

РІВЕНЬ ПОЛІМОРФІЗМУ ТА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ ПОПУЛЯЦІЙ *IRIS PUMILA* L. ЗА ДАНИМИ ТРЬОХ ТИПІВ ПЛР-МАРКЕРІВ

О.М. БУБЛИК¹, І.Ю. ПАРНІКОЗА^{1,2}, В.А. КУНАХ¹

¹ Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, вул. Акад. Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

² ДУ Національний антарктичний науковий центр МОН України, бульвар Тараса Шевченка, 16, Київ, 01601, Україна

E-mail: o.m.bublyk@imbg.org.ua, ivan.parnikoza@uac.gov.ua, kunakh@imbg.org

*Генетичний поліморфізм рідкісного селекційно і декоративно цінного виду *Iris pumila* досліджено за допомогою ПЛР-аналізу з праймерами трьох типів: на основі мікросателітних послідовностей (ISSR), послідовностей МГЕ (IRAP та iPBS) та генів відповіді на абіотичний стрес (LP-PCR). Виявлено високий рівень внутрішньовидового та внутрішньопопуляційного генетичного поліморфізму, який не поступався значенням інших видів роду *Iris*. Основні показники генетичного поліморфізму п'яти популяцій *I. pumila* з території України склали: частка поліморфних локусів (P) – 26,5–68,5 %, індекс Шеннона (S) – 0,105–0,285, генне різноманіття (H) – 0,069–0,190. Залежність рівня мінливості від розміру популяції була прямою у ISSR-аналізі і оберненою за даними інших двох маркерів. Пряму залежність генетичних та географічних дистанцій між популяціями виявили лише ISSR-маркери. Найвищий рівень поліморфізму виявляли LP-PCR-маркери, але встановити популяційну приналежність усіх особин дозволили лише ISSR-маркери. Апробована система ПЛР-маркерів може бути застосована для моніторингу стану генофонду, вивчення генетичної структури популяцій та міграційних процесів.*

Ключові слова: *Iris pumila* L., рідкісний вид, ПЛР-аналіз, генетичний поліморфізм, генетична структура популяцій.

Вступ. Одним із ключових сучасних напрямків природоохоронної біології є збереження генетичного різноманіття. Головним завданням при охороні видів є збереження максимального еволюційного потенціалу, що може забезпечити підтриманням найвищої можливої генетичної мінливості. Цей підхід ґрунтується на попередньому визначенні рівня і розподілу генетичної мінливості рідкісних видів, вивченні генетичних процесів у їхніх популяціях та адаптації до умов довкілля. Кінцевим етапом є розробка на основі цих даних науково обґрунтованих рекомендацій щодо збереження та експлуатації видів (Allendorf, 2017; Frankham et al., 2017; Holderegger et al., 2019).

Здебільшого для рідкісних та зникаючих видів обмежені відомості про геномні послідовності, тому актуальним завданням є розробка ефективних підходів та вибір адекватних маркерів для дослідження генетичного поліморфізму кожного нового виду. За літературними даними при вивченні генетичної мінливості рослин широко використовують як ПЛР-маркери на основі послідовностей некодувальних ділянок ДНК (Garrido-Cardenas et al., 2018), так і різних генів (Gupta, Rustgi, 2004; Soumaya et al., 2020) та ретротранспозонів (Kalendar et al., 2018). При розробці програм збереження останнім часом зростає інтерес до використання поряд із добре вивченими і найбільш поширеними нейтральними анонімними маркерами і тих, що відображають адаптивну генетичну мінливість (Rodriguez-Quilon et al., 2016; Flanagan et al., 2018). Саме вони дозволяють відібрати матеріал для збереження, який буде мати вищу стійкість до кліматичних змін, різноманітних стресів, хвороб і в кінцевому рахунку забезпечить адаптацію і виживання популяцій, а також у подальшому може бути застосований у селекції для збагачення господарсько-цінних видів корисними ознаками (Gupta et al., 2004; Allendorf, 2017). Розуміння особливостей мінливості різних типів ДНК-маркерів і їх адекватне застосування може бути корисне не лише для різнобічної характеристики генетичного поліморфізму, а і для уточнення класифікації таксономічних груп і підвищення ефективності застосування маркерних систем у селекційних програмах (Biswas et al., 2010; Mahmud et al., 2018).

У цьому дослідженні ми порівняли поширені методи ISSR, IRAP і порівняли нові – iPBS та LP-PCR за здатністю визначати генетичний поліморфізм. ISSR-ПЛР (Inter-Simple Sequence Repeat) призначений для аналізу ділянок геному, фланкованих інвертованими повторами

© О.М. БУБЛИК, І.Ю. ПАРНІКОЗА, В.А. КУНАХ, 2021

мікросателітних локусів (Zietkiewicz et al., 1994). Другий тип застосованих нами маркерів пов'язаний із мобільними генетичними елементами (МГЕ): IRAP (Inter-Retrotransposon Amplified Polymorphism) використовує праймери на основі послідовностей LTR – довгих кінцевих фрагментів ретротранспозонів, а іPBS – на основі послідовностей праймер-зв'язувального сайту (primer binding site) зворотної транскриптази (Kalendar et al., 2010). Ефективність цих маркерів зумовлена присутністю великої кількості ретроелементів у геномах більшості рослин і їх здатністю до утворення нових копій. Також ми використали LP-PCR (Long Primer PCR) – праймери, гомологічні до консервативних послідовностей генів відповіді на абіотичний стрес: гену теплового шоку *Hvhspl17* та гену стресу посухи *ABA3* (Liviero et al., 2002). Функція зазначених генів безпосередньо пов'язана із забезпеченням життєздатності організму в умовах стресу, тому мінливість, яку вони виявляють, потенційно має адаптивний характер.

Об'єкт дослідження – *Iris pumila* L. (Iridaceae) – вид, який використовується у селекції та декоративному садівництві, типовий ксерофіт європейської степової зони. Це багаторічник, що розмножується клонально та насінням, запилюється комахами, є строго перехреснозапильним, з низькою здатністю до розповсюдження насіння. Цей вид – алополіплоїд ($2n = 32$), що імовірно утворився внаслідок природної гібридизації між *I. attica* ($2n = 16$) and *I. pseudopumila* ($2n = 16$). Внаслідок згубного антропогенного впливу та природних факторів чисельність іриса низького скорочується, відбувається руйнування його середовища існування і фрагментація ареалу. На сьогоднішній день вид охороняється на території низки областей України (Parnikoza et al., 2017), що обумовлює актуальність визначення загрози збіднення його генетичного різноманіття.

У цьому дослідженні ми ставили перед собою подвійну мету – поглиблене дослідження генетичного поліморфізму *I. pumila* за допомогою ПЛР-маркерів трьох типів – ISSR, МГЕ та LP-PCR – і порівняння їх ефективності для визначення рівня мінливості, диференціації популяцій та окремих особин, встановлення по-

пуляційної структури та виявлення адаптивних генетичних змін.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження були 49 рослин *I. pumila* з п'яти природних популяцій, географічне розміщення яких охоплює широти від південного Криму до північної межі поширення виду в Україні: 11 рослин з популяції поблизу с. Мигія (Первомайський р-н Миколаївської обл.), 9 рослин з півострова Аляуди (м. Миколаїв), 10 – з околиць с. Каравеллово (до 2016 р. Коларово, Жовтневий р-н Миколаївської обл.), 10 – з околиць с. Андріївка (Полтавський район, Полтавська обл.), 9 рослин з околиць Балаклави (м. Севастополь, АР Крим). Розміри популяцій склали: Мигія – більше тисячі особин, Аляуди – близько сорока, Каравеллово та Андріївка – близько п'ятидесяти, Балаклава – близько двохсот.

