

ГЕНЕТИЧНИЙ ПОЛІМОРФІЗМ ПОПУЛЯЦІЙ *GENTIANA LUTEA* L. (GENTIANACEAE) З ЧОРНОГІРСЬКОГО МАСИВУ УКРАЇНСЬКИХ КАРПАТ

М.З. МОСУЛА¹, І.І. КОНВАЛЮК², В.М. МЕЛЬНИК²,
Н.М. ДРОБИК¹, Й.В. ЦАРИК³, Ю.Й. НЕСТЕРУК⁴, В.А. КУНАХ²

¹ Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка

E-mail: maryanamosula@gmail.com

² Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ

³ Львівський національний університет імені Івана Франка

⁴ Інститут екології Карпат НАН України, Львів

З використанням RAPD- та ISSR-ПЛР вивчено особливості генетичної структури та оцінено рівень мінливості популяцій *G. lutea* з гірського масиву Чорногора в Українських Карпатах. Встановлено високі показники рівня генетичної гетерогенності досліджених популяцій за цими ДНК-маркерами. На відмінності між популяціями припадає 59–72 % загальної генетичної мінливості, тоді як внутрішньопопуляційний поліморфізм становить 28–41 %. Припускається існування зв'язку між рівнем генетичної варіабельності та еколого-географічними умовами зростання виду і його біологічними особливостями. Отримані результати свідчать про генетичну ізоляцію чорногірських популяцій *G. lutea* в Українських Карпатах. Агропопуляція на горі Пожизжівська характеризувалась високим рівнем поліморфізму, що свідчить про можливість використання штучних насаджень цього виду з метою його збереження.

Ключові слова: *Gentiana lutea*, RAPD- та ISSR-маркери, між- і внутрішньопопуляційна мінливість, показники генетичного поліморфізму, генетична структура, диференціація популяцій.

Вступ. В Українських Карпатах проходить північно-східна межа природного поширення цінного реліктового виду – тирличу жовтого (*Gentiana lutea* L.), нерациональне використання якого призвело до зменшення його ареалу, небажаних змін структури популяцій, збіднення генофонду, зменшення сировинних запасів, а в деяких випадках – до повного зникнення зі складу флори деяких регіонів як в Українських Карпатах, так і в Європі в цілому [1–3].

Раніше популяція цього виду була широко розповсюдженою в Українських Карпатах, про що свідчить її ареал від Горган до Чивчинських

гір. Деякі автори припускають, що в минулому, коли існував єдиний карпатський пенеплен, не перерізаний рікою Тиса, була єдина велика популяція *G. lutea*, яка пізніше розпалася спершу на свидовецьку й чорногірську, а внаслідок пізніших антропогенних впливів – на ряд окремих локусів і фрагментів [1]. Нині збереглися лише кілька великих ізольованих локалітетів, найбільший з яких – Шешул площею біля 40 га на Чорногорі, а також невеликі фрагменти популяцій, розкидані на цьому та інших гірських масивах – Свидовці, Горганах, Мармарошах, Боржаві і Красній. На сьогодні популяції *G. lutea* суттєво відрізняються за чисельністю: від кількох десятків особин до кількох мільйонів [3].

З літератури відомо про взаємозв'язок між ефективною чисельністю популяції і процесами генетичного дрейфу та інбридингу: види з вузьким ареалом і невеликим числом особин характеризуються низьким рівнем генетичного поліморфізму. На генетичній структурі популяцій також повинні відобразитися значна неоднорідність ґрунтово-кліматичних і фітоценотичних умов зростання, маргінальне розташування та їхня ізольованість.

Раніше нами вже з'ясовано міжпопуляційний поліморфізм довжини 45S рДНК рослин *G. lutea* з різних місцезростань в Українських Карпатах [4]. Завданням даної роботи було вивчення особливостей генетичної структури і диференціації трьох різних за чисельністю чорногірських популяцій *G. lutea* Українських Карпат на основі RAPD- й ISSR-аналізу.

