

Д.А. ЗУБОВ, Г.П. КАШЕВАРОВ, С.Я. ДИДЕНКО, О.Б. БЛЮМ

Национальный ботанический сад им. Н.Н. Гришко НАН Украины  
Украина, 01014 г. Киев, ул. Тимирязевская, 1

## АНАЛИЗ ДНК-ПОЛИМОРФИЗМА ИНТРОДУЦИРОВАННЫХ ВИДОВ РОДА GALANTHUS L. (AMARYLLIDACEAE J. ST.-HIL.) С ПОМОЩЬЮ RAPD-МАРКЕРОВ

Приведены результаты изучения ДНК-полиморфизма украинских и кавказских видов подснежников (*Galanthus* L.), интродуцированных в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины: *Galanthus alpinus*, *G. angustifolius*, *G. elwesii* *ucr. auct.*, *G. lagodechianus*, *G. nivalis*, *G. plicatus* и *G. woronowii*. По результатам RAPD-анализа электрофореграмм, полученных при помощи 16 декаолигонуклеотидных маркеров, выявлены видоспецифические фрагменты ДНК (ампликоны). Генотипические отличия, обнаруженные у морфологически неоднородных растений *G. elwesii* *ucr. auct.* (с узколанцетовидным и широколанцетовидным листом), *G. alpinus* *var. alpinus*, а также различия, выявленные между растениями *G. plicatus*, произрастающими за пределами основного в Украине (крымского) ареала в урочище «Холодный Яр» (Черкасская обл.) и в Крыму, свидетельствуют о наличии у этих видов внутривидовой и внутривидовой изменчивости, которая требует дальнейшего специального изучения. Для выяснения таксономического статуса произрастающего в Одесской и Николаевской областях критического вида *G. elwesii* *ucr. auct.* необходимо провести сравнительные молекулярные исследования его и *G. cfr. graecus*.

Относительно молодой в эволюционном плане и сложный в систематическом отношении род *Galanthus* L. в настоящее время, согласно последней монографической обработке А. Дэвиса и дополнениям, включает 20 видов [3, 13, 16]. Центрами видообразования и биоразнообразия представителей рода является Кавказ (первичный центр), в частности Западное Закавказье (Колхидская низменность), а также Малая Азия и Средиземноморье.

В последнее время в изучении данного рода активно развивается филогенетическое направление. Проведены кариологические, молекулярные и кладистические исследования, выявившие генетически родственные расы подснежников независимо от морфологических признаков. Особенно значимыми в данном аспекте оказались результаты сравнения существующих таксонов рода на основании определенных последовательностей ДНК пластидного и ядерного геномов [10, 12, 19–21, 23]. Эти

данные позволили выявить родительские пары естественных интрогрессивных и сложных в систематическом аспекте рас (природных гибридов) подснежников.

До настоящего времени остается неясным вопрос относительно видового состава рода *Galanthus* L. на территории Украины. Так, в последнем издании «Определителя высших растений Украины» и «Червоної книги України. Рослинний світ» [9, 11] приведены три вида подснежников: *G. nivalis* L., *G. plicatus* M. Bieb. и *G. elwesii* Hook. f. По мнению других исследователей [4, 8], во флоре Украины насчитывается четыре вида: *G. nivalis*, *G. plicatus*, *G. elwesii* и *G. graecus* Orph. ex Boiss. Известный морфолог растений и знаток семейства *Amaryllidaceae* З.Т. Артюшенко считала, что в Украине произрастает только разновидность *G. elwesii* — *G. elwesii* *var. maximus* (Velen.) G. Beck [1]. Английский монограф рода А. Дэвис для Украины также приводит четыре вида [16], однако вместо *G. graecus* он указывает *G. gracilis* Čelak.

После совместной украино-британской экспедиции по Киевской и Одесской обла-

стям в марте 2011 г. (В.И. Мельник, Д.А. Зубов, С.Я. Диденко — НБС им. Н.Н. Гришко, Киев, Украина; А. Дэвис, А. Триас-Бласи — Королевские ботанические сады, Кью, Великобритания) А. Дэвис пересмотрел свою точку зрения. В результате проведенных полевых исследований растений в Одесской области, а также согласно недавно полученным им молекулярно-генетическим данным (маркеры пластидного генома *matK* и *trnL-F*), *G. elwesii ucr. auct.* из Одесской области оказался полностью идентичным расам *G. elwesii*, произрастающего в Греции. В то же время украинские и греческие растения по тем же маркерам четко отличаются от истинного *G. elwesii* (широкие (1,5–3,6 см), прямостоячие, слегка штопоровидно закрученные листья; охватывающее почкосложение; две выраженные продольные складки на адаксиальной стороне листовой пластинки; верхушка внутренней доли околоцветника прямая, неотвернутая у синуса), произрастающего только в южной Турции в горах Тавра (А.Р. Davis, личное сообщение).

