

УДК 575.17:582.923.1

ГЕНЕТИЧНА СТРУКТУРА І ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ПОПУЛЯЦІЙ *GENTIANA LUTEA* L. (GENTIANACEAE) В УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТАХ

М.З. МОСУЛА¹, В.М. МЕЛЬНИК², І.І. КОНВАЛЮК², Н.М. ДРОБИК¹,
І.О. АНДРЕЄВ², В.А. КУНАХ²

¹ Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка
Україна, 46027, м. Тернопіль, вул. М. Кривоноса, 2
e-mail: maryanamosula@gmail.com

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України
Україна, 03680, м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 150
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

Мета. Встановити генетичну структуру *G. lutea* з двох гірських масивів (Чорногора, Свидовець) Українських Карпат, оцінити рівень генетичного поліморфізму та ступінь диференціації популяцій цього виду. **Методи.** Для генетичних досліджень використали метод аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції з RAPD-, ISSR-, IRAP-, CDDP- та RGAP-праймерами. Розраховували частку поліморфних ампліконів (P), очікувану гетерозиготність (H_e), індекс Шеннона (S) та генетичні відстані Жакарда (D_j). **Результати.** Значення показників генетичної різноманітності природних популяцій коливалися в діапазоні: $P = 29, 1-37, 9 \%$, $H_e = 0, 089-0, 126$, $S = 0, 137-0, 190$, середнє $D_j = 26, 9-38, 7 \%$. Агропопуляція з г. Пожижевська характеризувалася низькими показниками H_e ($0, 085$) і S ($0, 131$), близькими до свидовецьких популяцій, та найнижчим серед усіх локалітетів значенням P ($27, 7 \%$) і середнього D_j ($22, 1 \%$). За даними Байєсівського аналізу, досліджені генотипи утворили п'ять груп, в яких виявлено поодинокі особини, що містилися в залишкових кількостях ($0, 1-0, 5 \%$) генетичний матеріал з інших популяцій. Згідно з результатами AMOVA, майже дві третини (65%) генетичної різноманітності припадало на міжпопуляційні відмінності, а частка внутрішньопопуляційного поліморфізму становила 35% . **Висновки.** Порівняння популяцій *G. lutea* з хребтів Чорногора та Свидовець показало, що перші мають вищий рівень генетичної гетерогенності. Методом AMOVA виявлено значну диференціацію популяцій *G. lutea*, яка свідчить про ізоляцію популяцій і обмежений обмін генетичним матеріалом.

Ключові слова: *Gentiana lutea* L., генетична структура, ПЛР-маркери, внутрішньо- та міжпопуляційний поліморфізм, диференціація популяцій.

Вступ. Останнім часом у популяційних дослідженнях рослин значну увагу приділяють вивченню генетичної складової, зокрема внутрішньопопуляційного та внутрішньовидового поліморфізму з використанням методів молекулярно-генетичного аналізу на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Особливо актуальними є такі дослідження рідкісних і зникаючих видів рослин, що зумовлено загостренням проблеми їхнього збереження і відновлення. Знання генетичної структури популяцій цих рослин, динаміки популяційно-генетичних характеристик є необхідними для розроблення стратегії збереження генофонду таких видів та раціонального використання їхніх ресурсів.

© М. З. МОСУЛА, В. М. МЕЛЬНИК, І. І. КОНВАЛЮК, Н. М. ДРОБИК, І. О. АНДРЕЄВ, В. А. КУНАХ, 2014

Унікальним об'єктом для генетичних досліджень є цінний лікарський гірський реліктовий середньоєвропейський вид тирлич жовтий (*Gentiana lutea* L.). В Українських Карпатах проходить північно-східна межа природного поширення *G. lutea*. Тут він зустрічається в діапазоні висот 750–2000 м н.р.м. на схилах різної експозиції та крутизни [1–3]. Біологічні особливості т. жовтого: диз'юнктивний ареал, зумовлений потребою в специфічних екологічних (ґрунтово-кліматичних, фітоценотичних) умовах росту, обмеженість ресурсів, спричинена тривалим періодом онтогенезу (до 100 років), а також селективна елімінація, пов'язана з викопуванням кореневищ найбільших рослин і тому, фактично, знищення найкращих екземплярів, призвели до стрімкого скорочення чисельності його популяцій. На сьогодні в Українських Карпатах збереглося лише кілька великих ізольованих локалітетів цього виду та десяток малих, які суттєво відрізняються за чисельністю (від кількох десятків особин до кількох мільйонів), а також еколого-географічними та фітоценотичними характеристиками [3, 4]. *G. lutea* занесений до Червоних книг і Червоних списків як в Україні, так і в ряді інших європейських країн, відноситься до категорії вразливих таксонів і підлягає охороні [5, 6].

