

ISSN 1029-8940 (Print)

ISSN 2524-230X (Online)

УДК 582.581:581.15:575.22.015-025.25

<https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-2-223-231>

Поступила в редакцию 03.08.2020

Received 03.08.2020

Н. В. Самохвалова, А. В. Кручонок, Б. Ю. Аношенко, В. В. Титок

Центральный ботанический сад НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ БЕЛОРУССКИХ ПОПУЛЯЦИЙ ОФРИС НАСЕКОМОНОСНОЙ (*OPHRYS INSECTIFERA* L.) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОЛЕКУЛЯРНЫХ iPBS-МАРКЕРОВ

Аннотация. Проведен анализ генетической гетерогенности двух популяций офрис насекомоносной (*Ophrys insectifera* L.), произрастающих в Лепельском районе (Березинский биосферный заповедник) и в Ушачском районе (окрестности д. Веркуды). Вид имеет I категорию охраны (CR – критическая угроза исчезновения). Результаты, полученные с помощью использования iPBS-маркеров, показали, что у популяции из д. Веркуды более высокий уровень генетической гетерогенности, чем у популяции из Березинского биосферного заповедника. Анализ молекулярной варiances (AMOVA) показал, что основная доля генетической изменчивости является внутривидовой (64 %). Определен коэффициент генетической дифференциации популяций ($G_{st} = 0,26$). Анализ главных координат (PCoA) выявил две группы, которые совпадали с природными популяциями, и подтвердил большую генетическую гетерогенность у популяции из д. Веркуды.

Ключевые слова: молекулярные iPBS-маркеры, *Ophrys insectifera* L., ретротранспозоны, генетическое разнообразие, мобильные генетические элементы, ДНК, ПЦР, AMOVA, PCoA

Для цитирования: Оценка генетической изменчивости белорусских популяций офрис насекомоносной (*Ophrys insectifera* L.) с использованием молекулярных iPBS-маркеров / Н. В. Самохвалова [и др.] // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2021. – Т. 66, № 2. – С. 223–231. <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-2-223-231>

Natalia V. Samokhvalova, Alesia V. Kruchonok, Boris Yu. Anoshenko, Vladimir V. Titok

Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus

EVALUATION OF THE GENETIC VARIABILITY OF *OPHRYS INSECTIFERA* L. POPULATIONS GROWING IN BELARUS USING MOLECULAR iPBS MARKERS

Abstract. An analysis of genetic heterogeneity was performed for two populations of *Ophrys insectifera* L. located in the Berezinsky Biosphere Reserve and the Verkudy village. The species are critically endangered (CR). The analysis of data obtained using iPBS markers detected the higher risk of extinction of the population in the Berezinsky Biosphere Reserve than the population from the Verkudy village, since the level of population genetic heterogeneity from the Verkudy is higher compared to the Berezinsky Biosphere Reserve. Molecular variance analysis (AMOVA) and other parameters of genetic variation showed the major fraction of intrapopulation variation (64 %, $G_{st} = 0.26$). Principal Coordinates Analysis (PCoA) revealed two groups that coincided with natural populations, and confirmed a larger genetic heterogeneity in the population from the Verkudy.

Keywords: Molecular iPBS markers, *Ophrys insectifera* L., retrotransposons, genetic diversity, mobile genetic elements, DNA, PCR, AMOVA, PCoA

For citation: Samokhvalova N. V., Kruchonok A. V., Anoshenko B. Yu., Titok V. V. Evaluation of the genetic variability of *Ophrys insectifera* L. populations growing in Belarus using molecular iPBS markers. *Vesti Natsyonal'nai akademii nauk Belarusi. Seriya biyalagichnykh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological series*, 2021, vol. 66, no. 2, pp. 223–231 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1029-8940-2021-66-2-223-231>

Введение. Национальные генетические ресурсы растений как один из основных компонентов биоразнообразия являются основой экологической безопасности страны. Негативная трансформация природных экосистем сопровождается стремительным обеднением видового состава растительных сообществ. Первыми на деструктивные изменения реагируют редкие виды растений, так как у больших популяций больше шансов на самовосстановление и самоподдержание [1].