Что касается *G. gracilis fide* Davis (листья узкие, 0,3–0,6 см шириной, штопоровидно закрученные, лежачие; плоское почкосложение; верхушка внутренней доли околоцветника с отвернутыми кнаружи краями у синуса), описанного из Болгарии, то, скорее всего, он произрастает только на континентальной территории западной Турции и греческого о. Самос и не встречается на Балканском полуострове (Болгария, Румыния, континентальная Греция, западная оконечность эгейского побережья Турции), в Причерноморской низменности и на Бессарабской возвышенности (Украина, Молдова) (А.Р. Davis, личное сообщение). Вероятнее всего, растения из Одесской и Николаевской областей, как и греческие (кроме растений с о. Самос), следует рассматривать как весьма полиморфный вид — *G. graecus* (листья от узких до широких (0,8–2,3 см шириной), без продольных складок на адаксиальной стороне, прямостоячие, слегка штопоровидно закрученные; почкосложение от плоско-

го до охватывающего; верхушка внутренней доли околоцветника с отвернутыми кнаружи краями у синуса). Растение *G. graecus* было собрано на греческом о. Хиос и описано Т. Орфанидисом в 1882 г. (гора Пеллинос, 1140 м н. у. м., type G). Общий ареал этого вида лежит, по-видимому, в пределах Юго-Восточной Европы (включая Украину), Средиземноморья (острова Хиос, Лесбос, Тасос) и Западной Азии (западная оконечность эгейского побережья Турции). Видовую самостоятельность *G. graecus* отстаивал и румынский ботаник К. Захариади [5, 22].

Иными словами, таксономия растений видов *G. elwesii* (*nom. cons. prop.*, A. Davis, 1997 [14, 16], *holotype* K by Elwes, 1874 — западная часть Турции, окрестности Измира, Маниса-Даг, 610–914 м н. у. м.; *conserved type* K by Danford, 1879 — южная часть Турции, окрестности Аданы, Гяур-Даг, 610 м н. у. м.), *G. graecus* и *G. gracilis* (*nom. cons. prop.*, A. Davis, 1999 [14, 16], *holotype* PR by Milde, 1890 — северо-восточная Болгария, окрестности Шумена) на данный момент весьма запутана и требует прояснения на основе дальнейшего изучения их морфологических признаков, ареалов, а также исследования при помощи молекулярных маркеров их пластидного (*matK*, *trnL-F*) и ядерного геномов (ITS). В этой связи мы считаем целесообразным временно рассматривать подснежник, произрастающий в Одесской и Николаевской областях, как *G. elwesii ucr. auct.* до окончательного прояснения таксономического статуса обоих критических видов — *G. elwesii* и *G. graecus*.

Кроме того, как отмечает А. Дэвис [15], более ранним синонимом болгарского *G. gracilis fide* Davis необходимо считать *G. reflexus* Herb. — таксон, описанный из Турции, который, по-видимому, требует восстановления с приведением неотипа растений, собранных именно в Турции, но с сохранением за ним общепринятой концепции вида *G. gracilis fide* Davis (листья узкие, 0,3–0,6 см шириной, штопоровидно закрученные, лежачие; плоское поч-

косложение; верхушка внутренней доли околоцветника с отвернутыми кнаружи краями у синуса) [16]. Ранее таксон *G. reflexus* был ошибочно отвергнут (*nom. rej. prop.*, А. Дэвис, 2000, *type not preserved*, северо-западная Турция, вилайеты<sup>1</sup> Чанаккале и Баликезир, Каз-Даг, *leg. Lauder*, 1845) [15, 16]. По нашему мнению, именно *G. gracilis sensu* Čelakovsky, описанный с Балканского полуострова (Болгария), а не *G. reflexus*, описанный из Малой Азии (Турция), следует считать синонимом *G. graecus*, который был описан с о. Хиос (Греция).

Таким образом, при изучении критических видов *Galanthus*, в том числе и упомянутых выше, все большее значение приобретает привлечение методов молекулярных маркеров, одним из которых является метод RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA)-ПЦР (полимеразная цепная реакция). В данной молекулярной технике используют определенную последовательность ДНК образцов изучаемых растений, которую затем выборочно амплифицируют в миллионы раз, что позволяет получить большое количество фрагментов-копий ДНК (так называемых ампликонов). Далее ампликоны разделяют на фрагменты ДНК различной молекулярной массы посредством электрофореза в агарозном геле. Такие ДНК являются уникальными отпечатками (*fingerprints*), которые свидетельствуют о наличии генетических различий/сходства как на видовом, так и на внутривидовом уровне. Ценность метода RAPD-ПЦР заключается в том, что он позволяет получить необходимые дополнительные характеристики при изучении тех таксонов, которые не имеют заметных морфологических или анатомических отличий.

