

УДК 575.17: 582.923.1

ГЕНЕТИЧНЕ РІЗНОМАНІТТЯ ПОПУЛЯЦІЙ *GENTIANA LUTEA* L. З ХРЕБТА СВИДІВЕЦЬ УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ

М.З. МОСУЛА¹, І.І. КОНВАЛЮК², В.М. МЕЛЬНИК², І.О. АНДРЕЄВ²,
О.М. БУБЛИК², Н.М. ДРОБИК¹, 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. Оцінка рівня внутрішньо- та міжпопуляційного поліморфізму *G. lutea* зі Свидівецького масиву Українських Карпат з використанням ПЛР-маркерів. **Методи.** Генетичне різноманіття рослин з двох популяцій оцінювали за допомогою RAPD-, ISSR-, CDDP- та RGAP-маркерів. Спектри ПЛР-продуктів представляли у вигляді бінарних матриць, за якими розраховували частку поліморфних ампліконів (P), очікувану гетерозиготність (He), індекс Шеннона (S) та генетичні відстані за Жаккардом (D_j). Розподіл генетичного поліморфізму на між- та внутрішньопопуляційний вивчали методом аналізу молекулярної дисперсії (AMOVA). **Результати.** Розмах показників генетичного різноманіття для обох популяцій за різними типами маркерів становив: $P = 35,0-56,7\%$, $He = 0,113-0,176$, $S = 0,170-0,267$, $D_j = 16,1-37,3\%$. На дендрограмі генетичної подібності та за результатами аналізу головних координат зразки групувалися відповідно до популяційної приналежності. Результати AMOVA показали, що на відмінності між популяціями за RAPD-, RGAP-, CDDP-аналізами припадає приблизно 70%; ISSR-аналізом – 60% загальної генетичної гетерогенності, а на внутрішньопопуляційний поліморфізм – приблизно 30 і 40%, відповідно. **Висновки.** Дві досліджені популяції *G. lutea* з хребта Свидівець мають подібні показники генетичного різноманіття і не відрізняються суттєво від інших популяцій виду з Чорногірського хребта Українських Карпат. Суттєва перевага міжпопуляційних відмінностей над внутрішньопопуляційними у складі загального генетичного різноманіття за даними AMOVA свідчить про значну ізоляцію і диференціацію досліджених популяцій.

Ключові слова: *Gentiana lutea* L., генетичне різноманіття, ПЛР-маркери, внутрішньо- та міжпопуляційний поліморфізм, аналіз молекулярної дисперсії (AMOVA).

Вступ. Розробка науково обґрунтованих заходів збереження та ефективного відтворення видів рослин у межах природних ареалів потребує знання генетичної структури популяцій та рівня між- і внутрішньопопуляційного поліморфізму. Першочерговим завданням є вибір методів і критеріїв оцінки генетичної різноманітності рослин, які відносять до категорії рідкісних, зникаючих [1]. До таких належить цінний лікарський високогірний вид флори Українських Карпат тирлич жовтий (*Gentiana lutea* L.) [2, 3].

У сучасних популяційно-генетичних дослідженнях представників родини Gentianaceae успішно застосовують методи молекулярно-генетичного аналізу

© М.З. МОСУЛА, І.І. КОНВАЛЮК, В.М. МЕЛЬНИК, І.О. АНДРЕЄВ, О.М. БУБЛИК, Н.М. ДРОБИК,
В.А. КУНАХ, 2013

на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [4–6]. Раніше нами також проведено дослідження генетичного різноманіття популяцій *G. lutea* з території Українських Карпат із використанням RAPD- та ISSR-аналізу, проте вони охопили локалітети лише з одного гірського масиву Карпат – хребта Чорногора [7, 8].

Застосування кількох типів ПЛР-маркерів, які дозволяють оцінити поліморфізм різних структурних та функціональних ділянок геному, безумовно здатне підвищити точність оцінки рівня генетичного різноманіття популяцій. У разі відсутності будь-якої інформації про геномні послідовності виду, як це є у випадку *G. lutea*, з цієї метою часто використовують ПЛР-аналіз із праймерами на основі довільних послідовностей ДНК (RAPD) та послідовностей мікросателітних повторів (ISSR). В останнє десятиріччя накопичення інформації про функціонально важливі ділянки геному, зокрема кодувальні та регуляторні ділянки генів, стимулювало розробку нових методів ПЛР-аналізу, що базуються на використанні праймерів гомологічних до консервативних мотивів цих ділянок. До таких належать CDDP-аналіз (conserved DNA-derived polymorphism) із праймерами на основі консервативних ділянок генів відповіді на стрес та RGAP-аналіз (resistance gene analog polymorphism) із праймерами, гомологічними до консервативних ділянок генів стійкості до патогенів [9–13].

У цій роботі ми застосували зазначені вище методи ПЛР-аналізу з метою оцінки внутрішньо- та міжпопуляційного різноманіття та диференціації популяцій *G. lutea* зі Свидівецького хребта Українських Карпат.

