

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ КЛІТИННОЇ БІОЛОГІЇ ТА ГЕНЕТИЧНОЇ ІНЖЕНЕРІЇ

На правах рукопису

МОСУЛА Мар'яна Зіновіївна



УДК 575.17:574.1:582.923.1+57.088.7

**ПОПУЛЯЦІЙНО-ГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТИРЛИЧУ ЖОВТОГО
(*GENTIANA LUTEA* L.) З УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ**

03.00.15 – генетика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2015

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано в Тернопільському національному педагогічному університеті імені Володимира Гнатюка та Інституті молекулярної біології і генетики НАН України (м. Київ)

Науковий керівник – доктор біологічних наук, професор

Дробик Надія Михайлівна,

Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка, декан хіміко-біологічного факультету

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник

Тищенко Олена Миколаївна,

Інститут фізіології рослин і генетики НАН України, виконувач обов'язків завідувача відділу генетичної інженерії;

кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник

Банникова Марія Олександрівна,

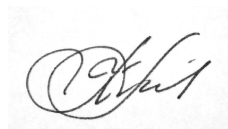
Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України

Захист відбудеться «5» березня 2015 р. об 11-й годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 26.202.01 Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: вул. Академіка Заболотного, 148, м. Київ – 143, Україна, 03143.

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Інституту клітинної біології та генетичної інженерії НАН України за адресою: м. Київ, вул. Академіка Заболотного, 148.

Автореферат розіслано «30» січня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



К.В. Листван

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. У зв'язку із зростаючим впливом людини на природу актуальною проблемою сьогодення є збереження біорізноманіття (Глобальна стратегія..., 2002). До середини поточного століття прогнозується збільшення кількості зникаючих видів рослин з 7 до 60 тисяч (Стратегія сохрания..., 2004; Frankel, 1995). Дослідження, які виконуються з метою оптимізації природокористування і охорони біорізноманіття на популяційному рівні, є одними із найбільш пріоритетних напрямів розвитку науки сьогодення. Створення ефективних природоохоронних заходів неможливе без вивчення генетичної компоненти біологічного різноманіття. Фундаментальне значення генетичних процесів у популяціях живих організмів обумовило активізацію вивчення генетичної структури як у теоретичних, так і експериментальних аспектах. Дослідження генетичної структури популяцій дозволяє отримати інформацію про рівень генетичної гетерогенності та унікальність їх генофонду, виявляти внутрішньовидовий та внутрішньопопуляційний поліморфізм, оцінити гетерозиготність, визначити просторові зв'язки між популяціями та окремими особинами, встановити напрям розвитку генетичних процесів у популяціях. Лише глибоке знання популяційно-генетичної структури дозволить проводити моніторинг її змін і прогнозувати порушення її стабільного відтворення в часі (Политов, 2007).

У зв'язку з прямою та опосередкованою господарською діяльністю людини популяційні системи багатьох видів рослин зазнають катастрофічного зменшення площ, змін чисельності, вікової та просторової структури і, як результат, спостерігається зниження генетичної різноманітності популяцій (Алтухов, 2003; Динамика популяционных..., 2004; Пірко, 2005). У першу чергу, це стосується рідкісних видів, які потребують розробки сучасних методів (у тому числі, молекулярно-генетичних) з метою підтримання біорізноманіття.

До таких видів належать деякі представники роду Тирлич (*Gentiana* L.) флори України, а саме офіційний вид тирлич жовтий (*Gentiana lutea* L.). *G. lutea* відносять до рідкісних, зникаючих видів у більшості європейських країн, у тому числі і в Україні (Червона книга..., 2009). Неконтрольоване використання рослинної сировини цього виду, знищення місць зростання, вплив пасторального навантаження призвели до небажаних змін у структурі його популяцій, зменшення ареалів, а в деяких випадках – до їх повного зникнення зі складу флори регіону. Наразі вітчизняними вченими проведено пошук та охарактеризовано стан популяцій *G. lutea* в Українських Карпатах (Майорова та ін., 2013). Водночас, дані оцінки генетичного потенціалу виду загалом і його окремих популяцій і досі залишаються фрагментарними (Melnyk et al., 2004; 2007). Зважаючи на цінність цієї лікарської рослини, потенційну потребу в сировині *G. lutea*, з одного боку, та скорочення його природних запасів, з іншого, необхідним є проведення заходів, спрямованих на збереження та відновлення його популяцій.

Для встановлення спорідненості між таксонами, популяціями й окремими організмами, визначення генетичної структури угруповань широко

використовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з різними молекулярно-генетичними маркерами (Календар, 2011; Сиволап, 2011; Созинов, 1985; Сулимова, 2004; Ray, 2007). Створення методів на основі аналізу поліморфних ділянок ДНК відкрило нові методичні можливості для вивчення генетичних факторів, що обумовлюють особливості динаміки популяційно-генетичної структури видів рослин.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами. Дисертаційне дослідження виконано у лабораторії екології та біотехнології Тернопільського національного педагогічного університету (ТНПУ) імені Володимира Гнатюка у рамках держбюджетних тем «Біохімічні та молекулярно-генетичні характеристики морфогенних та неморфогенних культур *in vitro* видів роду *Gentiana* L.» (номер держреєстрації 0109U002309, 2009–2011 рр.) та «Фізіолого-екологічні та біотехнологічні основи збереження видів роду *Gentiana* L. *in vitro* та *in situ*» (номер держреєстрації 0112U000272, 2012–2014 рр.), а також у відділі генетики клітинних популяцій Інституту молекулярної біології і генетики (ІМБіГ) НАН України за цільовою комплексною міждисциплінарною програмою наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» «Порівняльна геноміка у діагностиці генофонду деяких рідкісних видів рослин України» (№ держреєстрації 0110U006052, 2010–2014 рр.).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи був аналіз популяційно-генетичного різноманіття *G. lutea* з Українських Карпат.

Для реалізації мети поставлено наступні завдання:

- встановити рівень генетичного поліморфізму шести популяцій *G. lutea* та визначити генетичні відстані між ними за допомогою методів молекулярно-генетичного аналізу (RAPD-, ISSR-, RGAP-, CDDP-, IRAP-ПЛР);
- дослідити особливості генетичної структури і диференціації *G. lutea* та виявити можливий зв'язок між ступенем генетичної диференціації популяцій та їх географічною віддаленістю;
- встановити кореляції між генетичними та екологічними параметрами популяцій і оцінити їх стан;
- дослідити генетичні особливості агропопуляції з г. Пожижевська, що дозволить оцінити можливість використання штучних насаджень з метою збереження *G. lutea*;
- підібрати ефективний показник інформативності праймерів для оцінки генетичної різноманітності на прикладі *G. lutea* та розробити систему генетичних маркерів з метою оптимізації дослідження генофонду популяцій цього виду;
- на основі еколого-генетичних параметрів популяцій розробити рекомендації щодо збереження та охорони *G. lutea*.

Об'єкт дослідження – стабільність/мінливість популяцій *G. lutea* з Українських Карпат.

Предмет дослідження – характер внутрішньовидового та внутрішньопопуляційного поліморфізму, особливості генетичної структури

G. lutea.

Методи дослідження: СТАВ-метод виділення ДНК, ПЛР з різними типами ДНК-праймерів (RAPD, ISSR, IRAP, CDDP, RGAP), електрофорез ДНК в агарозному гелі, методи статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. За матеріалами наукових досліджень вперше:

- на основі проведеного молекулярно-генетичного аналізу шести популяцій (пол. Лемська, г. Пожижевська, г. Шешул-Павлик, г. Гутин Томнатик, пол. Крачунеска, г. Трояска-Татарука) *G. lutea* з Українських Карпат оцінено генетичну різноманітність та визначено генетичні відстані між популяціями з використанням різних типів ДНК-маркерів (RAPD, ISSR, RGAP, CDDP, IRAP);
- встановлено рівень генетичної диференціації популяцій;
- оцінено стан популяцій *G. lutea* на основі комплексного еколого-генетичного аналізу, складовими якого є вивчення генетичної структури популяцій та співставлення отриманих даних із результатами дослідження екологічних параметрів;
- підібрано ефективний показник інформативності праймерів для вивчення генетичного поліморфізму *G. lutea*;
- розроблена система молекулярно-генетичних маркерів, яка дозволяє швидко, ефективно та менш затратно досліджувати генетичний поліморфізм популяцій *G. lutea*;
- розроблено науково обґрунтовані рекомендації щодо збереження генофонду *G. lutea*.

Практичне значення одержаних результатів. Наукові висновки роботи і рекомендації можуть бути використані для проведення моніторингу популяцій *G. lutea*, як в Українських Карпатах, так і в інших районах поширення виду. Комплексне застосування різних типів ПЛР-маркерів для аналізу поліморфних ділянок ДНК відкриває нові можливості вивчення організації та функціонування геномів рідкісних і зникаючих видів рослин шляхом мультилокусного маркування геномів. Вивчення генетичної різноманітності популяцій, оцінка їх стану дозволяє рекомендувати науково обґрунтовані заходи збереження *G. lutea*. Результати дослідження можуть бути використані під час інтродукції або реінтродукції (репатріації) з метою відновлення популяцій цього виду. Розроблена система молекулярно-генетичних маркерів може бути застосована для оцінки генетичного поліморфізму популяцій *G. lutea*.

Отримані результати досліджень використовуються в курсі «Молекулярна генетика» для студентів магістратури хіміко-біологічного факультету ТНПУ ім. В. Гнатюка; також можуть бути використані у навчальному процесі під час читання лекційних курсів, проведення лабораторно-практичних робіт з дисципліни «Генетика» і «Генетика популяцій» для студентів біологічних спеціальностей вищих навчальних закладів та під час підготовки навчальних посібників з молекулярної генетики та екології для студентів вищих навчальних

закладів.