Целью настоящего исследования было молекулярное изучение представленных в коллекции НБС произрастающих в Украине и на Кавказе видов рода *Galanthus*, в

частности, таких критических видов, как *G. elwesii* — *G. graecus* и *G. angustifolius* *G. Koss* — *G. alpinus* *Sosn. var. alpinus*. Особый интерес также представляло выяснение вопроса о таксономической идентичности подснежника, произрастающего в Черкасской области (урочище «Холодный Яр»), *G. plicatus*, произрастающему в Крыму.

### Материалы и методы

Материалом для исследования послужили растения 7 видов *Galanthus* (11 образцов), интродуцированных в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины: 1 — *Galanthus nivalis* (Киевская обл., Украина); 2 — *Galanthus angustifolius* (Кабардино-Балкарская Республика, РФ); 3 — *Galanthus elwesii* *ucr. auct.* с узколанцетовидным листом и плоским почкосложением (Одесская обл., Украина); 4 — *Galanthus elwesii* *ucr. auct.* с широколанцетовидным листом и охватывающим почкосложением (Одесская обл., Украина); 5 — *Galanthus plicatus* (мутантное растение «Трум», урочище «Холодный Яр», Черкасская обл., Украина); 6 — *Galanthus plicatus* (АР Крым, Украина); 7 — *Galanthus plicatus* (урочище «Холодный Яр», Черкасская обл., Украина); 8 — *Galanthus lagodechianus* *Kem.-Nath.* (урочище «Лагодехи», Грузия); 9 — *Galanthus alpinus* *var. alpinus* (Грузия); 10 — *Galanthus alpinus* *var. alpinus* (Грузия); 11 — *Galanthus woronowii* *Losinsk.* (урочище «Казачья Щель», окрестности Туапсе, РФ).

Из свежих листьев растений выделяли ДНК с использованием цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ) согласно общепринятому протоколу [13]. Спектральные характеристики полученных образцов ДНК и ее количество определяли с помощью спектрофотометра «Nano-Drop» (США). ДНК изучали методом RAPD-ПЦР с использованием 16 декаолигонуклеотидных праймеров (табл. 1, 2). Реакционная смесь для проведения ПЦР объемом 25 мкл содержала:

20 нг ДНК, 0,2 мМ dNTP, 2,0 U Taq-полимеразы, 0,6 мМ праймера, 15 мМ Tris-Cl

<sup>1</sup> Вилает — основная административно-территориальная единица в Турции.

**Таблица 1. Характеристика RAPD-праймеров, использованных для анализа полиморфизма растений *Galanthus cfr. elwesii***

№	Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Учено фрагментов, шт.	Полиморфных фрагментов, шт.	% полиморфизма
1	OPP-01	GTAGCACTCC	18	3	16,7
2	OPP-02	TCGGCACGCA	23	3	13,0
3	OPP-03	CTGATACGCC	11	2	18,2
4	OPP-04	GTGTCTCAGG	8	0	0
5	OPP-05	CCCCGGTAAC	21	5	23,8
6	OPP-06	GTGGGCTGAC	10	0	0
7	OPP-07	GTCCATGCCA	13	0	0
8	OPP-08	ACATCGCCCA	20	0	0
9	OPP-09	GTGGTCCGCA	16	2	12,5
10	OPP-10	TCCCGCCTAC	22	6	27,3
11	OPP-11	AACGCGTCCG	14	2	14,3
12	OPP-12	AAGGGCGAGT	12	3	25,0
13	MACH-1	TCCACCGAGC	14	2	14,3
14	MACH-6	GAGCCAACCG	12	0	0
15	MACH-7	AGTCAGCCAC	15	1	6,7
16	MACH-9	AGGTGACCGT	15	1	6,7
	В целом		244	30	12,3

с рН 8,3, 75 мМ КСl, 0,06 мг/мл BSA, 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. На реакцию смесь наносили 15 мкл минерального масла. В качестве негативно-го контроля использовали стандартную реакцию смесь без ДНК.

ПЦР проводили при помощи амплификатора «CreaCon» (Нидерланды) в следующем температурном режиме: 94 °С — 5 мин, 35 циклов (94 °С — 1 мин, 33 °С — 1 мин, 72 °С — 1 мин) и 72 °С — 7 мин. Температура гибридизации ( $t_{\text{гипр.}}$ ) для праймеров составляла 33 °С. Все реакции повторяли с целью обеспечения их воспроизводимости.

