

Таксономічний статус *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss з території України за результатами аналізу вторинної структури послідовності ITS2

ОЛЕКСАНДРА АНАТОЛІВНА ЛЯХ
РОМАН ЯРОСЛАВОВИЧ КІШ
НАТАЛІЯ ІВАНІВНА КАРПЕНКО
ІГОР ЮРІЙОВИЧ КОСТИКОВ

Лях О.А., Кіш Р. Я., Карпенко Н.І., Костіков І.Ю. (2013). **Таксономічний статус *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss з території України за результатами аналізу вторинної структури послідовності ITS2.** *Чорноморськ. бот. ж.*, 9 (4): 497-506.

За результатами порівняльного аналізу вторинної структури послідовності ITS2 кластеру ядерних РНК-кодуєчих рибосомальних генів перевірено статус представника субальпійської популяції з території Українських Карпат, ідентифікованого за морфологічними критеріями як *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss. Встановлено, що за вторинною структурою ITS2 *Swertia alpestris* не відрізняється від представників інших популяцій, ідентифікованих як *Swertia perennis* L. Таксономічний статус *Swertia alpestris* обговорюється.

Ключові слова: систематика рослин, молекулярна таксономія, *Swertia alpestris*, *Swertia perennis*, вторинна структура ITS2, Україна

LIAKH A.A., KISH R.Y., KARPENKO N.I., KOSTIKOV I.Y. (2013). **Taxonomical status of *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss from the territory of Ukraine based on the analysis of the ITS2 secondary structure.** *Chornomors'k bot. z.*, 9 (4): 497-506.

Based on results of comparative ITS2 secondary structure sequence analysis from the nuclear-encoding ribosomal genes, species status was tested from subalpine population from Ukrainian Carpathian region that were identified using morphological criteria as *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss. It was found that at the secondary structure ITS2 *Swertia alpestris* has not differences from species of other populations, that were identified as *Swertia perennis* L. The taxonomical status of *Swertia alpestris* are discussed.

Key words: plant systematics, molecular taxonomy, *Swertia alpestris*, *Swertia perennis*, second structure ITS2, Ukraine

Лях А.А., Кіш Р.Я., Карпенко Н.І., Костіков І.Ю. (2013). **Таксономічний статус *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss с території України по результатам аналізу вторинної структури послідовності ITS2.** *Чорноморськ. бот. ж.*, 9 (4): 497-506.

На основе сравнительного анализа вторичной структуры последовательности ITS2 кластера ядерных РНК-кодирующих рибосомальных генов проверен таксономический статус представителя субальпийской популяции с территории Украинских Карпат, идентифицированного по морфологическим критериям как *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss. Установлено, что по вторичной структуре ITS2 *Swertia alpestris* не отличается от представителей других популяций, идентифицированных как *SWERTIA perennis* L. Таксономический статус *Swertia alpestris* обсуждается.

Ключевые слова: систематика растений, молекулярная таксономия, *Swertia alpestris*, *Swertia perennis*, вторичная структура ITS2, Украина

Балкано-середньоєвропейський високогірний вид *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss (Gentianaceae) був описаний М. Фузом в роботі Й.Х.Г. Баумгартена за зразками з високогір'я Роднянських гір Східних Карпат [FUSS, 1846]. Проте ще у XIX ст. видовий статус цього таксону був поставлений під сумнів. Так, Л. Сімонкаї запропонував розглядати його як *S. perennis* subsp. *alpestris* (Baumg. ex Fuss) Simonk., тобто як окремий підвид в межах розповсюдженого в Європі, переважно в горах, ліннеєвського виду [SIMONKAI, 1886]. У середньоєвропейських флористичних зведеннях погляди на *Swertia alpestris* як на внутрішньовидовий таксон або навіть як на окрему еколого-географічну расу *S. perennis* набули значного поширення. Так, у Карпатському регіоні *S. alpestris* у ранзі підвиду (тобто як *S. perennis* subsp. *alpestris*) наводиться для території історичної Угорщини [JAVORKA, 1924-1925], Словаччини [BERTOVA, 1984; DOSTAL, 1989] та Польщі [SZAFER, KULCZYCKI, PAWIOWSKI, 1988]. Підвидовий ранг цьому таксону надає й монограф роду *Swertia* в Європі Ж. Карпати [КАРПАТУ, 1970]. В роботах, присвячених флорі Румунії – країни, де знаходиться locus classicus *S. alpestris* – останню або розглядають як *S. perennis* var. *alpestris* (Baumg.) Sag. et Schn. [ТОРА, 1961], або зовсім про неї не згадують [BELDIE, 1977-1979]. У “Flora Europaea” *S. alpestris* разом із *S. punctata* Baumg. взагалі віднесена до молодших синонімів *S. perennis* [TUTIN et al., 1972].

