

ISSR АНАЛИЗ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ УЗКОЛИСТНЫХ ОВСЯНИЦ

И.А. БЕДНАРСКАЯ¹, В.Н. ПОПОВ², Ю.Н. ДУГАРЬ³, Г.Е. АКИНИНА², Т.А. ДОЛГОВА³

¹ Институт экологии Карпат НАН Украины, Львов

² Институт растениеводства им. В.Я. Юрьева, Харьков

E-mail: vnpor@mail.ru

³ Харьковский национальный аграрный университет им. В.В. Докучаева

Изучали генетические взаимоотношения между популяциями различных видов узколистных овсяниц — *F. macutrensis*, *F. rupicola*, *F. arietina*, *F. valesiaca*, *F. pallens*, *F. psammophila* и *F. brevipila* с использованием ISSR анализа. Уровень полиморфизма ISSR локусов у овсяниц в среднем составил 92,9 %. Выявлен видоспецифичный ампликон для *F. valesiaca*, а также идентифицирован общий фрагмент для двух близкородственных видов — *F. pallens* и *F. psammophila*. На основании данных NJ анализа подтверждена дифференциация видов на такие крупные агрегаты, как *F. glauca* agg. и *F. valesiaca* agg. Показана также более четкая дифференциация видов в пределах *F. glauca* agg., тогда как для видов агрегата *F. valesiaca* agg. не удалось установить четкие закономерности генетических взаимоотношений между его представителями.

Ключевые слова: *F. valesiaca* agg., *F. glauca* agg., ISSR, полиморфизм.

Введение. Род *Festuca* является одним из самых крупных и самых сложных родов семейства *Poaceae*. Согласно последней общей сводке флоры Европы описано 170 видов овсяниц, однако вопрос объема рода и таксономического ранга многочисленных его представителей, особенно среди узколистных овсяниц, до сих пор является дискуссионным [1]. В первую очередь это связано с фрагментарностью самих исследований по филогении рода *Festuca*, проведенных с использованием различных методик.

Это не позволяет объективно оценить амплитуду изменчивости видов, выяснить ее причины, оценить дискретность видов, их дифференциацию в различных частях ареала произрастания видов. Так, в ходе ревизии рода *Festuca* во флоре Украины и Беларуси нами выявлены существенные расхождения между различными европейскими научными школами как в трактовке отдельных таксонов, так и по методическим подходам, что во многих случаях

сделало невозможным равноценное сравнение различных данных между собой [2, 3].

В современной систематике растений альтернативой традиционным методам сравнительной морфологии являются методы молекулярной генетики [4, 5]. И хотя в научном сообществе продолжается дискуссия между классическими систематиками и геносистематиками относительно понимания объемов и критериев видов, для разрешения спорных вопросов невозможно обойтись без комплексного подхода, который позволил бы критически пересмотреть спорные таксономические группы и филогенетические взаимоотношения между ними.

Молекулярно-генетические исследования рода *Festuca* в основном посвящены широколиственным видам овсяниц (например, *F. pratensis* Huds., *F. arundinacea* Schreb., *F. mairei* St. Yves) и их гибридам с видами рода *Lolium* L. [6–17]. Узколистные же виды овсяниц на сегодняшний день остаются малоизученными в силу сложности идентификации их классическими методами. Только незначительное число работ посвящено применению ДНК маркеров для установления филогенетических взаимоотношений между некоторыми представителями узколистных овсяниц [18–20].

Во флоре Украины представлено около 20 видов узколистных овсяниц, которые по основным диагностическим признакам анатомического строения листка можно разделить на четыре больших агрегата: *F. ovina* agg., *F. rubra* agg., *F. valesiaca* agg. и *F. glauca* agg. Последние два агрегата являются наиболее сложными в области систематики рода. В связи с этим целью нашей работы было изучение генетических взаимоотношений между популяциями видов узколистных овсяниц, принадлежащих *F. valesiaca* agg. и *F. glauca* agg.

Материалы и методы. Растительный материал. Для исследования были взяты 30 популяций различных перекрестноопыляемых видов

рода *Festuca* (табл. 1), которые принадлежат двум видовым агрегатам: *F. valesiaca* agg. (*F. macutrensis* Zapal., *F. rupicola* Heuff., *F. arietina* Klok., *F. valesiaca* Schleich. ex Gaud.) и *F. glauca* agg. (*F. pallens*, *F. psammophila*). Каждый из агрегатов по возможности был представлен максимальным количеством видов, которые репрезентуют различные регионы Украины и частично Беларуси. В исследовании также использовали *F. brevipila* Tracey (синоним *F. trachyphylla* (Hack.) Krajina), занимающий промежуточное положение между упомянутыми агрегатами. Предварительное изучение и идентификация по-

пуляций видов рода *Festuca* проведены методами сравнительной морфологии и анатомии [2].