Метою роботи було встановити генетичну структуру *G. lutea* з двох гірських масивів (Чорногора, Свидовець) Українських Карпат, оцінити рівень генетичного поліморфізму та ступінь диференціації популяцій цього виду.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження обрано дикорослі рослини із п'яти природних (гори (гг.) Шешул-Павлик (Sh), полонина (пол.) Лемська (Lem), гора (г.) Гутин Томнатик (HT), гг. Трояска-Татарука (Tr), пол. Крачунеска (Kr)) та однієї інтродукованої (г. Пожижевська (Pozh)) популяцій *G.*

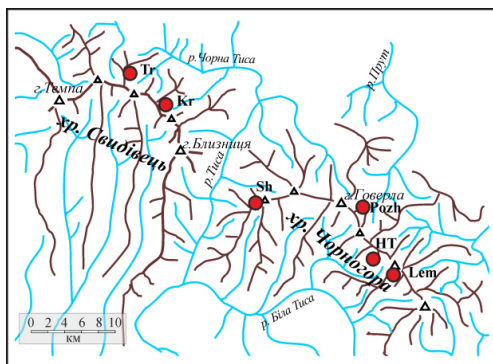


Рис. 1. Карта-схема розташування досліджених популяцій *G. lutea* в Українських Карпатах
Пр и м і т к а. Трикутниками вказано основні вершини гір, кругами – популяції *G. lutea*.

lutea з Українських Карпат (рис. 1). Популяції Tr та Kr зростають на хребті (хр.) Свидовець (1500–1730 м н.р.м.), а Lem, Pozh, HT, Sh – на хр. Чорногора (1400–1950 м н.р.м.).

З наведених вище популяцій було відібрано по 15 зразків листових пластинок з окремих рослин, окрім популяції на г. Гутин Томнатик, з якої, у зв'язку з її малою чисельністю, відібрано 11. ДНК виділяли за стандартним протоколом із свіжих молодих листків [7]. У результаті попереднього скринінгу з 27 RAPD-, 13 ISSR-, 34 IRAP-, 12 CDDP- та 8 пар RGAP-праймерів для роботи було відібрано 10, 9, 5, 6 та 6 пар відповідно [8–12]. IRAP-праймери (розроблені для різних видів рослин) для роботи люб'язно надав д-р Р.М. Календар (МТТ/BI Plant Genomics, Institute of Biotechnology, University of Helsinki).

Ампліфікацію проводили у термоциклері Терцик MC2 («Биотехнология», Росія). Реакційна суміш містила: 0,2 мМ дНТФ (Fermentas, Литва), 1,25 од. Таq-полімерази (Амплісенс, Росія), 0,5 мкМ праймера, 1 × ПЛР-буфер на $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ з 2,5 мМ MgCl_2 (Fermentas, Литва). На суміш нашарували 15 мкл мінеральної олії. Як негативний контроль використовували стан-

дартну реакційну суміш без ДНК. Для проведення ПЛР використовували такі температурні режими: RAPD-ПЛР: 94 °С – 2 хв., 5 циклів (94 °С – 30 с, 37 °С – 30 с, 72 °С – 1 хв.), 35 циклів (94 °С – 20 с, 37 °С – 20 с, 72 °С – 40 с), 72 °С – 2,5 хв.; ISSR-ПЛР: 94 °С – 2 хв., 35 циклів (94 °С – 30 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 1,5 хв.), 72 °С – 2,5 хв.; IRAP-ПЛР: 94 °С – 2 хв.; 35 циклів (94 °С – 30 с; 58 °С – 30 с; 72 °С – 1,5 хв.), 72 °С – 2,5 хв.; CDDP-ПЛР: 94 °С – 2 хв., 35 циклів (94 °С – 30 с, 50 °С – 1 хв., 72 °С – 1,5 хв.), 72 °С – 2,5 хв.; RGAP-ПЛР: 94 °С – 2 хв., 45 циклів (94 °С – 30 с, 45 °С – 45 с, 72 °С – 1 хв.), 72 °С – 2,5 хв. Продукти ампліфікації геномної ДНК розділяли електрофорезом в 1,3 % агарозному гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію в 1 × SB-буфері (5 mM Na₂B₄O₇, pH 8,5) упродовж 5–6 год. за напруженості електричного поля 4–5 В/см. Для визначення розміру фрагментів використовували маркер молекулярної маси (100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb DNA Ladder) («ООО-СибЭнзим-М», Росія).