В Україні у більшості флористичних зведень та у визначниках *S. alpestris* наводиться як окремий самостійний вид, що зростає в Українських Карпатах на високогір'ях Свидівця, Чорногори, Чивчину та Марамороських Альп [VYZNACHNYK..., 1950; VISYULINA, 1957; FODOR, 1974; VYZNACHNYK..., 1977; DOBROCHAEVA et al., 1987; MOSYAKIN, FEDORONCHUK, 1999]. Статус самостійного виду *S. alpestris* зберігає у “Флоре Европейской части СССР” [PISIAUKOVA, 1978]. Винятком є лише останнє видання Червоної книги України – в ньому *S. alpestris* включена в число синонімів *S. perennis*, наведеної як рідкісний вид з диз'юнктивним ареалом, що має природоохоронний статус “вразливий” [CHERVONA..., 2009]. Таким чином, питання про таксономічний статус *S. alpestris* до сьогодні залишається відкритим та дискусійним.

Протягом останніх 15-ти років у серії публікацій було показано, що в багатьох випадках питання щодо статусу критичних у систематичному відношенні таксонів, а також з'ясування їх місця у системі, може бути успішно вирішене шляхом молекулярно-генетичного аналізу послідовності ITS2 кластеру ядерних РНК-кодуєчих рибосомальних генів [MAI, COLEMAN, 1997; DENDUANGBORIPANT, CRONK, 2001; GOERTZEN et al., 2003; BUSCHNEIM et al., 2011]. Особливо результативним вважається порівняльний аналіз вторинної структури всіх чотирьох спіралей ITS2 з оцінкою наявності та кількості компенсаторних та напівкомпенсаторних змін основ (CBC – compensatory base changes, та hCBC – hemi-compensatory base changes відповідно) [COLEMAN, 2003, 2007].

У міжнародному банку генетичної інформації (NCBI) будь-які відомості про нуклеотидні послідовності *S. alpestris* наразі відсутні. Проте в цьому банку (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) депоновано 18 нуклеотидних послідовностей *S. perennis*, включаючи 11 послідовностей пластидного геному (переважно – транспортних РНК та спейсорів) та 7 послідовностей кластеру ядерних рибосомальних генів (по три послідовності першого та другого спейсорів, що транскрибуються (ITS1 та ITS2), та одна послідовність обох спейсорів).

Метою нашої роботи була оцінка за вторинною структурою ITS2 статусу представника української субальпійської популяції роду *Swertia*, який за поширенням та морфологічними ознаками відповідав *S. alpestris*.

Матеріали та методи дослідження

Матеріалом для дослідження слугував гербарний зразок *S. alpestris*, відібраний 10.07.2012 в популяції цього виду в Карпатах на г. Драгобрат масиву Свидовець в Закарпатській області (координати: 48°14.850' півн. шир., 024°14.557' сх. довг.) на висоті 1315 м над р. м. Зразок за морфологічними ознаками, наведеними в вітчизняних ключах [VYZNACHNYK..., 1977; DOBROCHAEVA et al., 1987] та ключах флористичних робіт країн Карпатського регіону [JAVORKA, 1924-1925; KARPATY, 1970; BERTOVA, 1984; DOSTAL, 1989], відповідав опису *S. alpestris*.

ДНК виділяли СТАБ-методом за модифікованою методикою, запропонованою для гербарних зразків [TAREEV et al., 2011]. Ампліфікацію проводили за [CHASSOT et al., 2001] на термоциклері Techne. При ампліфікації послідовності ITS здійснювали початкову денатурацію ДНК при 95°C протягом 15 хв. Температурний профіль ампліфікації протягом 30 циклів становив: денатурація – 30 с (94°C), віджиг праймерів – 30 с (55°C), елонгація – 1,5 хв (72°C). Термінальну елонгацію здійснювали при 72°C протягом 4 хв. ПЛР завершували охолодженням реакційної суміші до 4°C.

Амплікони для послідовності ITS1-5.8S-ITS2 кластеру ядерних рибосомальних генів отримували за допомогою пари універсальних праймерів – ITS1 (прямий) та ITS4 (зворотній), рекомендованих для ДНК штрих-кодування [WHITE et al., 1990] (табл. 1).

Таблиця 1

Праймери, використані для ампліфікації послідовності ITS1-ITS2 *S. alpestris*

Table 1

Primers that were used for the amplification of ITS1-ITS2 *S. alpestris* sequence

Праймер	Послідовність
ITS1 forward	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4 reverse	TCCTCCGCTTATTGATATGC

Продукти ампліфікації секвенували за допомогою ідентичних праймерів на комерційній основі (www.macrogen.com., Нідерланди). Редагування здійснювали вручну за допомогою програми BioEdit шляхом порівняння хроматограм прямої та зворотньої послідовностей.

Матрицю даних для порівняння формували з послідовностей ITS2 *S. perennis*, а також з аналогічної послідовності інших видів, які, за літературними даними [CHASSOT et al., 2001], утворюють зі *S. perennis* одну молекулярну кладу (табл. 2).