Оценку генетического разнообразия и структуры популяций растений проводили с использованием молекулярных маркеров. Эти маркеры надежны, информативны и могут быть использованы на разных стадиях развития растения [2]. Изучение уровня и структуры генетическо-

го разнообразия природных популяций вида важно для сохранения генетических ресурсов. Основная задача популяционной генетики состоит в том, чтобы исследовать распределение и динамическое изменение частот аллелей на уровне популяции, которые вызваны эволюционными процессами и техногенными событиями. Для всестороннего решения этих задач были разработаны различные математические модели. Информация о генетическом разнообразии дает представление об эволюционной истории вида [3], что определяет выбор стратегии управления численностью популяций и методов ее осуществления [4].

Цель данного исследования – оценить внутри- и межпопуляционную генетическую изменчивость обнаруженных в Беларуси популяций *Ophrys insectifera* L. с использованием молекулярных iPBS-маркеров.

Объекты и методы исследования. Офрис насекомоносная (*Ophrys insectifera* L.) – реликтовый европейско-средиземноморский вид, существующий в Беларуси в отдельных локалитетах за восточной границей ареала и находящийся на грани исчезновения (I категория охраны – CR). Охраняется также в России, Украине, Эстонии, Литве и Латвии. Включен в Приложение II к Конвенции СИТЕС. В Беларуси известно два места произрастания.

Офрис насекомоносная – многолетнее травянистое растение высотой 15–35 см, с небольшими шаровидными или продолговатыми клубнями. Цветки небольшие, напоминают насекомое (осу), собраны в редкое колосовидное соцветие. Завязь слабо скрученная. Плод – эллипсоидальная коробочка с многочисленными семенами. Произрастает на сыроватых и заболоченных лугах, моховых ключевых и осоковых болотах. Предпочитает карбонатные почвы. Цветет в июне–июле, плодоносит в июле–августе. Энтомофил. Размножение семенное, крайне редко – вегетативное. Анемохор. Семена мелкие, прорастают только в присутствии микоризного гриба. Отличается оригинальным процессом опыления – путем псевдокопуляции. Считается, что для привлечения насекомых растение выделяет летучие вещества, идентичные половым феромонам определенных видов роющих ос. Самцы принимают цветки офриса за своих самок и пытаются осуществить с ними копуляцию. В результате насекомое, как правило, задевает клейкие поллинии и переносит их на своем теле к следующему цветку, осуществляя тем самым опыление [5].

В Беларуси этот вид впервые был обнаружен в 2009 г. в Березинском биосферном заповеднике (ББЗ) на восточной границе болота «Чистик» [6]. Представлен несколькими локалитетами, один из которых является пунктом постоянного наблюдения в системе мониторинга растительного мира МРМ-КК-Вм-5. Вторая популяция обнаружена в 2015 г. в окрестностях д. Веркуды (Ушачский район, Витебская область). Численность этой популяции на момент находки достигала 1000 экземпляров, однако из-за расположения в непосредственной близости от дороги подвергалась риску быть вытесненной инвазионными видами. Оба места произрастания располагаются на территориях, относящихся к редким биотопам с высоким уровнем видового разнообразия [7].

Этот вид находится под угрозой исчезновения из-за деградации среды обитания, которое принимает несколько форм: осушение болот, зарастание лугов, снижение уровня лесного хозяйства и вытеснение инвазионными видами. К тому же *O. insectifera* находится в очень тесной связи со своими опылителями, и реализация его генеративного потенциала напрямую зависит от стабильности популяций роющих ос. Этот вид подвержен также негативным воздействиям, вызванным аридизацией климата [8]. Вероятно, в ближайшее время возникнет необходимость в природоохранных мероприятиях, направленных на резервирование и восстановление популяций этого вида. Авторы данного исследования попытались дать ответы на вопросы, касающиеся выбора стратегии сохранения его популяций.

