



УДК 582.6/.9+57.574.3+575.2

Эффективность SCoT-маркеров для характеристики внутривидового генетического разнообразия *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii*, *Paeonia caucasica*

Р. М. Шхалахова^{1, 2*}, В. И. Маляровская^{1, 3}, Н. Г. Конинская^{1, 4}

¹ Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук», ул. Яна Фабрициуса, д. 2/28, г. Сочи, 354002, Россия

² E-mail: shhalahova1995@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0001-5262-7866>

³ E-mail: malyarovskaya@yandex.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0003-4213-8705>

⁴ E-mail: natakoninskaya@mail.ru; ORCID iD: <https://orcid.org/0000-0002-2126-5863>

* Автор для переписки

Ключевые слова: генетическое разнообразие, полиморфизм, редкие и исчезающие виды, PCoA анализ, SCoT-маркеры.

Аннотация. Для создания стратегий сохранения редких и исчезающих растений важно изучить внутривидовое генетическое разнообразие каждого конкретного вида. Для выполнения этих задач необходимы эффективные маркерные системы. В данном исследовании оценивалась эффективность 36 SCoT-маркеров для характеристики внутривидового генетического разнообразия *Cyclamen coum* Mill., *Helleborus caucasicus* A. Brown, *Galanthus woronowii* Losinsk., *Paeonia caucasica* Schipcz., собранных из разных мест произрастания Сочинского национального парка. Отдельные маркеры, такие как SCoT16 (58,2 %), SCoT6 (50,3 %), SCoT7 (49,6 %), SCoT8 (48,1 %), SCoT30 (42,8 %), SCoT29 (41,1 %) и SCoT20 (39,3 %), показали высокий уровень полиморфизма, что свидетельствует о хорошей применимости этих маркеров для оценки внутривидового генетического разнообразия исследуемых видов природной флоры Западного Кавказа. Кроме того, результаты исследования важны для реализации мер по сохранению данных видов и борьбы с генетической эрозией.

SCoT markers efficiency for characterizing the intraspecific genetic diversity of *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii*, *Paeonia caucasica*

R. M. Shkhalakhova, V. I. Malyarovskaya, N. G. Koninskaya

Federal Research Centre the Subtropical Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences,
Jana Fabriciusa St., 2/28, Sochi, 354002, Russia Federation

Keywords: genetic diversity, intraspecific diversity, PCoA analysis, polymorphism, rare and endangered species, SCoT markers.

Summary. Creating strategies of rare and endangered plants conservation requires studying the intraspecific genetic diversity of each particular species. Thus, efficient marker systems are necessary for implementing these objectives. In this study, the efficiency of 36 SCoT markers were evaluated for characterizing the intraspecific genetic diversity of *Cyclamen coum* Mill., *Helleborus caucasicus* A. Brown, *Galanthus woronowii* Losinsk., *Paeonia caucasica* Schipcz. collected from different habitats of the Sochi National Park. Single markers, such as SCoT16 (58,2 %), SCoT6 (50,3 %),

SCoT7 (49,6 %), SCoT8 (48,1 %), SCoT30 (42,8 %), SCoT29 (41,1 %), and SCoT20 (39,3 %) showed high levels of polymorphism, indicating good applicability of these markers to assess the intraspecific genetic diversity of the studied of the Western Caucasus flora species. In addition, the results of the study are important for the implementing conservation measures for these species and combating genetic erosion.

Введение

На территории Западного Кавказа сосредоточено более 2200 растений, из которых 65 % относятся к редким видам, подлежащим охране на государственном и региональном уровнях (Astarov et al., 2017). Большое разнообразие реликтов в регионе обуславливается особенностями экотонного эффекта Колхидской, Восточно-Средиземноморской и Кавказской горно-луговой геоботанических провинций. Кроме того, горные экосистемы часто образуют самые разнообразные центры произрастания редких видов, в том числе и эндемичных (Rahbek et al., 2019; Fassou et al., 2020). Так, Сочинский национальный парк является мощным природоохранным центром на Кавказе, в настоящее время здесь под охраной находится более 400 видов растений (Timukhin, 2006). Особого внимания к сохранению требуют редкие виды растений, оказавшиеся под угрозой исчезновения. Несмотря на охранные меры, целый ряд угнетенных реликтов до недавнего времени оставался неучтенным в официальных списках Красных книг (Shumkova et al., 2019). Важнейшим этапом в организации мероприятий по сохранению редких и исчезающих видов является анализ генетического разнообразия внутри каждого конкретного вида, так как в основе его самоорганизации лежит внутривидовой генетический полиморфизм (Fassou et al., 2020). Однако данные о распределении генетического разнообразия внутри и между популяциями большинства редких и исчезающих видов растений недостаточны, вместе с этим они необходимы, например, при отборе наиболее дистантных особей для скрещивания и увеличения генетического разнообразия и адаптивного потенциала вида. Таким образом, анализ внутривидового разнообразия редких видов растений имеет большое значение, так как позволяет выявить частоты и распределение генетических полиморфизмов, что является необходимым условием для грамотной стратегии сохранения исчезающих видов (Kress, Erickson, 2012), в частности для таких видов, как *Cyclamen coum* Mill., *Helleborus caucasicus* A. Brown, *Galanthus woronowii* Losinsk., *Paeonia caucasica* Schipcz.

Цикламен кавказский (*Cyclamen coum*) относится к семейству первоцветные (Primulaceae), распространен на территориях средиземноморской флоры: от Болгарии до Северной Сирии и Ирана, в России произрастает на территории Краснодарского края, Республик Адыгеи и Крыма. В Краснодарском крае встречается в районах г. Сочи, г. Туапсе и г. Геленджик (Vahrusheva et al., 2009; Luchkina, 2010; Fomenko, Postarnak, 2011). Занесен в Красную книгу РФ (категория 3) и Краснодарского края (категория 2) (Litvinskaya, 2008; Timukhin, Tuniev, 2017). Из-за своего горного происхождения *C. coum* отличается высокой морозостойкостью, что делает его ценным источником генетического материала для селекционеров и производителей цикламенов в умеренной зоне (Prange et al., 2010). *Cyclamen coum* содержит сапонины (кумозиды, цикламинорин, деглюкоцикламин и др.) (Ishizaka et al., 2002), стерины (стигмастерол и др.), алкалоиды, флавоноиды, фенолы, дубильные вещества, антоцианы, терпены и гликозиды (Dall'Acqua et al., 2010; Altunkeyik et al., 2012; Öztürk, 2020). Наличие широкого спектра лекарственных метаболитов характеризует антиоксидантную, антибактериальную и противоопухолевую активность экстрактов *C. coum* (Vokov et al., 2020).

Зимовник кавказский (*Helleborus caucasicus*) – третичнореликтовый вид, относящийся к семейству Лютиковые (Ranunculaceae), летнезеленый травянистый корневищный полукарпик. Распространен на территории Средиземноморья, Кавказа, Азии. В РФ произрастает главным образом на территории всего Российского Кавказа. Краснодарский край является основным местом произрастания данного вида, здесь он распространен на территориях от г. Геленджика до г. Сочи. Занесен в Красную книгу Краснодарского края (категория 3) как вид, «находящийся в состоянии, близком к угрожающему» (Litvinskaya, 2017). Экстракты *H. caucasicus* обладают широким спектром биологической активности, в корнях и корневищах обнаружены гликозиды (буфадииенолиды и экидистероиды), биоциды, стероидные сапонины, гамма-лактоны. Гликозид корельборин Р активно применялся при сердечной недостаточности, но производство этого препарата резко сократилось

из-за недостаточной сырьевой базы (Chukuridi, Bakalov, 2009). В ряде исследований отмечался цитотоксический эффект экстракта корней и корневищ *H. caucasicus* в отношении клеток рака легких и колоректального рака (Muzashvili et al., 2006; Bassarello et al., 2008; Martucciello et al., 2018).

Подснежник Воронова (*Galanthus woronowii*) – спорадично распространенный эндемик Западного Кавказа из семейства Амариллисовые (Amaryllidaceae) (Mikheev, 2008; Timukhin, Tuniev, 2017). Встречается в северо-восточной части Турции, Грузии, Южной Осетии, Абхазии (Davis, 2006), в Краснодарском крае на Черноморском побережье от Туапсе до реки Псоу, в Республике Адыгея, в Ставропольском крае, близ г. Ессентуки. Внесен в Красные книги РФ (категория 2б) и Краснодарского края (категория 2) и рекомендован к охране на территории Большого Сочи (Mikheev, 2008; Timukhin, Tuniev, 2017; Malyarovskaya et al., 2018). *G. woronowii* – один из основных источников растительных алколоидов (Jin, 2013), галантамина, обладающего ацетилхолинэстеразной ингибирующей активностью (Howes, Perry, 2011; Sarikaya et al., 2013) и ликорина (Bokov et al., 2017; Genç et al., 2019).

