

УДК 575.22:577.29
AGRIS F30

https://doi.org/10.33619/2414-2948/54/03

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕДКОГО ВИДА РАСТЕНИЯ
PULSATILLA PATENS (L.) MILL. СЕВЕРНОГО КАЗАХСТАНА**

- ©**Пинаева Ю. Ю.**, ORCID: 0000-0002-1909-3054, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, julya.pinaeva@yandex.ru
©**Бельтюкова Н. Н.**, ORCID: 0000-0002-4188-1997, канд. биол. наук, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, N-NBeltukova@gmail.com
©**Пришневская Я. В.**, ORCID: 0000-0003-1513-2682, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, yana_prishnivskaya@mail.ru
©**Султангазина Г. Ж.**, ORCID: 0000-0002-4160-7090, канд. биол. наук, Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова, г. Костанай, Казахстан, gul_sultan@mail.ru
©**Бейшова И. С.**, ORCID: 0000-0001-5293-2190, канд. с.-х. наук, Западно-Казахстанский аграрно-технический университет им. Жангир хана, г. Уральск, Казахстан, indira_bei@mail.ru
©**Ульянов В. А.**, ORCID: 0000-0002-7500-1601, Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова, г. Костанай, Казахстан, vadimkst@mail.ru
©**Бейшов Р. С.**, ORCID: 0000-0002-9240-3856, Костанайский государственный университет им. А. Байтурсынова, г. Костанай, Казахстан, mr.rus.kvn@mail.ru

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF A RARE PLANT SPECIES *PULSATILLA PATENS* (L.) MILL. IN NORTHERN KAZAKHSTAN

- ©**Pinaeva Yu.**, ORCID: 0000-0002-1909-3054, Perm State University, Perm, Russia, julya.pinaeva@yandex.ru
©**Beltyukova N.**, ORCID: 0000-0002-4188-1997, Ph.D., Perm State University, Perm, Russia, NNBeltukova@gmail.com
©**Prishnivskaya Yu.**, ORCID: 0000-0003-1513-2682, Perm State University, Perm, Russia, yana_prishnivskaya@mail.ru
©**Sultangazina G.**, ORCID: 0000-0002-4160-7090, Ph.D., Kostanay State University named after A. Baitursynov, Kostanay, Kazakhstan, gul_sultan@mail.ru
©**Beishova I.**, ORCID: 0000-0001-5293-2190, Ph.D., West Kazakhstan Agrarian Technical University Zhangir Khan, Uralsk, Kazakhstan, indira_bei@mail.ru
©**Ulianov V.**, ORCID: 0000-0002-7500-1601, Kostanay State University named after A. Baitursynov, Kostanay, Kazakhstan, vadimkst@mail.ru
©**Beishov R.**, ORCID: 0000-0002-9240-3856, Kostanay State University named after A. Baitursynov, Kostanay, Kazakhstan, mr.rus.kvn@mail.ru

Аннотация. Изучено генетическое разнообразие 5 ценопопуляций редкого вида растений *Pulsatilla patens* (L.) Mill., распространенных на территории Павлодарской, Акмолинской и Костанайской областей Республики Казахстан. Для определения показателей генетического разнообразия был применен метод межмикросателлитного анализа ДНК (ISSR — Inter Simple Sequence Repeats) с использованием полимеразной цепной реакции с 5 праймерами: ISSR-1, ISSR-3, M1, M27, X11. Число полиморфных фрагментов ДНК в



суммарной выборке растений варьировало от 9 до 28, а их размеры — от 200 до 1420 пн. Доля полиморфных локусов в общей выборке *P. patens* явилась высокой и составила 0,965, ожидаемая гетерозиготность равна 0,162, а число эффективных аллелей — 1,361. Показатели генетического разнообразия выше у ценопопуляции из Костанайской области (с. Боровское) $H_E=0,209$, $n_e=1,743$, и ниже у популяции из Павлодарской области $H_E=0,131$, $n_e=1,597$. В изученных ценопопуляциях *P. patens* обнаружено 2 редких фрагмента ДНК: у ценопопуляции из Павлодарской области и у ценопопуляции из Акмолинской области (с. Ерейментая). Наиболее сбалансированной структурой разнообразия характеризуется ценопопуляция из Костанайской области (с. Боровское) $h=0,139$, а наименее сбалансированной $h = 0,188$ — ценопопуляция Костанайской области (с. Каменск–Уральск). Информационный индекс Шеннона выявил наибольшее разнообразие в ценопопуляции из Костанайской области (с. Боровское) $I=0,327$, а наименьшее — в ценопопуляции из Павлодарской области $I=0,215$.