Обробку електрофореграм проводили за допомогою програми TotalLab (Nonlinear Dynamics). На основі бінарних матриць за допомогою програми GenAlEx 6.5 розраховували частку поліморфних ампліконів (P), очікувану гетерозиготність (He), індекс Шеннона (S) [13]. Визначали генетичні відстані між популяціями за Nei та Жакардом (D_j). Дендрограму генетичної подібності будували методом незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA) за допомогою програми FAMD 1.25 [14]. Для оцінки достовірності групування зразків проводили бутстреп-тест із 1000 повторами. Консенсусне дерево будували з використанням програми Consense (пакет програм Phylip) [15]. Аналіз основних координат (PCoA) проводили з використанням програми FAMD 1.25 [14]. Візуалізацію даних, отриманих за результатами PCoA, здійснювали за допомогою програ-

ми JMP version 7 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Генетичну структуру популяцій визначали з використанням програми Structure 2.3.4 [16, 17]. Розподіл загальної генетичної мінливості між популяціями та в їхніх межах вивчали методом аналізу молекулярної варіанси (AMOVA) в програмі GenAlEx 6.5 [13]. Оцінку кореляцій між матрицями генетичних відстаней Nei та географічних відстаней між популяціями здійснювали з використанням тесту Мантела (999 permutations) [18].

Результати та обговорення

Використовуючи 40 праймерів, отримано 725 ампліконів розміром від 110 до 3400 п.н. Із них 23 (3 %) були мономорфними, тобто характерними для зразків усіх популяцій. Розраховано показники генетичного поліморфізму для популяцій *G. lutea*. Для окремих природних популяцій значення частки поліморфних ампліконів коливалися від 29,1 % до 37,9 %, очікуваної гетерозиготності – від 0,089 до 0,126, індекса Шеннона – від 0,137 до 0,190. Популяції Lem, HT, Sh із масиву Чорногора характеризувалися вищими показниками генетичного поліморфізму (P, He, S) порівняно з популяціями Kr та Tr із Свидовецького масиву. Агропопуляція з г. Пожижевська відзначалась низькими показниками He (0,085) та S (0,131), близькими до свидовецьких популяцій, та найнижчим з усіх досліджених популяцій значенням показника P (27,7 %) (табл.).

Розраховано середні значення генетичних відстаней Жакарда (D_j (сер.)) для шести популяцій т. жовтого за п'ятьма типами маркерів. Найбільші генетичні відстані встановлено для популяції з г. Гутин Томнатик, найменші – для агропопуляції на г. Пожижевська. Популяції за D_j (сер.) розподілилися наступним чином HT > Lem > Sh > Kr ≈ Tr > Pozh. Для природних популяцій генетичні відстані коливалися від 14,7 % до 56,4 %. Для загальної вибірки

Таблиця. Значення основних показників генетичного поліморфізму досліджених популяцій *G. lutea* за узагальненими даними п'яти типів маркерів

Популяція	Частка поліморфних ампліконів (P), %	Очікувана гетерозиготність (He)	Індекс Шенона (S)	Генетичні відстані між рослинами за Жакардом (D _j), %	Середня генетична відстань між рослинами за Жакардом (D _j), %
Lem	37,9	0,126 ± 0,007	0,190 ± 0,010	19,6–39,9	30,6
HT	35,3	0,118 ± 0,007	0,178 ± 0,010	21,5–56,4	38,7
Sh	34,2	0,123 ± 0,007	0,183 ± 0,010	17,8–45,7	28,1
Kr	29,1	0,097 ± 0,006	0,146 ± 0,009	14,7–36,0	27,5
Tr	30,2	0,089 ± 0,006	0,137 ± 0,009	17,7–32,5	26,9
Pozh	27,7	0,085 ± 0,006	0,131 ± 0,009	10,8–30,6	22,1
Середнє	32,4	0,106 ± 0,003	0,161 ± 0,004	17,0–40,2	29,0
Сумарна вибірка рослин	97,0	0,239 ± 0,006	0,379 ± 0,008	10,8–76,7	58,7

рослин цей показник в середньому складає 58,7 %.

На основі D_j методом UPGMA побудовано дендрограму генетичної подібності зразків *G. lutea* (рис. 2). Зразки утворюють кластери відповідно до їхньої популяційної приналежності з високим ступенем підтримки (індекс бутстрепа (ІБ) становить 100 %).

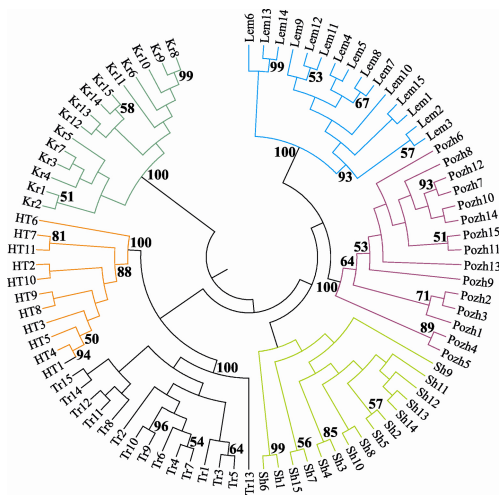


Рис. 2. UPGMA-дендрограма генетичних зв'язків між дослідженими зразками *G. lutea*, побудована на основі D_j, розрахованих за п'ятьма типами ПЛР-аналізу (RAPD, ISSR, IRAP, RGAP, CDDP). Цифрами вказано величини достовірності кластеризації (ІБ)