Матеріали і методи. Генетичну варіабельність *G. lutea* оцінювали на основі аналізу 45 зразків із трьох популяцій (по 15 рослин з кожної), розташованих між вершинами гір Шешул і Павлик (Sh), на полонині Лемська (Lem) та на

горі Пожижевська (Pozh) в Українських Карпатах. Чисельність особин у цих локалітетах становила близько 2 млн, 150 тис. і 10 тис. відповідно. Пожижевська популяція є штучно створеною (агропопуляція) із рослин шешульської у 70-х роках ХХ століття [5].

Виділення ДНК проводили згідно з стандартним протоколом із незначними змінами [6]. Якість і концентрацію ДНК оцінювали за допомогою гель-електрофорезу шляхом порівняння за інтенсивністю флуоресценції комплексів ДНК-бромистий етидид в УФ-променях із ДНК фага λ відомої концентрації [7]. Дослідження проводили методом ПЛР з використанням довільних праймерів (RAPD-ПЛР) та ПЛР ділянок геному, фланкованих інвертованими повторами мікросателітних локусів (ISSR-ПЛР). Протестовано 27 RAPD- та 13 ISSR-праймерів [8, 9], з яких 10 та 9 відповідно забезпечували синтез чітких відтворюваних ампліконів і були відібрані для подальших досліджень:

RAPD-праймери		ISSR-праймери	
A01	CAGGCCCTTC	UBC#807	(AG) ₈ T
A03	AGTCAGCCAC	UBC#809	(AG) ₈ G
A05	AGGGGTCTTG	UBC#810	(GA) ₈ T
A07	GAAACGGGTG	UBC#811	(GA) ₈ C
A13	CAGCACCCAC	UBC#827	(AC) ₈ G
A18	AGGTGACCGT	UBC#835	(AG) ₈ YC
A19	CAAACGTCGG	UBC#840	(GA) ₈ YT
B01	GTTTCGCTCC	UBC#857	(AC) ₈ YG
B07	GGTGACGCAG	UBC#889	DBD(AC) ₈
B08	GTCCACACGG		

Ампліфікацію здійснювали в термоциклері Терцик MC2 («Биотехнология», РФ). Реакційна суміш для проведення ISSR- та RAPD-ПЛР (об'єм 20 мкл) містила: 30 нг ДНК (ISSR), 20 нг ДНК (RAPD), 0,2 мМ dNTP, 1,25 U Taq-полімерази, 0,5 мкМ праймера, 1×ПЛР-буфер з 2,5 мМ MgCl₂. На реакційну суміш нашаровували 15 мкл мінеральної олії. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. Для ампліфікації фрагментів RAPD-ПЛР застосовували температурний режим: 94 °C – 2 хв, 5 циклів (94 °C – 30 с, 37 °C – 30 с, 72 °C – 1 хв), 35 циклів (94 °C – 20 с, 37 °C – 20 с, 72 °C – 40 с), 72 °C – 2 хв 30 с. ISSR-ПЛР проводили у такому режимі: 95 °C – 2 хв, 35 циклів (94 °C – 30 с, 53 °C – 30 с, 72 °C – 1 хв 30 с), 72 °C – 2 хв 30 с.

Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом в 1,3%-ному агарозному гелі в буфері 1×SB (5 мМ Na₂B₄O₇, рН 8,5) і візуалізували забарвленням бромистим етидидом. Електрофореграми представляли у вигляді бінарних матриць, на основі яких за допомогою програми FAMD 1.21 beta розраховано генетичні відстані Жакарда (D_j) [10] та методом незваженої парно-групової кластеризації (UPGMA) [11] побудовано дендрограму генетичної подібності досліджених зразків. Частку поліморфних ампліконів (P), індекс Шеннона (S), генну різноманітність He_i (очікувану гетерозиготність He) та генетичні відстані між популяціями за He_i розраховували із використанням програми GeneAlex 6.5 [12]. Розподіл загальної генетичної мінливості на міжпопуляційну та внутрішньопопуляційну визначали методом аналізу молекулярної дисперсії (AMOVA) [12].