Abstract. The genetic diversity of 5 cenopopulations of the rare plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill, located on the territories of Pavlodar, Akmola and Kostanay regions, Kazakhstan Republic, was studied. Intermicrosatellite DNA analysis (ISSR — Inter Simple Sequence Repeats) was used to determine the indicators of genetic diversity. Polymerase chain reaction with 5 primers: ISSR-1, ISSR-3, M1, M27, X11 was performed. The number of polymorphic DNA fragments in the total plant samples ranged from 9 to 28. Fragment's size ranged from 200 to 1420 bp. The percentage of polymorphic loci in the total sample *P. patens* was 0.965. Expected heterozygosity is 0.162, and the number of effective alleles is 1.361. Indicators of genetic diversity are higher in the cenopopulation from the Kostanay region (Borovskoe village): $H_E = 0.209$, $n_e = 1.743$, and lower in the population from the Pavlodar region: $H_E = 0.131$, $n_e = 1.597$. Two rare DNA fragments were found in the studied *P. patens* cenopopulations: in cenopopulation from the Pavlodar region and in cenopopulation from the Akmola region (village Yerementau). Cenopopulation from the Kostanay region (village Borovskoe) has the most balanced diversity structure: $h=0.139$, and cenopopulation of the Kostanay region (village Kamensk-Uralsk) is the least balanced: $h = 0.188$. The Shannon Index revealed the greatest diversity in the cenopopulation from the Kostanay region (village Borovskoe) $I=0.327$, and the lowest diversity in cenopopulation from the Pavlodar region $I=0.215$.

Ключевые слова: ценопопуляция, *Pulsatilla patens* (L.) Mill., метод межмикросателлитного анализа (ISSR).

Keywords: cenopopulation, *Pulsatilla patens* (L.) Mill., intermicrosatellite DNA analysis method (ISSR).

Введение

Pulsatilla patens (L.) Mill. — прострел раскрытый относят к редким видам растений. Занесен в Красную книгу Казахстана [1]. В последние 50 лет наблюдается сокращение численности этого вида. Это связано со многими факторами, среди которых основной вклад вносит человек. Выпас скота, сбор цветов из-за декоративных и лечебных свойств и другая деятельность человека. А также снижение численности происходит из-за уменьшения количества насекомых-опылителей и неблагоприятных погодных условий, таких как продолжительные и морозные зимы [2]. Молекулярно-генетические исследования данного вида имеют особую важность для решения главной проблемы в поддержании

биоразнообразия — отбора наиболее типичных представителей популяций и создания генетически обоснованных программ по их сохранению [3]. Для анализа генетического полиморфизма у *Pulsatilla patens* (L.) Mill. был применен метод межмикросателлитного анализа (ISSR — Inter Simple Sequence Repeats). Это связано с рядом его особенностей: не требует предварительного клонирования и секвенирования фрагмента для подбора праймеров, маркеры доминантного типа наследования, полиморфизм которых тестируется по наличию или отсутствию полосы, имеет высокую точность, улучшенную воспроизводимость из-за длины праймера (15–24 нуклеотида) и более высокую температуру отжига. Поэтому может быть с успехом использован для выявления межвидовой и внутривидовой генетической изменчивости, идентификации видов, популяций, линий, а в ряде случаев и для индивидуального генотипирования [4]. Легкость применения этого типа маркеров, универсальность праймеров, возможность вовлечения в анализ одновременного большого числа локусов делает их весьма перспективными для массового популяционного анализа [5].

Цель данной работы — молекулярно-генетический анализ 5 ценопопуляций редкого вида растения *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Северного Казахстана.

Материал и методы исследования

Материалом для выделения ДНК служили листья 150 гербарных образцов 5 ценопопуляций *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Павлодарской, Акмолинской, Костанайской областей Северного Казахстана (Таблица 1).

Таблица 1.

ИССЛЕДОВАННЫЕ ПОПУЛЯЦИИ *P.patens* (L.) Mill.

