

## Геномна мінливість деяких видів роду *Gentiana L.* у природі та в культурі *in vitro*: RAPD-аналіз

М. О. Твардовська, Н. М. Дробик<sup>1</sup>, В. М. Мельник, І. І. Конвалюк, В. А. Кунах

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, Україна, 03680

<sup>1</sup>Тернопільський національний педагогічний університет імені Володимира Гнатюка  
Вул. М. Кривоноса, 2, Тернопіль, Україна, 46027

kunakh@imbg.org.ua

---

**Мета.** Дослідити внутрішньовидову та соматоклональну мінливість *Gentiana acaulis*, *G. cruciata* та *G. punctata*. **Методи.** Полімеразна ланцюгова реакція з праймерами довільної послідовності (RAPD-ПЛР), гель-електрофорез. **Результати.** Виявлено видоспецифічність показників генетичної гетерогенності тирличів – відсотка поліморфних ампліконів і генетичних відстаней. Рівень внутрішньовидової мінливості зменшується у напрямку *G. acaulis* > *G. punctata* > *G. cruciata*. Показано, що зміни в культурі тканин тирличів за вмістом поліморфних ампліконів лежать у діапазоні 10–15 % і не виходять за межі внутрішньовидової варіабельності. **Висновки.** Методом RAPD-ПЛР досліджено геномну мінливість *G. acaulis*, *G. cruciata* та *G. punctata*. Встановлено, що тирличі характеризуються різною варіабельністю як у природі, так і в культурі *in vitro*. У культурі тканин виявлено зміни, які значно менші порівняно з внутрішньовидовою мінливістю.

**Ключові слова:** геномна мінливість, види роду Тирлич (*Gentiana L.*), культура тканин рослин, внутрішньовидова і соматоклональна варіабельність, RAPD-ПЛР.

---

**Вступ.** Види роду Тирлич (*Gentiana L.*) – цінні лікарські та декоративні рослини, які на території України зростають переважно в Карпатах. Скорочення ареалів цих видів, зменшення чисельності та порушення структури їхніх природних популяцій внаслідок антропогенного впливу зумовило занесення багатьох з них до Червоної книги України [1]. Це, в свою чергу, обмежує їхнє використання як сировини для потреб фармацевтики. Для забезпечення ефективних заходів охорони тирличів необхідним є не лише всебічне вивчення цих видів (у тому числі і генофонду), а й використання новітніх біотехнологій, зокрема, отримання їхніх культур клітин, тканин, органів *in vitro* [2–4].

У рамках комплексного генетичного дослідження тирличів ми встановили їхній міжвидовий поліморфізм за хромосомними числами, розмірами повторів рибосомної ДНК, RAPD-спектрами [5–8]. Показано внутрішньовидову варіабельність генів 45S рРНК у *G. lutea* [9].

Окрім цього, проведено аналіз соматоклональної мінливості культури тканин різних видів *Gentiana* за допомогою цитогенетичного методу та блот-гібридизації [9–12]. Результати молекулярно-генетичних досліджень виявили, що геном тирличів за умов *in vitro* зазнає змін, які, однак, не виходять за межі внутрішньовидової гетерогенності [9]. У багатьох випадках мінливість *in vitro* не виявляється на рівні ДНК, але детектується при дослідженні каріотипу [6, 10–12].

Подальше вивчення внутрішньовидової та соматональної мінливості *G. acaulis*, *G. cruciata* та *G. punctata* методом RAPD-ПЛР дозволить поглибити розуміння особливостей геномної мінливості тирличів як у природі, так і в культурі *in vitro*, у чому й полягає мета представленої роботи.

**Матеріали і методи.** Матеріалом для дослідження слугували рослини з природних популяцій: *G. acaulis* (гори Туркул, Ребра, Бребенескул, усі – хребет Чорногора Українських Карпат), *G. cruciata* (с. Креничі Київської обл. та заповідник «Медобори» Тернопільської обл.), *G. punctata* (гори Пожижевська і Брескул, хребет Чорногора; гора Трояска, хребет Свидовець Українських Карпат), а також рослини цих видів, вирощені з насіння за стерильних умов (асептичні рослини). Генетичну варіабельність тирличів у природі оцінювали на основі аналізу восьми зразків *G. acaulis* із трьох популяцій (чотири рослини – реберської, по дві – туркульської і бребенескульської), шість зразків *G. cruciata* (по три рослини з двох популяцій – медоборської і креничської) та шість зразків *G. punctata* з трьох популяцій (три рослини – брескульської, дві – трояської та одна – пожижевської). Окрім рослин, ми використали культуру тканин кореневого походження: *G. acaulis* (гора Туркул) на 7-, 30- та 72-му пасажах, *G. cruciata* (с. Креничі) на 9-му, *G. cruciata* (заповідник «Медобори») на 8-му, *G. punctata* (гора Трояска) на 10-му та *G. punctata* (гора Пожижевська) на 15-му пасажах вирощування, отримані з асептичних рослин. Тривалість одного пасажу усіх калюсів становила 4 тижні. Умови отримання та вирощування калюсів досліджених тирличів описано в роботах [2, 3]. Мінливість культури тканин цих видів вивчали, порівнюючи із рослино-донором, яку використано і для аналізу внутрішньовидового поліморфізму.