ДНК виділяли за (Doyle, Doyle, 1987) із сухого матеріалу за допомогою СТАБ із подальшою очисткою хлороформом.

Для генетичного аналізу були використані відібрані в попередньому дослідженні (17) праймери різних типів, ефективність яких визначали за показником розпізнавальна здатність D_L . Показник D_L розраховували за формулою:

$$D_L = 1 - \sum p_i,$$

де p_i – частота i -го набору фрагментів (патерну) з числа утворюваних праймером (Tessier et al., 1999). Загалом було застосовано сім ISSR-праймерів ($t_{\text{гібр}} = 53$ °C), два IRAP-праймери ($t_{\text{гібр}} = 58$ °C), чотири іPBS-праймери ($t_{\text{гібр}} = 50$ °C) та два LP-PCR-праймери ($t_{\text{гібр}} = 55$ °C). Послідовності та характеристики використаних праймерів наведено у табл. 1.

Реакційна суміш для проведення ПЛР об'ємом 20 мкл містила: 20 нг ДНК, 0,2 мМ дНТФ, 1,25 U Taq-полімерази, $1 \times (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ буфер («Fermentas», Литва), 2 мМ MgCl_2 , 1 мкМ праймера. На реакційну суміш нашарували 15 мкл мінеральної олії для запобігання випаровуванню. Як негативний контроль використовували стандартну реакційну суміш без ДНК. ПЛР проводили в термоциклері Терцик МС2 («Біотехнологія», Росія) за наступного температурного режиму: 94 °C – 2 хв., $35 \times (94$ °C – 20 с, $t_{\text{гібр}}$ – 30 с, 72 °C – 90 с), 72 °C – 5 хв.

Продукти ПЛР фракціонували електрофорезом у 1,5%-ному агарозному гелі в буфері 0,5×TBE і візуалізували забарвленням бромистим етидієм.

Кожну реакцію проводили у двох повторностях, враховували лише чіткі і відтворювані амплікони. На основі матриць бінарних ознак (наявність-відсутність амплікона) за допомогою програми FAMD (Schluter, Harris, 2006) розраховували генетичні відстані Жакарда між рослинами, на їх основі методом UPGMA будували дендрограми генетичної подібності. Проведено бутстреп аналіз з 10000 реплік за допомогою програми FAMD, консенсусну дендрограму побудовано за допомогою програми Consense з пакету Phylip (застосовано extended majority rule) (Felsenstein, 2004).

Основні показники генетичного поліморфізму популяції: частка поліморфних ампліконів (P), індекс Шенона (S), гenna різнома-

нітність Нея (очікувана гетерозиготність He) – розраховували за допомогою програми GenAl-Ex (Peakall, Smouse, 2006). За допомогою цієї ж програми у тесті Мантеля (Mantel, 1967) з 999 пермутаціями визначали кореляції між матрицями генетичних та географічних дистанцій. А також застосовували аналіз молекулярної дисперсії (AMOVA) для оцінки розподілу загальної генетичної мінливості між трьома регіонами (Миколаївська обл., Полтавська обл., АР Крим), п'ятьма популяціями та в їх межах.

Генетичну структуру популяцій аналізували в програмі Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000), за моделлю, що допускає змішане походження особин і передбачає кореляцію частот алелей у батьківських протопопуляціях (K), та без урахування приналежності особин до географічних популяцій. Для визначення найбільш вірогідного числа K виконували серію аналізів із K від 1 до 8 (у 10 повторностях), з періодом

Таблиця 1. Нуклеотидні послідовності, походження та характеристика праймерів, відібраних для аналізу поліморфізму *I. pumila*

Тип праймерів	Праймер	Нуклеотидна послідовність (5'–3')	Джерело	NT	D _L	
ISSR	ISSR-03	(AC) ₈ TT	(Chuanliang et al., 2006)	21	0,921	
	ISSR-05	(AC) ₈ TG		20	0,879	
	ISSR-59	(AG) ₈ GC		26	0,874	
	UBC#810	UBC #810	(GA) ₈ T	Biotechnology Laboratory, The University of British Columbia, Canada	32	0,943
		UBC #811	(GA) ₈ C		50	0,946
		UBC #835	(AG) ₈ YC		29	0,941
		UBC #840	(GA) ₈ YT		44	0,946
IRAP	675 (Calypso LTR, Glycine max)	AGCGCGCGTG-	Праймери розроблено Р.М. Календарем у МТТ/BI Plant Genomics, Institute of Biotechnology, University of Helsinki	33	0,886	
	1681 (Brachypodium distachyon)	CTGGGCTGGG ATACCTCGGAG- GCGCTGCACCTG		23	0,868	
iPBS	2374*	CCCAGCAAACCA	(Kalendar et al., 2010)	10	0,368	
	2377*	ACGAAGGGACCA				
	2375	TCGCATCAACCA		14	0,783	
	2394	GAGCCTAGGCCA		18	0,670	
LP-PCR	SGER (Hvhspl7 – ген теплового шоку, кодувальна послідовність)	TGGTGCGCTCGCC- GCTGACG	(Liviero et al., 2002)	49	0,946	
	QQG (ABA3 – ген стресу посухи, кодувальна послідовність)	ATCCCGGTGTGGCC- TTGCTGC		43	0,939	

Примітка. * – праймери застосовували разом в одній реакції; NT – загальна кількість ампліконів; D_L – розпізнавальна здатність.

Рівень поліморфізму та диференціація популяцій *Iris pumila* L.

