

А.Е. МІЛОВАНОВ, О.О. КОМПАНІЙЦЕВ,
В.В. ОБЕРЕМОК, А.П. СІМЧУК

Таврійський національний університет ім. В.І. Вернадського,
Сімферополь
E-mail: avi@tnu.crimea.ua

**ГЕНЕТИЧНІ ДИСТАНЦІЇ МІЖ
НОМІНАТИВНИМИ
І ПАРАТИПІЧНИМИ ФОРМАМИ
COLIAS CROCEA FOURC.
ТА C. ERATE ESP. (LEPIDOPTERA,
PIERIDAE) ЗА ДАНИМИ
RAPD-PCR-АНАЛІЗУ**



Генетичний поліморфізм двох палеарктичних видів жовтянок *Colias crocea* Fourc. і *Colias erate* Esp. досліджений у серійних вибірках методом RAPD-PCR-аналізу тотальної клітинної ДНК. Використано праймери OPA-01, OPA-03, OPA-04, OPA-08. Для обох видів були знайдені таксон-специфічні маркери (маркери OPA-08₂₅₀, OPA-08₃₀₀ виявилися асоційованими із плавно округленим краєм вальви, маркер OPA-04₄₀₀ виявився асоційованим із вальвою у формі кута). Внутрішньогеномний поліморфізм *C. erate* виявився набагато меншим, ніж у *C. crocea*. Представлено свідчення міжвидової гібридизації *C. crocea* та *C. erate*. Передбачувані міжвидові гібриди (паратипічні форми *f. chlorodona* і *f. pseudochrysozona*) зайняли строго проміжне положення між батьківськими видами на дендрограмах подібності, побудованих методом UPGMA, і на максимальних спенінгових деревах. Ціком адитивних RAPD-спектрів, однак, не було отримано, і таксономічний статус паратипічних форм залишається неясним. Тільки форма *eratoidea* має маркери, відсутні у спектрах всіх інших тестованих екземплярів. Можливо, вона є криптичним видом, який не виявляється звичайними морфологічними і біохімічними методами, та її передослідження методами молекулярної генетики (секвенування клонованої ДНК) представляється дуже бажаним.

© А.Е. МІЛОВАНОВ, О.О. КОМПАНІЙЦЕВ,
В.В. ОБЕРЕМОК, А.П. СІМЧУК, 2006

Вступ. Семісимпатричні види *C. crocea* та *C. erate* широко перекривають один одного за амплітудою внутрішньопопуляційної мінливості і, можливо, гібридизуються у зоні часткової симпатрії. Ще з часів роботи Яхонтова [1] затвердилася думка, що паратипічні форми обох видів мають негібридне походження.

Раніше нами [2] при електрофоретичному тестуванні (ЕФ) у поліакриламідному гелі 12 алозимних локусів — Aat (аспартатамінотрансфераза), Ac (аконітаза), AldH (альдегіддегідрогеназа), AlpH (лужна фосфатаза), Est (естераза), GdH (глутаматдегідрогеназа), Gk (гексокіназа), G-6-PdH (глюкозо-6-фосфат дегідрогеназа), MdH (малатдегідрогеназа), Me (малік-ензим), NdH (NadH-дегідрогеназа), Tgr (тирозиназа) у двох вибірках достовірні відмінності між номінативними *C. crocea* (vm⁺cs⁺fs⁺) і *C. erate* (vm cs fs) були виявлені тільки за локусом NdH (N = 27, коефіцієнт асоціації Пірсона, $r = -0,49$, $\chi^2 = 6,48$, $df = 1$, $P < 0,02$). Номінативні *C. erate* (vm⁺cs⁺fs⁺) і гібриди (паратипічні форми обох видів) не розрізняються за жодним із локусів (в тому числі за AlpH і Est). Не розрізняються вони ні за рівнем гетерозиготності, ні за частотою рідких алелей. У той же час номінативні *C. crocea* (vm⁺cs⁺fs⁺) і гібриди (паратипічні форми обох видів) розрізняються за локусом NdH (N = 23, $r = -0,48$, $\chi^2 = 5,3$, $df = 1$, $P < 0,05$). При об'єднанні номінативного *C. erate* (vm cs fs) і гібридів (паратипічних форм обох видів) в одну групу і зіставленні їх із номінативним *C. crocea* (vm⁺cs⁺fs⁺) відмінності за локусом NdH посилюються (N = 30, $r = -0,57$, $\chi^2 = 9,75$, $df = 1$, $P < 0,01$). При такому групуванні стають достовірними відмінності за локусом AldH (N = 14, $r = -0,56$, $\chi^2 = 4,39$, $df = 1$, $P < 0,05$). Таким чином, паратипічні форми *C. crocea* і *C. erate* за локусами NdH і AldH виявляють більшу схожість з *C. erate*.