Для исследования генетической структуры популяций *O. insectifera* выделяли ДНК из предварительно высушенных в силикагеле листьев СТАВ-методом [9]. С помощью спектрофотометра NanoPhotometer (Pearl Implen GmbH, Германия) проверяли качество выделенной ДНК и определяли количество нуклеиновых кислот и белков в образце на основе их оптической плотности при длинах волн 260 и 280 нм соответственно. В исходных выборках соотношение 260/280 варьировалось от 1,8 до 2,16, а соотношение 260/230 – от 0,83 до 2,32. Образцы с низким показателем соотношения 260/230 были дополнительно очищены с использованием 0,7 %-ного СТАВ-буфера.

Для определения уровня генетического разнообразия популяций *O. insectifera* применяли iPBS (inter primer binding site amplification) молекулярные маркеры. Метод iPBS основан на использовании ретровирусами и LTR-ретротранспозонами клеточных тРНК в качестве праймеров для обратной транскрипции во время циклов их репликации. тРНК присоединяется к сайту связывания праймеров (PBS), смежным с 5'LTR, и синтезирует простые кДНК минус-цепи с помощью обратной транскриптазы. Продукт ПЦР содержит последовательности как LTR, так и PBS вместе с геномной ДНК между двумя LTR. Метод iPBS универсален и обладает рядом преимуществ, так как не требует предварительных знаний о последовательности LTR [10], а мишенями для праймеров могут служить фактически все ретротранспозоны. Для видовой и внутривидовой идентификации и анализа необходим небольшой набор праймеров, а использование простых аналитических систем для ретротранспозонных маркеров увеличивает преимущество данного метода [11].

В исследовании использовали праймеры, предложенные R. Kalendar с соавт. [11] (табл. 1). ПЦР проводили в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 25–50 нг ДНК, 5 мкл готовой смеси для ПЦР ScreenMix («Евроген», Россия), 1 мМ праймера для 12–13 п. н. праймеров или 0,6 мМ для 18 п. н. праймеров, и воды. Рекомендованная программа ПЦР включала: 1 цикл при 95 °С в течение 3 мин; 28–30 циклов при 95 °С в течение 15 с, при 50–60 °С (в зависимости от праймера) и при 68 °С (по 60 с); финальную элонгацию при 72 °С в течение 5 мин [11]. Амплификацию проводили в программируемом терморегуляторе C1000 Touch Thermal Cycler (MJ Research Inc., Bio-Rad Laboratories, США), электрофорез – в 2 %-ном агарозном геле в течение 4,5 ч при напряжении 55 В. Окрашивание геля осуществляли бромидом этидия в течение 30 мин и визуализировали с помощью системы UV Imager Gel Doc XR+ (Bio-Rad, США).

Т а б л и ц а 1. Праймеры, используемые в исследовании

Table 1. Primers used in the study

Праймер	Оптимальная температура отжига, °С	Последовательность (5'–3')
2074	49,6	GCTCTGATACCA
2389	50,0	ACATCCTTCCCA
2373	51,0	GAACCTTGCTCCGATGCCA
2277	52,0	GGCGATGATACCA
2376	52,0	TAGATGGCACCA
2375	52,5	TCGCATCAACCA
2377	53,0	ACGAAGGGACCA
2378	53,0	GGTCCTCATCCA
2383	53,0	GCATGGCCTCCA
2374	53,5	CCCAGCAAACCA
2095	53,7	GCTCGGATACCA
2083	54,6	CTTCTAGCGCCA
2237	55,0	CCCCTACCTGGCGTGCCA
2239	55,0	ACCTAGGCTCGGATGCCA
2272	55,0	GGCTCAGATGCCA
2077	55,1	CTCACGATGCCA
2232	55,4	AGAGAGGCTCGGATACCA
2390	56,4	GCAACAACCCCA
2273	56,5	GCTCATCATGCCA
2394	56,5	GAGCCTAGGCCA
2220	57,0	ACCTGGCTCATGATGCCA
2242	57,0	GCCCCATGGTGGGCGCCA
2076	59,2	GCTCCGATGCCA
2271	60,0	GGCTCGGATGCCA
2415	61,0	CATCGTAGGTGGGCGCCA
2078	62,8	GCGGAGTCGCCA
2080	63,3	CAGACGGCGCCA
2081	65,0	GCAACGGCGCCA
2270	65,0	ACCTGGCGTGCCA

