

Изучение информативности маркерной системы при генетическом анализе ценопопуляций *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow с использованием ISSR-праймеров

[Дмитриев П. А.¹](#), [Шмараева А. Н.²](#), [Козловский Б. Л.³](#), [Вардуни Т. В.⁴](#), [Чохели В. А.⁵](#), [Раджпут В. Д.⁶](#), [Степаненко В. В.⁷](#), [Азаров А. С.⁸](#), [Бакулин С. Д.⁹](#)

1. Старший научный сотрудник лаборатории биоразнообразия НИИ Биологии ЮФУ.
2. Должность: научный сотрудник
3. Место работы (полностью): Ботанический сад Южного федерального университета
4. Директор ботанического сада ЮФУ
5. Должность: младший научный сотрудник
6. Ученое звание: Доктор
7. Должность: биолог
8. Южный федеральный университет, Академия Биологии и Биотехнологии им. Д.И. Ивановского, лаборатория молекулярной генетики
9. Ботанический сад ЮФУ

В статье описываются основные характеристики информативности праймеров, такие как величина информационного полиморфизма (polymorphism information content, PIC) для доминантных маркеров, эффективное мультиплексное отношение (effective multiplex ratio, EMR) и маркерный индекс (marker index, MI), разрешающая способность праймера (resolving power, Rp). Значение информационного полиморфизма (PIC) варьировало в пределах от 0,095 до 0,5 для праймеров UBC 811 и UBC 835, предел от 0 до 0,5 был характерен для праймеров UBC 857 и UBC 880. Наибольшим эффективным мультиплексным отношением характеризовался праймер UBC 811 (EMR=19,69), а наименьшим UBC 857 (EMR=0,42). Наибольшими значениями маркерного индекса (MI) характеризовались праймеры UBC 811 и UBC 835 (диапазон 1,871–9,845 и 0,780–4,105 соответственно). А наименьшими значениями маркерного индекса (MI) характеризовались праймеры UBC 857 и UBC 880 (диапазон 0–0,210 и 0–0,615 соответственно). Наибольшая разрешающая способность и количество генотипов, которое может быть диагностировано (x) было выявлено у праймера UBC 811 (Rp=25, x=154), а наименьшая у праймера UBC 857 (Rp=3,2, x=9). У всех праймеров оказалась высокая степень информативности (более 0,4), наиболее информативным был праймер UBC 811 (AvIb=0,5208). Показатели разрешающей способности (Rp) праймеров и эффективное мультиплексное отношение (EMR) показывают, что данная система «праймер-методика» и в целом используемая маркерная система пригодна для диагностики ценопопуляций *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow. Цель данной работы – изучить приемлемость использования выбранной маркерной системы.

Введение

Bellevalia sarmatica (Pall. ex Georgi) Woronow [*Hyacinthus sarmaticus* Pall. ex Georgi] (сем. Hyacinthaceae Batsch) – бельвалия сарматская – это эндемик Причерноморской подпровинции степной зоны Евразии, имеющий в Красной книге Ростовской области категорию статуса редкости 2а как вид, сокращающийся в численности в результате изменения условий существования или разрушения местообитаний. *Bellevalia sarmatica* внесена также в Красную книгу Российской Федерации [7] с аналогичной категорией статуса редкости. Этот вид включался в списки редких, исчезающих и нуждающихся в охране растений Ростовской области с 1977 г. [2].

Ареал *Bellevalia sarmatica* охватывает причерноморские степи от Румынии до Нижнего Поволжья и Предкавказья, отдельные части ареала имеются в переднеазиатском регионе (Кавказ, Турция, Иран). В Ростовской области бельвалия сарматская встречается спорадически во всех природных районах [4].

Bellevalia sarmatica – луковичный многолетник, криптофит (геофит), мезофит, гелиофит, кальцефил; анемохор, размножается семенами. Вид хорошо адаптирован к обитанию в степях как по ритму развития (весенний гемиземероид), так и по способу расселения (перекати-поле, редкий для однодольных способ диссеминации).

Живые и биокосные системы

Дмитриев П. А., Шмараева А. Н., Козловский Б. Л., Вардуни Т. В., Чохели В. А., Раджпут В. Д., Степаненко В. В., Азаров А. С., Бакулин С. Д.

Изучение информативности маркерной системы при генетическом анализе ценопопуляций *Bellevalia sarmatica*

(Pall. ex Georgi) Woronow с использованием ISSR-маркеров

Бельвалия сарматская произрастает в зональных, залежных и каменистых степях, на остепнённых склонах балок, в искусственных полевых защитных лесополосах, на опушках кустарниковых зарослей [10]. Лимитирующим фактором для популяций бельвалии сарматской является распашка степей, чрезмерный выпас скота на сохранившихся целинах и в балках, уничтожение луковиц слепышом обыкновенным (*Spalax microphthalmus*), относительно медленное возобновление [6], так как растения переходят в генеративное состояние в естественных экотопах на 5-ом году, в культуре – на 4-ом году после прорастания семян [5].

