлена

Таблица 5. Результаты ANCOVA для флуктуирующей асимметрии (FA17) размера глазчатых пятен

Предиктор	Частное η^2	SS	df	F	p	Коэффициент наклона (\pm ошибка)
Самцы <i>C. arcania</i> : $R^2 = 0.11$, $F(5, 43) = 1.03$, $p = 0.413$						
Участок	0.07	0.001	3	1.11	0.357	–
Log ₁₀ Cu	<0.01	<0.001	1	<0.01	0.984	– 0.001 \pm 0.013
Log ₁₀ Zn	0.05	0.001	1	2.11	0.154	0.020 \pm 0.014
Самки <i>C. arcania</i> : $R^2 = 0.26$, $F(4, 28) = 2.41$, $p = 0.073$						
Участок	0.03	453×10^{-6}	2	0.49	0.615	–
Log ₁₀ Cu	<0.01	5×10^{-6}	1	0.01	0.917	– 0.002 \pm 0.020
Log ₁₀ Zn	0.15	2288×10^{-6}	1	4.99	0.034	– 0.045 \pm 0.020
Самцы <i>A. hyperantus</i> : $R^2 = 0.27$, $F(5, 43) = 3.11$, $p = 0.017$						
Участок	0.27	0.011	3	5.17	0.004	–
Log ₁₀ Cu	0.01	<0.001	1	0.46	0.502	0.014 \pm 0.021
Log ₁₀ Zn	0.07	0.002	1	3.28	0.077	– 0.030 \pm 0.017
Самки <i>A. hyperantus</i> : $R^2 = 0.11$, $F(5, 39) = 0.96$, $p = 0.454$						
Участок	0.07	1373×10^{-6}	3	1.00	0.402	–
Log ₁₀ Cu	0.01	114×10^{-6}	1	0.25	0.620	0.006 \pm 0.013
Log ₁₀ Zn	<0.01	4×10^{-6}	1	0.01	0.928	0.002 \pm 0.019

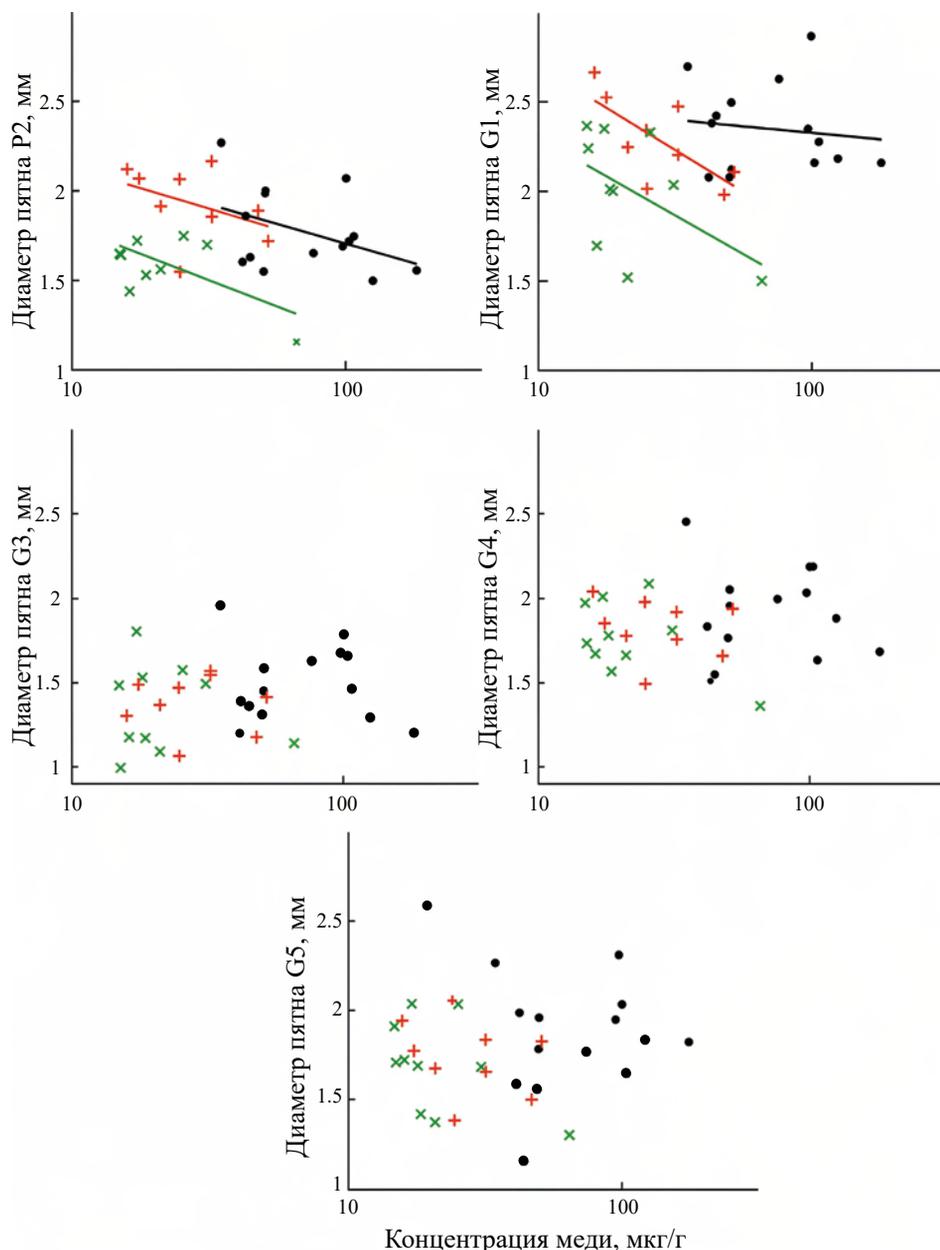


Рис. 5. Зависимость размера глазчатых пятен самок *S. arcana* от концентрации меди: зеленым цветом обозначен контрольный участок, красным – буферный, черным – импактный.

