

iPBS-полиморфизм редких реликтовых и исчезающих видов *Allium*, произрастающих на территории Казахстанского Алтая

О. Б. Райзер¹✉, О. Н. Хапилина¹

¹ Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Республика Казахстан

✉E-mail: 2008olesya@mail.ru

Аннотация. Цель исследования – оценка генетического полиморфизма казахстанских популяций редких реликтовых и эндемичных видов *Allium*. Новизна исследований заключается в использовании современного молекулярно-генетического iPBS (Inter-Primer Binding Site Polymorphism) метода амплификации ДНК, для оценки генетического разнообразия различных популяций *Allium*, собранных в местах их естественного произрастания на территории Казахстанского Алтая. Методы. В качестве объектов исследований были использованы лекарственные реликтовые и исчезающие виды лука (*A. ledebourianum*, *A. altaicum*, *A. microdictyon*), собранные в местах их естественного произрастания на территории Казахстанского Алтая. ДНК выделяли из 3–5-дневных стерильных проростков лука с использованием лизирующего СТАВ-буфера с РНКазой А. В работе использовали PBS-праймеры для оценки генетического разнообразия различных популяций *Allium*. Оценку результатов амплификации, полученных с использованием различных PBS-праймеров, проводили в программе-макросе GenAlex 6.5 для Excel. Результаты. Проведен анализ полиморфизма 16 генотипов редких реликтовых и исчезающих видов *Allium* с использованием 7 PBS-праймеров. Были получены четко различимые ампликоны, количество которых варьировало в зависимости от используемого праймера. Дендрограмма, основанная на анализе UPGMA, сгруппировала изучаемые генотипы в 2 основных кластера, в один из которых вошли образцы популяции *A. altaicum*, во второй кластер вошли образцы *A. ledebourianum*. *A. microdictyon*, представленный одним образцом, не вошел ни в один кластер, в дендрограмме сформировал базальную ветвь. В результате исследований была выявлена высокая степень iPBS-полиморфизма и генетического разнообразия редких реликтовых и исчезающих видов *Allium*. Практическая значимость. Использование молекулярно-генетического iPBS-метода позволяет выявить высокий уровень полиморфизма, который может служить основой для идентификации различных генотипов вида *Allium*, что позволит существенно дополнить традиционные методы сохранения естественных популяций данного рода.

Ключевые слова: *Allium*, популяция, ПЦР, молекулярные маркеры, iPBS, генотип, амплификация, кластерный анализ.

Для цитирования: Райзер О. Б., Хапилина О. Н. iPBS-полиморфизм редких реликтовых и исчезающих видов *Allium*, произрастающих на территории Казахстанского Алтая // Аграрный вестник Урала. 2020. № 09 (200). С. 63–73. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-200-9-63-73.

Дата поступления статьи: 01.08.2020.

Постановка проблемы (Introduction)

На сегодняшний день сохранение биологического разнообразия – одна из важнейших проблем современного мира. Основой биологического разнообразия являются его генетические ресурсы. Сокращение или исчезновение видового и генетического разнообразия представляет угрозу для воспроизводства природных экосистем. Редкие и исчезающие виды растений имеют меньшее генетическое разнообразие, чем широко распространенные, и поэтому они более подвержены угрозе исчезновения при изменении условий окружающей среды и антропогенного фактора [1, с. 1], [2, с. 223]. Изучение генетического разнообразия редких и исчезающих видов растений: внутривидового полиморфизма, генетической дифференциации популяций – в комплексе с изучением морфологии вида, биологических признаков популяции, особенностями возрастного спектра позволит наиболее точно изучить осо-

бенности редких видов растений, а значит, позволит выбрать наиболее рациональный механизм сохранения.

Применение существующих на сегодняшний день молекулярно-генетических методов исследований очень важно при выборе стратегии сохранения редких реликтовых и исчезающих видов растений, так как данные методы позволяют выявить генетическую структуру вида растений, генетическое разнообразие в популяциях и между ними, а также создать «генетические паспорта» для охраняемых видов растений с целью поддержания и сохранения биоразнообразия.

Представители рода *Allium* L. (лук) – это многолетние травянистые растения, относящиеся к подсемейству луковых (*Alliaceae*), семейству амариллисовых (*Amaryllidaceae*). Практически все виды луков являются ценными пищевыми, лекарственными или декоративными растениями, издавна заготавливаемыми человеком, что

приводит к значительному истощению запасов в природе. Род *Allium* L. представлен 750–800 видами. Это один из крупнейших родов флоры Казахстана, который включает в себя 140 видов, 21 вид из которых встречается на территории Казахстанского Алтая, Сауро-Манрака и Зайсанской котловины [3], [4, с. 279], [5, с. 3].

Среди луков довольно много редких видов, которые представляют научный интерес и являются объектами изучения с целью сохранения их биоразнообразия, а также нуждаются в экстренных охранных действиях. Одними из них являются представители рода *Allium*: *A. altaicum*, *A. ledebourianum*, *A. microdictyon*, *A. schoenoprasum*, *A. obliquum*, *A. microdictyon*. Это реликтовые растения ледникового периода, которые повсеместно сокращают свою численность из-за массового сбора для пищевого назначения. В связи с изменением среды обитания под влиянием хозяйственной деятельности человека происходит сокращение природных местонахождений луков. Бесконтрольные массовые заготовки уничтожают маточные растения, что значительно сокращает семенное возобновление этих видов и приводит к снижению их численности и ареалов распространения. В настоящее время эти виды встречаются только на труднодоступных склонах, популяции носят спорадический характер, а часть из них представлена несколькими особями. Некоторые представители рода *Allium* ввиду их высокой биологической ценности занесены в Красную книгу нескольких государств: Монголии, России, Китая. В Казахстане данные виды луковых растений являются редкими, узколокальными эндемиками. Стратегия сохранения и размножения их численности является весьма актуальной задачей в сохранении биоразнообразия природной флоры Казахстана.

Решать проблемы исчезновения данных видов в местах их природного местобитания необходимо с применением новых современных подходов и инструментов для сохранения биоразнообразия.