Пион кавказский (*Paeonia caucasica*) – травянистый реликтовый многолетник из семейства Раеониaceae, численность которого резко сокращается из-за сбора и выкопки корневищ в коммерческих целях (Ukhova, Litvinskaya, 2019). Распространен на территории Юго-Западной Азии, Кавказе (Грузия), в России в Республиках Северного Кавказа, в Краснодарском крае от г. Анапы до г. Сочи и в Республике Адыгея. Занесен в Красные книги РФ (категория 3), Краснодарского края (категория 2) (Mikheev, 2008; Litvinskaya, 2017). Экстракты *P. caucasica* содержат терпеноиды, фенологликозиды, флавоноиды, фенольные соединения (галловая кислота и пеонифлорин), иридоиды, дубильные вещества (Wu et al., 2010; Parker et al., 2016; Deng et al., 2018). В ряде стран применяется в качестве обезболивающего, противовоспалительного, иммуномодулирующего, антиоксидантного средства (Ivanova et al., 2002).

Согласно новым подходам молекулярной биологии эффективной платформой для анализа генетической вариабельности стали системы молекулярных маркеров. Одним из самых главных преимуществ ДНК-маркеров является то, что они не подвержены влиянию окружающей среды и не имеют плейотропных или эпистатических эффектов (Fassou et al., 2020).

Существуют разные типы ДНК-маркеров, такие как AFLP, ISSR, RAPD, SRAP, SCoT и SSR, используемые для исследования генетического разнообразия различных видов растений (Martins et al., 2004; Hou et al., 2005; Arif et al., 2009; Son et al., 2012; Mukherjee et al., 2013; Simsek et al., 2017). Каждый тип маркера имеет свои преимущества и недостатки: низкая воспроизводимость RAPD, высокая стоимость AFLP и необходимость знать фланкирующие последовательности для SSR. Метод ISSR-PCR преодолевает большую часть этих ограничений, однако локализация в геноме продуктов амплификации, так же, как и функция, остаются неизвестными (Karimi et al., 2014). При этом лишь единичные публикации встречаются по перечисленным видам природной флоры. В ряде работ анализировали генетическое разнообразие некоторых видов рода *Cyclamen* L. с использованием RAPD и SRAP праймеров (Naderi et al., 2009; Simsek et al., 2017), рода *Helleborus* L. с ISSR (Fassou et al., 2020), рода *Paeonia* L. (Yang et al., 2005; Lim et al., 2013), где отмечался высокий уровень полиморфизма. Также ранее была оптимизирована система SCoT-PCR для древесных видов рода *Paeonia* L. (Hou et al., 2005). В других исследованиях оценивались генетическая стабильность коллекции *in vitro Galanthus woronowii* с помощью ISSR праймеров (Suprun et al., 2017) и внутривидовой полиморфизм нескольких видов *Galanthus* с RAPD праймерами, где идентифицировались единичные генетические отличия (Zubov et al., 2011).

Наряду с быстрым ростом исследований в области геномики наблюдается тенденция отхода от случайных ДНК-маркеров к маркерам, нацеленным на гены (Gupta, Rustgi, 2004; Gupta et al., 2019). Таковыми являются маркеры SCoT (start codon targeted), основанные на полиморфизме, направленном на стартовый кодон. Маркеры SCoT состоят из короткой консервативной области, фланкирующей стартовый кодон (ATG), который является консервативным для всех генов (Collard, Mackill, 2009). Данный метод набирает популярность благодаря своему превосходству над другими системами доминантных маркеров ДНК, такими как RAPD, AFLP или ISSR, в отношении более высокого полиморфизма и лучшей разрешаемости. Кроме того, из-за большей длины праймеров с более высокой температурой отжига SCoT являются более надежными и воспроизводимыми (Hou et al., 2011; Hajibarat et al., 2015; Satya et al., 2015; Etminan et al., 2016; Samarina et al., 2021).

В связи с этим целью исследований являлась оценка эффективности SCoT-маркеров для анализа внутривидового разнообразия редких и исчезающих видов Западного Кавказа *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii*, *Paeonia caucasicus*.

Материалы и методы

Растительный материал и экстракция ДНК.
В данном исследовании был использован расти-

тельный материал четырех видов, произрастающих на территории Западного Кавказа, в частности, в окр. г. Сочи (рис. 1).

Образцы *Cyclamen coum* были взяты из двух природных популяций: первая популяция произрастала на скалистых породах (С1, С2), площадь составила около 100 м², численность на 1 м² – 2–3 особи; вторая – в лесной тенистой местности (С3, С4), площадь популяции – 400–450 м², численность на 1 м² около 4 особей. Растения росли группами, неравномерно.

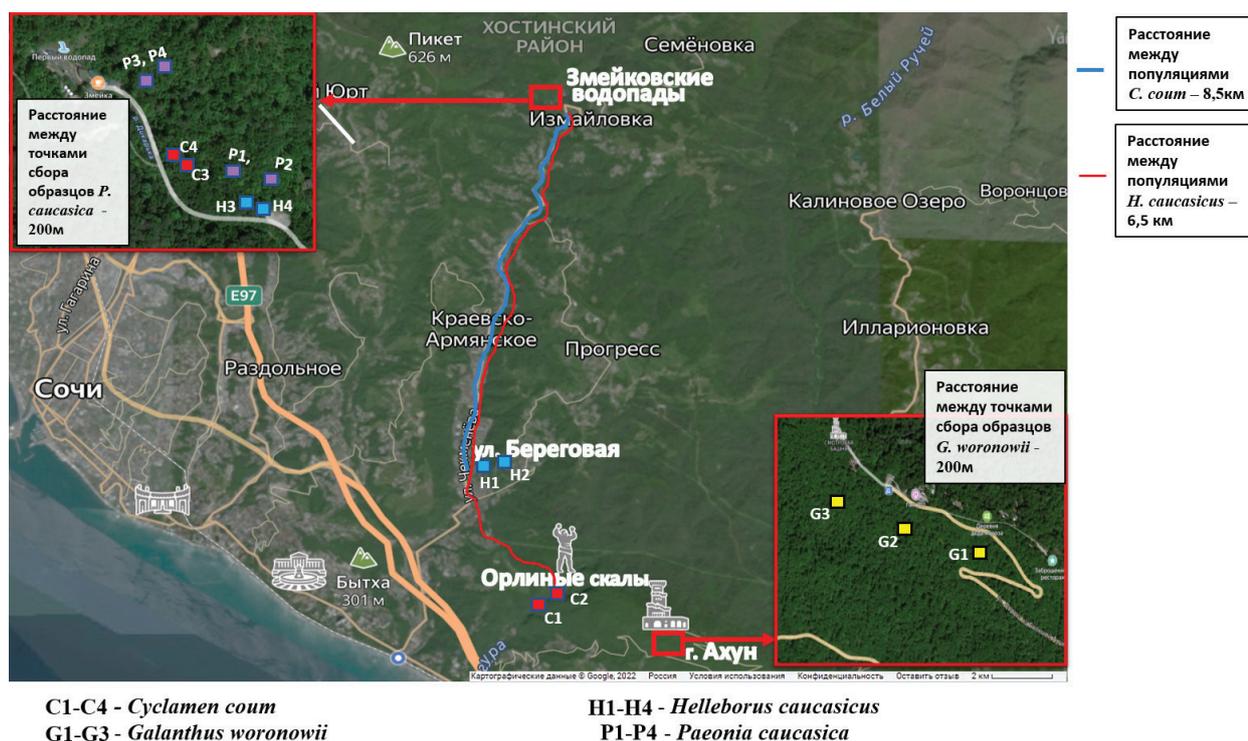


Рис. 1. Географическое местонахождение исследуемых эндемиков Западного Кавказа.

Образцы *Helleborus caucasicus* также были взяты из двух популяций: первая популяция находилась в районе жилых домов, вдоль р. Мацеста (Н1, Н2), площадь популяции составила 20 м² с численностью 38 особей; вторая популяция в лесной местности (Н3, Н4), площадь популяции – 90 м², численность – до 3 особей на м².

Образцы *Galanthus woronowii* были отобраны с нижней границы (G1), середины (G2) и верхней (G3) границы популяции, находящейся в тенистой лесной зоне вершины г. Ахун, общая площадь, занимаемая растениями, составила около 350 м², численность – до 4–5 особей на 1 м². Растения росли скоплениями, образуя небольшие группы.

