

УДК 575.17:582.923.1

**АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ ПОПУЛЯЦІЙ  
*GENTIANA LUTEA* L. МЕТОДОМ МАРКУВАННЯ  
МІЖРЕТРОТРАНСПОЗОНОВИХ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ  
(IRAP-ПЛР)**

М.З. МОСУЛА<sup>1</sup>, І.І. КОНВАЛЮК<sup>2</sup>, В.М. МЕЛЬНИК<sup>2</sup>, О.М. БУБЛИК<sup>2</sup>,  
І.О. АНДРЕЄВ<sup>2</sup>, Н.М. ДРОБИК<sup>1</sup>, В.А. КУНАХ<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup>Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України  
03680 Київ, вул. Акад. Заболотного, 150  
e-mail: kunakh@imbg.org.ua

Досліджено особливості генетичної структури й оцінено рівень поліморфізму шести популяцій рідкісної рослини *G. lutea* з Українських Карпат за допомогою IRAP-маркерів. Незважаючи на відмінності еколого-географічних, фітоценотичних умов зростання, а також режимів використання, п'ять із шести популяцій виявилися подібними за очікуваною гетерозиготністю та індексом Шеннона. Найнижчий рівень генетичного поліморфізму за всіма використаними показниками має пожижевська агропопуляція, що, ймовірно, пов'язано з її штучним походженням, а також коротким віком (~40 років). Виявлено відсутність кореляції між генетичними й географічними відстанями, що підтверджено розміщенням зразків на дендрограмі, на якій просторово віддалені популяції групувалися разом, а географічно близькі — у різних кластерах. У результаті аналізу молекулярної варіанси (AMOVA) показано, що відмінності між популяціями становлять 62 % загальної генетичної мінливості, а внутрішньопопуляційний поліморфізм — 38 %, що є свідченням значної генетичної ізоляції досліджених популяцій *G. lutea*.

**Ключові слова:** *Gentiana lutea* L., IRAP-маркери, показники генетичного поліморфізму, міжпопуляційна і внутрішньопопуляційна мінливість, генетична структура.

Нині для оцінювання стану популяцій рідкісних рослин використовують молекулярно-генетичний підхід, який дає змогу з'ясувати генетичну структуру, рівень мінливості видів, розробити стратегії збереження їхніх популяцій [6, 7].

Основними причинами зменшення генетичної різноманітності видів є зміна умов існування, фрагментація та скорочення природного ареалу. ДНК-маркери дають інформацію про унікальність генофонду окремих популяцій, допомагають виявити загрозу інбредної депресії — одного з головних чинників генетичної ерозії популяцій.

Останнім часом як ДНК-маркери для визначення внутрішньовидового поліморфізму використовують послідовності LTR-ретротранспозонів. Суть методу полягає в ампліфікації геномної ДНК між близько розміщеними послідовностями LTR-ретротранспозонів (IRAP-ПЛР) [6,

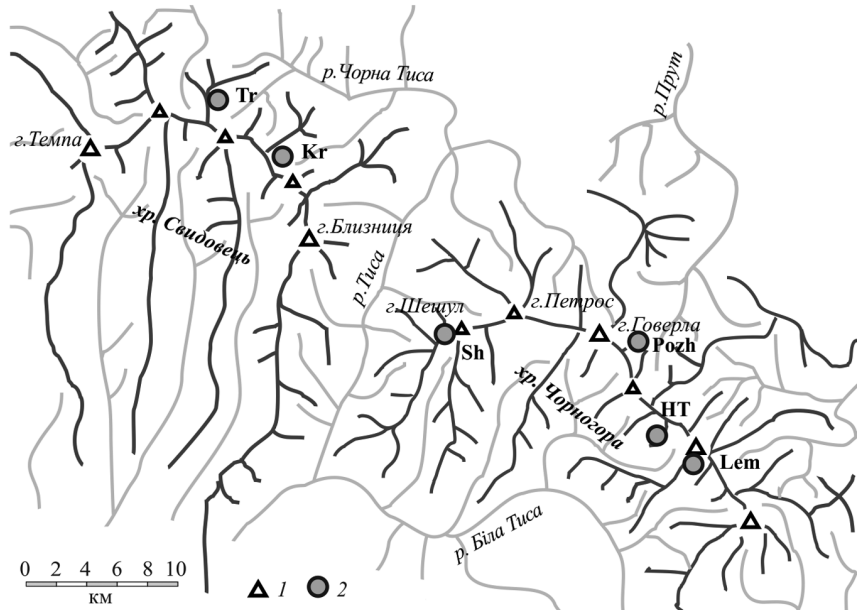


Рис. 1. Карта-схема розміщення досліджених популяцій *G. lutea* в Українських Карпатах: 1 — основні вершини гір; 2 — популяції *G. lutea*.