Результати досліджень та їх обговорення. RAPD- та ISSR-праймери забезпечували ампліфікацію фрагментів у межах 250–3000 п.н. На рис. 1 представлено електрофореграми, що демонструють варіабельність профілів ПЛР-продуктів рослин з досліджених популяцій.

Для загальної вибірки рослин з усіх популяцій за результатами RAPD-аналізу отримано 202 фрагменти, ISSR-аналізу – 206, з яких 96,04 % і 93,69 % відповідно були поліморфними. Для окремих популяцій цей показник в середньому становив 30,05 % (RAPD-ПЛР) і 40,45 % (ISSR-ПЛР). Кількість унікальних ампліконів коливалася від 27 до 44, фіксованих – від 34

Таблиця 1. Значення основних показників генетичного

Популяція (місцезнаходження)	Враховано ампліконів, шт.		Фіксовані ампліконів, шт.		Унікальні ампліконів, шт.	
	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR
Полонина Лемська	111	123	34	35	44	32
Гори Шешул і Павлик	97	141	34	50	38	28
Гора Пожижевська	104	116	41	35	27	16
У середньому	104	127	36	40	36	25
Сумарна вибірка рослин	202	206	8	12	–	–

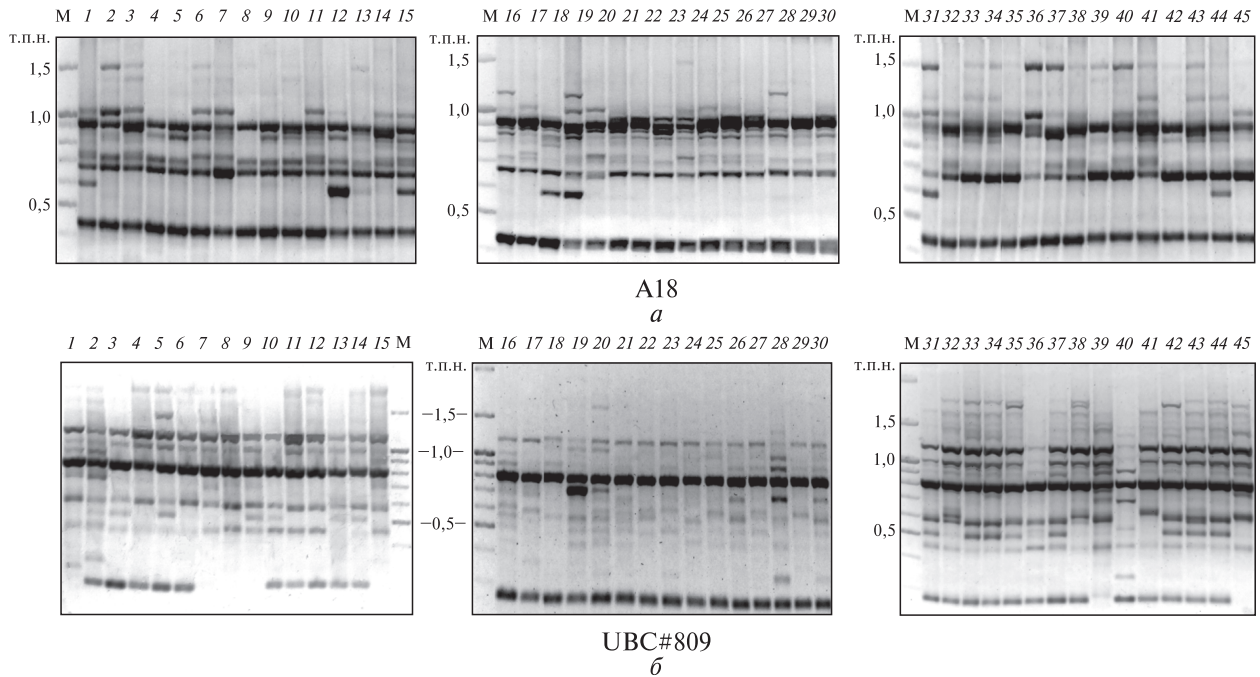


Рис. 1. RAPD- (а) та ISSR-спектри (б) ДНК досліджених зразків *G. lutea* (праймер А18 та UBC#809 відповідно): 1–15 – зразки Lem, 16–30 – зразки Pozh, 31–45 – зразки Sh; М – маркер молекулярних мас

до 41 для RAPD-аналізу і відповідно 16–32 та 35–50 для ISSR-аналізу.