На сегодняшний день существует огромное количество методов исследования ДНК. В настоящий момент представители рода *Allium* изучаются с использованием различных молекулярных маркеров, таких как RAPD, ISSR, AFLP, SSR. Кроме того, секвенирован пластидный геном лука репчатого *A. sepa*. Изучена филогения дикорастущих видов *Allium* с помощью последовательностей ITS и EST [6, с. 260], [7, с. 560], [8, с. 19]. В отличие от вышеупомянутых методов, iPBS-амплификацию ДНК начали использовать относительно недавно. Данный метод заключается в использовании консервативных областей последовательностей PBS сайтов ретротранспозонов как для выявления полиморфизма в профилях транскрипции и клонирования LTR сегментов из геномной ДНК, так и для поиска в базах данных ретротранспозонов. Ввиду того что многие ретротранспозоны являются встроенными в другие ретротранспозоны и инвертированы друг к другу или фрагментированы, они могут быть доступны при использовании консервативных PBS-праймеров в амплификации ДНК для любого вида растений или животного [9, с. 14], [10], [11, с. 923], [12, с. 460]. Это позволяет использовать данный метод в качестве универсального и высокоэффективного метода для прямой детекции полиморфизма. Изучение полиморфизма как генома в целом, так и отдельных генов представляет несомненный научный и практический интерес [13, с. 3].



Рис. 1. Места сбора образцов редких реликтовых и эндемичных видов лука на территории Казахстанского Алтая
Fig. 1. Places of collection of samples of rare relict and endemic species of *Allium* in the territory of Kazakhstan Altai

Характеристика образцов *Allium* на территории Казахстанского Алтая

Наименование вида	Место сбора	Координаты		Высота, м над ур. м.	ID номер
		Широта	Долгота		
<i>A. altaicum</i>	Южный Алтай, хребет Тарбагатай, перевал Бурхат	49°07'33"	86°02'10"	2146	Al 1
	Хребет Калбинский (Восточная Калба), горы Коктау	49°29'37"	82°36'19"	693	Al 2
	Хребет Калбинский, урочище Талды, горы Коктау, северо-западный склон	49°29'11"	82°35'37"	707	Al 8
	Западный Алтай, хребет Убинский, юго-восточный склон, гора Порожная	50°33'33"	82°32'46"	1800	Al 9
	Южный Алтай, хребет Тарбагатай, северо-западный склон, в районе перевала Бурхат	50°33'32"	81°39'30"	786	Al 10
	Хребет Нарымский, урочище Кедровый Ключ, юго-западный склон	48°54'34"	83°44'21"	1200	Al 11
	Участок природной флоры Алтайского ботанического сада	50°19'34"	83°32'46"	774	Al 12
	Хребет Сарым-Сакты, юго-восточный щебнистый склон, Бурхат	49°07'33"	86°02'10"	2146	Al 13
	Хребет Ивановский, урочище Серый Луг, северо-западный склон	50°19'16"	83°52'51"	1800	Al 14
	Калбинский Алтай, окрестности озер Сибинских	49°24'5"	82°58'23"	987	Al 15
	Хребет Западная Листвяга, юго-восточный склон, долина реки Кондрашка	49°23'16"	85°45'18"	1585	Al 16
	Хребет Калбинский, урочище Талды, горы Коктау, юго-восточный склон	49°29'18"	82°35'44"	915	Al 17
<i>A. ledebouriamum</i>	Южная часть хребта Линейский	50°19'12"	84°11'49"	1925	Al 6
	Хребет Ивановский, ущелье Серый Луг	50°21'27"	83°53'54"	1170	Al 20
	Юго-Западный Алтай, Проходной белок	49°07'33"	83°32'44"	774	Al 3
<i>A. microdiction</i>	Хребет Ивановский, Пихтовый лес, ущелье Серый Луг	50°20'33'	83°44'04"	1023	Al 21

Table 1

Characteristics of the *Allium* samples collected in the territory of Kazakhstan Altai

Type name	Collection place	Coordinates		Altitude, m above sea	ID
		Latitude	Longitude		
<i>A. altaicum</i>	South Altai Tarbagatai range, Burkhat passage	49°07'33"	86°02'10"	2146	Al 1
	Kalba Range (Eastern Kalba), Koktau Mountains	49°29'37"	82°36'19"	693	Al 2
	Kalba Range, Taldy Ecosite, Koktau Mountain, North-west slope	49°29'11"	82°35'37"	707	Al 8
	Ubinskiy Range, South-eastern slope, Porozhnaya Mountain	50°33'33"	82°32'46"	1800	Al 9
	South Altai Tarbagatai, North-west slope, in the area of the Burkhat passage	50°33'32"	81°39'30"	786	Al 10
	Narymskiy Range, Kedrovyy Kliuch Ecosite, South-west slope	48°54'34"	83°44'21"	1200	Al 11
	Site of natural flora of the Altai Botanical Garden	50°19'34"	83°32'46"	774	Al 12
	Sarym-Sakty Range, South-east rubble slope, Burkhat	49°07'33"	86°02'10"	2146	Al 13
	Ivanovskiy Range, Seryy Lug Ecosite, North-west slope	50°19'16"	83°52'51"	1800	Al 14
	Kalbinskiy Altai, Sibir Lakes vicinities	49°24'5"	82°58'23"	987	Al 15
	Western Listvyaga Range, south-east slope, valley of the Kondrashka River	49°23'16"	85°45'18"	1585	Al 16
	Kalba Range, Taldy Ecosite, Koktau Mountain, South-east slope	49°29'18"	82°35'44"	915	Al 17
<i>A. ledebouriamum</i>	Lineyskiy Range, South Altai	50°19'12"	84°11'49"	1925	Al 6
	Ivanovskiy Range, Seryy Lug Ecosite,	50°21'27"	83°53'54"	1170	Al 20
	Southwestern Altai, Prokhdnoy belok	49°07'33"	83°32'44"	774	Al 3
<i>A. microdiction</i>	Ivanovskiy Range, fir forest, Seryy Lug Ecosite	50°20'33'	83°44'04"	1023	Al 21

Таким образом, оценка генетического разнообразия различных популяций *Allium*, собранных в местах их естественного произрастания на территории Казахского Алтая с использованием современного молекулярно-генетического iPBS-метода амплификации ДНК, является актуальной задачей и обуславливает выбор направления исследований для сохранения и воспроизводства биологического разнообразия Казахстана. Использование этого метода позволяет выявить высокий уровень полиморфизма, который может служить основой для идентификации различных генотипов рода *Allium*, что позволит существенно дополнить традиционные методы сохранения естественных популяций данного рода [14, с. 77], [15, с. 1157].

Методология и методы исследования (Methods)

В качестве объектов исследований были использованы лекарственные, редкие реликтовые и исчезающие виды лука (*A. altaicum* – 12 образцов, *A. ledebourianum* – 3 образца, *A. microdictyon* – 1 образец), собранные в местах их естественного произрастания на территории Казахского Алтая. Сроки сбора образцов были привязаны к температурному режиму и сходу снегового покрова. Координаты и абсолютная высота местонахождения ценопопуляций, из которых был взят растительный материал, были определены с помощью GPS-навигатора. Места произрастания популяций показаны на рис. 1. Характеристика собранных образцов *Allium* представлена в таблице 1.