Виділення ДНК та гель-електрофорез продуктів ампліфікації здійснювали за підібраними раніше методиками [10]. Умови проведення полімеразної ланцюгової реакції з праймерами довільної послідовності (RAPD-ПЛР) та нуклеотидні послідовності використаних праймерів наведено у роботі [8].

Результати обробки електорофореграм RAPD-продуктів представлено у вигляді бінарної матриці, у якій наявність чи відсутність однакових за роз-

міром ампліконів позначено відповідно «1» або «0». На основі складених матриць за допомогою комп'ютерної програми POPGENE 1.31 [13] розраховано генетичні відстані за Неєм, Лі [14]. Методом незваженої попарно-групової кластеризації (UPGMA) побудовано дендрограму взаємозв'язків між дослідженими об'єктами. При цьому використано програму MEGA 3.1 [15].

Відсоток поліморфних ампліконів (P) визначали за формулою

$$P = \frac{\text{Кількість поліморфних ампліконів}}{\text{Загальна кількість ампліконів}} \cdot 100 \%$$

**Результати і обговорення.** За результатами RAPD-аналізу зразків тирличів з використанням 21 випадкового праймера отримано 957 фрагментів розміром 250–3000 п. н. Оскільки не всі праймери давали чіткі продукти ампліфікації, то обрахунки у разі *G. cruciata* проводили за 21 праймером, *G. punctata* – за 19, *G. acaulis* – за 17. Загальна кількість чітких відтворюваних ампліконів для *G. acaulis* становила 313 (у середньому 18,4 на праймер), *G. cruciata* – 315 (15 на праймер), *G. punctata* – 329 (17,3 на праймер).

Деякі типові RAPD-спектри рослин *G. acaulis* представлено на рис. 1, а. Для всієї вибірки праймерів вміст поліморфних ампліконів (P) у досліджених зразках становив 63 %. RAPD-спектри рослини-донора (гора Туркул) та отриманої від неї культури тканин виявилися подібними, але не ідентичними (рис. 1, б). Рівень генетичного поліморфізму за P між цими зразками відносно невисокий і дорівнює 12 %. Найподібнішими у загальній вибірці є RAPD-спектри зразків одного й того ж калюсу, відібраних на 30-му і 72-му пасажах (рис. 1, б).

На основі результатів проведеного RAPD-аналізу побудовано дендрограму генетичної подібності зразків *G. acaulis* (рис. 2). З наведеної дендрограми видно, що досліджені об'єкти формують два кластери. До першого належать зразки *G. acaulis*, які походять з популяції, локалізованої на горі Ребра, до другого – об'єкти з двох інших популяцій цього виду – туркульської та бребенескульської. У межах першого кластеру можна виділити субкластер, сформований дикорослими рослинами з реберської популяції, та дві окремі гілки, представлені

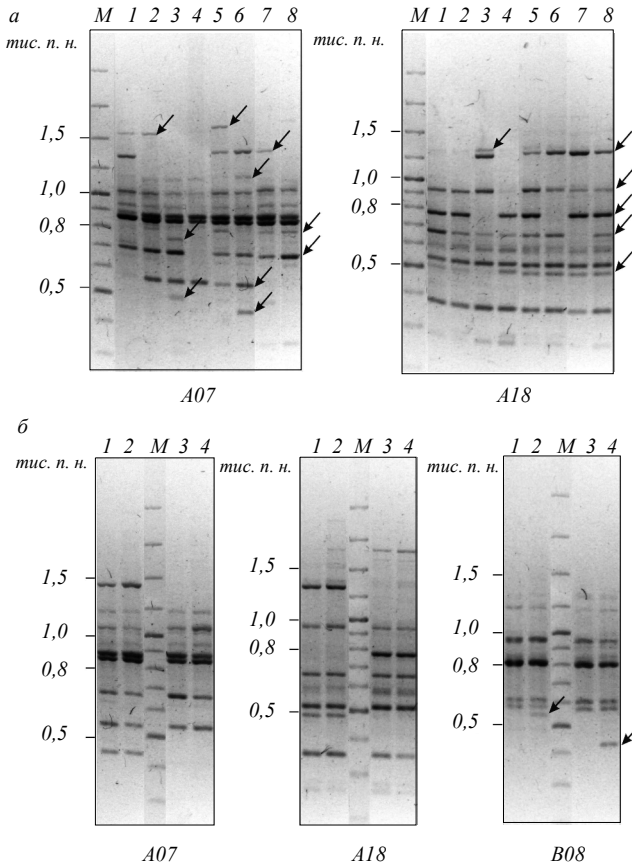


Рис. 1. RAPD-профілі різних генотипів *G. acaulis*: а – внутрішньовидовий поліморфізм (1–4 – рослини реберської популяції; 5–6 – рослини туркульської популяції; 7–8 – рослини бребенескульської популяції); б – мінливість у культурі *in vitro* зразків ДНК рослин туркульської популяції (1 – рослина-донор; 2 – культура тканин 7-го пасажу, отримана від рослини 1; 3, 4 – культура тканин 30-го і 72-го пасажів відповідно). М – маркер молекулярних мас. Стрілками позначено поліморфні амплікони для всіх доріжок (а) або для доріжок 1, 2 та 3, 4 відповідно (б). Назви використаних праймерів зазначено під електрофореграмами