Для дальнейшего изучения межпопуляционных различий из 30 протестированных праймеров (табл. 1) было отобрано два – 2076 и 2390. Использование этих праймеров позволило получить четкие ампликоны ДНК с полиморфными локусами, оптимизировать условия проведения ПЦР и провести анализ генетической гетерогенности исследованных популяций. В результате конечная программа ПЦР включала: 1 цикл при 95 °С в течение 5 мин; 34 цикла при 95 °С в течение 15 с, для маркера 2076 – при 54 °С, для маркера 2390 – при 53 и 68 °С (по 60 с); финальную элонгацию при 72 °С в течение 5 мин.

Для построения двоичной матрицы на основе данных электрофореза использовали программу PyElph 1.4. Все полосы электрофореза, которые можно точно распознать, оценивали как присутствующие (1) или отсутствующие (0) и рассматривали как единичные доминантные локусы. Полученные данные регистрировали в виде бинарной матрицы, которую затем обрабатывали с помощью программы PopGene 1.31 для расчета таких параметров, как доля полиморфных локусов (P), эффективное (N_e) и наблюдаемое число аллелей (N_a), информационный индекс Шеннона (I) генетическое разнообразие Нея (H_e), общее разнообразие генов (H_t), разнообразие генов в популяциях (H_s), коэффициент генетической дифференциации ($G_{st} = [H_t - H_s]/H_t$) и поток генов в популяциях (N_m). Эти параметры были выбраны как наиболее подходящие для анализа результатов, полученных с использованием доминантных молекулярных маркеров [12]. Для расчета величины информационного полиморфизма (PIC) и среднего генетического расстояния, проведения анализа молекулярной вариансы (AMOVA) и главных координат (PCoA) использовали пакет программ GenALEx 6.5.

Результаты и их обсуждение. На рис. 1 представлены результаты электрофореза для популяции из ББЗ с использованием iPBS-праймера 2076, применение которых позволило построить бинарную матрицу генетических расстояний.

Для исследуемых iPBS-маркеров установлены такие показатели, как количество полиморфных локусов, их доля и PIC (табл. 2).