ДНК выделяли из 3–5-дневных стерильных проростков лука с использованием кислого лизирующего СТАВ-буфера с РНКазой А. Экстрагированную ДНК растворяли в 100 мкл 1 × ТЕ-буфера (1 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl, pH 8,0). Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра NanoDrop1000 (Thermo Scientific).

Визуализацию экстрагированной ДНК проводили в 1-процентном агарозном геле с использованием геледокументирующей системы ChemiDoc-It2. Образцы ДНК были подготовлены в двух вариантах: маточный раствор для длительного хранения при температуре –20 °С; рабочие растворы, используемые для ПЦР в концентрации 10 нг/мкл.

В работе использовали PBS-праймеры для оценки генетического разнообразия различных популяций *Allium*. Нуклеотидные последовательности этих PBS-участков универсальны для всех ретротранспозонов и относятся к высокоповторяющимся последовательностям, характерным для высших эукариот. Последовательности используемых праймеров, комплементарных участкам различных ретротранспозонов, представлены в таблице 2.

Реакцию ПЦР проводили в объеме 20 мкл реакционной смеси, включающей 3 мкл ДНК (10 нг/мкл), 4 мкл Phire Reaction Buffer 5x с MgCl₂, 1 мкл праймера (10 мМ), 0,4 мкл смеси dNTPs (10 мМ), 0,2 мкл 1 U Phire Hot Start полимеразы. Режим амплификации был следующим: предварительная денатурация при 98 °С в течение 2 минут, затем 30 циклов: 98 °С – 30 с, 50–57 °С – 1 минута с, 72 °С – 1 минута, дополнительная элонгация при 72 °С – 2 минуты. Амплификацию проводили в амплификаторе T100 Thermal Cycler (BIO RAD). Полученные продукты амплификации (ампликоны) визуализировали в 1,5-процентном агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Размеры амплифицируемых фрагментов ДНК определяли путем сопоставления их с маркером (Thermo Scientific GeneRuler DNA Ladder Mix 100-10,000 bp). Определение длин фрагментов проводили с использованием программы Quantity One в системе геле-документации ChemiDoc-It@TS2 Imager (UVP). Уровень детектируемого полиморфизма определяли процентным отношением полиморфных ампликонов к общему числу ампликонов для каждого праймера.

Таблица 2
Последовательности используемых в работе 18-мерных PBS праймеров

ID	Последовательность 5'–3'	Температура отжига (°С)	ГЦ-состав (%)
2221	ACCTAGCTCACGATGCCA	56,9	55,6
2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	55,0	72,2
2240	AACCTGGCTCAGATGCCA	55,0	55,6
2249	AACCGACCTCTGATACCA	51,0	50,0
2257	CTCTCAATGAAAGCACCA	50,0	44,4
2373	GAACTTGCTCCGATGCCA	51,0	55,6
2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	52,8	72,2

Table 2
Sequences of 18-mer PBS primers used in this study

ID	Sequence 5'–3'	Annealing temperature (°C)	GC (%)
2221	ACCTAGCTCACGATGCCA	56.9	55.6
2237	CCCCTACCTGGCGTGCCA	55.0	72.2
2240	AACCTGGCTCAGATGCCA	55.0	55.6
2249	AACCGACCTCTGATACCA	51.0	50.0
2257	CTCTCAATGAAAGCACCA	50.0	44.4
2373	GAACTTGCTCCGATGCCA	51.0	55.6
2395	TCCCCAGCGGAGTCGCCA	52.8	72.2

a)
a)б)
б)

Рис. 2. Внешний вид растений лука: а) лук мелкосетчатый (*A. microdictyon*), б) лук алтайский (*A. altaicum*)
Fig. 2. Appearance of plants: a) plants of *A. microdictyon*, b) plants of *A. altaicum*

Оценку результатов амплификации, полученных с использованием различных РБС-праймеров, проводили в программе-макросе GenAlex 6.5 для Excel с определением информативных параметров, таких как индекс информативности праймера (PIC), разнообразие аллелей (Na), эффективное число аллелей (Ne), информационный индекс Шеннона (I), ожидаемая гетерозиготность (He), наблюдаемая гетерозиготность (uHe), общее число локусов (L) [16, с. 174].

Была составлена бинарная матрица, в которой наличие фрагмента обозначалось как 1, отсутствие – как 0. Затем по результатам данной матрицы с использованием программы Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA-X) была выполнена кластеризация методом невзвешенного парно-группового усреднения (UPGMA) [17, с. 288].

Результаты (Results)

На хребтах Казахстанского Алтая в зависимости от увлажнения почвы и места произрастания выделено несколько групп ценопопуляций изучаемых видов лука *A. altaicum*, *A. ledebourianum*, *A. microdictyon* на территории юго-западной периферии Западного и Южного Алтая.

Лук Ледебура (*A. ledebourianum*) – узколокальный эндемик, гигрофит, светолюбивый обитатель мест повышенного увлажнения. В Казахстане лук Ледебура произрастает на хребтах юго-западной и юго-восточной периферии Западного Алтая (Ивановский, Ульбинский, Убинский, Линейский, Коксинский, Холзун, Листвяга), горно-лесной части хребтов Южного Алтая (Курчумский, Южный Алтай, Сарымсақты, Южноалтайский Тарбагатай) и юго-восточной периферии Центрального Алтая (Чиндогатуйские горы). Наиболее типичные места обитания: берега рек, ручьев, кочкарниковые болота, чрезмерно сырые луга, микропонижения, где скапливается значительное количество влаги в течение всего вегетационного периода.

Лук мелкосетчатый (*A. microdictyon*) – мезофит, мезогигрофит, обитающий в горно-лесных и луговых сообществах. В Казахстане лук мелкосетчатый произрастает только на хребтах казахстанского Алтая (Холзун, Ивановский, Линейский, Убинский), обрамляющих Риддерскую впадину. В Казахстанском Алтае лук мелкосетчатый находится на юго-западной периферии ареала. Ценопопуляции встречаются по северо-западным и северо-восточным склонам хребтов на тяжелых, уплотненных, суглинистых почвах, умеренно или избыточно увлажненных.

Лук алтайский (*A. altaicum*) – редкое растение, ледниковый реликт. В Казахстане лук алтайский произрастает на территории юго-западной периферии Западного Алтая, на хребтах Ивановский, Ульбинский, Убинский и Листвяга. Выделены популяции в Южном Алтае на хребтах Южный Алтай и Тарбагатай. Давольно часто встечается в Восточном Казахстане на хребтах Калбинский, Нарымский, Сарымсақты, Ульбинский и на плоскогорье Уюк [18, с. 104] (рис. 2).