Обозначение популяции	Место сбора
Pr1	Павлодарская обл., окр. с. Баянаул, горы Баянаул, поляна между гранитных скал
Pr2	Акмолинская обл., окр. с. Ерейментау, горы Ерейментау, основание сопки
Pr3	Акмолинская обл., Бурабайский район, окр. с. Акылбай, ГУ Государственный национальный природный парк «Бурабай», Боровское лесничество, кв.96, ковыльно-разнотравная степь на восточном склоне сопки
Pr4	Костанайская обл., Мендыгаринский район, окр. с. Каменск-Уральск
Pr5	Костанайская обл., Мендыгаринский район, окр. с. Боровское, 80 км по трассе Костанай–Боровское

Для выделения ДНК была использована модифицированная методика С. Роджерса с использованием поливинилполипирролидона (PVPP) в качестве сорбента [6]. Навеска растительного материала для выделения ДНК составляла 20 мг листьев. После выделения в полученных пробах измерялась концентрация ДНК, степень их чистоты на спектрофотометре Spectrofotometr™ NanoDrop 2000 (Thermo scientific, США).

Выявление генетического полиморфизма ДНК *P. patens* проводили ISSR-методом анализа полиморфизма ДНК [4] с применением полимеразной цепной реакции. Амплификацию ДНК проводили с использованием 5 ISSR-праймеров (ISSR-1 (AC)8T, ISSR-3 (TG)8A, M1 (AC)8G, M27 (GA)8C, X11 (AGC)6G), высокая эффективность которых была установлена ранее [7]. Для ПЦР реакционная смесь содержала: 2 единицы *Taq*-полимеразы («Силекс М», Россия); 2,5 мкл стандартного 10x буфера для ПЦР («Силекс М», Россия); 25 пМ праймера («Евроген», Россия); 2,5 мМ MgCl₂ («Силекс М», Россия); 0,25 мМ dNTP (Fermentas, Литва); 5 мкл ДНК с концентрацией 10 нг/мкл. Амплификацию проводили в термоциклере MJ Mini-Cycler (Bio-Rad, США) по следующей программе для ISSR-анализа:

предварительная денатурация 94 °С, 2 мин.; первые пять циклов 94 °С, 20 сек.; t° отжига, 10 сек.; 72 °С, 10 сек; в последующих тридцати пяти циклах 94 °С, 5 сек.; t° отжига, 5 сек.; 72 °С, 5 сек. Последний цикл элонгации длился 2 мин при 72 °С. Температура отжига варьировала от 52 до 64 °С в зависимости от G/C состава ISSR-праймеров.

Для проверки чистоты реактивов добавляли вместо ДНК 5 мкл деионизированной воды в реакционную смесь в качестве отрицательного контроля (К-). Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 1,7% агарозном геле в 1×TBE буфере, окрашивали бромистым этидием и фотографировали в проходящем ультрафиолетовом свете. Определение длин фрагментов ДНК проводилось при помощи программы Quantity One 4.6.2 (Bio-Rad, США) с использованием маркера молекулярной массы (100 bp DNA Ladder, ООО «СибЭнзим-М», г. Москва).

Компьютерный анализ полученных данных осуществляли с помощью программ POPGENE 1.31 [8], Treecoon 3.1 и с помощью специализированного макроса GenAlE×6 [9] для MS-Excel с определением: доли полиморфных локусов (P_{95}) [10], абсолютного числа аллелей (n_a), эффективного числа аллелей (n_e), ожидаемой гетерозиготности (H_E) [11], информационного индекса Шеннона (I) [12], среднего числа морф (μ), доли редких морф (h) [13] и числа редких фрагментов (R).

Результаты и их обсуждение

При анализе фрагментов ДНК амплифицированных в результате ПЦР в 5 изученных ценопопуляциях *P. patens* было выявлено 144 амплифицированных фрагмента ДНК, из которых 139 были ($P_{95}=0,965$) полиморфными. Число амплифицированных фрагментов ДНК в суммарной выборке растений варьировало в зависимости от праймера от 23 (M1) до 28 (M27). Число полиморфных фрагментов ДНК в суммарной выборке растений варьировало от 9 до 28, а их размеры — от 200 до 1420 пн.

Доля полиморфных локусов в общей выборке *P. patens* была высокой и в зависимости от ISSR-праймера колебалась от 0,920 (M1) до 1,000 (M27, ISSR3), в среднем она составила 0,965. Число полиморфных фрагментов ДНК варьировало от 78 у Pp1 до 103 у Pp5. Доля полиморфных локусов (P_{95}) в ценопопуляциях варьировала от 0,728 (Pp3) до 0,851 (Pp5) (Таблица 2).