Bellevalia sarmatica культивировалась в Ботаническом саду с 1961 года [3], но в последние годы коллекции луковичных растений были уничтожены слепышом обыкновенным, который расселился практически по всей территории Ростовской области. В 2013 г. была предпринята попытка вновь сформировать микропопуляцию этого вида, и в настоящее время в коллекции редких и исчезающих растений Ростовской области удаётся сохранять несколько десятков генеративных особей.

При решении проблемы сохранения генофонда растений используются современные молекулярно-генетические методы. Так потенциал генетической изменчивости охраняемых видов растений может быть выявлен с использованием молекулярно-генетических маркеров полиморфизма различных участков геномной ДНК [1].

Материалы и методы исследований

Объектом исследования послужили растения *Bellevalia sarmatica* (рис. 1, 2, 3, 4) отобранные из двух ценопопуляций, находящиеся на особо охраняемых природных территориях (ООПТ) Ростовской области. Из каждой ценопопуляции было отобрано по 10 экземпляров, находящихся на расстоянии не менее 10 метров друг от друга. Отбор экземпляров проводили по трансектам для того, чтобы максимально охватить разнообразие особей в составе ценопопуляции, включая краевые и центральные особи.

Ценопопуляция 1

Местонахождение: Мясниковский р-н, 1,7 км северо-восточнее х. Недвиговка (Недвиговское сельское поселение), балка Каменная, приводораздельные и верхние части правого склона балки и её поперечных отвершков, ООПТ «Каменная балка», 2-й кластерный участок.

Географические координаты: 47.288123 с. ш., 39.382833 в. д.

Ценопопуляция 2

Местонахождение: Усть-Донецкий р-н, 1,5 км западнее хутора Конигина, правый коренной берег р. Дон, балка Кулиничева, 2-й кластерный участок ООПТ «Раздорские склоны», остепнённый склон южной экспозиции.

Географические координаты: 47.587864 с. ш., 40.663795 в. д.