Продукты амплификации (10 мкл) разделяли при помощи электрофореза в 1,7 % агарозном геле с трис-боратным буфером с этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА) и окрашивали бромистым этидием для визуализации в ультрафиолетовом све-

**Таблица 2. Характеристика RAPD-праймеров, использованных для анализа полиморфизма растений *Galanthus plicatus***

№	Праймер	Нуклеотидная последовательность (5'–3')	Учено фрагментов, шт.	Полиморфных фрагментов, шт.	% полиморфизма
1	OPP-01	GTAGCACTCC	14	2	14,3
2	OPP-02	TCGGCACGCA	16	3	18,7
3	OPP-03	CTGATACGCC	8	0	0
4	OPP-04	GTGTCTCAGG	10	0	0
5	OPP-05	CCCCGGTAAC	20	5	25,0
6	OPP-06	GTGGGCTGAC	12	0	0
7	OPP-07	GTCCATGCCA	11	2	18,2
8	OPP-08	ACATCGCCCA	15	3	20,0
9	OPP-09	GTGGTCCGCA	13	2	15,4
10	OPP-10	TCCCGCCTAC	22	10	45,4
11	OPP-11	AACGCGTCCG	19	5	26,3
12	OPP-12	AAGGGCGAGT	15	0	0
13	MACH-1	TCCACCGAGC	15	3	20,0
14	MACH-6	GAGCCAACCG	11	4	36,4
15	MACH-7	AGTCAGCCAC	12	3	25,0
16	MACH-9	AGGTGACCGT	12	2	16,7
	В целом		225	44	19,5

те. Таq-полимераза, NTP (смесь дезокси-нуклеотидтрифосфатов), а также ДНК маркер (GeneRuller™ 100 bp Plus DNA Ladder) были получены от компании «Fermentas» (Литва). Гели фотографировали в УФ-свете (254 нм) при помощи трансиллюминатора с системой фотодокументации (Vilbert Lourmat, Франция).

### Результаты и обсуждение

Типичные электрофореграммы, полученные при помощи 16 десятимерных олигонуклеотидных праймеров приведены на рис. 1. При анализе электрофореграмм учитывали как мажорные, так и минорные ПЦР-фрагменты (полосы, ампликоны или локусы). На большинстве электрофореграмм каждый из изученных видов *Galanthus L.* имел индивидуальные RAPD-фрагменты,



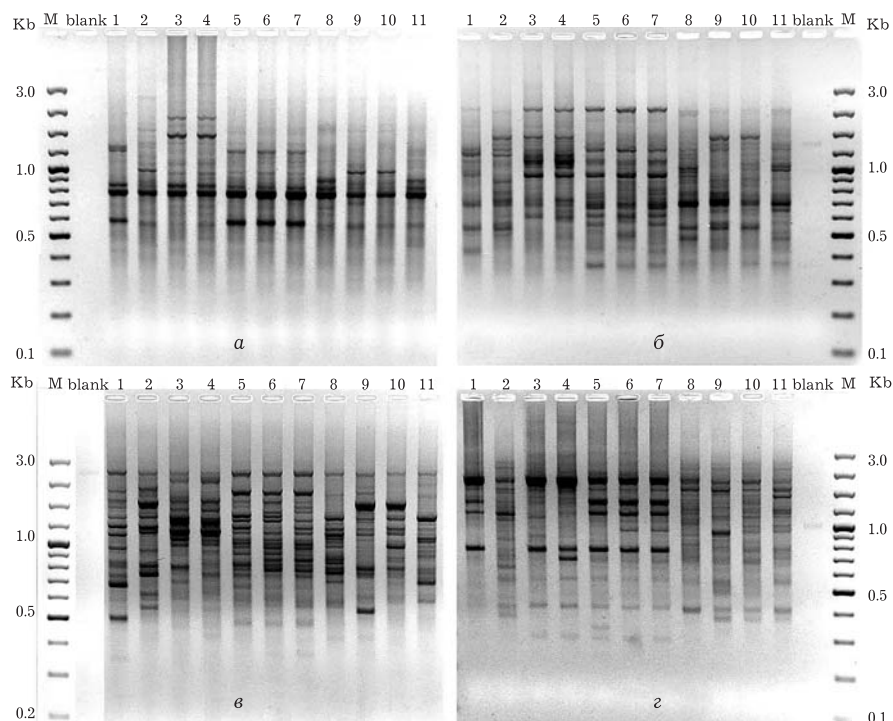


Рис. 1. Электрофоретические спектры RAPD-фрагментов, полученные при помощи разных праймеров и характеризующие генетическую гетерогенность растений рода *Galanthus* L.: а) праймер OPP-07; б) праймер OPP-08; в) праймер OPP-11; г) праймер MACH-9; М — маркер молекулярной массы (100 bp Plus DNA Ladder, «Fermentas»); 1–11 — номера исследованных растений: 1 — *G. nivalis*; 2 — *G. angustifolius*; 3 — *G. elwesii* *ucr.* (с узколанцетовидным листом); 4 — *G. elwesii* *ucr. auct.* (с широколанцетовидным листом); 5 — *G. plicatus* (урочище «Холодный Яр», мутантное растение «Трум»); 6 — *G. plicatus* (АР Крым); 7 — *G. plicatus* (урочище «Холодный Яр»); 8 — *G. lagodechianus*, 9, 10 — *Galanthus alpinus*; 11 — *G. woronowii*

отличающиеся наличием или отсутствием определенных ампликонов.