В результате амплификации были получены четко различимые ампликоны, количество которых варьировало в зависимости от используемого праймера. Детектируемый полиморфизм и насыщение спектров амплификации являлись критериями эффективности используемых праймеров.

В результате iPBS-анализа 16 генотипов редких реликтовых и исчезающих видов *Allium* было амплифицировано 165 фрагментов (таблица 3). Количество информативных амплифицируемых фрагментов в зависимости от праймера колебалось от 15 до 35, их размеры варьировали от 100 до 1500 п. н. Уровень полиморфизма для всех образцов коллекции составлял от 74 % до 100 %, что является достаточным для дифференциации исследуемых генотипов. Изучаемые образцы отличались индивидуальным сочетанием полиморфных амплифицированных фрагментов различного молекулярного веса.

Таблица 3

Анализ продуктов амплификации ДНК *Allium* с PBS-праймерами

ID	Амплифицированные фрагменты		Полиморфизм, %
	Всего	Полиморфных	
2221	39	35	90
2237	23	21	91
2240	25	23	92
2249	23	17	74
2257	15	15	100
2373	20	19	95
2395	20	20	100
Всего	165	150	–
Среднее	23,6	21,4	91,7

Table 3

Analysis of the *Allium* DNA amplification products with PBS primers

ID	Amplified fragments		Polymorphism, %
	Total	Polymorphic	
2221	39	35	90
2237	23	21	91
2240	25	23	92
2249	23	17	74
2257	15	15	100
2373	20	19	95
2395	20	20	100
Total	165	150	–
Average value	23.6	21.4	91.7

В результате проведения ПЦР с 7 PBS-праймерами получено 486 локусов (таблица 4). На основе этих данных рассчитаны основные показатели генетического полиморфизма, отражающие уровень изменчивости в исследуемых популяциях *Allium*. Индексы полиморфизма при использовании PBS-праймеров варьировали от 0,689 для праймера 2257 до 0,831 для праймера 2373 со средним значением 0,761. В результате проведенных исследований все изучаемые праймеры показали значения выше 0,5, что говорит об эффективности их использования при изучении генетического полиморфизма *Allium*. Информационный индекс Шеннона (I), который показывает среднюю минимальную длину уникального бинарного таксономического кода одной структурной единицы из анализируемой коллекции или выборки, варьировал от 0,271 до 0,310. Чем меньше значение I, тем стабильнее популяция, чем больше данное значение, тем больше видовое разнообразие. В ходе изучения генетического разнообразия популяций *Allium* с использованием PBS-праймеров установлено, что наблюдаемая гетерозиготность (uHe) всех популяций больше ожидаемой гетерозиготности (He), что говорит о том, что система случайного скрещивания в популяции преобладает над имбридингом.

Данные, полученные в результате амплификации с PBS-праймерами различных популяций *Allium*, были использованы для кластерного анализа и построения UPMGA-дендрограммы. *A. microdictyon*, представленный одним образцом, не вошел ни в один кластер, в дендрограмме сформировал базальную ветвь. Все остальные анализируемые образцы казахстанских популяций *Allium*

формируют два кластера (рис. 3). В первый кластер вошли образцы популяции *A. altaicum*, во второй кластер вошли образцы *A. ledebourianum*.

Обсуждение и выводы (Discussion and Conclusion)

Лимитирующими факторами широкого распространения изучаемых видов *Allium* являются их слабая способность формировать дочерние луковицы и низкая семенная продуктивность, которая обусловлена стрессовыми факторами среды – сухим жарким летом и холодной снежной зимой. В природных местообитаниях прорастание семян идет растянуто и может занять даже несколько лет [19, с. 125]. На продуктивность оказывает влияние также густой растительный покров, не позволяющий размножаться вегетативным способом, и массовый неконтролируемый сбор населением.

В течение последних десятилетий использование молекулярных методов исследований, выявляющих полиморфизм на уровне ДНК, играет немаловажную роль в улучшении и сохранении природного биоразнообразия редких реликтовых и исчезающих видов растений. В результате изучения литературных данных установлено, что ранее исследования по генетическому разнообразию для видов *A. microdictyon*, *A. altaicum*, *A. ledebourianum* с использованием PBS-праймеров не проводились. В качестве исходной задачи предполагалось использование PBS-праймеров для выявления полиморфизма и генотипирования изучаемых образцов. Для проведения PBS-амплификации использовали праймеры, разработанные ранее Kalendar R., et al. [20, p. 1419]. Длина PBS-участков ретротранспозонов, на которые были ориентированы в обоих направлениях праймеры, не превышает 18 нуклеотидов.

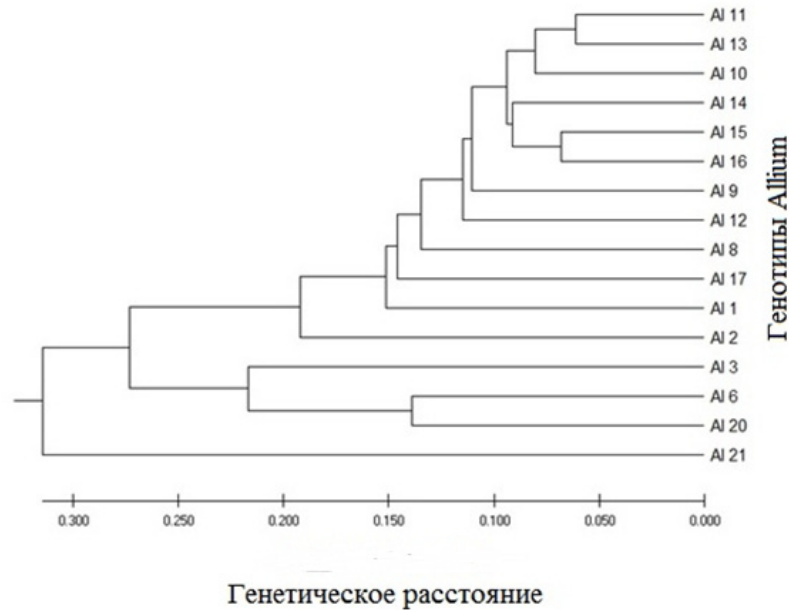


Рис. 3. Дендрограмма генетических различий 16 образцов *Allium* с использованием PBS-праймеров