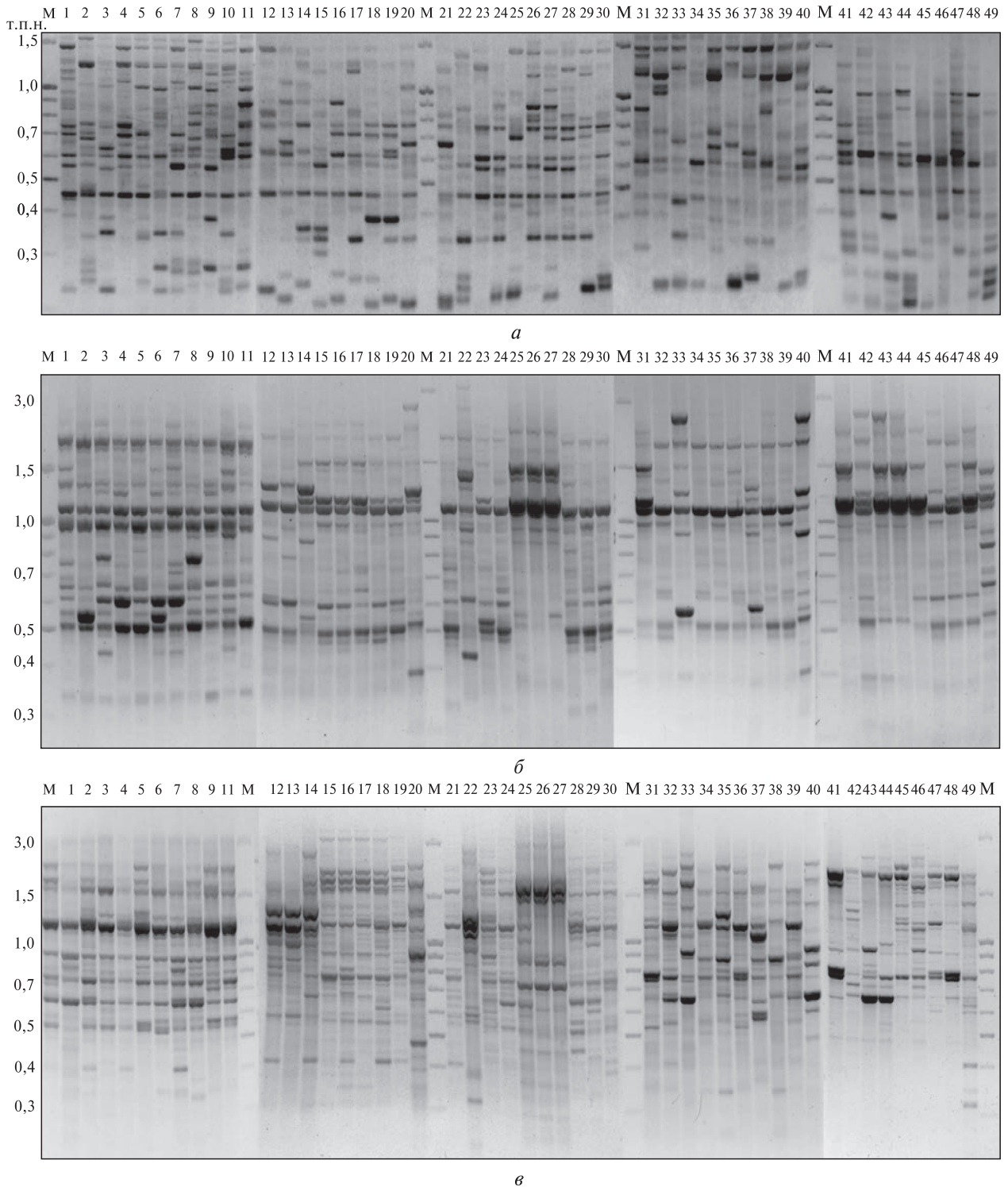


Рис. 1. Поліморфізм спектрів ПЛР-продуктів *I. pumila*, *а* – ISSR-праймер UBC #840; *б* – IRAP-праймер 1681, *в* – LP-PCR-праймер SGER: 1–11 – рослини з популяції «Мигія»; 12–20 – «Аляуди»; 21–30 – «Каравеллово»; 31–40 – «Андріївка»; 41–49 – «Балаклава»; М – маркер молекулярної маси «100 bp Ladder»

припрацювання 50000 і 300000 ітераціями. Для найвірогіднішого значення К проводили аналіз із періодом припрацювання 100000 і 1000000 ітерацій для описання генетичної структури популяцій.

Наявність локусів-аутсайдерів із різко відмінними або навпаки дуже близькими частотами алелей у різних популяціях, тобто таких, що вірогідно підлягають дії направленого або стабілізуючого добору відповідно, визначали за допомогою програми Mcheza (Antao, Beaumont, 2011).

Результати. Підбір ефективних праймерів. У попередньому дослідженні на мигійській популяції *I. pumila* були відібрані праймери різних типів: ISSR, IRAP, LP-PC, RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), RGAP (Resistance Gene Analog Polymorphisms), які давали багаті спектри ампліфікації, виявляли високий відсоток поліморфних фрагментів та мали достатню роздільну здатність (Bublyk et al., 2013). Лише частина з цих праймерів виявилася ефективною для роботи з іншими популяціями виду. У деяких праймерів спостерігали зникнення частини мажорних фрагментів у спектрах. У подальшому для аналізу генетичного поліморфізму чотирьох та п'яти популяцій *I. pumila* (Parnikoza et al., 2017, Bublyk et al., 2020) було застосовано лише 7 з 8 попередньо відібраних

ISSR-праймерів. Поглиблений аналіз генетичної мінливості п'яти популяцій *I. pumila* проведено з використанням найефективніших праймерів трьох типів, що охоплюють регіони геному з різними функціями (табл. 1), приклади отриманих поліморфних спектрів ампліфікації наведено на рис. 1.

Генетичний поліморфізм *I. pumila*. Для вибірки рослин *I. pumila* в ISSR-аналізі враховано 222 фрагменти, для МГЕ-маркерів – 98 фрагментів, для LP-PCR – 92 фрагменти. Частка поліморфних фрагментів для цих методів відповідно склала 97,8, 89,8 і 100 % (табл. 2). У межах популяцій для різних методів частки поліморфних фрагментів значно коливалися – від 26,5 % у варіанті «Мигія-МГЕ» до 68,5 % у «Аляуди-LP-PCR». Так само для різних популяцій та методів суттєво варіювали рівні основних показників генетичного поліморфізму популяцій – індексу Шенона (S), незміщеної генної різноманітності Нея, генетичні відстані між рослинами за Жакардом. Найбільші відмінності за рівнем мінливості виявили у мигійської популяції – за ISSR-маркерами вона мала найвищу мінливість, за іншими двома типами маркерів навпаки – значно нижчу. Загалом, серед трьох типів маркерів найвищий рівень поліморфізму виявили LP-PCR-маркери. Для всієї вибірки ампліконів, що відповідає рівню

Таблиця 2. Значення основних показників генетичного поліморфізму досліджених популяцій *I. pumila* за даними

Популяція	Враховано ампліконів, шт.			Частка поліморфних ампліконів (P), %			Індекс
	ISSR	МГЕ	LP-PCR	ISSR	МГЕ	LP-PCR	ISSR
Мигія	137	48	38	56,3	26,5	31,5	0,230 ± ± 0,016
Аляуди	116	56	64	46,9	45,9	68,5	0,190 ± ± 0,016
Каравеллово	116	54	62	44,6	43,9	67,4	0,178 ± ± 0,015 *
Андріївка	106	56	59	42,8	44,9	64,1	0,171 ± ± 0,015 *
Балаклава	100	54	51	39,6	43,9	52,2	0,171 ± ± 0,016 *
У середньому	115	53,6	54,8	46,0 ± 2,8	41,0 ± 3,6	56,7 ± 7,0	0,188 ± ± 0,007
Сумарна матриця	222	98	92	97,8	89,8	100	0,261 ± ± 0,012

Примітка. * – значимі відмінності від популяції Мигія (p < 0.05).

внутрішньовидової мінливості, показники генетичного поліморфізму були вищими, ніж у межах популяцій, або приблизно дорівнювали найвищим значенням (табл. 2).

Генетична спорідненість рослин та популяцій. На основі генетичних відстаней Жакарда методом UPGMA побудовано дендрограми генетичної спорідненості досліджених рослин для кожного з типів маркерів (рис. 2). Дані ISSR-маркерів дозволили диференціювати всі популяції за винятком популяцій Аляуди та Каравеллово, які розділяє відстань лише у 1,5 км (рис. 2, а). Натомість за результатами ПЛР аналізу з МГЕ-праймерами утворився лише один кластер, що містив об'єкти з однієї популяції — мигійської. Ще один кластер, що частково відповідав походженню матеріалу, нараховував 7 особин із Андріївки. Решта досліджених рослин, у тому числі і три особини з Андріївки, розподілилися незалежно від популяційної приналежності, кластери були мало вираженими (рис. 2, б). LP-PCR-дендрограма загалом відтворювала дані МГЕ-маркерів, вона не містила яскраво виражених кластерів, об'єкти з різних популяцій на ній не диференціювалися. Єдиний кластер, що складався з особин одного популяційного походження, сформували рослини з популяції «Мігія» (рис. 2, в). Тобто три типи застосованих

маркерів відрізнялися за здатністю до групування окремих рослин і встановленням їх приналежності до популяцій.