На підставі отриманої бінарної матриці розраховали основні показники генетичного поліморфізму чорногірських популяцій *G. lutea* (табл. 1). Їх значення були досить високими і виявилися близькими для окремих популяцій. Встановлено, що показники генетичної різноманітності (P, He, S) вищі у випадку ISSR-

ПЛР та дещо нижчі для RAPD-ПЛР (за включенням значень P та S для сумарної вибірки рослин) (табл. 1).

Порівняння трьох досліджених популяцій з використанням двох типів молекулярно-генетичних маркерів показало подібність рівня генетичного поліморфізму популяцій. Показники, отримані на основі RAPD-ПЛР, були дещо вищими у випадку Lem і близькими за значен-

поліморфізму досліджених популяцій *G. lutea* за результатами RAPD- та ISSR-аналізу

Частка поліморфних ампліконів (P), %		Очікувана гетерозиготність (He)		Індекс Шенона (S)		Генетичні відстані між рослинами за Жакардом (D _j), %		Середня генетична відстань між рослинами за Жакардом (D _j), %	
RAPD	ISSR	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR	RAPD	ISSR
37,62	42,23	0,122 ± 0,012	0,145 ± 0,013	0,186 ± 0,018	0,218 ± 0,019	19,18–52,81	16,28–50,00	36,47	33,34
30,69	37,28	0,103 ± 0,012	0,151 ± 0,014	0,156 ± 0,018	0,225 ± 0,020	12,68–45,24	20,37–40,71	29,71	31,35
30,69	41,75	0,102 ± 0,012	0,116 ± 0,012	0,153 ± 0,018	0,178 ± 0,018	14,29–37,50	17,28–47,42	23,97	34,04
33,00	40,45	0,109 ± 0,007	0,138 ± 0,008	0,165 ± 0,010	0,207 ± 0,011	15,38–45,18	17,98–46,04	30,05	32,91
96,04	93,69	0,247 ± 0,010	0,399 ± 0,014	0,393 ± 0,014	0,257 ± 0,011	12,68–86,44	16,28–79,20	63,27	54,80

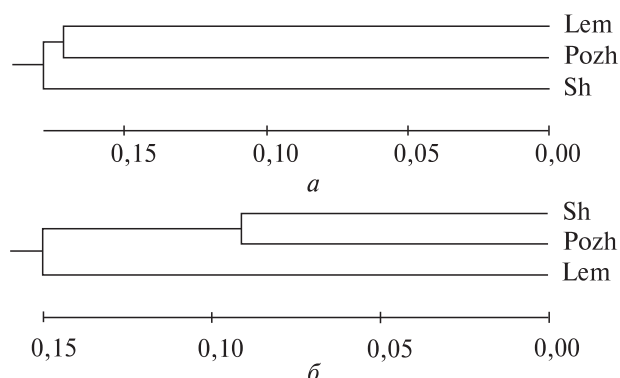


Рис. 2. Дендрограми генетичних відстаней між популяціями *G. lutea*, побудовані методом UPGMA за генетичними відстанями H_e на основі даних RAPD- (а) та ISSR-аналізу (б)

Таблиця 2. Генетичні дистанції за H_e між популяціями *G. lutea*, розраховані за результатами RAPD- (зліва під діагоналлю) та ISSR-аналізу (справа над діагоналлю)

Популяція	Полонина Лемська	г. Пожижевська	г. Шешул і Павлик
Полонина Лемська		0,264	0,336
г. Пожижевська	0,343		0,182
г. Шешул і Павлик	0,359	0,355	

ням (зокрема S, H_e) або однаковими (P) для Sh та Pozh. Генетичне різноманіття H_e та індекс Шеннона за результатами ISSR-аналізу були високими і подібними (недостовірно відрізнялися) для рослин з Sh і Lem та нижчими – для Pozh. Значення середніх генетичних відстаней D_j трьох популяцій істотно відрізнялися для двох типів маркерів (табл. 1). Так, наприклад, відмінності D_j між різними популяціями за RAPD-ПЛР становили приблизно 6–7 %, тоді як за ISSR-аналізом – лише близько 1–3 %.