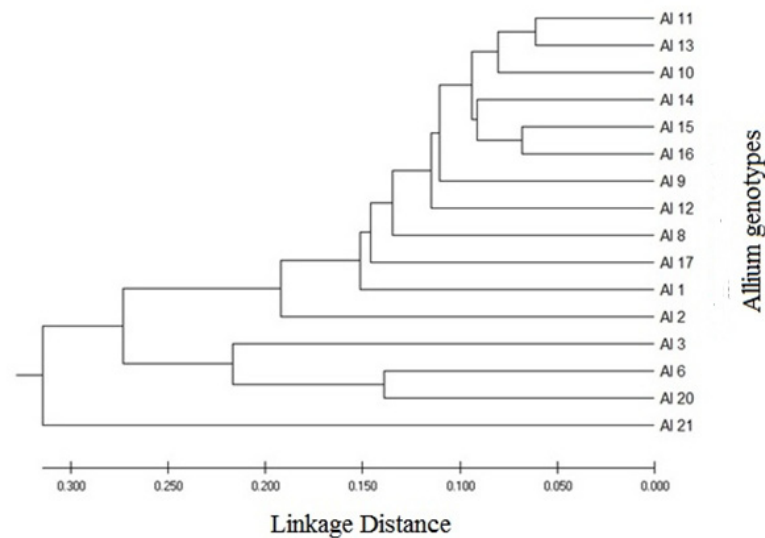


Fig. 3. Dendrogram of genetic differences of 16 *Allium* samples using PBS primers

Исследования популяций вида *Allium* с использованием PBS-праймеров показали высокий уровень полиморфизма и генетического разнообразия. Индекс полиморфизма (PIC) является важным показателем, который оценивает эффективность полиморфных локусов и определяет эффективность каждого праймера. По классификации Botstein, et al. (1980), к высокоинформативным праймерам относятся те, у которых $PIC \geq 0,5$, к среднеинформативным – имеющие значение PIC в интервале 0,5–0,25; к низкоинформативным – при $PIC \leq 0,25$ [21, с. 314]. Индексы полиморфизма при использовании PBS-праймеров варьировали от 0,689 до 0,831 со средним значением 0,761, что говорит о высокоинформативности и эффективности их использования при изучении генетического полиморфизма *Allium*. Существуют работы по анализу генетического разнообразия лука (*Allium cepa L.* и *A. regelianum*) с использованием специфических маркеров RAPD и ISSR. В этих работах значение PIC находилось в пределах 0,07–0,5 по изучаемым генотипам для RAPD-маркеров.

Значения PIC – от 0,06 до 0,26 для ISSR-маркеров по тем же генотипам [22, с. 110], [23, с. 30], [24, с. 213].

В работах по генетическому разнообразию популяций фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris L.*) на основе ретротранспозонов (iPBS) находят подтверждение наши исследования о высокоинформативности и эффективности применения PBS праймеров. Авторы использовали те же 18-нуклеотидные праймеры (2221, 2237, 2249, 2395), что и мы в наших исследованиях. Значение PIC для этих праймеров было выше 0,5 и варьировало от 0,54 до 0,91. Это подтверждает, что PIC является важным показателем, который оценивает полезность и эффективность полиморфных локусов и определяет высокую различающую способность праймеров среди изучаемых образцов [25, с. 940].

В работе Phong, et al. (2016) по разнообразию чая (*Camellia sinensis*), выращенного во Вьетнаме, авторы использовали 6 PBS-праймеров, один из них – 2373 – встречается в нашей работе. Процент полиморфизма образцов чая с использованием PBS-праймера 2373 в данном исследовании

Таблица 4

Оценка информативности PBS-праймеров по основным показателям генетического полиморфизма

Праймер	<i>L</i>	<i>PI</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>He</i>	<i>uHe</i>
2221	117	0,719	1,291	1,373	0,310	0,213	0,243
2237	69	0,794	1,203	1,330	0,286	0,194	0,221
2240	75	0,779	1,240	1,335	0,290	0,196	0,225
2249	69	0,746	1,290	1,363	0,309	0,211	0,243
2257	48	0,689	1,313	1,342	0,295	0,201	0,229
2373	48	0,831	1,146	1,308	0,271	0,183	0,208
2395	60	0,769	1,250	1,320	0,286	0,192	0,220
	Всего 486	Среднее 0,761			Среднее 0,292		

Table 4

Evaluation of the informative value of PBS primers by the main indicators of genetic polymorphism

Primer	<i>L</i>	<i>PI</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>He</i>	<i>uHe</i>
2221	117	0.719	1.291	1.373	0.310	0.213	0.243
2237	69	0.794	1.203	1.330	0.286	0.194	0.221
2240	75	0.779	1.240	1.335	0.290	0.196	0.225
2249	69	0.746	1.290	1.363	0.309	0.211	0.243
2257	48	0.689	1.313	1.342	0.295	0.201	0.229
2373	48	0.831	1.146	1.308	0.271	0.183	0.208
2395	60	0.769	1.250	1.320	0.286	0.192	0.220
	Total 486	Average value 0.761			Average value 0.292		

довании составил 88,89 %. В результате наших исследований процент полиморфизма данного праймера составил 95 % [26, с. 385].

Эффективность iPBS-метода оценивали при изучении генетической изменчивости между популяциями вида *Allium*. Оценка праймеров проводили по информационному индексу Шеннона и ожидаемой гетерозиготности. По двум этим параметрам самые высокие значения наблюдали у праймера 2221 ($I = 0.310$; $He = 0.213$), тогда как самые низкие показатели были у праймера 2373 ($I = 0.271$; $He = 0.183$). В работе Кос J., et al. (2018) при изучении генетической изменчивости *Colobanthus quitensis* с использованием iPBS-метода также представлены результаты об информативности индекса Шеннона и ожидаемой гетерозиготности. Полученные авторами данные подтверждают информативность, надежность и эффективность использования PBS-праймеров для изучения генетического разнообразия растений [27, с. 2467].

В результате исследований было выявлено, что нет связи между генетическим разнообразием и географическим происхождением образцов *Allium*, так как экотипы одного вида с разным географическим происхождением были сгруппированы каждый в отдельный кластер. Так, напри-

мер, вид *A. altaicum* сформировал отдельный кластер, в который вошли 12 экотипов из Западного и Южного Алтая, а также с участка природной флоры Алтайского ботанического сада. Вид *A. ledebourianum* также был сформирован в отдельный кластер, в который вошли экотипы из Западного, Юго-Западного Алтая.