В останні роки широке застосування в молекулярній систематиці і популяційній генетиці отримали методи молекулярно-генетичного типування на основі полімеразної ланцюгової реакції. Великою популярністю користується метод RAPD-PCR, який дозволяє виявляти генетичні розходження не тільки видів або популяцій, але й окремих особин. Недоліками методу є висока чутливість до початкової концентрації ДНК-мішені, залежність кінцевих результатів від умов проведення реакції, подібна електрофоретична рухливість ампліфікованих

фрагментів з різною нуклеотидною послідовністю, а також домінуючий характер успадкування маркерів, що ускладнює проведення експерименту та інтерпретацію даних. Але RAPD—PCR дозволяє відносно швидко аналізувати будь-який, у тому числі анонімний, генетичний матеріал, не маючи даних про його первинну послідовність. При ретельно підібраних умовах метод RAPD—PCR-аналізу дозволяє усунути вказані перешкоди та отримувати результати з високим ступенем відтворюваності [3—5].

Метою нашої роботи була оцінка генетичних дистанцій між номінативними і паратипічними формами *C. crocea* і *C. erate*, маючи на увазі отримання доказів факту природної гібридації *C. crocea* і *C. erate* методом RAPD—PCR-аналізу, який раніше уже використовувався деякими авторами для виявлення міжвидових гібридів у метеликів [4, 6]. Досягнення поставленої мети вимагало розв'язання наступних задач: виділення та очищення сумарної клітинної ДНК, оптимізація умов ампліфікації; пошук видоспецифічних молекулярних маркерів; їхнє використання для визначення таксономічного статусу особин, ідентифікованих як можливі гібриди *C. crocea* і *C. erate*.

Матеріали і методика. Використовувався ентомологічний матеріал, зібраний авторами на степовій станції 12 км північніше м. Сімферополя. RAPD—PCR-аналіз виконаний зі зразками ДНК 17 особин *C. crocea* і *C. erate* (4 ♂♂ номінативного *C. crocea*, 1 ♂ *C. crocea* f. *pseudochrysodona*, 1 ♂ *C. crocea* f. *chlorodona*, 2 ♂♂ *C. crocea* f. *eratoides*, 2 ♂♂ номінативного *C. erate*, 2 ♂♂ *C. erate* f. *chrysodona*, 3 ♂♂ *C. erate* f. *androniata*, 1 ♂ *C. erate* f. *hyaleoides*, 1 ♂ *C. erate*, що містить ознаки f. *chrysodona* і f. *hyaleoides*, і 1 ♂ *C. hyale* як зовнішню групу), вилонених у вказаному локальному місцеперебуванні у вересні 2004 р. Термін збереження матеріалу становив від 6 міс до 1 року. Для виділення ДНК використовували шматочок черевця самця комахи після відокремлення геніталій.

Методика виділення та ампліфікації ДНК описана у роботі [7]. Виділення та очистку сумарної клітинної ДНК проводили шляхом занурення шматочків черевця комахи у рідкий азот на 45—60 с із подальшою гомогенізацією у лізуючому буфері, який містив 0,1 М трис-

HCl, рН 8,5, 0,2 М сахарози, 0,05 М EDTA, 0,5 % додецил сульфат натрію. Гомогенат інкубували при кімнатній температурі 80—90 хв. Додавали 10 мкл протеїнази К із концентрацією 10 мг/л, інкубували 10 хв при 65 °С, перемішуючи. Додавали 100 мкл 8 М ацетату калію та помішали на лід на 30 хв. Центрифугували 20 хв при 3000 г, супернатант відбирали та двічі депротейнізували рівним об'ємом фенолу із подальшою екстракцією сумішшю хлороформ—ізоаміловий спирт 24 : 1. ДНК осаджували додаванням 1,5-кратного об'єму охолодженого ізопропанолу. Після формування осадку при 4 °С центрифугували 30 хв при 6000 г, ізопропанол зливали, осадок ДНК промивали 1 мл 70%-ного етанолу і центрифугували 30 хв при 6000 г. Осадок висушували і розчиняли у 300—400 мл ТЕ-буфера.