На рис. 3 подано просторове відображення кластеризації досліджених зразків *G. lutea*, побудоване за допомогою PCoA на основі матриці генетичних відстаней Жакарда. Групування зразків на графіку відповідає їхній популяційній приналежності. Розташування зразків на графіку PCoA є подібним до їхнього розташування на дендрограмі UPGMA, проте не ідентичним.

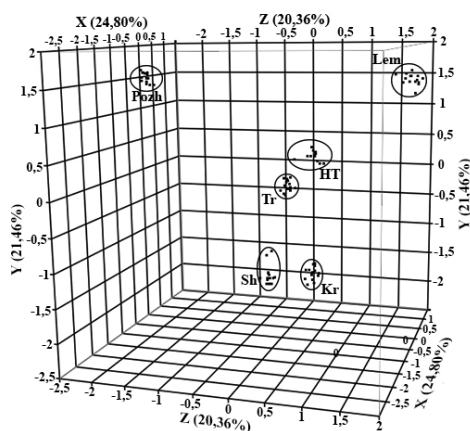


Рис. 3. Графік основного координатного аналізу (PCoA), побудований на основі матриці генетичних відстаней Жакарда, що розраховані за п'ятьма типами ПЛР-аналізу (RAPD, ISSR, IRAP, RGAP, CDDP), та візуалізований за допомогою JMP version 7

Аналіз молекулярної варіанси (AMOVA) за результатами ПЛР з п'ятьма типами маркерів показав, що майже дві третини (65 %) генетичної різноманітності *G. lutea* припадає на міжпопуляційні відмінності, а частка внутрішньопопуляційного поліморфізму становить 35 %.

Популяційно-генетичну структуру *G. lutea* проаналізовано за допомогою програми Structure 2.3.4. Значення К (батьківські популяції) дорівнювало 5. Рисунок 4 демонструє так звані «пропорції суміші» (admixture proportions, Q), розраховані для 86 проаналізованих генотипів, які фактично визначають, з якою ймовірністю кожний з генотипів може бути віднесений до одного із п'яти кластерів. Згідно з даними Байєсівського аналізу, популяції з пол. Лемська та г. Гутин Томнатик мають спільне походження. В об'єднаній популяції «Lem-NT» виявлено три особини, які містять генетичний матеріал із популяції з г. Трояска-Татарука (1,7 %, 10,4 % та 15,6 %). У популяції з г. Трояска-Татарука виявлено особину із генетичним матеріалом з популяції, яка локалізована на г. Шешул-Павлик в кількості 3,2 %. В усіх кластерах виявлено особини, що в залишкових

кількостях (0,1–0,5 %) містять генетичний матеріал, властивий іншим популяціям.

Аналіз отриманих даних дозволив встановити деякі особливості генетичного поліморфізму *G. lutea*. Зокрема, за значеннями основних показників генетичного поліморфізму (He, S, P) популяції *G. lutea* виявилися схожими між собою.

На основі отриманих результатів досліджені популяції можна умовно розділити на три групи: з хр. Чорногора (Sh, Lem, NT), з хр. Свидовець (Kr, Tr) і Pozh. Остання, яка є агропопуляцією, характеризується найнижчими показниками генетичного поліморфізму та найменшими генетичними відстанями між рослинами. Причиною цього, очевидно, є ефект засновника – для створення цієї популяції у 70-х роках ХХ століття було взято невелику кількість генотипів із популяції, яка знаходиться між вершинами гір Шешул та Павлик. Порівняно короткий час існування пожижевської популяції (~ 40 років), а також тривалий період онтогенезу однієї рослини *G. lutea* (до 100 років) були тими факторами, що стримували зростання генетичного різноманіття у ній. Відмінність пожижевської популяції від інших досліджених нами популяцій підтверджується її розташуванням на гра-