Выделение ДНК и проведение ПЦР. ДНК выделяли из смеси 15 семян СТАБ-методом [21]. Для проведения ПЦР использовали 11 праймеров с закоренными нуклеотидами на 3'-конце к микросателлитным последовательностям (табл. 2).

Аmplификацию ДНК проводили в пробирках с лиофилизированным набором реактивов для ПЦР (GenePak PCR core) в амплификаторе «Терцик» (Россия). Конечный объем реакционной смеси составил 20 мкл и содержал 20 нг

Таблица 1. Представители рода *Festuca* L., использованные в исследовании

№ п/п	LWKS	Вид	Географический регион
1	7962	<i>F. macutrensis</i>	Львовская обл., Золочевский р-н, с. Красне
2	1В-1166	<i>F. macutrensis</i>	Львовская обл., Бродовский р-н, с. Суховоля
3	1В-670	<i>F. macutrensis</i>	Житомирская обл., Житомирский р-н, с. Сингуры
4	1В-763	<i>F. macutrensis</i>	Житомирская обл., Коростышевский р-н, с. Большие Кошарища
5	1В-246	<i>F. macutrensis</i>	Тернопольская обл., Бережанский р-н, восточная окраина с. Гутиско
6	1В-1157	<i>F. rupicola</i>	Львовская обл., Пустомытовский р-н, юго-восточные окраины с. Подтемное
7	1В-188	<i>F. rupicola</i>	Ивано-Франковская обл., Галицкий р-н, окр. с. Межигорцы
8	7107	<i>F. rupicola</i>	Тернопольская обл., Боршевский р-н, окр. с. Синьков
9	1В-1460	<i>F. arietina</i>	Черкасская обл., Каневский р-н, с. Леплява
10	1В-1461	<i>F. arietina</i>	Черкасская обл., Каневский р-н, с. Леплява
11	1В-1444	<i>F. arietina</i>	Беларусь. Гомельская обл., Ветковский р-н, окр. с. Новоселки
12	1В-1506	<i>F. arietina</i>	Беларусь, Калинковичский р-н, с. Юровичи. Коренной берег р. Припять
13	8992	<i>F. rupicola</i>	Львовская обл., Золочевский р-н, окр. с. Липица
14	1В-243	<i>F. macutrensis</i>	Ивано-Франковская обл., Рогатинский р-н, с. Яглуш
15	8896а	<i>F. macutrensis</i>	Ивано-Франковская обл., Галицкий р-н, окр. с. Подолье
16	8492а	<i>F. macutrensis</i>	Тернопольская обл., г. Кременец
17	1В-369	<i>F. valesiaca</i>	Тернопольская обл., Подволочиский р-н, с. Галушинцы
18	1В-370	<i>F. rupicola</i>	Тернопольская обл., Подволочиский р-н, с. Галушинцы
19	1В-367	<i>F. rupicola</i>	Тернопольская обл., Залещицкий р-н, с. Устечко
20	1В-928	<i>F. valesiaca</i>	Донецкая обл., Володарский р-н, с. Назаровка
21	1В-965	<i>F. valesiaca</i>	Донецкая обл., Володарский р-н, окр. с. Старченково
22	1В-927	<i>F. valesiaca</i>	Донецкая обл., Володарский р-н, с. Назаровка
23	1В-896	<i>F. pallens</i>	Тернопольская обл., Кременецкий р-н, г. Кременец
24	08492	<i>F. pallens</i>	Тернопольская обл., Кременецкий р-н, окр. г. Кременец
25	1В-1167	<i>F. pallens</i>	Тернопольская обл., Кременецкий р-н, с. Куликов
26	08484	<i>F. psammophila</i>	Львовская обл., Яворовский р-н, с. Страдч
27	1В-1479	<i>F. psammophila</i>	Беларусь; Гродненская обл., предместье г. Гродно, д. Пышки
28	1В-1465	<i>F. psammophila</i>	Беларусь; Брестская обл., Малоритский р-н, 10 км на юго-восток от с. Томашовка
29	1В-1164	<i>F. psammophila</i>	Львовская обл., Золочевский р-н, северо-западная окраина с. Хмелевая
30	8459	<i>F. brevipila</i>	Волынская обл., Турыйский р-н, окр. с. Овлочин

ДНК и 0,2 мкМ праймера. ПЦР осуществляли в следующем режиме: начальная денатурация – 4 мин при 94 °С; последующие 40 циклов с такими параметрами: денатурация – 45 с при 94 °С, отжиг праймера – 45 с при 52 °С, элонгация – 45 с при 72 °С; конечная элонгация – 7 мин при 72 °С.