асептичними рослинами з тієї ж популяції. В середині другого кластеру спостерігається чіткий розподіл на два субкластери: один – зразки з гори Туркул, інший – рослини з гори Бребенескул. Значення генетичних відстаней між окремими генотипами цих популяцій приблизно однакові. Із зразків туркульської популяції, у свою чергу, виокремилися одна гілка, представлена дикорослою рослиною, та два підкластери, перший з яких формували рослина-донор та отримана від неї культура тканин 7-го пасажу, другий – калус 30-го та 72-го пасажів від

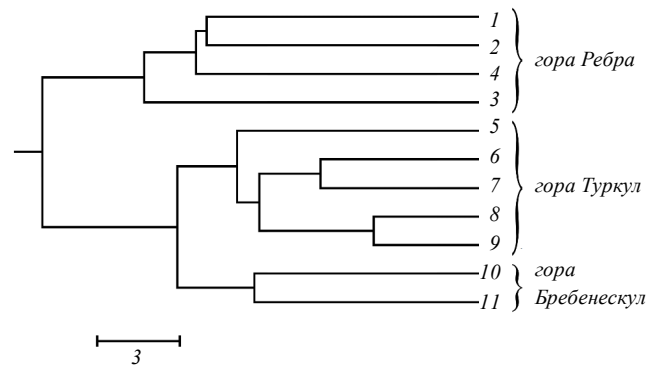


Рис. 2. Дендрограма генетичної подібності зразків *G. acaulis*, побудована UPGMA-методом за генетичними відстанями Нея, Лі [14]: 1, 2 – дикорослі та 3, 4 – асептичні рослини; 5 – дикоросла рослина; 6 – асептична рослина-донор; 7 – культура тканин 7-го пасажу, одержана з рослини 6; 8, 9 – культура тканин 30-го і 72-го пасажів відповідно; 10, 11 – дикорослі рослини

іншої рослини, яку в даній роботі не вивчали. Як видно з дендрограми (рис. 2), саме зразки калюсу, культивованого протягом тривалого часу, виявилися генетично найближчими. Представлені результати показують більшу генетичну спорідненість зразків *G. acaulis* з туркульської та бребенескульської популяцій, які на дендрограмі формують один кластер, та віддаленість від них зразків реберської, що утворюють окремий кластер.

Генетична відстань за Неєм, Лі між рослинами *G. acaulis* лежить у діапазоні 0,170–0,438 (табл. 1). Ці показники не виходять за межі отриманого нами раніше значення міжвидової варіабельності (середня величина генетичних відстаней між сімома видами становить 0,54) та генетичної відстані між *G. acaulis* та найближчим до нього за топологією на дендрограмі *G. verna* (0,532) [8]. Ступінь генетичних відмінностей між калюсом *G. acaulis* (гора Туркул) 7-го пасажу та рослиною-донором дорівнює 0,122, що не виходить за межі показників генетичних відстаней між рослинами цього виду.

Для всієї вибірки праймерів величина Р у досліджених рослин *G. cruciata* становить 30 %. Порівняння RAPD-спектрів рослин-донорів та отриманих від них культур тканин (рис. 3) виявило, що рівень генетичного поліморфізму між ними дорівнює 10 % для медоборської і 12 % – для креницької популяції.

Таблиця 1

Генетичні відстані за Несм, Лі [14] між зразками *G. ascaulis* за результатами RAPD-аналізу

Зразок	Гора Ребра				Гора Туркул					Гора Бребенескул		
	Дикоросла рослина		Асептична рослина		Дикоросла рослина	Асептична рослина-донор	Культура тканин 7-го пасажу від рослини 6	Культура тканин 30-го пасажу	Культура тканин 72-го пасажу	Дикоросла рослина		
	1	2	3	4						5	6	7
1	–											
2	0,205	–										
3	0,274	0,249	–									
4	0,217	0,209	0,229	–								
5	0,308	0,282	0,376	0,287	–							
6	0,291	0,308	0,357	0,295	0,182	–						
7	0,326	0,335	0,366	0,321	0,205	0,122	–					
8	0,295	0,253	0,344	0,274	0,163	0,170	0,148	–				
9	0,308	0,300	0,376	0,295	0,182	0,174	0,174	0,083	–			
10	0,300	0,326	0,404	0,313	0,174	0,205	0,229	0,186	0,229	–		
11	0,376	0,330	0,438	0,308	0,225	0,266	0,282	0,229	0,241	0,170	–	

На основі даних RAPD-аналізу побудовано дендрограму генетичної подібності зразків *G. cruciata* (рис. 4), які розподілилися на два кластери, відповідно до популяційної приналежності. У межах першого кластеру, представленого зразками з креницької популяції, виокремлюються два субкластери, сформовані відповідно дикорослою і асептичною рослинами та ще однією рослиною з природи і культурою тканин від асептичної рослини. У другому кластері зразки з медоборської популяції розподіляються дещо по-іншому: дві рослини входять до одного субкластеру, окремі гілки формують асептична рослина та отримана з неї культура тканин. Як видно з дендрограми, в обох випадках рослини-донори та їхні калуси не потрапляють до одного субкластеру, що може свідчити про зміни геному в культурі тканин *G. cruciata*. Найближчими генетично у дослідженій вибірці виявилися дві рослини з медоборської популяції.