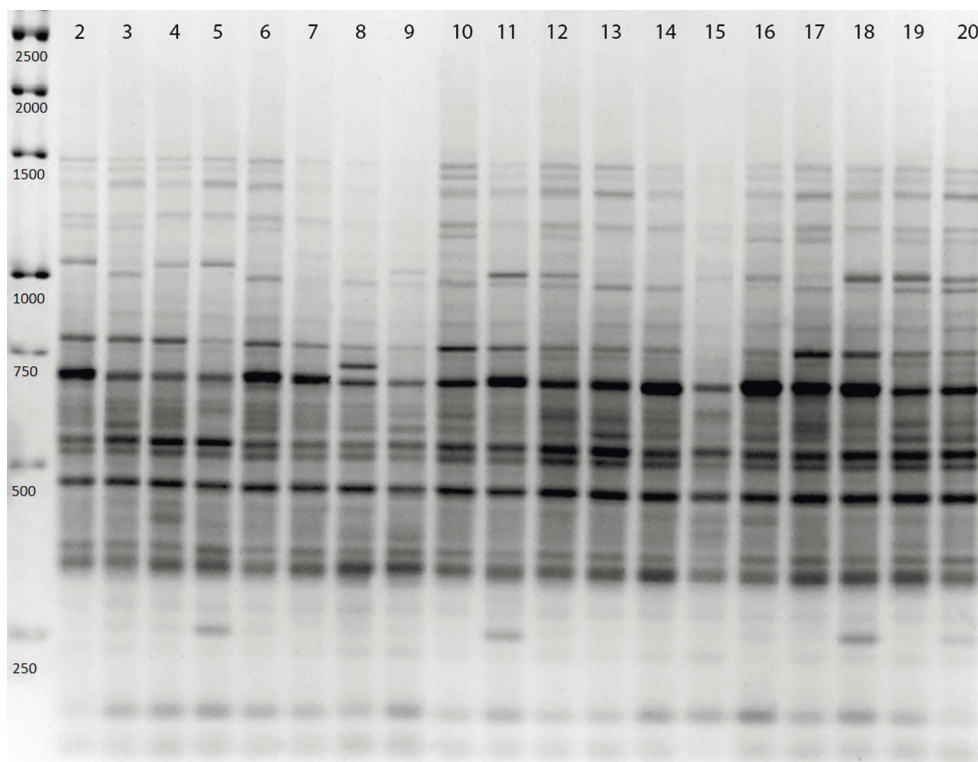


Рис. 1. Электрофорез результатов ПЦР с использованием 2076 iPBS-праймера для популяции ББЗ (дорожки 2–20). Первая дорожка – маркер молекулярного веса 1 Кб

Fig. 1. Electrophoresis of PCR results using a 2076 iPBS primer for the BBR population (2–20 lanes). The first lane – 1 Kb molecular weight marker

Т а б л и ц а 2. Характеристика iPBS-маркеров 2390 и 2076

T a b l e 2. Characteristics of iPBS markers 2390 and 2076

iPBS-маркер	К-во полиморфных локусов	Доля полиморфных локусов (P), %	Информационный полиморфизм (PIC)
2390	6	40,00	0,32
2076	22	81,48	0,47

При использовании маркера 2076 было обнаружено большее число полиморфных локусов, чем при использовании маркера 2390 (6 и 22 соответственно). Коэффициент PIC для маркера 2076 составил 0,47, для маркера 2390 – 0,32. Так как для доминантных маркеров максимальное значение PIC составило 0,5 [13], можно сделать вывод, что оба маркера являются информативными (маркер 2076 – высокоинформативным) и пригодными для оценки генетической гетерогенности популяций *Ophrys insectifera* L.

На основе полученных бинарных матриц для каждой из популяций были рассчитаны значения P , N_e , N_a , I , H_e . Кроме того, для всех локусов двух популяций были определены значения P , N_e , N_a , I , H_e , H_t , H_s , G_{st} и N_m (табл. 3).

Т а б л и ц а 3. Параметры генетического полиморфизма исследованных популяций *Ophrys insectifera* L.T a b l e 3. Parameters of genetic polymorphism of the studied populations of *Ophrys insectifera* L.

Параметр	Популяция из д. Веркуды	Популяция из ББЗ	Вероятность различий между популяциями	Общее для двух популяций
Доля полиморфных локусов (P), %	61,9	33,33	0,996	66,67
Наблюдаемое число аллелей (N_a)	1,62 ± 0,08	1,33 ± 0,07	0,992	1,67 ± 0,07
Эффективное число аллелей (N_e)	1,3 ± 0,05	1,19 ± 0,05	0,890	1,34 ± 0,06
Генетическое разнообразие Нея (H_e)	0,19 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,951	0,2 ± 0,03
Информационный индекс Шеннона (I)	0,29 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,971	0,31 ± 0,04
Общее генетическое разнообразие (H_t)				0,20 ± 0,04
Генетическое разнообразие в популяциях (H_s)				0,15 ± 0,02
Коэффициент дифференциации популяций (G_{st})				0,26
Поток генов между популяциями (N_m)				1,43

П р и м е ч а н и е. Различия между популяциями оценивали по t -критерию Стьюдента, для доли полиморфных локусов – по критерию χ^2 .

Генетическое разнообразие в популяциях является очень важным для адаптации к изменяющейся среде и, как следствие, для долгосрочного выживания вида. Генетически однородные популяции более подвержены влиянию биотических и абиотических факторов и могут элиминироваться в результате распространения болезней и патогенов, а популяции с более узким диапазоном генотипов могут исчезать при экстремальных климатических условиях, таких как жара, холод, засуха и т. д. [4, 14].

При условии равновесия Харди–Вайнберга $N_e = 1,62$ для популяции из д. Веркуды и $N_e = 1,33$ для популяции из ББЗ. Значения H_e , I и P для популяции из д. Веркуды равняются 0,19; 0,29 и 61,9 % соответственно, а для популяции ББЗ – 0,11; 0,17 и 33,33 %.

Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод, что популяция из д. Веркуды является более генетически гетерогенной, чем популяция из ББЗ.

Для анализа генетической изменчивости для всех локусов двух популяций были рассчитаны N_a , N_e , H_e , I и P , которые составили 1,67; 1,34; 0,20; 0,31 и 66,67 соответственно (табл. 3).

Разнообразие генов в популяциях ($H_s = 0,15$) меньше общего генетического разнообразия ($H_t = 0,2$). G_{st} составил 0,26. Считается, что у инбредных популяций $G_{st} \geq 0,5$, т. е. группы растений представляют собой единую подразделенную популяцию, состоящую из субпопуляций [15]. Полученные данные позволяют предположить, что изученные группы (популяции) *O. insectifera* L. не являются единой популяцией, т. е., возможно, имели разных родоначальников.

Поток генов – это движение генов внутри и между популяциями. Интенсивность потока генов оказывает важное влияние на дифференциацию популяций. Обычно считается, что при $N_m > 1$ поток генов может предотвратить генетическую дифференциацию между популяциями,

вызванную генетическим дрейфом. Когда $Nm < 1$, генетический дрейф является основной причиной дифференциации генетической структуры среди популяций [16]. Следует подчеркнуть два важных момента: во-первых, расчет Nm не учитывает пространственное расположение популяций. Во-вторых, высокие показатели Nm могут отображать исторический генетический обмен и не указывать на текущие показатели миграции. Nm -значения демонстрируют поток генов за определенный (обычно неизвестный) период времени [17].

Для популяций *Ophrys insectifeta* L. Nm составил 1,43, что указывает на высокий уровень обмена генов в исследованных популяциях. Но так как поток генов между популяциями в данный момент маловероятен из-за их географической удаленности, можно предположить, что ранее, в какой-то промежуток времени, поток генов между популяциями существовал.

Анализ молекулярной вариации показал, что большая часть генетического разнообразия (64 %) является внутривидовым, а доля генетической вариации между оцененными популяциями составляет 36 % (табл. 4). Разница между индивидами в популяциях была статистически значимой ($p < 0,001$). Считается, что $\Phi_{IT} > 0,2$ указывает на значительное различие между популяциями [18]. Для исследованных популяций Φ_{IT} составил 0,36, следовательно, выявлена значительная и достоверная генетическая дифференциация популяций.

Т а б л и ц а 4. Параметры генетического полиморфизма исследованных популяций *Ophrys insectifera* L.

Table 4. Parameters of genetic polymorphism of the studied populations of *Ophrys insectifera* L.

Источник изменчивости	Число степеней свободы (df)	Сумма квадратов (SS)	Средний квадрат (MS)	Дисперсия	Φ_{IT}	Доля в вариации
Общая вариация	37	160,97	4,35	5,26	0,36**	—
Между популяциями	1	38,97	38,97	1,87		0,36
Внутри популяций	36	122,00	3,39	3,39		0,64

Примечание. ** – различия достоверны при уровне значимости $p < 0,01$.

На графике главных координат (ось 1 составляет 29,86 % отклонения, а ось 2 – 9,24 %), построенном по результатам iPBS-анализа, образцы сформировали две достаточно четкие группы (рис. 2).