Таблиця 2

Послідовності ITS2 видів роду *Swertia*, залучених до аналізу таксономічного статусу *S. alpestris*

Table 2

Swertia species ITS2 sequences used in analysis of *S. alpestris* taxonomical status

Назва таксону в NCBI	Код доступу послідовності в NCBI
<i>S. perennis</i> L.	AJ294700
<i>S. perennis</i> L.	AJ410345
<i>S. perennis</i> L.	AJ580550
<i>S. perennis</i> L.	AY251717
<i>S. calycina</i> N.E.Br.	AJ410333
<i>S. angustifolia</i> Buch.-Ham. ex D.Don	AJ410330
<i>S. cordata</i> Wall.	AJ410336
<i>S. volkensis</i> Gilg	AJ410350
<i>S. kilimandscharica</i> Engl.	AJ410343

Заклучення щодо видового статусу *S. alpestris* робили на основі порівнянь вторинної структури її транскриптів 1-4 спіралі ITS2 з такими самими інших видів роду *Swertia*. Послідовність ITS2 анотували за допомогою серверної програми ITS2 Database [MERGET et al., 2012]. Реконструкцію та візуалізацію вторинної структури ITS2 проводили за допомогою серверної програми mfold [ZUKER, 2003]. Аналогічно проводили реконструкцію вторинних структур ITS2 інших видів роду *Swertia*, депонованих в NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Результати досліджень

У *S. alpestris* було секвеновано послідовність довжиною 609 п.н., яка включала частковий сіквенс ITS1, повну послідовність 5.8S rDNA, повну послідовність ITS2 та фрагмент послідовності 28S rDNA (сіквенс депонований в EMBL, код доступу KF747367). Результати пошуку подібних послідовностей за допомогою BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) показали, що найбільш схожою (99.17%) із дослідженою була послідовність кластеру рибосомальних генів ITS1-5.8S-ITS2 *S. perennis* (AJ580550). У секвенованій послідовності довжина ITS2 становила 229 п.н. Це співпадало з довжинами ITS2 інших видів роду *Swertia*, за винятком *S. calycina* та *S. cordata*, у яких ця послідовність включала 230 п.н.

За реконструкціями 1-4 спіралей ITS2 в дослідженій вибірці було виявлено п'ять варіантів укладки першої спіралі, по чотири варіанти – другої та третьої спіралі, шість варіантів – четвертої спіралі (рис. 1, 2).

За першою спіраллю *S. alpestris* не відрізнялась від *S. perennis* та *S. calycina*, проте добре відрізнялась від інших близьких таксонів наявністю, як мінімум, однієї напівкомпенсаторної зміни.

За вторинною структурою другої спіралі *S. alpestris* була ідентична до *S. perennis* і дуже схожа зі *S. calycina*, від якої відрізнялась лише однією зміною в термінальній петлі (сайт 17). Чотири інших види показали більш суттєві відміни від групи *S. alpestris*, *S. perennis* та *S. calycina*, які полягали у наявності напівкомпенсаторної зміни у позиціях 12-18.

За третьою спіраллю *S. alpestris* виявилась майже ідентичною до *S. perennis*. В позиціях 31-36 наявний консервативний для насінневих рослин субтермінальний мотив NRUGGT [COLEMAN, 2007], представлений послідовністю GGUGGU. Положення цього мотиву свідчить про правильність обраної для НЗ укладки вторинної структури.

В термінальній петлі третьої спіралі у *S. alpestris* наявний поліморфний сайт 43, в якому на хроматограмі спостерігаються два рівнозначних піки, що у транскрипті відповідають гуаніну (G) та урацилу (U). Варіант “G” в цьому сайті виявлений також у вторинній структурі термінальної петлі двох зразків *S. perennis* (AJ294700 та AJ410345), варіант “U” – в одному зразку *S. perennis* (AJ580550). Це вказує на поліморфізм сайту 43 третьої спіралі, який може бути інтерпретований як прояв явища однонуклеотидного поліморфізму – SNP (single nucleotide polymorphism). Оскільки SNP не має таксономічного значення, *S. alpestris* за вторинною структурою НЗ не відмежовується від *S. perennis* навіть на найнижчих таксономічних рівнях.

Всі зразки, ідентифіковані як *S. alpestris* або *S. perennis*, у третій спіралі відрізнялись від всіх інших видів *Swertia* як мінімум наявністю напівкомпенсаторних змін. Так, найменшими були відміни від *S. calycina* (одна напівкомпенсаторна зміна – сайт 81). Від *S. cordata*, *S. volkensii* та *S. kilimandscharica* дослідний зразок відрізнявся однією напівкомпенсаторною зміною (сайт 81) та іншою вторинною структурою у двох сайтах (79, 80). Найбільшими були відміни від *S. angustifolia* (три напівкомпенсаторні зміни у сайтах 79-81 та інша вторинна структура у сайтах 15, 64 та 70).