Значення генетичних відстаней за Несм, Лі між рослинами *G. cruciata* (табл. 2) лежать у діапазоні від 0,046 до 0,215 і не виходять за межі встановленого раніше показника міжвидової варіабельності тирличів (0,54), а також генетичної дистанції до

найближчого на дендрограмі виду – *G. pneumonanthe* (0,498) [8]. При порівнянні культури тканин і вихідної рослини з креницької популяції встановлено, що генетична відстань між ними дорівнює 0,132; з медоборської популяції – 0,1.

Деякі типові RAPD-спектри *G. punctata* наведено на рис. 5. Відсоток поліморфних ампліконів у досліджених рослин *G. punctata* становить 39 %. Рівень генетичного поліморфізму за цим показником між вихідною рослиною пожижевської і трояської популяцій та їхньою культурою тканин відносно невисокий і дорівнює 11 і 15 % відповідно.

На основі результатів проведеного RAPD-аналізу побудовано дендрограму генетичної подібності досліджених зразків *G. punctata* (рис. 6), які формують два кластери. До першого з них належать об'єкти *G. punctata* (гора Трояська), до другого – представники двох інших популяцій цього виду – брескульської та пожижевської. У межах другого кластеру можна виділити два субкластери: один формують три рослини з гори Брескула, а інший – зразки з гори Пожижевської. Тобто на дендрограмі генетичної подібності розподіл об'єктів *G. punctata* відповідає їхній популяційній прина-

Таблиця 2

Генетичні відстані за Неєм, Лі [14] між зразками *G. cruciata* за результатами RAPD-аналізу

Зразок	Село Кренічі				Заповідник «Медобори»			
	Дикоросла рослина		Асептична рослина-донор	Культура тканин 9-го пасажу від рослини 3	Дикоросла рослина		Асептична рослина-донор	Культура тканин 8-го пасажу від рослини 7
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	–							
2	0,125	–						
3	0,147	0,066	–					
4	0,129	0,132	0,132	–				
5	0,177	0,204	0,204	0,132	–			
6	0,184	0,196	0,204	0,147	0,046	–		
7	0,188	0,215	0,215	0,151	0,076	0,076	–	
8	0,204	0,264	0,272	0,173	0,111	0,118	0,100	–

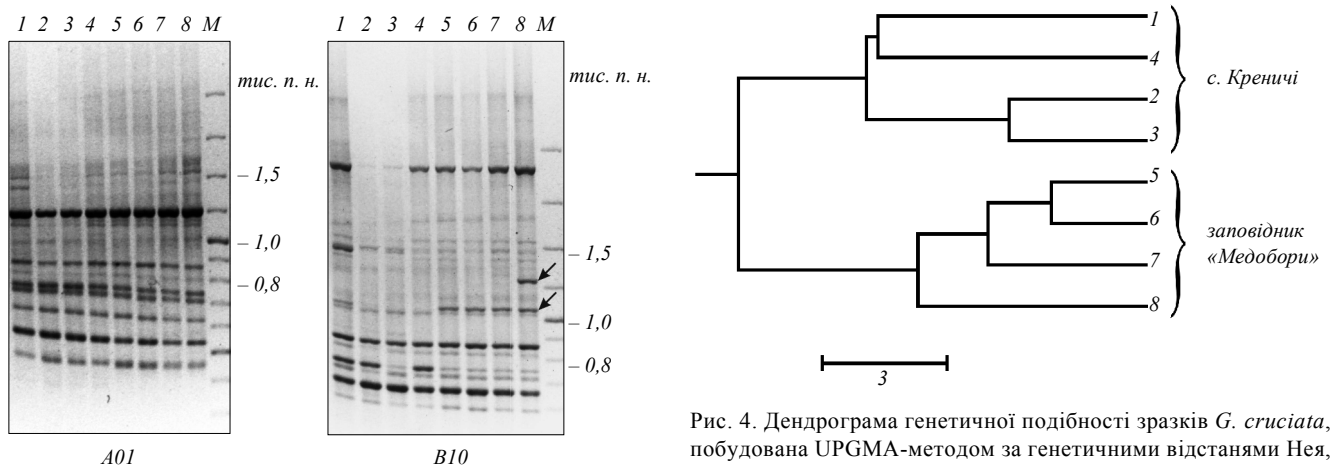


Рис. 3. RAPD-спектри ДНК досліджених зразків *G. cruciata* із села Кренічів (1, 2 – дикорослі рослини; 3 – асептична рослина-донор; 4 – культура тканин 8-го пасажу, отримана з рослини 3) та із заповідника «Медобори» (5, 6 – дикорослі рослини; 7 – асептична рослина-донор; 8 – культура тканин 9-го пасажу, отримана з рослини 7); M – маркер молекулярних мас. Стрілками позначено поліморфні амплікони. Назви використаних праймерів зазначено під електрофореграмами

лежності. Найближчими генетично є дві рослини з брескульської популяції.