RAPD—PCR проводили у реакційній суміші (25 мкл) на термоциклері «Терцик» (ДНК-Технологія, Росія) з використанням реактивів для ПЦР — GenePak™ PCR Universal (ІзоГен, Москва). Реакційна суміш для RAPD-PCR містила 10 мМ трис-HCl рН 9,0, 1,5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 0,01 % желатин, 0,1 % тритон X-100, 0,125 мМ кожного dNTP, 0,25 мкг праймера («Operon Technologies», США), 0,5 од. Taq-полімерази, та 5—10 нг ДНК *C. crocea* або *C. erate*.

Список умовних позначень фенів, прийнятих у раніш опублікованій [12] та даній роботі, наведений у кінці статті.

Режим ампліфікації: 1 цикл денатурації 95 °С 5 хв і наступних 45 циклів за схемою — 95 °С 1 хв, 36 °С 1 хв, 72 °С 2 хв. Термінальну стадію синтезу проводили при 72 °С 10 хв. Використовували олігонуклеотидні декамерні праймери OPA-01 (послідовність основ (5'-3') CAGGCC TTTC; OPA-03 (AGTCAGCCAC); OPA-04 (AATCGGGCTG); OPA-08 (GTGACGTAGG) («Operon Technologies», США). Продукти ампліфікації розділяли методом електрофорезу у 1,8%-ному агарозному гелі і після фарбування бромистим етидієм фотографували в ультрафіолетовому світлі. Як мітчик використовували DNA-markers M100 (ІзоГен, Москва) з довжиною фрагментів 100—1000 пар нуклеотидів. Відтворені RAPD спектри отримані для всіх тестованих зразків за винятком п'яти зразків, ампліфікованих з праймером OPA-01.

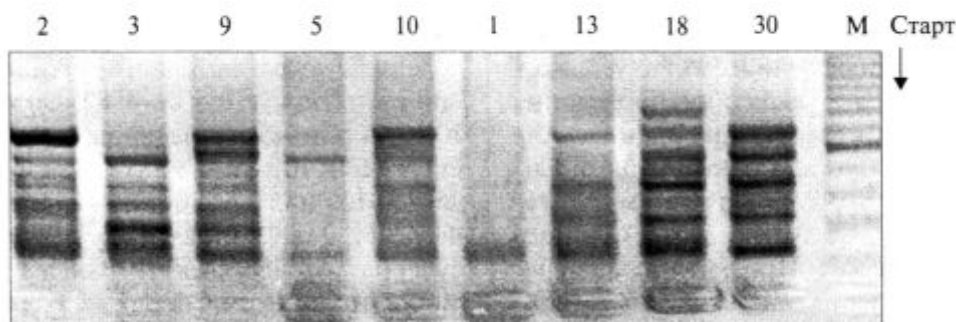


Рис. 1. RAPD-PCR спектри дев'яти примірників ДНК номінативних і паратипічних форм *C. crocea* і *C. erate* (праймер OPA-08): 2 — *C. crocea* (номінативний) (vm'cs'fs⁺); 3 — *C. crocea* (номінативний) (vm'cs'fs⁺); 9 — *C. crocea* (номінативний) (vm'cs'fs⁺); 5 — *C. erate* (номінативний) (vmcsfs); 10 — *C. erate* (номінативний) (vmcsfs); 1 — передбачуваний гібрид, більш схожий із *C. erate*, f. *chlorodona* (vm'csfs⁺); 13 — *C. erate* (vmcsfs); 18 — f. *eratoides* (vm'csfs); 30 — передбачуваний гібрид, f. *pseudochrysodona*, (vm'cs'fs⁺); М — DNA-markers M100 (ІзоГен, Москва) із довжиною фрагментів від 100 до 1000 п.н. (мажорна смужка — 500 п.н.)