Образцы *Paeonia caucasicus* были отобраны с нижней (Р1, Р2) и верхней границ (Р3, Р4) популяции, находящейся на одной территории с популяцией *Cyclamen coum*. Общая площадь, занимаемая растениями, составила около 100 м² с численностью 46 особей. Растения также росли группами, неравномерно.

Территории данных популяций подвержены, главным образом, антропогенным нагрузкам (вытаптывание, сбор на букеты, сбор в лекарственных целях, рекреационные нагрузки).

Из листьев отобранных образцов выделяли ДНК согласно протоколу СТАВ (Doyle, 1990). Качество выделенной ДНК проверяли в 1%-м агарозном геле и спектрофотометрическим ме-

тодом. Все образцы разбавляли до рабочей концентрации 200 нг/мкл.

Генетический анализ. Поскольку 36 SCoT-праймеров были первоначально разработаны для *Oryza sativa* (Collard, Mackill, 2009) (табл. 1),

мы предварительно оценили переносимость этих праймеров на исследуемые виды и подобрали оптимальную программу амплификации. Эффективные SCoT-маркеры были выбраны для дальнейшей оценки.

Таблица 1

SCoT-маркеры, используемые для генетического анализа исследуемых видов

Название	Сиквенс праймера 5'3'
SCoT праймер	
SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA
SCoT2	CAACAATGGCTACCACCC
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG
SCoT4	CAACAATGGCTACCACCT
SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA
SCoT6	CAACAATGGCTACCACGC
SCoT7	CAACAATGGCTACCACGG
SCoT8	CAACAATGGCTACCACGT
SCoT9	CAACAATGGCTACCAGCA
SCoT10	CAACAATGGCTACCAGCC
SCoT11	AAGCAATGGCTACCACCA
SCoT12	ACGACATGGCGACCAACG
SCoT13	ACGACATGGCGACCATCG
SCoT14	ACGACATGGCGACCACGC
SCoT15	ACGACATGGCGACCCGGA
SCoT16	ACCATGGCTACCACCGAC
SCoT17	ACCATGGCTACCACCGAG
SCoT18	ACCATGGCTACCACCGCC
SCoT19	ACCATGGCTACCACCGGC
SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG
SCoT21	ACGACATGGCGACCCACA
SCoT22	AACCATGGCTACCACCAC
SCoT23	CACCATGGCTACCACCAG
SCoT24	CACCATGGCTACCACCAT
SCoT25	ACCATGGCTACCACCGGG
SCoT26	ACCATGGCTACCACCGTC
SCoT27	ACCATGGCTACCACCGTG
SCoT28	CCATGGCTACCACCGCCA
SCoT29	CCATGGCTACCACCGGCC
SCoT30	CCATGGCTACCACCGGCG
SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT
SCoT32	CCATGGCTACCACCGCAC
SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG
SCoT34	ACCATGGCTACCACCGCA
SCoT35	CATGGCTACCACCGGCC
SCoT36	GCAACAATGGCTACCACC

Реакционная смесь для ПЦР SCoT состояла из 10 мкл 2х реакционного буфера HS-TaqPCR (Биолабмикс, Новосибирск, Россия), содержащего Hot Start Taq-полимеразу, 0,4 мкл праймера (10 мкМ), 2 мкл ДНК (200 нг/мкл) и обработанной DEPC воды в общем объеме ПЦР 20

мкл. Амплификацию проводили в термоциклере MiniAmp (Thermo Fisher Scientific, Массачусетс, США) по следующей программе: первичная денатурация 5 мин при 95 °С, отжиг 35 циклов денатурация при 95 °С в течение 1 мин, отжиг при 52 °С в течение 1 мин, элонгация при 72 °С в

течение 2 мин и финальная элонгация при 72 °C в течение 5 мин. Разделение SCoT-фрагментов проводили в 2%-м агарозном геле в течение 2,5 часов при 90 В в 1 × TAE буфере. Длину каждого фрагмента ДНК в геле определяли по маркеру размера длин ДНК Sky-High (Биолабмикс), предназначенному для оценки длин и количества двуцепочечных ДНК размером от 250 до 10 000 п.н. Данные записывали в виде бинарной матрицы 1/0 для обозначения наличия и отсутствия амплифицированных фрагментов соответственно. Подсчет полос и длин фрагментов оценивались приблизительно вручную.

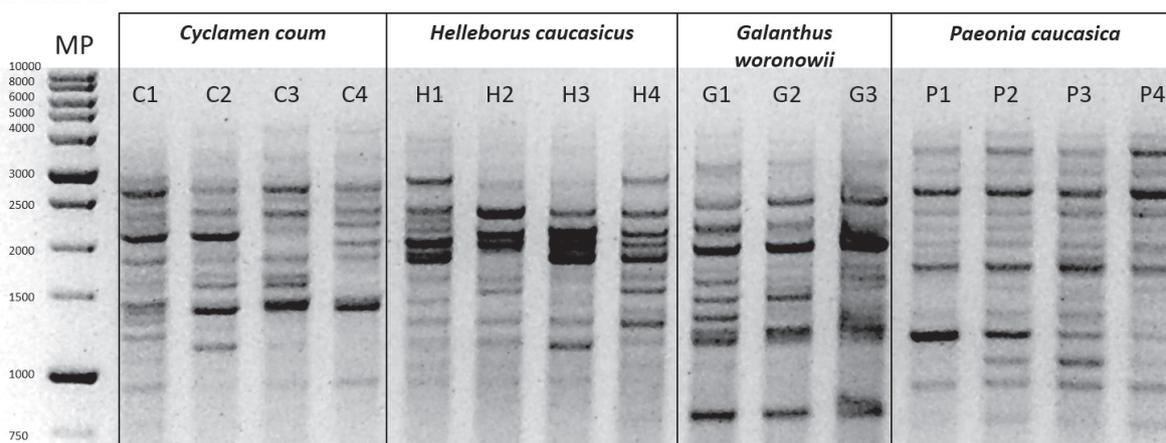
Статистическая обработка. Параметры генетического разнообразия были рассчитаны с использованием программы IMEC (Marker Efficiency Calculator. URL: <https://irscope.shinyapps.io/iMEC/>) и программного обеспечения GeneAlex ver. 6.5 (Peakall, Smouse, 2006; Peakall,

Smouse, 2012). Для каждого анализируемого параметра исследовали одну биологическую повторность (один образец – один генотип) и две технические повторности. Оценивались следующие параметры: общее количество бэндов, количество полиморфных бэндов (P = полиморфизм (%)). Кроме того, был выполнен анализ главных координат (PCoA) на основе набора данных матрицы в GeneAlex ver. 6.5.

Результаты

В результате апробации 36 SCoT-праймеров на целевых видах природной флоры три (SCoT13, SCoT14, SCoT15) показали низкий уровень амплификации в образцах и были удалены из анализа. Наибольшее количество полиморфных полос генерировали праймеры SCoT6 и SCoT16 (рис. 2).

Primer SCoT 6



Primer SCoT 16

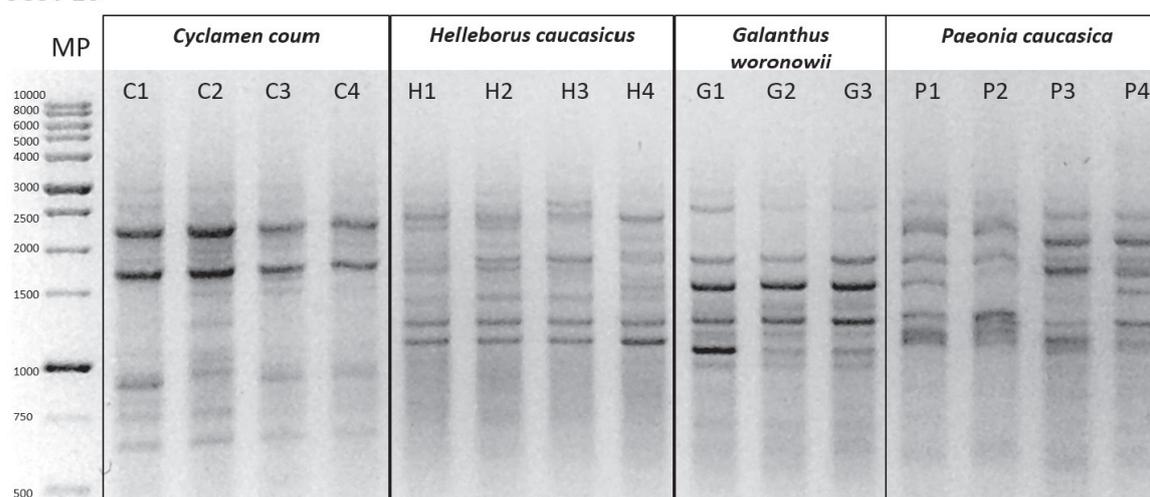


Рис. 2. Электрофоретические спектры SCoT-праймеров для *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii*, *Paeonia caucasica*.