Электрофореграммы морфологически хорошо очерченных видов *G. lagodechianus* и *G. woronowii* (образцы 8 и 11 соответственно) имели в большей или меньшей степени отчетливо выраженные генотипические отличия по всем праймерам, кроме OPP-04 и OPP-07, по которым они оказались идентичными. Наибольшее количество отличающихся ампликонов (5–12) на электрофореграммах этих видов было обнаружено для праймеров OPP-02, OPP-05, OPP-06, OPP-10, OPP-11, MACH-1 и MACH-7. *G. lagodechianus* является гексаплоидной циторасой, возникшей, вероятно,

в результате воздействия экстремальных условий плейстоценового оледенения [10, 12], а *G. woronowii* — эндемиком и реликтом Западного Закавказья (Колхида) и представляет собой наиболее древнюю морфу подснежников с апикальным синусом на внутренних долях околоцветника (однако не самую древнюю в роду).

Подснежники *G. nivalis* (образец 1) и *G. angustifolius* (образец 2) имели отчетливые генотипические отличия практически по всем 16 маркерам (праймерам), что подтверждает их несомненный видовой статус и опровергает мнение З.Т. Артюшенко [1] о необходимости рассмотрения *G. angustifolius* не как самостоятельного вида, а как

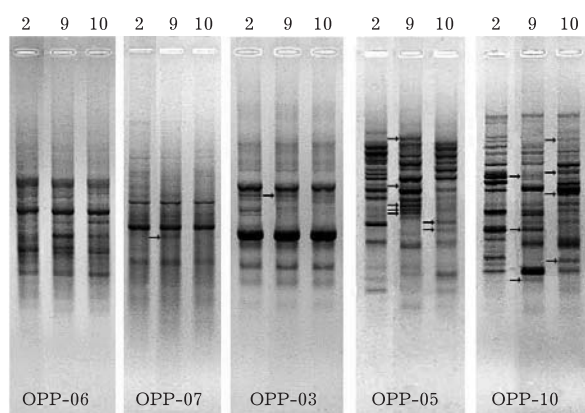


Рис. 2. Электрофоретические спектры RAPD-фрагментов генетически близких видов *Galanthus angustifolius* (2) и *G. alpinus var. alpinus* (образцы 9, 10), полученные при помощи разных праймеров. Полиморфные фрагменты обозначены стрелками

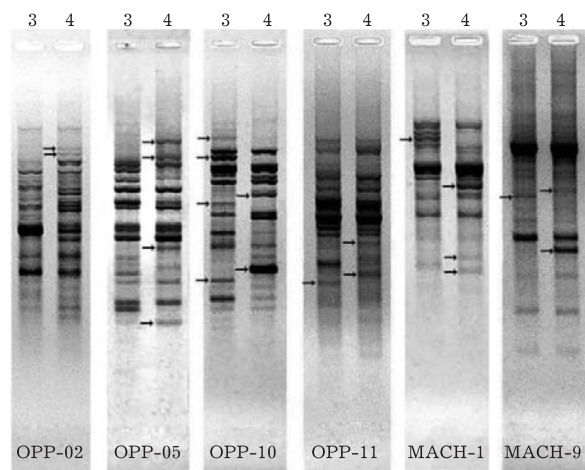


Рис. 3. Электрофоретические спектры RAPD-фрагментов морфологически различных типов *Galanthus elwesii ucr. auct.*: 3 — с узколанцетовидным листом и плоским почкосложением; 4 — с широколанцетовидным листом и охватывающим почкосложением. Полиморфные фрагменты обозначены стрелками

подвида *G. nivalis subsp. angustifolius* (G. Koss) Artjush. О самостоятельности этих двух видов свидетельствует и тот факт, что они отличаются и своими ареалами: *G. nivalis* — Южная и Средняя Европа, а *G. angustifolius* — Центральный Кавказ [2, 16].

Подснежники *G. angustifolius* (образец 1 — растения с узким листом и плоским почкосложением, Кабардино-Балкарская Республика, РФ) и *G. alpinus var. alpinus* (образцы 9, 10 — растения с широким листом и охватывающим почкосложением, Грузия) генотипически оказались весьма сходными (рис. 2). Их электрофореграммы имели существенные отличия только для праймеров OPP-05 (по 8 ампликонам) и OPP-10 (по 4 ампликонам). Для праймеров OPP-06 и OPP-07 они оказались идентичными, а для всех остальных изученных праймеров выявлены незначительные отличия по 1–3 локусам. По-видимому, как и предполагал Ю. Кос [6], описавший *G. angustifolius*, этот подснежник генетически очень близок к расам смежно-симпатрического *G. alpinus s. l.*

Образцы *G. elwesii ucr. auct.* из Одесской области, имевшие некоторые морфологические отличия (образец 3 — растение с узколанцетовидным листом и плоским почкосложением, похожее на *G. graecus*, и образец 4 — растение с широколанцетовидным листом и охватывающим почкосложением, похожее на *G. elwesii*), имели генотипически идентичные электрофореграммы для 6 праймеров (OPP-03, OPP-04, OPP-06, OPP-07, OPP-08, OPP-09) и незначительные отличия в количестве и расположении ампликонов на электрофореграммах, полученных с праймерами OPP-01, OPP-11, OPP-12, MACH-6 и MACH-7. Наибольшая полиморфность между этими образцами была обнаружена по праймерам OPP-02, OPP-05, OPP-10, MACH-1 и MACH-9 (рис. 3).