Матеріали і методи

Вивчали дві популяції *G. lutea* зі Свидівецького хребта Українських Карпат, розташованих на полонині Крачунеска (Kr) та між горами Трояска і Татарука (Tr), з яких

відібрано по 15 зразків листкової тканини індивідуальних рослин.

ДНК виділяли зі свіжих листків відповідно до загальноприйнятої методики [14]. Для ПЛР-аналізу використали 7 пар RGAP-, 10 RAPD-, 9 ISSR-, 9 CDDP-праймерів [4, 9, 12, 15, 16]. Перелік та нуклеотидні послідовності RGAP- та CDDP-праймерів подано у табл. 1.

Таблиця 1. Назви і нуклеотидні послідовності використаних CDDP- та RGAP-праймерів

№	Праймер / пара праймерів	Нуклеотидна послідовність, (5'– 3')
CDDP-праймери		
1	WRKY-A-F	TGGCGSAAGTACGGCCAG
2	WRKY-A-R	GTGGTTGTGCTTGCC
3	WRKY-B	GCCCTCGTASGTSGT
4	MYB	GGCAAGGGCTGCCGC
5	ERF-F	CACTACCGCGGCTSCG
6	KNOX-F	AAGGSAAGCTSCCSAAG
7	KNOX-R	CACTGGTGGGAGCTSCAC
8	MADS-A	ATGGGCCGSGGAAGGTGC
9	ABP1-2	ACSCSATCCACCGC
RGAP-праймери		
1	RLRR for RLRR rev	CGCAACCACTAGAGTAAC ACACTGGTCCATGAGGTT
2	XLRR-INV1 XLRR-INV2	TTGTCAAGCCAGATACCC GAGGAAGGACAGGTTGCC
3	Pto kin3 Pto kin4	TACTTCGGACGTTTACAT AGTGTCTGTAGGGTATC
4	XLRR for XLRR rev	CCGTTGGACAGGAAGGAG CCCATAGACCGGACTGTT
5	NLRR for NLRR rev	TAGGGCCTCTGCATCGT TATAAAAGTGCCGGACT
6	Cre3Ploop Cre3-k3	GCGGGTCTGGGAAATCTACC CTGCAGTAAGCAAAGCAACG
7	NLRR-INV1 NLRR-INV2	TGCTACGTTCTCCGGG TCAGGCCGTGAAAAATAT

ПЛР проводили в термоциклері Терцик MC2 («Биотехнология», Росія). Реакційна суміш об'ємом 20 мкл містила: 20–30 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 1,25 U Taq-полімерази, 0,5 мМ праймера, 1×ПЛР-буфер з 2,5 мМ MgCl₂. Для запобігання випаровуванню на

неї нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Проба негативного контролю містила повну ампліфікаційну суміш без додавання 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 хв 30 с; ISSR-ПЛР: 95 °С – 2 хв, 35 циклів (94 °С – 30 с, 53 °С – 30 с, 72 °С – 1 хв 30 с), 72 °С – 5 хв; CDDP-ПЛР: 94 °С – 2 хв, 35 циклів (94 °С – 30 с, 50 °С – 1 хв, 72 °С – 2 хв), 72 °С – 5 хв; RGAP-ПЛР: 94 °С – 5 хв, 45 циклів (94 °С – 30 с, 45 °С – 45 с, 72 °С – 1 хв), 72 °С – 7 хв. Продукти реакції ампліфікації розділяли електрофорезом у 1,3 % агарозному гелі з 0,5 мкг/мл бромистого етидію, в 1×SB-буфері й фотографували в УФ-світлі. Для визначення довжини фрагментів використовували ДНК-маркер молекулярної маси (100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb DNA Ladder) («ООО-СибЭнзим-М», Москва).

При аналізі електрофореграм враховували тільки чіткі, відтворювані фрагменти. Електрофоретичні спектри ПЛР-продуктів подавали у вигляді бінарних матриць, виходячи з припущення, що кожний амплікон відповідає індивідуальному локусу, що існує в геномі у вигляді одного з двох алелей: домінантного (1) – амплікон присутній або рецесивного (0) – відсутній. На основі бінарних матриць розраховували очікувану гетерозиготність (H_e), індекс Шеннона (S), частку поліморфних ампліконів (P). Розподіл загальної генетичної мінливості на міжпопуляційну та внутрішньопопуляційну визначали методом аналізу молекулярної дисперсії (AMOVA) з використанням програми GenAlEx 6.5 [17]. Генетичні відстані за Жаккардом (D_j) розраховували за допомогою програми FAMD 1.25 [18]. Дендрограму генетичної подібності будували методом незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA). Для оцінки достовірності групування зразків проводили

бутстреп-тест із 1000 повторами. Консенсусне дерево будували з використанням програми Consense (пакет програм Phylip) [19]. Групування зразків методом аналізу головних координат (PCoA) на основі матриці генетичних відстаней Жаккарда проводили з використанням програми FAMD 1.25 [18].