Особистий внесок здобувача. Наведені в рукописі результати отримано здобувачем особисто або за безпосередньої участі при виконанні експериментів. Концепцію роботи, програму і методологію експериментальних досліджень, основні положення і висновки роботи сформульовані та обговорені дисертантом разом із завідувачем відділу генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАН України, д.б.н., професором, член-кореспондентом НАН України Кунахом В.А., к.б.н. Конвалюк І.І., к.б.н. Мельником В.М., к.б.н. Андрєєвим І.О. та науковим керівником д.б.н., проф. Дробик Н.М.

Автором особисто підібрано об'єкти дослідження; виділено ДНК; проведено ПЛР з різними типами праймерів; вибрано молекулярно-генетичні маркери; оброблено та інтерпретовано представлені у роботі результати; здійснено їх порівняння з літературними даними. Також автором відібрано і критично проаналізовано великий обсяг сучасної вітчизняної та зарубіжної літератури за темою проведеного наукового дослідження.

Аналіз і обговорення результатів дослідження дисертаційної роботи проведено спільно із науковим керівником – д.б.н., проф. Дробик Н.М., д.б.н., чл.-кор. Кунахом В.А., а також із працівниками відділу генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАН України к.б.н. Конвалюк І.І., к.б.н. Мельником В.М., к.б.н. Андрєєвим І.О., к.б.н. Бублик О.М., к.б.н. Спірідоною К.В. та опубліковано у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Результати роботи були представлені на семінарах відділу генетики клітинних популяцій ІМБіГ НАН України (Київ, 2013, 2014), науковій конференції «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (Ростов-на-Дону, 25–29 березня 2013), II регіональній науково-практичній конференції «Дослідження флори і фауни Західного Поділля» (Гутисько, 24 травня 2013), Всеросійській конференції молодих вчених «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Улан-Уде, 16–21 вересня 2013), VIII Міжнародній науковій конференції «Фактори експериментальної еволюції організмів» (Алушта, 23–27 вересня 2013), науково-методичному семінарі «Сучасні досягнення екології та їх імплементація у природничу освіту» (Тернопіль, 24 квітня 2014).

Публікації. Результати досліджень і матеріали за темою дисертації викладено в 13 наукових працях, з яких: 7 статей у наукових фахових виданнях, перелік яких затверджений ДАК України, у тому числі 3 – у зарубіжних періодичних виданнях та тези 4 доповідей на міжнародних і всеукраїнських конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з переліку умовних скорочень, вступу, огляду літератури, матеріалів та методів досліджень, двох експериментальних розділів, аналізу і узагальнення результатів, висновків та списку використаних джерел. Її обсяг – 143 сторінок друкованого тексту, враховуючи 20 рисунків та 22 таблиці. Перелік цитованої літератури містить 177 найменувань, у т.ч. 88 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

В огляді літератури розглянуто необхідність використання популяційно-генетичного підходу для вирішення проблем збереження біорізноманіття рослин; наведено характеристику ПЛР-маркерів, які застосовуються вченими у роботі з рідкісними рослинами, зокрема видами родини Gentianaceae. Представлено дані біоекологічних досліджень *G. lutea*, а саме особливості його біології, характеристику популяцій в Українських Карпатах та сучасний стан виду загалом. Розглядається доцільність проведення молекулярно-генетичних досліджень *G. lutea*, що можуть бути використані у програмах збереження та відновлення популяцій цього виду.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Вивчали дикорослі рослини із п'яти природних (гг. Шешул-Павлик (Sh), пол. Лемська (Lem), г. Гутин Томнатик (HT), гг. Трояска-Татарука (Tr), пол. Крачунеска (Kr)) та однієї інтродукованої (г. Пожижевська (Pozh)) популяцій *G. lutea* з Українських Карпат. У роботі за основу було взято метод виділення ДНК Rogers S.O. і Bendich A.J. (1985), дещо модифікований Спірідоною К.В. (2000). Молекулярно-генетичний аналіз проводили методами RAPD (random amplification of polymorphic DNA)-, ISSR (inter simple sequence repeats)-, IRAP (inter-retransposon amplified polymorphism)-, RGAP (resistance gene analog polymorphism)- та CDDP (conserved DNA-derived polymorphism)-ПЛР. Протестовано 27 RAPD-, 13 ISSR-, 12 CDDP-, 31 IRAP- та 8 пар RGAP-праймерів. Для роботи із зразками ДНК *G. lutea* було відібрано 10, 9, 6, 5 та 6 пар праймерів відповідно. Також протестовано 13 LP-праймерів, проте вони не синтезували відтворювальні амплікони, тому не були використані у подальших дослідженнях. Ампліфікацію проводили у термоциклері Терцик MC2 («Биотехнология», Росія).

Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом у 1,3 % агарозному гелі в $1 \times$ SB-буфері (5 мМ $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, рН 8,5) з використанням барвника – бромистого етидію, впродовж 5–6 год за напруженості електричного поля 4–5 В/см. Для визначення розміру фрагментів використовували ДНК-маркер «100 bp + 1,5 Kb» (СибЭнзим, Росія). Гелі фотографували в проникаючому УФ світлі цифровим фотоапаратом з використанням фільтра «O-2,8».

Обробку електрофореграм проводили за допомогою програми TotalLab TL120 (Nonlinear Dynamics). Для кількісної оцінки RAPD-, ISSR-, IRAP-, CDDP- та RGAP- поліморфізму дані обробки електрофоретичних спектрів ПЛР-продуктів записували у вигляді бінарних матриць. Для статистичного аналізу даних ПЛР-аналізу застосовували програми FAMD 1.25 (Schluter, 2006), Mega 6 (Tamura, 2013), GenAlEx 6.5 (Peakall, 2006), JMP version 7 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA). Для оцінки рівня генетичного поліморфізму та опису генетичної структури популяцій розраховували наступні параметри: частку поліморфних ампліконів (P), індекс Шеннона (S), очікувану гетерозиготність (H_e), генетичні відстані Жакарда (D_J) та H_{ei} . На основі показника D_J методом незваженої попарно-групової

кластеризації (UPGMA) побудовано консенсусні дендрограми генетичної подібності зразків з використанням програми WinBoot; бутстреп-тест включав 1000 повторів (Kumar, 2004; Yар, 1996). Оцінку кореляцій між матрицями генетичних відстаней H_e та географічних відстаней між популяціями здійснювали з використанням тесту Мантела (999 permutations) (Mantel, 1967). Генетичну структуру популяцій визначали з використанням програми Structure 2.3.4, яка базується на ймовірнісній моделі Байєса (Bayesian method) (адаптованої для домінантних маркерів). Розподіл загальної генетичної мінливості між популяціями та в їхніх межах вивчали методом аналізу молекулярної варіанси (AMOVA).

Для комплексного аналізу популяцій, аналогічно до 5-бальної системи оцінки стану популяцій Бельтюкової Н.М. (2010), нами розроблено шкалу за 12 критеріями (P , H_e , S , D_t – загальна щільність, D_e – ефективна щільність, I_B – індекс відновлення, I_Z – індекс заміщення, I_C – індекс старіння, Δ – індекс віковості, ω – індекс ефективності, g/v – характер самопідтримання за співвідношенням між кількістю особин генеративного та вегетативного походження). Враховували ступінь антропогенного впливу (ан. в.), що здійснюється на популяції: незначний (5 балів), слабкий (4 бали), середній (3 бали), помірний (2 бали), сильний (1 бал). Популяції з кількістю балів 46–60 оцінювали як стабільні, 29–45 – відносно стабільні, 12–28 – нестабільні.

Для оцінки інформативності праймерів та створення системи молекулярно-генетичних маркерів розраховували наступні показники: загальну кількість ампліконів (ЗКА), кількість поліморфних ампліконів (КПА) та частку поліморфних ампліконів, показник інформативності PIC (polymorphism information content) (Botstein, 1980), індекс інформативності маркерів (marker index, MI) (Powell, 1996), роздільну здатність (R_p) (Prevost, 1999), розпізнавальну здатність (discrimination power, D), границю D за прямування числа зразків до нескінченості (discriminating power, D_L) (Tessier, 1999). Зв'язок між показниками інформативності праймерів розраховували за допомогою коефіцієнта кореляції Спірмена (r_s). Кореляцію між матрицями генетичних відстаней, розрахованих за різними типами маркерів, оцінювали з використанням тесту Мантела (999 permutations) (Mantel, 1967).

АНАЛІЗ ГЕНЕТИЧНОГО РІЗНОМАНІТТЯ *G. LUTEA* З ДОПОМОГОЮ ДНК-МАРКЕРІВ

Оцінка генетичного поліморфізму *G. lutea* за RAPD-, ISSR-, IRAP-, RGAP- та CDDP-маркерами. За допомогою ДНК-маркерів (RAPD, ISSR, IRAP, RGAP, CDDP) досліджено генетичний поліморфізм та охарактеризовано генетичну структуру п'яти природних та однієї інтродукованої популяцій рідкісного виду *G. lutea*, що знаходяться на двох хребтах (Чорногора, Свидовець) в Українських Карпатах. Сукупне використання п'яти типів молекулярно-генетичних маркерів дозволило охарактеризувати поліморфізм різних ділянок геному рослин *G. lutea* та встановити основні показники генетичної різноманітності.

RAPD-, ISSR-, RGAP-, CDDP- та IRAP-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 200–3000 п.н., 200–3400 п.н., 140–1900 п.н., 110–2800 п.н., 200–2800 п.н. відповідно. Електрофореграми, що демонструють поліморфізм профілів ПЛР-продуктів окремих рослин досліджених популяцій, представлено на рис. 1.