Для всех анализируемых образцов генерировано 1205 фрагментов ДНК. Так, для *Cyclamen coum* получено 305 фрагмента в диапазоне от 2 (SCoT1) до 23 (SCoT6), в среднем 9,21 полос на

праймер. При этом размер амплифицированных продуктов варьировал от 0,175 (SCoT24) до 5,95 т. п. н. (SCoT20) (рис. 3).

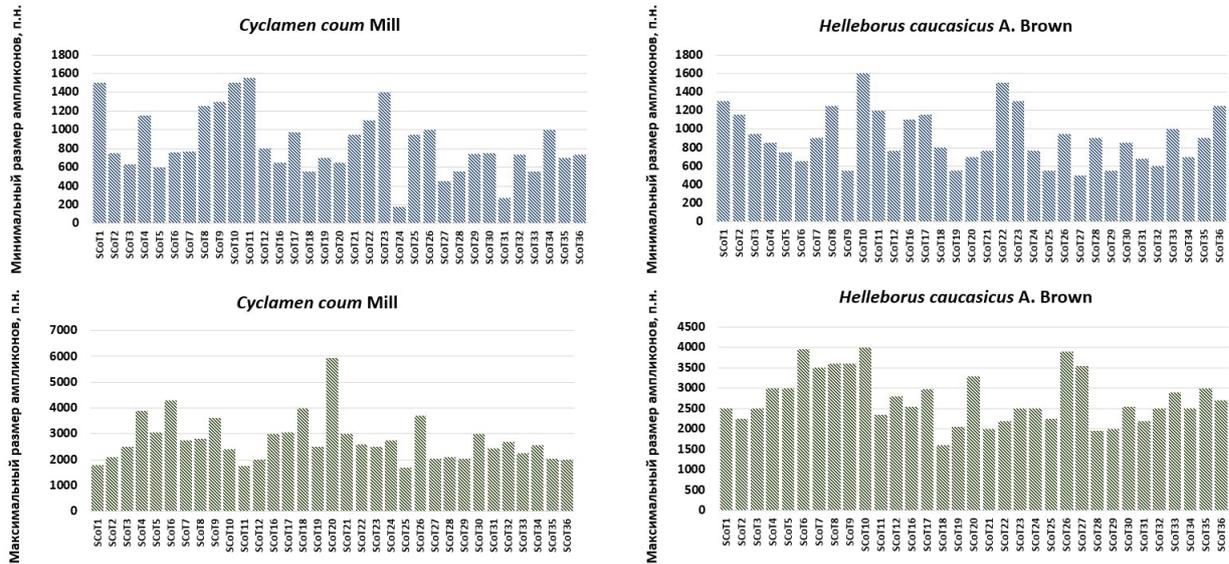


Рис. 3. Минимальный и максимальный размеры фрагментов ДНК (п. н.) *Cyclamen coum* и *Helleborus caucasicus*.

Среди образцов *Helleborus caucasicus* SCoT-праймеры генерировали 323 фрагмента в диапазоне от 4 (SCoT1, 22) до 20 (SCoT6), в среднем 9,8 полос на праймер. В то же время, размер амплифицированных продуктов варьировал от 0,5 (SCoT27) до 4 т. п. н. (SCoT10) (рис. 3). Для видов *Galanthus woronowii* и *Paeonia caucasica* SCoT-праймеры генерировали 294 и 283 ампликона соответственно. Диапазон количества фрагмен-

тов ДНК у *Galanthus woronowii* от 6 (SCoT21) до 15 (SCoT6, 27), у *Paeonia caucasica* от 3 (SCoT32) до 18 (SCoT6), в среднем для каждого вида 8,8 и 8,6 полос на праймер соответственно. Размер амплифицированных продуктов варьировал от 0,3 (SCoT31) до 4 т. п. н. (SCoT5) у *Galanthus woronowii* и от 0,21 (SCoT25) до 5 т. п. н. у *Paeonia caucasica* (SCoT32) (рис. 4).

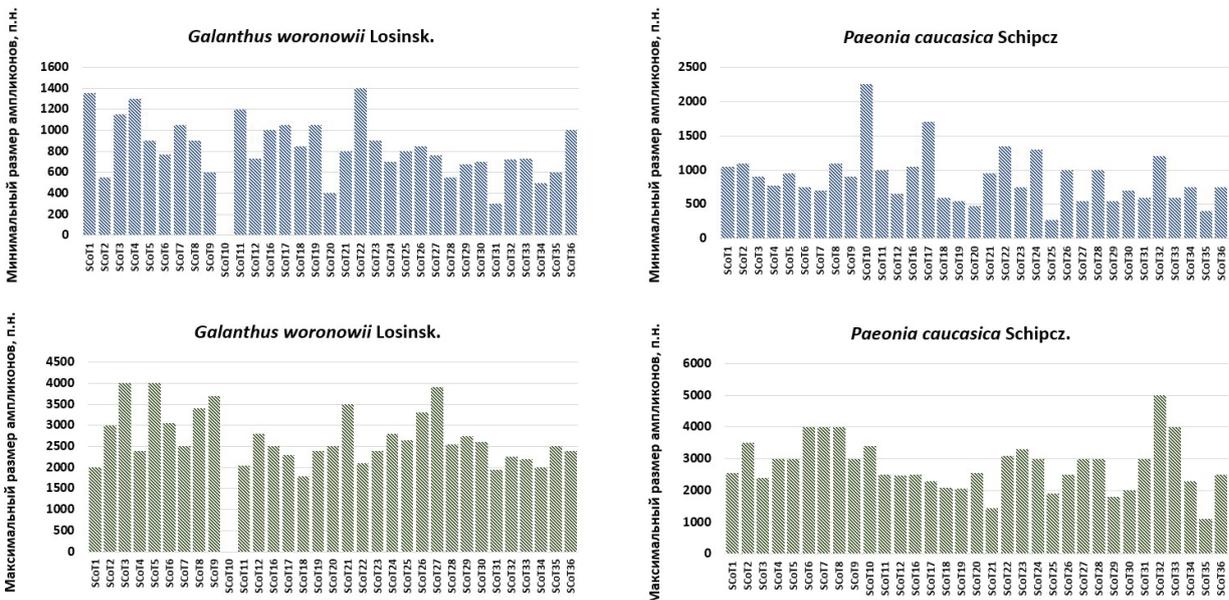


Рис. 4. Минимальный и максимальный размеры фрагментов ДНК (п. н.) *Galanthus woronowii* и *Paeonia caucasica*.

Изученные нами праймеры были распределены на два кластера по параметру полиморфизма (табл. 2). В первом кластере 16 SCoT-праймеров, показавших низкий уровень полиморфизма для большинства исследуемых видов. Среди них только SCoT17 показал достаточно высокий полиморфизм для *Helleborus caucasicus*. Во второй кластер вошли 17 SCoT-праймеров с высокими

значениями полиморфизма. Так, во втором кластере среднее значение полиморфизма для *Cyclamen coum* составило 50 %, от 18,2 (SCoT28) до 93,8 % (SCoT8), для *Helleborus caucasicus* – 42,6 %, от 12,5 (SCoT28) до 66,7 % (SCoT17), для *Galanthus woronowii* – 22,1 %, от 9,1 (SCoT26) до 77,8 % (SCoT7), для *Paeonia caucasica* – 27,2 %, от 10 (SCoT5) до 85,5 % (SCoT16).