Віддаленість популяцій оцінювали за генетичними відстанями H_e (табл. 2). Загалом, показники генетичних дистанцій на основі результатів ISSR-ПЛР були дещо більшими порівняно з такими для RAPD-аналізу.

На основі генетичних відстаней методом UPGMA побудовано дендрограми генетичних подібностей досліджених популяцій *G. lutea* (рис. 2). На дендрограмі за результатами RAPD-ПЛР (рис. 2, а) зразки з пожижевської популяції були ближчими до лемських, а з шешульської – генетично більш віддалені. У випадку ISSR-аналізу шешульська і пожижевська популяції утворювали один кластер, тоді як лемська формувала окрему гілку (рис. 2, б).

Таблиця 3. Рівень генетичного поліморфізму різних видів родини Gentianaceae (літературні дані)

Вид	Тип аналізу	Показник	Дані	Джерело
<i>Gentiana atuntsiensis</i>	ISSR	S	0,225	Zhang et al., 2007 [18]
		P	33,51–46,58 %	
<i>Gentiana striolata</i>	ISSR	S	0,273	Ge et al., 2007 [13]
		P	40,42–52,47 %	
<i>Megacodon stylophorus</i>	ISSR	S	0,0792	Ge et al., 2007 [13]
		H_e	0,0532	
		P	10,34–18,10 %	
<i>Gentiana acaulis</i>	RAPD	P	63 %	Твардовська та ін., 2010 [19]
<i>Gentiana punctata</i>	RAPD	P	39 %	
<i>Gentiana cruciata</i>	RAPD	P	30 %	
<i>Gentiana nivalis</i>	RAPD	D_j	20,9 %; 27,5 %	Raica et al., 2006 [20]
<i>Gentiana crassicaulis</i>	SSR	H_e	0,32–0,78	Li et al., 2007 [15]
<i>Halenia elliptica</i>	SSR	H_e	0,191–0,784	Zhang et al., 2011 [16]
<i>Gentiana nipponica</i>	Алозимний	H_e	0,127	Hirao, Kudo, 2004 [14]
<i>Sabatia angularis</i>	Алозимний	P	55–73 %	Spigler et al., 2010 [17]
		H_e	0,270	

У табл. 3 подано літературні дані щодо рівня генетичного поліморфізму різних видів родини *Gentianaceae*. Порівняння отриманих нами даних із літературними показало, що *He* (середнє значення усіх досліджених популяцій *G. lutea*, табл. 1) було вищим, ніж у *Megacodon stylophorus* (Clarke) Smit [13], подібним до *G. nipponica* Maxim. [14], і нижчим у порівнянні з *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. [15], *Halenia elliptica* D. Don [16], *Sabatia angularis* L. (Pursh) [17]. Середнє значення індексу Шеннона і частка поліморфних ампліконів за результатами ISSR-аналізу трьох популяцій *G. lutea* були вищими, ніж для *Megacodon stylophorus*, проте нижчими у порівнянні з *G. atuntsiensis* W.W. Smith і *G. striolata* T.N. Ho [13, 18] (табл. 1 та 3). Схожі дані (значення показника *P*) отримані за допомогою RAPD- і алозимного аналізу й для інших видів тирличів – *G. acaulis*, *G. punctata*, *G. cruciata* [19], а також *G. nipponica* [14] (табл. 3). За результатами RAPD-аналізу середні значення генетичних відстаней D_j для різних популяцій *G. lutea* були подібними або дещо вищими порівняно з *G. nivalis* [20].