Тут і на рис. 2, 3 — умовні позначення популяцій див. у табл. 1

12]. Ефективність IRAP-аналізу пов'язана зі значним поширенням мобільних генетичних елементів у геномах багатьох видів рослин та їхньою здатністю утворювати нові копії [12].

До рідкісних рослин, чисельність популяцій яких постійно скорочується, належить цінний високогірний, занесений до Червоної книги України, вид тирлич жовтий *Gentiana lutea* L.

Метою роботи було оцінювання рівня генетичного поліморфізму популяцій *G. lutea* та вивчення генетичної структури цього виду за допомогою IRAP-маркерів.

### Методика

Генетичну різноманітність проаналізовано в п'яти природних та одній штучно створеній (пожижевська) популяціях *G. lutea* з Українських Карпат (рис. 1, табл. 1). Із різних частин кожної популяції відбирали по 15 зразків листової тканини з окремих рослин окрім популяції на горі Гутин Томнатик, з якої, у зв'язку з малою чисельністю, відібрано 11 зразків.

ДНК зі свіжих молодих листків виділяли за загальноприйнятою методикою з деякими модифікаціями [20]. Якість і концентрацію ДНК оцінювали за допомогою гель-електрофорезу порівнянням інтенсивностей флуоресценції комплексів ДНК-бромистий етидій в УФ-світлі з ДНК фага  $\lambda$  відомої концентрації. Праймери для роботи люб'язно надав д-р Р.М. Календар (МТТ/BI Plant Genomics, Institute of Biotechnology, University of Helsinki). У результаті попереднього скринінгу із 34 IRAP-праймерів, розроблених для різних видів рослин, для дослідження популяцій *G. lutea* обрано 5, які забезпечували синтез чітких відтворюваних ампліконів (табл. 2).

ТАБЛИЦЯ 1. Еколого-географічна характеристика досліджених популяцій *G. lutea* [2]

Місце зростання популяції	Умовне позначення популяції	Висота над рівнем моря, м	Площа, яку займає популяція, тис. м <sup>2</sup>	Щільність зростання, особин/м <sup>2</sup>	Чисельність, тис. особин
Хребет Черногора					
Гори Шешул-Павлик	Sh	1400—1700	400	5,3	2120
Полонина Лемська	Lem	1600—1750	30	5,2	156
Гора Пожижевська	Pozh	1450—1455	1—1,5	6,5	6,5—10
Гора Гутин Томнатик	HT	1850—1950	3	0,2	0,6
Хребет Свидовець					
Гори Трояска-Татарука	Tr	1550—1600	100	3,9	390
Полонина Крачунеска	Kr	1500—1730	150	3,0	450

Реакційна суміш для ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ дНТФ, 1,25 U Taq-полімерази,  $1 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  буфер (Fermentas, Литва), 2 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мкМ праймера, 15 мкл мінеральної оливи. Як негативний контроль застосовували стандартну реакційну суміш без ДНК. ПЛР проводили в термоциклері Терцик МС2 («Биотехнология», Росія) за такого режиму: попередня денатурація 94 °С, 2 хв; 35 циклів: 94 °С, 30 с; 58 °С, 30 с; 72 °С, 90 с. Кінцевий цикл елонгації тривав 2 хв при 72 °С. Продукти ампліфікації геномної ДНК розділяли електрофорезом в 1,3 %-му агарозному гелі з додаванням 0,5 мкг/мл бромистого етидію в буфері  $1 \times \text{SB}$  упродовж 5—6 год за напруженості електричного поля 4—5 В/см. Для визначення довжини фрагментів використовували маркер молекулярної маси (100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb DNA Ladder) («ООО-СибЭнзим-М», Москва).

Електрофореграми подавали у вигляді бінарних матриць. Кожен ампліфікований фрагмент вважали доміантним алелем окремого локусу, а його відсутність розцінювали як рецесивний алель відповідного локусу. Електрофореграми оброблено за допомогою програми TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics), для статистичного аналізу даних ПЛР-аналізу застосовано програми FAMD 1.21 beta [21], Mega 3 [13], GenAlEx 6.5 [18], Consense (з пакета програм Phylip) [11].