Таблица 2

Полиморфизм SCoT-маркеров для исследуемых образцов

Группа	Маркер	Фрагменты ДНК				Полиморфизм, %			
		<i>Cyclamen</i>	<i>Helleborus</i>	<i>Galanthus</i>	<i>Paeonia</i>	<i>Cyclamen</i>	<i>Helleborus</i>	<i>Galanthus</i>	<i>Paeonia</i>
Кластер I	SCoT1	2	4	6	7	0	50	33,3	0
	SCoT22	4	4	7	5	0	0	28,6	0
	SCoT24	3	11	11	5	0	45,5	18,2	0
	SCoT11	3	8	8	5	0	50	25	0
	SCoT35	3	5	7	6	0	40	28,6	0
	SCoT36	3	9	10	6	0	33,3	50	0
	SCoT10	3	5	–	5	0	0	–	0
	SCoT21	5	6	5	4	0	0	0	0
	SCoT23	5	7	8	7	20	42,9	0	0
	SCoT18	5	6	6	7	0	33,3	33,3	14,3
	SCoT25	6	9	11	8	0	33,3	27,3	0
	SCoT2	6	5	10	10	0	20	0	20
	SCoT31	7	8	6	8	0	25	16,7	0
	SCoT4	8	15	8	9	25	46,7	12,5	0
	SCoT3	8	6	8	8	25	0	0	25
	SCoT17	9	9	6	4	0	66,7	0	0
Кластер II	SCoT19	9	11	6	13	22,2	54,5	0	23,1
	SCoT9	9	14	11	12	33,3	42,9	36,4	25
	SCoT27	9	15	15	10	22,2	46,7	40	50
	SCoT29	9	13	8	12	44,4	61,5	0	58,3
	SCoT12	10	8	10	8	50	25	0	0
	SCoT33	11	12	12	10	63,6	58,3	58,3	0
	SCoT28	11	8	11	6	18,2	12,5	0	16,7
	SCoT34	11	12	9	9	27,3	25	0	22,2
	SCoT30	12	14	10	9	66,7	64,3	40	0
	SCoT5	13	14	8	10	38,5	42,9	37,5	10
	SCoT32	14	8	9	3	21,4	25	11,1	0
	SCoT7	15	10	9	11	73,3	20	77,8	27,3
	SCoT8	16	8	9	12	93,8	62,5	11,1	25
	SCoT26	17	15	11	7	64,7	26,7	9,1	14,3
	SCoT20	18	13	13	15	44,4	46,2	0	66,7
	SCoT16	17	11	9	14	70,6	54,5	22	85,7
SCoT6	23	20	15	18	73,9	55	33,3	38,9	

Таким образом, эффективными маркерами, показавшими наибольшее среднее значение полиморфизма для всех видов растений, оказались SCoT16 (58,2 %), SCoT6 (50,3 %), SCoT7 (49,6 %), SCoT8 (48,1 %), SCoT30 (42,8 %), SCoT29 (41,1 %) и SCoT20 (39,3 %).

На рисунке 5 представлен анализ главных координат (РСоА), с помощью которого определены генетические дистанции между образцами каждого целевого вида из разных экологических мест произрастания (рис. 5).

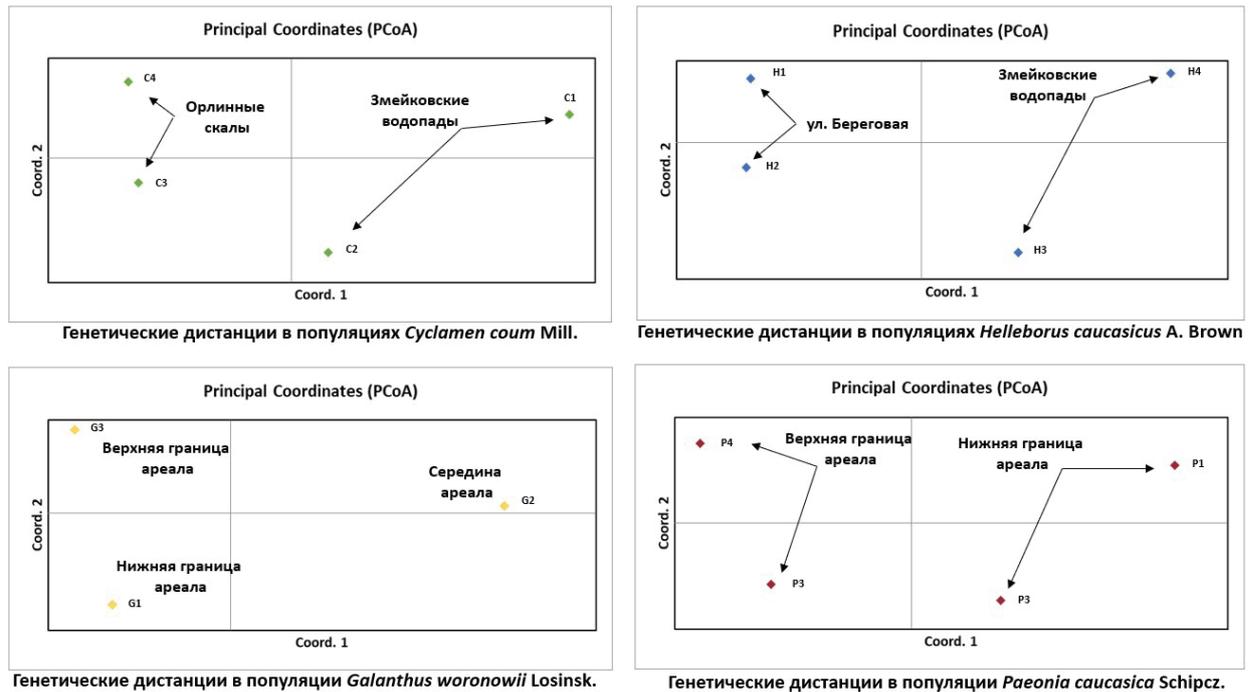


Рис. 5. Генетические дистанции в популяциях *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii*, *Paeonia caucasica* на основе SCoT праймеров.

Установлено, что образцы двух популяций *Cyclamen coum* (C1, C2 и C3, C4) генетически отдалены друг от друга, такие же результаты наблюдались и в образцах популяций *Helleborus caucasicus* (H1, H2 и H3, H4). На основе PcoA анализа также показано, что среди образцов *Galanthus woronowii* (G1, G2, G3) и *Paeonia caucasica* (P1, P2 и P3, P4), собранных в различных местах произрастания, также наблюдается генетическая дистантность.

Таким образом, система SCoT-маркеров эффективна для оценки внутривидового разнообразия целевых «краснокнижных» видов Западного Кавказа.

Обсуждение результатов

Маркеры SCoT ассоциированы с функциональными генами, поэтому первичный анализ полиморфизма SCoT-маркеров на различных видах растительных организмов имеет важное значение для таких целей, как селекция, характеристика зародышевой плазмы, изучение генетической стабильности и разнообразия различных культур и диких видов растений (Gorji et al., 2011; Xiong et al., 2011; Luo et al., 2012; Wu et al., 2013; Samarina et al., 2021, 2022). Изученные SCoT-маркеры не были ранее апробированы на целевых эндемичных видах растений природ-

ной флоры: *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii* и *Paeonia caucasica*, поэтому нами они впервые были использованы для оценки внутривидового разнообразия данных видов.

В нашей работе ряд SCoT-маркеров (SCoT6-8, SCoT16, SCoT20, SCoT29, SCoT30) показал высокий уровень полиморфизма, в среднем для всех исследуемых видов от 39,3 до 58,2 %. В исследовании O. Simsek общий уровень полиморфизма RAPD-праймеров составил 99,3 % для *Cyclamen*, а SRAP-праймеров – 100 % (Simsek et al., 2017). А в исследовании ISSR-праймеров на видах рода *Helleborus* полиморфизм был от 43,28 до 76,87 % (Fassou et al., 2020). Также полиморфизм для видов рода *Galanthus* составлял 12,3–19,5 %. В работе M. Y. Lim общий полиморфизм RAPD-праймеров для *Paeonia* составил 87,3 % (Lim et al., 2013). Стоит отметить, что исследования велись на различных видах одного рода, что способствовало выявить значительные генетические различия. Вместе с этим известно, что при изучении внутривидового полиморфизма на других видах растений, SCoT-маркеры показывают высокий полиморфизм, в диапазоне от 50 до 75 %. (Luo et al., 2012; Wu et al., 2013; Nath et al., 2015). Наши результаты согласуются с этими исследованиями и свидетельствуют об эффективности SCoT-маркеров для оценки внутривидовой изменчивости целевых видов.

В ряде исследований образцы, завезенные из близких географических локаций, формируют аналогичный генетический фон и обычно группируются в единый кластер (Hirano et al., 2010; Luo et al., 2012). Однако в результате анализа PCoA нами отмечены генетические дистанции между образцами внутри вида, что может быть связано с небольшой выборкой образцов. В дальнейшем планируется применение отобранных наиболее эффективных маркеров на расширенной выборке популяций.

Заключение

Наши результаты подтверждают актуальность и показывают эффективность SCoT-маркеров для оценки генетического разнообразия, характеристики и идентификации целевых видов природной флоры: *Cyclamen coum*, *Helleborus caucasicus*, *Galanthus woronowii* и *Paeonia caucasica*. Выявлены наиболее перспективные маркеры: SCoT6-8, SCoT16, SCoT20,

SCoT29, SCoT30. Полученные результаты актуальны для дальнейших генетических исследований, а также являются вспомогательным инструментом при разработке стратегии сохранения редких и исчезающих видов растений.

Благодарности

Авторы выражают особую благодарность к. б. н. Лидии Сергеевне Самариной (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Субтропический научный центр Российской академии наук», г. Сочи) за помощь в планировании опытов и обработке полученных данных.