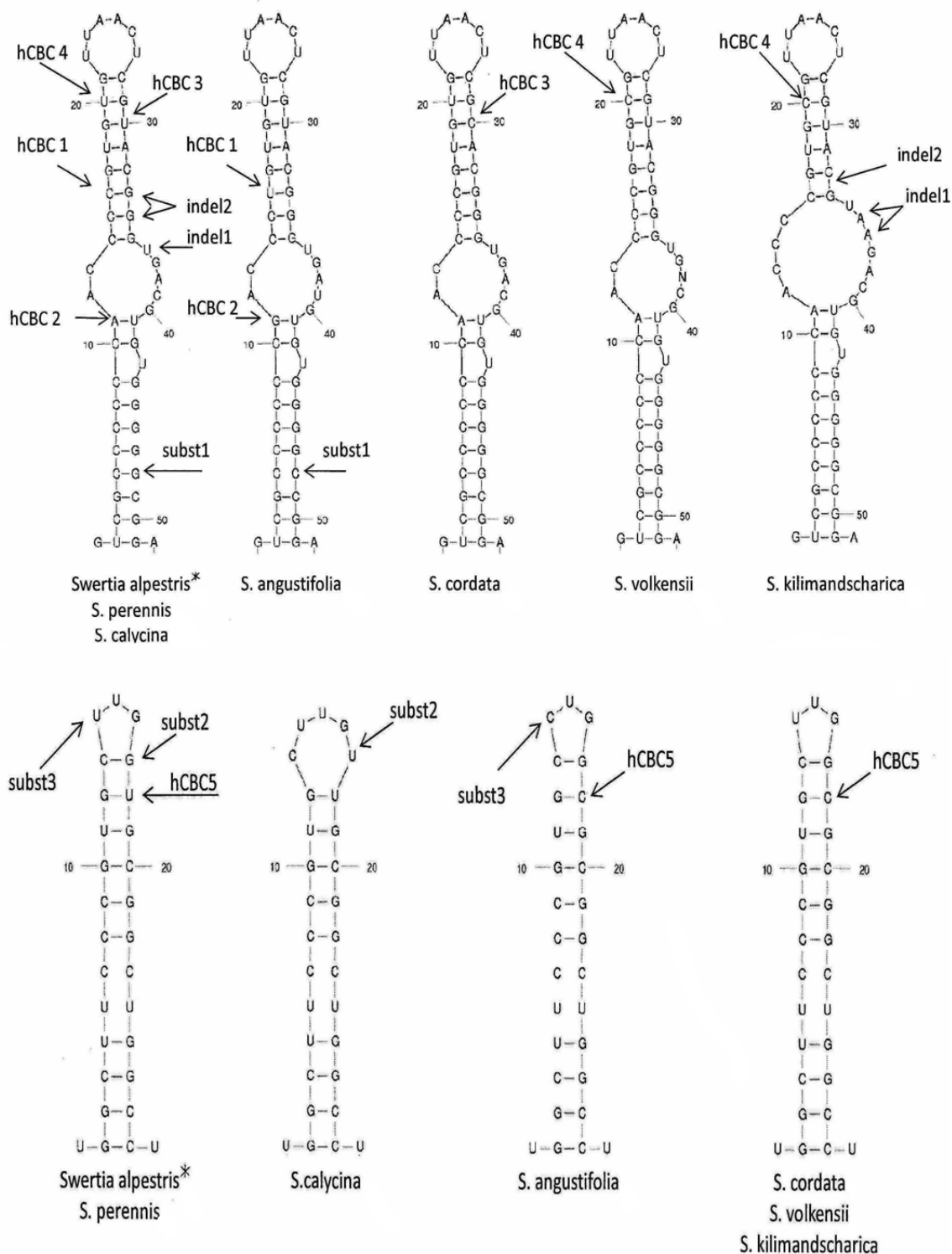


Рис. 1. Вторинна структура першої (верхній ряд) та другої (нижній ряд) спіралей ITS2 *Swertia alpestris* та інших близьких видів роду *Swertia* з позначенням типів відмін дослідженого таксону від інших таксонів (hCBC – напівкомпенсаторні зміни, indel – інсерції або делеції).

Fig. 1. The secondary structure of the first (upper row) and the second (lower row) ITS2 helices of *Swertia alpestris* and other genus *Swertia* species with signed types of differences between investigated taxons and other taxons (hCBC – hemi-compensatory changes, indels or delations).