отрицательная корреляция между FA17 и Zn, однако общая модель статистически незначима (см. табл. 5 и рис. 6), что, скорее всего, связано с недостаточным объемом выборки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Форма крыла

В полете чешуекрылых чередуются две фазы – парения и порхания. Форма крыла влияет на эффективность обеих фаз. Парящий полет относительно энергетически дешев, а его эффективность

повышается с увеличением коэффициента удлиненности (aspect ratio) – отношения длины крыла к площади [7, 8]. Порхающий полет более маневренный и энергетически затратный, на его эффективность влияет распределение площади вдоль длинной оси крыла, т.е. положение его центра тяжести [8, 50]: чем дистальнее располагается центр тяжести крыла, тем больше подъемной силы производят крылья за один взмах. Коэффициент удлиненности и положение центра тяжести крыла характеризуют его общие пропорции. Именно эти параметры сильнее всего влияют на аэродинамику и эффективность полета чешуекрылых.

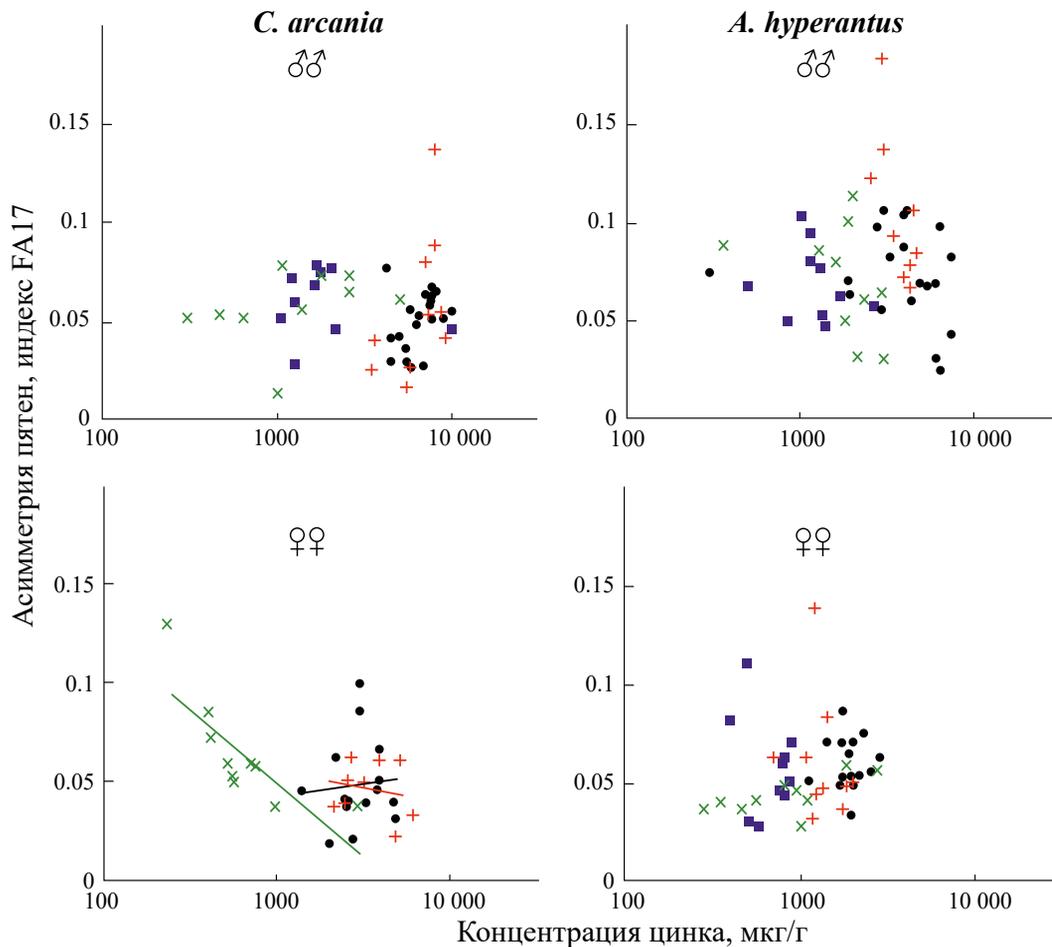


Рис. 6. Зависимость флуктуирующей асимметрии (FA17) размера глазчатых пятен от концентрации цинка: зеленым цветом обозначен контрольный участок, синим – фоновый, красным – буферный, черным – импактный.

Мы анализировали микромасштабную изменчивость формы крыла, не затрагивающую его пропорций. Связь между микроразличиями формы крыла и аэродинамикой изучена слабо [8], поэтому остается открытым вопрос, насколько влияют небольшие вариации формы на эффективность полета и жизнеспособность особей. Можно предположить, что по сравнению с общими пропорциями крыла их влияние существенно слабее. Относительно FA формы крыльев также нет оснований полагать, что она может влиять на эффективность полета.

Для некоторых видов насекомых именно изменение формы крыльев, но не FA, может служить индикатором стресса [34]. Тем не менее у исследованных нами видов бархатниц не выявлено однозначной связи между содержанием металлов и формой крыла. Из четырех возможных сочетаний (два вида \times два пола) зависимость обнаружена только для одного из них (самки *C. arcania*), причем только для одного из двух анализируемых металлов (Cu). Однако даже в этом случае различия формы,

соответствующие разнице между фоновыми и импактными концентрациями Cu, столь ничтожны, что требуются значительные усилия для их локализации на крыле (см. рис. 2). Это означает, что различия между чистыми и загрязненными участками по форме крыла пренебрежимо малы, а в выявленном случае, учитывая небольшой объем этой выборки, скорее всего, случайны.