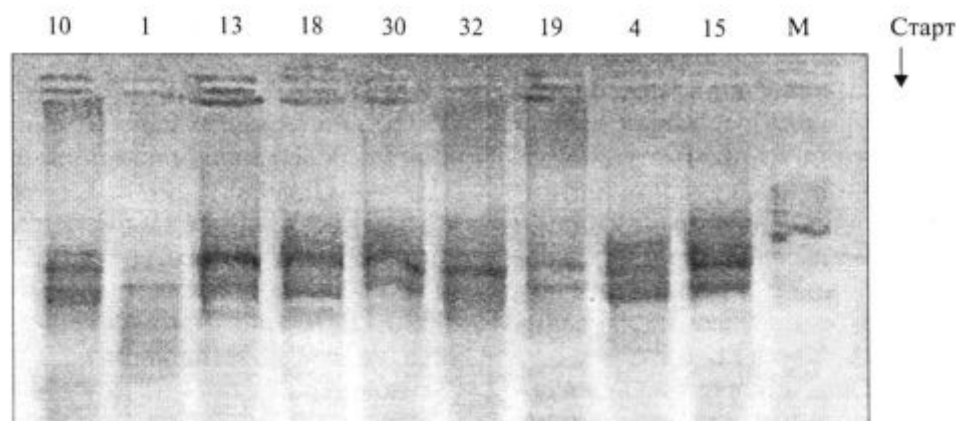


Рис. 2. RAPD-PCR спектри дев'яти примірників ДНК номінативних і паратипічних форм *C. crocea* і *C. erate* (праймер OPA-04): 10, 1, 13, 18, 30 — як на рис. 1; 32 — *C. crocea* (номінативний) (vm'cs'fs⁺); 19 — *C. erate* f. *hyaleoides* (гінекоморф) (vmcsfs); 4 — *C. hyale* (зовнішня група); 15 — *C. erate* f. *androconiata* (vmcsfs⁺); М — DNA-markers M100 (ІзоГен, Москва) із довжиною фрагментів від 100 до 1000 п.н. (мажорна смужка — 500 п.н.)

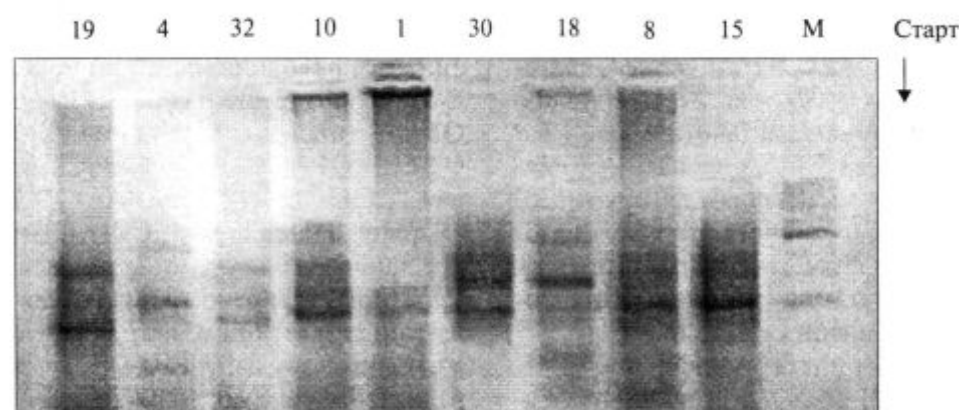


Рис. 3. RAPD-PCR спектри дев'яти примірників ДНК номінативних і паратипічних форм *C. crocea* і *C. erate* (праймер OPA-01 — примірники 19 та 4; праймер OPA-03 — інші примірники): 19, 4, 32, 10, 1, 30, 18, 15 — як на рис. 1 та 2, 8 — *C. erate* f. *chrysodona* (vmcs'fs); М — DNA-markers M100 (ІзоГен, Москва) із довжиною фрагментів від 100 до 1000 п.н. (мажорна смужка — 500 п.н.)

Результати дослідження та їх обговорення. RAPD-спектри всіх проаналізованих особин порівнювалися візуально для виявлення подібних за електрофоретичною рухливістю гомологічних ампліфікованих фрагментів. Отримані на підставі такого порівняння матриці ознак, що відбивають присутність (+) чи відсутність (–) відповідної смуги на електрофореграмі, були використані для розрахунку генетичних дистанцій H_{ei} за формулами з робіт [8, 9]. На підставі отриманих генетичних дистанцій незваженим парно-груповим методом математичних середніх (UPGMA) були побудовані дендрограми і розраховані спенингові дерева. Розрахунок генетичних дистанцій H_{ei} та побудову дендрограм здійснювали вручну, без використання будь-яких комп'ютерних програм, що пов'язано із нечисленністю даних і порівняною легкістю їхньої обробки.