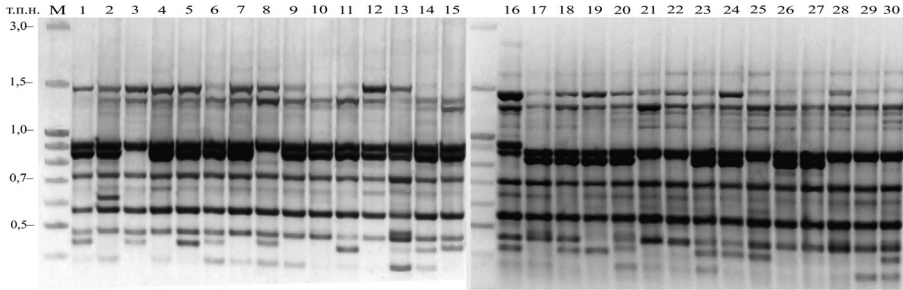
Результати та обговорення

Загальна кількість фрагментів, що синтезувалися при використанні RAPD-, ISSR-, CDDP- та RGAP- маркерів, у середньому для двох досліджених популяцій становила 142, 122, 104 та 60 відповідно. Використані праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах: 180–2600 п.н. (RAPD-ПЛР), 190–3400 п.н. (ISSR-ПЛР), 180–2800 п.н. (CDDP-ПЛР), 250–1300 п.н. (RGAP-ПЛР). Електрофореграми, що демонструють варіабельність профілів ПЛР-продуктів окремих рослин свідівцевих популяцій, наведено на рис. 1.

Оцінку генетичного різноманіття здійснювали за такими показниками: очікувану гетерозиготність, індексом Шеннона, часткою поліморфних ампліконів, генетичні відстані за Жаккардом. Порівняння двох досліджених популяцій з використанням чотирьох типів молекулярно-генетичних маркерів показало їхню подібність за рівнем генетичного поліморфізму (табл. 2). Так, у випадку очікуваної гетерозиготності й індекса Шеннона різниця між популяціями для різних типів маркерів становила до 0,06, а для показників P і D_j – до 6%.

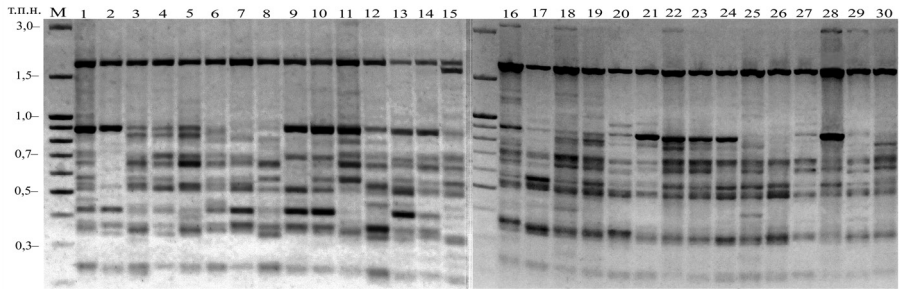
Частка поліморфних ампліконів (P) у середньому була найвищою у випадку ISSR-ПЛР, дещо меншою для RAPD-ПЛР, найнижчою, проте подібною для RGAP- та CDDP-ПЛР (табл. 2). Показник P для сумарної вибірки рослин був подібним для RAPD- й ISSR-маркерів, а також CDDP- і RGAP-маркерів (табл. 2).

У випадку очікуваної гетерозиготності (середні значення H_e для двох популяцій)