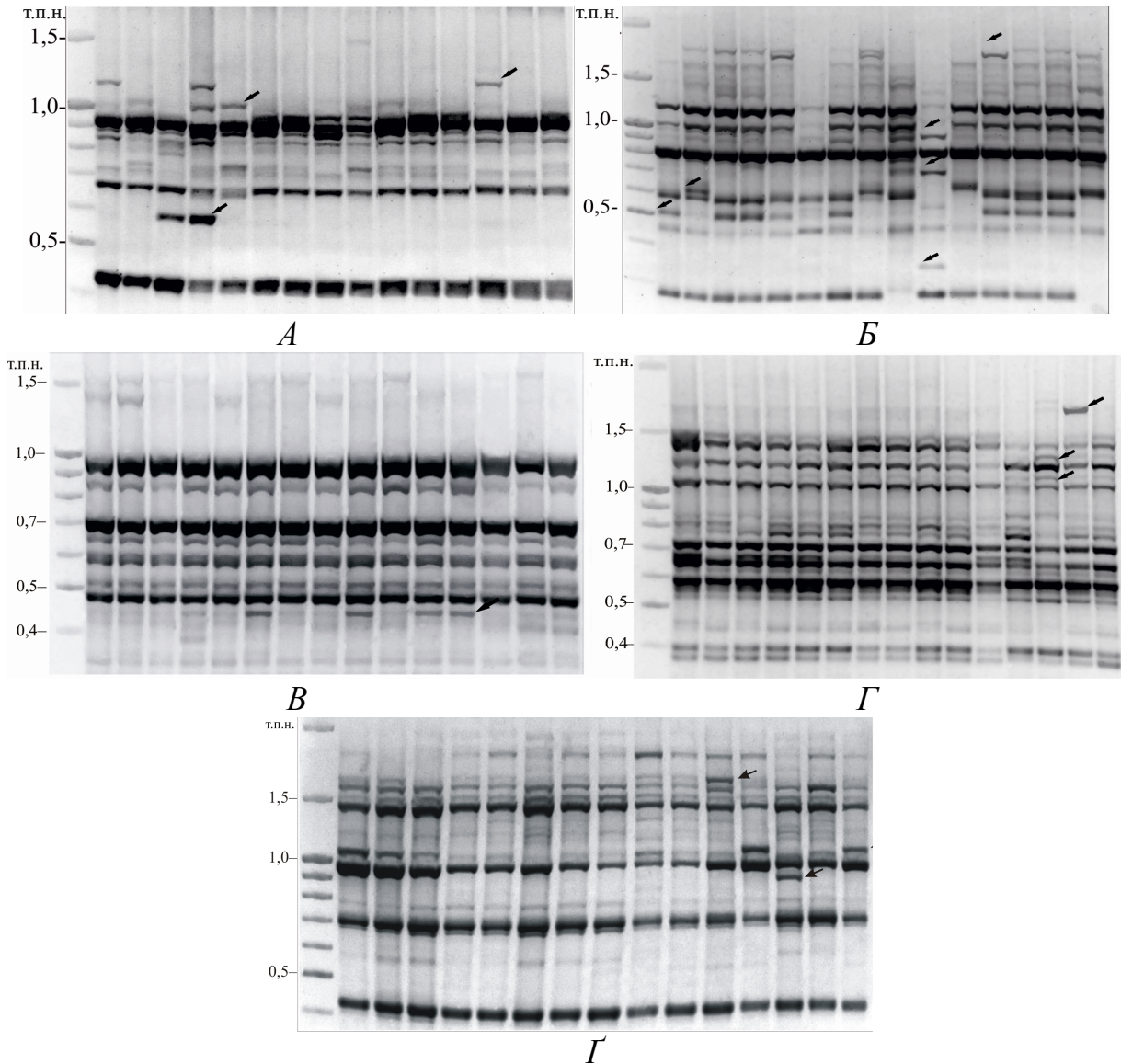


Рис. 1. Спектри ДНК досліджених зразків *G. lutea*: А – RAPD (A18) – зразки з г. Пожижевська; Б – ISSR (UBC#809) – зразки з г. Шешул-Павлик; В – RGAP (Cre3Ploor+Cre3-k3) – зразки з г. Трояска-Татарука; Г – CDDP (MADS-A) – зразки з г. Трояска-Татарука; Г – IRAP (866) – зразки з пол. Лемська.

Примітка. Стрілками позначені поліморфні амплікони

Для загальної вибірки рослин з усіх популяцій за результатами RAPD- та ISSR-аналізів отримано 438 фрагменти, з яких 98,6 % були поліморфними. У результаті RGAP-аналізу отримано 84 амплікони, із яких 79 (94,1 %) були поліморфними. Досліджені вибірки відрізнялися за частотами RGAP-локусів, проте були амплікони, характерні тільки для зразків з окремих популяцій. CDDP-маркери забезпечували ампліфікацію 120 фрагментів, з яких 98,6 % були поліморфними. З використанням IRAP-праймерів отримано 83 амплікони, із

яких 76 (92,8 %) були поліморфними, а сім мономорфними – спільними для усіх досліджених зразків. Загалом проаналізовано 2230 фрагментів ДНК, за якими дано кількісну оцінку рівня поліморфізму як окремих популяцій, так і виду в цілому, а також охарактеризовано генетичну структуру популяцій *G. lutea*.

Виявлено, що розмах мінливості популяцій *G. lutea* знаходиться в межах рівня генетичного поліморфізму, визначеного для інших представників родини Gentianaceae. Частка поліморфних ампліконів популяцій за різними типами ДНК-маркерів варіювала у вузьких межах (30,8–34,5 %) з незначним переважанням показників, отриманих з використанням ISSR-маркерів (рис. 2). Згідно усіх типів аналізу встановлено, що приблизно 6–9 % дослідженого генетичного матеріалу була унікальною, не типовою для популяцій конкретних місць зростання. Значення інших показників (очікувана гетерозиготність, індекс Шеннона), що дозволяють дати кількісне вираження генетичної різноманітності, дещо відрізнялися (H_e : 0,097–0,115, S : 0,149–0,173) (рис. 2). У цілому значення основних параметрів генетичної різноманітності за RGAP- та CDDP-маркерами були дещо нижчими у порівнянні з іншими використаними маркерами. Така відмінність результатів пояснюється різною інтенсивністю дії добору на досліджені ділянки ДНК.

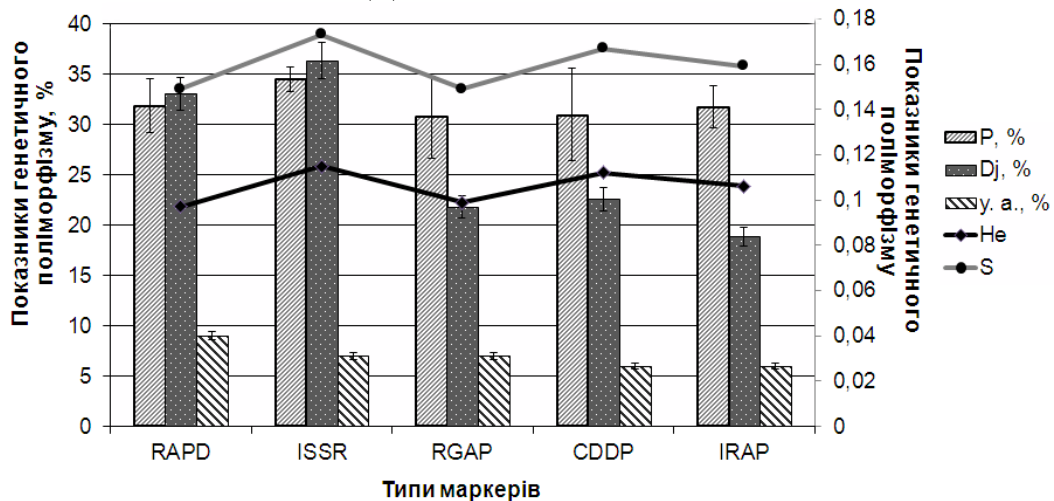


Рис. 2. Показники генетичного поліморфізму популяцій *G. lutea* (усереднені дані шести популяцій): P – частка поліморфних ампліконів; D_j – генетичні відстані Жакарда; у. а. – частка унікальних ампліконів, H_e – очікувана гетерозиготність; S – індекс Шеннона

Розподіл загальної генетичної різноманітності на між- та внутрішньопопуляційну (AMOVA) характеризується значним (приблизно у 2 рази) переважанням міжпопуляційних відмінностей, що є свідченням значної генетичної дивергенції популяцій *G. lutea*. Усі застосовані підходи до оцінки генетичної диференціації популяцій продемонстрували схожі результати (рис. 3). Така ізоляція популяцій *G. lutea*, очевидно, існує впродовж тривалого часу і призвела до накопичення суттєвих міжпопуляційних відмінностей. Це також підтверджується наявністю лише 3 % мономорфних фрагментів, спільних для зразків усіх популяцій. Чітка дивергенція популяцій *G. lutea* пояснюється генетичною ізоляцією, спричиненою фрагментацією місць зростання, в окремих випадках значною географічною (територіальною)

ізоляцією та посилюється за рахунок контрастності екологічних умов зростання цього гірського виду. 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.