Ожидаемая гетерозиготность (H_E) по локусам в общей выборке *P. patens* составила 0,162. В ценопопуляциях *P. patens* эта величина варьировала от 0,131 в Pp1 до 0,209 в Pp5 (Таблица 2). Разница между значениями показателей ожидаемой гетерозиготности и доли полиморфных фрагментов ДНК была не достоверной (Таблица 3).

Абсолютное число аллелей на локус (n_a) на общую популяцию составило 1,965. Этот параметр наибольший в ценопопуляции Pp5 ($n_a=1,743$), а в ценопопуляции Pp1 он наименьший ($n_a=1,597$). Эффективное число аллелей на локус (n_e) на общую выборку равно 1,361. Большее значение n_e в ценопопуляции Pp5 ($n_e=1,330$), а наименьшее значение в популяции Pp1 ($n_e=1,197$). В изученных ценопопуляциях *P. patens* обнаружено всего 2 редких фрагмента ДНК: по одному в Pp1 и Pp2 (Таблица 2).

У всех изученных ценопопуляций *P. patens* показатель h имеет значения меньше 0,3. Наиболее сбалансированной структурой разнообразия характеризуется ценопопуляция Pp5 ($h=0,139$), а наименее сбалансированной ($h=0,188$) — ценопопуляция Pp4. Информационный Индекс Шеннона выявил наибольшее разнообразие в ценопопуляции Pp5 ($I=0,327$), а наименьшее в — Pp1 ($I=0,215$) (Таблица 2).

При анализе внутривидового разнообразия *P. patens* с применением показателя μ установлено, что из 5 изученных ценопопуляций большей равномерностью распределения

частот аллелей характеризуется ценопопуляция Pp5 ($\mu=1,723$), а наименьшей ($\mu=1,625$) — ценопопуляция Pp4 (Таблица 2).

Таблица 2.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ *P. patens*

Ценопопуляции / показатели	Pp1	Pp2	Pp3	Pp4	Pp5	На общую выборку
H_E	0,131 (0,013)	0,166 (0,013)	0,148 (0,013)	0,157 (0,014)	0,209 (0,014)	0,162 (0,013)
n_a	1,597 (0,492)	1,715 (0,453)	1,660 (0,475)	1,632 (0,484)	1,743 (0,438)	1,965 (0,184)
n_e	1,197 (0,266)	1,255 (0,296)	1,224 (0,280)	1,247 (0,311)	1,330 (0,317)	1,361 (0,306)
P_{95}	0,772	0,838	0,728	0,741	0,851	0,965
R	1	1	0	0	0	2
μ	1,634 (0,006)	1,668 (0,005)	1,629 (0,006)	1,625 (0,006)	1,723 (0,005)	1,656 (0,006)
h	0,183 (0,003)	0,166 (0,003)	0,185 (0,003)	0,188 (0,003)	0,139 (0,002)	0,172 (0,003)
I	0,215 (0,226)	0,268 (0,232)	0,242 (0,229)	0,249 (0,246)	0,327 (0,244)	0,373 (0,196)

Примечание: H_E — ожидаемая гетерозиготность; n_a — абсолютное число аллелей на локус; n_e — эффективное число аллелей на локус; у всех вышеуказанных параметров в скобках даны стандартные отклонения; R — редкие фрагменты; μ — среднее число морф; h — доля редких морф; I — информационный индекс Шеннона

Таблица 3.

ОЦЕНКА ДОСТОВЕРНОСТИ РАЗНИЦЫ ПРИ СРАВНЕНИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ P_{95} И H_E ПО КРИТЕРИЮ ФИШЕРА МЕЖДУ ПЯТЬЮ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЯМИ *P. patens*

Ценопопуляция	Pp1	Pp 2	Pp 3	Pp 4	Pp 5
Pp 1	—	0,647	0,394	0,280	0,786
Pp 2	0,382	—	1,041	0,927	0,139
Pp 3	0,190	0,192	—	0,141	1,461
Pp 4	0,287	0,095	0,097	—	1,066
Pp 5	0,809	0,427	0,619	0,522	—

Примечание: над диагональю значения достоверности разницы доли полиморфных локусов (P_{95}), под диагональю ожидаемой гетерозиготности — (H_E); при $F_{\text{обьгт}}$ больше 1,96 результат достоверен

Анализ генетической структуры ценопопуляций *P. patens* показал, что ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в общей выборке (H_T) *P. patens* составила 0,232, а ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_S) в ценопопуляциях *P. patens* равна 0,162 (Таблица 4). Таким образом, ожидаемая доля гетерозиготных генотипов (H_S) в ценопопуляциях *P. patens* ниже, чем в общей выборке.