ТАБЛИЦЯ 2. Характеристика використаних IRAP-праймерів

Праймер	Походження (організм, родина, ідентифікатор мобільного генетичного елемента)	Послідовність праймера 5'—3'
653	<i>Zea mays</i> ; AY691949, Huck LTR, Gypsy	cccctactgcaagcgcaccc
1692	<i>Brachypodium</i> ; LTRs-праймер	aggaagaagcaccgcccattgg
866	<i>Triticum turgidum</i> ; TREP1413 ретротранспозон, LTR, Gypsy, «RIG_Fatima_AY368673-1»	accagcccgggcctgcacc
696	Triticeae; TREP3520 ретротранспозон, LTR, TRIM, «RIX_Cassandra_AF538603-1»	cggggtgggtcgggtgttac
675	<i>Triticum aestivum</i> ; TREP1716 ретротранспозон, LTR, Gypsy, «RIG_Laura_1020F19-2»	agcgcgctgctggcctggg

Для оцінювання рівня генетичного поліморфізму та опису генетичної структури досліджених популяцій обрано такі параметри: частка поліморфних ампліконів (P), індекс Шеннона (S), генна різноманітність  $H_{ei}$  (очікувана гетерозиготність  $H_e$ ), генетичні відстані між популяціями за  $H_{ei}$  та Жаккардом ( $D_j$ ). На основі генетичних відстаней за Жаккардом методом незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA) [13] побудовано консенсусну дендрограму генетичної подібності досліджених зразків, бутстреп-тест включав 1000 повторень.

Аналізували головні координати (PCoA) з використанням програми FAMD 1.21 beta [21].

Кореляції між матрицями генетичних відстаней  $H_{ei}$  та географічних відстаней між дослідженими популяціями оцінено з використанням тесту Мантела (999 permutations) [14].

Генетичну структуру досліджених популяцій проаналізовано за допомогою програми Structure 2.3.4 (адаптованої до домінантних маркерів). Для аналізу обрано модель, що допускає змішане походження особин, передбачає кореляцію частот алелів у батьківських популяціях (K) і не враховує належності особин до географічних популяцій. Для визначення найвірогіднішого числа K виконано серію аналізів з K від 1 до 9 (20 повторностей на K) з періодом припрацювання 50 000 і 300 000 ітерацій [10, 19].

Розподіл загальної генетичної мінливості між дослідженими популяціями та в їхніх межах вивчали методом аналізу молекулярної дисперсії (AMOVA).

### Результати та обговорення

Унаслідок IRAP-аналізу зразків із шести популяцій *G. lutea* з використанням п'яти праймерів отримано 83 амплікони, з яких 76 (92,8 %) були поліморфними, а 7 мономорфних локусів — спільними для усіх досліджених зразків. Число врахованих фрагментів у IRAP-спектрах для окремих популяцій становило від 43 до 53 (табл. 3). Досліджені вибірки відрізнялися за частотами IRAP-локусів, проте траплялись амплікони, характерні тільки для зразків з окремих популяцій (див. табл. 3).

Для визначення рівня генетичного різноманіття популяцій *G. lutea* ми розрахували основні показники генетичної гетерогенності. Як видно з наведених у табл. 3 даних, їх значення для різних популяцій варіювали. П'ять із шести популяцій виявились близькими (значення відрізнялись невірогідно) за показниками очікуваної гетерозиготності та індексом Шеннона, тоді як для популяції з гори Пожижевська значення  $H_e$ , S були дещо нижчими. Популяції *G. lutea* проранговано за показником P так:  $Kr \approx Tr > Lem > Sh > HT \approx Pozh$ , причому найбільше і найменше значення відрізнялися в 1,5 раза (див. табл. 3).

У порядку зменшення середнього значення  $D_j$  між рослинами досліджені популяції розподілились так:  $Kr > Lem > HT \approx Tr > Sh > Pozh$  (див. табл. 3). Відмінності  $D_j$  між популяціями становили близько 0,6—11 %.

Віддаленість популяцій оцінювали за генетичними відстанями  $H_{ei}$  та Жаккарда. За генетичними відстанями  $H_{ei}$  зразки популяції з полонини Лемська виявились ближчими до популяції з гори Трояска (0,163), з гори Шешул — до популяції з полонини Крачунеска (0,169), з гори Пожижевська — до популяції з гори Гутин Томнатик (0,173). Найвіддаленішими між собою були популяції з гір Шешул та Гутин Томнатик (0,274).