В результате проведенных работ была сформирована коллекция PBS-праймеров, информативных для анализа исследуемых образцов, с их использованием была выявлена высокая степень полиморфизма и генетического разнообразия. Результаты исследования показали, что PBS-праймеры могут быть использованы для оценки генетического разнообразия как на межвидовом, так и на внутривидовом уровне, так как являются надежными и высокоинформативными. Использование iPBS-метода позволит решить проблему видовой идентификации редких исчезающих видов *Allium*, а также сохранения их биологического разнообразия.

Благодарности (Acknowledgements)

Работа поддержана Министерством образования и науки Республики Казахстан в рамках программы финансирования исследований по проекту AP 05130404.

Библиографический список

1. Vincent H., Bornand C. N., Kempel A., Fischer M. Rare species perform worse than widespread species under changed climate // Biological Conservation. 2020. No. 246. DOI: 10.1016/j.biocon.2020.108586.
2. Трифонова А. А. Генетическое разнообразие в популяциях особо охраняемых видов растений Волгоградской области: дис. ... канд. биол. наук. М., 2018. 223 с.
3. Список видов рода лук (*Allium*) [Электронный ресурс] // The Plant List. URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Amariyllidaceae/Allium> (дата обращения: 02.07.2020).
4. Байтенов М. С. Флора Казахстана. Т. 2. Алматы: Гылым, 2001. 279 с.

5. Котухов Ю. А., Данилова А. Н., Ануфриева О. А. Конспекты луков (*Allium L.*) Казахстанского Алтая, Сауро-Манрака и Зайсанской котловины // Ботанические исследования Сибири и Казахстана. 2011. № 17. С. 3–33.
6. Chen S., Chen W., Shen X., Yang Y., Qi F., Liu Y., Meng H. Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum L.*) by simple sequence repeat and inter simple sequence repeat analysis and agro-morphological traits // Biochemical Systematics and Ecology. 2014. Vol. 55. Pp. 260–267.
7. Филюшин М. А. AFLP маркирование генотипов сортов лука-порея (*Allium porrum*) // Генетика. 2011. Т. 47. № 4. С. 560–565.
8. Филюшин М. А. Анализ полиморфизма генома чеснока *Allium sativum* и родственных видов секции *Allium*: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2017. 19 с.
9. Galindo-González L., Mhiri C., Deyholos M. K., Grandbastien M. LTR-retrotransposons in plants: Engines of evolution // Gene. 2017. Vol. 626. Pp. 14–25. DOI: 10.1016/j.gene.2017.04.051.
10. Li S., Ramakrishnan M., Vinod K. K., Kalendar R., Yrjälä K., Zhou M. Development and Deployment of High-Throughput Retrotransposon-Based Markers Reveal Genetic Diversity and Population Structure of Asian Bamboo // Forests. 2019. Vol. 11 (1). No. 31. Pp. 1–25. DOI: 10.3390/f11010031.
11. Yilmaz S., Marakli S., Yuzbasioglu, G., Gozukirmizi N. Short-term mutagenicity test by using IRAP molecular marker in rice grown under herbicide treatment // Biotechnology & Biotechnological Equipment. 2018. Vol. 32. Pp. 923–928. DOI: 10.1080/13102818.2018.1474137.
12. Nie Q., Qiao G., Peng L., Wen X. Transcriptional activation of long terminal repeat retrotransposon sequences in the genome of pitaya under abiotic stress // Plant Physiology and Biochemistry. 2018. Vol. 135. Pp. 460–468 DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.014.
13. Khapilina O. N., Daniyarov A. Z., Amenov A. A., Novakovskaya A. P., Turzhanova A. S., Tagimanova D. S., Filippova N. I., Kalendar R. N. Analysis of genetic diversity in legumes germplasm using retrotransposon based molecular markers // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. 2017. No. 2. Pp. 3–11. DOI: 10.11134/btp.2.2017.4.
14. Abdou R., Bakasso Y., Saadou M., Baudoin J. P., Hardy O. J. Genetic diversity of Niger onions (*Allium cepa L.*) assessed by simple sequence repeat markers (SSR) // Acta Horticulturae 1143, VII International Symposium on Edible *Alliaceae*. Nigde (Turkey), 2015. Pp. 77–90.
15. Nguyen N. H., Driscoll H. E., Specht C. D. A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; *Alliaceae*) with a focus on the western North American center of diversity // Molecular Phylogenetics and Evolution. 2008. Vol. 47 (3). Pp. 1157–1172.
16. Валуцких О. Е., Шадрин Д. М., Пылина Я. И. Морфологическая изменчивость и генетическое разнообразие популяций *Gymnadenia conopsea (L.) R. Br. (Orchidaceae)* на европейском северо-востоке России (Республика Коми) // Генетика. 2019. Т. 55. № 2. С. 174–191.
17. Peakall R., Smouse P.E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular Ecology Notes. 2006. Vol. 6. No. 1. Pp. 288–295. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
18. Данилова А. Н., Котухов Ю.А. Эколого-биологические особенности лука алтайского (*Allium Altaicum Pall.*) в природных условиях юго-западной периферии Западного Алтая // Вестник Национальной академии наук Республики Казахстан. 2006. № 2. С. 104–107.
19. Николаева М. Г. Покой семян // В книге «Физиология семян». М.: Наука, 1982. С. 125–183.
20. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. iPBS: a universal method for DNA Wngerprinting and retrotransposon isolation // Theoretical and Applied Genetics. 2010. Vol. 121. Pp. 1419–1430. DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2.
21. Botstein D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // American Journal Human Genetics. 1980. Vol. 32. Pp. 314–331.
22. Sai Sudha G., Ramesh P., Chandra Sekhar A., Sai Krishna T., Bramhachari P.V., Riazunnisa K. Genetic diversity analysis of selected Onion (*Allium cepa L.*) germplasm using specific RAPD and ISSR polymorphism markers // Biocatalysis and Agricultural Biotechnology. 2019. Vol. 17. Pp. 110–118. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.007.
23. Трифонова А. А., Кочиева Е. З., Кудрявцев А. М. Низкий уровень подразделенности популяций редкого вида *Allium regellianum* A. K. Becker ex Пjin Волгоградской области на основе данных ISSR-анализа // Экологическая генетика. 2017. Т. 15. № 1. С. 30–37. DOI: 10.17816/ecogen15130-37.
24. Trifonova A. A., Kochieva E. Z., Kudryavtsev A. M. Analysis of microsatellite loci variability in rare and endemic species *Allium regelianum* A. K. Becker ex Iljin // Russian Journal of Genetics. 2017. Vol. 53 (2). Pp. 213–220. DOI: 10.1134/S1022795417010124.
25. Nemli S., Kianoosh T., Tanyolac M. B. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) accessions through retrotransposon-based interprimer binding sites (iPBSs) markers // Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 2015. Vol. 39. Pp. 940–948. DOI: 10.3906/tar-1505-59.
26. Phong N. H., Pongnak W., Soyong K., Poemim S., Poemim A. Diversity of Tea (*Camellia sinensis*) Grown in Vietnam based on Morphological Characteristics and Inter-primer Binding Sites (iPBS) Marker // International Journal of Agriculture & Biology. 2016. Vol.18. No. 2. Pp. 385–392. DOI: 10.17957/IJAB/15.0100.
27. Koc J., Androsiuk P., Chwedorzewska K., Cuba-Díaz M., Górecki R., Giełwanowska I. Range-wide pattern of genetic variation in *Colobanthus quitensis* // Polar Biology. 2018. Vol. 41. Pp. 2467–2479. DOI: 10.1007/s00300-018-2383-5.