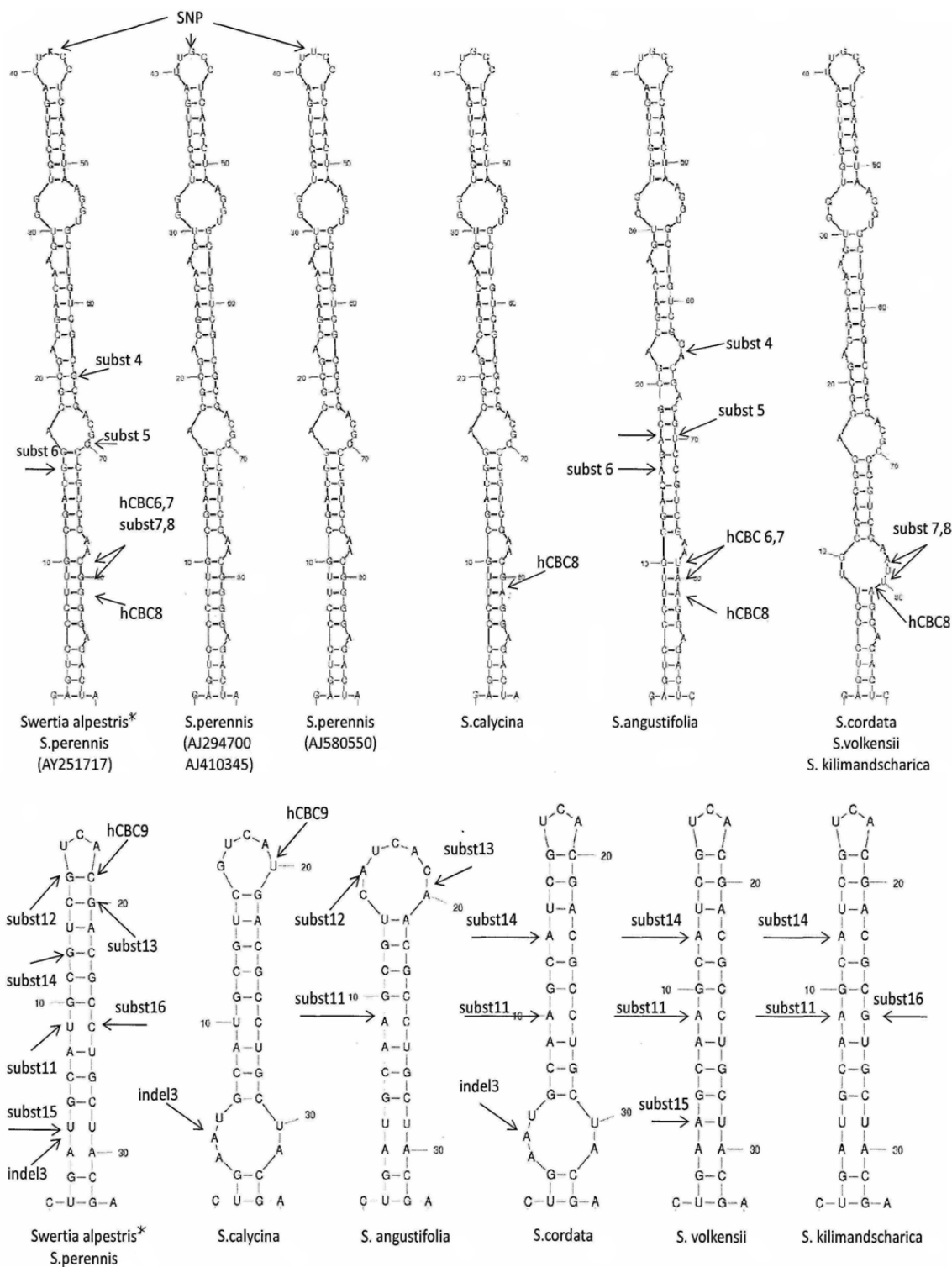


Рис. 2. Вторинна структура третьої (зверху) та четвертої (знизу) спіралей ITS2 *Swertia alpestris* та інших близьких видів роду *Swertia* з позначенням типів відмін дослідженого таксону від інших таксонів (hCBC – напівкомпенаторні зміни, subst – нуклеотидні зміни, indel – інсерції або делеції).

Fig. 2. The secondary structure of the third (upper row) and the fourth (lower row) ITS2 helices of *Swertia alpestris* and other species genus *Swertia* with signed types of differences between investigated taxons and other taxons (hCBC – hemi-compensatory changes, subst – nucleotide changes, indels or deletions).

Вторинна структура четвертої спіралі дозволяє розмежувати всі види, крім пари “*S. perennis* – *S. alpestris*” (вторинні структури цих зразків є ідентичними). *S. alpestris* та *S. perennis* за Н4 найбільше відрізняються від *S. calycina* (одна напівкомпенсаторна зміна, сайт 20). Від інших видів група *S. perennis* – *S. alpestris* відрізняється 2-3 замінами та інделями, які надають унікальності вторинній структурі четвертої спіралі у кожного з видів дослідної групи. Таким чином, розмежування всіх видів дослідної вибірки, крім пари “*S. perennis* – *S. alpestris*”, може бути здійснено за вторинною структурою четвертої спіралі.

Обговорення

Згідно з авторським першоописом та синтезом ключів з різних визначників [VYZNACHNYK..., 1977; PISJAUKOVA, 1978; DOBROCHAEVA et al., 1987; FUSS, 1846; JAVORKA, 1924-1925; KARPATY, 1970; BERTOVA, 1984; DOSTAL, 1989; ROTHMALER, 2005], *S. alpestris* відрізняється від *S. perennis*, в першу чергу, наступними ознаками: а) забарвленням віночка, б) розміром віночка, в) співвідношенням довжини торочок нектароносних ямок до їх діаметра, г) ступенем розгалуженості суцвіття, д) висотою стебла, е) кількістю листків при основі суцвіття, ж) кількістю міжвузлів стебла (табл. 3).