Публикация подготовлена в рамках реализации ГЗ ФИЦ СЦЦ РАН № FGWR-2021-0008 «Разработка методов биотехнологии для целей сохранения генетических ресурсов субтропических, плодовых, декоративных культур и видов природной флоры как источников ценных признаков и селекционных исследований».

REFERENCES / ЛИТЕРАТУРА

- Altunkeyik H., Gülcemal D., Masullo M., Alankus-Caliskan O., Piacente S., Karayildirim T.** 2012. Triterpene saponins from *Cyclamen hederifolium*. *Phytochemistry* 73: 127–133. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.09.003
- Arif M., Zaidi N. W., Singh Y. P., Haq Q. M. R., Singh U. S.** 2009. A comparative analysis of ISSR and RAPD markers for study of genetic diversity in Shisham (*Dalbergia sissoo*). *Plant Mol. Biol. Rep.* 27(4): 488–495. DOI: 10.1007/s11105-009-0097-0
- Astapov M. B., Lozovoy S. P., Litvinskaya S. A.** 2017. Introduction. In: S. A. Litvinskaya (ex. ed.). *Krasnaya kniga Krasnodarskogo kraja. Rasteniya i griby* [Red Book of the Krasnodar Territory. Plants and Fungi]. Krasnodar: Administration of the Krasnodar Territory. 850 pp. [In Russian] (**Асманов М. Б., Лозовой С. П., Литвинская С. А.** Введение // Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы. Отв. Ред. С. А. Литвинская. 3-е изд. Краснодар: Администрация Краснодарского края, 2017. 850 с.).
- Bassarello C., Muzashvili T., Skhirtladze A., Kemertelidze E., Pizza C., Piacente S.** 2008. Steroidal glycosides from the underground parts of *Helleborus caucasicus*. *Phytochemistry* 69(5): 1227–1233. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.11.007
- Bokov D. O., Krasikova M. K., Sergunova E. V., Bobkova N. V., Kovaleva Tyu., Bondar A. A., Marakhova A. I., Morokhina S. L., Krasnyuk I. I., Moiseev D. V.** 2020. Pharmacognostic, phytochemical and ethnopharmacological potential of *Cyclamen coum* Mill. *Pharmacogn. J.* 12(1): 204–212. DOI: 10.5530/pj.2020.12.31
- Bokov D. O., Samylina I. A., Nikolov S. D.** 2017. Macroscopic and microscopic evaluation of *Galanthus woronowii* Losinsk. and *Galanthus nivalis* L. homeopathic crude herbal drugs. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 9(1): 58–64. DOI: 10.25258/ijpap.v9i1.8041
- Chukuridi S. S., Bakalov A. N.** 2009. The state of natural populations and features of cultivation in the culture of *Helleborus caucasicus* var. *flavor-guttatus* Br. and *Scopolia carniolica* Jacq. In: *Subtropicheskoye dekorativnoye sadovodstvo* [Subtropical ornamental gardening] 1(42): 188–192. [In Russian] (**Чукуруиди С. С., Бакалов А. Н.** Состояние естественных популяций и особенности выращивания в культуре морозника кавказского *Helleborus caucasicus* var. *flavor-guttatus* Br. и скополии карниолийской *Scopolia carniolica* Jacq. // Субтропическое декоративное садоводство, 2009. Т. 1(42). С. 188–192).
- Collard B. C. Y., Mackill D. J.** 2009. Start Codon Targeted (SCoT) Polymorphism: A simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* 27: 86–93. DOI: 10.1007/s11105-008-0060-5
- Dall’Acqua S., Castagliuolo I., Brun P., Ditadi F., Palù G., Innocenti G.** 2010. Triterpene glycosides with in vitro anti-inflammatory activity from *Cyclamen repandum* tubers. *Carbohydr. Res.* 345(5): 709–714. DOI: 10.1016/j.carres.2009.12.028

- Davis A. P.** 2006. The genus *Galanthus*-snowdrops in the wild. In: M. Bishop, A. P. Davis, J. Grimshaw (eds.). *Snowdrops, A Monograph of Cultivated Galanthus*. Cheltenham: Griffin Press Publishing Ltd. Pp. 9–63.
- Deng R. X., Yang X., Wang Y. X., Du M. Z., Hao X. T., Liu P.** 2018. Optimization of ultrasound-assisted extraction of monoterpene glycoside from oil Peony seed cake. *J. Food Sci.* 83(12): 2943–2953. DOI: 10.1111/1750-3841.14378
- Doyle J. J.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–15.
- Etminan A., Pour-Aboughadareh A., Mohammadi R., Ahmadi-Rad A., Noori A., Mahdavian Z., Moradi Z.** 2016. Applicability of start codon targeted (ScoT) and inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for genetic diversity analysis in durum wheat genotypes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 30: 1075–1081. DOI: 10.1080/13102818.2016.1228478
- Fassou G., Kougioumoutzis K., Iatrou G., Trigas P., Papasotiropoulos V.** 2020. Genetic diversity and range dynamics of *Helleborus odorus* subsp. *cyclophyllus* under different climate change scenarios. *Forests* 11(6): 620. DOI: 10.3390/f11060620
- Fomenko E. V., Postarnak Yu. A.** 2011. Comparative characteristics of morphological features and ontogeny of *Cyclamen coum* Mill. in the valleys of the rivers Psekups, Tuapse and Pshekha of the Krasnodar Territory. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk [Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences]* 13(5–2): 123–127. [In Russian] (Фоменко Е. В., Постарнак Ю. А. Сравнительная характеристика морфологических особенностей и онтогенеза *Cyclamen coum* Mill. в долинах рек Псекупс, Туапсе и Пшеха Краснодарского края // Известия Самарского научного центра Российской академии наук, 2011. № 13(5–2). С. 123–127).
- Genç N. Yıldız İ., Karan T., Eminagaoglu Ö., Erenler R.** 2019. Antioxidant activity and total phenolic contents of *Galanthus woronowii* (Amaryllidaceae). *Turk. J. Biod.* 2(1): 1–5.
- Gorji A. M., Poczai P., Polgar Z., Taller J.** 2011. Efficiency of arbitrarily amplified dominant markers (SCoT, ISSR and RAPD) for diagnostic fingerprinting in tetraploid potato. *Am J Potato Res* 88: 226–237. DOI: 10.1007/s12230-011-9187-2
- Gupta P. K., Rustgi S.** 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct. Integr. Geonomics* 4: 139–62. DOI: 10.1007/s10142-004-0107-0
- Gupta V., Jatav P. K., Haq S. U., Verma K. S., Kaul V. K., Kothari S. L., Kachhwaha, S.** 2019. Translation initiation codon (ATG) or SCoT markers-based polymorphism study within and across various *Capsicum* accessions: insight from their amplification, cross-transferability and genetic diversity. *J. Genet.* 98: 61. DOI: 10.1007/s12041-019-1095-0
- Hajibarat Z., Saidi A., Hajibarat Z., Talebi R.** 2015. Characterization of genetic diversity in chickpea using SSR markers, start codon targeted polymorphism (ScoT) and conserved DNA-derived polymorphism (CDDP). *Physiol. Mol. Biol. Plants* 21(3): 365–373. DOI: 10.1007/s12298-015-0306-2
- Hirano R., Htun O. T., Watanabe K. N.** 2010. Myanmar mango landraces reveal genetic uniqueness over common cultivars from Florida, India, and Southeast Asia. *Genome* 53: 321–330. DOI: 10.1139/g10-005
- Hou X., Wang J., Jia T., Zhang Y. Q., Hou J., Li J. J.** 2011. Orthogonal optimization of SCoT-PCR system and primer screening of tree peony. *Acta Agric. Bor. Sin.* 26(5): 92–96.
- Hou Y. C., Yan Z. H., Wei Y. M., Zheng Y. L.** 2005. Genetic diversity in barley from west China based on RAPD and ISSR analysis. *Barley Genet. Newsl.* 35(1): 9–22.
- Howes M.-J. R., Perry E.** 2011. The role of phytochemicals in the treatment and prevention of dementia. *Drugs Aging* 28: 439–468. DOI: 10.2165/11591310-000000000-00000
- Ishizaka H., Yamada H., Sasaki K.** 2002. Volatile compounds in the flowers of *Cyclamen persicum*, *C. purpurascens* and their hybrids. *Sci. Hort.* 94(1–2): 125–135. DOI: 10.1016/S0304-4238(01)00362-4
- Ivanova A., Delcheva I., Tsvetkova I., Kujumgiev A., Kostova I.** 2002. GC-MS analysis and anti-microbial activity of acidic fractions obtained from *Paeonia peregrina* and *Paeonia tenuifolia* roots. *Z. Naturforsch.* 57(7–8): 624–628. DOI: 10.1515/znc-2002-7-813
- Jin Z.** 2013. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* 30: 849–868. DOI: 10.1039/C3NP70005D
- Karimi E., Jaafar H. Z. E., Aziz M. A., Taheri S., AzadiGonbad R.** 2014. Genetic relationship among *Labisia pumila* (Myrsinaceae) species based on ISSR-PCR. *Genet. Mol. Res.* 13: 3301–3309. DOI: 10.4238/2014.April.29.8
- Kress W. J., Erickson D. L.** 2012. DNA barcodes: methods and protocols. *Methods Mol. Biol.* 858: 3–8. DOI: 10.1007/978-1-61779-591-6_1
- Lim M. Y., Jana S., Sivanesan I., Park H. R., Hwang J. H., Park Y. H., Jeong B. R.** 2013. Analysis of genetic variability using RAPD markers in *Paeonia* spp. Grown in Korea. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 31(3): 322–327. DOI: 10.7235/hort.2013.12210
- Litvinskaya S. A.** 2008. *Cyclamen coum*. In: L. V. Bardunov, V. S. Novikov (eds.). *Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii (rasteniya i griby) [Red Data Book of Russian Federation (plants and fungi)]*. Moscow: KMK Scientific Press Ltd. Pp. 462–463. [In Russian] (Литвинская С. А. Цикламен кавказский // Красная книга Российской Федерации. Растения и грибы. Под ред. Л. В. Бардунова, В. С. Новикова. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. С. 462–463).