Аналогичный результат получен и для FA формы крыла: только в одном случае из четырех – и также у самок *C. arcania* – FA увеличивалась с ростом концентрации металла, но на этот раз Zn, а не Cu. Напомним, что для FA длины крыла не было выявлено связи с накоплением металлов в теле имаго [1]. С одной стороны, это противоречие соответствует представлениям о том, что форма крыла как многомерный и менее функционально нагруженный признак обладает большей чувствительностью при оценке влияния стрессора на стабильность развития по сравнению с длиной крыла. С другой стороны, эффект обнаружен только для самок одного

вида, что не позволяет рассматривать зависимость FA формы от индивидуальной токсической нагрузки общей закономерностью. Более того, с учетом небольшого объема выборки пока нет оснований считать этот эффект надежно установленным. В единственной известной нам работе по изучению влияния промышленного загрязнения на FA формы крыла в природных популяциях насекомых (перепончатокрылых) не было обнаружено зависимости FA от загрязнения среды выбросами цинкоплавильного завода [51].

Пятна крылового рисунка

Мы анализировали глазчатые пятна на вентральной стороне переднего и заднего крыльев, хорошо заметные у бархатниц в позе покоя. Вопрос о функциональной значимости таких пятен остается дискуссионным. В ряде работ была подтверждена справедливость гипотезы отклонения (перенос внимания хищника от жизненно важных частей тела на край крыла), но лишь при специфических условиях освещения [52] или только в отношении определенных хищников [53, 54]. Однако при других условиях освещения и другом составе хищников этот эффект отсутствовал [55, 56]. Тем не менее факт неоднократного независимого возникновения глазчатых пятен в разных эволюционных линиях чешуекрылых [15], а также первоначального появления именно вентральных пятен на задних крыльях в семействе Nymphalidae [16] может быть косвенным аргументом в пользу функциональной нагруженности этого признака.

Мы установили, что влияние загрязнения на размеры пятен различалось между видами. У *A. hyperantus* размеры не зависели ни от концентраций металлов в теле имаго, ни от близости участка к источнику выбросов. Для *C. arcania* закономерность оказалась иной: у обоих полов выявлена разница между участками, а у самок — отрицательная корреляция с концентрацией Cu (но не Zn). Показательно, что последний эффект установлен не для всех пятен, а только для двух из пяти анализировавшихся (P2 и G1).

Скорее всего, выявленные различия между участками — это естественно обусловленная микропопуляционная изменчивость, не имеющая отношения к промышленному загрязнению. Из-за низкой миграционной способности для *C. arcania* характерно образование локальных группировок, в той или иной степени морфологически дистанцированных друг от друга, особенно при высокой мозаичности местообитаний [57]. Отрицательная

корреляция размера пятен и концентраций Cu вряд ли надежна из-за уже упоминавшегося небольшого объема выборки. В любом случае ее не только затруднительно интерпретировать, но и нельзя считать общей для обоих видов и тем более специфичной в отношении загрязнения.

Результаты по FA размера пятен также можно рассматривать как отрицательные применительно к тестируемым гипотезам. Нами не выявлено корреляции этого показателя с содержанием металлов у обоих видов. Различия между участками по FA размера пятен обнаружены только у самцов *A. hyperantus*, однако максимальный уровень FA отмечен на буферном участке, а не импактном. Косвенно это свидетельствует о случайном характере различий, которые проблематично однозначно интерпретировать как причинно-следственную зависимость “доза—эффект”.

Из исследованных нами трех признаков только глазчатые пятна в отличие от размера и формы крыла не имеют отношения к локомоции. С одной стороны, появляющиеся в последние годы прямые экспериментальные подтверждения гипотезы отклонения [52, 54] ставят под сомнение нейтральность этого признака. С другой, эксперименты на бархатнице *Bicyclus anynana* показали, что при выборе полового партнера самки учитывают размер глазчатых пятен, но не их асимметрию [33]. Также нет оснований полагать, что в природных условиях асимметрия пятен на вентральной стороне крыльев у бархатниц может каким-либо образом влиять на вероятность успешных атак хищников. У представителей данного семейства в позе покоя крылья сложены над телом, поэтому хищник одномоментно может наблюдать жертву только с одной стороны. Исходя из сказанного, теоретически симметричность анализируемых нами пятен должна слабо контролироваться отбором. Однако тестируемая гипотеза об увеличении FA под влиянием стресса от накопления металлов не подтвердилась даже на таком — наиболее «подходящем» — признаке.

Литературные данные относительно изменений FA глазчатых пятен под действием стресса противоречивы. Так, у одного и того же вида бархатниц, *B. anynana*, воздействие разных температур на одной и той же стадии онтогенеза привело к неодинаковым результатам: холодовой шок вызвал увеличение FA размера пятен, а тепловой — нет [58, 59]. В зависимости от стороны крыла FA размера пятен может различаться: у играющих роль вторичных половых признаков дорсальных пятен FA больше,

чем у вентральных [33, 59]. В единственном известном нам исследовании влияния промышленного загрязнения на FA размера пятен крылового рисунка чешуекрылых [2] было показано отсутствие различий между чистыми и загрязненными участками.

Флуктуирующая асимметрия как индикатор стресса

Вероятной причиной неослабевающего интереса исследователей к анализу флуктуирующей асимметрии служит их убежденность в информативности этого параметра для индикации стресса. Стресс могут вызывать любые физические, химические, генетические и прочие воздействия, ведущие к повышению энергетических затрат организма, в результате чего на его рост, размножение и стабилизацию развития остается меньше энергии. Длительный стресс снижает жизнеспособность организма [60, 61].

Для насекомых-фитофагов стрессором может быть загрязнение среды потенциально токсичными металлами и металлоидами, содержащимися в выбросах промышленных предприятий, которые накапливаются в организме в превышающих пределы регуляции концентрациях. У чешуекрылых вызванный накоплением металлов стресс может выражаться в повышенной смертности гусениц, снижении плодовитости самок и уменьшении размера тела [62–65].