image not found or type unknown

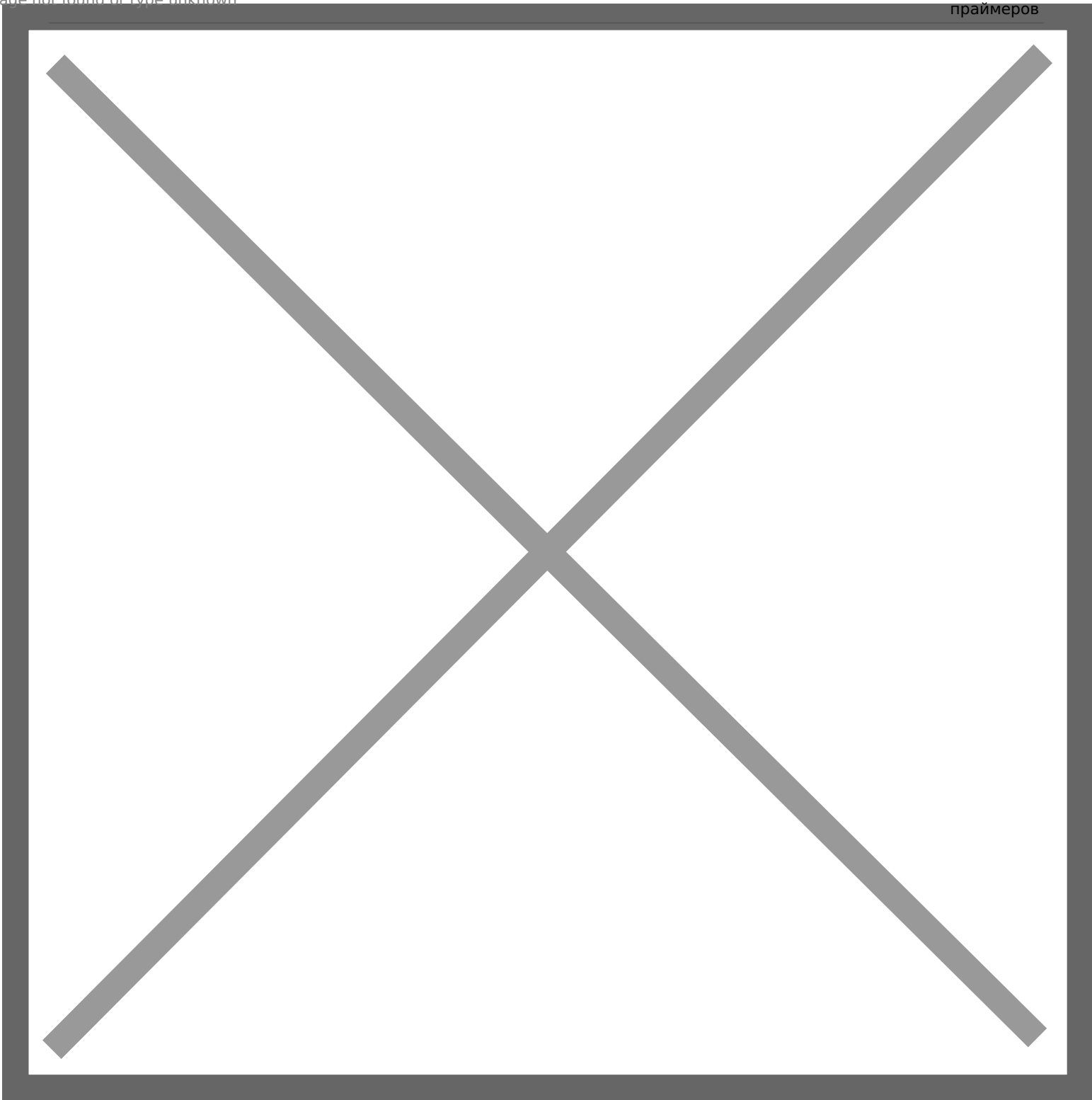


Рис. 1 – Цветение бельвалии сарматской (ООПТ «Каменная балка»). 28.04.2020 г.

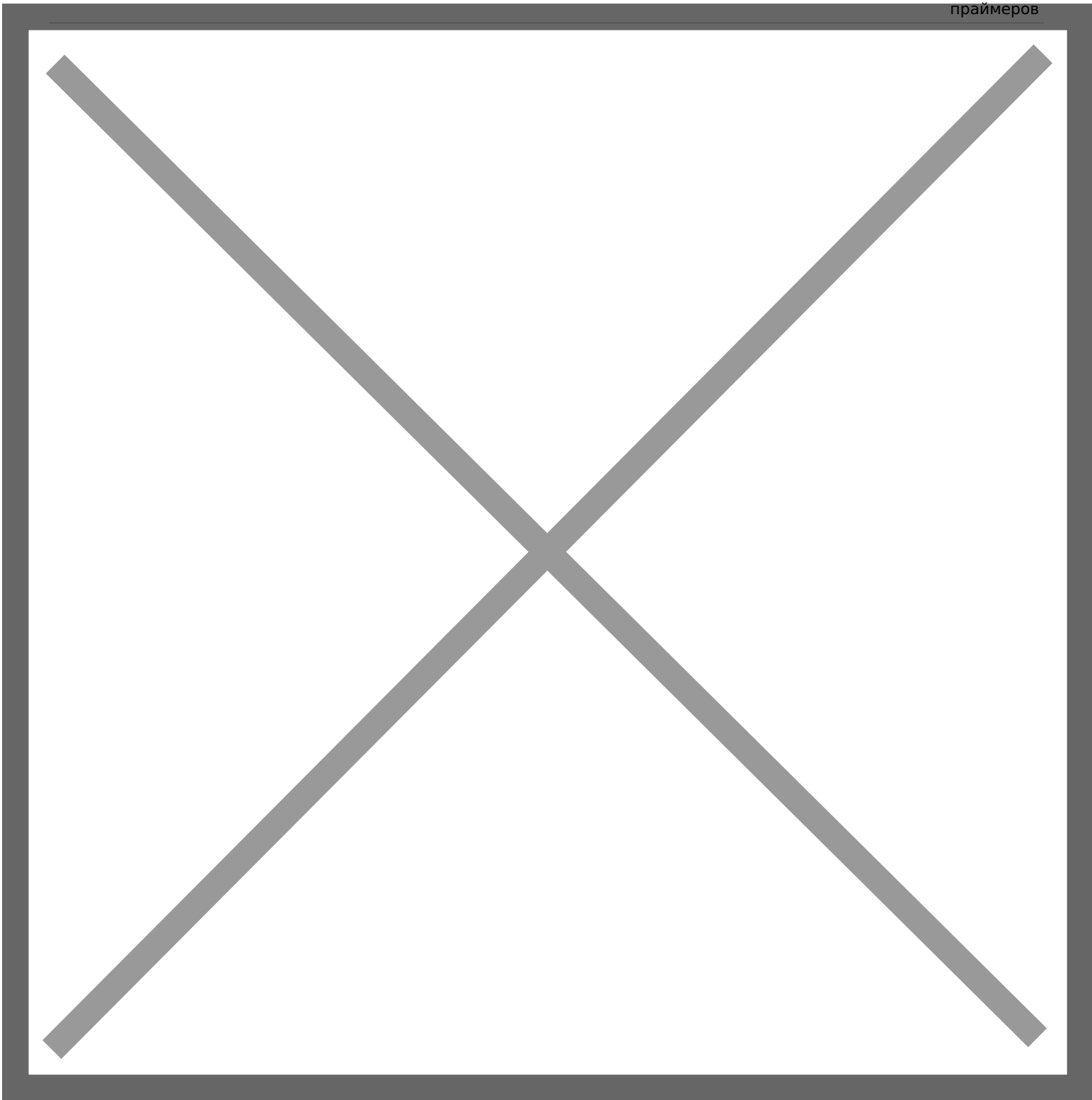


Рис. 2 - Ценопопуляция бельвалии сарматской на ООПТ «Каменная балка». 28.04.2020 г.

Выделение тотальной ДНК проводилось из гомогенизированных образцов навесками по 50 мг, которые предварительно были продезинфицированы и обработаны слабым раствором гипохлорита натрия. Выделение ДНК проводилось с использованием сорбентного метода при помощи коммерческого набора «Сорб-ГМО-Б» (Синтол,

Живые и биокосные системы

Дмитриев П. А., Шмараева А. Н., Козловский Б. Л., Вардуни Т. В., Чохели В. А., Раджпут В. Д., Степаненко В. В., Азаров А. С., Бакулин С. Д.