Общий уровень полиморфизма в спектрах продуктов амплификации у этого подснежника составил 12,3 % (см. табл. 1). Вероятнее всего, в Причерноморской низменности и на Бессарабской возвышенности (Одесская и Николаевская обл.) мы имеем дело с единой интрогрессивной (с наличием обратного скрещивания) расой подснежников (которую в данной статье мы рассматриваем как *G. elwesii ucr. auct.*), как и в

случае с *G. × valentinei nothosubsp. subplicatus* A. P. Davis, являющимся природным гибридом между *G. nivalis* и *G. plicatus* M. Bieb. *subsp. byzantinus* (Baker) D.A. Webb. [18]. Очевидно, что в указанных выше областях Украины никакой вид-двойник подснежника не произрастает, нужно только определиться, в качестве какого именно вида рассматривать эту единую интрогрессивную расу: как *G. elwesii ucr. auct.* или как *G. cfr. graecus*. Таким образом, на территории Украины произрастает не четыре, как считалось ранее [4, 8, 16], а три вида подснежников, а именно: *G. nivalis*, *G. plicatus* и *G. elwesii ucr. auct.*

Электрофореграммы образцов *G. plicatus*, произрастающего за пределами основного в Украине (крымского) ареала в урочище «Холодный Яр» (Черкасская обл.), включая мутантное растение «Трум»<sup>2</sup> (образцы 7 и 5 соответственно), и в Крыму (образец 6), оказались идентичными по 5 праймерам (OPP-03, OPP-04, OPP-06, OPP-07 и OPP-12), однако имели определенные отличия (по 1–5 локусам) по остальным праймерам. Наибольшие отличия у этого подснежника были отмечены для праймеров OPP-05 и OPP-10 — соответственно по 4 и 5 локусам (рис. 4), а общий уровень полиморфизма в спектрах продуктов амплификации составил 19,5 % (табл. 2). Несомненно, эти генотипические отличия связаны с внутривидовой и внутривидовой изменчивостью *G. plicatus*, которая требует специального изучения. Более детальные молекулярно-генетические исследования с применением иных типов праймеров, а также других техник анализа позволят оценить уровень внутривидовой и межвидовой изменчивости у данного вида и дать окончательный ответ на вопрос об автохтонности рассматриваемой расы подснежника из Черкасской области.

<sup>2</sup> Это растение имеет по три равные доли с апикальным синусом в обоих кругах околоцветника.

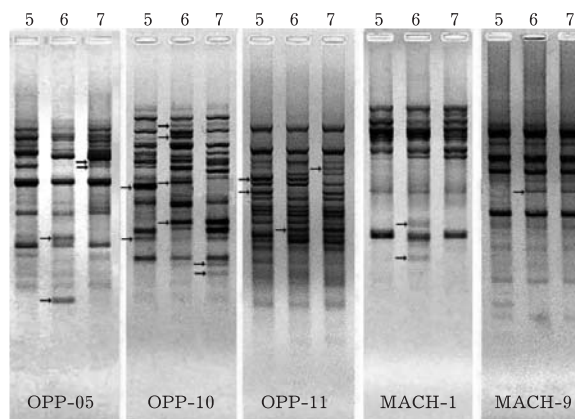


Рис. 4. Электрофоретические спектры RAPD-фрагментов растений из различных популяций *Galanthus plicatus*: 5 — урочище «Холодный Яр», Черкасская обл., мутантное растение «Трум»; 6 — АР Крым; 7 — урочище «Холодный Яр», Черкасская обл. Полиморфные фрагменты обозначены стрелками

## Выводы

1. По результатам RAPD-анализа полученных при помощи произвольно выбранных 16 декаолигонуклеотидных маркеров электрофореграмм интродуцированных в Национальном ботаническом саду им. Н.Н. Гришко НАН Украины видов рода *Galanthus* отобраны наиболее полиморфные маркеры (OPP-02, OPP-05, OPP-10, OPP-11, MACH-1, MACH-9) и выявлены видоспецифические фрагменты ДНК (ампликоны).

2. Генотипические отличия, обнаруженные у морфологически неоднородных растений *G. elwesii ucr. auct.* (с узколанцетовидным листом и плоским почкосложением и с широколанцетовидным листом и охватывающим почкосложением), у растений *G. alpinus var. alpinus*, а также между растениями *G. plicatus*, произрастающими за пределами основного в Украине (крымского) ареала в урочище «Холодный Яр» (Черкасская обл.) и в Крыму, свидетельствуют о наличии у этих видов внутривидовой и внутривидовой изменчивости, которая требует дальнейшего специального изучения.