Спорідненість між популяціями оцінювали за незміщеними генетичними відстанями Нея (табл. 3). За ISSR-маркерами найбільш подібними виявилися популяції «Аляуди» і «Каравеллово», що узгоджується з географічною близькістю між ними. Загалом отримана картина генетичної подібності популяцій добре відтворювала їх просторове розміщення (рис. 3, а). Інший результат показали дані МГЕ- та LP-PCR-маркерів. Тут мигійська популяція була найбільш генетично відмінною, а решта популяцій сформували один кластер, при цьому зв'язку з географічною віддаленістю популяцій не спостерігали (рис. 3, б, в). Це підтверджується і наступними даними: у тесті Мантеля (Mantel et al., 1967) з 999 пермутаціями коефіцієнт кореляції між матрицями генетичних та географічних відстаней для ISSR склав 0,9 ($p = 0,01$). Для МГЕ- та LP-PCR-маркерів такої кореляції не спостерігали, генетична близькість популяцій не відповідала просторовій ($r = -0,02$, $p = 0,55$ та $-0,31$, $p = 0,35$ відповідно).

Розподіл генетичної мінливості. За результатами AMOVA розподіл генетичної мінливості між популяціями та в межах популяцій склав відповідно 24 та 76 % для ISSR, 33 та 67 % для

маркерів трьох типів

Шеннона (S)		Незміщена генна різноманітність Нея (очікувана гетерозиготність H_e)			Генетичні відстані між рослинами за Жакардом (Dj)/середні відстані, %		
МГЕ	LP-PCR	ISSR	МГЕ	LP-PCR	ISSR	МГЕ	LP-PCR
0,105 ± 0,020	0,147 ± 0,025	0,150 ± 0,011	0,069 ± 0,014	0,100 ± 0,018	43,6–75,6/ 61,9	9,7–37,5/ 25,4	21,7–55,2/ 30,6
0,184 ± 0,024 *	0,285 ± 0,025*	0,125 ± 0,011	0,121 ± 0,017 *	0,190 ± 0,019 *	46,7–74,0/ 59,8	4,2–64,1/ 45,6	42,3–90,2/ 57,2
0,169 ± 0,023	0,251 ± 0,023 *	0,116 ± 0,011	0,110 ± 0,016	0,161 ± 0,017 *	43,1–67,1/ 55,0	7,7–66,7/ 44,7	45,0–92,9/ 62,2
0,166 ± 0,021	0,272 ± 0,025 *	0,111 ± 0,011 *	0,105 ± 0,015	0,179 ± 0,018 *	41,7–72,1/ 60,0	17,9–64,9/ 47,6	46,2–90,6/ 59,7
0,186 ± 0,024 *	0,213 ± 0,025	0,115 ± 0,011 *	0,124 ± 0,017 *	0,142 ± 0,018	40,8–72,9/ 55,3	13,0–65,9/ 46,3	43,5–83,9/ 53,0
0,162 ± 0,010	0,234 ± 0,011	0,123 ± 0,005	0,106 ± 0,007	0,154 ± 0,008	—/ 58,4	—/ 51,3	—/ 52,6
0,236 ± 0,020	0,294 ± 0,021	0,152 ± 0,009	0,139 ± 0,015	0,176 ± 0,016	40,8–86,4/ 68,5	4,2–78,3/ 53,4	21,7–96,9/ 72,0

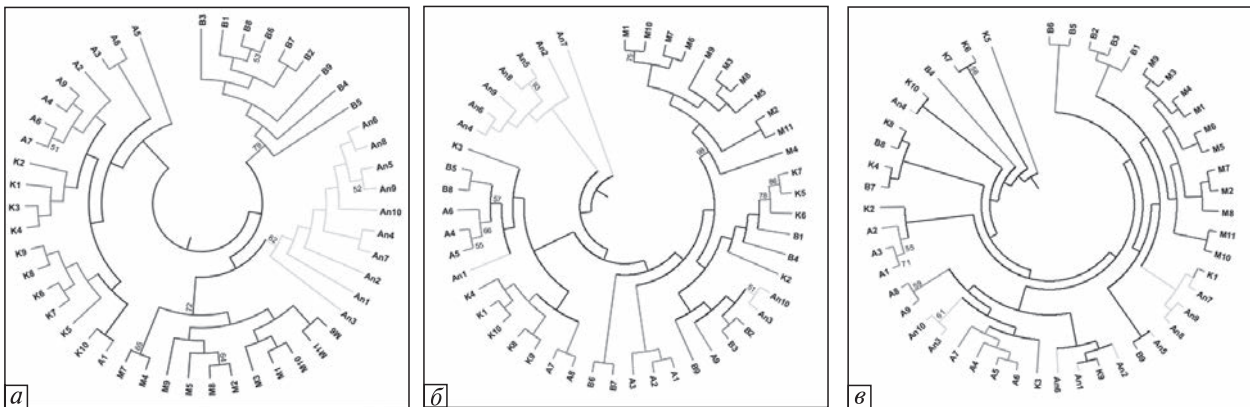


Рис. 2. Консенсусні дендрограми генетичної подібності рослин *I. pumila* з п'яти природних популяцій, побудовані на основі 10000 реплік бутстреп аналізу методом UPGMA за генетичними відстанями Жакарда: а – ISSR; б – IRAP та iPBS; в – LP-PCR. М – Мигія, А – Аляуди, К – Каравеллово, An – Андріївка, В – Балаклава. Наведено значення бутстреп-підтримки більші 50 %

МГЕ та 18 та 82 % для LP-PCR-аналізу. Тобто встановлено переважання внутрішньопопуляційної мінливості над міжпопуляційною, що є типовим для перехреснозапильних видів, до яких належить *I. pumila* (Ellegren, Galtier, 2016; Pannell, Voillemot, 2017; Clo et al., 2019; Glémin et al., 2019). У другому ієрархічному аналізі при додатковому врахуванні трьох регіонів (Миколаївської і Полтавської областей та АР Крим) мінливість за ISSR-маркерами розподілилася наступним чином: між регіонами – 11 %, між популяціями – 16 %, у межах популяцій – 73 %. Лише цей тип маркерів зафіксував вплив регіону на розподіл генетичної мінливості, а МГЕ та LP-PCR-маркери визначили його як нульовий. Отже диференціація між популяціями та регіонами є порівняно низькою, незважаючи на значні географічні відстані між ними.