Усього було отримано близько 100 ампліконів. Якщо враховувати тільки мажорні фрагменти, що добре відтворюються при роздрукуванні цифрових фотографій на папері, то в середньому було отримано по 3,1 амплікони/праймер/зразок (причому для *C. crocea* у середньому 3 амплікони/праймер/зразок). Кожен праймер ініціював синтез специфічного набору фрагментів ДНК, що відрізняються за молекулярною масою і мажорністю. RAPD-спектри двох видів помітно розрізняються (рис. 1–3), хоча це маскується високими рівнями внутрішньогеномної гетерогенності й індивідуальної мінливості. Розходження між видами за ступенем генетичної мінливості легко виявляються навіть при візуальному аналізі: RAPD-спектри *C. crocea* більш варіабельні, ніж *C. erate*, з високим внутрішньогеномним поліморфізмом. Молекулярна маса ампліконів варіювала від 700 до 150 пар нуклеотидів. Частина ампліконів була унікальною для окремих особин, деякі фрагменти виявилися таксон-специфічними. Тільки два праймери — ОРА-04 і ОРА-08 — ініціювали синтез діагностичних маркерних фрагментів. Праймер ОРА-08 ампліфікував фрагмент розміром близько 250 п.н., характерний для *C. crocea* (асоціація амплікону ОРА-08₂₅₀ з $vm^+cs^+fs^+$; $n = 14$, $r = +0,522$, $s_r = 0,21$, $t = 2,48$, $P > 0,95$); інший фрагмент, ампліфікований праймером ОРА-08, довжиною близько 380 п.н., розподілявся

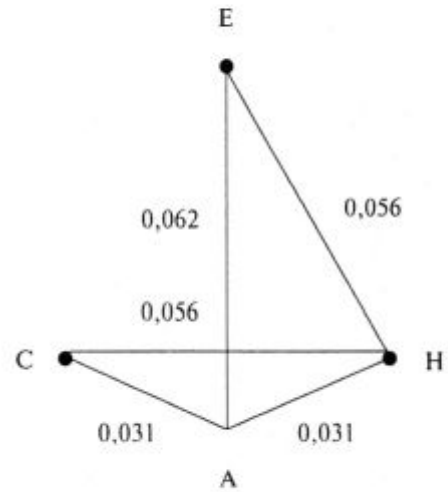


Рис. 4. Значення міжвидових і внутрішньовидових генетичних дистанцій (між номінативними і паратипічними формами *C. crocea* і *C. erate* та їхніми передбачуваними гібридами) у реальному масштабі (праймер ОРА-08): генетичні дистанції розраховані за форму-

$$D = -\ln \frac{\sum a_i b_i}{\left(\sum a_i^2 \sum b_i^2 \right)^{1/2}}, \text{ [за 8]; } C - C. \text{ crocea номіна-}$$

тивний ($vm^+cs^+fs^+$); E — *C. erate* номінативний ($vmcsfs$); A — *C. erate* f. *androconiata* ($vmcsfs^+$) і f. *hyaleoides* ($vmcsfs$); H — передбачувані гібриди: f. *chlorodona* (vm^+csfs^+); f. *pseudochrysodona* (vm^+cs^+fs); f. *eratoides* (vm^+csfs)

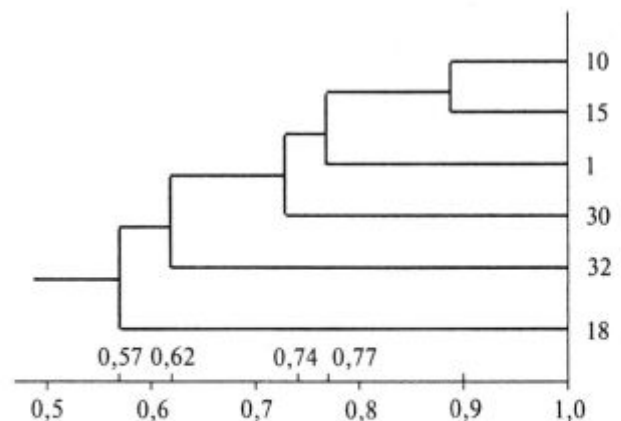


Рис. 5. Дендрограма подібності, побудована методом UPGMA із використанням праймерів ОРА-03, ОРА-04, ОРА-08 для шести зразків ДНК *Colias crocea* і *Colias erate*: 10 — *C. erate* (номінативний) ($vmcsfs$); 15 — *C. erate* f. *androconiata* ($vmcsfs^+$); 1 — *C. crocea* f. *chlorodona* (vm^+csfs^+); 32 — *C. crocea* f. *pseudochrysodona* (vm^+cs^+fs) — передбачуваний гібрид; 30 — *C. crocea* f. *eratoides* (vm^+csfs) — передбачуваний гібрид; 18 — *C. crocea* f. *eratoides* (vm^+csfs)

Коефіцієнти попарної подібності ампліфікованих послідовностей шести зразків ДНК (праймери ОРА-03, ОРА-04, ОРА-08) *C. crocea* і *C. erate*

	32				
30	0,5	30			
18	0,63	0,67	18		
1	0,57	0,75	0,5	1	
15	0,67	0,8	0,5	0,78	15
10	0,75	0,67	0,56	0,75	0,9

Примітка. Подібність між зразками розраховували за формулою $D = 2N_{ab}/(N_a + N_b)$, де N_a і N_b — число ампліфікованих фрагментів у зразків a і b , а N_{ab} — число фрагментів із однаковою електрофоретичною рухливістю [9].