Загалом ці дані свідчать про те, що рівень генетичного поліморфізму *G. lutea* хоча й є досить високим, проте знаходиться в межах мінливості, визначеної для інших представників родини *Gentianaceae*. Про це ж свідчить і порівняння з видами рослин, схожими за деякими біологічними особливостями (подібними життєвими формами). Зокрема, генетична диференціація (за індексом Шеннона на популяційному рівні) *G. lutea* подібна (ISSR-аналіз) або дещо нижча (RAPD-аналіз) порівняно із показниками для рослин, які також є довгоживучими багаторічниками (0,25), перехреснозапильними (0,27), ендеміками (0,2), насіння яких поширюється вітром або водою (0,27) [21].

Відомо, що одним із основних факторів, який визначає генетичну структуру виду, є спосіб розмноження [13, 18, 21]. Більша генетична різноманітність характерна для видів рослин, які розмножуються генеративно, тоді як повний або частковий перехід до вегетативного розмноження призводить до збіднення генофонду [22, 23]. На основі результатів еколого-популяційних досліджень Майорової та ін. [3] встановлено, що для рослин з полонини Лем-

ська, гори Пожижевська та гір Шешул і Павлик властивий переважно генеративний спосіб розмноження. Очевидно це поряд з іншими чинниками забезпечує відносно високий рівень їх генетичної гетерогенності.

Окрім способу розмноження, рівень генетичної мінливості може залежати від розмірів популяцій, щільності особин, дрейфу генів та генетичної ізоляції популяцій. Зокрема, із літературних даних відомо, що високій генетичній різноманітності сприяють великі розміри та щільність популяції. При цьому значна чисельність особин може запобігти інбридингу і генетичному дрейфу [18]. Так, на основі результатів RAPD-аналізу двох різних за розміром популяцій *G. nivalis* та 11 популяцій *Gentianella germanica* (Bornet) Willdenow (*Gentianaceae*) виявлено позитивну кореляцію між геномною мінливістю і розмірами популяцій [20, 24]. Аналіз отриманих нами результатів свідчить про відсутність кореляції між генетичною гетерогенністю та чисельністю особин в популяціях *G. lutea*. Високі показники генетичної варіабельності рослин пожижевської популяції при малій чисельності особин очевидно зумовлені її походженням з шешульської: значний початковий рівень гетерогенності зберігся навіть після тривалого (~ 40-річного) ізолюваного росту [5]. Зважаючи на це, можна стверджувати, що штучні насадження *G. lutea* є одним зі способів підтримання генетичного різноманіття цього виду.

За результатами AMOVA, на відмінності між популяціями припадає 72 % (RAPD-аналіз) та 59 % (ISSR-аналіз) загальної генетичної мінливості, тоді як внутрішньопопуляційний поліморфізм становить 28 % (RAPD-аналіз) та 41 % (ISSR-аналіз). Цілком імовірно, це зумовлено особливостями генетичної структури виду, зокрема значною дивергенцією окремих популяцій, що в свою чергу може залежати від еколого-географічних умов зростання цих високогірних рослин. Адже відомо, що генетична диференціація між популяціями може збільшуватися в результаті ізоляції, спричиненої фрагментацією місць зростання, а високий рівень генетичної різноманітності та ендемізму – географічною та екологічною гетерогенністю гір [18, 25].

Висновки. На основі молекулярно-генетичного дослідження встановлено особливості ге-

нетичної структури та рівень мінливості трьох популяцій *G. lutea* з Чорногірського масиву Українських Карпат. Виявлено, що для *G. lutea* характерним є високий рівень генетичної гетерогенності. Показники генетичної різноманітності були вищими у випадку ISSR-ПЛР та дещо нижчими для RAPD-аналізу. Показано, що на відмінності між популяціями припадає 59–72 % загальної генетичної мінливості, тоді як внутрішньопопуляційний поліморфізм становить 28–41 %, що можна пояснити значною диференціацією досліджених популяцій. Отримані результати свідчать про генетичну ізоляцію чорногірських популяцій *G. lutea*. Високі показники рівня генетичної мінливості рослин агропопуляції на горі Пожижевська свідчать про підтримання значного початкового рівня поліморфізму у штучних насадженнях цього виду протягом десятків років.