Разделение продуктов амплификации проводили методом горизонтального электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Электродный буфер использовали с низкой ионной силой [22]. Визуализацию продуктов амплификации осуществляли при помощи трансиллюминатора TCP-20МС с последующим фотографированием гелей. В качестве маркера молекулярной массы для определения размеров амплифицированных фрагментов использовали 1 kb DNA ladder.

Молекулярную массу продуктов амплификации вычисляли при помощи демоверсии программного пакета «TotalLab TL120» (<http://www.totallab.com>).

Статистическая обработка данных. По результатам анализа на основе выявленных ампликонов с помощью 11 ISSR праймеров составили бинарную матрицу. В матрице присутствие ампликона обозначалось цифрой 1, отсутствие – 0. Каждую ISSR полосу рассматривали как отдельный генетический локус. Уровень полиморфизма определяли как соот-

ношение полиморфных локусов к общему числу выявленных локусов, детектируемых с использованием каждого праймера, и выражали в процентах. Анализ генетического разнообразия осуществляли с помощью вычисления генетических расстояний по Nei и Li [23]. Для изучения генетических взаимоотношений между видами рода *Festuca* строили дендрограмму методом ближайших соседей (Neighbor-joining, NJ). Достоверность дендрограммы проверяли бутстреп-анализом при 1000 повторностях. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ «PHYLIP-3.69».

Результаты исследований и их обсуждение. Для изучения молекулярно-генетического полиморфизма видов рода *Festuca* использовали 11 ISSR праймеров, состоящих из коротких тандемных динуклеотидных повторов, которые на 3'-конце имели 1–2 заякоренных нуклеотида (табл. 2). Каждый праймер ограничивает межмикросателлитные участки ДНК, и в результате амплификации геномной ДНК растений удается получать высокополиморфные и хорошо воспроизводимые ампликоны [24]. На рис. 1 представлен пример амплификации ДНК узколистных видов овсяниц с праймером ISSR 842.

Указанные в табл. 2 праймеры при амплификации с геномной ДНК изучаемых популяций видов рода *Festuca* выявляли разные коли-

Таблица 2. Характеристика праймеров и ISSR фрагментов

Праймер	Последовательность праймера	Общее количество фрагментов, шт.	Полиморфные фрагменты, шт.	Полморфизм, %	Размер фрагментов, п.н.
ISSR 4	(CT) ₈ TG	20	19	95,0	402–2026
ISSR 5	(CA) ₈ AC	13	9	69,2	344–1364
ISSR 807	(AG) ₈ T	26	26	100,0	250–1502
ISSR 810	(GA) ₈ T	13	12	92,3	240–1464
ISSR 812	(GA) ₈ A	23	23	100,0	272–1590
ISSR 825	(AC) ₈ T	13	12	92,3	350–1554
ISSR 826	(AC) ₈ C	15	12	80,0	357–1166
ISSR 834	(AG) ₈ CT	30	30	100,0	360–1900
ISSR 842	(GA) ₈ TG	24	22	91,7	280–1547
ISSR 847	(CA) ₈ AC	15	13	86,7	308–1110
ISSR 857	(AC) ₈ CG	19	18	94,7	386–1360
Среднее		19,2	17,8	92,9	–
Всего		211	196	–	–