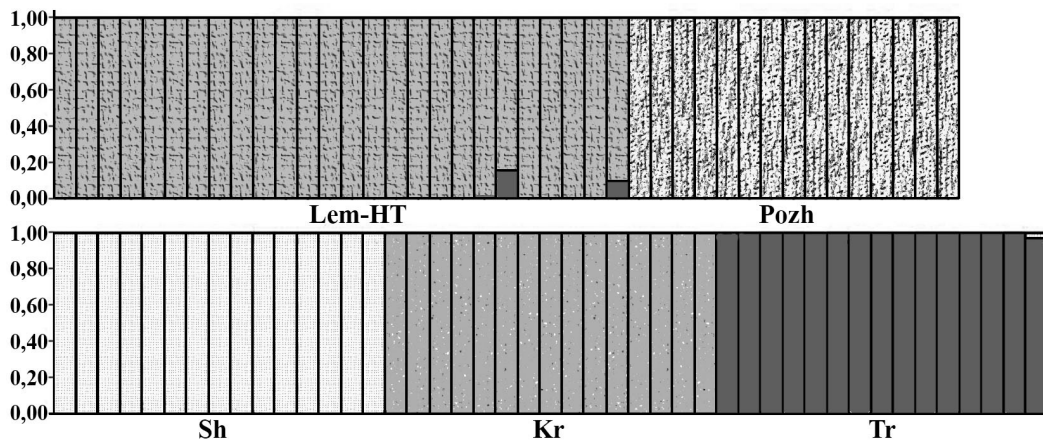


Рис. 4. Структура генетичної різноманітності *G. lutea* з Українських Карпат, встановлена на основі результатів п'яти типів ПЛР-аналізів (RAPD, ISSR, IRAP, RGAP, CDDP) з використанням програми Structure 2.3.4

фіку PCoA, на якому вона виходить із єдиної трьохвимірної площини розташування усіх інших популяцій (рис. 3).

Подібність двох популяцій зі Свидовецького гірського масиву за значеннями показників генетичного поліморфізму, на нашу думку, може бути пов'язана з їхніми еколого-географічними умовами зростання, груповими характеристиками та режимом використання. Зокрема, зазначені популяції близькі за розміром, чисельністю, характеризуються схожою амплітудою висот, орієнтацією та крутизною схилу, розірваним фітогенним полем, фітоценотичним оточенням, переважанням вегетативного способу розмноження над генеративним, зазнають значного пасторального навантаження тощо [3]. Імовірно, сукупність усіх цих чинників зумовлює подібність свидовецьких популяцій за рівнем генетичного різноманіття.

Популяції *G. lutea* з хр. Черногора мають вищий рівень генетичної гетерогенності порівняно із свидовецькими. На нашу думку, це може бути спричинене одним із тих факторів (або їхньою сукупністю), за якими ці дві групи популяцій відрізняються: фітоценотичним оточенням, фітогенним полем (розірваним чи нерозірваним), переважанням одного із способів розмноження (вегетативним чи генеративним), режимом охорони та ін. [3]. Черногірські популяції були схожі між собою за значеннями основних показників генетичного поліморфізму (He, S, P), проте відрізнялися за висотою над рівнем моря, експозицією та груповими характеристиками. Так, наприклад, найбільша в Українських Карпатах за площею і чисельністю популяція *G. lutea* на г. Шешул-Павлик, середня за розміром на пол. Лемська та мала популяція на г. Гутин Томнатик характеризувалися схожими високими показниками генетичного поліморфізму. НТ розташована неподалік (до 3 км) від Lem і відмежована від неї лише невисоким відрогом гори, що, очевидно, не

перешкоджає вільному обміну генетичною інформацією між цими популяціями (перенесення насіння вітром або тваринами, пилку комахами). Тому, незважаючи на малу чисельність особин популяції з г. Гутин Томнатик, для неї характерні високі показники генетичного поліморфізму. На підтвердження цього припущення свідчать результати аналізу даних за допомогою програми Structure – популяції з пол. Лемська і г. Гутин Томнатик формували єдиний кластер (рис. 4).

Деякі ботаніки припускають існування в недалекому минулому на території Українських Карпат єдиної великої популяції *G. lutea* [4]. До її фрагментації відбувався вільний обмін генетичною інформацією між особинами цього виду. Проте, групування зразків на графіку PCoA та на дендрограмі UPGMA, яке відповідає їхній популяційній приналежності, свідчить про значну міжпопуляційну диференціацію *G. lutea*. Така ізоляція популяцій тирличу жовтого, очевидно, існує впродовж тривалого часу і призвела до накопичення суттєвих міжпопуляційних відмінностей, які за даними AMOVA майже в 2 рази перевищують частку внутрішньопопуляційного поліморфізму у складі загальної генетичної гетерогенності виду. Це підтверджується наявністю лише 3 % мономорфних фрагментів, спільних для зразків усіх популяцій. Чітка дивергенція досліджених популяцій пояснюється генетичною ізоляцією, спричиненою фрагментацією місць зростання та в окремих випадках значною географічною (територіальною) ізоляцією. Останнім часом така ізоляція посилилася за рахунок зникнення поодиноких особин, груп рослин або навіть невеликих популяцій *G. lutea*, що знаходились між великими популяціями і сприяли обміну генетичною інформацією між ними [3]. Окрім того, міжпопуляційна дивергенція посилюється контрастністю екологічних умов зростання цього гірського виду. Екологічна гетеро-

генність, яка пов'язана із відмінністю висота експозиції, на яких розташовуються популяції, підсилює генетичну диференціацію напівізолюваних чи ізолюваних популяцій [19]. Підтвердженням того, що гетерогенність умов існування впливає на генетичну диференціацію популяцій, є дослідження, проведені на різних гірських популяціях рослин [19, 20].