- Litvinskaya S. A.** 2017. *Helleborus caucasicus*. In: S. A. Litvinskaya (ex. ed.). *Krasnaya kniga Krasnodarskogo kraja. Rasteniya i griby* [Red Book of the Krasnodar Territory. Plants and Fungi]. Krasnodar: Administration of the Krasnodar Territory. Pp. 151–153. [In Russian] (**Литвинская С. А.** Зимовник кавказский. // Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы. Отв. ред. С. А. Литвинская. 3-е изд. Краснодар: Администрация Краснодарского края, 2017. С. 151–153).
- Litvinskaya S. A.** 2017. *Paeonia caucasica*. In: S. A. Litvinskaya (ex. ed.). *Krasnaya kniga Krasnodarskogo kraja. Rasteniya i griby* [Red Book of the Krasnodar Territory. Plants and Fungi]. Krasnodar: Administration of the Krasnodar Territory. Pp. 185–186. [In Russian] (**Литвинская С. А.** Пион кавказский // Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы. Отв. ред. С. А. Литвинская. 3-е изд. Краснодар: Администрация Краснодарского края, 2017. С. 185–186).
- Luchkina M. A.** 2010. Comparative ontogenic analysis of *Cyclamen coum* Mill. and *Cyclamen kuznetzovii* Kotov et Czernov. *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 65: 84–89. DOI: 10.3103/S0096392510020094
- Luo C., He X.-H., Chen H., Hu Y. and Ou S.-J.** 2012. Genetic relationship and diversity of *Mangifera indica* L., revealed through ScoT analysis. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 59: 1505–1515.
- Malyarovskaya V. I., Samarina L. S., Rahmangulov R. S., Koninskaya N. G.** 2018. Study of micropropagation stages of *Galánthus woronowii* Losinsk. *Plodovodstvo i yagodovodstvo Rossii* [Fruit growing and berry growing in Russia] 55: 71–77. [In Russian] (**Маляровская В. И., Самарина Л. С., Рахмангулов Р. С., Конинская Н. Г.** Изучение этапов микроразмножения *Galánthus woronowii* Losinsk. // Плодоводство и ягодоводство России, 2018. № 55. С. 71–77). DOI: 10.31676/2073-4948-2018-55-71-77
- Marker Efficiency Calculator.** [2021] URL: <https://irscope.shinyapps.io/iMEC/> (Accessed 08 September 2021).
- Martins M., Sarmiento D., Oliveira M. M.** 2004. Genetic stability of micropropagated almond plantlets, as assessed by RAPD and ISSR markers. *Plant Cell Rep.* 23(7): 492–496. DOI: 10.1007/s00299-004-0870-3
- Martucciello S., Paoletta G., Muzashvili T., Skhirtladze A., Pizza C., Caputo I., Piacente S.** 2018. Steroids from *Helleborus caucasicus* reduce cancer cell viability inducing apoptosis and GRP78 down-regulation. *Chem. Biol. Interact.* 279: 43–50. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.11.002
- Mikheev A. D.** 2008. *Galánthus woronowii*. In: L. V. Bardunov, V. S. Novikov (eds.). *Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii (rasteniya i griby)* [Red Data Book of Russian Federation (plants and fungi)]. Moscow: KMK Scientific Press Ltd. Pp. 54–55. [In Russian] (**Мухеев А. Д.** Подснежник Воронова // Красная книга Российской Федерации. Растения и грибы. Под ред. Л. В. Бардунова, В. С. Новикова. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. С. 54–55).
- Mikheev A. D.** 2008. *Paeonia caucasica*. In: L. V. Bardunov, V. S. Novikov (eds.). *Krasnaya kniga Rossiyskoy Federatsii (rasteniya i griby)* [Red Data Book of Russian Federation (plants and fungi)]. Moscow: KMK Scientific Press Ltd. Pp. 422–423. [In Russian] (**Мухеев А. Д.** Пион кавказский // Красная книга Российской Федерации. Растения и грибы. Под ред. Л. В. Бардунова, В. С. Новикова. М.: Тов-во науч. изд. КМК, 2008. С. 422–423).
- Mukherjee A., Sikdar B., Ghosh B., Banerjee A., Ghosh E., Bhattacharya M., Roy S. C.** 2013. RAPD and ISSR analysis of some economically important species, varieties, and cultivars of the genus *Allium* (Alliaceae). *Turk. J. Bot.* 37(4): 605–618. DOI: 10.3906/bot-1208-18
- Muzashvili T., Skhirtladze A., Sulakvelidze T., Benidze M., Mshviladze V., Legault J., Pichette A., Kemertelidze E.** 2006. Cytotoxic activity of *Helleborus caucasicus* A. Br. *Georg. Chem. J.* 6: 684–685.
- Naderi R., Alaey M., Khalighi A., Hassani M. E., Salami S. A.** 2009. Inter- and intra-specific genetic diversity among cyclamen accessions investigated by RAPD markers. *Sci. Hort.* 122(4): 658–661. DOI: 10.1016/j.scienta.2009.06.020
- Nath V. S., Hegde V. M., Jeeva M. L., Misra R. S., Veena S. S., Raj M., Nair S. S. D.** 2015. Genetic diversity of *Phytophthora colocasiae* causing taro leaf blight, analysis using start codon targeted (SCoT) polymorphism. *J. Root Crops* 39: 168–177.
- Öztürk D.** 2020. *Cyclamen coum* subsp. *coum* Miller (Primulaceae/Çuhaçiçeğigiller) Taksonunun Anatomik, Mikromorfolojik ve Palinolojik Karakterlerinin İncelenmesi. *SDÜ Fen. Bil. Enst. Der.* 24(2): 281–288. DOI: 10.19113/sdufenbed.652819
- Parker S. May B., Zhang C., Zhang A. L., Lu C., Xue C. C.** 2016. A pharmacological review of bioactive constituents of *Paeonia lactiflora* Pallas and *Paeonia veitchii* Lynch. *Phytother. Res.* 30(9): 1445–1473. DOI: 10.1002/ptr.5653
- Peakall R., Smouse P. E.** 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol. Ecol. Notes* 6: 288–295. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Peakall R., Smouse P. E.** 2012. GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics* 28: 2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Prange A. N. S., Serek M., Bartsch M., Winkelmann T.** 2010. Efficient and stable regeneration from protoplasts of *Cyclamen coum* Miller via somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 101, 2: 171–182. DOI: 10.1007/s11240-010-9674-z
- Rahbek C., Borregaard M. K., Antonelli A., Colwell R. K., Holt B. G., Noguez-Bravo D., Rasmussen C. M., Richardson K., Rosing M. T., Whittaker R. J., Fjeldså J.** 2019. Building Mountain biodiversity: Geological and evolutionary processes. *Science* 365(6458): 1114–1119. DOI: 10.1126/science.aax0151

Samarina L. S., Malyarovskaya V. I., Reim S., Yakushina L. G., Koninskaya N. G., Klemeshova K. V. Shkhalakhova R. M., Matskiv A. O., Shurkina E. S., Gabueva T. Y., Slepchenko N. A., Ryndin A. V. 2021. Transferability of ISSR, SCoT and SSR markers for *Chrysanthemum × morifolium* Ramat and genetic relationships among commercial Russian cultivars. *Plants* 10(7): 1302. DOI: 10.3390/plants10071302

Samarina L. S., Matskiv A. O., Shkhalakhova R. M., Koninskaya N. G., Hanke M.-V., Flachowsky H., Shumeev A. N., Manakhova K. A., Malyukova L. S., Liu S., Zhu J., Gvasaliya M. V., Malyarovskaya V. I., Ryndin A. V., Pchikhahev E. K., Reim S. 2022. Genetic diversity and genome size variability in the Russian genebank collection of Tea plant [*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze]. *Front. Plant Sci.* 12: 800141. DOI: 10.3389/fpls.2021.800141

Sarikaya B. B., Kaya G. I., Onur M. A., Bastida J., Somer N. U. 2013. Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*. *Biochem. Syst. Ecol.* 51: 276–279.