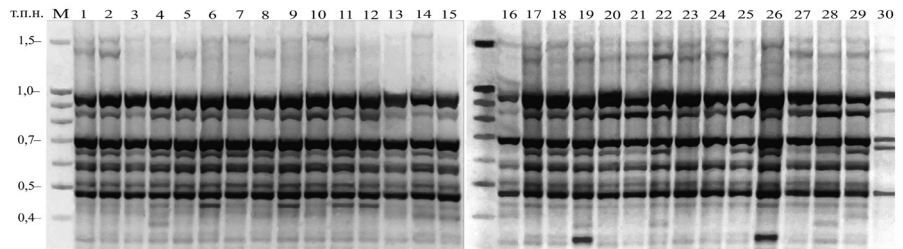
B 07

а



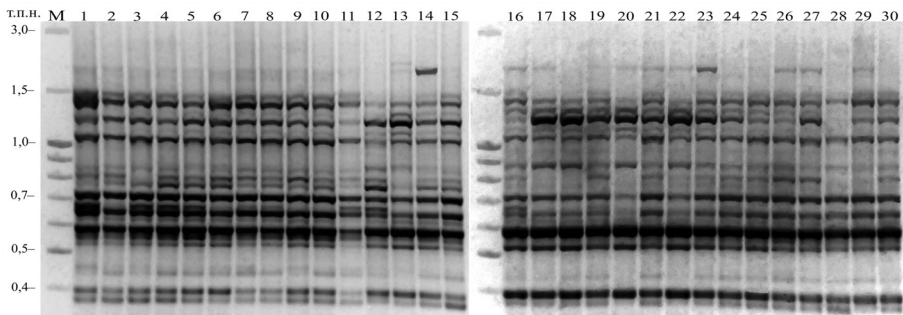
UBC#840

б



Cre 3 Ploop
Cre 3 k3

в



MADS-A

г

Рис. 1. Поліморфізм спектрів ПЛР-продуктів рослин *G. lutea* з двох свидівецьких популяцій (а – RAPD-амплікони, б – ISSR, в – RGAP, г – CDDP): 1–15 – гір Трояска –Татарука; 16–30 – полонини Крачунеска. М – маркер молекулярної маси «100 bp Ladder»

Таблиця 2. Значення основних показників генетичного поліморфізму досліджених популяцій *G. lutea*

Тип ПЛР-маркерів	Популяція	Враховано ампліконів, шт.	Частка поліморфних ампліконів (P), %	Очікувана гетерозиготність (He)	Індекс Шеннона (S)	Генетичні відстані між рослинами за Жакардом (Dj), %	Середня генетична відстань між рослинами за Жакардом (Dj), %
ISSR	Кг	118	57,0	0,200±0,017	0,299±0,024	23,5–43,4	35,5
	Тг	103	56,3	0,151±0,015	0,235±0,022	20,3–52,4	39,1
	*Середнє	111	56,7	0,176±0,011	0,267±0,016	21,9–47,9	37,3
	**СВ	142	90,1	0,259±0,014	0,401±0,019	19,1–74,5	50,5
RAPD	Кг	81	40,2	0,109±0,015	0,171±0,022	6,3–41,3	28,6
	Тг	87	46,7	0,140±0,017	0,213±0,024	14,3–42,4	26,0
	Середнє	84	43,4	0,124±0,011	0,192±0,016	10,3–41,9	27,3
	СВ	122	90,2	0,258±0,015	0,398±0,021	6,3–79,4	52,1
CDDP	Кг	84	36,5	0,148±0,020	0,216±0,029	7,1–31,1	18,6
	Тг	81	33,7	0,118±0,018	0,177±0,026	6,8–24,7	16,5
	Середнє	83	35,1	0,133±0,013	0,196±0,019	7,0–27,9	16,1
	СВ	104	73,1	0,253±0,018	0,382±0,025	6,8–55,0	33,0
RGAP	Кг	49	36,7	0,116±0,023	0,176±0,034	5,3–35,6	15,8
	Тг	47	33,3	0,109±0,023	0,164±0,033	2,5–28,6	17,4
	Середнє	48	35,0	0,113±0,016	0,170±0,024	4,1–32,1	16,9
	СВ	60	70,0	0,222±0,025	0,336±0,035	2,5–54,0	31,7
Сума маркерів	Кг	83	44,4	0,150±0,009	0,225±0,013	10,6–37,9	24,6
	Тг	80	44,9	0,134±0,009	0,205±0,013	11,0–37,0	24,8
	Середнє	82	44,6	0,142±0,006	0,215±0,009	10,8–37,5	24,4
	СВ	107	83,2	0,252±0,008	0,386±0,012	8,7–65,7	41,8

Примітки: Кг – полонина Крачунєска, Тг – гори Трояска – Татарука; *Середнє – значення для двох популяцій; **СВ – сумарна вибірка рослин.

використані маркери були проранговані за показником наступним чином: ISSR > CDDP > RAPD > RGAP. Подібним чином досліджені маркери розташувалися у випадку індекса Шеннона, проте середні значення для RAPD- і CDDP-ампліконів були приблизно однаковими (табл. 2). У порядку зменшення середнього для двох популяцій значення генетичних відстаней D_j використані типи маркерів розподілилися таким

чином: ISSR > RAPD > RGAP ≈ CDDP (табл. 2).

На основі генетичних відстаней D_j за узагальненими результатами чотирьох типів аналізу методом UPGMA побудовано дендрограму генетичних подібностей досліджених зразків *G. lutea* (рис. 2). Загалом, досліджені зразки з високим ступенем підтримки кластеризуються відповідно до їхньої популяційної приналежності. Основний кластер поділяється на два під-