ТАБЛИЦЯ 3. Основні показники генетичного поліморфізму досліджених популяцій *G. lutea* за даними ІКАР-аналізу

Популяція	Враховано ампліконів, шт.	Фіксовані амплікони, шт.	Унікальні для популяції амплікони, шт.	Частка поліморфних ампліконів (P), %	Очікувана гетерозиготність (He)	Індекс Шеннона (S)	Середня генетична відстань між рослинами за Жаккардом (D <sub>J</sub> ), %
Lem	52	23	3	34,9	0,111±0,019	0,169±0,028	23,3
HT	43	21	2	26,5	0,104±0,021	0,151±0,029	21,5
Pozh	50	29	2	25,3	0,078±0,017	0,119±0,025	16,0
Sh	48	23	3	30,1	0,108±0,021	0,158±0,029	19,8
Kr	50	19	4	37,4	0,125±0,020	0,189±0,029	28,5
Tr	53	25	6	36,1	0,111±0,020	0,168±0,028	21,2
У середньому	49	23	3	31,7	0,106±0,008	0,159±0,012	21,7
Сумарна вибірка рослин	83	7	—	92,8	0,244±0,020	0,375±0,027	44,4

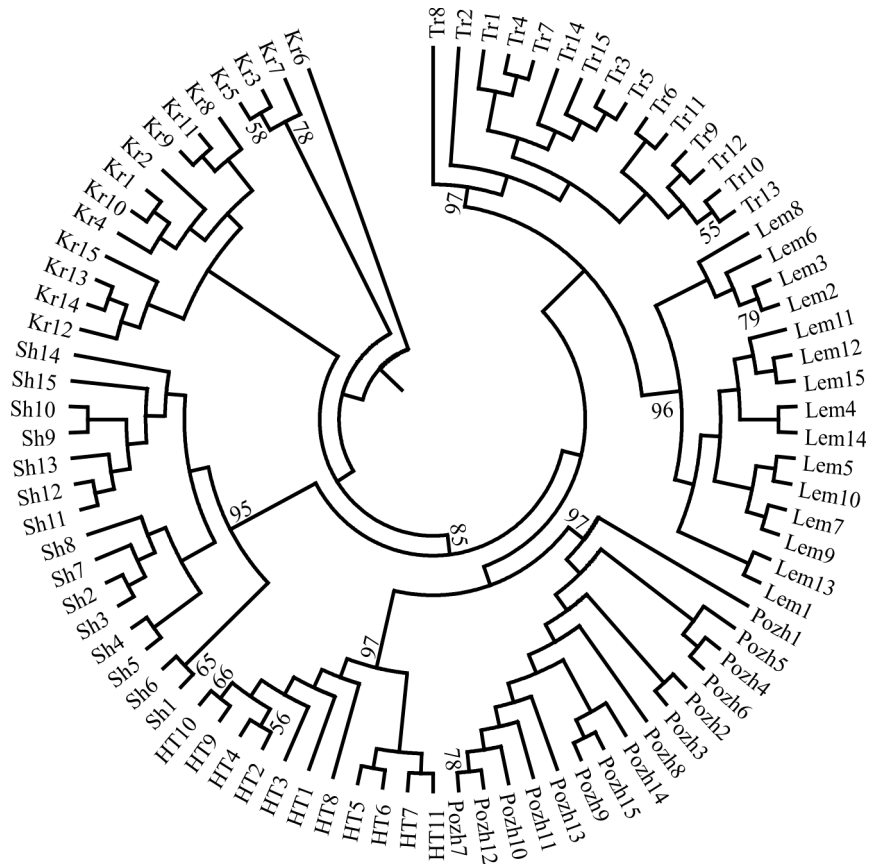


Рис. 2. Консенсусна UPGMA-дендрограма генетичних зв'язків між дослідженими зразками *G. lutea*, побудована на основі  $D_j$ . Цифрами вказано вірогідність кластеризації (індекс бутстрепа)

На основі генетичних відстаней Жаккарда методом UPGMA побудовано дендрограму генетичної подібності досліджених зразків *G. lutea* (рис. 2). Зразки з високим ступенем підтримки кластеризуються відповідно до їх популяційної належності за винятком зразків популяції з полонини Крачунеска, які не формують чіткого кластера. Індекс бутстрепа для Тг становив 97 %, Lem — 96, Pozh — 96, HT — 96, Sh — 85 %.