Satya P., Karan M., Jana S., Mitra S., Sharma A., Karmakar P. G., Ray D. P. 2015. Start codon targeted (SCoT) polymorphism reveals genetic diversity in wild and domesticated populations of ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaudich.), a premium textile fiber producing species. *Meta gene* 3: 62–70. DOI: 10.1016/j.mgene.2015.01.003

Shumkova O. A., Krivorotov S. B., Bukareva O. V., Arkhipov R. A. 2019. To the study of the distribution of protected plants in the North-Western Caucasus. In: *Vestnik Tverskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya Biologiya i ekologiya* [Bulletin of Tver State University. Series Biology and Ecology] 3: 55. [In Russian] (**Шумкова О. А., Криворотов С. Б., Букарева О. В., Архипов Р. А.** К изучению распространения охраняемых растений на Северо-Западном Кавказе // Вестник Тверского государственного университета. Серия Биология и экология, 2019. № 3. С. 55). DOI: 10.26456/vtbio111

Simsek O., Curuk P., Aslan F., Bayramoglu M., Izgu T., da Silva J. A T., Kacar Y. A., Mendi Y. Y. 2017. Molecular characterization of *Cyclamen* species collected from different parts of Turkey by RAPD and SRAP markers. *Biochem. Genet.* 55(1): 87–102. DOI: 10.1007/s10528-016-9770-9

Son J. H., Park K. C., Lee S. I., Kim J. H., Kim N. S. 2012. Species relationships among *Allium* species by ISSR analysis. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 53(3): 256–262. DOI: 10.1007/s13580-012-0130-3

Suprun I. I., Stepanov I. V., Slepchenko N. A., Malyarovskaya V. I., Kolomiec T. M., Samarina L. S. 2017. Approximation of ISSR DNA markers for genotyping of the species *Galanthus woronowii* Losinsk. and analysis of the genetic stability of plants obtained in culture in vitro. *Politematicheskij setevoy elektronnyy nauchnyy zhurnal Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Polythematic network electronic scientific journal of the Kuban State Agrarian University]. 133: 1166–1178. [In Russian] (**Супрун И. И., Степанов И. В., Слещенко Н. А., Мальяровская В. И., Колomieц Т. М., Самарина Л. С.** Апробация ISSR ДНК-маркеров для генотипирования вида *Galanthus woronowii* Losinsk. и анализ генетической стабильности растений, полученных в культуре *in vitro* // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета, 2017. № 133. С. 1166–1178). DOI: 10.21515/1990-4665-133-088

Timukhin I. N. 2006. Flora of vascular plants of the Sochi National Park. In: *Inventarizatsiya osnovnykh taksonomicheskikh grupp i soobshchestv, sozologicheskiye issledovaniya Sochinskogo natsionalnogo parka – pervyye itogi raboty pervogo natsionalnogo parka Rossii* [Inventory of the main taxonomic groups and communities, zoological studies of the Sochi National Park – the first results of the first national park in Russia]. Vol. 2. Sochi. Pp. 41–84. [In Russian] (**Тимухин И. Н.** Флора сосудистых растений Сочинского национального парка // Инвентаризация основных таксономических групп и сообществ, созологические исследования Сочинского национального парка – первые итоги первого в России национального парка. № 2. Сочи, 2006. С. 41–84).

Timukhin I. N., Tuniev B. S. 2017. *Cyclamen coum*. In: S. A. Litvinskaya (ex. ed.). *Krasnaya kniga Krasnodarskogo kraja. Rasteniya i griby* [Red Book of the Krasnodar Territory. Plants and Fungi]. Krasnodar: Administration of the Krasnodar Territory. Pp. 225–227. [In Russian] (**Тимухин И. Н., Туниев Б. С.** Цикламен кавказский // Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы. Отв. ред. С. А. Литвинская. 3-е изд. Краснодар: Администрация Краснодарского края, 2017. С. 225–227).

Timukhin I. N., Tuniev B. S. 2017. *Galanthus woronowii*. In: S. A. Litvinskaya (ex. ed.). *Krasnaya kniga Krasnodarskogo kraja. Rasteniya i griby* [Red Book of the Krasnodar Territory. Plants and Fungi]. Krasnodar: Administration of the Krasnodar Territory. Pp. 454–455. [In Russian] (**Тимухин И. Н., Туниев Б. С.** Подснежник Воронова // Красная книга Краснодарского края. Растения и грибы. Отв. ред. С. А. Литвинская. 3-е изд. Краснодар: Администрация Краснодарского края, 2017. С. 454–455).

Ukhova M. O., Litvinskaya S. A. 2019. Dantovo Gorge as a potential area of special conservation importance within the Emerald Network of European Russia. In: *Ekologo-geograficheskiye problemy regionov Rossii* [Ecological and geographical problems of Russian regions: materials of the X All-Russian scientific and practical conference with international participation, dedicated to the 100th anniversary of the birth of Professor V. I. Prokayev and the 90th anniversary of the Faculty of Natural Geography of SGSPU]. Samara. Pp. 90–92. [In Russian] (**Ухова М. О., Литвинская С. А.** Дантово ущелье как потенциальная территория особого природоохранного значения в рамках Изумрудной сети Европейской России // Эколого-географические проблемы регионов России: материалы X всерос. науч.-

практ. конф. с междунар. участием, посвящ. 100-летию со дня рождения д. г. н., профессора В. И. Прокаева и 90-летию естественно-географического факультета СГСПУ. Самара, 2019. С. 90–92).

Vahrusheva L. P., Ena A. V., Boldyrev E. V. 2009. *Cyclamen coum* in the Crimea: assessment of morphological criteria for species belonging to age conditions. *Ekosistemy [Ecosystems]* 1(20): 74–81. [In Russian] (**Вахрушева Л. П., Ена А. В., Болдырев Е. В.** *Сyclamen coum* в Крыму: оценка морфологических критериев видовой принадлежности возрастных состояний // Экосистемы, 2009. № 1(20). С. 74–81).

Wu J.-M., Li Y.-R., Yang L.-T., Fang F.-X., Song H.-z., Tang H.-Q., Wang M., Weng M.-L. 2013. cDNA-SCot, a novel rapid method for analysis of gene differential expression in sugarcane and other plants. *Aust. J. Crop Sci.* 7: 659.

Wu S. H., Wu D. G., Chen Y. W. 2010. Chemical constituents and bioactivities of plants from the genus *Paeonia*. *Chem. Biodivers.* 7(1): 90–104. DOI: 10.1002/cbdv.200800148

Xiong F. Q., Zhong R. C., Han Z. Q., Jiang J., He L. Q., Zhuang W. J., Tang R. H. 2011. Start codon targeted polymorphism for evaluation of functional genetic variation and relationships in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. *Mol. Biol. Rep.* 38: 3487–3494. DOI: 10.1007/s11033-010-0459-6

Yang S., Shi S., Gong X., Zhou R. 2005. Genetic diversity of *Paeonia delavayi* as revealed by ISSRs. *Biodiv. Sci.* 13(2): 105–111. DOI: 10.1360/biodiv.040179

Zubov D. A., Kashevarov G. P., Didenko S. Ya., Blyum O. B. 2011. The DNA polymorphism analysis of introduced *Galanthus* L. species (Amaryllidaceae J. St.-Hil.) using RAPD markers. *Plant Introduction* 52(4): 53–61. [In Russian] (**Зубов Д. А., Кашеваров Г. П., Диденко С. Я., Блюм О. Б.** Анализ ДНК-полиморфизма интродуцированных видов рода *Galanthus* L. (Amaryllidaceae J. St.-Hil.) с помощью RAPD-маркеров // Интродукция растений, 2011. № 52(4). С. 53–61). DOI: 10.5281/zenodo.2544348