Автори статті висловлюють подяку кандидатам біол. наук І.О. Андрєєву, К.В. Спіридоновій, О.М. Бублик (Ін-т молекулярної біології і генетики НАНУ) за цінні поради і зауваження під час отримання і аналізу результатів, а також директору Ін-ту екології Карпат НАНУ М.П. Козловському і співробітникам відділу популяційної екології інституту за сприяння під час збору зразків у Карпатах. Роботу виконано за фінансової підтримки Цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» в рамках проекту «Порівняльна геноміка у діагностиці генофонду деяких рідкісних видів рослин України».

GENETIC POLYMORPHISM OF *GENTIANA LUTEA* L. (GENTIANACEAE) POPULATIONS FROM CHORNOHORA RIDGE OF UKRAINIAN CARPATHIANS

M.Z. Mosula, I.I. Konvalyuk, V.M. Mel'nyk, N.M. Drobyuk, Y.V. Tsaryk, Yu.Y. Nesteruk, V.A. Kunakh

Volodymyr Hnatiuk Ternopil Pedagogical University
E-mail: maryanamosula@gmail.com
Institute of Molecular Biology and Genetics, Kyiv
Ivan Franko National University of Lviv
Institute of Ecology of the Carpathians, Lviv

The features of genetic structure and level of diversity were investigated for *G. lutea* populations from Chornohora Ridge of Ukrainian Carpathians using RAPD- and ISSR-PCR. We have shown a high level of genetic

diversity for investigated populations. The differences between populations account for 59–72 % of the total genetic variation, whereas intrapopulation polymorphism makes up 28–41 %. The relationships among genetic variability level and ecological-geographical conditions as well as biological features of the species were assumed to be possible. The obtained results indicate the genetic isolation of *G. lutea* Chornohora populations from Ukrainian Carpathians. Pozhyzhevskia agropopulation was characterized by a high level of polymorphism that means the possibility to use artificial plantings of the investigated species for its conservation.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ ПОПУЛЯЦИЙ *GENTIANA LUTEA* L. (GENTIANACEAE) С ЧЕРНОГОРСКОГО МАССИВА УКРАИНСКИХ КАРПАТ

М.З. Мосула, І.І. Конвалюк, В.Н. Мельник, Н.М. Дробык, І.В. Царык, Ю.І. Нестерук, В.А. Кунах

С использованием RAPD- и ISSR-ПЦР изучены особенности генетической структуры и оценен уровень изменчивости популяций *G. lutea* с Черногорского массива Украинских Карпат. Установлены высокие показатели уровня генетической гетерогенности исследованных популяций по этим ДНК-маркерам. Показано, что на различия между популяциями приходится 59–72 % общей генетической изменчивости, тогда как внутривидовой полиморфизм составляет 28–41 %. Предполагается существование связи между уровнем генетической вариабельности и эколого-географическими условиями, а также биологическими особенностями вида. Полученные результаты свидетельствуют о генетической изоляции черногорских популяций *G. lutea* в Украинских Карпатах. Агропопуляция на горе Пожижевская характеризовалась высоким уровнем полиморфизма, что свидетельствует о возможности использования искусственных насаждений этого вида с целью его сохранения.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Малиновський К.А., Царик Й.В., Жилиєв Г.Г. та ін. Структура популяцій рідкісних видів флори Карпат. — К.: Наук. думка, 1998. — 176 с.
2. Страшнюк Н.М., Грицак Л.Р., Леськова О.М., Мельник В.М. Види роду *Gentiana* L. флори України у природі та культурі *in vitro* // Укр. бот. журн. — 2005. — 62, № 3. — С. 337–348.
3. Майорова О.Ю., Грицак Л.Р., Терехова Г.І. та ін. *Gentiana lutea* L. (Gentianaceae) у флорі Українських Карпат: характеристика та сучасний стан популяцій // Укр. бот. журн. — 2013. — 70, № 6. — С. 780–787.
4. Mel'nyk V.M., Spiridonova K.V., Andreev I.O. et al.