Изучение информативности маркерной системы при генетическом анализе ценопопуляций *Bellevalia sarmatica*

(*Pall. ex Georgi*) Woronow с использованием ISSR-анализаторе Qubit 3.0 (Invitrogen, США), после чего все образцы ранжировали до концентрации 5 нг/мкл. Примеров

image not found or type unknown

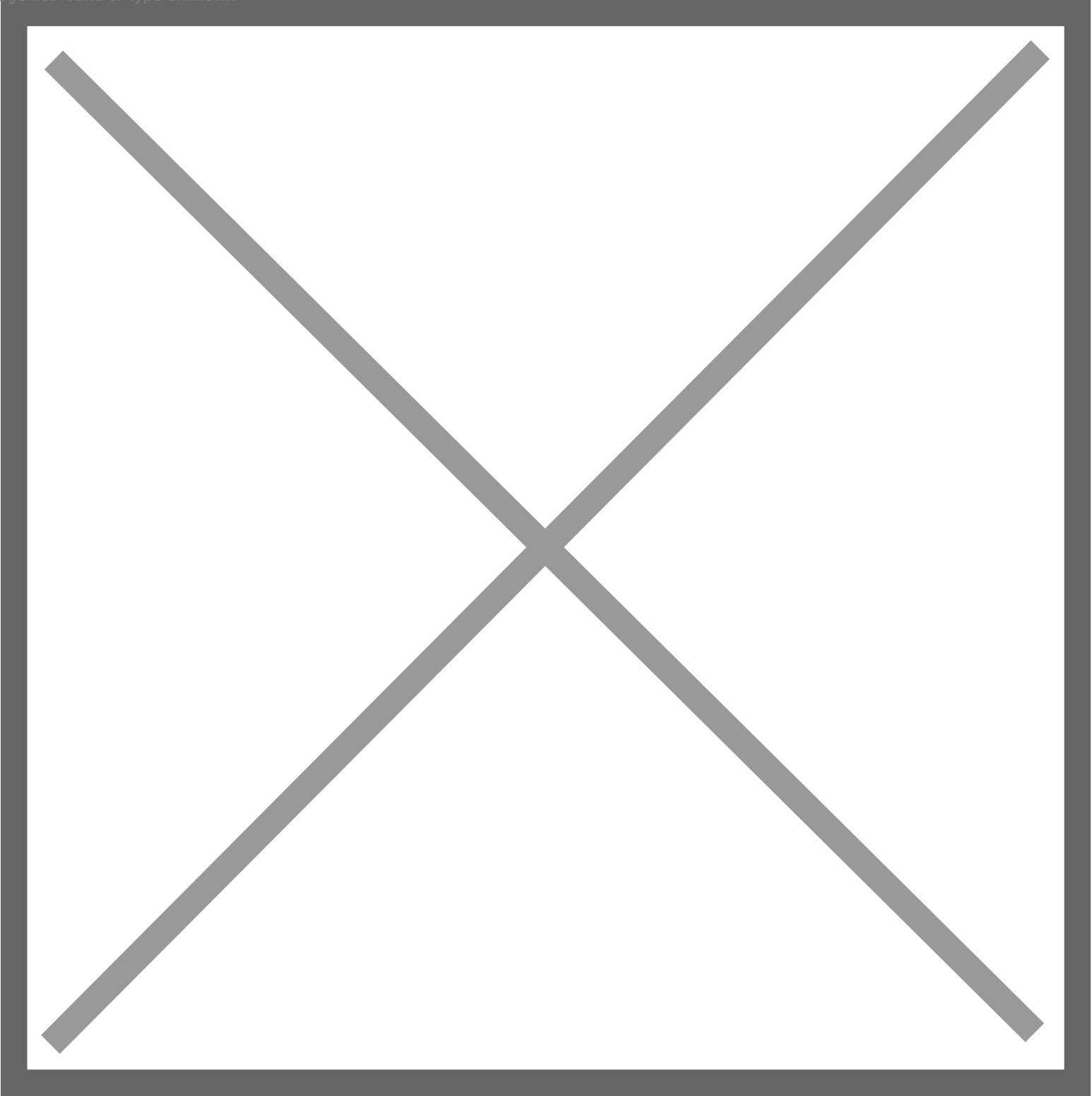


Рис. 3 – Бутонизация бельвалии сарматской на ООПТ «Раздорские склоны». 04.05.2020 г.