Таблиця 3

Основні морфологічні відміни між *S. alpestris* та *S. perennis*

Table 3

Basik morphological differences between *S. alpestris* and *S. perennis*

Ознака	<i>S. alpestris</i>	<i>S. perennis</i>
Забарвлення віночка	темно-фіолетове з фіолетовими пунктирними лініями	сталево- або брудно-синє
Діаметр віночка	13-18 мм	(6) 10-12 мм
Довжина торочок нектароносних ямок	в 2-3 рази перевищує діаметр	дорівнює діаметру
Суцвіття	майже не розгалужене, малоквіткове	розгалужене, 4-6-квіткове
Висота стебла	до 30 см	до 60 см і більше
Кількість листків при основі суцвіття	1-3 (4)	1-3
Кількість міжвузлів стебла	2-4 (5)	5-8

Проте, за нашими спостереженнями, у *S. perennis* ці ознаки є більш варіабельними і часто перекриваються з ознаками *S. alpestris*. Це збігається з висновками авторів, які не підтримують погляди на самостійний видовий статус *S. alpestris*. Наприклад, у “Flora Europaea” згадується лише про відміну забарвлення квіток у *S. alpestris* та *S. perennis*, проте ця відміна, на думку авторів, не є суттєвою [TUTIN et al., 1972].

У літературі (зокрема, вітчизняній) наводяться також деякі відміни, пов’язані із поширенням цих видів. Зокрема, у визначнику вищих рослин України [DOBROCHAEVA et al., 1987] *S. alpestris* наведена як вид субальпійського поясу Українських Карпат, що зростає на вологих скелях та по берегах струмків. Натомість *S. perennis* охарактеризована як вид, поширений на торфовищах та мокрих луках, що зрідка зустрічається на рівнинних територіях, а також на Закарпатті. З цього прикладу видно, що місцезростання обох таксонів схожі, а відмінним критерієм *de facto* виступає лише поширення: у субальпійському поясі (*S. alpestris*) чи на рівнині (*S. perennis*).

Молекулярно-генетичні дані, отримані за результатами реконструкції вторинної структури ITS2 різних видів роду *Swertia*, також не підтверджують самостійності *S. alpestris*. Наприклад, у дев’яти розглянутих нами близьких операційних таксономічних одиниць роду *Swertia* загалом наявно 6 варіантів укладки вторинної

структури ITS2, які дають змогу розрізнити в цій вибірці 6 самостійних таксонів (табл. 4). При цьому *S. alpestris* включається у групу, до якої належать всі операційні таксономічні одиниці, депоновані в NCBI як *S. perennis*.

Таблиця 4

Варіанти вторинної структури спіралей ITS2 у представників роду *Swertia*

Table 4

The variants of the ITS2 helixes second structure of *Swertia* representatives

Номер виду	Операційна таксономічна одиниця (ОТО)	Номер варіанту вторинної структури спіралі			
		H1	H2	H3	H4
1	<i>S. alpestris</i>	1	1	1ab	1
1	<i>S. perennis</i> (AJ294700)	1	1	1a	1
1	<i>S. perennis</i> (AJ410345)	1	1	1a	1
1	<i>S. perennis</i> (A580550)	1	1	1b	1
2	<i>S. calycina</i>	1	2	2	2
3	<i>S. angustifolia</i>	2	3	3	3
4	<i>S. cordata</i>	3	4	4	4
5	<i>S. volkensis</i>	4	4	4	5
6	<i>S. kilimandscharica</i>	5	4	4	6

Порівняння *Swertia alpestris* за типами та кількістю відмін вторинної структури ITS2 від інших операційних таксономічних одиниць дослідної вибірки показало, що *S. alpestris* не відрізняється від інших видів роду *Swertia* жодною компенсаторною зміною (табл. 5), тобто всі досліджені таксони *Swertia* представляють одну СВС-кладу. За напівкомпенсаторними змінами, замінами у стеблах, які порушують вторинну структуру, й замінами та/або інделями у петлях, які не порушують вторинну структуру ITS2, *S. alpestris* відрізняється від усіх інших видів, окрім *S. perennis*. Таким чином, аналіз вторинної структури ITS2 свідчить про відсутність відмін *S. alpestris* від *S. perennis*.

Таблиця 5

Кількість відмін вторинної структури ITS2 у *S. alpestris* від інших операційних таксономічних одиниць вибірки роду *SWERTIA*

Table 5

The quantity of ITS2 second structure differences between *S. alpestris* and other operational taxonomy units of *SWERTIA* genus

ОТО	Кількість відмін			Разом відмін
	компенсаторні зміни	напівкомпенсаторні зміни	заміни та інделі у "стеблах" і петлях	
<i>S. perennis</i> (AJ294700)	0	0	0	0
<i>S. perennis</i> (AJ410345)	0	0	0	0
<i>S. perennis</i> (A580550)	0	0	0	0
<i>S. calycina</i>	0	2	2	4
<i>S. angustifolia</i>	0	6	10	16
<i>S. cordata</i>	0	3	4	7
<i>S. volkensis</i>	0	3	4	7
<i>S. kilimandscharica</i>	0	3	7	10

Відсутність СВС між *S. alpestris* та іншими видами цього роду вказує на можливість статевої взаємодії на рівні гамет між всіма розглянутими операційними таксономічними одиницями, тобто на належність всієї вибірки до однієї СВС-клади, статус якої, згідно з видовою концепцією А. Колеман [COLEMAN, 2003, 2007], відповідає підродині або роду. Наявність від двох до шести напівкомпенсаторних змін між *S. alpestris* та іншими видами, окрім *S. perennis*, вказує на належність *S. alpestris* та *S. perennis* до окремої Z-клади, куди не потрапляють інші види цього роду.