Генетична відстань за Неєм, Лі між рослинами *G. punctata* лежить у діапазоні від 0,063 до 0,255 (табл. 3). Ці значення не перевищують отриманого нами раніше середнього показника міжвидової варіабельності (0,54) та відстані між *G. punctata* і генетично найближчим до нього видом *G. lutea*

Рис. 4. Дендрограма генетичної подібності зразків *G. cruciata*, побудована UPGMA-методом за генетичними відстанями Нея, Лі [14]: 1, 2 – дикорослі рослини; 3 – асептична рослина-донор; 4 – культура тканин 8-го пасажу, отримана з рослини 3; 5, 6 – дикорослі рослини; 7 – асептична рослина-донор; 8 – культура тканин 9-го пасажу, отримана з рослини 7

(0,351) [8]. Генетична дистанція між рослиною-донором і культурою тканин *G. punctata* (гора Трояк) становить 0,158. Дещо меншим (0,113) цей показник є для зразків пожижевської популяції.

З порівняння результатів RAPD-аналізу зразків *G. acaulis*, *G. cruciata* і *G. punctata* випливає, що вони характеризуються різним рівнем мінливості як у природі, так і в культурі *in vitro*. Вміст поліморфних ампліконів для трьох видів був відносно високим: *G. acaulis* – 63 %, *G. punctata* – 39 % та *G. cruciata* – 30 %. Вважається, що рівень генетичного поліморфізму виду залежить від низки чин-

Таблиця 3

Генетичні відстані за Неєм, Лі [14] між зразками *G. punctata* за результатами RAPD-аналізу

Зразок	Гора Трояска			Гора Брескул			Гора Пожижевська	
	Асептична рослина-донор	Культура тканин 10-го пасажу від рослини 1	Дикоросла рослина	Дикоросла рослина			Дикоросла рослина	Культура тканин 15-го пасажу
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	–							
2	0,158	–						
3	0,161	0,147	–					
4	0,243	0,198	0,224	–				
5	0,224	0,201	0,228	0,113	–			
6	0,255	0,216	0,235	0,126	0,063	–		
7	0,239	0,201	0,213	0,228	0,158	0,137	–	
8	0,228	0,213	0,224	0,255	0,183	0,190	0,113	–

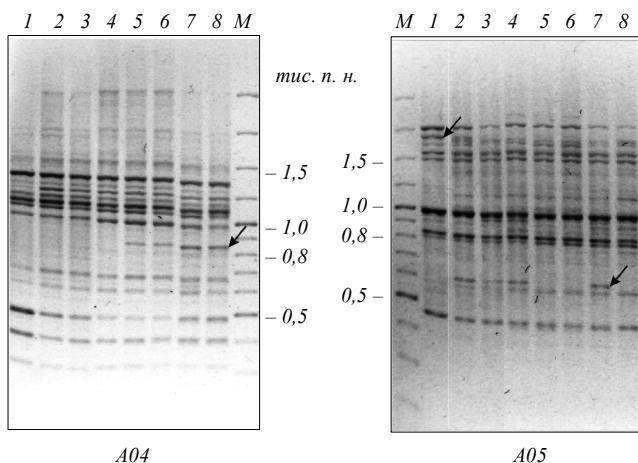


Рис. 5. Продукти ампліфікації ДНК зразків *G. punctata* з гори Трояски (1 – асептична рослина-донор; 2 – культура тканин 10-го пасажу, отримана з рослини 1; 3 – дикоросла рослина), з гори Брескула (4, 5, 6 – дикорослі рослини) та з гори Пожижевської (7 – дикоросла рослина; 8 – культура тканин 15-го пасажу); М – маркер молекулярних мас. Стрілками позначено поліморфні амплікони. Назви використаних праймерів зазначено під електрофореграмами

ників, визначальними серед яких є біологічні особливості виду (наприклад, екологічна пластичність, спосіб розмноження та ін.), розміри популяцій, географічне поширення тощо [16–18]. Дослідження методом RAPD-ПЛР генетичної варіабельності у різних за розміром популяціях рідкісного виду *Gentianella germanica* L. – представника роду *Gentianella* Moench, близького до *Gentiana*, виявило позитивну кореляцію між геномною мінливістю і

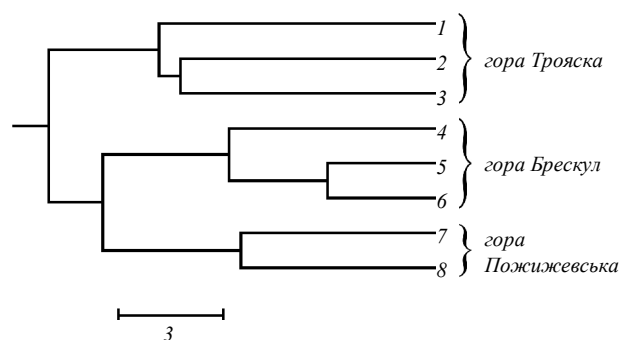


Рис. 6. Дендрограма генетичної подібності зразків *G. punctata*, побудована UPGMA-методом за генетичними відстанями Нея, Лі [14]: 1 – асептична рослина-донор; 2 – культура тканин 10-го пасажу, отримана з рослини 1; 3 – дикоросла рослина; 4–6 – дикорослі рослини; 7 – дикоросла рослина; 8 – культура тканин 15-го пасажу

розмірами популяцій [19]. Існує думка про те, що зростання за екстремальних умов може призвести до підвищення генетичної гетерогенності, яка й забезпечує виживання виду [16]. Зокрема, високий рівень геномного поліморфізму *Ungernia victoris* Vved. Ex Artjushenko автори пояснюють суворими умовами зростання та вузьким ареалом цього ендемічного виду [20].