серед особин *C. crocea* менш мозаїчно ($n = 14$, $r = +0,632$, $s_r = 0,224$, $t = 2,82$, $P > 0,95$). Праймер ОРА-04 ініціював фрагмент довжиною близько 400 п.н. (зв'язок амплікону ОРА-04₄₀₀ з феном vm^+ : $n = 9$, $r = -0,633$, $s_r = 0,282$, $t = 2,24$,

$P < 0,95$ кореляція негативна, але не достовірна). Праймер ОРА-08 виявляє ще один амплікон довжиною близько 150 п.н., який хоча і є присутнім у всіх особин *C. erate*, але все-таки у *C. crocea* і у передбачуваних гібридів він помітно мажорніший, ніж у *C. erate*. Маркерні фрагменти розподіляються у передбачуваних гібридів мозаїчно, що знижує їхню діагностичну цінність. *C. crocea* значно перебиває *C. erate* за спектрами внутрішньопопуляційної мінливості. Якщо у *C. erate* не виявляється багато ампліконів, які присутні у *C. crocea*, то у *C. crocea* всі амплікони, що визначаються у *C. erate*, присутні і виглядають набагато мажорнішими.

Так звана *C. crocea* f. *chlorodona* при візуальній оцінці за спектрами практично не відрізняється від номінативного *C. erate*. Дві інші паратипічні форми *C. crocea* — f. *pseudochrysodona* і f. *eratoides* за спектрами виявляють переконливу подібність до *C. crocea*: у них присутні амплікони ОРА-08₂₅₀ і ОРА-08₃₈₀, відсутні у *C. erate*, а також амплікон ОРА-08₁₅₀, що у передбачуваних гібридів є набагато мажорнішим, ніж у *C. erate*. Слід зазначити, що всі ампліфіковані фрагменти у передбачуваних гібридів набагато мажорніші, ніж у *C. erate*. У f. *eratoides* і f. *pseudochrysodona* присутній також амплікон ОРА-04₄₀₀, який не виявляється у *C. crocea* f. *chlorodona*. Тільки *C. crocea* f. *eratoides* має амплікони ОРА-08₇₀₀, ОРА-03₅₀₀ і ОРА-01₉₀₀ у високомолекулярній частині спектрів, що різко відрізняє її від всіх інших тестованих особин.

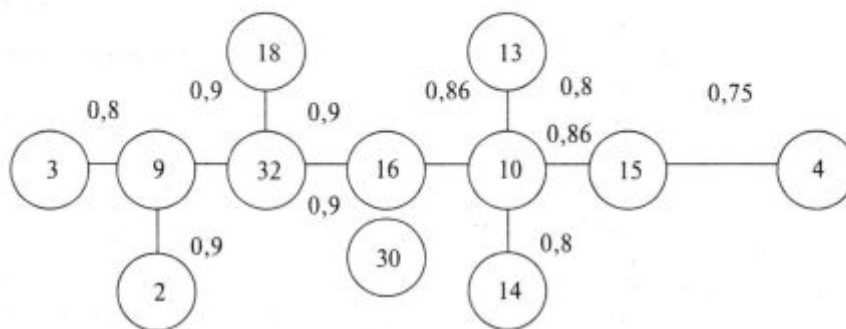


Рис. 6. Максимальне спенінгове дерево (праймер ОРА-08): 2 — *C. crocea* (номінальний) ($vm^+cs^+fs^+$); 3 — *C. crocea* (номінальний) ($vm^+cs^+fs^+$); 9 — *C. crocea* (номінальний) ($vm^+cs^+fs^+$); 18 — f. *eratoides* (vm^+csfs); 30 — передбачуваний гібрид, f. *pseudochrysodona*, (vm^+cs^+fs); 10 — *C. erate* (номінальний) ($vmcsfs$); 13 — *C. erate* ($vmcsfs$); 14–16 — *C. erate* f. *androconiata* ($vmcsfs^+$); 4 — *C. hyale* (зовнішня група)