Ідентичність сіквенсу українського ізоляту з субальпійських лук Карпат до послідовностей ITS2 трьох зразків, депонованих в NCBI як *S. perennis* (AJ294700, AJ410345, AJ580550), не узгоджується з поглядами на *S. alpestris* як на самостійний таксон рангу виду і свідчить про належність даного таксону (принаймні у дослідженій популяції) до *S. perennis*. Якщо українська популяція т. зв. *S. alpestris* виявиться конспецифічною до румунської популяції, що представляє locus classicus виду, описаного М.Фузом, то таксономічний статус *S. alpestris* має бути або знижений до внутрішньовидового таксону в межах *S. perennis*, або ж *S. alpestris* має бути віднесена до числа синонімів *S. perennis*.

Висновки

За результатами порівняльного аналізу вторинних структур послідовності ITS2 кластеру ядерних РНК-кодуєчих рибосомальних генів самостійний видовий статус *Swertia alpestris* Baumg. ex Fuss (на прикладі субальпійської популяції з території Українських Карпат) не підтверджений. Високогірна популяція, яка в українських флористичних зведеннях наводиться як самостійний вид *S. alpestris*, має бути віднесена до *Swertia perennis* L. та розглядатись в його межах або як таксон внутрішньовидового рангу, або як особлива високогірна еколого-географічна раса.

References

- BELDIE AL. (1977-1979). Flora Romaniæ. Determinator ilustrat al plantelor vasculare. Bucuresti: Editura Academiei Republicii Socialiste Romania. 1, 2. 405 p.
- BERTOVA L. (1984). *Swertia* L. Kropenáč. *Flora Slovenska*. Bratislava: VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akademie vied. 4 (1): 95-99.
- BUCHHEIM M.A., KELLER A., KOETSCHAN C., FORSTER F., MERGET B. et al. (2011). Internal transcribed spacer 2 (nu ITS2 rRNA) sequence-structure phylogenetics: towards an automated reconstruction of the green algal tree of life. *PLoS One*, 6 (2): 1-10.
- CHASSOT P., NEMOMISSA S., YUAN Y.-M., KUPHER P. (2001). High paraphyly of *Swertia* L. (Gentianaceae) in the *Gentianella*-lineage as revealed by nuclear and chloroplast DNA sequence variation. *Plant Syst. and Evol.*, 229: 1-21.
- CHERVONA knyga Ukrainy. Roslynni svit (2009). K.: Globalconsaltynг. 900 p. [ЧЕРВОНА книга України. Рослинний світ (2009) / за ред. ДІДУХА Я.П. К.: Глобалконсалтинг. 900 с.]
- COLEMAN A. W. (2007). Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucl. Acids Res.*, 35: 3322-3329.
- COLEMAN A.W. (2003). ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. *Trends Genet.* 19: 370-375.
- DENDUANGBORIPANT J., CRONK Q.C.B. (2001). Evolution and alignment of the hypervariable arm 1 of *Aeschynanthus* (Gesneriaceae) ITS2 nuclear ribosomal DNA. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 20: 163-172
- DOBROCHAЕVA D.N., KOTOV M.I., PROKUDIN YU.N. et al. (1987). *Opredelitel vysshyh rasteniy Ukrainy*. Kiev: Naukova dumka. 548 p. [ДОБРОЧАЕВА Д.Н., КОТОВ М.И., ПРОКУДИН Ю.Н. и др. (1987). *Определитель высших растений Украины*. Киев: Наукова думка. 548 с.]
- DOSTAL J. (1916). *Nova květena ČSSR*. 1, 2. Praha: Československa akademie ved. 1563 p.
- FODOR S.S. (1974). *Flora Zakarpattja*. Lviv: Vyshcha shkola. 207 p. [ФОДОР С.С. (1974). *Флора Закарпаття*. Львів: Вища школа. 1974. 207с.]
- FUSS M. (1846). *Mantissa ad floram Transsilvaniae*. In: Baumgarten J.Ch.G. *Enumerationis Stirpium Transilvaniae Indigenarum IV*. *Mantissa I. Cibinii*: Typis Theod. Steinhauseen. P. 1-82.
- GOERTZEN L.R., CANNONE J.J., GUTELL R.R., JANSEN R.K. (2003). ITS secondary structure derived from comparative analysis: implications for sequence alignment and phylogeny of the Asteraceae. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 29: 216-234
- JAVORKA S. (1924-1925). *Magyar Flora (Flora Hungarica)*. Budapest: Studium. 1307 p.
- KÁRPÁTI Z. (1970). Eine kritisch-taxonomische Übersicht der Gattung *Swertia* in Europa. *Fragm. Florist. Geobot.* 16: 53-59.
- MAI J.C., COLEMAN A.W. (1997). The Internal Transcribed Spacer 2 Exhibits a Common Secondary Structure in Green Algae and Flowering Plants. *J. Mol. Evol.*, 44: 258-271.
- MARHOLD K. (2011). *Gentianaceae*. In: EURO+MED PLANTBASE – THE INFORMATION RESOURCE FOR EURO-MEDITERRANEAN PLANT DIVERSITY (<http://ww2.bgbm.org/EuroPlusMed/>).