Літературні дані щодо впливу на рівень генетичної варіабельності географічного розповсюдження виду є неоднозначними. Наприклад, рівень геномної мінливості популяцій *Orobanchе gracilis* Sm. (var. *gracilis*) залежить від їхнього розташування і вищий у північних районах Іспанії порівняно з

південними [18]. Проте RAPD-аналіз поліморфізму представників родини *Lemnaceae* не виявив зв'язку внутрішньовидової диференціації з географічною приуроченістю зразків. На думку авторів, це можна пояснити відсутністю територіальної ізоляції окремих популяцій [21].

Загалом, групування досліджених нами об'єктів на дендрограмах генетичної подібності відповідає їхній популяційній приналежності. Поряд з цим, цікавими виявилися результати вивчення рослин *G. acaulis* і *G. punctata* з трьох популяцій, розташованих на різній відстані одна від одної. Класифікація на дендрограмі зразків *G. punctata* з трьох популяцій відображає географічне розташування останніх. Об'єкти з гір Пожижевської та Брескула (дві сусідні вершини Чорногірського хребта) на дендрограмі генетичної подібності розподілені в межах одного кластеру, тоді як зразки з трояської популяції, яка значно віддалена від двох попередніх (хребет Свидовець), формують окремий кластер. Проте у разі *G. acaulis* пояснити отримані дані лише географічним положенням не можна.

Представлені результати виявляють більшу генетичну спорідненість зразків цього виду з туркульської і бребенескульської популяцій, які на дендрограмі формують один кластер, та віддаленість від них зразків реберської, що утворюють окремий кластер, хоча гора Туркул географічно ближча до гори Ребра, ніж до гори Бребенескула. Очевидно, це зумовлено генетичною ізоляцією зазначених популяцій, однією з причин якої можуть бути біологічні особливості *G. acaulis* – серед вивчених видів здатність до вегетативного розмноження у нього найбільша [22]. Подібну закономірність для цього виду виявлено при дослідженні рослин з інших гірських масивів Європи – різних частин Альп і Піреней [23]. Зокрема, на дендрограмі генетичної подібності, побудованій за результатами RAPD-аналізу, зразки *G. acaulis* з одного гірського масиву – Приморських Альп – розміщені в різних кладах. Авторами також показано значну генетичну відстань між популяціями для ще одного представника секції *Ciminalis* – виду, дуже близького за біологічними особливостями до *G. acaulis* – *G. clusii*.

На основі власних і літературних даних ми припускаємо, що саме біологічні особливості *G. acau-*

*lis* є причиною часткового генетичного вирізнання досліджених нами популяцій та окремих генотипів у межах одного локалітету.

Рівень соматональної мінливості за Р для всіх досліджених видів нижчий у 2–5 разів за внутрішньовидовий поліморфізм і коливається в межах 10–15 %. Таку ж тенденцію виявлено при вивченні генетичної мінливості культури тканин *U. victoris*: авторами встановлено, що мінливість у культурі тканин значно нижча за внутрішньовидову [24, 25]. Рівень соматональної мінливості не виходить за межі внутрішньовидової і при дослідженні культури тканин та інтактних рослин деяких видів ірисів [26]. Однак відомо, що культивування *in vitro* може спричинити значні перебудови геному, які за своїм розмахом у раувольфії зміїної *Rauwolfia serpentina* є порівнянними з міжвидовими [27], а у женьшеню *Panax ginseng* – з внутрішньовидовими [28].

У вибірці об'єктів *G. acaulis* найближчими генетично виявилися зразки одного й того ж калюсу, відібрані на 30-му і 72-му пасажах культивування. Це може свідчити про відносну генетичну стабільність зазначеного калюсу впродовж третього–шостого років вирощування *in vitro*. На підтвердження такого припущення можна навести результати цитогенетичних досліджень, які засвідчили, що з віком у цій культурі тканин зростає частка поліплоїдних клітин, однак рівень анеуплоїдних у шестирічному калюсі порівняно з однорічним практично не змінюється [29]. Збереження відносної генетичної стабільності впродовж тривалого культивування виявлено і при вивченні 45S рДНК у культурі тканин 23–50-го пасажів (2–5 років вирощування *in vitro*) іншого виду тирличів – *G. lutea* [9].

**Висновки.** Методом RAPD-ПЛР проведено дослідження генетичної мінливості *G. acaulis*, *G. punctata* та *G. cruciata*. Показано, що для тирличів властивий різний рівень генетичної гетерогенності як у природі, так і в культурі *in vitro*. Вміст поліморфних ампліконів, який характеризує рівень внутрішньовидової мінливості, становить: для *G. acaulis* – 63 %, *G. punctata* – 39 % і *G. cruciata* – 30 %. Кластеризація об'єктів на дендрограмах відповідає їхній популяційній приналежності, що свідчить про відносну генетичну ізоляцію популяцій (локалітетів). Рівень соматональної мінливості за Р для всіх до-

сліджених видів у 2–5 разів нижчий за внутрішньовидовий поліморфізм і становить 10–15 %.

Автори висловлюють щиру подяку І. О. Андрєєву, К. В. Спірідоновій та О. М. Бублик за допомогу і консультації під час отримання та аналізу результатів.