К наиболее чувствительным индикаторам стресса относят специфические физиологические или морфологические модификации, направленные на его снижение, а также уменьшение размера тела. Нарушение стабильности развития также считают индикатором стресса [61]. Однако этот параметр, оцениваемый по величине FA симметричных органов, по-видимому, менее чувствителен и надежен. Более того, его измерение требует особой методической тщательности, без соблюдения которой велика вероятность ошибочных выводов [6, 66–68].

Вслед за многочисленными исследованиями энтузиастов, выявлявших зависимость FA от силы стрессора [69–72 и др.], появилось не меньше работ скептиков, не подтвердивших этого [45, 59, 73, 74]. Применительно к влиянию промышленного загрязнения на насекомых примерами первых могут быть работы [75–78], вторых – [2, 51, 79, 80]. Вероятно, чувствительность FA к стрессорам различна для разных видов и признаков, а также специфична по отношению к действующим факторам [51, 81, 82].

Выявление общих закономерностей в проявлении обсуждаемого феномена и причин разнородности эффектов оптимально на основе метаанализов, объединяющих результаты большого количества отдельных исследований. Метаанализ особенно полезен при изучении слабых эффектов и противоречивости результатов [83]; это как раз случай влияния стрессоров на FA.

Выполнено несколько метаанализов связи стресса и FA для разных групп животных [84, 85]. Их результаты показали, что в целом связь между силой стрессового воздействия и FA слабая [84], причем в природных популяциях насекомых эффект менее выражен по сравнению с лабораторными условиями [85]. Причиной таких различий может быть как недоучет многих «посторонних» факторов, оказывающих влияние на FA в природе, так и пониженная устойчивость к стрессу лабораторных линий, например из-за сниженного генетического разнообразия [85, 86]. В последнем случае лабораторные результаты могут завышать величину эффекта стрессора на FA. Однако влияние промышленного загрязнения на FA исследовано на ограниченном наборе таксонов и показателей, что обуславливает необходимость продолжения работ в природных популяциях с включением разных источников загрязнения, видов и признаков.

Наша работа добавляет к массиву данных по FA у обитающих на загрязненных территориях насекомых информацию по тем параметрам, которые исследуют очень редко – форме крыла и крыловому рисунку. Нам известны лишь единичные исследования этих признаков: форму крыла изучали у перепончатокрылых [51], элементы крылового рисунка – у чешуекрылых семейств *Nymphalidae* и *Lycaenidae* [2]. Хотя теоретически из-за меньшей функциональной нагрузки использование этих признаков как индикаторов стресса предпочтительнее по сравнению с традиционно анализируемой длиной крыла, цитируемые авторы, как и мы, получили отрицательные результаты.

Следует оговорить важный момент: мы не можем однозначно утверждать, что обитающие на импактном участке особи анализируемых видов находятся в состоянии стресса, вызванного поступлением потенциально токсичных металлов. С одной стороны, на этом участке было обнаружено накопление в теле имаго эссенциальных (Cu и Zn) и токсичных (Pb и Cd) элементов в очень высоких концентрациях, причем для Zn – на уровне гипераккумуляции [1]. У чешуекрылых под действием

металлов уменьшаются размеры тела [62, 64, 87], что интерпретируют как проявление стресса [61]. С другой стороны, отрицательная корреляция длины крыла с концентрациями металлов была выявлена только у самок *C. arcania*, т.е. реакцию нельзя считать общей [1]. Кроме того, поскольку из дюжины обитающих на фоновой территории видов бархатниц вблизи завода сохраняются только рассматриваемые *A. hyperantus* и *C. arcania* [1], это может свидетельствовать об их приспособленности к условиям загрязнения. К сожалению, такая неопределенность затрудняет интерпретацию результатов в контексте обсуждения FA как индикатора стресса.

Возможны следующие гипотетические объяснения полученных нами отрицательных результатов. Во-первых, накопление металлов даже в высоких концентрациях может не быть стрессором для исследуемых видов в силу их адаптации к загрязнению. Во-вторых, из-за функциональной нагрузки и прямой связи с жизнеспособностью FA рассмотренных признаков может плохо индцировать стресс. В-третьих, из-за небольшого объема выборки нашему статистическому анализу могло не хватить мощности, учитывая типичную для природных популяций слабость связи FA и стрессора. Наконец, в-четвертых, причинная связь между FA и стрессом действительно отсутствует.

На данном этапе мы не имеем оснований для обсуждения справедливости каждого из этих объяснений. Однако какова бы ни была причина полученного нами отрицательного результата, он добавляет аргументов скептикам, декларирующим необходимость осторожности при использовании FA в качестве индикатора стресса в природных популяциях насекомых.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тестируемые в нашей работе гипотезы о влиянии загрязнения металлами на форму крыла и глазчатые пятна крылового рисунка, а также их флуктуирующую асимметрию не нашли однозначного подтверждения. Хотя и на групповом (различия между чистыми и загрязненными участками), и на индивидуальном (корреляция с концентрациями металлов в теле имаго) уровнях были обнаружены некоторые эффекты, они оказались очень слабыми, специфичными в отношении признака, вида и пола и поэтому, скорее всего, случайными.