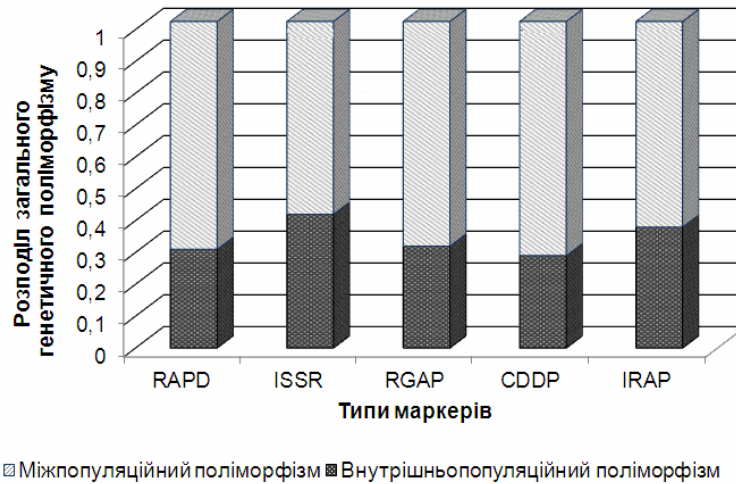


Рис. 3. Розподіл загального генетичного поліморфізму *G. lutea* на між- та внутрішньопопуляційний

Не виявлено кореляцій між генетичними та географічними відстанями популяцій *G. lutea*. Імовірно, це зумовлено тим, що формування генофонду окремих популяцій відбувалося під впливом інших факторів довкілля, не залучених до аналізу, або ж було пов'язане з історією утворення самих популяцій. Також не було виявлено зв'язку між показниками генетичної різноманітності популяцій *G. lutea* та їхньою чисельністю. Головною причиною цього може бути значна тривалість життя окремих особин виду, що уповільнює втрату різноманіття у випадку скорочення чисельності популяції в несприятливих умовах довкілля. У той же час, виявлено достовірну негативну високу кореляцію між індексом віковості популяцій і показниками очікуваної гетерозиготності, а також індексом Шеннона (в обох випадках $r_s = -0,9$, $p = 0,05$). Тобто, із зростанням Δ , який свідчить про старіння популяцій, показники генетичної різноманітності зменшуються, що й підтверджується коефіцієнтом кореляції Спірмена.

Характеристика генофонду популяцій за узагальненими результатами п'яти типів ПЛР-аналізу. Значення частки поліморфних ампліконів для п'яти природних популяцій коливалося від 29,1 % до 37,9 %, очікуваної гетерозиготності – від 0,089 до 0,126, індекса Шеннона – від 0,137 до 0,190. Для агропопуляції з г. Пожижевська $P = 27,7$ %, $H_e = 0,085$, $S = 0,131$ (рис. 4). Середнє значення генетичних відстаней Жакарда для природних популяцій варіювало від 26,9 % до 38,6 %, для інтродукованої становило 22,1 %. Популяції за середніми значеннями D_j були проранговані наступним чином $HT > Lem > Sh > Kr \approx Tr > Pozh$. На основі показника D_j методом UPGMA побудовано дендрограму генетичної подібності зразків *G. lutea*, яка наглядно відображає ступінь відмінностей досліджуваних зразків. Показано, що зразки з

високим ступенем підтримки кластеризуються відповідно до їхньої популяційної приналежності (індекс бутстрепа в основі кожного розгалуження становить 100 %) (рис. 5).

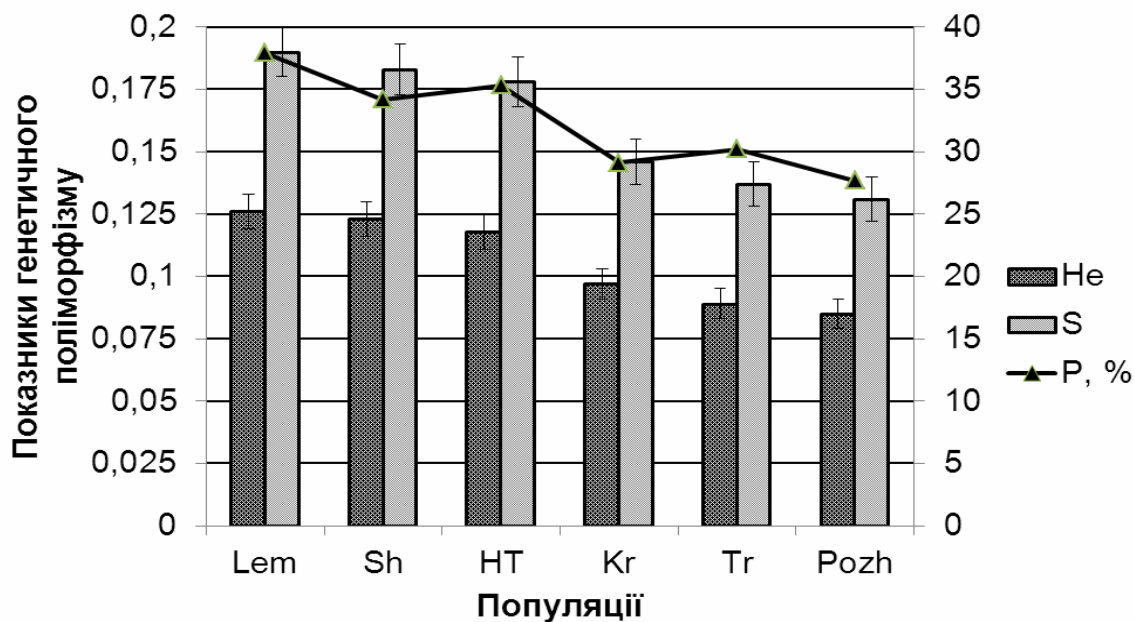


Рис. 4. Значення показників генетичного поліморфізму популяцій *G. lutea* за узагальненими даними п'яти типів аналізу (RAPD, ISSR, IRAP, RGAP, CDDP): P – частка поліморфних ампліконів, He – очікувана гетерозиготність, S – індекс Шеннона

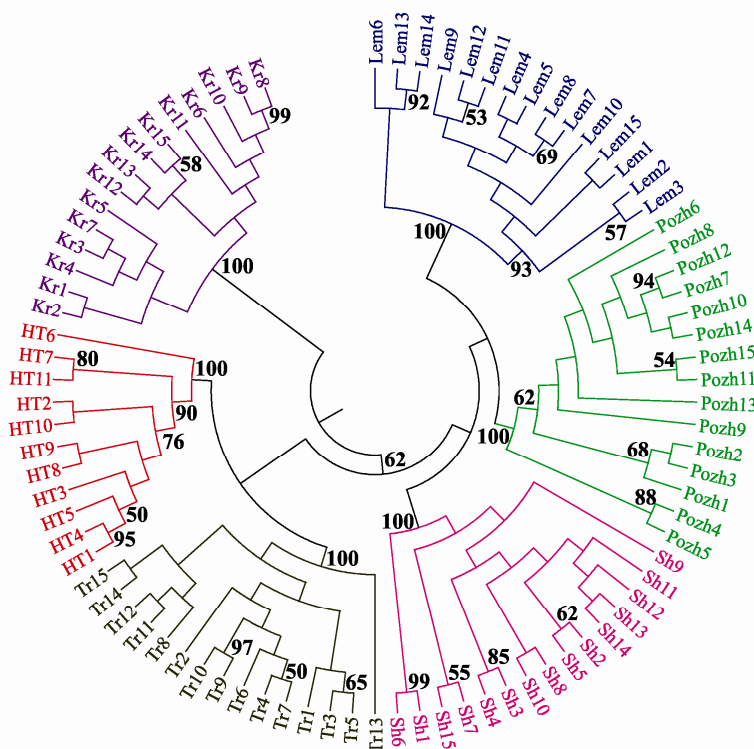


Рис. 5. UPGMA-дендрограма генетичних зв'язків між дослідженими зразками *G. lutea*, побудована на основі D_j , розрахованих за п'ятьма типами аналізу (RAPD, ISSR, RGAP, CDDP, IRAP).

Примітка. Цифрами вказано величини достовірності кластеризації – індекс бутстрепа для груп індивідів із значенням більше 50 %

Встановлено вищі показники генетичної різноманітності природних популяцій з хр. Чорногора, у порівнянні із популяціями з Свидовецького масиву Українських Карпат (рис. 4). Очевидно, це може бути спричинене одним з тих факторів (або їхньою сукупністю), за якими ці дві групи популяцій відрізняються: фітоценотичним оточенням, фітогенним полем (розірваним чи нерозірваним), переважанням одного із способів розмноження (вегетативного чи генеративного), режимом використання, різними груповими параметрами (щільністю, чисельністю) та ін. Зокрема відомо, що чорногорські популяції знаходяться в умовах заповідання, тоді як свидовецькі зазнають значного впливу пасквальних факторів (Майорова, 2013).

Встановлено подібні показники генетичної різноманітності популяцій з пол. Крачунеска та г. Трояска-Татарука, які схожі за еколого-географічними умовами зростання, груповими характеристиками та режимом використання. Чорногірські популяції були подібними між собою за значеннями основних показників генетичного поліморфізму (H_e , 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. Агропопуляція з г. Пожижевська відзначалася низькими показниками H_e і S та найменшим з усіх досліджених популяцій значенням частки поліморфних ампліконів. 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 популяції на г. Пожижевська (~ 40 років), а також тривалий період онтогенезу однієї рослини *G. lutea* (до 100 років) були тими факторами, що стримували зростання генетичного різноманіття у ній.

Популяційно-генетична структура *G. lutea* була проаналізована за допомогою програми Structure. Згідно даних Байєсовського аналізу значення K дорівнювало 5: Lem-HT, Sh, Pozh, Kr, Tr. В усіх сформованих кластерах виявлено особини спільного походження в залишкових кількостях, що можна пояснити обміном генетичною інформацією між особинами виду до фрагментації його ареалу (0,1–15,6 %). Це підтверджує думку деяких ботаніків про існування в минулому на території Українських Карпат єдиної великої популяції *G. lutea* (Малиновський та ін., 1998).