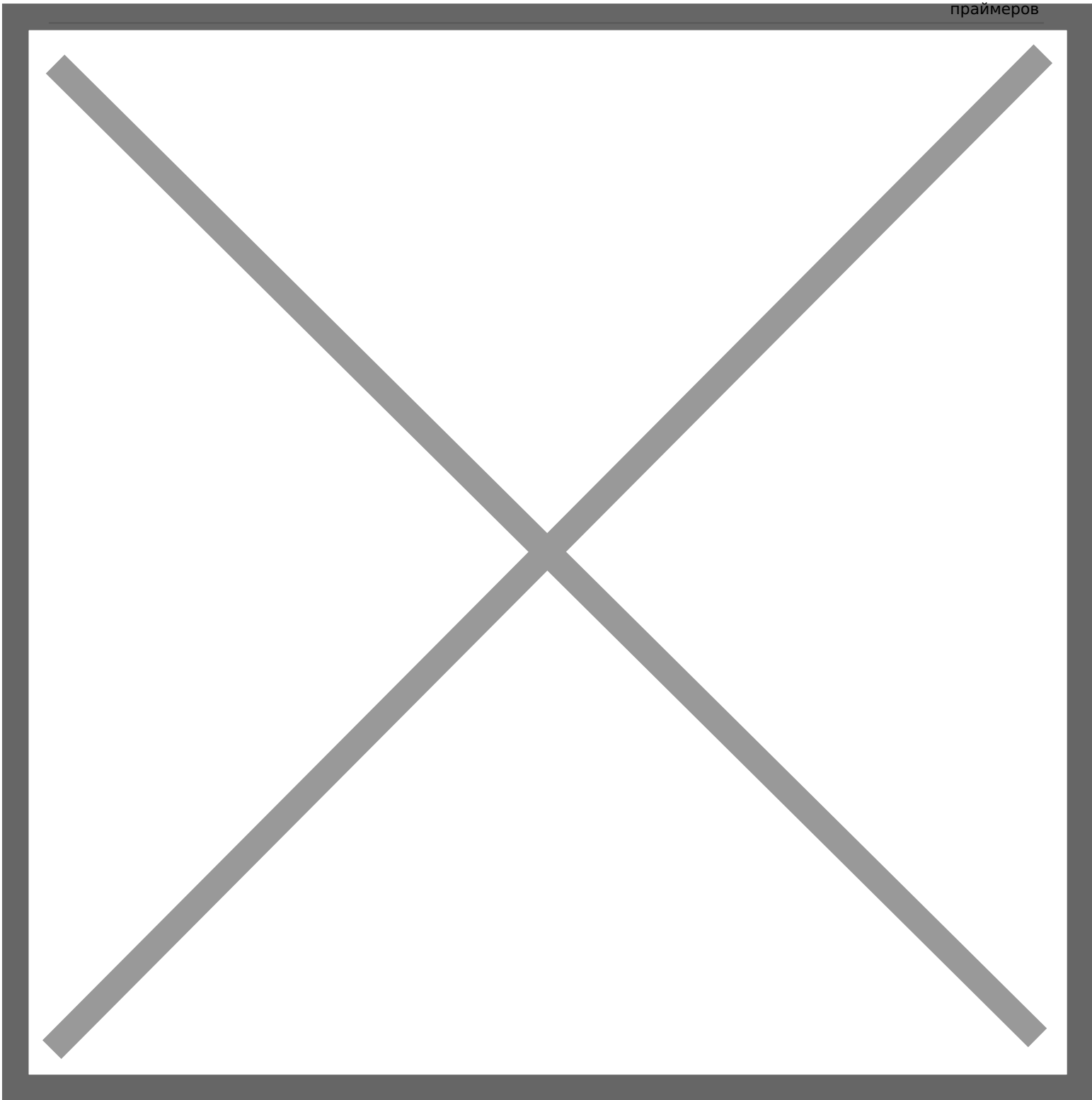


Рис. 4 - Ценопопуляция бельвалии сарматской на ООПТ «Раздорские склоны». 20.05.2020 г.

Для генетического анализа использовался межмикросателлитный (ISSR) анализ. ISSR-праймеры подбирались на основе литературных данных (из набора UBC Primer Set #9) [12, 15]. Характеристика праймеров представлена в таблице 1. Оптимизация условий для проведения ПЦР и температура отжига праймеров для *Bellevalia sarmatica* была

изучена нами ранее [8].

Таблица 1 – Нуклеотидная последовательность и температура отжига ISSR-праймеров

Название ISSR-праймера	Нуклеотидная последовательность (5'→3')	Температура отжига, (Ta, °C)
UBC 811	(GA) ₈ C	55
UBC 835	(AG) ₈ YC*	53
UBC 857	(AC) ₈ YG*	50
UBC 878	(GGAT) ₄	48
UBC 880	(GGAG) ₄	47

* где Y – любой пиримидин (Т или С)

ПЦР-смесь готовили из расчёта на один образец: H₂O (DD) – 15,3 мкл, 25 мМ хлорид магния (MgCl₂) – 2,5 мкл; 25 мМ раствор нуклеотидов dNTP – 2,5 мкл, 10×буфер для ПЦР – 2,5 мкл, мутантная Taq-полимераза – 0,2 мкл (5 ед./мкл), ДНК-матрица (концентрация 5 нг/мкл) – 1 мкл, праймер (10 пМ/мкл) – 1 мкл. Общий объём ПЦР-смеси составил 25 мкл.