Генетична структура популяцій. Генетичну структуру популяцій проаналізували за допо-

могою програми STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Було перевірено можливість походження популяцій *I. pumila* від 1–8 протопопуляцій (К). Баєсівський аналіз за ISSR-маркерами відніс досліджені особини до 4 груп, що загалом відповідали популяційній приналежності, вказавши при цьому на спільне походження популяцій Аляуди і Каравеллово. Виявлено кілька особин, частина генетичного матеріалу яких походила з інших популяцій, що свідчить про приналежність до них предків цих особин та наявність потоку генів між популяціями (рис. 4, а). За даними МГЕ-маркерів найвірогідніше значення К також дорівнювало 4, але окреме походження було показано лише для популяції Мигія, а решта особин містили у різних співвідношеннях генетичний матеріал із трьох інших протопопуляцій (рис. 4, б). Для LP-PCR найвищу вірогідність отримали для $K = 2$ (рис. 4, в). Однорідну генетичну

Таблиця 3. Незміщені генетичні дистанції Нея між популяціями *I. pumila* розраховані за результатами ISSR-аналізу/IRAP та iPBS-аналізів/LP-PCR-аналізу (під діагоналлю) та географічні відстані (над діагоналлю), км

Популяція	Мигія	Аляуди	Каравеллово	Андріївка	Балаклава
Мигія	–	140	141	295	443
Аляуди	0,036/0,131/0,096	–	1,5	327	304
Каравеллово	0,041/0,110/0,092	0,011/0,011/0,018	–	328,5	305
Андріївка	0,052/0,114/0,070	0,040/0,026/0,022	0,044/0,033/0,015	–	565
Балаклава	0,061/0,148/0,060	0,043/0,011/0,029	0,050/0,020/0,018	0,063/0,032/0,019	–

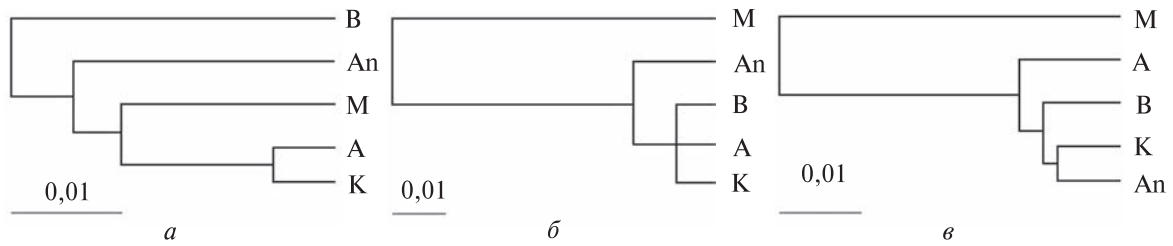


Рис. 3. Дендрограми генетичних відносин між популяціями *I. pumila*, побудовані методом UPGMA за генетичними відстанями Нея: а – на основі даних ISSR-аналізу; б – IRAP та iPBS-аналізів; в – LP-PCR-аналізу. М – Мигія, А – Аляуди, К – Каравеллово, An – Андріївка, В – Балаклава

структуру також мала лише популяція Мигія, особини решти популяцій містили генетичний матеріал із двох протопопуляцій у різних співвідношеннях. Їх популяційну приналежність не можна було ідентифікувати за визначеною генетичною структурою. Разом із тим, генетичний матеріал із другої протопопуляції у невеликих кількостях містили і всі особини з Мигії. Це може свідчити про вільний обмін генетичною інформацією у минулому, до фрагментації ареалу.

Адаптивна мінливість виду. Для пошуку адаптивної мінливості у популяціях застосували метод, який не потребує даних щодо параметрів довкілля, а отже потенційно дозволяє врахувати комплексний вплив відмінностей клімату та додаткових чинників: біотичних, едафічних, мікроклімату тощо (Antao, Beaumont, 2011). Він виділяє локуси-аутсайтери, відмінності частот яких між популяціями вищі, ніж очікується за моделлю нейтральної еволюції, тобто які не можуть бути пояснені лише дією генетичного дрейфу, а вірогідно пов'язані з дією спрямованого добору. Водночас цей аналіз дозволяє виділити локуси з однаковими частотами у різних популяціях, які імовірно знаходяться під впливом стабілізуючого добору і мають адаптивне значення в усіх умовах існування.

Серед ISSR-локусів виявлено сім (3,2 %), що піддаються дії спрямованого добору, та 17 локусів (7,7 %), що зазнають дії стабілізуючого добору. Для МГЕ-методів виявлено шість локусів (6,1 %), на які діє спрямований добір, та шість локусів (6,1 %), які зазнають дії стабілізуючого добору. За результатами LP-PCR-аналізу лише один локус (1,1 %) піддавався дії спрямованого добору, сім локусів (7,6 %) підлягали дії стабілізуючого добору.

Обговорення. Рівень та розподіл генетичного поліморфізму *I. pumila*. За результатами ПЛР-аналізу з трьома типами маркерів основні показники генетичного поліморфізму п'яти популяцій *I. pumila* склали: частка поліморфних локусів $P = 26,5\text{--}68,5\%$, індекс Шеннона $S = 0,105\text{--}0,285$, генне різноманіття $H_e = 0,069\text{--}0,190$. Літературні дані щодо генетичної мінливості *I. pumila* обмежені одним дослідженням 14 популяцій у Херсонській області України (Dembicz et al., 2018). Генне різноманіття у цій роботі $H_e = 0,233$, що дещо вище розрахованих нами значень, а середня частка поліморфних локусів вкладається у наш діапазон – $P = 58,6\%$. Деяка розбіжність результатів може певною мірою бути обумовлена відмінністю маркерів, адже автори застосували праймери на основі повторюваної послідовності rKRD *Oryza sativa* L.

Ми також маємо можливість порівняти наші результати з рівнями мінливості інших видів роду з подібною біологією та екологією. Отримані нами значення показників генетичного поліморфізму (табл. 2) не поступаються внутрішньопопуляційній мінливості видів *I. vorobievii*, *I. mandshurica* і *I. humilis*. Для цих видів за даними RAPD-аналізу $P = 32,5; 31,3$ і $48,1$; $S = 0,158; 0,161$ і $0,251$; $H_e = 0,104; 0,108$ і $0,168$ відповідно (Kozyrenko et al., 2009). За цим же методом у *I. aphylla* в середньому для семи популяцій $P = 30,6\%$, $S = 0,146$; $H_e = 0,097$, що приблизно відповідає нижній межі отриманих нами значень (Wroblewska, Brzosko, 2006). Для ISSR-аналізу в літературі представлені дані по *Iris lactea* var. *chinensis*. Виявлено високий рівень відмінностей між 24 рослинами, кожна з яких була зібрана в окремій популяції на території Китаю, південної Кореї,