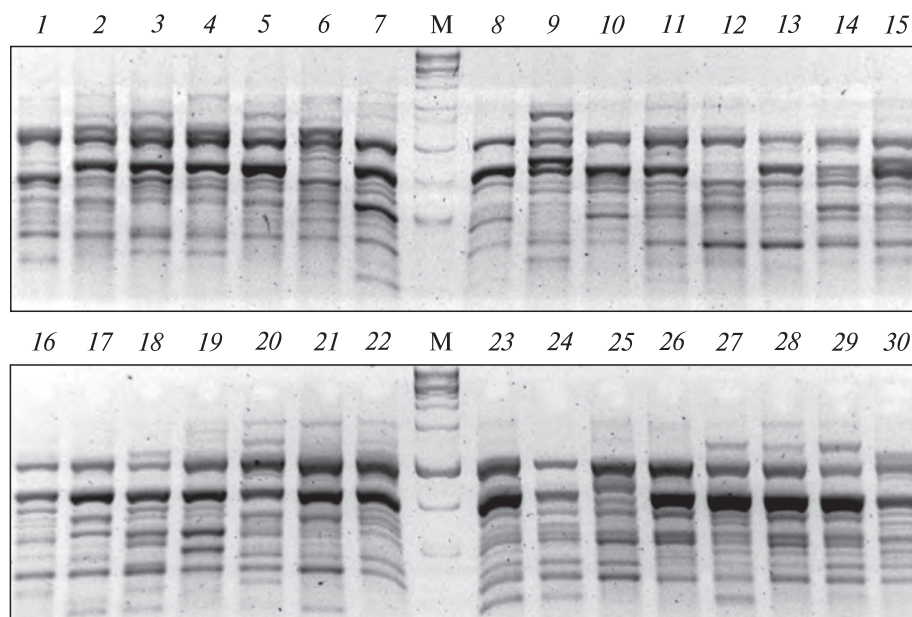


Рис. 1. Электрофоретические спектры ISSR фрагментов семи видов узколистных овсяниц (праймер ISSR 842): М – маркер молекулярной массы 1 kb ladder. 1–5, 14–16 – *F. macutrensis*; 6–8, 13, 18, 19 – *F. rupicola*; 17, 20–22 – *F. valesiaca*; 23–25 – *F. pallens*; 26–29 – *F. psammophila*; 30 – *F. brevipila*

чества ампликонов, которыми эти популяции отличались друг от друга. Количество амплифицируемых фрагментов ДНК варьировало от 13 до 30. Минимальное количество фрагментов идентифицировалось с использованием праймеров ISSR 5, ISSR 810 и ISSR 825, а максимальное – при амплификации ДНК с праймером ISSR 834. В среднем количество синтезированных ампликонов на один использованный праймер составило 19,2. Всего для отобранных популяций, представленных семью видами узколистных овсяниц, идентифицировано 211 четко воспроизводимых ампликонов. Размер ДНК фрагментов варьировал в широких пределах – от 240 до 2026 пн. Минимальный и максимальный размер продуктов детектировался с применением праймеров ISSR 810 и ISSR 4 соответственно (табл. 2).

Использование 11 праймеров позволило идентифицировать 196 полиморфных ISSR фрагментов из 211 проанализированных ампликонов. С использованием праймеров ISSR 807, ISSR 812 и ISSR 834 детектировался 100%-ный полиморфизм. Самый низкий уровень полиморфизма (69,2 %) отмечен с использованием праймера ISSR 5. В среднем уровень полимор-

физма ISSR локусов, выявляемый с помощью 11 праймеров, составил 92,9 %, что является достаточно высоким показателем, зависящим не только от нуклеотидного состава праймеров, но и от вида тестируемых растений.

Для *F. valesiaca* определен видоспецифичный мономорфный фрагмент размером ~ 740 пн. (праймер ISSR 4), который присутствовал во всех изученных популяциях этого вида (рис. 2). Кроме того, выявлен специфичный мономорфный фрагмент размером ~ 1120 пн., характерный для популяций двух близкородственных видов *F. pallens* и *F. psammophila*. Этот фрагмент представляет интерес для проведения дальнейших молекулярных исследований с помощью установления его нуклеотидного состава в геномах *F. pallens* и *F. psammophila* для окончательного разрешения дискуссий о целесообразности рассмотрения последнего в ранге самостоятельного вида и, соответственно, его представленности во флорах Украины и Беларуси [3]. Для остальных видов узколистных овсяниц видоспецифичные фрагменты не обнаружены.

При анализе электрофореграмм, помимо видоспецифичных фрагментов, удалось выявить специфичные фрагменты для некоторых популя-

ций определенного вида узколистных овсяниц. Всего идентифицировали 40 таких ампликонов, что в относительных единицах составило 18,9 % общего количества выявленных фрагментов. Количество таких фрагментов у изученных видов варьировало от 2 до 10. Наименьшее число специфических фрагментов идентифицировано для популяций *F. arietina* и *F. valesiaca*. Наибольшим числом специфических ампликонов характеризовались спектры образцов вида *F. psammophila*. Для популяций *F. macutrensis*, *F. rupicola* и *F. pallens* также детектировано 9, 7 и 6 специфических фрагментов амплификации соответственно.