Наименьшие показатели доли гетерозиготных генотипов (H_S) отмечены у праймера M1, определенная им ожидаемая гетерозиготность составляет 0,121; а самые высокие значения этого показателя (Таблица 4) отмечены у *P. patens* при ПЦР с праймером M27 ($H_S = 0,219$).

Наибольшая часть наблюдаемого генетического разнообразия *P. patens* сосредоточена внутри популяций ($G_{ST}=0,300$), а на долю межпопуляционной изменчивости приходится 70,00% (Таблица 4).

В 2016 г было проведено исследование генетического разнообразия европейских популяций *P. patens* [2]. Всего изучено 29 популяций *P. patens* с использованием микросателлитных праймеров. Результаты исследования показывают, что проанализированные популяции характеризуются низкими показателями гетерозиготности ($H_o=0,005$, $H_e=0,561$) и очень высокими уровнями инбридинга ($F_{IS}=0,90$). При этом результаты указывают на более высокий уровень изменчивости внутри популяций (77%), чем между популяциями (23%) [2]. Полученные нами данные с применением межмикросателлитного анализа генетического полиморфизма в 5 ценопопуляциях *P. patens* Северного Казахстана показывают еще более низкие значения ожидаемой гетерозиготности ($H_e=0,162$), а подразделенность изученных ценопопуляций имеет схожие значения ($G_{ST}=0,300$).

Если сравнивать полученные показатели генетического разнообразия для ценопопуляций *P. patens* Северного Казахстана с показателями ценопопуляций *P. patens* Пермского края ($P_{95} — 0,603$; $H_E — 0,141$; $I — 0,230$) [14], можно заметить, что ожидаемая гетерозиготность, доля полиморфных фрагментов ДНК и индекс разнообразия Шеннона выше у ценопопуляций Северного Казахстана.

Таблица 4.
 ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЙ *P. patens*

ISSR-праймер	H_T	H_S	G_{ST}
M1	0,149 (0,013)	0,121 (0,005)	0,185
ISSR1	0,256 (0,023)	0,181 (0,009)	0,292
X11	0,182 (0,019)	0,148 (0,012)	0,190
ISSR3	0,238 (0,025)	0,143 (0,009)	0,397
M27	0,324 (0,019)	0,219 (0,009)	0,326
На общую выборку	0,232 (0,023)	0,162 (0,010)	0,300

Примечание: H_T — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов как мера общего генного разнообразия во всей популяции; H_S — ожидаемая доля гетерозиготных генотипов в отдельной популяции, как мера ее внутривидового разнообразия или среднее выборочное генное разнообразие по всем локусам; G_{ST} — доля межпопуляционного генетического разнообразия в общем разнообразии или показатель подразделенности популяций; в скобках даны стандартные отклонения

На основании полученных данных по ISSR-анализу полиморфизма ДНК *P. patens* были определены генетические взаимоотношения между исследуемыми ценопопуляциями, составлена матрица бинарных признаков и рассчитаны матрицы генетических различий. На основании полученной матрицы был проведен кластерный анализ невзвешенным парно-групповым методом (UPGMA) и построена дендрограмма, отражающая степень сходства исследуемых ценопопуляций *P. patens* по ISSR-спектрам (Рисунок).

Для построения дендрограммы использовали компьютерную программу Treecon 3.1 с применением 100 реплик бутстрепа. Наименьшее генетическое расстояние отмечено между ценопопуляциями *P. patens* Костанайской области Pr4 и Pr5 ($D=0,087$), а наибольшее —

между ценопопуляциями, расположенными в Акмолинской области Pp2 и Pp3 ($D=0,131$) (Таблица 5).