Как и ранее в отношении длины крыла [1], результаты по его форме и размеру глазчатых пятен

не дают достаточных оснований считать флуктуирующую асимметрию индикатором вызванного промышленным загрязнением стресса. Несмотря на меньшую функциональную нагруженность и многомерность исследованных признаков, для которых традиционно предполагается большая чувствительность и разрешающая способность по сравнению с размером тела, связанные с ними ожидания не оправдались. Однако дефицит информации о влиянии промышленного загрязнения на стабильность развития в природных популяциях насекомых не позволяет пока обсуждать степень общности полученного отрицательного результата. Вместе с тем малочисленность данных обуславливает необходимость продолжения исследований в этом направлении, причем с расширением спектра анализируемых таксонов и признаков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем признательность Э.Х. Ахуновой за измерение концентраций металлов и П.В. Рудоискателю за предоставленные выборки бабочек с контрольного участка. Мы благодарны М.В. Козлову (Университет г. Турку, Финляндия) за ценные комментарии к первоначальному варианту рукописи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Анализ данных и подготовка статьи выполнены в рамках государственного задания Института экологии растений и животных УрО РАН (проекты №№ 122021000091-2 и 122021000076-9).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Сбор и анализ бабочек выполнен с одобрения Комиссии по биоэтике Института экологии растений и животных УрО РАН (протокол № 13 от 1 ноября 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Приложение доступно онлайн по адресу:

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шкурихин А.О., Захарова Е.Ю., Воробейчик Е.Л. Фенотипическая изменчивость *Aphantopus hyperantus*

- и *Coenonympha arcania* (Lepidoptera: Nymphalidae) в окрестностях Среднеуральского медеплавильного завода. 1. Содержание металлов и длина крыла // Экология. 2023. № 6. С. 453–469. <https://doi.org/10.31857/S0367059723060094>
2. Zverev V., Kozlov M.V. The fluctuating asymmetry of the butterfly wing pattern does not change along an industrial pollution gradient // *Symmetry*. 2021. V. 13. Art. 626. <https://doi.org/10.3390/sym13040626>
 3. Polak M., Möller A.P., Gangestad S.W. et al. Does an individual asymmetry parameter exist? A meta-analysis // *Developmental Instability: Causes and Consequences* / Ed. Polak M. New York: Oxford University Press, 2003. P. 81–96.
 4. Crespi B.J., Vanderkist B.A. Fluctuating asymmetry in vestigial and functional traits of a haplodiploid insect // *Heredity*. 1997. V. 79. P. 624–630. <https://doi.org/10.1038/hdy.1997.208>
 5. Leung B., Forbes M.R., Houle D. Fluctuating asymmetry as a bioindicator of stress: comparing efficacy of analyses involving multiple traits // *American Naturalist*. 2000. V. 155. P. 101–115. <https://doi.org/10.1086/303298>
 6. Palmer A.R., Strobeck C. Fluctuating asymmetry analyses revisited // *Developmental instability: causes and consequences* / Ed. Polak M. New York: Oxford University Press, 2003. P. 279–319.
 7. Dudley R. The biomechanics of insect flight: form, function, evolution. Princeton: Princeton University Press, 2002. 476 p.
 8. Le Roy C., Debat V., Llaurens V. Adaptive evolution of butterfly wing shape: from morphology to behavior // *Biol. Rev. Cambr. Philos. Soc.* 2019. V. 94. № 4. P. 1261–1281. <https://doi.org/10.1111/brv.12500>
 9. Adams D.C., Rohlf F.J., Slice D.E. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution” // *Ital. J. Zool.* 2004. V. 71. P. 5–16. <https://doi.org/10.1080/11250000409356545>
 10. Adams D.C., Rohlf F.J., Slice D.E. A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century // *Hystrix: Ital. J. Mammal.* 2013. V. 24. P. 7–14. <https://doi.org/10.4404/hystrix-24.1-6283>
 11. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. *Geometric morphometrics for biologist: a primer*. New York: Elsevier Academic Press, 2004. 443 p.
 12. Mitteroecker P., Gunz P. Advances in geometric morphometrics // *Evol. Biol.* 2009. V. 36. P. 235–247. <https://doi.org/10.1007/s11692-009-9055-x>
 13. Schwanwitsch B.N. On the groundplan of the wing pattern in nymphalids and certain other families of rhopalocerous Lepidoptera // *Proc. Zool. Soc. Lond. B.* 1924. V. 34. P. 509–528. <https://doi.org/10.1111/J.1096-3642.1924.TB01511.X>
 14. Nijhout H.F. *The development and evolution of butterfly wing patterns*. Washington: Smithsonian Institution Press, 1991. 297 p.
 15. *Diversity and evolution of butterfly wing patterns* / Eds. Sekimura T., Nijhout H.F. Singapore: Springer Nature, 2017. 321 p.
 16. Monteiro A. Origin, development, and evolution of butterfly eyespots // *Annu. Rev. Entomol.* 2015. V. 60. P. 253–271. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-010814-020942>
 17. Nijhout H.F. A comprehensive model for colour pattern formation in butterflies // *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1990. V. 239. P. 81–113. <https://doi.org/10.1098/rspb.1990.0009>
 18. Iwata M., Otaki J.M. Focusing on butterfly eyespot focus: uncoupling of white spots from eyespot bodies in nymphalid butterflies // *SpringerPlus*. 2016. V. 5. Art. 1287. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2969-8>
 19. Ford E.B. *Ecological genetics*. 2-nd ed. Methuen, London, 1965. 335 p.
 20. Frazer J.F.D., Willcox H.N.A. Variation in spotting among the close relatives of the butterfly, *Maniola jurtina* // *Heredity*. 1975. V. 34. № 3. P. 305–322. <https://doi.org/10.1038/hdy.1975.41>
 21. Roskam J.C., Brakefield P.M. Seasonal polyphenism in *Bicyclus* (Lepidoptera: Satyridae) butterflies: different climates need different cues // *Biol. J. Linn. Soc.* 1999. V. 66. P. 345–356. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1999.tb01895.x>
 22. Brakefield P., Gates J., Keys D. et al. Development, plasticity and evolution of butterfly eyespot patterns // *Nature*. 1996. V. 384. № 21. P. 236–241. <https://doi.org/10.1038/384236a0>
 23. Bhardwaj S., Jolander L.S.H., Wenk M.R. et al. Origin of the mechanism of phenotypic plasticity in satyrid butterfly eyespots // *eLife*. 2020. V. 9. P. 1–13. <https://doi.org/10.7554/eLife.49544>
 24. Marcus J.M. *Evo-Devo of butterfly wing patterns* // *Evolutionary Developmental Biology-A Reference Guide* / Eds. L. Nuño de la Rosa, G.B. Müller. Cham: Springer, 2019. P. 1–13.
 25. Seppänen R. Differences in spotting pattern between populations of *Aphantopus hyperantus* (Lepidoptera, Satyridae) in southern Finland // *Ann. Zool. Fenn.* 1981. V. 18. P. 1–36.
 26. Горбач В.В. Внутрипопуляционная изменчивость элементов рисунка на крыльях глазка цветочного *Aphantopus hyperantus* (Lepidoptera, Satyridae) // *Уч. зап. Петрозав. гос. ун-та*. 2012. № 6. С. 27–31.
 27. Захарова Е.Ю., Шкурухин А.О. Морфологическая изменчивость бархатниц *Aphantopus hyperantus* и *Erebia ligea* (Lepidoptera, Satyridae) в аллопатрических и аллохронных микропопуляциях // *Зоол. журн.* 2021. Т. 100. Вып. 10. С. 1110–1123. <https://doi.org/10.31857/S0044513421100135>