Еколого-генетична оцінка стану популяцій *G. lutea*. Для оцінки стану популяцій необхідно поряд із генетичними параметрами враховувати й екологічні характеристики, географічні умови росту тощо. Це дозволить на основі глибокого комплексного аналізу оцінити та прогнозувати перспективи існування і розвитку популяцій за умови дії на них певного поєднання факторів. Тому, особливістю запропонованого і реалізованого у роботі підходу є використання комплексного аналізу до визначення стану популяцій *G. lutea*, що полягає в оцінці генетичної структури популяцій та співставленні отриманих даних із результатами екологічних досліджень (літературні дані).

Сума набраних балів у популяціях *G. lutea* коливалася в межах від 22 до 51. До стабільних популяцій було віднесено Sh (50), Lem (49), Pozh (46); до відносно стабільних – HT (36); нестабільних – Kr (27), Tr (22) (рис. 6). Порушення стабільності популяцій *G. lutea* спричинено впливом біотичних (затінення високими чагарниками, щільне задерніння ґрунту злаками) та антропогенних (пасторальне навантаження) факторів.

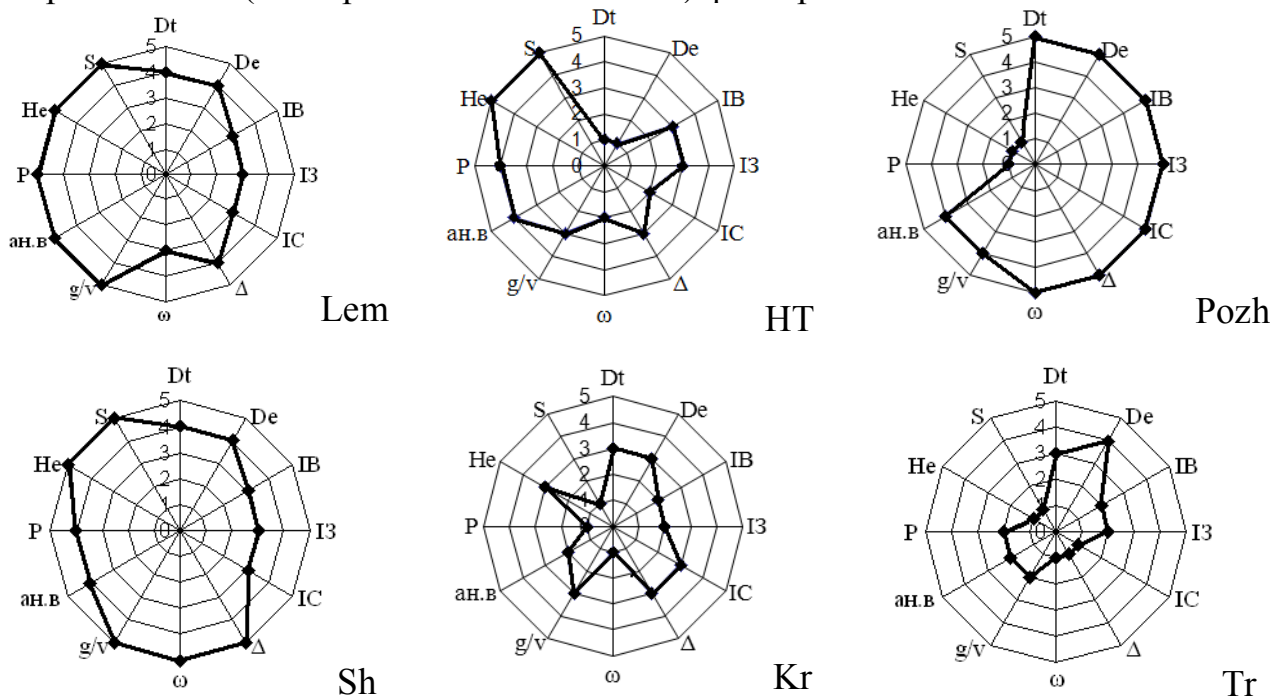


Рис. 6. Графіки, побудовані на основі генетичних та екологічних критеріїв за шкалою оцінки стану популяцій *G. lutea*. Ілюструють стабільний (Pozh, Sh, Lem), відносно стабільний (HT) та нестабільний (Kr, Tr) стани популяцій *G. lutea*

Нестабільність свідовецьких популяцій (Kr, Tr) зумовлена розташуванням цих локалітетів в умовах інтенсивного антропогенного пресингу, неспроможністю їх особин витримувати конкуренцію з високими чагарниками у фітоценозі, порушенням вікової структури (за IB вони є старіючими), зниженням життєздатності особин, переважання вегетативного розмноження над генеративним, стрес-толерантною стратегією. Стабільність Lem, Sh визначається як їхніми екологічними характеристиками – великі площі, високі показники щільності, IB та I3, самопідтримання здебільшого за рахунок генеративного розмноження, переважання у віковому спектрі молодих генеративних та прегенеративних особин, процвітаюча віталітетна структура; високими показниками генетичного поліморфізму – частка поліморфних ампліконів, очікувана гетерозиготність, індекс Шеннона, так і розташуванням у зоні заповідання. У відносно стабільній популяції з г. Гутин Томнатик виявлено невідповідність результатів вивчення екологічних параметрів цієї популяції з генетичними. Зокрема, згідно проведеного аналізу значення екологічних критеріїв були низькими, тоді як молекулярно-генетичні дослідження свідчать про значне генетичне різноманіття всередині популяції. Це можна пояснити потоком генів між цією популяцією та популяцією з пол. Лемська, яка розташована на відстані 3 км, що, очевидно, не перешкоджає вільному обміну

генетичною інформацією між ними (перенесення насіння вітром або тваринами, пилку – комахами). На підтвердження цього припущення свідчать результати аналізу даних за допомогою програми Structure – популяції з пол. Лемська і г. Гутин Томнатик формували єдиний кластер.

Інтродукована популяція на г. Пожижевська за результатами еколого-генетичного аналізу є стабільною. Відмінності генетичних та екологічних характеристик цієї популяції можна пояснити її невеликим віком, тривалим онтогенезом особин виду та довгим прегенеративним періодом (Майорова, 2013). Результати еколого-генетичних досліджень стану агропопуляції на г. Пожижевська свідчать про перспективність використання штучних насаджень у високогір'ї, з метою збільшення кількості місцезростань цього виду.

У зв'язку із значною диференціацією популяцій *G. lutea*, зникненні проміжних популяцій між нині відомими, нестабільним станом деяких популяцій, нами розроблені рекомендації з охорони, збереження та відтворення *G. lutea*:

- з метою збереження природних місць зростання популяцій з пол. Крачунеска та г. Трояска-Татарука, які знаходяться в нестабільному стані, необхідно регламентувати господарську діяльність людини (обмежити випас худоби) на Свидовецькому масиві Українських Карпат;

- посилити контроль та відповідальність за дотриманням режиму охорони, встановленого Карпатським національним природним парком і Карпатським біосферним заповідником, із практичною реалізацією норм і правил екологічного законодавства;

- встановлення інформаційних щитів з відомостями про рідкісні та зникаючі види рослин, поширених на визначеній території;

- проведення моніторингу популяцій *G. lutea* з метою з'ясування динаміки популяцій та прогнозування їх розвитку. Враховувати показники генетичної різноманітності (поліморфність, гетерозиготність) та екологічні характеристики (групові параметри популяцій, віковий спектр, віталітетну структуру) популяцій з ціллю виявлення порушень на початкових етапах і запобігання погіршення їхнього стану;

- створення штучних насаджень цього виду (шляхом інтродукції чи реінтродукції) у природних місцях зростання з метою підтримання його генетичного різноманіття та збільшення кількості місцезростань цього виду;

- у зв'язку із значною диференціацією популяцій *G. lutea* необхідно створювати інтродуковані проміжні популяції з метою підтримання генетичної різноманітності;

- зважаючи на те, що популяції з пол. Лемська та г. Шешул-Павлик характеризуються високими показниками генетичної різноманітності та є процвітаючими, можна використати їх для відбору вихідного матеріалу для перенесення в інші популяції з метою збільшення їхньої генетичної гетерогенності та підвищення стабільності або для створення проміжних популяцій.

СТВОРЕННЯ СИСТЕМИ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МАРКЕРІВ ДЛЯ ОЦІНКИ ГЕНЕТИЧНОЇ РІЗНОМАНІТНОСТІ

З метою зменшення фінансових затрат, зниження трудомісткості процесу та використання меншої кількості рідкісного рослинного матеріалу, необхідно створити ефективну систему із різних типів ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму *G. lutea*.

Порівняння ефективності показників інформативності ПЛР-маркерів для аналізу генетичної різноманітності на прикладі *G. lutea*. Нами проаналізовано низку показників (ЗКА, КПА, P, R_p, D_L, MI, PIC) для оцінки інформативності праймерів, які можна використати в генетичному аналізі. На основі частот ампліконів та наборів фрагментів, продукованих окремими праймерами, для кожного з них було розраховано вище зазначені показники інформативності. Встановлено, що значення PIC варіювали у діапазоні від 0 до 0,5, і в середньому становили 0,45; MI – від 0 до 9,5, в середньому – 3,4; R_p – від 0 до 12,3, в середньому – 5,5; і D_L – від 0 до 0,967, в середньому – 0,821. Найбільш інформативними за усіма показниками, крім PIC, виявилися праймери UBC#811 та UBC#807, а найменш інформативними – KNOX-F, KNOX-R, NLRR for/NLRR rev.