За допомогою аналізу головних координат (PCoA) на основі матриці генетичних відстаней за Жаккардом отримано просторове відображення кластеризації досліджених зразків *G. lutea* (рис. 3). Групування зразків на графіку відповідає їх популяційній належності. Розміщення зразків на графіку PCoA подібне до їх розміщення на дендрограмі UPGMA (див. рис. 2), проте не ідентичне.

За генетичними відстанями Неї та Жаккарда просторово віддалені популяції групувались разом, і навпаки, географічно ближче розмішені — потрапляли в різні кластери на дендрограмі (див. рис. 1–3).

За тестом Мантелла не виявлено кореляції ( $r = -0,03$ ) між матрицею генетичних відстаней Неї та матрицею географічних відстаней між дослідженими популяціями.

Аналіз молекулярної варіанси (AMOVA) підтвердив, що майже дві третини (62 %) генетичної різноманітності *G. lutea* припадає на міжпо-

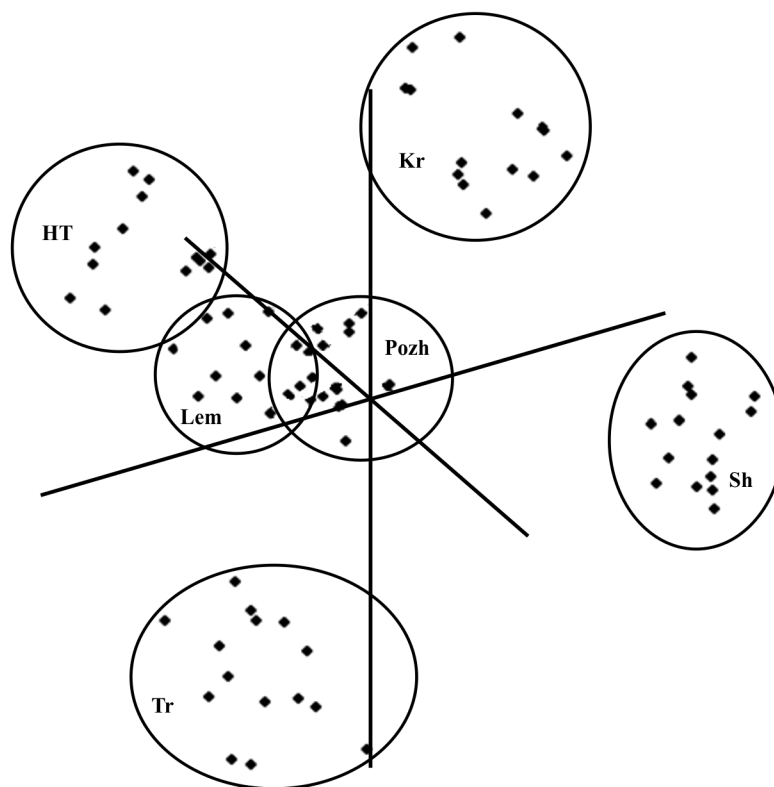


Рис. 3. Тривимірний графік кластеризації досліджених зразків *G. lutea* за використання аналізу головних координат (PCoA), матриці генетичних відстаней Жаккарда, розрахованих за результатами IRAP-ПЛР

пуляційні відмінності, а частка внутрішньопопуляційного поліморфізму становить 38 %.

Байєсовським аналізом із використанням програми Structure 2.3.4 визначено найімовірніше значення  $K$  (число батьківських популяцій), яке дорівнювало 5. Згідно з отриманими даними, популяції з гір Пожижевська і Гутин Томнатик мають спільне походження. В об'єднаній популяції Pozh-HT виявлено особину з генетичним матеріалом популяції з гори Шешул (3,4 %) та п'ять особин із генетичним матеріалом популяції з полонини Лемська (1–2,9 %). Найбільш відособленою виявилась популяція з полонини Лемська. У двох особин популяції з гори Шешул наявний генетичний матеріал популяції з полонини Крачунеска (3,5 і 5 %), в інших двох особин — з об'єднаної популяції Pozh-HT (по 1,2 %). Генетичний матеріал спільного походження в залишкових кількостях містили також представники популяції з полонини Крачунеска та гори Трояска. Отримані дані можна пояснити вільним обміном генетичною інформацією між особинами виду до фрагментації його ареалу. Відомо, що в минулому, коли єдиний карпатський пенеплен ще не перерізала р. Тиса, існувала єдина велика популяція *G. lutea*, яка пізніше розпалася спершу на свидовецьку й чорногірську, а внаслідок пізніших антропогенних впливів — на низку окремих локусів і фрагментів [3].