28. Захарова Е.Ю. Фенотипическая изменчивость сеницы *Coenonympha arcania* L. (Lepidoptera, Satyridae) в естественных и антропогенно трансформированных местообитаниях Среднего и Южного Урала // Энтомолог. обозр. 2012. Т. 91. № 2. С. 250–268.
29. Prudic K.L., Stoehr A.M., Wasik B.R., Monteiro A. Eyespots deflect predator attack increasing fitness and promoting the evolution of phenotypic plasticity // Proc. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci. 2015. V. 282. Art. 20141531. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.1531>
30. Vallin A., Jakobsson S., Lind J., Wiklund C. Prey survival by predator intimidation: an experimental study of peacock butterfly defence against blue tits // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2005. V. 272. P. 1203–1207. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.3034>
31. Kodandaramaiah U., Vallin A., Wiklund C. Fixed eyespot display in a butterfly thwarts attacking birds // Anim. Behav. 2009. V. 77. P. 1415–1419. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2009.02.018>
32. Kodandaramaiah U. The evolutionary significance of butterfly eyespots // Behav. Ecol. 2011. V. 22. P. 1264–1271. <https://doi.org/10.1093/beheco/arr123>
33. Breuker C.J., Brakefield P.M. Female choice depends on size but not symmetry of dorsal eyespots in the butterfly *Bicyclus anynana* // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2002. V. 269. P. 1233–1239. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2005>
34. Hoffman A.A., Woods R.E., Collins E. et al. Wing shape versus asymmetry as an indicator of changing environmental conditions in insects // Austr. J. Entomol. 2005. V. 44. P. 233–243. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.2005.00469.x>
35. Nijhout H.F., McKenna K.Z. Wing morphogenesis in Lepidoptera // Progr. Biophys. Molec. Biol. 2018. V. 137. P. 88–94. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2018.04.008>
36. McKenna K.Z., Nijhout H.F. The development of shape. Modular control of growth in the lepidopteran forewing // JEZ-B. Molec. Dev. Evol. 2021. V. 338. P. 170–180. <https://doi.org/10.1002/jez.b.23101>
37. Rohlf F.J. tpsDig2. 2017. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/index.html>
38. Rasband W.S. ImageJ. 2014. URL: <http://imagej.nih.gov/ij/>
39. Zakharova E.Yu., Shkurikhin A.O., Oslina T.S. Morphological variation of *Melanargia russiae* (Esper, 1783) (Lepidoptera, Satyridae) from the main part of the range and in case of its expansion to the north under climate change conditions // Contemp. Probl. Ecol. 2017. V. 10. P. 488–501. <https://doi.org/10.1134/S1995425517050146>
40. Некрутенко Ю.П. Булавоусые чешуекрылые Крыма: Определитель. Киев: Наукова думка, 1985. 152 с.
41. Klingenberg C.P., McIntyre G.S. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry with Procrustes methods // Evolution. 1998. V. 52. P. 1363–1375. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1998.tb02018.x>
42. Klingenberg C.P., Barluenga M., Meyer A. Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry // Evolution. 2002. V. 56. P. 1909–1920. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2002.tb00117.x>
43. Jackson D.A. Stopping rules in principal components analysis: a comparison of heuristical and statistical approaches // Ecology. 1993. V. 74. P. 2204–2214. <https://doi.org/10.2307/1939574>
44. Klingenberg C.P. Analyzing fluctuating asymmetry with geometric morphometrics: concepts, methods, and applications // Symmetry. 2015. V. 7. P. 843–934. <https://doi.org/10.3390/sym7020843>
45. Symanski C., Redak R.A. Does fluctuating asymmetry of wing traits capture relative environmental stress in a lepidopteran? // Ecol. Evol. 2021. V. 11. P. 1199–1213. <https://doi.org/10.1002/ece3.7097>
46. Drake A.G., Klingenberg C.P. The pace of morphological change: historical transformation of skull shape in St Bernard dogs // Proc. R. Soc. Lond. Ser. B: Biol. Sci. 2008. V. 275. P. 71–76. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1169>
47. Klingenberg C.P. Size, shape, and form: concepts of allometry in geometric morphometrics // Dev. Gen. Evol. 2016. V. 226. P. 113–137. <https://doi.org/10.1007/s00427-016-0539-2>
48. Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis // Palaeont. Electr. 2001. V. 4. № 1. P. 1–9.
49. Klingenberg C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics // Mol. Ecol. Res. 2011. V. 11. P. 353–357. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x>
50. Ellington C. The aerodynamics of hovering insect flight. II. Morphological parameters // Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser B: Biol. Sci. 1984. V. 305. P. 17–40. <https://doi.org/10.1098/rstb.1984.0050>
51. Szentgyorgyi H., Moroń D., Nawrocka A. et al. Forewing structure of the solitary bee *Osmia bicornis* developing on heavy metal pollution gradient // Ecotoxicology. 2017. V. 26. P. 1031–1040. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1831-2>
52. Olofsson M., Vallin A., Jakobsson S., Wiklund C. Marginal eyespots on butterfly wings deflect bird attacks under low light intensities with UV wavelengths // PLoS ONE. 2010. V. 5. № 5. Art. e10798. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010798>
53. Lyytinen A., Brakefield P.M., Lindström L., Mappes J. Does predation maintain eyespot plasticity in *Bicyclus anynana*? // Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2004. V. 271. P. 279–283. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2571>