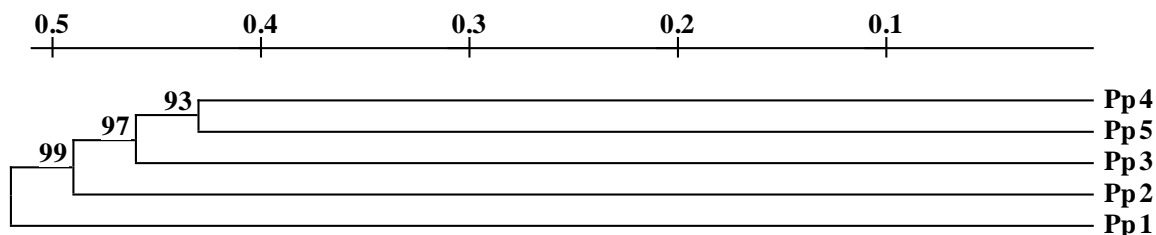


Рисунок. UPGMA-дендрограмма генетического сходства 5 ценопопуляций *P. patens*, построенная на основании полиморфизма ISSR-маркеров; шкала сверху — генетическое расстояние; указаны значения бутстрепа (в %).

На дендрограмме четвертая и пятая ценопопуляции *P. patens* (Pp4, Pp5) сформировали кластер, от которого отходят остальные ценопопуляции согласно их географической удаленности от Костанайской до Павлодарской областей. Узлы ветвления имеют высокую поддержку (индекс бутстрепа >50%).

Таблица 5.

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ РАССТОЯНИЕ МЕЖДУ ЦЕНОПОПУЛЯЦИЯМИ *P. patens*

	<i>Pp1</i>	<i>Pp2</i>	<i>Pp3</i>	<i>Pp4</i>	<i>Pp5</i>
<i>Pp1</i>	—				
<i>Pp2</i>	0,109	—			
<i>Pp3</i>	0,127	0,131	—		
<i>Pp4</i>	0,111	0,095	0,116	—	
<i>Pp5</i>	0,120	0,106	0,091	0,087	—

Выводы

На основании проведенного ISSR-анализа генетического полиморфизма пяти ценопопуляций *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Северного Казахстана можно сделать вывод, что изученные ценопопуляции характеризуются довольно высокими показателями генетического разнообразия ($P_{95}=0,965$, $n_e=1,361$), за исключением показателей ожидаемой гетерозиготности ($H_E=0,162$).

В двух из пяти изученных ценопопуляций *P. patens* (L.) Mill. были обнаружены редкие фрагменты ДНК: у ценопопуляции из Павлодарской области и у ценопопуляции из Акмолинской области (с. Ерейментау).

Пятая ценопопуляция из Костанайской области (с. Боровское) (Pp5) имеет самые высокие показатели генетического разнообразия ($P_{95}=0,851$, $H_E=0,209$, $I=0,327$) по сравнению с другими ценопопуляциями этого вида, изученными на территории Северного Казахстана.

Работа выполнялась в рамках проекта грантового финансирования Министерства образования и науки Республики Казахстан на 2018-2020 гг. № AP05132458 «Молекулярно-генетический анализ генофондов популяций редких видов растений Северного Казахстана», номер государственной регистрации 0118PK00404.

Список литературы:

1. Красная книга Казахстана. 2-е изд., испр. и доп. Астана: АртРпп1XX1, 2014. Т. 2. Растения. 452 с.
2. Szczecińska M., Sramko G., Wołosz K., Sawicki J. Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe // PLoS One. 2016. V. 11. №3. e0151730. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730
3. Боронникова С. В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь, 2013. 239 с.
4. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification // Genomics. 1994. V. 20. №2. P. 176-183. https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151
5. Гостимский С. А., Кокаева З. Г., Боброва В. К. Использование молекулярных маркеров для анализа генома растений // Генетика. 1999. Т. 35. №11. С. 1538-1549.
6. Rogers S. O., Bendich A. J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues // Plant molecular biology. 1985. V. 5. №2. P. 69-76. https://doi.org/10.1007/BF00020088
7. Шакирова А. Р. Подбор эффективных ISSR-праймеров для редких видов растений *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz. и *Pulsatilla patens* (L.) Mill. // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. Конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием (Пермь, 13-15 мая 2019 г.). Пермь, 2019. С. 162-164.
8. Yeh F. C., Mao J., Young R. C. POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Alta, Department of Renewable Resources. Edmonton: Univ. of Alberta, 1999.
9. Peakall R. O. D., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular ecology notes. 2006. V. 6. №1. P. 288-295. https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
10. Williams J. G. K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers // Nucleic acids research. 1990. V. 18. №22. P. 6531-6535. https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531
11. Nei M. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia Univ. press, 1987.
12. Lewontin R. C. The apportionment of human diversity // Evolutionary biology. New York, Springer, 1972. P. 381-398. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9063-3_14
13. Животовский Л. А. Показатели внутрипопуляционного разнообразия // Журн. общ. биологии. 1980. Т. 41. № 6. С. 828-836.
14. Шакирова А. Р. Молекулярно-генетические исследования редких видов растений рода *Pulsatilla* Mill. Пермского края с применением ISSR-метода // Симбиоз-Россия 2019: материалы XI Всерос. Конгр. молодых ученых-биологов с межд. участием (Пермь, 13-15 мая 2019 г.): Перм. гос. нац. исслед. ун-т, 2019. С. 161-162.