Об авторах:

Олеся Борисовна Райзер¹, магистр сельскохозяйственных наук, научный сотрудник лаборатории геномики и биоинформатики растений, ORCID 0000-0003-0754-3342, AuthorID 57216895212; +7 777 880-12-02, 2008olesya@mail.ru

Оксана Николаевна Хапилина¹, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории геномики и биоинформатики растений, ORCID 0000-0002-7256-568, AuthorID 57194829297; +7 705 749-14-75, oksfur@mail.ru

¹ Национальный центр биотехнологии, Нур-Султан, Казахстан

iPBS polymorphism of rare relict and endangered *Allium* species growing on the territory of Kazakhstan Altai

O. B. Raizer¹✉, O. N. Khapilina¹

¹ National Center of Biotechnology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan

✉E-mail: 2008olesya@mail.ru

Abstract. The purpose of the study. The estimation of genetic polymorphism of Kazakhstan populations of rare relict and endemic *Allium* species. **The novelty** of the research is the use of the modern molecular genetic iPBS (Inter-Primer Binding Site Polymorphism) method of DNA amplification to assess the genetic diversity of different populations of *Allium sp.*, collected in their natural habitats in the Kazakhstan Altai. **Methods.** Samples of medicinal relict and endangered species *A. ledebourianum*, *A. altaicum*, *A. microdiction* were collected in the places of their natural growth in the territory of the Kazakhstan Altai. DNA was isolated from 3–5 day sterile seedlings using lysis STAB buffer with RNaseA. PBS primers were used to assess the genetic diversity of different populations of *Allium spp.* The amplification results obtained using different PBS primers were evaluated in the GenAlex 6.5 macro program for Excel. **Results.** The polymorphism of 16 genotypes of the rare relict and endangered *Allium sp.* was analyzed using 7 PBS primers. Clearly distinguishable amplicons were obtained, the number of which varied depending on the primer used. The dendrogram, based on UPGMA analysis, grouped the studied genotypes into 2 main clusters, one of which included samples from the *A. altaicum* population, and the second cluster included samples from the *A. ledebourianum* population. *A. microdiction* represented by one sample did not enter any cluster, and formed a basal branch in the dendrogram. The results of the study have revealed a high degree of iPBS polymorphism and genetic diversity in rare relict and endangered *Allium sp.* **Practical significance.** The use of the molecular genetic iPBS method allows to identify a high level of polymorphism, which can serve as a basis for the identification of various genotypes of the *Allium sp.*, which will significantly supplement traditional preservation methods of natural populations of this genus.

Keywords: *Allium*, population, PCR, molecular markers, iPBS, genotype, amplification, cluster analysis.

For citation: Raizer O. B., Khapilina O. N. iPBS-polimorfizm redkikh reliktovykh i ischezayushchikh vidov *Allium*, proizrastayushchikh na territorii Kazakhstanskogo Altaya [iPBS polymorphism of rare relict and endangered *Allium* species growing on the territory of Kazakhstan Altai] // Agrarian Bulletin of the Urals. 2020. Pp. 63–73. DOI: 10.32417/1997-4868-2020-200-9-63-73. (In Russian.)

Paper submitted: 01.08.2020.

References

1. Vincent H., Bornand C. N., Kempel A., Fischer M. Rare species perform worse than widespread species under changed climate // *Biological Conservation*. 2020. No. 246. DOI: 10.1016/j.biocon.2020.108586.
2. Trifonova A. A. Geneticheskoe raznoobrazie v populyatsiyakh osobo okhranyaemykh vidov rasteniy Volgogradskoy oblasti: dis. ... kand. biol. Nauk [Genetic diversity in populations of specially protected plant species of the Volgograd region: dis. ... cand. biol. sciences]. Moscow, 2018. 223 p. (In Russian.)
3. Spisok vidov roda luk (*Allium*) [List of species of the genus onion (*Allium*)] [e-resource] // The Plant List. URL: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/AmaryllidaceaeAllium> (appeal date: 02.07.2020). (In Russian.)
4. Baytenov M. S. Flora Kazakhstana [Flora of Kazakhstan]. T. 2. Almaty: Gylym, 2001. 279 p. (In Russian.)
5. Kotukhov Yu. A., Danilova A. N., Anufrieva O. A. Konspekty lukov (*Allium* L.) Kazakhstanskogo Altaya, Sauro-Manraka i Zaysanskoy kotloviny [abstract of bows (*Allium* L.) of Kazakhstan Altai, Sauro-Manrak and Zaysan depression] // *Botanicheskie issledovaniya Sibiri i Kazakhstana*. 2011. No. 17. Pp. 3–33. (In Russian.)
6. Chen S., Chen W., Shen X., Yang Y., Qi F., Liu Y., Meng H. Analysis of the genetic diversity of garlic (*Allium sativum* L.) by simple sequence repeat and inter simple sequence repeat analysis and agro-morphological traits // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2014. Vol. 55. Pp. 260–267.
7. Filyushin M. A. AFLP markirovanie genotipov sortov luka-poreya (*Allium porrum*) [AFLP marking of genotypes of leek varieties (*Allium porrum*)] // *Russian Journal of Genetics*. 2011. T. 47. No. 4. Pp. 560–565. (In Russian.)
8. Filyushin M. A. Analiz polimorfizma genoma chesnoka *Allium sativum* i rodstvennykh vidov seksii *Allium*: avtoref. dis. ... kand. biol. nauk [Analysis of polymorphism of the genome of garlic *Allium sativum* and related species of the section *Allium*: abstract of dis. ... cand. biol. sciences]. Moscow, 2017. 19 p. (In Russian.)