Для кількісної оцінки зв'язку між використаними показниками інформативності праймерів було розраховано коефіцієнти рангової кореляції Спірмена. Виявлено дуже високу силу зв'язку між D_L і кількістю нерозпізнаних пар, а також між MI та P. Між іншими показниками, за виключенням PIC, сила зв'язку була високою або середньою. Достовірно значимий слабкий зв'язок виявлено лише між PIC та P. Отримані результати означають, що всі використані показники, за винятком PIC, певною мірою характеризують ефективність ПЛР-маркерів. Загальна кількість ампліконів та частка поліморфних ампліконів – важливі показники придатності окремих праймерів для оцінки генетичного поліморфізму, котрі можуть бути використані на етапі первинного скринінгу. Проте вони не враховують особливостей розподілу поліморфних ампліконів серед досліджених генотипів, зокрема їх частоти у вибірці зразків.

З усіх показників лише розпізнавальна здатність (розраховується з частот не окремих ампліконів, а їх наборів) враховує незалежність розподілу поліморфних ампліконів у наборах фрагментів різних генотипів. Показник D_L також безпосередньо пов'язаний з кількістю пар зразків, які нездатний розпізнати праймер у дослідженій вибірці. Порівняння кількості нерозпізнаних пар зразків, встановленої експериментально, та теоретично розрахованої за частотами наборів фрагментів, показало значну подібність цих показників для всіх праймерів, що є свідченням того, що D_L можна успішно застосовувати як показник інформативності при відборі праймерів для оцінки генетичного різноманіття виду. Оскільки роздільна здатність не завжди є надійним показником інформативності праймерів, а саме здатності до розпізнавання окремих особин, а розпізнавальна здатність безпосередньо пов'язана із

кількістю пар, які праймер здатний диференціювати у досліджуваній вибірці зразків, у подальшому ми відбирали праймери саме за показником D_L .

Підбір комбінації праймерів для оцінки генетичної різноманітності та генетичної структури *G. lutea*. Досліджено інформативність різних типів маркерів (ISSR, RAPD, IRAP, RGAP, CDDP) та розроблено систему ПЛР-маркерів для оцінки генетичного різноманіття та проведення популяційно-генетичних досліджень *G. lutea*. Найбільш інформативними виявилися ISSR-маркери, для яких середня кількість ампліконів на праймер для загальної вибірки рослин становила 15,8. Дещо нижчим цей показник виявився для IRAP-, CDDP- та RAPD-праймерів – 13,4; 13,3 і 12,2, і найнижчим він був для RGAP-праймерів – 8,6. При порівнянні між собою різних типів маркерів найбільш інформативними за показником D_L були ISSR-праймери, а найнижче значення D_L мали RGAP-праймери. Припускаємо, що RGAP-праймери найменш придатні для аналізу *G. lutea*, оскільки мають найбільш і найменш поліморфні спектри.

За найбільшим значенням D_L було відібрано п'ять комбінацій із 12, 10, 5, 3 та 1 праймера. Встановлено, що праймер UBC#807 дозволяє диференціювати всі зразки рослин з двох популяцій (Kr, Tr), решта здатні це зробити у поєднанні по два або по три. Використання різних комбінацій праймерів з найбільшим D_L проявилось у зростанні показників генетичного різноманіття, що зумовлено зростанням частки поліморфних праймерів внаслідок видалення із вибірки праймерів, що утворюють мономорфні спектри. За зменшення кількості праймерів до 12 і менше відбувається зсув розподілу загальної генетичної гетерогенності за AMOVA в бік переважання внутрішньопопуляційної мінливості, але за використання різних варіантів комбінацій праймерів співвідношення внутрішньо- та міжпопуляційної гетерогенності суттєво не змінюється. Найвищу кореляцію між матрицями генетичних дистанцій, розрахованими за даними 40 праймерів та різними комбінаціями праймерів з найвищими значеннями D_L , в тесті Мантела виявлено для комбінації з 12 праймерів ($r = 0,960$, $p = 0,001$). Комбінація із 12 праймерів включала: 5 ISSR- (UBC#807, UBC#811, UBC#840, UBC#889, UBC#835), 4 RAPD- (A18, A07, B01, A19), 2 CDDP- (ERF-F, MYB) та 1 IRAP-маркер (1962).

Для підбору мінімального числа праймерів (маркерів), необхідних для встановлення генетичних зв'язків серед зразків з шести популяцій *G. lutea*, ми визначили бутстреп-підтримку основних вузлів на UPGMA-дендрограмі, побудованій на основі матриць генетичних відстаней Жакарда з використанням різної кількості маркерів (рис. 7). Встановлено, що вже за використання трьох перших праймерів (UBC#807, UBC#811, A18), які в сумі дають 91 ПЛР-маркер, бутстреп-підтримка всіх основних вузлів наближалася до 90 %, а 6 праймерів (UBC#807, UBC#811, A18, UBC#840, A07, UBC#889), які продукують 166 маркерів, забезпечують бутстреп-підтримку основних вузлів вище 99 %. Тому, використання лише трьох праймерів з числа відібраних забезпечує утворення поліморфних ПЛР-маркерів у кількості, достатній для встановлення генетичної приналежності рослин *G. lutea* до тієї, чи іншої популяції не менш, ніж із 85 % вірогідністю. Виявлено, що збільшення обсягу вибірки аналізованих

зразків буде потребувати і збільшення кількості праймерів, що використовуються в аналізі.

За необхідності проведення експрес-оцінки генетичного різноманіття популяцій *G. lutea* достатнім буде мінімальний набір з 3–6 праймерів, залежно від розміру вибірки та ступеня диференціації популяцій. Водночас, решта праймерів із значеннями D_L вище 0,8 можуть бути використана для теоретичних та прикладних екогенетичних досліджень *G. lutea* та пошуку локусів, що зазнають тиску природного добору або асоційовані з фенотипом.

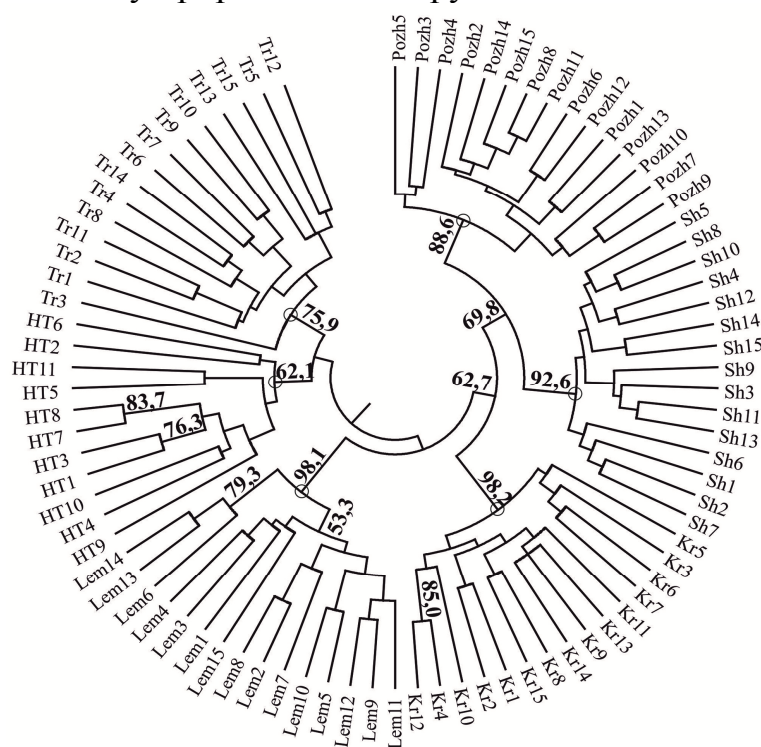


Рис. 7. UPGMA-дендрограма генетичних зв'язків між зразками *G. lutea*, побудована на основі D_j , яка демонструє взаємовідносини між генотипами, оцінені з використанням трьох найбільш інформативних праймерів, які генерують 91 амплікон (UBC#807; UBC#811; A18).

Примітка. Цифрами вказано величини достовірності кластеризації – індекс бутстрепа – для шести ключових вузлів та для груп індивідів із значеннями більше 50 %

Таким чином, для всебічного вивчення геному необхідно дотримуватися принципів множинного молекулярно-генетичного маркування геному, тобто використовувати ДНК-маркери, які базуються на різних послідовностях ДНК, у тому числі кодувальних та некодувальних, що дозволить точніше диференціювати генотипи.

ВИСНОВКИ

Вперше з використанням молекулярно-генетичних маркерів оцінено стан популяцій рідкісного виду *G. lutea* з Українських Карпат, визначено рівень генетичної різноманітності та встановлено ступінь диференціації його популяцій. На основі проведених досліджень створено систему ДНК-маркерів для оцінки генетичного поліморфізму *G. lutea* і розроблено рекомендації для охорони та збереження цього виду.

1) Показники генетичної різноманітності популяцій *G. lutea* за п'ятьма типами ПЛР-маркерів (RAPD, ISSR, CDDP, RGAP, IRAP) були високими ($P = 93\text{--}99\%$; $H_e = 0,228\text{--}0,274$; $S = 0,368\text{--}0,423$; $D_j = 44,4\text{--}66\%$) і знаходилися в межах рівня генетичного поліморфізму, визначеного для інших представників родини Gentianaceae. Генетична гетерогенність природних популяцій з хр. Чорногора (пол. Лемська, гг. Шешул-Павлик, г. Гутин Томнатик) була вищою порівняно з популяціями з хр. Свидовець (пол. Крачунєска, гг. Трояска-Татарука).

2) Встановлено значну генетичну ізоляцію та дивергенцію популяцій *G. lutea* за показником розподілу загальної генетичної мінливості на між- і внутрішньопопуляційну (65% та 35% відповідно), а також за наявністю лише 3% мономорфних фрагментів, спільних для зразків з усіх популяцій. Показано наявність генетичного матеріалу спільного походження в усіх сформованих кластерах, що можна пояснити вільним обміном генетичною інформацією між особинами виду до фрагментації його ареалу.