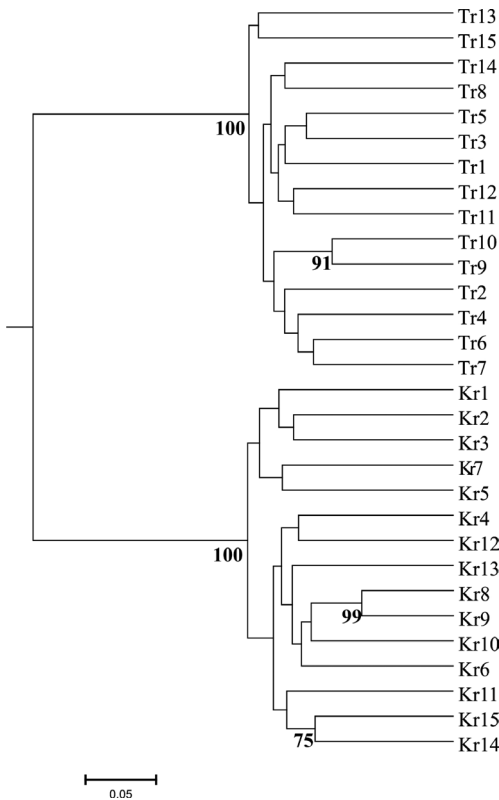


Рис. 2. UPGMA-дендрограма генетичних зв'язків між дослідженими зразками *G. lutea*, побудована на основі D_j , розрахованих за усіма типами маркерів. Цифрами вказано величини достовірності кластеризації (ІБ). Tr – популяція з гір Трояска – Татарука, Kr – популяція з полонини Крачунеска

кластери. Один із них складають зразки популяції з пол. Крачунеска, інший – зразки популяції з гір Трояска-Татарука (індекс бутстрепа (ІБ) становить 100 %).

На рис. 3 наведено просторове відображення кластеризації досліджених зразків *G. lutea*, обраховане за допомогою РСоА на основі матриці генетичних відстаней за Жаккардом. Розташування зразків на графіку показано для даних, узагальнених за чотирма використаними типами маркерів.

Як видно з рис. 2 і 3, розташування зразків на дендрограмі та на графіку РСоА

було подібним. Результати групування зразків *G. lutea* з двох популяцій різними методами свідчать про їхню чітку диференціацію та обмежений обмін генетичним матеріалом.

Цей висновок підтверджують результати аналізу молекулярної дисперсії (АМОВА), які показали, що частка загального генетичного різноманіття, що припадає на міжпопуляційні відмінності, в 1,5–2 рази перевищує частку внутрішньопопуляційного поліморфізму і становить 70 і 30 % для RAPD- і rGAP-; 69 і 31% – для CDDP-; 59 і 41 % – для ISSR-маркерів.

Порівняння свидівецьких популяцій *G. lutea* із дослідженими нами раніше чорногірськими [7, 8] за показниками генетичного поліморфізму, визначеними на основі RAPD- та ISSR-аналізу, показало подібний або дещо вищий рівень різноманіття у популяціях з хр. Свидівець.

Результати RAPD- та ISSR-аналізів свидівецьких популяцій *G. lutea* показують, що вид має високий рівень генетичної гетерогенності порівняно із іншими представниками родини Gentianaceae, описаними в літературі [4, 5, 20, 21].

У літературі є небагато даних щодо вивчення генетичної мінливості рослин із використанням rGAP- та CDDP-маркерів. Зокрема, показники H_e та S *Triticum dicoccoides* (Koern. ex Asch. et Graeb.) Schweinf., отримані за допомогою rGAP-аналізу (середні значення для досліджених популяцій $H_e=0,271$, $S=0,404$; і показники для сумарної вибірки рослин $H_e=0,352$, $S=0,541$), були вищими, ніж у *G. lutea*, незважаючи на подібний рівень поліморфності використаних маркерів: значення P для *G. lutea* і *T. dicoccoides* становили 70,0 % та 75,6 %, відповідно (табл. 2) [12]. У випадку CDDP-аналізу показники P (для сумарної вибірки рослин), H_e та S (середні значення для досліджених популяцій) *G. lutea* виявилися нижчими порівняно з показниками *Solanum dulcamara* L. [10].