Аmplification проводили в термоциклере T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, США) и C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Протокол амплификации: 1) 94 °C – 5:00 мин; 2) 94 °C – 0:30 сек; 3) Ta °C – 0:45 сек; 4) 72 °C – 2:00 мин; 5) 35 циклов пункты 2–4; 6) 72 °C – 5:00 мин; 7. Хранение при 12 °C.

Разделение фрагментов проводили электрофорезом в 2 %-м агарозном геле с использованием 1×TBE-буфера (Tris, Boric acid, EDTA) при напряжении 90 В, 3 часа, источник питания – PowerPacBasic (Bio-Rad, США). Пробирки с ампликонами предварительно смешивали с 2 мкм загрузочного красителя состава бромфеноловый синий + глицерин. Окрашивание ДНК производили красителем SYBR Green I x80 (Lumiprobe, США) из соотношения 2 мкл красителя на 5 мкл ампликонов, съёмку – в гельдокументирующей системе GelDoc XR+ (Bio-Rad, США) с программным обеспечением ImageLab версии 6.0 (Bio-Rad, США). Маркер длин ДНК фрагментов 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия) добавляли по 7 мкл в лунку.

Компьютерная обработка полученных данных проводилась при помощи приложения MS Excel (Microsoft Office 2007) где строилась бинарная матрица, отражающая наличие (1) или отсутствие (0) фрагмента. При этом учитывались только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты, изменчивость по интенсивности не учитывалась. Были рассчитаны основные параметры используемой маркерной системы, такие как величина информационного полиморфизма (polymorphism information content, PIC) для доминантных маркеров [11], эффективное мультиплексное отношение (effective multiplex ratio, EMR) и маркерный индекс (marker index, MI) [13], разрешающая способность праймера (resolving power, Rp) [14].

Далее приведены основные формулы для анализа маркерной системы.

Величина информационного полиморфизма (PIC):

$$PIC = -\sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i$$

где p – частота присутствующих фрагментов (1), q – частота отсутствующих фрагментов (0).

Эффективное мультиплексное отношение (EMR):

$$EMR = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i}$$

где p_r – число полиморфных локусов, p – общее число локусов.

Маркерный индекс (MI):



Разрешающая способность (Rp):



где $I_b = 1 - (2 \times 0,5 - p)$ – информативность ампликона, p – доля особей, у которых выявлен ампликон I .

Результаты исследования и обсуждение

На основании анализа полученных электрофореграмм установлено, что число ISSR-фрагментов на общую проанализированную выборку варьировало от 8 (праймер UBC 857) до 48 (праймер UBC 811). Среднее число фрагментов составило 23,4, всего детектировано 117 фрагментов (табл. 2). Длина фрагментов укладывалась в диапазон от 200 п.н. (праймер UBC 880) до 2300 п.н. (праймер UBC 811).

Таблица 2 – Характеристика праймеров по двум ценопопуляциям

Bellevalia sarmatica

Название ISSR-праймера	Длина фрагментов, п.н.	Количество фрагментов на общую выборку, шт.	Количество полиморфных фрагментов, шт.	% полиморфизма
UBC 811	250-2300	48	48	100
UBC 835	250-1575	31	31	100
UBC 857	325-1200	8	7	87,5
UBC 878	300-1625	17	16	94,1
UBC 880	200-1525	13	12	92,3
Итого		117		

Число полиморфных фрагментов варьировало от 7 (процент полиморфизма 87,5) для праймера UBC 857 до 48 (процент полиморфизма 100) для праймера UBC 811.

Большое количество полученных фрагментов для праймера UBC 811, по-видимому, связано с тем, что в качестве якоря выступает один нуклеотид. Несмотря на то, что праймер UBC 857 является вырожденным и содержит динуклеотидные повторы с якорем из двух нуклеотидов, малое количество фрагментов для него можно объяснить низкой специфичностью. Возможно, в геноме *Bellevalia sarmatica* повторов «TG» крайне мало, или повторов «TG» много, но с используемым «якорем» «YG» идентифицируются только некоторые из них.

Малое количество ампликонов, получаемых при использовании тетрануклеотидных повторов, по сравнению с динуклеотидными, возможно, связано с тем, что в геноме *Bellevalia sarmatica* праймеры лучше отжигаются на тандемных повторах, состоящих из двух нуклеотидов.

(Pall. ex Georgi) Woronow с использованием ISSR-праймеров
 Существует несколько подходов, позволяющих оценивать меру информативности маркерной системы при генетическом анализе ценопопуляций *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow с использованием ISSR-праймеров. ДНК-маркеры в настоящее время признаны довольно удобным и качественным инструментом оценки генетического разнообразия на молекулярном уровне [9].

Для оценки пригодности выбранной системы праймеров были рассчитаны основные параметры информативности праймеров (табл. 3). Чтобы отразить способность сочетания «праймер-применяемая методика» устанавливать различия между большим числом генотипов, используют показатель разрешающей способности (Rp). Наибольшая разрешающая способность и количество генотипов, которое может быть диагностировано (x) была выявлена у праймера UBC 811 (Rp=25, x=154), а наименьшие у праймера UBC 857 (Rp=3,2, x=9). У всех праймеров оказалась высокая степень информативности (более 0,4), наиболее информативным был праймер UBC 811 (AvIb=0,5208).