3) Відсутня кореляція між генетичними та географічними відстанями популяцій *G. lutea*, а також між показниками генетичного поліморфізму (S , H_e) та чисельністю популяцій. Виявлено достовірну негативну високу кореляцію між індексом віковості популяцій і показниками очікуваної гетерозиготності, а також індексом Шеннона (в обох випадках $r_s = -0,9$, $p = 0,05$).

4) За результатами комплексного еколого-генетичного аналізу популяції *G. lutea* були віднесені до трьох груп: стабільні (пол. Лемська, гг. Шешул-Павлик, г. Пожижевська), відносно стабільні (г. Гутин Томнатик), нестабільні (пол. Крачунєска, гг. Трояска-Татарука). Генофонд нестабільних популяцій збіднений ($P = 29,1\%$ і $30,2\%$; $H_e = 0,097$ і $0,089$; $S = 0,146$ і $0,137$ відповідно), що спричинено впливом антропогенних (значне пасторальне навантаження) та біотичних (затінення високими чагарниками, щільне задерніння ґрунту злаками) чинників.

5) Інтродукована популяція з г. Пожижевська, незважаючи на віднесення її до стабільних, характеризується низькими показниками генетичного поліморфізму та невеликими генетичними відстанями між рослинами. Це пояснюється її коротким віком (~ 40 років), тривалим онтогенезом особин виду ($50\text{--}100$ років) та довгим прегенеративним періодом ($12\text{--}15$ років). Низький внутрішньопопуляційний поліморфізм обумовлений «ефектом засновника», результатом якого є нижчий рівень генетичної різноманітності у порівнянні з батьківською популяцією (гг. Шешул-Павлик).

6) Оцінка показників інформативності праймерів показала, що найефективнішим серед них є розпізнавальна здатність, яка найбільш повно враховує особливості розподілу поліморфних ампліконів серед досліджених зразків *G. lutea*, а також дозволяє розрахувати кількість пар зразків, що не можуть бути розпізнані праймером або комбінацією праймерів у вибірці певного розміру.

7) З метою оптимізації дослідження генофонду популяцій *G. lutea* (зменшення фінансових затрат, зниження трудомісткості процесу та використання меншої кількості рідкісного рослинного матеріалу) розроблено

систему генетичних маркерів, яка включає 12 із 40 протестованих праймерів: 5 ISSR- (UBC#807, UBC#811, UBC#840, UBC#889, UBC#835), 4 RAPD- (A18, A07, B01, A19), 2 CDDP- (ERF-F, MYB) та 1 IRAP-маркер (1962). Найбільш інформативними в оцінці генетичного поліморфізму *G. lutea* виявилися ISSR-маркери, найменш – RGAP-маркери. При проведенні експрес-оцінки генетичного різноманіття популяцій *G. lutea* достатнім буде мінімальний набір з 3–6 праймерів (бутстреп-підтримка всіх основних вузлів дендрограми наближалася до 90–99 %). Решта праймерів із значеннями розпізнавальної здатності вище 0,8 може бути використана для теоретичних та прикладних екогенетичних досліджень.

8) Розроблено рекомендації для збереження та охорони *G. lutea*. Зважаючи на те, що популяції з пол. Лемська та гг. Шешул-Павлик характеризуються високими показниками генетичної різноманітності та є процвітаючими, пропонується використати їх для відбору вихідного матеріалу для створення проміжних популяцій виду та перенесення в інші популяції з метою збільшення їхньої генетичної гетерогенності та підвищення стабільності.

СПИСОК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових виданнях

1. Генетичне різноманіття популяцій *Gentiana lutea* L. з хребта Свидівець Українських Карпат / **М.З. Мосула**, І.І. Конвалюк, В.М. Мельник, І.О. Андреев, О.М. Бублик, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2013. – Т. 11, № 2. – С. 250–259. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 30 листкових пластинок рослин з двох популяцій, проведення ПЛР з 10 RAPD-, 9 ISSR-, 6 CDDP-, та 6 парами RGAP-праймерів, проведення гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження з використанням методів математичної статистики, написання основної частини статті).
2. Genetic polymorphism of *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) populations from the Chornohora ridge of the Ukrainian Carpathians / **M.Z. Mosula**, I.I. Konvalyuk, V.M. Mel'nyk, N.M. Drobyk, Y.V. Tsaryk, Yu.Y. Nesteruk, V.A. Kunakh // Cytology and Genetics. – 2014. – V. 48, № 6. – P. 371–377. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 30 листкових пластинок рослин з двох популяцій, проведення ПЛР з 10 RAPD- та 9 ISSR-праймерами і гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження з використанням методів математичної статистики, написання основної частини статті).
3. Molecular markers to assess genetic diversity of *Gentiana lutea* L. from the Ukrainian Carpathians / **M.Z. Mosula**, I.O. Andreev, V.M. Mel'nyk, I.I. Konvalyuk, N.M. Drobyk, V.A. Kunakh // Plant Genetic Resources. – 2014. – P. 1–8. Doi:10.1017/S147926211400104X. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 86 листкових пластинок рослин з шести популяцій, підбір праймерів для дослідження *G. lutea*, проведення ПЛР з 10 RAPD-, 9 ISSR-, 9 CDDP-, 5 IRAP- та 7 парами RGAP-праймерів, та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження, підбір показників інформативності праймерів, визначення ефективності показників інформативності ПЛР-праймерів, визначення розрахункового числа пар зразків, які не може розрізнити праймер у вибірці з n зразків, встановлення рівня та розподілу

генетичного поліморфізму в двох популяціях на основі використання різних комбінацій праймерів, написання тексту статті).

4. RGAP-аналіз генетической гетерогенности популяций вида *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) с Украинских Карпат / **М.З. Мосула**, Н.Г. Каспрук, М.И. Гриневич, Н.М. Дробык // Фундаментальные исследования. – 2014. – Т. 5, час. 4. – С. 760–764. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 86 листкових пластинок рослин з шести популяцій, попередній скринінг 8 пар RGAP-праймерів, проведення ПЛР з 6 парами RGAP-праймерів та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження, написання основної частини статті).
5. Аналіз генетичної різноманітності популяцій *Gentiana lutea* L. методом маркування міжретротранспозонних послідовностей (IRAP-ПЛР) / **М.З. Мосула**, І.І. Конвалюк, В.М. Мельник, О.М. Бублик, І.О. Андрєєв, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Физиология растений и генетика. – 2014. – Т. 46, № 1. – С. 45–55. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 86 листкових пластинок рослин з шести популяцій, попередній скринінг 34 IRAP-праймерів, проведення ПЛР з 5 IRAP-праймерами та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження, написання основної частини статті).
6. Генетична структура і диференціація популяцій *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) в Українських Карпатах / **М.З. Мосула**, В.М. Мельник, І.І. Конвалюк, Н.М. Дробик, І.О. Андрєєв, В.А. Кунах // Вісн. Укр. тов-ва генетиків і селекціонерів. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 174–183. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 86 листкових пластинок рослин з шести популяцій, проведення ПЛР з 10 RAPD-, 9 ISSR-, 5 IRAP-, 6 CDDP- та 6 RGAP-праймерами та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження, написання основної частини статті).
7. Еколого-генетичний аналіз популяцій *Gentiana lutea* L. в Українських Карпатах / **М.З. Мосула**, О.Ю. Майорова, Л.Р. Грицак, В.М. Мельник, Н.М. Дробик, В.А. Кунах // Екологія та ноосферологія. – 2014. – Т. 25, № 3–4. – С. 5–13. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 86 листкових пластинок рослин із шести популяцій, проведення ПЛР з 10 RAPD-, 9 ISSR-праймерами та гель-електофорезу, підбір методики для проведення комплексного еколого-генетичного аналізу, опрацювання результатів молекулярно-генетичного дослідження, написання тексту статті).
8. Оцінка генетичного поліморфізму чорногірських популяцій *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) з Українських Карпат: RAPD-аналіз / **М.З. Мосула**, І.І. Конвалюк, В.М. Мельник, Н.М. Дробик // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Т. 13: присвяч. 95-річчю від часу заснування НАН України / Редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Логос, 2013. – С. 80–83. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 30 листкових пластинок рослин з двох популяцій, проведення ПЛР з 10 RAPD-праймерами та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження з використанням методів математичної статистики, написання тексту статті).
9. Порівняння показників інформативності ПЛР-маркерів для аналізу генетичного різноманіття на прикладі *Gentiana lutea* L. / І.О. Андрєєв, **М.З. Мосула**, В.М. Мельник, О.М. Бублик, І.І. Конвалюк, Н.М. Дробик // Фактори експериментальної еволюції організмів: Зб. наук. пр. Т. 14: присвяч. 180-річчю від часу заснування Київського національного університету імені