Порівнянням популяцій *G. lutea* за основними показниками генетичного поліморфізму (He, S, P, D<sub>j</sub>) встановлено, що рівень генетичного різноманіття агропопуляції з полонини Пожижевська найнижчий серед усіх популяцій. Очевидно, це пов'язано з походженням агропопуляції, для створення якої було взято обмежену кількість генотипів із популяції з гори Шешул, а також із порівняно коротким часом її існування (~40 років).

Досліджені популяції відрізнялись між собою за низкою еколого-географічних і фітоценотичних характеристик. Зокрема, популяція з гори Пожижевська знаходиться у невласивому для цього виду екоотопі — серед смерекового лісу. Її щільність найбільша, оскільки рослини зростають на невеликій за площею (1—1,5 тис. м<sup>2</sup>) ділянці, обмеженій по периметру деревами, через що зазнають постійного ущільнення і затінення. Популяція на горі Гутин Томнатик розміщена найвище і найменша за чисельністю — близько 600 особин. Найбільшою за площею, а відтак і за чисельністю, є популяція на горах Шешул-Павлик. У подібних еколого-фітоценотичних умовах зростають рослини на полонині Лемська, проте чисельність особин цієї популяції на порядок нижча. Дві свидовецькі популяції — на полонині Крачунеска і горах Трояска-Татарука — подібні між собою за умовами зростання, щільністю, чисельністю, режимом використання (див. табл. 1). На відміну від чорногірських популяцій фітогенне поле у них розірване — рослини розміщені окремими групами на галявинах поміж чагарниками [2]. Незважаючи на такі відмінності, популяції Lem, HT, Sh, K<sub>r</sub>, T<sub>r</sub> виявились подібними за показниками He і S.

Загалом основні параметри генетичної різноманітності, визначені нами методом IRAP-ПЛР, були подібними або нижчими порівняно з такими, отриманими за допомогою RAPD-, ISSR-аналізів [4, 5]. Як і за IRAP-аналізу, рівні поліморфізму двох свидовецьких популяцій (K<sub>r</sub>, T<sub>r</sub>) за RAPD-, ISSR-, RGAP- і CDDP-маркерами виявились близькими, із незначним переважанням показників для популяції з полонини Крачунеска. IRAP-аналізом популяція з полонини Лемська визначена як найбільш гетерогенна серед чорногірських популяцій, що аналогічно результатам, отриманим нами раніше методами RAPD- та ISSR-ПЛР [4, 5].

За результатами IRAP-аналізу внутрішньопопуляційний рівень генетичного поліморфізму *G. lutea* був нижчим порівняно з іншими видами рослин. Зокрема, вищі показники генетичної мінливості встановлено для популяцій *Iris pumila* L. (He = 0,169; S = 0,273; P = 69,6 %; D<sub>j</sub> = 36,4 %), *Adonis vernalis* L. (He = 0,291; P = 54—77 %) та *Populus tremula* L. (He = 0,262) [1, 6, 7].

Визначено, що показники внутрішньовидового поліморфізму були значно вищими, ніж у межах окремих популяцій. Отримані результати можна пояснити топологією їх місць зростання, адже саме рельєф Українських Карпат створює бар'єри для міграції генів. Очевидно, як і в інших видів роду *Gentiana*, географічна та екологічна гетерогенність гір спричинює високий рівень генетичної різноманітності *G. lutea*, а фрагментація місць зростання приводить до ізоляції і, як наслідок, до збільшення генетичної диференціації популяцій [17, 22].

Отримані нами результати дослідження популяцій *G. lutea* підтвердили відсутність кореляції між генетичними й географічними дистанціями: на дендрограмі просторово віддалені популяції кластеризують-



ся разом, а географічно ближчі — знаходяться в різних кластерах. Зокрема рослини популяцій з гори Трояска та полонини Лемська із Свидовецького й Чорногірського хребтів групувались в один кластер, аналогічно формували один кластер і зразки з географічно віддалених популяцій з гори Шешул (хребет Чорногора) та полонини Крачунеска (хребет Свидовець).