References:

1. Red data book of Kazakhstan (2014). Astana, 2. Plants. (in Russian).
2. Szczecińska, M., Sramko, G., Wołosz, K., & Sawicki, J. (2016). Genetic Diversity and Population Structure of the Rare and Endangered Plant Species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *PloS one*, 11(3), e0151730. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730
3. Boronnikova, S. V. (2013). Molekulyarno-geneticheskii analiz i otsenka sostoyaniya genofondov resursnykh vidov rastenii Permskogo kraja. Perm, 239. (in Russian).

4. Zietkiewicz, E., Rafalski, A., & Labuda, D. (1994). Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. *Genomics*, 20(2), 176-183. <https://doi.org/10.1006/geno.1994.1151>
5. Gostimskii, S. A., Kokaeva, Z. G., & Bobrova, V. K. (1999). Ispol'zovanie molekulyarnykh markerov dlya analiza genoma rastenii. *Genetika*, 35(11), 1538-1549.
6. Rogers, S. O., & Bendich, A. J. (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant molecular biology*, 5(2), 69-76. <https://doi.org/10.1007/BF00020088>
7. Shakirova, A. R. (2019). Podbor effektivnykh ISSR-praimerov dlya redkikh vidov rastenii *Pulsatilla flavescens* (Zucc.) Juz. i *Pulsatilla patens* (L.) Mill. In *Simbioz-Rossiya 2019: materialy XI Vseros. kongr. molodykh uchenykh-biologov s mezhd. uchastiem (Perm, 13-15 maya 2019 g.) Perm. gos. nats. issled. un-t. Perm*, 162-164. (in Russian).
8. Yeh, F. C., Yang, R. C., Mao, J., Ye, Z., & Boyle, T. J. (1996). POPGENE, the Microsoft Windows-based user-friendly software for population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. Dept. Renewable Resources. Edmonton, University of Alberta, 238.
9. Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
10. Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic acids research*, 18(22), 6531-6535. <https://doi.org/10.1093/nar/18.22.6531>
11. Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York, Columbia university press.
12. Lewontin, R. C. (1972). The apportionment of human diversity. In *Evolutionary biology*, New York, Springer, 381-398. https://doi.org/10.1007/978-1-4684-9063-3_14
13. Zhivotovskii, L. A. (1980). Pokazatel' vnutripopulyatsionnogo raznoobraziya. *Zhurn. obshch. biol*, 41(6), 828-836. (in Russian).
14. Shakirova, A. R. (2019). Molecular and genetic rare plant species studies of the genus *Pulsatilla* Mill. Perm region using the ISSR method. In *Symbiosis-Russia 2019: materials XI Congr. young scientists-biologists from Russia participation (Perm, May 13-15, 2019): PSU*, 161-162. (in Russian).

Работа поступила
в редакцию 03.04.2020 г.

Принята к публикации
08.04.2020 г.

Ссылка для цитирования:

Пинаева Ю. Ю., Бельтюкова Н. Н., Пришневская Я. В., Султангазина Г. Ж., Бейшова И. С., Ульянов В. А., Бейшов Р. С. Молекулярно-генетический анализ редкого вида растения *Pulsatilla patens* (L.) Mill. Северного Казахстана // Бюллетень науки и практики. 2020. Т. 6. №5. С. 29-37. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/54/03>

Cite as (APA):

Pinaeva, Yu., Belyukova, N., Prishnivskaya, Yu., Sultangazina, G., Beishova, I., Uliyanov, V., & Beishov, R. (2020). Molecular Genetic Analysis of a Rare Plant Species *Pulsatilla patens* (L.) Mill. of Northern Kazakhstan. *Bulletin of Science and Practice*, 6(5), 29-37. (in Russian) <https://doi.org/10.33619/2414-2948/54/03>