3. Между морфологически хорошо очерченными видами подснежников — *G. nivalis* (образец 1), *G. lagodechianus* (образец 8) и *G. woronowii* (образец 11) — выявлены четкие генотипические отличия.

4. Необходимо провести дополнительные молекулярные исследования по сравнению украинского вида подснежника (*G. elwesii* *ucr. auct.*), произрастающего в Одесской и Николаевской областях, с видами подснежников из Молдовы, Болгарии, Румынии, материковой и островной Греции (*G. graecus*) и Турции (*G. elwesii* — горы Тавра; *G. gracilis* — хребет Каз-Даг) для четкого таксономического разграничения этих критических видов.

Авторы выражают благодарность Я.В. Пирко за советы и замечания при подготовке рукописи статьи, а также В.П. Грахову за оказанную помощь в оформлении рисунков.

1. Артюшенко З.Т. Амариллисовые (Amaryllidaceae Jaume St.-Hilaire) СССР. Морфология, систематика и использование. — Л.: Наука, 1970. — 180 с.

2. Артюшенко З.Т., Мордак Е.В. *Galanthus* L. // Конспект Флоры Кавказа: в 3 т. / Отв. ред. А.Л. Тахтаджян. — СПб.: Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2006. — Т. 2. — С. 161–165.

3. Габриэлян Э.Ц. *Galanthus artjuschenkoae* (Amaryllidaceae), новый вид из Армении и Тальша // Флора, растительность, растительные ресурсы Армении. — 1999. — Вып. 12. — С. 13–14.

4. Диденко С.Я. Види роду *Galanthus* L. (Amaryllidaceae) в природі і в культурі в Україні: Автореф. дис. ...канд. біол. наук. — К., 2000. — 19 с.

5. Захариади К. Морфология и таксономия некоторых видов рода *Galanthus* L. из СССР и РНР // Второй делегат. съезд Всесоюз. ботан. о-ва, 9–15 мая 1957 г. — Л.: Изд-во АН СССР, 1958. — С. 9–13.

6. Кос Ю.И. Новые кавказские виды рода *Galanthus* L. // Ботан. материалы Гербария Ботан. ин-та АН СССР. — 1951. — Вып. 14. — С. 130–138.

7. Мельник В.И., Диденко С.Я., Спрягайло А.В. *Galanthus plicatus* (Amaryllidaceae) — новый вид для флоры равнинной части Украины // Ботан. журн. — 2007. — 92, № 8. — С. 1154–1160.

8. Мельник В., Диденко С., Рак О. Порівняння географічних, еколого-ценотичних особливостей та структури популяцій *Galanthus elwesii* Hook. f. та *Galanthus graecus* Orph. ex Boiss. в Україні // 36. наук. пр. Полтав. держ. пед. ун-ту ім. В.Г. Короленка. Сер. Екологія. Біол. науки. — Полтава, 2007. — Вип. 6, № 58. — С. 33–47.

9. *Определитель* высших растений Украины / Под ред. Ю.Н. Прокудина. — К.: Наук. думка, 1987. — С. 402.

10. Свешникова Л.И. Сравнительно-кариологическое исследование рода *Galanthus* L. II. Секция *Viridifolii* // Ботан. журн. — 1971. — 56, № 2. — С. 282–293.

11. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я.П. Дідуха. — К.: Глобалконсалтинг, 2009. — С. 62–64.

12. Числа хромосом цветковых растений флоры СССР: Семейства Асеровые — Менуантовые / Под ред. А.Л. Тахтаджяна. — Л.: Наука, 1990. — С. 44–47.

13. Davis A.P., Özhatay N. *Galanthus trojanus*: a new species of *Galanthus* (Amaryllidaceae) from north-western Turkey // Bot. J. Linn. Soc. — 2001. — 137. — P. 409–412.

14. Davis A.P. (1307) Proposal to conserve the name *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae) with a conserved type // Taxon. — 1997. — 46, N 3. — P. 553–554.

15. Davis A.P. (1471) Proposal to reject the name *Galanthus reflexus* Herb. (Amaryllidaceae) // Ibid. — 2000. — 49, N 4. — P. 813–814.

16. Davis A.P. The Genus *Galanthus*. — Portland, Oregon: Timber Press, Inc. in ass. with Kew: Royal Botanic Garden, 1999. — 297 p.

17. Doyle J.J., Doyle J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue // Focus. — 1990. — 12. — P. 13–15.

18. Davis A.P., Byfield A., Özhatay N. et al. *Galanthus* × *valentinei* nothosubsp. *subplicatus* (Amaryllidaceae): a new *Galanthus* hybrid from north-western Turkey // Kew Bulletin. — 2001. — 56, N 3. — P. 639–647.