9. Galindo-González L., Mhiri C., Deyholos M. K., Grandbastien M. LTR-retrotransposons in plants: Engines of evolution // *Gene*. 2017. Vol. 626. Pp. 14–25. DOI: 10.1016/j.gene.2017.04.051.
10. Li S., Ramakrishnan M., Vinod K. K., Kalendar R., Yrjälä K., Zhou M. Development and Deployment of High-Throughput Retrotransposon-Based Markers Reveal Genetic Diversity and Population Structure of Asian Bamboo // *Forests*. 2019. Vol. 11 (1). No. 31. Pp. 1–25. DOI: 10.3390/f11010031.
11. Yilmaz S., Marakli S., Yuzbasioglu, G., Gozukirmizi N. Short-term mutagenicity test by using IRAP molecular marker in rice grown under herbicide treatment // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. 2018. Vol. 32. Pp. 923–928. DOI: 10.1080/13102818.2018.1474137.
12. Nie Q., Qiao G., Peng L., Wen X. Transcriptional activation of long terminal repeat retrotransposon sequences in the genome of pitaya under abiotic stress // *Plant Physiology and Biochemistry*. 2018. Vol. 135. Pp. 460–468. DOI: 10.1016/j.plaphy.2018.11.014.
13. Khapilina O. N., Daniyarov A. Z., Amenov A. A., Novakovskaya A. P., Turzhanova A. S., Tagimanova D. S., Filippova N. I., Kalendar R. N. Analysis of genetic diversity in legumes germplasm using retrotransposon based molecular markers // *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*. 2017. No. 2. Pp. 3–11. DOI: 10.11134/btp.2.2017.4.
14. Abdou R., Bakasso Y., Saadou M., Baudoin J. P., Hardy O. J. Genetic diversity of Niger onions (*Allium cepa* L.) assessed by simple sequence repeat markers (SSR) // *Acta Horticulturae* 1143, VII International Symposium on Edible *Alliaceae*. Nigde (Turkey), 2015. Pp. 77–90.
15. Nguyen N. H., Driscoll H. E., Specht C. D. A molecular phylogeny of the wild onions (*Allium*; *Alliaceae*) with a focus on the western North American center of diversity // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2008. Vol. 47 (3). Pp. 1157–1172.
16. Valuyskikh O. E., Shadrin D. M., Pylina Ya. I. Morfologicheskaya izmenchivost' i geneticheskoe raznoobrazie populyatsiy *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (*Orchidaceae*) na evropeyskom severo-vostoke Rossii (Respublika Komi) [Morphological variability and genetic diversity of populations of *Gymnadenia conopsea* (L.) R. Br. (*Orchidaceae*) in the European northeast of Russia (Komi Republic)] // *Russian Journal of Genetics*. 2019. T. 55. No. 2. Pp. 174–191. (In Russian.)
17. Peakall R., Smouse P.E. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // *Molecular Ecology Notes*. 2006. Vol. 6. No. 1. Pp. 288–295. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
18. Danilova A. N., Kotukhov Yu.A. Ekologo-biologicheskie osobennosti luka altayskogo (*Allium Altaicum* Pall.) v prirodnykh usloviyakh yugo-zapadnoy periferii Zapadnogo Altaya [Ecological and biological features of the Altai onion (*Allium Altaicum* Pall.) in the natural conditions of the southwestern periphery of Western Altai] // *Bulletin of the National Academy of Science Republic of Kazakhstan*. 2006. No. 2. Pp. 104–107. (In Russian.)
19. Nikolaeva M. G. Pokoy semyan [Seed dormancy] // In book *Fiziologiya semyan*. Moscow: Nauka, 1982. Pp. 125–183. (In Russian.)
20. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. iPBS: a universal method for DNA Wngerprinting and retrotransposon isolation // *Theoretical and Applied Genetics*. 2010. Vol. 121. Pp. 1419–1430. DOI: 10.1007/s00122-010-1398-2.
21. Botstein D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms // *American Journal Human Genetics*. 1980. Vol. 32. Pp. 314–331.
22. Sai Sudha G., Ramesh P., Chandra Sekhar A., Sai Krishna T., Bramhachari P.V., Riazunnisa K. Genetic diversity analysis of selected Onion (*Allium cepa* L.) germplasm using specific RAPD and ISSR polymorphism markers // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019. Vol. 17. Pp. 110–118. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.11.007.
23. Trifonova A. A., Kochieva E. Z., Kudryavtsev A. M. Nizkiy uroven' podrazdelenosti populyatsiy redkogo vida *Allium regellianum* A. K. Becker ex Iljin Volgogradskoy oblasti na osnove dannykh ISSR-analiza // *Ekologicheskaya genetika* [Low subdivision of populations of the rare species *Allium regellianum* A. K. Becker ex Iljin in the Volgograd region based on ISSR analysis data]. 2017. T. 15. No. 1. Pp. 30–37. DOI: 10.17816/ecogen15130-37. (In Russian.)
24. Trifonova A. A., Kochieva E. Z., Kudryavtsev A. M. Analysis of microsatellite loci variability in rare and endemic species *Allium regelianum* A. K. Becker ex Iljin // *Russian Journal of Genetics*. 2017. Vol. 53 (2). Pp. 213–220. DOI: 10.1134/S1022795417010124.
25. Nemli S., Kianoosh T., Tanyolac M. B. Genetic diversity and population structure of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accessions through retrotransposon-based interprimer binding sites (iPBSs) markers // *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2015. Vol. 39. Pp. 940–948. DOI: 10.3906/tar-1505-59.
26. Phong N. H., Pongnak W., Soyong K., Poaim S., Poaim A. Diversity of Tea (*Camellia sinensis*) Grown in Vietnam based on Morphological Characteristics and Inter-primer Binding Sites (iPBS) Marker // *International Journal of Agriculture & Biology*. 2016. Vol. 18. No. 2. Pp. 385–392. DOI: 10.17957/IJAB/15.0100.
27. Koc J., Androsiuk P., Chwedorzewska K., Cuba-Díaz M., Górecki R., Gielwanowska I. Range-wide pattern of genetic variation in *Colobanthus quitensis* // *Polar Biology*. 2018. Vol. 41. Pp. 2467–2479. DOI: 10.1007/s00300-018-2383-5.

Authors' information:

Olesya B. Raizer¹, master of agricultural sciences, researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0003-0754-3342, AuthorID 57216895212; +7 777 880-12-02, 2008olesya@mail.ru

Oksana N. Khapilina¹, candidate of biological sciences, leading researcher of laboratory of plant genomics and bioinformatics, ORCID 0000-0002-7256-568, AuthorID 57194829297; +7 705 749-14-75, oksfur@mail.ru

¹ National Center of Biotechnology, Nur-Sultan, Republic of Kazakhstan