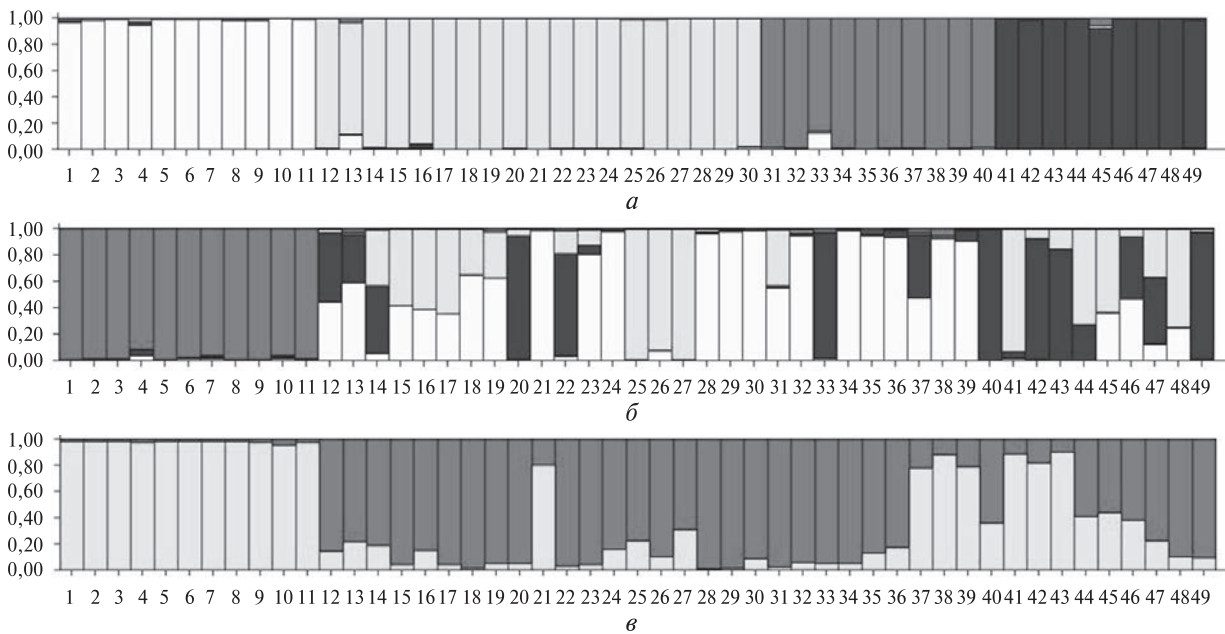


Рис. 4. Результати аналізу генетичної структури п'яти популяцій *I. pumila*, проведеного за допомогою програми STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al., 2000): *а* – ISSR-аналіз; *б* – IRAP та iPBS-аналізи; *в* – LP-PCR-аналіз. Столпчики відповідають особинам: 1–11 – рослини з популяції «Мігія»; 12–20 – «Аляуди»; 21–30 – «Каравеллово»; 31–40 – «Андріївка»; 41–49 – «Балаклава». Забарвлення сегментів стовпчиків відповідає походженню генетичного матеріалу з однієї із протопопуляцій *K*; розмір сегменту відповідає частці у геномі

Росії і Казахстану. Частка поліморфних локусів у вибірці складала 79 %, генетична подібність 0,400–0,929 (у середньому 0,592) (Wang et al., 2009).

Отже, порівняння власних і літературних даних показало, що рівень генетичної різноманітності *I. pumila* приблизно дорівнює або перевищує такий у інших видів роду на внутрішньопопуляційному і на внутрішньовидовому рівнях. Це додатково підтверджує зроблені нами раніше на меншій вибірці висновки (Parnikoz et al., 2017; Bublik et al., 2020), що не зважаючи на статус уразливого, вид володіє достатніми генетичними ресурсами і має сприятливий прогноз щодо виживання, можливостей адаптації та сталого існування за відсутності значних змін довкілля і подальшого скорочення ареалу. Одержані результати, очевидно, пов'язані з перехресним запиленням *I. pumila*, яке забезпечує високу комбінаторну мінливість, значною тривалістю життя окремих рослин та вегетативним розмноженням за допомогою кореневища. Останнє забезпечує існування різно-

манітних клонів у несприятливий для насінневого розмноження період та може захистити від втрати генетичного різноманіття внаслідок випадкових змін довкілля. Водночас, висока тривалість життя виду сприяє обміну генами між особинами різних поколінь (Ellegren, Galtier, 2016; Pannell, Voillemot, 2017; Clo et al., 2019; Glémin et al., 2019).

Окремі популяції *I. pumila* суттєво відрізнялися за рівнем генетичного поліморфізму, причому результати були різними для трьох типів маркерів. Найбільша серед досліджених популяція – Мігія, що нараховує більше тисячі особин, була найбільш поліморфною за ISSR-маркерами. За даними IRAP та iPBS-маркерів, вона навпаки мала найменший поліморфізм, натомість менші за розміром популяції, що мають 40–200 особин, були більш поліморфними (табл. 2). Отже, закономірність прямої залежності між розміром популяції і рівнем генетичної мінливості, описана в літературі (Ellegren, Galtier, 2016), була виявлена лише за ISSR-маркерами.

Популяції з Андріївка та Балаклава, які знаходяться відповідно на північній та південній межі ареалу виду в Україні, за рівнем генетичного поліморфізму не відрізнялися від популяцій приблизно такого ж розміру з центральної частини ареалу. Це не узгоджується з поширеною гіпотезою, за якою генетичне різноманіття всередині крайових популяцій низьке, як і їх розмір і кількість, через несприятливі екологічні умови на периферії. Натомість розбіжності між популяціями високі завдяки генетичному дрейфу (Kaweski, 2008). Альтернативна теорія стверджує, що периферичні популяції є генетично більш варіабельними, оскільки нестабільні умови на краю ареалу запускають дестабілізуючий добір, який підтримує високе генетичне різноманіття (Safriel et al., 1994), однак, цього ми також не спостерігали у нашому дослідженні.

Порівняння ефективності трьох типів маркерів. Серед трьох застосованих типів ПЛР-аналізу найвищий генетичний поліморфізм у *I. pumila* виявили LP-PCR-маркери (табл. 2). За літературними даними (Liviero et al., 2002) ці маркери також були високополіморфними – у ячменя метод LP-PCR визначав дещо вищий рівень мінливості, ніж RAPD-аналіз. Частка поліморфних фрагментів у вибірці рослин із різних популяцій досягала відповідно 85 та 80 %.

Мінливість двох інших типів маркерів – ISSR та МГЕ – для більшості популяцій *I. pumila* була близькою. Так само, у видів *Citrus* IRAP- та ISSR-аналіз були подібні за рівнем детектованої мінливості: частка поліморфних ампліконів становила відповідно 82,4 та 84,9 %, очікувана гетерозиготність – 0,24 та 0,22 (Biswas et al., 2010). У *Argania spinosa* L. методи ISSR та IRAP також були майже ідентичними за показниками визначення генетичного поліморфізму (Pakhrou et al., 2017). Натомість при вивченні поліморфізму винограду IRAP-маркери виявилися більш ефективними за ISSR (D'Onofrio et al., 2010). Порівняння методів iPBS, IRAP та ISSR у роботі виконаній на рисі показало значний розкид показників генетичної мінливості для окремих праймерів. Середні значення для iPBS та ISSR були дуже близькими, єдиний IRAP-праймер мав

високі показники на рівні найефективніших праймерів двох інших типів (Shirmohammadli et al., 2018).

Не зважаючи на дещо нижчий рівень поліморфізму, лише ISSR-маркери були здатні до встановлення популяційної приналежності рослин *I. pumila*. Також лише за цими маркерами картина генетичної подібності популяцій узгоджувалася з їх просторовим розміщенням, коефіцієнт кореляції між матрицями генетичних та географічних відстаней склав 0,9. Отже цей метод є ефективним інструментом для вивчення генетичної структури популяцій та міграційних процесів.

Хоча за окремими показниками ISSR і LP-PCR виявилися ефективнішими, сумісне застосування усіх типів маркерів може забезпечити більш комплексну характеристику мінливості послідовностей ДНК різного типу та повніше покриття всього геному (Biswas et al., 2010; Zhang et al., 2018). Успішна програма дослідження і збереження біорізноманіття має ґрунтуватися не лише на даних маркерів спрямованих на некодувальні ділянки, але і вивченні адаптивної генетичної мінливості, що може бути з більшою вірогідністю визначена за мінливістю кодувальних послідовностей (Rodriguez-Quilon et al., 2016; Flanagan et al., 2018).