54. Halali D., Krishna A., Kodandaramaiah U., Molleman F. Lizards as predators of butterflies: shape of wing damage and effects of eyespots // J. Lepid. Soc. 2019. V. 73. № 2. P. 78–86. <https://doi.org/10.18473/lepi.73i2.a2>
55. Lyytinen A., Brakefield P.M., Mappes J. Significance of butterfly eyespots as an anti-predator device in ground-based and aerial attacks // Oikos. 2003. V. 100. P. 372–379. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2003.11935.x>
56. Vlieger L., Brakefield P.M. The deflection hypothesis: eyespots on the margins of butterfly wings do not influence predation by lizards // Biol. J. Linn. Soc. 2007. V. 92. P. 661–667. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00863.x>
57. Захарова Е.Ю., Юсупова О.В. Морфологическая изменчивость и ландшафтно-биотопическая приуроченность микропопуляций сеницы *Coenonympha arcania* (L.) (Lepidoptera: Satyridae) в условиях гор Южного Урала // Бюл. МОИП. Отд. биол. 2017. Т. 122. Вып. 2. С. 18–26.
58. Brakefield P.M. Phenotypic plasticity and fluctuating asymmetry as responses to environmental stress in the butterfly *Bicyclus anynana* // Environmental stress, adaptation and evolution / Eds. Bijlsma R., Loeschcke V. Basel: Birkäuser, 1997. P. 65–78.
59. Breuker C.J., Brakefield P.M. Heat shock in the developmentally sensitive period of butterfly eyespots fails to increase fluctuating asymmetry // Evol. Dev. 2003. V. 5. № 3. P. 231–239. <https://doi.org/10.1046/j.1525-142X.2003.03031.x>
60. Escós J.M., Alados C.L., Pugnaire F.I. et al. Stress resistance strategy in arid land shrub: interaction between developmental instability and fractal dimension // J. Arid Environ. 2000. V. 45. P. 325–336. <https://doi.org/10.1006/jare.2000.0641>
61. Graham J.H., Raz S., Hel-Or H., Nevo E. Fluctuating asymmetry: methods, theory, and applications // Symmetry. 2010. V. 2. P. 466–540. <https://doi.org/10.3390/sym2020466>
62. Huang D., Kong J., Seng Y. Effects of the heavy metal Cu²⁺ on growth, development, and population dynamics of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) // J. Econ. Entomol. 2012. V. 105. №1. P. 288–294. <https://doi.org/10.1603/ec11163>
63. Islam S.J., Manna P., Unni B., Kailta J. Higher concentrations of heavy metals impair antioxidant defense mechanism and growth response of muga silkworm, *Antheraea assamensis* (Lepidoptera: Saturniidae) // J. Entomol. Zool. Stud. 2019. V. 7. № 2. P. 715–724.
64. Jin P., Chen J., Zhan H. et al. Accumulation and excretion of zinc and their effects on growth and food utilization of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) // Ecotoxicol. Environ. Saf. 2020. V. 202. Art. 110883. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110883>
65. Shephard A.M., Mitchell T.S., Henry S.B. et al. Assessing zinc tolerance in two butterfly species: consequences for conservation in polluted environments // Insect Conserv. Diver. 2020. P. 201–210. <https://doi.org/10.1111/icad.12404>
66. Kozlov M.V., Zvereva E.L. Confirmation bias in studies of fluctuating asymmetry // Ecol. Indic. 2015. V. 57. P. 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.05.014>
67. Козлов М.В. Исследования флуктуирующей асимметрии растений в России: мифология и методология // Экология. 2017. № 1. С. 3–12. <https://doi.org/10.7868/S0367059717010103>
68. Kozlov M.V. Blind measurements did not confirm effects of forest fragmentation on fluctuating asymmetry of a tropical butterfly *Morpho helenor* // Sci. Nat. 2024. V. 110. Art. 28. <https://doi.org/10.1007/s00114-024-01913-9>
69. Zakharov V.M. Analysis of fluctuating asymmetry as a method of biomonitoring at the population level // Bioind. Chem. Radioact. Pollut. / Ed. Krivolutsky D. Moscow, Boca Raton: Mir, CRC Press, 1990. P. 187–198.
70. Clarke G.M. Fluctuating asymmetry: a technique for measuring developmental stress of genetic and environmental origin // Acta Zool. Fenn. 1992. V. 191. № 1. P. 31–35.
71. Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: an epigenetic measure of stress // Biol. Rev. 1990. V. 65. P. 131–145. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1990.tb01186.x>
72. Parsons P.A. Fluctuating asymmetry: a biological monitor of environmental and genomic stress // Heredity. 1992. V. 68. № 4. P. 361–364. <https://doi.org/10.1038/hdy.1992.51>
73. Bjorksten T., David P., Pomiankowski A., Fowler K. Fluctuating asymmetry of sexual and nonsexual traits in stalk-eyed flies: a poor indicator of developmental stress and genetic quality // J. Evol. Biol. 2000. V. 13. P. 89–97. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.2000.00146.x>
74. Cárcamo H.A., Floate K.D., Lee B.L. et al. Developmental instability in a stem-mining sawfly: can fluctuating asymmetry detect plant host stress in a model system? // Oecologia. 2008. V. 156. P. 505–513. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1009-y>
75. Graham J.H., Roe K.E., West T.B. Effects of lead and benzene on the developmental stability of *Drosophila melanogaster* // Ecotoxicology. 1993. V. 2. P. 185–195. <https://doi.org/10.1007/BF00116423>
76. Bonada N., Williams D.D. Exploration of the utility of fluctuating asymmetry as an indicator of river condition using larvae of the caddisfly *Hydropsyche morosa* (Trichoptera: Hydropsychidae) // Hydrobiologia. 2002. V. 481. P. 147–156. <https://doi.org/10.1023/A:1021297503935>
77. Bonada N., Vives S., Rieradevall M., Prat N. Relationship between pollution and fluctuating