У випадку дослідженого нами *G. lutea* чітко проявляється закономірність, характерна для більшості рідкісних рослин і видів, які перебувають під загрозою зникнення, а саме значна диференціація їхніх популяцій. Ця закономірність простежується також у мексиканського ендеміка *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. Ex Baker var *achyrostachys* (Bromeliaceae), фрагментація середовища існування якого привела до значної просторової диференціації алельного різноманіття [21]. Порівнюючи *G. lutea* з Українських Карпат з іншими багаторічними видами, популяції яких локалізуються на значній географічній відстані, встановлено схожі тенденції розподілу загальної генетичної мінливості на між- та внутрішньопопуляційну. А саме з використанням ISSR-маркерів показано високу генетичну різноманітність на видовому рівні ($S = 0,183$) *Monimopetalum chinese* Rehd. (Celastereae), тоді як кожна популяція була менш мінливою ($S = 0,083$), що пов'язується з наявністю інбридингу та відсутністю механізмів і умов, що забезпечують інтенсивний генетичний потік [22]. Цим же методом встановлено, що популяції *G. lutea* L. var. *aurantiaca* з Кантабрійських гір (північно-західна частина Піренейського півострова) характеризуються високим рівнем генетичного поліморфізму ($He = 0,090$, $S = 0,134$, $P = 25,4\%$ – середні значення для популяцій); розподіл загальної генетичної мінливості на між- та внутрішньопопуляційну становив 57% та 43% відповідно [23]. Результати вивчення генетичного різноманіття 29 островних ендемі-

ків із використанням 12–24 ізоферментних локусів показали значну генетичну гетерогенність на видовому рівні, проте низькі показники для окремих популяцій [24].

Отримані нами результати дослідження популяцій *G. lutea* вказують також на відсутність кореляції між показниками генетичного поліморфізму та географічними дистанціями між популяціями ($r = -0,360$, $p = 0,145$) – на дендрограмі просторово віддалені популяції кластеризувалися разом, і навпаки, географічно ближчі розташовувалися в різних кластерах. Імовірно, це зумовлено тим, що формування генетичного різноманіття окремих популяцій відбувалось під впливом інших факторів довкілля, не залучених до аналізу, або ж було пов'язане із історією формування самих популяцій. Також не було виявлено зв'язку між показниками генетичної різноманітності популяцій та їхньою чисельністю. Основною причиною цього може бути велика тривалість життя окремих особин виду, що уповільнює втрату різноманіття у випадку скорочення чисельності популяції в несприятливих умовах.

Висновки

На основі даних молекулярно-генетичного аналізу визначено рівень поліморфізму та вивчено особливості генетичної структури шести популяцій *G. lutea* з Українських Карпат. Виявлено, що вид у цілому характеризується високим рівнем генетичної гетерогенності. Водночас, як свідчать результати аналізу молекулярної варіабельності AMOVA, значна частина її припадає на міжпопуляційні відмінності (65%), а генетичне різноманіття окремих популяцій є порівняно низьким. Це є свідченням їхньої значної дивергенції. Популяції *G. lutea* з хр. Чорногора характеризуються вищим рівнем генетичної гетерогенності порівняно із популяціями з хр. Свидовець. Найнижчий рівень генетичного різноманіття за усіма вивченими показни-

ками має пожижевська агропопуляція, що, ймовірно, зумовлено її штучним походженням, а також коротким часом її існування (~ 40 років). Групування зразків на дендрограмі генетичної подібності та за результатами аналізу головних координат відповідало їхній популяційній приналежності. Не виявлено кореляцій між генетичними та географічними відстанями, а також зв'язку між показниками генетичного різноманіття та чисельністю популяцій. Популяції *G. lutea* є генетично відособленими, проте наявний у невеликій кількості генетичний матеріал з інших популяцій, очевидно, є свідченням спільного походження у недалекому минулому.