Адаптація до умов довкілля. Здатність популяцій пристосовуватися до нових умов довкілля значною мірою залежить від наявності адаптивної генетичної мінливості, і її врахування при відборі матеріалу для збереження у природоохоронних програмах дозволяє пом'якшити ризик негативного впливу змін клімату (Bothwell et al., 2013, Yang et al., 2016; Chen et al., 2017).

Для з'ясування адаптивної складової у генетичній структурі популяцій застосували метод, що визначає локуси-аутсайтери, які мають неочікувано високу або низьку генетичну диференціацію, тобто знаходяться під впливом добору або зчеплені з адаптивними генами (Ruan et al., 2013). У п'яти популяціях *I. pumila* загалом виявили 10,9 % аутсайдерів серед ISSR, 12,2 % серед МГЕ і 8,7 % серед LP-PCR-локусів. Це досить висока частка, адже за літературними даними таких локусів зазвичай виявляють менше 5 % (Bothwell et al., 2013).

Результати дослідження можуть свідчити про адаптивний характер частини генетичної мінливості *I. pumila*, пов'язаний із накопиченням найбільш пристосованих до певних кліматичних умов генотипів. Вірогідно, додатково до нейтральних стохастичних процесів, тиск зовнішнього середовища відіграє значну роль у формуванні генетичної структури виду. Виявлені нами локуси є кандидатами для майбутнього дослідження по виявленню генів, пов'язаних із відповіддю на дію чинників довкілля, та пристосуванням видів рослин до кліматичних змін.

Висновки. Підібрано ефективну для вивчення генетичного поліморфізму *I. pumila* систему праймерів трьох типів (ISSR, МГЕ та LP-PCR), що може бути застосована у подальшому для моніторингу стану генофонду. При вивченні генетичної структури популяцій та міграційних процесів слід надавати перевагу ISSR-маркерам, оскільки встановлення популяційної приналежності усіх особин було можливим лише за їх використання. За даними трьох типів маркерів підтверджено високий рівень внутрішньовидового та внутрішньопопуляційного генетичного поліморфізму *I. pumila*, що загалом був порівнюваним або перевищував показники інших видів роду, наведені в літературі. Отже цей регіонально рідкісний вид, включно з периферичними популяціями, має достатні генетичні ресурси і сприятливий прогноз сталого існування за умови відсутності посилення антропогенного або екологічного тиску. Для трьох типів маркерів знайдено локуси-аутсайтери, які мають неочікувано високу або низьку генетичну диференціацію, отже вірогідно зазнають дії добору, і відіграють певну роль в адаптації до умов довкілля.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить жодних досліджень із участю тварин або людей, проведених будь-яким із авторів.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Роботу виконано при фінансовій підтримці Цільової комплексної міждисциплінарної програми наукових досліджень НАН України «Фундаментальні основи молекулярних та клітинних біотехнологій» на 2010–2014 рр.

LEVEL OF POLYMORPHISM AND POPULATION DIFFERENTIATION OF *IRIS PUMILA* L. ACCORDING TO THREE TYPES OF PCR MARKERS

O. Bublyk, I. Parnikoza, V. Kunakh

Institute of Molecular Biology and Genetics of NAS of Ukraine
150, Akad. Zabolotnoho str., Kyiv, 03680, Ukraine
State Institution National Antarctic Scientific Center, the Ministry of Education and Science of Ukraine
16, Taras Shevchenko blvd, Kyiv, 01601, Ukraine

E-mail: o.m.bublyk@imbg.org.ua,
ivan.parnikoza@uac.gov.ua, kunakh@imbg.org

The genetic polymorphism in *Iris pumila* L., a rare ornamental species involved in hybridization, was studied with PCR analysis using three types of primers: the first group was based on microsatellite repeats (ISSR), the second was complementary to the sequences of transposable elements (IRAP and iPBS), and the third – to the genes of abiotic stress response (LP-PCR). The high levels of intraspecific and intrapopulation genetic polymorphism were revealed for *I. pumila*, whose indices appeared to be comparable to other species of this genus. The main indices of genetic polymorphism were determined for five populations of *I. pumila* from the territory of Ukraine: the percentage of polymorphic loci (P) was 26,5–68,5 %, Shannon index (S) was 0.105–0,285, and gene diversity (H_e) was 0,069–0,190. ISSR-analysis demonstrated the direct relationship between the level of variation and the size of population, whereas two other types of markers showed the negative correlation between these indices. The direct relationship between genetic and geographic distances between populations was found only using ISSR-markers. The highest level of genetic polymorphism was detected by LP-PCR-markers, while the population assignment of all the individual plants was possible only with ISSR-markers. The developed system of PCR-based markers can be used to monitor the gene pool further on, and to study the genetic structure of populations and migration.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Allendorf FW. (2017) Genetics and the conservation of natural populations: Allozymes to genomes. *Mol. Ecol.* **26**:420–30. doi: 10.1111/mec.13948.
- Antao T, Beaumont MA. (2011) Mcheza: A workbench to detect selection using dominant markers. *Bioinformatics.* **27**(12):1717–8. doi: 10.1093/bioinformatics/btr253.
- Biswas MK, Xu Q, Deng X. (2010) Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of Citrus spp. *Sci. Hortic.* **124**(2):254–61. doi: 10.1016/j.scienta.2009.12.013.