Таблица 3 – Анализ информативности праймеров по двум ценопопуляциям *Bellevalia sarmatica*

Название ISSR-праймера	Rp	AvIb	x	PIС	EMR	MI
UBC 811	25,0	0,5208	154,6667	0,095-0,5	19,69	1,871-9,845
UBC 835	14,3	0,4612	83,3333	0,095-0,5	8,21	0,780-4,105
UBC 857	3,2	0,4	9,3333	0-0,5	0,42	0-0,21
UBC 878	7,9	0,4647	40,6667	0-0,495	2,19	0-1,084
UBC 880	6,4	0,4923	30,6667	0-0,5	1,23	0-0,615

Среднее значение разрешающей способности равно 11,36, а среднее значение информативности праймера – 0,4678. Значение информационного полиморфизма (PIС) варьировала в пределах от 0,095 до 0,5 для праймеров UBC 811 и UBC 835, предел от 0 до 0,5 был характерен для праймеров UBC 857 и UBC 880. И для праймера UBC 878 значение PIС варьировало в пределах от 0 до 0,495. Максимальное значение PIС для ISSR-маркеров равно 0,5 [9]. Средние значения PIС для каждого праймера распределились по шкале 0,266 (UBC 857) → 0,317 (UBC 878) → 0,319 (UBC 880) → 0,328 (UBC 835) → 0,356 (UBC 811).

Для каждого праймера было рассчитано эффективное мультиплексное отношение (EMR). Чем выше значения EMR, тем эффективней система «праймер-маркер». Наибольшим эффективным мультиплексным отношением характеризовался праймер UBC 811 (EMR=19,69), а наименьшим UBC 857 (EMR=0,42). Маркерный индекс (MI) – статистическая величина, используемая для оценки суммарной пригодности маркерной системы. Чем выше значение MI для методики, тем она лучше. Наибольшими значениями маркерного индекса (MI) характеризовались праймеры UBC 811 и UBC 835 (диапазон 1,871-9,845 и 0,780-4,105 соответственно). А наименьшими значениями маркерного индекса (MI) характеризовались праймеры UBC 857 и UBC 880 (диапазон 0-0,21 и 0-0,615 соответственно).

Заключение

В результате проведенного исследования используемая маркерная система зарекомендовала себя как надёжная. Наиболее информативными оказались два праймера праймер UBC 811 (AvIb=0,5208) и праймер UBC 880 (AvIb=0,4923), хотя большее количество генотипов можно выявить с использованием праймеров UBC 811 (x=154) и UBC 835 (x=83).

Основываясь на показателе разрешающей способности (Rp) праймеров и эффективном мультиплексном отношении (EMR), можно сделать вывод, что данная система «праймер-методика» пригодна для диагностики ценопопуляций *Bellevalia sarmatica*.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (№ 0852-2020-0029).

Список литературы

1. Боронникова С. В. Молекулярно-генетическая паспортизация редких реликтовых видов растений // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2009. – Том 7. – № 3. – С. 3–11.
2. Зозулин Г. М., Пашков Г. Д., Абрамова Т. И., Степнин Г. И., Федяева В. В. Материалы для Красной книги Ростовской области // Известия СКНЦ ВШ. Естественные науки. – 1977. – № 1. – С. 105–108.
3. Колесникова Л. Г. Коллекция степных растений флоры Нижнего Дона в Ботаническом саду Ростовского университета // Итоги интродукции растений / Ред. В. Г. Сидоренко. Ростов-на-Дону, 1989. – С. 3–6.
4. Красная книга Ростовской области. Растения и грибы. Издание 2-е. Т. 2 / Науч. ред. В. В. Федяева. Ростов-на-Дону: Минприроды Ростовской области, 2014. – 344 с.
5. Кузьменко И. П., Шмараева А. Н. Семенная продуктивность *Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow при интродукции в Ботанический сад Южного федерального университета // Актуальные проблемы экологии и природопользования: сборник материалов / Отв. ред. К. Ш. Казеев; Южный федеральный университет. Ростов-на-Дону – Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2019. – С. 93–96.
6. Редкие и исчезающие виды растений, грибов и лишайников Ростовской области. Ростов-на-Дону: Изд-во «Пайк», 1996. – 248 с.
7. Скрипчинский В. В. Бельвалия сарматская // Красная книга Российской Федерации. Растения и грибы. М., Т-во науч. изданий КМК, 2008. – С. 284–285.
8. Степаненко В. В., Чохели В. А., Шмараева А. Н., Вардуни Т. В. Оптимизация условий ПЦР для проведения ISSR-анализа редких и исчезающих видов растений Ростовской области на примере *Bellevalia sarmatica* // Актуальные проблемы экологии и природопользования. Сборник материалов / Отв. ред. К. Ш. Казеев; Южный федеральный университет. Ростов-на-Дону; Таганрог: Издательство Южного федерального университета, 2020. – С. 115–119.
9. Чесноков Ю. В., Артемьева А. М. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 5. – С. 571–578.
10. Шмараева А. Н., Шишлова Ж. Н., Федяева В. В. Состояние популяций бельвалии сарматской (*Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow) в Ростовской области // Экологический вестник Северного Кавказа. – 2009. – Т. 5. – № 2. – С. 74–78.
11. Ghislain M., Zhang D., Fajardo D., Huaman Z., Hijmans R. J. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers // Genet. Resour. Crop Evol. – 1999. – V. 46. – pp. 547–555.
12. Godwin I. D., Aitken E. A. B., Smith L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics // Electrophoresis. – 1997. – V. 18. – pp. 1524–1528.
13. Nagaraju J., Damodar R. K., Nagaraja G. M., Sethuraman B. N. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori* // Heredity. – 2001. V. 86. – pp. 588–597.
14. Prevost A., Wilkinson M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars // Theor. Appl. Genet. – 1999. – V. 98. – pp. 107–112.
15. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – 1994. – V. 20. – pp. 176–183.