Для оценки генетических взаимоотношений между изученными образцами узколистных овсяниц определяли генетические расстояния по Nei и Li [23]. Полученные значения генетических дистанций варьировали от 0,003 до 0,015. Минимальное значение выявлено для пары из популяции *F. psammophila* (выборки 28 и 29), тогда как максимальное — между популяциями *F. arietina* и *F. pallens* (выборки 11 и 24 соответственно).

Для построения филогенетического дерева методом ближайших соседей (NJ) обрабатывали матрицу генетических дистанций, рассчитанных по алгоритму Nei и Li [23]. В NJ методе для построения дерева используется внешняя группа, в качестве которой мы выбрали *F. brevipila*, занимающего по анатомо-морфологическим признакам промежуточное положение между *F. valesiaca* agg. и *F. glauca* agg. Использование внешней группы позволяет получить топологию дерева, отражающую наиболее вероятное родство между биологическими объектами [25].

На полученной дендрограмме изучаемые образцы узколистных овсяниц объединились в две четко обособленные клады, представляющие виды двух агрегатов — *F. glauca* agg. (клада А) и *F. valesiaca* agg. (клада Б) (рис. 3).

Группирование популяций *F. pallens* и *F. psammophila* в единую кладу А свидетельствует о том, что эти виды являются близкородственными с вероятным происхождением от одной гибридной комбинации, потомки которых приспособились к разным экологическим условиям произрастания. Аналогичные результаты получены Šmarda et al. [20] при использовании

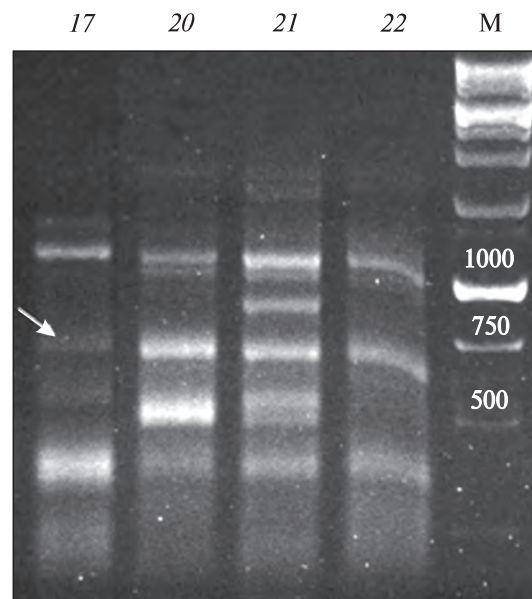


Рис. 2. Электрофоретические спектры ISSR фрагментов (праймер ISSR 4), характерные для *F. valesiaca*: М — маркер молекулярной массы 1 kb ladder. Стрелкой показан характерный для представителей *F. valesiaca* мономорфный фрагмент

AFLP маркеров, которые также подтверждают близкородственные отношения между *F. pallens* и *F. psammophila*. Следует отметить, что эволюционные отношения между этими видами остаются спорными до сих пор.

В ранних работах исследователей указывается на невозможность возведения *F. psammophila* в ранг вида [26, 27]. Тем не менее экологические условия произрастания этих видов (например, *F. pallens* — ярко выраженный кальцефил и петрофит, в то время как *F. psammophila* — типичный пасмофит), а также анализ данных анатомического строения листка и молекулярно-генетических данных указывают на то, что *F. psammophila* можно классифицировать как отдельный вид. Для окончательного подтверждения существования вида *F. psammophila* необходим анализ других участков ядерной ДНК (например, ITS последовательности рибосомальных генов) или же хлоропластных генов, которые часто используют для разграничения близкородственных видов [28].