M. O. Twardovska, N. M. Drobyk<sup>1</sup>, V. M. Mel'nyk, I. I. Konvalyuk, V. A. Kunakh

Genome variability of some *Gentiana* L. species in nature and in culture *in vitro*: RAPD-analysis

Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine  
150, Akademika Zabolotnogo Str., Kyiv, Ukraine, 03680

<sup>1</sup>Volodymyr Hnatiuk Ternopil' National Pedagogical University  
2, M. Kryvonosa Str., Ternopil', Ukraine, 46027

#### Summary

**Aim.** Investigation of intraspecies and somaclonal variability of *G. acaulis*, *G. cruciata* and *G. punctata*. **Methods.** Random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction (RAPD-PCR), gel-electrophoresis. **Results.** It was established a species specificity for indicators of gentians genetic heterogeneity – the proportion of polymorphic amplicons and genetic distances. A level of intraspecies variation decreased in the direction of *G. acaulis* > *G. punctata* > *G. cruciata*. Changes in gentians tissue culture by the proportion of polymorphic amplicons were shown to vary within the range of 10–15 % and failed to extend beyond the intraspecies variation. **Conclusions.** Genome variation of *G. acaulis*, *G. cruciata* and *G. punctata* was studied through the use of RAPD-PCR. The gentians were found to be characterized by different variability in both nature and culture *in vitro*. In the tissue culture there were discovered considerably smaller number changes as compared to intraspecies variation.

**Keywords:** genome variability, *Gentiana* L. species, plant tissue culture, intraspecies and somaclonal variation, RAPD-PCR.

M. O. Твардовская, Н. М. Дробык, В. Н. Мельник,  
И. И. Конвалюк, В. А. Кунах

Геномная изменчивость некоторых видов рода *Gentiana* L. в природе и в культуре *in vitro*: RAPD-анализ

#### Резюме

**Цель.** Исследовать внутривидовую и соматоклональную изменчивость *Gentiana acaulis*, *G. cruciata* и *G. punctata*. **Методы.** Полимеразная цепная реакция с праймерами произвольной последовательности (RAPD-ПЦР), гель-электрофорез. **Результаты.** Обнаружена видоспецифичность показателей генетической гетерогенности горечавок – процента полиморфных ампликонов и генетических расстояний. Уровень внутривидовой изменчивости уменьшается в ряду *G. acaulis* > *G. punctata* > *G. cruciata*. Показано, что изменения в культуре тканей горечавок по содержанию полиморфных ампликонов лежат в диапазоне 10–15 % и не выходят за границы внутривидовой вариабельности. **Выводы.** Методом RAPD-ПЦР исследована геномная изменчивость *G. acaulis*, *G. cruciata* и *G. punctata*. Установлено, что горечавки характеризуются различной вариабельностью как в

природе, так и в культуре *in vitro*. В культуре тканей обнаружены значительно меньшие изменения по сравнению с внутривидовой изменчивостью.

**Ключевые слова:** геномная изменчивость, виды рода Горечавка (*Gentiana* L.), культура тканей растений, внутривидовая и соматоклональная вариабельность, RAPD-ПЦР.

#### PERELIK LITERATURY

1. Red data Book of Ukraine. Plants and Fungy / 2 ed.–Kyiv: M. Bazhan Ukr. encyclopedia, 1996.–608 p.
2. Strashniuk N. M., Hrytsak L. R., Les'kova O. M., Mel'nyk V. M. Introduction in culture *in vitro* of some *Gentiana* L. genus species // *Physiol. and Biochem. of Cultivated Plants*.–2004.–**36**, N 4.–P. 327–334.
3. Strashniuk N. M., Twardovska M. O., Mel'nyk V. M. Introduction in culture *in vitro* of *Gentiana cruciata* L. and *Gentiana pneumonanthe* L. species // *Nauk. zap., Ser. Biol. (Ternop. nats. pedagog. univ. im. Volodymyra Gnatuka)*.–2006.–N 2 (29).–P. 100–107.
4. Pat. of Ukraine on a useful model N 36436 dated by 27.10. 2008. Method to gain of non- transgenic root isolated culture of gentians (*Gentiana* L.) / N. M. Strashniuk, L. R. Hrytsak, V. M. Mel'nyk, M. O. Twardovska, I. I. Konvalyuk, V. A. Kunakh // *Bull.* N 20.
5. Mel'nyk V. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Restriction mapping and variability of 18S-25S ribosomal genes in some species of *Gentiana* genus // *Cytology and Genetics*.–2003.–**37**, N 5.–P. 65–71.
6. Andreev I. O., Spiridonova K. V., Mel'nyk V. M., Kunakh V. A. Interspecies polymorphism and rearrangements in culture *in vitro* of 5S rRNA genes in *Gentiana* L. species // *Repts Nat. Acad. Sci. Ukr.*–2004.–N 6.–P. 189–192.
7. Strashniuk N. M., Twardovska M. O., Mel'nyk V. M. Karyology of some European species of *Gentiana* L. (*Gentianaceae*) // *Ukr. Bot. Zhur.*–2008.–**65**, N 6.–P. 836–848.
8. Twardovska M. O., Strashniuk N. M., Mel'nyk V. M., Konvalyuk I. I., Kunakh V. A. RAPD-analysis of the genome polymorphism for some *Gentiana* L. species from the Ukrainian flora // *Repts Nat. Acad. Sci. Ukr.*–2009.–N 5.–P. 200–204.
9. Mel'nyk V. M., Spiridonova K. V., Andreev I. O., Strashniuk N. M., Kunakh V. A. Variability of nuclear 18S-25S rDNA of *Gentiana lutea* L. in nature and in tissue culture *in vitro* // *Cytology and Genetics*.–2004.–**38**, N 3.–P. 16–21.
10. Mel'nyk V. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Strashniuk N. M., Kunakh V. A. 18S-25S rDNA variation in tissue culture of some *Gentiana* L. species // *Cytology and Genetics*.–2007.–**41**, N 2.–P. 19–23.
11. Twardovska M. O., Strashniuk N. M., Mel'nyk V. M., Kunakh V. A. Evaluation of some *Gentiana* L. species tissue culture genetic variation // *Bull. of Vavilov Soc. Geneticists and Breeders of Ukr.*–2007.–**5**, N 1–2.–P. 104–111.
12. Twardovska M. O., Strashniuk N. M., Mel'nyk V. M., Adonin V. I., Kunakh V. A. Chromosomal variability in a tissue culture of rare species of the genus *Gentiana* L. // *Cytology and Genetics*.–2008.–**42**, N 4.–P. 12–17.
13. Yeh F. C., Rongcai Y., Boyle T. POPGENE. Version 1.31.–Edmonton: Univ. Alberta, 1999.
14. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.–1979.–**76**, N 10.–P. 5269–5273.



15. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolution genetics analysis and sequences alignment // Briefin. Bioinf.–2004.–**5**, N 2.–P. 150–163.
16. Nevo E. E. Evolution of genome-phenome diversity under environmental stress // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.–2001.–**98**, N 11.–P. 6233–6240.
17. Ward S. Genetic analysis of invasive plant populations at different spatial scales // Biol. Invas.–2006.–**8**, N 3.–P. 541–552.
18. Roman B., Hernandez R., Pujadas-Salva A. J., Cubero J. I., Rubiales D., Satovic Z. Genetic diversity in two variants of *Orobanchae gracilis* Sm. [var. *gracilis* and var. *deludens* (Beck) A. Pujadas] (*Orobanchaceae*) from different regions of Spain // Electron. J. Biotechnol.–2007.–**10**, N 2.–P. 221–229.
19. Fisher M., Matthies D. RAPD variation in relation to population size and plant fitness in the rare *Gentianella germanica* (*Gentianaceae*) // Am. J. Bot.–1998.–**85**, N 6.–P. 811–819.
20. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Muzyka V. I., Kolonina I. V., Kunakh V. A. Genetic heterogeneity of the rare endemic species *Ungernia victoris* (*Amaryllidaceae*): RAPD-analysis // Ukr. Bot. Zhur.–2008.–**65**, N 3.–P. 445–452.
21. Martirosyan E. V., Ryzhova N. N., Skryabin K. G., Kochieva E. Z. RAPD analysis of genome polymorphism in the family *Lemnaceae* // Russ. J. Genet.–2008.–**44**, N 3.–P. 417–422.
22. Serebryakova T. I. Models of shoot formation and some evolutionary trends in the genus *Gentiana* L. // Bull. MOIP Sect. Biol.–1979.–**84**, N 6.–P. 97–109.
23. Hungerer K. B., Kadereit J. W. The phylogeny and biogeography of *Gentiana* L. sect. *Ciminalis* (Adans.) Dumort.: A historical interpretation of distribution ranges in the European high mountains // Persp. Plant Ecol., Evol. and System.–1998.–**1**, N 1.–P. 121–135.
24. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Mozhylevska L. P., Kunakh V. A. Studies on the genome variability in *Ungernia victoris* tissue culture through RAPD-markers // Bull. of Vavilov Soc. Geneticists and Breeders of Ukr.–2006.–**4**, N 1.–P. 3–11.
25. Bublyk O. M., Andreev I. O., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Somaclonal variability of *Ungernia victoris*: the necessity of comprehensive genetic analysis // Biopolym. cell.–2008.–**24**, N 6.–P. 487–493.
26. Kozyrenko M. M., Artyukova E. V., Lauve L. S., Boltentkov E. V. The analysis of genetic variability of callus cultures of several species of *Iris* L. genus // Russ. J. Biotechnol.–2002.–**4**.–P. 38–48.
27. Solov'yan V. T., Spiridonova K. V., Kunakh V. A. Genome rearrangements in cell culture of *Rauwolfia serpentina*: Diverse pattern of genome variations // Russ. J. Genet.–1994.–**30**, N 2.–P. 250–254.
28. Kozyrenko M. M., Artyukova E. V., Lauve L. S., Zhuravlev Yu. N., Reunova G. D. The genetic variability of *Panax ginseng* callus lines // Russ. J. Biotechnol.–2001.–**1**.–P. 19–26.
29. Twardovska M. O., Strashniuk N. M., Mel'nyk V. M., Adonin V. I., Kunakh V. A. Chromosome number variability and chromosome aberration level in *Gentiana acaulis* L. tissue culture // Bull. of Vavilov Soc. Geneticists and Breeders of Ukr.–2006.–**4**, N 2.–P. 204–209.

UDC 575.22: 582.923.1 + 576.5  
Received 28.07.09