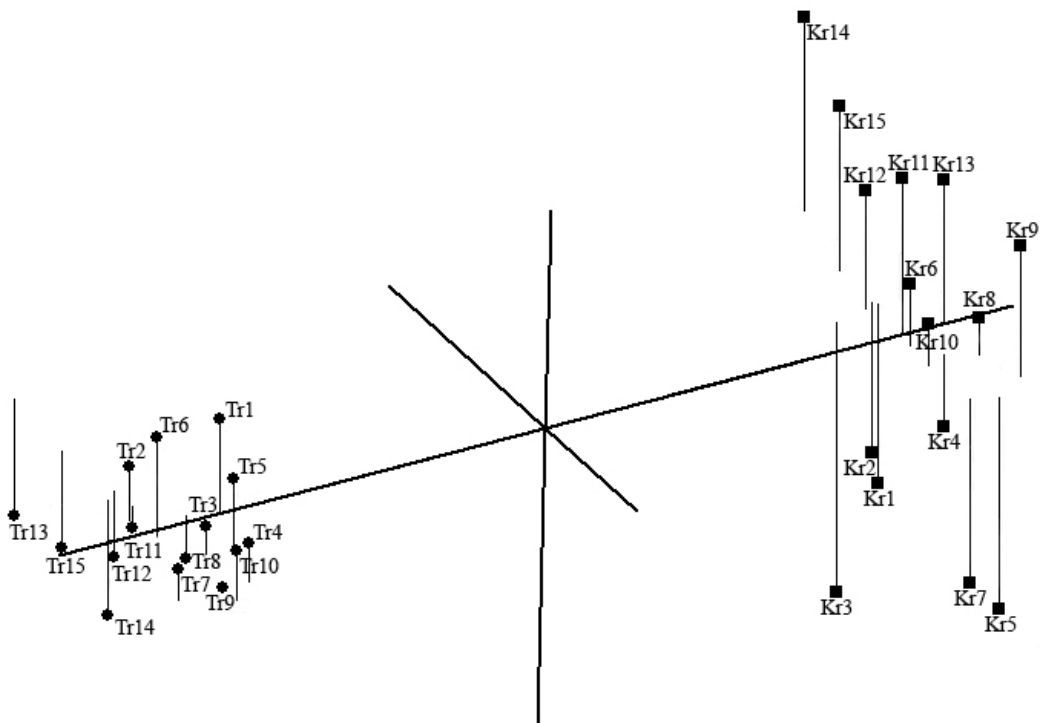


Рис. 3. Графік основного координатного аналізу на основі генетичних відстаней за Жаккардом, узагальнений за чотирма типами аналізу. Tr – популяція з гір Трояска – Татарука, Kr – популяція з полонини Крачунеска

Найвищий рівень поліморфізму у свідівських популяцій *G. lutea* (середнє значення для двох популяцій) виявили ISSR-маркери ($P = 56,7\%$, $H_e = 0,176$, $S = 0,267$, $D_j = 37,3\%$). Нижчим рівнем варіабельності характеризуються RAPD-маркери ($P = 44,4\%$, $H_e = 0,124$, $S = 0,192$, $D_j = 27,3\%$). Ще менш поліморфними виявилися CDDP- та RGAP-маркери. Таку відмінність показників, очевидно, можна пояснити різною інтенсивністю дії добору на ділянки геному, асоційовані з використаними маркерами. Відомо, що мікросателітні повтори мають швидкість мутацій у декілька разів вищу порівняно з іншими ділянками геному. RAPD-маркери представлені усіма фракціями геному, яким притаманна різна швидкість дивергенції та еволюції [22]. CDDP- та RGAP-маркери, в свою

чергу, асоційовані з консервативними та регуляторними ділянками генів, які забезпечують життєздатність організму в стресових умовах і відіграють важливу роль в його адаптації.

Літературні дані щодо переваг використання того чи іншого типу маркерів у дослідженнях генетичного різноманіття рослин досить суперечливі. Зокрема, при вивченні *Iris pumila* L. найефективнішими виявилися ISSR-маркери [23]. У дослідженнях представників роду *Myristica* і родини Avicenniaceae ISSR- та RAPD-аналіз показали подібні результати [24, 25]. У випадку *Vigna umbellata* RAPD-маркери були ефективнішими за ISSR [26]. Такі відмінності в результатах можуть бути зумовлені особливостями структури геному досліджуваного виду, зокрема співвідношенням

кодувальної та некодувальної ДНК, та підкреслюють важливість вибору системи ефективних маркерів для кожного нового об'єкта.

Загалом, нами не виявлено достовірних відмінностей між двома популяціями з хребта Свидівець за показниками генетичного поліморфізму. Ці популяції мають подібний розмір, чисельність та інші популяційні характеристики, а також зростають в подібних умовах, які характеризуються схожою амплітудою висот, орієнтацією та крутизною схилу, розірваним фітогенним полем і складом рослинності. Імовірно, сукупність цих чинників зумовлює відсутність відмінностей між ними за рівнем генетичного різноманіття. Водночас за результатами кластерного аналізу особини з цих популяцій чітко відрізняються за використаними маркерами. Фізична відстань між свидівецькими популяціями по прямій складає лише 6 км, вони відділені одна від одної відрогом та двома невеликими гірськими долинами, однак навіть цього, очевидно, достатньо для формування бар'єру, що обмежує обмін генетичним матеріалом і сприяє поступовій диференціації популяцій. Така ізоляція популяцій, очевидно, існує впродовж тривалого часу і призвела до накопичення суттєвих міжпопуляційних відмінностей, які за даними AMOVA мають суттєво більшу частку у складі загальної генетичної гетерогенності виду порівняно із внутрішньопопуляційним поліморфізмом.