Для аналізу генетичної подібності досліджуваних особин були обрані три праймери: OPA-03, OPA-04 і OPA-08, RAPD-спектри яких характеризувалися перевагою мажорних фрагментів, що добре ідентифікуються. На підставі отриманих матриць присутності/відсутності ознаки були розраховані середні значення генетичних дистанцій для номінативних і паратипічних форм *C. crocea* і *C. erate*, а також їх передбачуваних гібридів. Генетичні дистанції за Nei (праймер OPA-08) у реальному масштабі представлені на рис. 4. Генетичну відстань між номінативним *C. crocea* і номінативним *C. erate*, рівну 0,156, у реальному масштабі на графіку представити не вдалося. Інші генетичні відстані утворюють правильну піраміду, складену із конгруентних трикутників. Добре видно, що передбачувані гібриди знаходяться на рівній генетичній відстані від номінативного *C. crocea* і від номінативного *C. erate*. Паратипічні форми *C. erate* f. *androconiata* і f. *hyaleoides*, розглянуті разом, розташувалися на рівній відстані від *C. crocea* і передбачуваних гібридів і на вдвічі більшій відстані від *C. erate*, ніж від *C. crocea*, що є дещо несподіваним.

Для побудови дендрограми використовували міру подібності, розраховану як $2N_{ab} / (N_a + N_b)$, де N_a і N_b — число ампліфікованих фрагментів, а N_{ab} — число фрагментів із однаковою електрофоретичною рухливістю [9]. Коефіцієнти попарної подібності ампліфікованих послідовностей ДНК представлені у вигляді вторинної матриці (таблиця). Побудована на основі даних цієї таблиці дендрограма подібності (рис. 5) показує, що передбачувані гібриди (*C. crocea* f. *chlorodona* та f. *pseudochrysodona*) займають проміжне положення між номінативними *C. crocea* і *C. erate*. Виключенням є f. *eratooides*, що першою відгалужується від загального стовбура дендрограми на рівні подібності 0,57. Очевидно, ця форма є в значній мірі стабілізованою і викликає підозру, що серед групи ератеформних особин може ховатися криптичний вид-двійник, який не виявляється звичайними морфологічними і біохімічними методами. Найбільш тісна подібність відзначена між номінативним *C. erate* і f. *androconiata* (0,9). Несподівано тісну подібність виявляють f. *chlorodona* і f. *pseudochrysodona*, однак підкластерів тестовані форми не утворюють: усі відгалужен-

ня відходять від загального стовбура на рівні різної генетичної подібності (кластер «ланцюгового» типу).

Приведені дані добре узгоджуються із даними з максимального спенінгового дерева (праймер OPA-08) для 12 зразків ДНК різних номінативних і паратипічних форм *C. crocea* і *C. erate* (рис. 6).

Висновки. Аналіз генетичних дистанцій і візуальний аналіз RAPD-спектрів приводять до висновку, що хоча передбачувані гібриди займають на дендрограмі проміжне положення між батьківськими видами, вважати це переконливим свідченням на користь припущення про те, що вони є гібридами F₁ або нащадками від повторних схрещувань, очевидно, не можна. Відомо, що RAPD-маркери розглядають як домінуючі ознаки, що успадковуються за законами Менделя. Тому ідентифікація міжвидових гібридів найбільш доказова, коли один з перехресних видів має маркер, відсутній у другого виду. Хоча передбачувані гібриди *C. crocea* і *C. erate* (зокрема f. *eratooides* та f. *pseudochrysodona*) сполучають діагностичні маркери обох видів, цілком адитивних RAPD-спектрів у гібридних особин нами не отримано. Для цього необхідний скринінг значно більшого числа праймерів, ніж ми маємо у даний час. Форма *eratooides*, очевидно, являє собою самостійну та стабілізовану форму, і передослідження її ДНК за допомогою тонких методів молекулярної генетики (секвенування клонованої ДНК) є дуже бажаним.

SUMMARY. Genetic polymorphism of the two Palearctic sulphur butterflies *Colias crocea* Fourc. and *Colias erate* Esp. was examined in serial samples using RAPD-PCR analysis of total cellular DNA. The primers OPA-01, OPA-03, OPA-04, OPA-08 were used. Taxon-specific molecular markers have been found for each species (markers OPA-08₂₅₀, OPA-08₃₀₀ were associated with rounded valve margin; marker OPA-04₄₀₀ was associated with angled valve margin). The genetic diversity of *C. erate* is considerably less than that of *C. crocea*. Genetic evidence for interspecific hybridization between *C. crocea* and *C. erate* is presented. Interspecific hybrids in question (paratypical forms such as f. *chlorodona* and f. *pseudochrysodona*) are situated at intermediate position with regard to the parental species on dendrograms (UPGMA) and maximal spanning trees (MST). Completely additional RAPD-spectra were not obtained though taxonomic status of these paratypical forms stay still vague. Only f. *eratooides* has DNA markers

that are absent in spectra of other specimens tested. Probably it is a cryptic species unrevealed by common morphological and biochemical methods and its investigation by the methods of molecular genetics (sequence of cloned DNA) is very desirable.