- Bothwell H, Bisbing S, Therkildsen NO et al. (2013) Identifying genetic signatures of selection in a non-model species, alpine gentian (*Gentiana nivalis* L.), using a landscape genetic approach. *Conserv. Genet.* **14**:467–81. doi: 10.1007/s10592-012-0411-5.
- Bublyk O, Andreev I, Parnikoza I, Kunakh V. (2020) Population genetic structure of *Iris pumila* L. in Ukraine: effects of habitat fragmentation. *Acta. Biol. Cracov. Bot.* **62**(1):51–61. doi: 10.24425/abscsb.2020.131665.
- Bublyk OM, Andreev IO, Kalendar RN et al. (2013) Efficiency of different PCR-based marker systems for assessment of *Iris pumila* genetic diversity. *Biologia.* **68**(4):613–20. doi: 10.2478/s11756-013-0192-4.
- Chen J, Huang C, Lai Y et al. (2017) Postglacial range expansion and the role of ecological factors in driving adaptive evolution of *Musa basjoo* var. *formosana*. *Sci. Rep.* **7**:5341. doi: 10.1038/s41598-017-05256-6.
- Chuanliang D, Jian Zh, Longdou L et al. (2006) Study on germplasmic resources of *Lycoris longituba* using RAPD and ISSR. *Analele Universitatii «Alexandru Ioan Cuza», Seria Genetica si Biologie Moleculara.* **VII**:111–20.
- Clo J, Gay L, Ronfort J. (2019) How does selfing affect the genetic variance of quantitative traits? An updated meta-analysis on empirical results in angiosperm species. *Evolution.* **73**(8):1578–90. doi: 10.1111/evo.13789.
- Dembicz I, Szczeparska L, Moysiienko II, Wodkiewicz M. (2018) High genetic diversity in fragmented *Iris pumila* L. populations in Ukrainian steppe enclaves. *Basic. Appl. Ecol.* **28**:37–47. doi: 10.1016/j.baae.2018.02.009.
- D'Onofrio C, De Lorenzis G, Giordani T et al. (2010) Retrotransposon-based molecular markers for grapevine species and cultivars identification. *Tree Genet. Genom.* **6**:451–66. doi: 10.1007/s11295-009-0263-4.
- Doyle JJ, Doyle JL. (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* **19**:11–5.
- Ellegren H, Galtier N. (2016) Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*, Nature Publishing Group. **17**(7):422–33. doi: 10.1038/nrg.2016.58.
- Felsenstein J. (1989) PHYLIP – Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics.* **5**:164–6.
- Flanagan SP, Forester BR, Latch E et al. (2018). Guidelines for planning genomic assessment and monitoring of locally adaptive variation to inform species conservation. *Evol. Appl.* **11**(7):1035–52. doi: 10.1111/eva.12569.
- Frankham R, Ballou JD, Ralls K et al. (2017) Genetic management of fragmented animal and plant populations. Oxford University Press, Oxford, UK. doi: 10.1093/oso/9780198783398.001.0001.
- Garrido-Cardenas JA, Mesa-Valle C, Manzano-Agugliaro F. (2018) Trends in plant research using molecular markers. *Planta.* **247**:543–57. doi: 10.1007/s00425-017-2829-y.
- Glémin S, François CM, Galtier N. (2019) Genome evolution in outcrossing vs. selfing vs. asexual species. In: Anisimova M (ed) *Evolutionary genomics. Methods in molecular biology*, vol 1910. Humana, New York, NY. doi: 10.1007/978-1-4939-9074-0_11.
- Gupta PK, Rustgi S. (2004) Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct. Integr. Genom.* **4**:139–62. doi: 10.1007/s10142-004-0107-0.
- Hanson JO, Rhodes JR, Riginos C, Fuller RA. (2017) Environmental and geographic variables are effective surrogates for genetic variation in conservation planning. *PNAS.* **114**(48):12755–60. doi: 10.1073/pnas.1711009114.
- Holderegger R, Balkenhol N, Bolliger J et al. (2019) Conservation genetics: Linking science with practice. *Mol. Ecol.* **28**:3848–56. doi: 10.1111/mec.15202.
- Kalendar R, Amenov A, Daniyarov A. (2018) Use of retrotransposon-derived genetic markers to analyse genomic variability in plants. *Funct. Plant Biol.* **46**:15–29. doi: 10.1071/FP18098.
- Kalendar R, Antonius K, Smýkal P, Schulman AH. (2010) iPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theor. Appl. Genet.* **121**(8):1419–30. doi: 10.1007/s00122-010-1398-2.
- Kawecki TJ. (2008) Adaptation to marginal habitats. *Ann. Rev. Ecol. Evol. S.* **39**:321–42. doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.38.091206.095622.
- Kozyrenko MM, Artyukova EV, Zhuravlev YuN. (2009) Independent species status of *Iris vorobievii* N.S. Pavlova, *Iris mandshurica* Maxim., and *Iris humilis* Georgi (Iridaceae): Evidence from the nuclear and chloroplast genomes. *Russ. J. Genet.* **45**(11):1394–402. doi: 10.1134/S1022795409110143.
- Liviero L, Maestri E, Gulli M et al. (2002) Ecogeographic adaptation and genetic variation in wild barley, application of molecular markers targeted to environmentally regulated genes. *Genet. Res. Crop. Ev.* **49**(2):133–44. doi: 10.1023/A:1014792509087.
- Mahmud R, Kabir MR, Hoque E, Akhond AY. (2018). Assessment of some genetic attributes in wheat (*Triticum aestivum* L.) using gene-specific molecular markers. *Agric. Nat. Res.* **52**:39–44. doi: 10.1016/j.anres.2018.05.003.
- Mantel N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* **27**(2):209–20.
- Pakhrou O, Medraoui L, Yatrib C et al. (2017) Assess-

- ment of genetic diversity and population structure of an endemic Moroccan tree (*Argania spinosa* L.) based in IRAP and ISSR markers and implications for conservation. *Physiol. Mol. Biol. Plants*. **23**:651–61. doi: 10.1007/s12298-017-0446-7.
- Pannell JR, Voillemot M. (2017) Evolution and ecology of plant mating systems. In: eLS. Wiley. Chichester. doi: 10.1002/9780470015902.a0021909.pub2.
- Parnikoza I, Andreev I, Bublyk O et al. (2017) The current state of steppe perennial plants populations: a case study on *Iris pumila*. *Biologia*. **72**(1):24–35. doi: 10.1515/biolog-2017-0002.
- Peakall R, Smouse PE. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes*. **6**:288–95. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. **155**:945–59.
- Rodriguez-Quilon I, Santos-del-Blanco L, Serra-Varela MJ et al. (2016) Capturing neutral and adaptive genetic diversity for conservation in a highly structured tree species. *Ecol. Appl.* **26**:2254–66. doi: 10.1002/eap.1361.
- Ruan Y, Huang B-H, Lai Sh-J et al. (2013) Population genetic structure, local adaptation, and conservation genetics of *Kandelia obovata*. *Tree Genet. Genom.* **9**:913–25. doi: 10.1007/s11295-013-0605-0.
- Safriel NU, Volis S, Kark S. (1994) Core and peripheral populations and global climate change. *Isr. J. Plant Sci.* **42**:331–45. doi: 10.1080/07929978.1994.10676584.
- Schluter PM, Harris SA. (2006) Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data. *Mol. Ecol. Notes*. **6**(2):569–72. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01225.x.
- Shirmohammadli S, Sabouri H, Ahangar L et al. (2018) Genetic diversity and association analysis of rice genotypes for grain physical quality using iPBS, IRAP, and ISSR markers. *J. Genet. Resour.* **4**:122–9. doi: 10.22080/jgr.2019.15415.1115.
- Soumaya Rh-Ch, Sarra Ch, Maha M, et al. (2020) Gene-targeted markers to assess genetic diversity and population structure within Tunisian *Phoenix dactylifera* L. cultivars. *Silvae Genet.* **69**(1). doi: 10.2478/sg-2020-0005.
- Tessier C, David J, This P et al. (1999) Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification in *Vitis vinifera* L. *Theor. Appl. Genet.* **98**:171–7. doi: 10.1007/s001220051054.
- Wang K, Kang J, Zhou H et al. (2009) Genetic diversity of *Iris lactea* var. *chinensis* germplasm detected by inter-simple sequence repeat (ISSR). *Afr. J. Biotechnol.* **8**(19):4856–63.
- Wroblewska A, Brzosko E. (2006) The genetic structure of the steppe plant *Iris aphylla* L. at the northern limit of its geographical range. *Bot. J. Linn. Soc.* **152**(2):245–55. doi: 10.1111/j.1095-8339.2006.00568.x.
- Yang A-H, Wei N, Fritsch PW, Yao X-H. (2016) AFLP Genome scanning reveals divergent selection in natural populations of *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae) along a latitudinal transect. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2016.00698.
- Zhang Y, Zhang X, Chen X et al. (2018) Genetic diversity and structure of tea plant in *Qinba area* in China by three types of molecular markers. *Hereditas.* **155**(22). doi: 10.1186/s41065-018-0058-4.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics.* **20**(2):176–83. doi: 10.1006/geno.1994.1151.

Надійшла в редакцію 30.06.20
Після доопрацювання 11.08.20
Прийнята до друку 18.01.21