Висновки

Визначено рівень генетичного різноманіття двох популяцій *G. lutea* із Свидівецького масиву Українських Карпат на основі даних RAPD-, ISSR-, CDDP- та RGAP-аналізів. За показниками генетичного різноманіття (індекс Шеннона, очікувана гетерозиготність) досліджені популяції виявилися близькими та не відрізнялися суттєво від досліджених раніше популяцій з хребта Чорногора Українських Карпат. На дендро-

грамі генетичної подібності та за результатами аналізу головних координат зразки групувалися відповідно до популяційної приналежності. Найвищий рівень поліморфізму проявили ISSR-маркери; нижчим характеризувалися RAPD-маркери; ще менш поліморфними виявилися CDDP- та RGAP-маркери. Показано, що на відмінності між популяціями припадає 59–70 % загальної генетичної мінливості, тоді як внутрішньопопуляційний поліморфізм становить 30–41 %, що є свідченням значної дивергенції досліджених популяцій.

Перелік літератури

1. Боронникова С.В. Генетическая паспортизация редких и нуждающихся в охране видов растений как основа оптимизации сохранения их генофондов [Електронний ресурс] // Вопросы современной науки и практики. – Режим доступу: http://vernadsky.tstu.ru/pdf/2009/03/rus_01_2009_3.pdf
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. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я.П. Дідуха. – К.: Глобалконсалтинг, 2009. – 900 с.
4. Zhang X.-L., Yuan Y.-M., Ge X.-J. Genetic structure and differentiation of *Gentiana atuntsiensis* 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.
5. Ge X.-J., Zhang L.-B., Yuan Y.-M. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) // Biodivers. Conserv. – 2005. – Vol. 14, № 4. – P. 849–861.
6. Raica P., Pamfil D., Botez C., Gaboreanu M.I., Pătrascu B., Kovacs K. The assesment of two populations of *Gentiana nivalis* by RAPD markers // Buletin USAMV-CN. – 2006. – Vol. 62. – P. 228–231.
7. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.Н., Дробык Н.М., Кунах В.А. ISSR-анализ некоторых популяций *Gentiana lutea* L. Украинских Карпат // Тезисы докладов научной конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии», 25–29 марта 2013 г. – Ростов-на-Дону: ЮНЦ РАН, 2013. – С. 62.
8. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.М., Дробык Н.М. Оцінка генетичного поліморфізму чорногірських популяцій *Gentiana lutea* L.

- (Gentianaceae) з Українських Карпат: RAPD-аналіз // Фактори експерим. еволюції організмів. – К.: Логос, 2013. – Т. 13. – С. 80–83.
9. Collard B.C.Y., Mackill D.J. Conserved DNA-Derived Polymorphism (CDDP): a simple and novel method for generating DNA markers in plants // Plant Mol. Biol. Rep. – 2009. – Vol. 27, № 4. – P. 558–562.
10. 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.
11. Poczai P., Varga I., Laos M., Cseh A., Bell N.E., Valkonen J.P.T., Hyvonen J. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review // Plant Methods. – 2013. – Vol. 9, № 6. – 31 p.
12. 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.
13. Multu N., Miklas P.N., Coyne D.P. Resistance gene analog polymorphism (RGAP) markers colocalize with disease resistance genes and QTL in common bean // Mol. Breeding. – 2006. – Vol. 17. – P. 127–135.
14. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // Plant Mol. Biology. – 1985. – Vol. 5, № 2. – P. 69–76.
15. Твардовська М.О., Страшний Н.М., Мельник В.М., Конвалюк І.І., Кунах В.А. RAPD-аналіз геномного поліморфізму деяких видів роду *Gentiana* L. флори України // Доповіді НАН України. – 2009. – № 5. – С. 200–204.
16. 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.
17. 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.
18. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – № 6. – P. 569–572.
19. 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>
20. Li Y., Li L.-F., Chen G.-Q., Ge X.-J. Development of ten microsatellite loci for *Gentiana crassicaulis* (Gentianaceae) // Conserv. Genet. – 2007. – Vol. 8, № 6. – P. 1499–1501.
21. Zhang Z.-R., Yang J., Sun Y., Gao T.-G., Li D.-Z., Xue C.-Y. A set of novel microsatellite markers developed for the traditional tibetan medicinal plant *Halenia elliptica* (Gentianaceae) // Amer. J. Bot. – 2011. – Vol. 98, № 7. – P. 173–175.
22. Сиволап Ю.М. Геном рослин і «молекулярна селекція» // Селекція і насінництво. – 2008. – Т. 96. – С. 34–42.
23. Bubyk O.M., Andreev I.O., Kalendar R.N., Spiridonova K.V., Kunakh V.A. Efficiency of different PCR-based marker systems for assessment of *Iris pumila* genetic diversity // Biologia. – 2013. – Vol. 68, № 4. – P. 613–620.
24. Kader A., Sinha S.N., Ghosh P. Evaluation of genetic diversity of Avicenniaceae family in Indian sundarban by using RAPD and ISSR markers // IJGPB. – 2012. – Vol. 1, № 2. – P. 22–27.
25. Sheeja T.E., Sabeesh C., Shabna O.V., Shalini R.S., Krishnamoorthy B. Genetic diversity analysis of *Myristica* and related genera using RAPD and ISSR markers // JOSAC. – 2013. – Vol. 22, № 1. – P. 38–46.
26. Muthusamy S., Kanagarajan S., Ponnusamy S. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces // Electron. J. Biotechn. – 2008. – Vol. 11, № 3 [Електронний ресурс]. – Режим доступу до журн.: <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol11/issue3/full/8/index.html>