F. brevipila, занимающий по анатомо-морфологическим признакам промежуточное по-

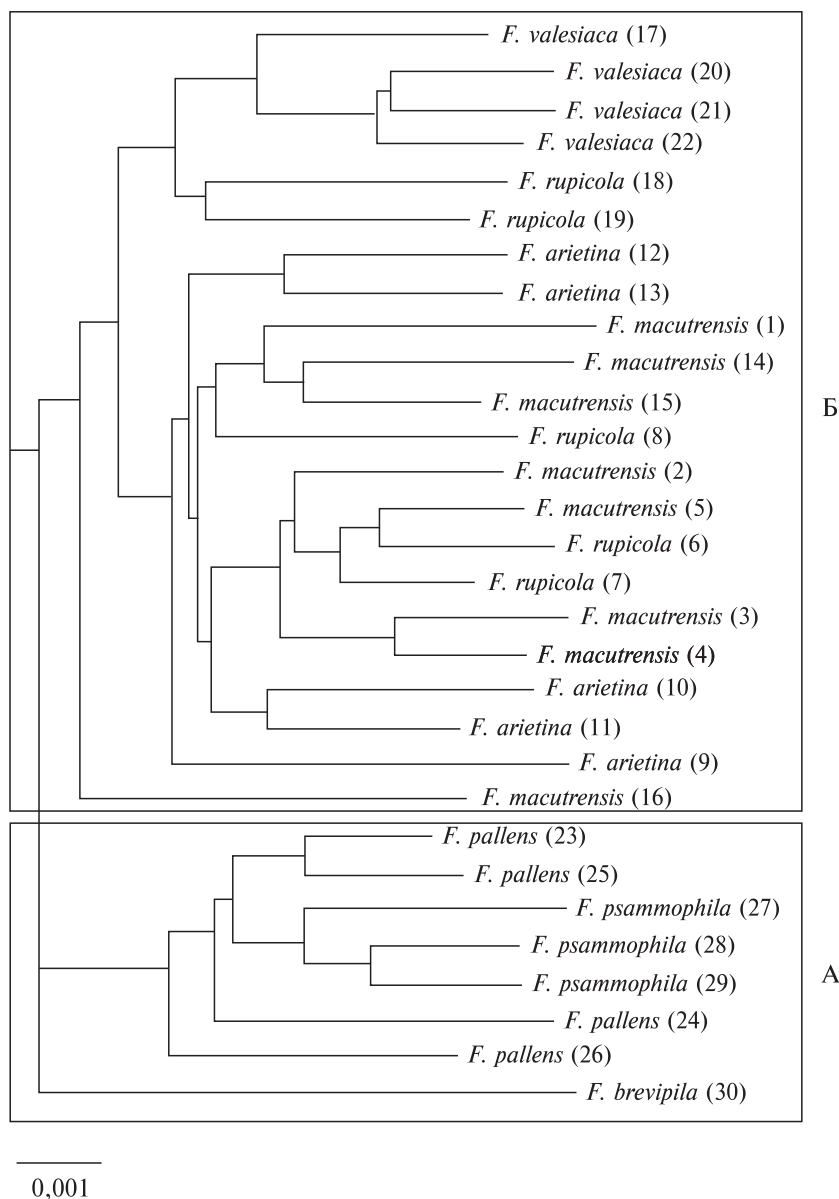


Рис. 3. Дендрограмма, полученная на основе сравнительного анализа амплифицированных ISSR фрагментов представителей семи видов узколистных овсяниц

ложение между *F. valesiaca* agg. и *F. glauca* agg., также вошел в кладу А, и можно предположить, что этот вид генетически ближе находится к видам агрегата *F. glauca* agg.

В пределах клады Б наиболее четко обособленными выявились популяции *F. valesiaca*, которые сформировали отдельную группу. Популяции остальных видов узколистных овсяниц

образовали недостаточно дифференцированную гетерогенную группу. На представленной дендрограмме популяции *F. arietina*, *F. macutrensis* и *F. rupicola* перемеживаются между собой без формирования четких групп. В ряде случаев наблюдается обособленное расположение единичных популяций, например, популяций 9 (*F. arietina*) и 16 (*F. macutrensis*) (рис. 2). При этом

между некоторыми популяциями, отобранными из одного географического региона, выделено существенное генетическое подобие. Так, у *F. macutrensis* объединяются вместе популяции 3 и 4, отобранные в Житомирской области, а также популяции 14 и 15, взятые в Ивано-Франковской области. Генетическое сходство обнаружено также между популяциями 10 и 11 *F. arietina*, отобранными в географических регионах Украины и Беларуси.

Оценка неслучайного характера топологии полученного дерева подверглась бутстреп-анализом. Объединение в группы популяций видов узколистных овсяниц в согласованном дереве совпадает с исходным деревом, однако бутстреп-поддержка некоторых узлов была ниже 50 %, что теоретически может приводить к иному группированию образцов в пределах кластера. Тем не менее представленные нами результаты распределения образцов узколистных видов овсяниц являются наиболее вероятными.

Сопоставление наших данных с ранее полученными результатами не позволило дать четкий ответ о закономерностях генетического взаимоотношения между *F. macutrensis*, *F. rupicola* и *F. arietina*. Причиной этого может быть наличие нечетких границ между видами в результате их возможной гибридизации между собой и последующим образованием промежуточных форм растений. В связи с этим определенные дискуссионные вопросы относительно этих видов, которые не были разрешены методом сравнительной анатомии и морфологии, также остались не решенными и при вовлечении в настоящее исследование ISSR маркеров.