Spisok literatury

1. Boronnikova S. V. Molekuljarno-geneticheskaja pasportizacija redkih reliktovyh vidov rastenij // Vestnik NGU. Serija: Biologija, klinicheskaja medicina. – 2009. – Tom 7. – № 3. – S. 3–11.
2. Zozulin G. M., Pashkov G. D., Abramova T. I., Stepnin G. I., Fedjaeva V. V. Materialy dlja Krasnoj knigi Rostovskoj oblasti // Izvestija SKNC VSh. Estestvennye nauki. – 1977. – № 1. – S. 105–108.
3. Kolesnikova L. G. Kollekcija stepnyh rastenij flory Nizhnego Dona v Botanicheskom sadu Rostovskogo universiteta // Itogi introdukcii rastenij / Red. V. G. Sidorenko. Rostov-na-Donu, 1989. – S. 3–6.
4. Krasnaja kniga Rostovskoj oblasti. Rastenija i griby. Izdanie 2-e. T. 2 / Nauch. red. V. V. Fedjaeva. Rostov-na-Donu: Minprirody Rostovskoj oblasti, 2014. – 344 s.
5. Kuz'menko I. P., Shmaraeva A. N. Semennaja produktivnost' Bellevalia sarmatica (Pall. ex Georgi) Woronow pri introdukcii v Botanicheskij sad Juzhnogo federal'nogo universiteta // Aktual'nye problemy jekologii i prirodnopol'zovanija: sbornik materialov / Otv. red. K. Sh. Kazeev; Juzhnyj federal'nyj universitet. Rostov-na-Donu – Taganrog: Izdatel'stvo Juzhnogo federal'nogo universiteta, 2019. – S. 93–96.
6. Redkie i ischezajushhie vidy rastenij, gribov i lishajnikov Rostovskoj oblasti. Rostov-na-Donu: Izd-vo «Pajk», 1996. – 248 s.
7. Skripchinskij V. V. Bel'valija sarmatskaja // Krasnaja kniga Rossijskoj Federacii. Rastenija i griby. M., T-vo nauch. izdanij KMK, 2008. – S. 284–285.
8. Stepanenko V. V., Choheli V. A., Shmaraeva A. N., Varduni T. V. Optimizacija uslovij PCR dlja provedenija ISSR-analiza redkih i ischezajushhijh vidov rastenij Rostovskoj oblasti na primere Bellevalia sarmatica // Aktual'nye problemy jekologii i prirodnopol'zovanija. Sbornik materialov / Otv. red. K. Sh. Kazeev; Juzhnyj federal'nyj universitet. Rostov-na-Donu; Taganrog: Izdatel'stvo Juzhnogo federal'nogo universiteta, 2020. – S. 115–119.

9. Chesnokov Ju. V., Artem'eva A. M. Ocenka mery informacionnogo polimorfizma genetičeskogo raznoobražija // Sel'skohožajstvennaja biologija. – 2015. – T. 50, № 5. – S. 571–578.
10. Shmaraeva A. N., Shishlova Zh. N., Fedjaeva V. V. Sostojanie populjacij bel'valii sarmatskoj (*Bellevalia sarmatica* (Pall. ex Georgi) Woronow) v Rostovskoj oblasti // Jekologičeskij vestnik Severnogo Kavkaza. – 2009. – T. 5. – № 2. – S. 74–78.
11. Ghislain M., Zhang D., Fajardo D., Huaman Z., Hijmans R. J. Marker-assisted sampling of the cultivated Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers // Genet. Resour. Crop Evol. – 1999. – V. 46. – Rr. 547–555.
12. Godwin I. D., Aitken E. A. B., Smith L. W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics // Electrophoresis. – 1997. – V. 18. – Rr. 1524–1528.
13. Nagaraju J., Damodar R. K., Nagaraja G. M., Sethuraman B. N. Comparison of multilocus RFLPs and PCR-based marker systems for genetic analysis of the silkworm, *Bombyx mori* // Heredity. – 2001. V. 86. – Rr. 588–597.
14. Prevost A., Wilkinson M. J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars // Theor. Appl. Genet. – 1999. – V. 98. – Rr. 107–112.
15. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. – 1994. – V. 20. – Rr. 176–183.