Перелік літератури

1. Shyyan N.M. A Review of the taxonomy and distribution of the Gentianaceae in the Ukraine. / In: Rybczyński J.J., Davey M.R., Mikula A. (Eds.). The Gentianaceae. Vol. 1. Characterization and ecology. – Springer Heidelberg, New York, Dordrecht, London, 2014. – P. 149–168.
2. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Види роду *Gentiana* L. флори України у природі та культурі *in vitro* // Укр. ботан. журн. – 2005. – Т. 62, № 3. – С. 337–348.
3. Майорова О.Ю., Грицак Л.Р., Терехова Г.І., Мельник В.М., Андрєєв І.О., Дробик Н.М. *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) у флорі Українських Карпат: характеристика та сучасний стан популяцій // Укр. ботан. журн. – 2013. – Т. 65, № 6. – С. 790–787.
4. Структура популяцій рідкісних видів флори Карпат / [Малиновський К.А., Царик Й.В., Жилияєв Г.Г. та ін.]. – К.: Наук. думка, 1998. – 176 с.
5. European Red List of Vascular Plants / [Bilz M., Kell S.P., Maxted N., Lansdown R.V.]. – Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2011. – 130 p.
6. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я.П. Дідуха. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
7. Rogers I., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biology. – 1985. – Vol. 5, № 2. – P. 69–76.
8. Твардовська М.О., Страшнюк Н.М., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Кунах В.А. RAPD-аналіз геномного поліморфізму деяких видів роду *Gentiana* L. флори України // Доп. НАН України. – 2009. – № 5. – С. 200–204.
9. Конвалюк І.І., Мельник В.М., Дробик Н.М., Кравець Н.Б., Твардовська М.О., Кунах В.А. RAPD-і ISSR-аналіз генетичної мінливості у культурі тканин та органів тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – Т. 9, № 1. – С. 22–31.
10. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.М., Андрєєв І.О., Бублик О.М., Дробик Н.М., Кунах В.А. Генетичне різноманіття популяцій *Gentiana lutea* L. з хребта Свидівців Українських Карпат // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 250–259.
11. Dong P., Wei Y.-M., Chen G.-Y., Li W., Nevo E., Zheng Y.-L. Resistance gene analog polymorphisms (RGAPs) in wild emmer wheat (*Triticum dicoccoides*) and their ecological associations // Genet. Resour. Crop. Ev. – 2009. – Vol. 56, № 1. – P. 121–136.
12. Poczai P., Varga I., Bell N.E., Hyvonen J. Genetic diversity assessment of bitter-sweet (*Solanum dulcamara*, Solanaceae) germplasm using conserved DNA-derived polymorphism and intron-targeting markers // Ann. Appl. Biology. – 2011. – Vol. 159, № 1. – P. 141–153.
13. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – № 6. – P. 288–295.
14. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – № 6. – P. 569–572.
15. Felsenstein J. Inferring Phylogenies [Електронний ресурс]. – Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA, 2004. – 580 p. – Режим доступу: <http://www.sinauer.com/inferring-phylogenies.html>
16. Falush D., Stephens M., Pritchard J. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles / Mol. Ecol. Notes. – 2007. – Vol. 7, № 4. – P. 574–578.
17. Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // Genetics. – 2000. – Vol. 155. – P. 945–959.
18. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // Cancer Res. – 1967. – Vol. 27. – P. 209–220.
19. Linhart Y.B., Grant M.C. Evolutionary significance of local genetic differentiation in plants // Annu. Rev. Ecol. Syst. – 1996. – № 27. – P. 237–277.
20. Zhang X.-L., Yuan Y.-M., Ge X.-J. Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* W.W. Smith and *G. striolata* T.N. Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR-markers // Bot. J. Linn. Soc. – 2007. – Vol. 154, № 2. – P. 225–232.
21. Gonzalez-Astorga J., Cruz-Angon A., Flores-Palacios A., Vovides A.P. Diversity and genetic

- structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae) // Ann. Bot. – 2004. – Vol. 94. – P. 545–551.
22. Xie G.W., Wang D.L., Yuan Y.M., Ge X.-J. Population genetic structure of *Monimopetalum chinense* (Celastraceae), an endangered endemic species of eastern China // Ann. Bot. – 2005. – Vol. 95. – P. 773–777.
23. Gonzalez-Lopez O., Polanco C., Gyurgy Z., Pedryc A., Casquero P.A. Genetic variation of the endangered *Gentiana lutea* L. var. *aurantiaca* (Gentianaceae) in populations from the Northwest Iberian Peninsula // Int. J. Mol. Sci. – 2014. – Vol. 15. – P. 10052–10066.
24. Crawford D.J., Ruiz E., Stuessy T.F., Tepe E., Aqueveque P., Gonzalez F., Jensen R.J., Anderson G.J., Bernardello G., Baeza C.M., Swenson U., Silva O.M. Allozyme diversity in endemic flowering plant species of the Juan Fernandez Archipelago, Chile: ecological and historical factors with implications for conservation // Am. J. Bot. – 2001. – Vol. 88. – P. 2195–2203.