- asymmetry in the pollution-tolerant caddisfly *Hydropsyche exocellata* (Trichoptera, Insecta) // Arch. Hydrobiol. 2005. V. 162. P. 167–185.
<https://doi.org/10.1127/0003-9136/2005/0162-0167>
78. Görür G. Developmental instability in cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*) populations exposed to heavy metal accumulated host plants // Ecol. Indic. 2006. V. 6. P. 743–748.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2005.09.001>
79. Rabitsch W.B. Levels of asymmetry in *Formica pratensis* Retz. (Hymenoptera, Insecta) from a chronic metal-contaminated site // Environ. Toxicol. Chem. 1997. V. 16. P. 1433–1440.
<https://doi.org/10.1002/etc.5620160716>
80. Zverev V., Kozlov M.V. Decline of *Eulia ministrana* (Lepidoptera: Tortricidae) in polluted habitats is not accompanied by phenotypic stress responses // Insect Sci. 2021. V. 28. P. 1482–1490.
<https://doi.org/10.1111/1744-7917.12862>
81. Woods R.E., Sgrò C.M., Hercus M.J., Hoffmann A.A. The association between fluctuating asymmetry, trait variability, trait heritability, and stress: a multiply replicated experiment on combined stresses in *Drosophila melanogaster* // Evolution. 1999. V. 53. P. 493–505.
<https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1999.tb03784.x>
82. Polak M., Kroeger D., Cartwright I., Ponce de Leon C. Genotype-specific responses of fluctuating asymmetry and preadult survival to the effects of lead and temperature stress in *Drosophila melanogaster* // Environ. Pollut. 2004. V. 127. P. 145–155.
[https://doi.org/10.1016/s0269-7491\(03\)00238-0](https://doi.org/10.1016/s0269-7491(03)00238-0)
83. Harrison F. Getting started with meta-analysis // Methods Ecol. Evol. 2011. V. 2. P. 1–10.
<https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2010.00056.x>
84. Leung B., Forbes M.R. Fluctuating asymmetry in relation to stress and fitness: effects of trait type as revealed by meta-analysis // Ecoscience. 1996. V. 3. P. 400–413.
<https://doi.org/10.1080/11956860.1996.11682357>
85. Beasley D.A.E., Bonisoli-Alquati A., Mousseau T.A. The use of fluctuating asymmetry as a measure of environmentally induced developmental instability: A metaanalysis // Ecol. Indic. 2013. V. 30. P. 218–226.
<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.02.024>
86. Frankham R. Stress and adaptation in conservation genetics // J. Evol. Biol. 2005. V. 18. P. 750–755.
<https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00885.x>
87. Zvereva E.L., Kozlov M.V. Responses of terrestrial arthropods to air pollution: a meta-analysis // Environ. Sci. Pollut. Res. 2010. V. 17. P. 297–311.
<https://doi.org/10.1007/s11356-009-0138-0>

PHENOTYPIC VARIABILITY OF *APHANTOPUS HYPERANTUS* AND *COENONYMPHA ARCANIA* (LEPIDOPTERA: NYMPHALIDAE) IN THE VICINITY OF THE MIDDLE URAL COPPER SMELTER. PART 2. WING SHAPE AND EYESPOT SIZE

A. O. Shkurihin^{a,*}, E. Y. Zakharova^a, E. L. Vorobeichik^a

^a Institute of Plant and Animal Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences,
Russia 620144 Yekaterinburg

* e-mail: ashkurikhin@yandex.ru

Abstract – We tested hypotheses that the accumulation of potentially toxic metals (Cu and Zn) in the imagoes of two Nymphalid species (*Aphantopus hyperantus* and *Coenonympha arcania*) correlates with wing shape and eyespot size, as well as increases their fluctuating asymmetry. These traits are less functionally significant compared to wing length, for which no negative impact of pollution was previously found in these species. Therefore, theoretically, their fluctuating asymmetry may better indicate stress. Butterflies were collected at different distances from the Middle Ural Copper Smelter (Revda, Russia). The shape of the forewings and hindwings was analyzed using geometric morphometrics. Eyespot sizes were measured on the ventral side of the forewings and hindwings. Wing shape and its fluctuating asymmetry did not differ between sites in all cases (two species, males and females) but, in one case, correlated with metals (*C. arcania* females). Eyespot size differed between sites in one species (*C. arcania*) and, only in females of this species, negatively correlated with Cu (only for two out of five analyzed eyespots). The fluctuating asymmetry of eyespot size differed between sites only in one case (*A. hyperantus* males), but it was not highest near the smelter; only in *C. arcania* females, asymmetry decreased with increasing Zn. Thus, the tested hypotheses were not unequivocally confirmed: although some pollution effects were found at both the group (differences between sites) and individual (correlation with metals) levels, they were very weak, specific to trait, species, and sex, and therefore, most likely occasional. The results add to doubts about the informativeness of fluctuating asymmetry as an indicator of stress in natural insect populations.

Keywords: fluctuating asymmetry, developmental stability, geometric morphometrics, wing pattern, diurnal butterflies, air emission, heavy metals, industrial pollution