19. Lledo M.D., Davis A.P., Crespo M.B. et al. Phylogenetic analysis of *Leucojum* and *Galanthus* (Amaryllidaceae) based on plastid *matK* and nuclear ribosomal spacer (ITS) DNA sequence and morphology // Plant Syst. Evol. — 2004. — 246. — P. 223–243.

20. Taşçi N. The genetic diversity of the *Galanthus* L. species in Turkey: thesis for the degree of Master of Science. — Istanbul University, 2004. — 118 p.

21. Larsen M.M., Adersen A., Davis A.P. et al. Using a phylogenetic approach to selection of target



plants in drug discovery of acetylcholinesterase inhibiting alkaloids in Amaryllidaceae tribe Galantheae // Biochem. Syst. Ecol. — 2010. — 38, N 5. — P. 1026–1034.

22. Zahariadi C., Săvulescu T., Nyárády E.I. *Galanthus* L. // Fl. Reipub. Soc. România. — București: Fed. Acad. Reipub. Soc. România, 1966. — 11. — P. 406–413.

23. Zonneveld B.J.M., Grimshaw J.M., Davis A.P. The systematic value of nuclear DNA content in *Galanthus* // Plant Syst. Evol. — 2003. — 241. — P. 89–102.

Рекомендовал к печати Н.Б. Гапоненко

Д.О. Зубов, Г.П. Кашеваров,  
С.Я. Діденко, О.В. Блюм

Національний ботанічний сад  
ім. М.М. Гришка НАН України,  
Україна, м. Київ

АНАЛІЗ ДНК-ПОЛІМОРФІЗМУ  
ІНТРОДУКОВАНИХ ВИДІВ РОДУ *GALANTHUS* L.  
(AMARYLLIDACEAE J. ST.-HIL.)  
ЗА ДОПОМОГОЮ RAPD-МАРКЕРІВ

Наведено результати вивчення ДНК-поліморфізму українських та кавказьких видів підсніжників (*Galanthus* L.), інтродукованих у Національному ботанічному саду ім. М.М. Гришка НАН України: *Galanthus alpinus*, *G. angustifolius*, *G. elwesii* *ucr. auct.*, *G. lagodechianus*, *G. nivalis*, *G. plicatus* і *G. woronowii*. За результатами RAPD-аналізу електрофоретичних маркерів, виявлено видоспецифічні фрагменти ДНК (амплікони). Генотипові відмінності, виявлені у морфологічно неоднорідних рослин *G. elwesii* *ucr. auct.* (з вузьколанцетоподібним і широколанцетоподібним листком), у рослин *G. alpinus* *var. alpinus*, а також відмінності, виявлені між рослинами *G. plicatus*, що зростають за межами основного в Україні (кримського) ареалу в урочищі «Холодний Яр» (Черкаська обл.) і у Криму, свідчать про

наявність у цих видів внутрішньовидової та внутрішньопопуляційної мінливості, яка потребує подальшого спеціального вивчення. Для з'ясування таксономічного статусу критичного виду *G. elwesii* *ucr. auct.*, що зростає в Одеській та Миколаївській областях, необхідно провести порівняльні молекулярні дослідження його та *G. cfr. graecus*.

D.A. Zubov, G.P. Kashevarov,  
S.Ya. Didenko, O.V. Blum

M.M. Gryshko National Botanical Gardens,  
National Academy of Sciences of Ukraine,  
Ukraine, Kyiv

THE DNA-POLYMORPHISM ANALYSIS  
OF INTRODUCED *GALANTHUS* L. SPECIES  
(AMARYLLIDACEAE J. ST.-HIL.) USING  
RAPD-MARKERS

The results of the DNA polymorphism study of Ukrainian and Caucasian snowdrop (*Galanthus* L.) species introduced to M. M. Gryshko National Botanical Gardens — *Galanthus alpinus*, *G. angustifolius*, *G. elwesii* *ucr. auct.*, *G. lagodechianus*, *G. nivalis*, *G. plicatus* and *G. woronowii* are presented. RAPD-analysis of electrophoregrams obtained by mean of sixteen 10-mer oligonucleotide primers were performed. According to this results the intraspecific DNA fragments (amplicons) were detect. Genotypic differences found in morphologically heterogeneous plants of *G. elwesii* *ucr. auct.* (plants with narrow and broadly-lanceolate leaves), in plants of *G. alpinus* *var. alpinus*, and also the differences identified between *G. plicatus* growing outside the main Ukraine distribution area (Crimea) in the natural boundary *Kholodny Yar* (Cherkassy region) and Crimean *G. plicatus*, indicate the presence of intraspecific and intrapopulation variability in these species, which requires further special study. To clarify the taxonomic status of critical species *G. elwesii* *ucr. auct.* distributed in Odessa and Nikolaev regions its comparative molecular studies with *G. cfr. graecus* are necessary.