Інші дослідники також не виявили зв'язку внутрішньовидової диференціації з географічною приуроченістю рослин у представників родини Lemnaceae (RAPD-аналіз), що пояснено відсутністю територіальної ізоляції окремих популяцій [15]. Незалежність генетичних і географічних відстаней встановлено також для *Triticum dicoccoides*, *Hordeum spontaneum* [9, 16]. Проте літературні дані щодо впливу на рівень генетичної варіабельності географічного поширення виду неоднозначні. Наприклад, встановлено позитивну кореляцію між генетичною диференціацією популяцій і географічними відстанями для *Atriplex* sp. (Chenopodiaceae) [8].

Таким чином, на основі даних IRAP-аналізу встановлено рівень генетичного поліморфізму шести популяцій *G. lutea* та особливості генетичної структури виду. Досліджені популяції виявились близькими за індексом Шеннона та очікуваною гетерозиготністю, серед них виділялась лише пожижевська агропопуляція, всі проаналізовані показники (He, S, P, D<sub>J</sub>) якої виявились найнижчими. Групування зразків на дендрограмі генетичної подібності та за результатами аналізу головних координат відповідало їх популяційній належності. Для досліджених популяцій не встановлено кореляції між генетичними й географічними відстанями. Показано, що на відмінності між популяціями припадає 62 % загальної генетичної мінливості, на внутрішньопопуляційний поліморфізм — 38 %, що є свідченням їх значної генетичної ізоляції і дивергенції.

1. Боронникова С.В., Светлакова Т.Н., Бобошина И.В. Молекулярно-генетический анализ *Populus tremula* L. на основании полиморфизма IRAP и ISSR маркеров [Электронный ресурс] // Тез. докл. Междунар. конф. «Conservation of Forest Genetic Resources of Siberia». — 2011. — Режим доступа: <http://conf.nsc.ru/cfgrs2011/reportview/46716>
2. Майорова О.Ю., Грицак Л.Р., Мельник В.М. та ін. Поширення і стан популяцій *Gentiana lutea* L., *G. punctata* L. та *G. acaulis* L. в Українських Карпатах // Інтродукція рослин. — 2013. — № 3. — С. 21–28.
3. Малиновський К.А., Царик Й.В., Жияєв Г.Г. та ін. Структура популяцій рідкісних видів флори Карпат. — К.: Наук. думка, 1998. — 176 с.
4. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.Н. и др. ISSR-анализ некоторых популяций *Gentiana lutea* L. Украинских Карпат // Тез. докл. научн. конф. «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии». 25–29 марта 2013 г. — Ростов-на-Дону: ЮНЦ РАН, 2013. — С. 62.
5. Мосула М.З., Конвалюк І.І., Мельник В.М., Дробик Н.М. Оцінка генетичного поліморфізму чорногірських популяцій *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) з Українських Карпат: RAPD-аналіз // Фактори експерим. еволюції організмів. — К.: Логос, 2013. — 13. — С. 80–83.
6. Boronnikova S.V., Kalendar R.N. Using IRAP markers for analysis of genetic variability in populations of resource and rare species of plants // Russ. J. Genet. — 2010. — 46, N 1. — P. 36–42.
7. Bublyk O., Andreev I., Kalendar R. et al. Efficiency of different PCR-based marker systems for assessment of *Iris pumila* genetic diversity // Biologia. — 2013. — 68, N 4. — P. 613–620.
8. Clarke L., Jardine D., Byrne M. et al. Significant population genetic structure detected for a new and highly restricted species of *Atriplex* (Chenopodiaceae) from Western Australia, and implications for conservation management // Aust. J. Bot. — 2012. — 60. — P. 32–41.

9. Fahima T., Roder M.S., Wendehake K. et al. Microsatellite polymorphism in natural populations of wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, in Israel // *Theor. Appl. Genet.* — 2002. — **104**, N 1. — P. 17–29.
10. Falush D., Stephens M., Pritchard J. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles // *Mol. Ecol. Notes.* — 2007. — **7**, N 4. — P. 574–578.
11. Felsenstein J. Inferring Phylogenies [Электронный ресурс]. — Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA, 2004. — 580 p. Режим доступа: <http://www.sinauer.com/inferring-phylogenies.html>
12. Kalendar R., Flavell A.J., Ellis T.H. et al. Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers // *Heredity (Edinb.)*. — 2011. — **106**, N 4. — P. 520–530.
13. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolution genetics analysis and sequences alignment // *Briefin Bioinf.* — 2004. — **5**, N 2. — P. 150–163.
14. Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach // *Cancer Res.* — 1967. — **27**. — P. 209–220.
15. Martirosyan E.V., Ryzhova N.N., Skryabin K.G., Kochieva E.Z. RAPD-analysis of genome polymorphism in the family Lemnaceae // *Russian J. Genet.* — 2008. — **44**, N 3. — P. 417–422.
16. Nevo E.E. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* — 2001. — **98**, N 11. — P. 6233–6240.
17. Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H., den Nijs J.C.M. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation // *Biol. Conservation.* — 2003. — **113**, N 3. — P. 389–398.
18. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Mol. Ecol. Notes.* — 2006. — N 6. — P. 288–295.
19. Pritchard J., Stephens M., Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data // *Genetics.* — 2000. — **155**. — P. 945–959.
20. Rogers I., Bendich A. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh herbarium and mummified plant tissues // *Plant Mol. Biol.* — 1985. — **5**. — P. 69–76.
21. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // *Mol. Ecol. Notes.* — 2006. — N 6. — P. 569–572.
22. 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. — **154**. — P. 225–232.