Представлено О.М. Тищенко
Надійшла 24. 11. 2014

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА
И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ
GENTIANA LUTEA L. (GENTIANACEAE)
В УКРАИНСКИХ КАРПАТАХ

М.З. Мосула¹, В.Н. Мельник², И.И. Конвалюк²,
Н.М. Дробик¹, И.О. Андреев², В.А. Кунах²

¹ Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка
Украина, 46027, г. Тернополь, ул. М. Кривоноса, 2
e-mail: maryanamosula@gmail.com

² Институт молекулярной биологии и генетики
НАН Украины
Украина, 03680, г. Киев, ул. Академика Заболотного, 150
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

Цель. Проанализировать генетическую структуру *G. lutea* с двух горных массивов (Черногора, Свидовец) Украинских Карпат, оценить уровень генетического полиморфизма и степень дифференциации популяций этого вида.

Методы. Для исследований использовали метод генетического анализа на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) с RAPD-, ISSR-, IRAP-, CDDP- и RGAP-праймерами. Рассчитывали долю полиморфных амплико-

нов (P), ожидаемую гетерозиготность (He), индекс Шеннона (S) и генетические расстояния Жаккарда (D_j). **Результаты.** Значения показателей генетического разнообразия природных популяций колебались в диапазоне: P = 29,1–37,9 %, He = 0,089–0,126, S = 0,137–0,190, среднее D_j = 26,9–38,7 %. Агропопуляция с г. Пожижевская характеризовалась низкими показателями He (0,085) и S (0,131), близкими к свидовецким популяциям, и самым низким среди всех локалитетов значением P (27,7 %) и среднего D_j (22,1 %). По данным Байесовского анализа, исследованные генотипы образовали пять групп, в которых обнаружены единичные особи, содержавшие в остаточных количествах (0,1–0,5 %) генетический материал из других популяций. Согласно результатам AMOVA, почти две трети (65 %) генетического разнообразия приходилось на межпопуляционные различия, а доля внутривидового полиморфизма составляла 35 %. **Выводы.** Сравнение популяций *G. lutea* с хребтов Черногора и Свидовец показало, что первые имеют более высокий уровень генетической гетерогенности. Методом AMOVA обнаружена значительная дифференциация популяций *G. lutea*, что свидетельствует об изоляции популяций и ограниченном обмене генетическим материалом.

Ключевые слова: *Gentiana lutea* L., генетическая структура, ПЦР-маркеры, внутри- и межпопуляционный полиморфизм, дифференциация популяций.

GENETIC STRUCTURE AND DIFFERENTIATION IN *GENTIANA LUTEA* L. POPULATIONS (GENTIANACEAE) FROM THE UKRAINIAN CARPATHIANS

M.Z. Mosula¹, V.M. Mel'nyk², I.I. Konvalyuk²,
N.M. Drobik¹, I.O. Andreev², V.A. Kunakh²

¹ Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University
M. Kryvonosa Str. 2, Ternopil, 46027, Ukraine
e-mail: maryanamosula@gmail.com

² Institute of Molecular Biology and Genetics
National Academy of Sciences of Ukraine
Akad. Zabolotnoho Str. 150, Kyiv, 03680, Ukraine
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

Aim. The aim of the study was to determine genetic structure of *G. lutea* populations from two mountain ranges (Chornogora, Svydovets) of Ukrainian Carpathians, assess the level of genetic polymorphism and degree of differentiation across the species populations.

Methods. For the studies, a method of genetic analysis based on polymerase chain reaction (PCR) with RAPD-, ISSR-, IRAP-, CDDP- and RGAP-primers was used. Proportion of polymorphic amplicons (P), expected heterozygosity (H_e), Shannon index (S) and Jacquard genetic distance (D_j) were calculated.

Results. Value of genetic diversity indices for natural populations ranged as follows: P = 29,1–37,9 %, H_e = 0,089–0,126, S = 0,137–0,190, the average D_j = 26,9–38,7 %. Agropopulation from mountain Pozhyzhevskya had low H_e (0,085) and S (0,131), that were close to the values of populations from Svydovets, and the lowest among all localities values of P (27,7 %) and average D_j value (22,1 %). According to

the Bayesian analysis, all studied genotypes formed five groups, inside which there were found few individuals with residual amounts (0,1–0,5 %) of genetic material inherited from other populations. As shown by the AMOVA analysis, almost two-thirds (65 %) of genetic heterogeneity was due to between-population differences, while the proportion of within-population polymorphism was 35 %. **Conclusions.** Comparison of *G. lutea* populations from Chornogora and Svydovets ranges showed that the former have a higher level of genetic heterogeneity. Analysis of molecular variance revealed significant differentiation of *G. lutea* populations, indicating genetic isolation of populations and limited gene flow.

Keywords: *Gentiana lutea* L., genetic structure, PCR-markers, intra- and interpopulation polymorphism, differentiation of populations.