РЕЗЮМЕ. Генетический полиморфизм двух палеарктических видов желтушек *Colias crocea* Fourc. и *Colias erate* Esp. исследован в серийных выборках методом RAPD—PCR-анализа тотальной клеточной ДНК. Используются праймеры ОРА-01, ОРА-03, ОРА-04, ОРА-08. Для обоих видов были найдены таксон-специфичные маркеры (маркеры ОРА-08₂₅₀, ОРА-08₃₅₀ оказались ассоциированными с плавно округленным краем вальвы, маркер ОРА-04₄₀₀ оказался ассоциированным с угловатой формой вальвы). Внутригеномный полиморфизм *C. erate* оказался гораздо меньшим, чем у *C. crocea*. Представлены свидетельства межвидовой гибридизации *C. crocea* и *C. erate*. Предполагаемые межвидовые гибриды (паратипические формы *f. chlorodona* и *f. pseudochrysodona*) заняли строго промежуточное положение между родительскими видами на дендрограммах сходства, построенных методом UPGMA, и на максимальных спэннинговых деревьях. Полностью аддитивные RAPD-спектры, однако, не были получены, и таксономический статус паратипических форм остается неясным. Только форма *eratoides* имеет маркеры, отсутствующие в спектрах всех других тестируемых экземпляров. Возможно, она представляет собой криптический вид, не выявляемый обычными морфологическими и биохимическими методами, и ее переисследование методами молекулярной генетики (секвенирование клонированной ДНК) представляется весьма желательным.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Яхонтов А.А. Денні метелики : Посібник для визначення і біологічного вивчення Lepidoptera Rhopalocera Європейської частини СРСР. — К.: Рад. школа, 1939. — 184 с.
2. Мілованов А.Э., Сімчук А.П., Івашов А.В. Внутрипопуляционный полиморфизм *Colias crocea* и *Colias erate* (Lepidoptera, Pieridae) в зоне их синтопного

обитания в Крыму // Зоол. журн. — 2004. — 83. — С. 1244—1248.

3. Захаров Е.В., Челомина Г.Н., Журавлев Ю.Н. Выделение ДНК из музейных экспонатов бабочек (Lepidoptera, Papilionidae) и ПЦР-анализ со случайными и универсальными ген-специфичными праймерами // Генетика. — 2000. — 36. — С. 1221—1229.
4. Захаров Е.В. Доказательство естественной гибридизации двух видов парусников *Parnassius nomion* и *Parnassius bremeri* (Lepidoptera, Papilionidae) методом RAPD-PCR // Генетика. — 2001. — 37. — С. 475—484.
5. Zakharov E.V., Smith C.R., Lees D.C., Cameron A., Vane-Wright R.I., Sperling F.A. Independent gene phylogenies and morphology demonstrate a Malagasy origin for a wide-ranging group of swallow-tale butterflies // Evolution. — 2004. — 58. — P. 2763—2782.
6. Deverno L.L., Smith G.A., Harrison K.J. Randomly amplified polymorphic DNA evidence of introgression in two closely related sympatric species of coniferophagous *Choristoneura* (Lepidoptera, Tortricidae) in Atlantic Canada // Ann. Entomol. Assoc. Amer. — 1998. — 91. — P. 248—259.
7. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd Ed. — New York : Cold Spring Harbour Lab. Press, 1996. — 386 p.
8. Nei M. Molecular Population Genetics and Evolution. — Amsterdam : North-Holland Publ. Co., 1975. — 278 p.
9. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. — 1979. — 76. — P. 5269—5273.

Надійшла 27.09.05

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

- cs⁺ — забарвлення крил шафранне
 cs — забарвлення крил жовто-зелене;
 fs⁺ — андроконіальна пляма на задньому крилі присутня;
 fs — андроконіальна пляма на задньому крилі відсутня;
 vm⁺ — вільний край вальви плавно закруглений;
 vm — вільний край вальви утворює виступ у вигляді кута.