Представлено О.М. Тищенко
Надійшла 10.12.2013

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ПОПУЛЯЦИЙ *GENTIANA LUTEA* L. С ХРЕБТА СВИДОВЕЦ УКРАИНСКИХ КАРПАТ

М.З. Мосула¹, И.И. Конвалюк², В.Н. Мельник²,
И.О. Андреев², Е.Н. Бублик², Н.М. Дробик¹,
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. Оценка уровня внутри- и межпопуляционного полиморфизма *G. lutea* со Свидовецкого

массива Українських Карпат с использованием ПЦР-маркеров. **Методи.** Генетическое разнообразие растений из двух популяций оценивали с помощью RAPD-, ISSR-, CDDP- и RGAP-маркеров. Спектры ПЦР-продуктов представляли в виде бинарных матриц, на основании которых рассчитывали долю полиморфных ампликонов (P), ожидаемую гетерозиготность (He), индекс Шеннона (S) и генетические расстояния по Жаккарду (D_j). Распределение генетического полиморфизма на меж- и внутривидовой популяционной изучали методом анализа молекулярной дисперсии (AMOVA). **Результаты.** Размах показателей генетического разнообразия для обеих популяций по разным типам маркеров составил: P – 35,0–56,7%, He – 0,113–0,176, S – 0,170–0,267, D_j – 16,1–37,3%. На дендрограмме генетического сходства и по результатам анализа главных координат образцы группировались в соответствии с популяционной принадлежностью. Результаты AMOVA показали, что на различия между популяциями по RAPD-, RGAP-, CDDP- анализам приходится примерно 70%; ISSR-анализу – 60% общей генетической изменчивости, тогда как внутривидовой популяционной полиморфизм составляет примерно 30 и 40%, соответственно. **Выводы.** Две исследованные популяции *G. lutea* с хребта Свидовец имеют сходные показатели генетического разнообразия и не отличаются существенно по их уровню от других популяций вида с Черногорского хребта Украинских Карпат. Существенное преобладание межпопуляционных отличий над внутривидовой популяционными в составе общего генетического разнообразия по результатам AMOVA свидетельствует о значительной изоляции и дифференциации исследованных популяций.

Ключевые слова: *Gentiana lutea* L., генетическое разнообразие, ПЦР-маркеры, внутри- и межпопуляционный полиморфизм, анализ молекулярной дисперсии (AMOVA).

GENETIC DIVERSITY IN *GENTIANA LUTEA* L. POPULATIONS FROM SVYDIVETS RIDGE OF THE UKRAINIAN CARPATHIANS

M.Z. Mosula¹, I.I. Konvalyuk², V.M. Mel'nyk², I.O. Andreev², O.M. Bublyk², N.M. Drobyk¹, V.A. Kunakh²

¹Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University

Ukraine, 46027, Ternopil, M. Kryvonosa str., 2
e-mail: maryanamosula@gmail.com

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

Aim. To evaluate the levels of intra- and interpopulation diversity in *G. lutea* from Svydivets ridge of the Ukrainian Carpathians using PCR-markers. **Methods.** Genetic variability of plants from two populations was assessed by RAPD-, ISSR-, CDDP- and RGAP- markers. Profiles of PCR products were recorded as binary matrices, which were further analyzed to determine the proportion of polymorphic amplicons (P), expected heterozygosity (He), Shannon index (S), and genetic distances by Jaccard (D_j). The distribution of total genetic variation between and within the studied populations was quantified using the analysis of molecular variance (AMOVA). **Results.** The range of indices of genetic diversity in both populations calculated for different types of markers was as follows: P – 35.0–56.7%, He – 0.113–0.176, S – 0.170–0.267, D_j – 16.1–37.3%. The samples on the dendrogram of genetic similarity and based on the results of analysis of principal coordinates (PCoA) were grouped according to their population of origin. AMOVA results showed that the differences between populations by RAPD-, RGAP-, CDDP-analyses accounted for approximately 70%; and by ISSR-analysis made up roughly 60% of the total genetic variation, while intrapopulation polymorphism was around 30 and 40%, respectively. **Conclusions.** The indices of genetic diversity were the same in two studied populations of *G. lutea* from Svydivets ridge, and were similar with the indices of populations from the Chornogora ridge of the Ukrainian Carpathians. The large variation between the studied populations revealed by the AMOVA indicates significant isolation and differentiation of the populations.

Key words: *Gentiana lutea* L., genetic diversity, PCR-markers, intra- and interpopulation variation, analysis of molecular variance (AMOVA).