- MERGET B., KOETSCHAN C., HACKL T., FÖRSTER F., DANDEKAR T., MÜLLER T., SCHULTZ J., WOLF M. (2012). The ITS2 Database. *J Vis Exp.*, **12** (61): 3791-3806.
- MOSYAKIN S.L., FEDORONCHUK M.M. (1999). Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. Kiev. 346 p.
- PISJAUKOVA V.V. (1978). Rod 8. *Swertia* L. Flora evropeiskoi chasti SSSR. Leningrad: Isd-vo Nauka, Leningrad. otdelenije. **3**: 82-85 [ПИСЬЯУКОВА В.В. (1978). Род 8. Свєрція – SWERTIA L. Флора Європейської частини СРСР. Ленінград: Изд-во Наука, Ленінград. відділення. **3**: 82-85]
- ROTHMALER W. (BEGR.), JÄGER E., WERNER K. (Eds.). (2005). Exkursionflora von Deutschland. Band 4: Gefäßpflanzen: Kritischer Band. 10. völlig neu bearb. Aufl. München: Elsevier. P. 7.
- SIMONKAI L. (1886). Enumeratio Florae Transsilvanicae vesiculosae critica. Budapest: Kir. Mady. Term. tud. Társ. 678 p.
- SZAFER W., KULCZYCKI S., PAWIOWSKI B. (1988). Rosliny Polskie. Opisy i klucze do oznaczania wszystkich gatunków roślin naczyniowych rosnących w Polsce bądź dziko bądź też zdziczałych lub częścię hodowanych. Warszawa: Państwowe wydawnictwo naukowe. **6** (2): 465-1020 (*Swertia* – S. 606-607).
- TAREEV A.S., GIRIN A.S., KARPENKO N.I., TYSHENKO O.V., KOSTIKOV I.YU. (2011). *Chornomors'k. bot. z.*, **7** (4): 309-317. [ТАРЕЄВ А.С., ГІРІН А.С., КАРПЕНКО Н.І., ТИЩЕНКО О.В., КОСТИКОВ І.Ю. (2011). Модифікована методика виділення ДНК з гербарних зразків. *Чорноморськ. бот. ж.*, **7** (4): 309-317]
- ТОПА Е. (1961). Fam. 96. Gentianaceae B. Juss. *Flora Reipublicii Populare Romone*. Bucuresti: Editura Academiei Republicii Populare Române. **8**: 430-479.
- TUTIN T.G. et al. (eds) (1972). *Swertia* L. *Flora Europaea*, Cambridge University Press. Cambridge. P. 67.
- VISYULINA O.D. (1957). Rodyna CXV. Tyrylichevi – Gentianaceae Dumort. Flora URSS. K.: vyd-vo AN URSS. **8**: 221-260 [ВІСЮЛІНА О.Д. (1957). Родина CXV. Тирличеві – Gentianaceae Dumort. Флора УРСР. К.: Вид-во АН УРСР. **8**: 221-260]
- VYZNACHNYK roslyn ukrainskyh Karpat (1977). K.: Nauk. dumka. 435 p. [ВИЗНАЧНИК рослин Українських Карпат (1977). К.: Наук. думка. 435 с.]
- VYZNACHNYK roslyn URSS (1950). K.: Derzhavne vydavnytstvo silskogospodarskoi literatury URSS. 932 p. [ВИЗНАЧНИК рослин УРСР (1950). К.: Державне видавництво сільськогосподарської літератури УРСР. 932 с.]
- WHITE T.J., BRUNS T., LEE S., TAYLOR J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA. P. 315-322.
- ZUKER M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31** (13): 3406-3415.

Рекомендує до друку
М.Ф. Бойко

Отримано 19.09.2013

Адреси авторів:

О.А. Лях
Н. І. Карпенко
І. Ю. Костіков
Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка, ННЦ "Інститут біології"
вул. Володимирська, 64,
Київ, 01601
e-mail: AlexandraLiakh21@gmail.com
e-mail: kni@univ.kiev.ua
e-mail: kost@univ.kiev.ua

Authors' addresses:

O.A.Liakh
N.I. Karpenko
I.Yu. Kostikov
Taras Shevchenko National University of Kyiv
ESC "Institute of Biology"
64, Volodymyrs'ka Sr,
Kyiv, 01601
e-mail: AlexandraLiakh21@gmail.com
e-mail: kni@univ.kiev.ua
e-mail: kost@univ.kiev.ua

Р.Я. Кіш
Міжвідомча науково-дослідна лабораторія охорони
природних екосистем
Ужгородський національний університет
вул. Підгірна 46,
Ужгород, 88000, Закарпатська обл.,
e-mail: rkish@rambler.ru

R.Ya. Kish
Laboratory for environmental protection
Uzhhorod National University
46, Pidhirna Str.
Uzhhorod, 88000 Zakarpattia Oblast,
e-mail: rkish@rambler.ru