- Тараса Шевченка / Редкол.: В.А. Кунах (голов. ред.) [та ін.]. – К.: Логос, 2014. – С. 141–146. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 30 листкових пластинок рослин *G. lutea* з двох популяцій, проведення ПЛР з 10 RAPD-, 9 ISSR-, 9 CDDP-, 5 IRAP- та 7 парами RGAP-праймерів та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження, підбір показників інформативності праймерів, визначення ефективності показників інформативності ПЛР-праймерів, розрахунок числа нерозпізнаних пар для різних комбінацій праймерів, написання тексту статті).
10. ISSR-анализ некоторых популяций *Gentiana lutea* L. Украинских Карпат / **М.З. Мосула**, И.И. Конвалюк, В.Н. Мельник, Н.М. Дробык, В.А. Кунах // Тезисы докладов научной конференции «Молекулярно-генетические подходы в таксономии и экологии» (Россия, Ростов-на-Дону, 25–29 марта 2013 г.). – Ростов-на-Дону: Изд-во ЮНЦ РАН, 2013. – С. 62. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 30 листкових пластинок рослин з двох популяцій, проведення ПЛР з 9 ISSR-праймерами та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження з використанням методів математичної статистики, написання тексту тез).
 11. Підбір молекулярних маркерів для дослідження генетичної варіабельності рідкісного карпатського виду *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) / **М.З. Мосула**, І.І. Конвалюк, Н.Г. Каспрук, М.І. Гриневич, В.В. Кошіль, Н.М. Дробик // Матеріали регіональної науково-практичної конференції, присвяченої 15-річчю створення Голицького біостаніонару ТНПУ імені Володимира Гнатюка «Дослідження флори і фауни Західного Поділля». Ред. кол.: В.З. Курант (відп. ред.) та ін. (с. Гутисько Бережанського району Тернопільської області, 24–25 травня 2013 р.). – Тернопіль: В-во ТНПУ імені Володимира Гнатюка, 2013. – С. 61–64. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 5 листкових пластинок рослин з однієї популяції, протестовано 27 RAPD-, 13 ISSR-, 12 CDDP-, 34 IRAP-, 13 LP- та 8 пар RGAP-праймерів, написання тексту тез).
 12. **Мосула М.З.** Генетическая гетерогенность *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) в Украинских Карпатах: RAPD-анализ / **М.З. Мосула**, И.И. Конвалюк, Н.М. Дробык // Материалы Всероссийской конференции молодых ученых «Биоразнообразие: глобальные и региональные процессы» (Россия, Улан-Удэ, 16–21 сентября 2013 г.). – Улан-Удэ: Из-во БНЦ СО РАН, 2013. – С. 12–13. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 75 листкових пластинок рослин з п'яти популяцій, проведення ПЛР з 10 RAPD-праймерами та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження, написання тексту тез).
 13. Комплексна оцінка популяцій *Gentiana lutea* L. з Українських Карпат / **М.З. Мосула**, О.Ю. Майорова, Л.Р. Грицак, Н.М. Дробик // Матеріали науково-методичного семінару «Сучасні досягнення екології та їх імплементація у природничу освіту» (Тернопіль, 24 квітня 2014 р.). – 2014. – С. 22–24. (Особистий внесок здобувача: виділення та оцінка кількості і якості ДНК із 86 листкових пластинок рослин з шести популяцій, проведення ПЛР з 6 парами RGAP-праймерів та гель-електофорезу, опрацювання результатів дослідження, написання тексту тез).

АНОТАЦІЯ

Мосула М.З. Популяційно-генетичний аналіз тирличу жовтого (*Gentiana lutea* L.) з Українських Карпат. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.15 – генетика. – Інститут клітинної біології та генетичної інженерії НАН України, Київ, 2015.

Дисертаційну роботу присвячено дослідженню стану *Gentiana lutea* L. з Українських Карпат на основі вивчення рівня генетичного поліморфізму його популяцій та обґрунтуванню підходу до збереження цього виду.

Встановлено рівень генетичної різноманітності популяцій *G. lutea* з двох гірських масивів (Чорногора, Свидовець) Українських Карпат з використанням п'яти типів ДНК-маркерів (RAPD, ISSR, RGAP, CDDP, IRAP). На основі аналізу генетичної структури популяцій та співставлення отриманих результатів з їх екологічними характеристиками (площа, щільність, вікова, просторова та віталітетна структури, здатність до відновлення і самопідтримання) оцінено стан популяцій цього виду, що дало змогу встановити необхідність їх відновлення. Розроблено рекомендації щодо охорони та збереження популяцій *G. lutea*. Підібрано ефективний показник інформативності праймерів, призначених для оцінки рівня генетичної різноманітності, та розроблено систему ПЛР-праймерів з метою оптимізації дослідження генофонду популяцій *G. lutea*.

Ключові слова: *Gentiana lutea* L., генетична структура, генетична різноманітність, диференціація популяцій, стан популяцій, ДНК-маркери, розпізнавальна здатність (D_L), система ПЛР-праймерів.

АННОТАЦИЯ

Мосула М.З. Популяционно-генетический анализ горечавки желтой (*Gentiana lutea* L.) с Украинских Карпат. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.15 – генетика. – Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев, 2015.

Выполнено молекулярно-генетическое исследование генофонда пяти природных и одной интродуцированной популяций *G. lutea* с двух хребтов (Чорногора, Свидовець) Украинских Карпат. Оценено генетическое разнообразие популяций с использованием различных типов ДНК-маркеров (RAPD, ISSR, RGAP, CDDP, IRAP) и определены генетические расстояния между популяциями. Выяснено, что для *G. lutea* характерен относительно высокий уровень изменчивости, однако он не выходит за пределы, наблюдаемой и для других представителей семейства *Gentianaceae*. Значения основных параметров генетического разнообразия (P , H_e , S , D_j) по RGAP-и CDDP-маркерам были более низкими по сравнению с другими использованными маркерами, что обусловлено разной интенсивностью действия отбора на исследованные участки ДНК.

Изучение общего генетического разнообразия свидетельствует о

преобладание межпопуляционных различий (65%) над внутривидовыми (35 %), что указывает на изоляцию и генетическую дивергенцию популяций *G. lutea*. Не выявлено корреляций как между генетическими и географическими расстояниями популяций этого вида, так и между показателями генетического разнообразия и численностью популяций.

При оценке состояния популяций *G. lutea* учитывали не только параметры генетического разнообразия, но и особенности экологических характеристик. Результаты комплексного анализа популяции этого вида позволили распределить их между тремя группами: стабильными (пол. Лемская, гг. Шешул-Павлик, г. Пожижевская), относительно стабильными (г. Гутин Томнатик), нестабильными (пол. Крачунеска, гг. Трояска-Татарука). Выяснено, что для природных популяций изучаемого вида с хр. Черногора характерны более высокие показатели генетического разнообразия, по сравнению с популяциями с Свидовецкого массива Украинских Карпат. Это, очевидно, обусловлено спецификой воздействия на популяции определенного фактора (или их совокупности), отличиями фитогеографического поля, способов размножения и групповых характеристик популяций. Результаты популяционно-генетического исследования свидетельствуют о необходимости восстановления локалитетов на пол. Крачунеска, а также между горами Трояска и Татарука (хр. Свидовец).

Разработаны рекомендации, касающиеся не только охраны, но и сохранения *G. lutea* в Украинских Карпатах. Учитывая результаты эколого-генетического анализа, предлагаем использовать популяции с пол. Лемская и гг. Шешул-Павлик, которые характеризуются более высокими показателями генетического разнообразия и относятся к процветающим, в качестве исходного материала для переноса их диаспор в другие популяции либо для создания промежуточных популяций. Это позволит увеличить генетическую гетерогенность и повысить стабильность подобных популяций.

Подобраны эффективные показатели информативности праймеров для оценки генетического полиморфизма. Выяснено, что опознавательная способность (D_L) является эффективным показателем, наиболее полно учитывающим особенности распределения полиморфных ампликонов среди исследованных образцов. При этом ISSR-маркеры оказались более информативными, а RAPD-маркеры – менее.

Разработана система молекулярно-генетических праймеров для оценки генетического полиморфизма *G. lutea*. Эта система включает 12 ПЦР-праймеров: 5 ISSR-, 4 RAPD-, 2 CDDP-и 1 IRAP-праймер и разрешает быстро и эффективно исследовать генетический полиморфизм популяций *G. lutea*, а также является менее дорогостоящей. Выяснено, что для экспресс-оценки генетического разнообразия популяций достаточно использовать минимальный набор праймеров, количество которых (от 3 до 6) зависит от размера выборки и степени дифференциации популяций. Остальные праймеры со значениями D_L выше 0,8 могут быть использованы для теоретических и прикладных экогенетических исследований.

Разработаны генетические основы сохранения вида рода Горечавка *G. lutea*; подходы к оценке состояния популяций и выделения стабильных,

относительно стабильных и нестабильных популяций; *система* генетических маркеров для оценивания генетического полиморфизма и генетической структуры популяций *G. lutea*; *принципы* оптимизации исследования генофонда популяций *G. lutea*.

Ключевые слова: *Gentiana lutea* L., генетическая структура, генетическое разнообразие, дифференциация популяций, состояние популяций, ДНК-маркеры, опознавательная способность (D_L), система ПЦР-праймеров.

SUMMARY

Mosula M.Z. Population-genetic analysis of yellow gentian (*Gentiana lutea* L.) from the Ukrainian Carpathians. – Manuscript.

Thesis for the degree of candidate of biological sciences by speciality 03.00.15 – Genetics. Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2015.

The thesis is devoted to the investigation of *Gentiana lutea* L. status from the Ukrainian Carpathians by studying the level of genetic polymorphism and substantiation of approaches to conservation of this species.

The features of genetic structure and level of diversity have been investigated for *G. lutea* populations from the two mountain chains of the Ukrainian Carpathians using five types of DNA-based markers (RAPD, ISSR, RGAP, CDDP, IRAP). Based on the analysis of the populations' genetic structure and comparison of these results with ecological characteristics (area, density, age, spatial and vitality structure, ability of renewal and self-maintenance) the status of species populations has been assessed. Thus, the necessity of their renewal has been established. The recommendations for the protection and conservation of *G. lutea* populations have been developed. The effective indicator of the primers informativeness has been selected with intention to evaluate the level of populations' genetic diversity. The system of PCR-based primers has been worked out in order to optimize the study of gene pools of *G. lutea* populations.

Key words: *Gentiana lutea* L., genetic structure, genetic diversity, differentiation of populations, populations' status, DNA-markers, discriminating power (D_L), the system of PCR-based primers.