Таким образом, в нашем исследовании использование ISSR маркеров позволило четко разграничить два агрегата — *F. glauca* agg. и *F. valesiaca* agg. В пределах первого агрегата также выявлена достаточная дифференциация *F. pallens* и *F. psammophila*. Отсутствие четкой группировки видов по отдельным кластерам среди *F. valesiaca* agg., за исключением образцов самой *F. valesiaca* s.str., свидетельствует о необходимости вовлечения в дальнейший анализ как большего количества самих видов, так и использования альтернативных методов молекулярно-генетического анализа. Тем не менее, выявленный высокий уровень молекулярно-генетического полиморфизма геномов узколи-

стных овсяниц делает ISSR анализ весьма перспективным для установления генетических различий между популяциями отдельных видов.

ISSR ANALYSIS OF SOME SPECIES OF ANGUSTIFOLIATE FESCUE

I.A. Bednarskaya, V.N. Popov, Yu.N. Dugar, G.E. Akinina, T.A. Dolgova

Institute of Carpathian Ecology, Lviv
Plant production institute after named V.Ya. Yurjev
E-mail: vnpop@mail.ru
Kharkiv National Agrarian University
after named V.V. Dokuchaev

Using ISSR analyses genetic relationships were studied between the populations of the next species of angustifoliate fescue: *F. macutrensis*, *F. rupicola*, *F. arietina*, *F. valesiaca*, *F. pallens*, *F. psammophila* and *F. brevipila*. High level of ISSR loci polymorphism (average 92,9 %) was shown. The species specific amplicon was revealed for *F. valesiaca* as well as the common fragment was identified for two related species — *F. pallens* and *F. psammophila*. On the basis of NJ analyses the differentiation of species was confirmed on such large aggregates as *F. glauca* agg. and *F. valesiaca* agg. More clear differentiation of the species was shown for *F. glauca* agg., while for *F. valesiaca* agg. we have not found any regularity of genetic relations among the species that represent this aggregate.

ISSR АНАЛІЗ ДЕЯКИХ ВИДІВ ВУЗЬКОЛИСТНИХ КОСТРИЦЬ

I.O. Беднарська, В.М. Попов, Ю.М. Дугарь, Г.Є. Акініна, Т.А. Долгова

Вивчено генетичні взаємовідносини між такими видами вузьколистных костриць: *F. macutrensis*, *F. rupicola*, *F. arietina*, *F. valesiaca*, *F. pallens*, *F. psammophila* и *F. brevipila* з використанням ISSR аналізу. Рівень поліморфізму ISSR локусів у костриць в середньому склав 92,9 %. Виявлено видоспецифічний амплікон для *F. valesiaca*, а також ідентифіковано загальний фрагмент для двох близькоспоріднених видів — *F. pallens* и *F. psammophila*. ISSR аналіз підтвердив диференціацію видів на такі великі агрегати, як *F. glauca* agg. та *F. valesiaca* agg. На підставі даних NJ аналізу показано більш чітку диференціацію видів в межах *F. glauca* agg., тоді як для видів агрегату *F. valesiaca* agg. не встановлено чіткої закономірності генетичних взаємовідносин між його представниками.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Markgraf-Dannenberg I. Festuca L. // Flora Europaea. — Cambridge: Univ. press. — 1980. — 5. — P. 125–153.