- Variability of nuclear 18S-25S rDNA of *Gentiana lutea* L. in nature and in *in vitro* tissue culture // Cytology and Genetics. – 2004. – **38**, № 3. – P. 14–19.
5. Бедей М.І., Крись О.П., Волощук М.І., Маханець І.А. Тирлич жовтий (*Gentiana lutea* L.) в Українських Карпатах. – Ужгород, 2010. – 134 с.
 6. 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.
 7. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. – М.: Мир, 1984. – С. 411–412
 8. Твардовська М.О., Страшнюк Н.М., Мельник В.М. та ін. RAPD-аналіз геномного поліморфізму деяких видів роду *Gentiana* L. флори України // Доп. НАН України. – 2009. – № 5. – С. 200–204.
 9. Конвалюк І.І., Мельник В.М., Дробик Н.М. та ін. RAPD- і ISSR-аналіз генетичної мінливості у культурі тканин та органів тирличу звичайного (*Gentiana pneumonanthe* L.) // Вісн. Укр. т-ва генетиків і селекціонерів. – 2011. – **9**, № 1. – С. 22–31.
 10. Schluter P.M., Harris S.A. Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – № 6. – P. 569–572.
 11. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA 3: Integrated software for molecular evolution genetics analysis and sequences alignment // Briefin. Bioinf. – 2004. – **5**, № 2. – P. 150–163.
 12. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Notes. – 2006. – № 6. – P. 288–295.
 13. Ge X.-J., Zhang L.-B., Yuan Y.-M. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon styliphorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR) // Biodivers Conserv. – 2005. – **14**. – P. 849–861.
 14. Hirao A.S., Kudo G. Landscape genetics of alpine-snowbed plants: comparisons along geographic and snowmelt gradients // Heredity. – 2004. – № 93. – P. 290–298.
 15. Li Y., Li L.-F., Chen G.-Q., Ge X.-J. Development of ten microsatellite loci for *Gentiana crassicaulis* (Gentianaceae) // Conserv. Genet. – 2007. – **8**, № 6. – P. 1499–1501.
 16. Zhang Z.-R., Yang J., Sun Y. et al. A set of novel microsatellite markers developed for the traditional Tibetan medicinal plant *Halenia elliptica* (Gentianaceae) // Amer. J. Bot. – 2011. – **98**, № 7. – P. 173–175.
 17. Spigler R.B., Hamrick J.L., Chang S.-M. Increased inbreeding but not homozygosity in small populations of *Sabatia angularis* (Gentianaceae) // Plant Syst. Evol. – 2010. – № 284. – P. 131–140.
 18. 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.
 19. Твардовська М.О., Дробик Н.М., Мельник В.М. та ін. Геномна мінливість деяких видів роду *Gentiana* L. у природі та в культурі *in vitro*: RAPD-аналіз // Biopolym. Cell. – 2010. – **26**, № 6. – P. 499–507.
 20. Raica P., Pamfil D., Botez C. et al. The assesment of two populations of *Gentiana nivalis* by RAPD markers // Bull. USAMV-CN. – 2006. – **62**. – P. 228–231.
 21. Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants // Mol. Ecol. – 2004. – № 13. – P. 1143–1155.
 22. Bushakra J.M., Hodges S.A., Cooper J.B., Kaska D.D. The extent of clonality and genetic diversity in the Santa Cruz Island ironwood, *Lyonothamnus floribundus* // Mol. Ecol. – 1999. – **8**, № 3. – P. 471–475.
 23. Kery M., Matthies D., Spillmann H.-H. Reduced fecundity and offspring performance in small populations of the declining grassland plants *Primula veris* and *Gentiana lutea* // J. Ecol. – 2000. – **88**. – P. 17–30.
 24. Fisher M., Matthies D. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (Gentianaceae) // Amer. J. Bot. – 1998. – **85**, № 6. – P. 811–819.
 25. Oostermeijer J.G.B., Luijten S.H., den Nijs J.C.M. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation // Biol. Conserv. – 2003. – **113**, № 3. – P. 389–398.

Надійшла 04.07.13