Отримано 23.09.2013

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ ПОПУЛЯЦИЙ *GENTIANA LUTEA* L.  
МЕТОДОМ МАРКИРОВАНИЯ МЕЖРЕТРОТРАНСПОЗОННЫХ  
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ (IRAP-ПЦР)

М.З. Мосула<sup>1</sup>, И.И. Конвалюк<sup>2</sup>, В.Н. Мельник<sup>2</sup>, Е.Н. Бублик<sup>2</sup>, И.О. Андреев<sup>2</sup>, Н.М. Дробык<sup>1</sup>,  
В.А. Кунах<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тернопольский национальный педагогический университет имени Владимира Гнатюка

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

Исследованы особенности генетической структуры и оценен уровень полиморфизма шести популяций редкого растения *G. lutea* из Украинских Карпат с помощью IRAP-маркеров. Несмотря на различия эколого-географических, фитоценологических условий произрастания, а также режимов использования, пять из шести популяций оказались сходными по ожидаемой гетерозиготности и индексу Шеннона. Самый низкий уровень генетического полиморфизма по всем использованным показателям имеет пожижевская агропопуляция, что, вероятно, обусловлено ее искусственным происхождением, а также малым возрастом (~40 лет). Обнаружено отсутствие корреляции между генетическими и географическими расстояниями, что подтверждено расположением образцов на дендрограмме, на которой пространственно отдаленные популяции группировались вместе, а географически близкие — в разных кластерах. В результате анализа молекулярной вариации (AMOVA) показано, что различия между популяциями составляют 62 % общей генетической изменчивости, а внутривидовой полиморфизм — 38 %, что является свидетельством значительной генетической изоляции исследованных популяций *G. lutea*.

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY IN *GENTIANA LUTEA* L.  
POPULATIONS BY METHOD OF MARKING BETWEEN RETROTRANSPOZON'S  
SEQUENCES (IRAP-PCR)

*M.Z. Mosula*<sup>1</sup>, *I.I. Konvalyuk*<sup>2</sup>, *V.M. Mel'nyk*<sup>2</sup>, *O.M. Bublyk*<sup>2</sup>, *I.O. Andreev*<sup>2</sup>, *N.M. Drobyk*<sup>1</sup>,  
*V.A. Kunakh*<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Volodymyr Hnatiuk Ternopil National Pedagogical University

2 M. Kryvonosa St., Ternopil, 46027, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Molecular Biology and Genetics National Academy of Sciences of Ukraine

150 Acad. Zabolotnogo St., Kyiv, 03680, Ukraine

The features of genetic structure and level of genetic polymorphism were investigated using IRAP-PCR in six populations of rare plant *G. lutea* from Ukrainian Carpathians. We found low level of genetic diversity using IRAP-PCR compared with the other types of PCR-markers for this populations. Five of the six investigated populations were similar to each other by the value of expected heterozygosity and Shannon's index, despite the differences in ecological, geographical, phytoecological conditions of growth and different modes of use. Pozhzyhevskya agropopulation was distinguished by low level of polymorphism, probably due to its artificial origin and short term of existence (about 40 years). It was no correlation between genetic and geographic distances as evidenced by location of samples on dendrogram. Spatially separated populations were grouped together, while geographically closer ones found themselves in different clusters. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the differences between populations account for 62 % of total genetic variation, whereas only 38 % of it were resided within populations. The results obtained indicate significant genetic isolation of studied *G. lutea* populations.

**Key words:** *Gentiana lutea* L., IRAP-markers, indicators of genetic polymorphism, interpopulation and intrapopulation variation, genetic structure.