2. Беднарська І.О. Рід *Festuca* (Poaceae) у флорі західних регіонів України : Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2009. – 21 с.
3. Беднарська І.О. Види збірної групи *Festuca glauca* agg. у флорі України // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. – 2003. – Вип. 33. – С. 27–41.
4. Антонов А.С. Основы геносистематики высших растений. – М.: Наука, 2000. – 135 с.
5. Лухтанов В.А., Кузнецова В.Г. Молекулярно-генетические и цитогенетические подходы к проблемам видовой диагностики, систематики и филогенетики // Журн. общ. биологии. – 2009. – 70. – С. 415–437.
6. Федоренко О.М., Грицких М.В., Малышева И.Е., Николаевская Т.С. Генетическое разнообразие островных природных популяций *Festuca pratensis* Huds.: RAPD-анализ // Генетика. – 2009. – 45. – С. 1287–1291.
7. Stammers M., Harris J., Evans G.M. et al. Use of random PCR (RAPD) technology to analyse phylogenetic relationships in the *Lolium/Festuca* complex // Heredity. – 1995. – 74. – P. 19–27.
8. Torrecilla P., Lopez Rodriguez J.A., Stancik D., Catalan P. Systematics of *Festuca* L. sects. *Eskia* Willk., *Pseudatropis* Kriv., *Amphigenes* (Janka) Tzvel., *Pseudoscariosa* Kriv. and *Scariosae* Hack. based on analysis of morphological characters and DNA sequences // Plant Syst. Evol. – 2003. – 239. – P. 113–139.
9. Bartos J., Sandve S.R., Kolliker R. et al. Genetic mapping of DArT markers in the *Festuca-Lolium* complex and their use in freezing tolerance association analysis // Theor. Appl. Genet. – 2011. – 122. – P. 1133–1147.
10. Namaganda M., Kare A.L., Friebe B., Heun M. AFLP-based differentiation of tropical African *Festuca* species compared to the European *Festuca* complex // Theor. Appl. Genet. – 2006. – 113. – P. 1529–1538.
11. Saha M.C., Cooper J.D., Mian M.A.R. et al. Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species // Theor. Appl. Genet. – 2006. – 113. – P. 1449–1458.
12. Gaut B.S., Tredway L.P., Kubik C. et al. Phylogenetic relationships and genetic diversity among members of the *Festuca-Lolium* complex (Poaceae) based on ITS sequence data // Plant Syst. Evol. – 2000. – 224. – P. 33–53.
13. Hand M.L., Cogan N.O., Stewart A.V., Forster J.W. Evolutionary history of tall fescue morphotypes inferred from molecular phylogenetics of the *Lolium-Festuca* species complex // BMC Evol. Biol. – 2010. – 10. – P. 303.
14. Kopecký D., Bartoš J., Lukaszewski A.J. et al. Development and mapping of DArT markers within the *Festuca-Lolium* complex // BMC Genom. – 2009. – 10. – P. 473.
15. Tehrani M.S., Mardi M., Sahebi J. et al. Genetic diversity and structure among Iranian tall fescue populations based on genomic-SSR and EST-SSR marker analysis // Theor. Appl. Genet. – 2000. – 100. – P. 384–390.
16. Pääkinskiene I., Griffiths C.M., Bettany A.J.E. et al. Anchored simple-sequence repeats as primers to generate species-specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses // Plant Syst. Evol. – 2009. – 282. – P. 57–70.
17. Wang J.P., Bughrara S.S., Mian R.M.A. et al. Parental genome composition and genetic classifications of derivatives from intergeneric crosses of *Festuca mairei* and *Lolium perenne* // Mol. Breed. – 2009. – 23. – P. 299–309.
18. Foggi B., Parolo G., Šmarda P. et al. Revision of the *Festuca alpina* group (*Festuca* section *Festuca*, Poaceae) in Europe // Bot. J. Linn. Soc. – 2012. – 170. – P. 618–639.
19. Foggi B., Gherardi M.E., Signorini M.A. et al. *Festuca inops* and *Festuca gracilior* (Poaceae): are they two different species? // Bot. J. Linn. Soc. – 2006. – 151. – P. 239–258.
20. Šmarda P., Smerda J., Knoll A. et al. Revision of Central European taxa of *Festuca* ser. *Psammophilae* Paulus: morphometrical, karyological and AFLP analysis // Plant Syst. Evol. – 2007. – 266. – P. 197–232.
21. Current protocols in molecular biology / Eds F.M. Ausubel, R. Brent, R.E. Kingston et al. – New York, 1987. – P. 4.3.1–4.3.3.
22. Brody J.R., Kern S.E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis // BioTechniques. – 2004. – 36. – P. 214–216.
23. Nei M., Li W.H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1979. – 76. – P. 5269–5273.
24. Reddy M.P., Sarla N., Siddiq E.A. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding // Euphytica. – 2002. – 128. – P. 9–17.
25. Schneider A., Cannarozzi G.M. Support patterns from different outgroups provide a strong phylogenetic signal // Mol. Biol. Evol. – 2009. – 26, № 6. – P. 1259–1272.
26. Алексеев Е.Б. Узколистные овсяницы (*Festuca* L.) Европейской части СССР // Новости систематики высших растений. – 1975. – 12. – С. 11–43.
27. Тверетинова В.В. Род *Festuca* L. // Злаки Украины. – К.: Наук. думка, 1977. – С. 265–320.
28. Шнеер В.С. ДНК-штрихкодирование – новое направление в сравнительной геномике растений // Генетика. – 2009. – 45, № 11. – С. 1436–1448.

Поступила 19.05.13