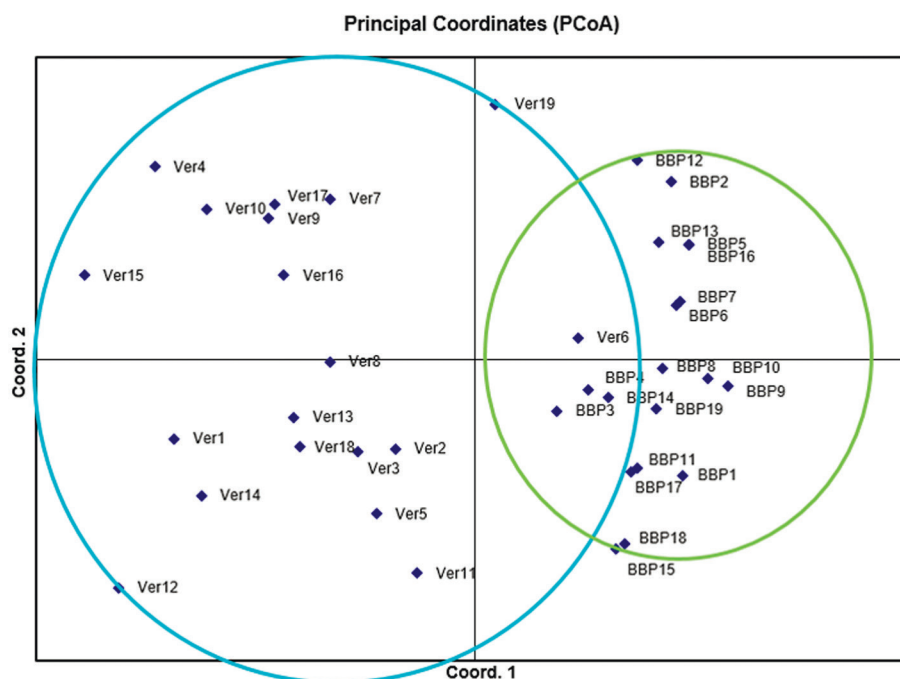


Рис. 2. Распределение исследованных образцов на первых двух главных координатах (PCoA)

Fig. 2. The distribution of the studied samples at the first two principal coordinates (PCoA)

Такое разделение популяций в целом совпадает с их географическим расположением. Анализ РСoA подтверждает ранее полученные данные о том, что популяция из д. Веркуды более генетически гетерогенна, чем популяция из ББЗ. Среднее генетическое расстояние для популяции из ББЗ составило 4,41, а для популяции из д. Веркуды – 9,15. Среднее расстояние между особями отражает внутривидовое разнообразие, и если расстояние мало, то, соответственно, и генетическое разнообразие также мало [19]. Результаты подтверждают то, что генетическое разнообразие для популяции из д. Веркуды существенно больше, чем для популяции из ББЗ.

Заключение. Низкий уровень генетического разнообразия может ограничить способность популяций растений реагировать на изменяющиеся условия окружающей среды. Для оценки генетической гетерогенности существует множество методов, в том числе молекулярных, которые основаны на мобильных генетических элементах. В проведенном исследовании примененный метод iPBS, который базируется на использовании LTR-ретротранспозонов, позволил исследовать генетическое разнообразие двух популяций *Ophrys insectifera* L. – из д. Веркуды и из ББЗ.

В результате проведения статистического анализа данных, полученных с помощью использования iPBS-маркеров 2390 и 2076, был определен уровень генетической гетерогенности для каждой из популяций. Установлено, что популяция из д. Веркуды, в отличие от популяции из ББЗ, имеет более высокий уровень генетического разнообразия.

Анализ молекулярной вариации позволил установить, что основная доля генетической изменчивости является внутривидовой (64 %). Полученное значение *Gst* (0,26) показало, что популяции не являются субпопуляциями единой популяции. Анализ главных координат выявил две группы, которые совпадали с природными популяциями, и подтвердил большую генетическую гетерогенность у популяции из д. Веркуды.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что у популяции из ББЗ более высокий риск исчезновения, чем у популяции из д. Веркуды. Наличие более высокого уровня внутривидового разнообразия может указывать также на то, что для сохранения вида достаточно небольшое количество популяций. Следовательно, на территории Республики Беларусь необходимо контролировать состояние (генетическую гетерогенность) обеих найденных популяций.

Полученные нами результаты могут быть использованы для выбора стратегии сохранения вида и оценки способности популяций адаптироваться к неблагоприятным факторам окружающей среды.

Список использованных источников

1. Population extinctions driven by climate change, population size, and time since observation may make rare species databases inaccurate / T. N. Kaye [et al.] // PLoS ONE. – 2019. – Vol. 14, N 10. – P. e0210378 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210378>
2. Hamouda, M. Molecular analysis of genetic diversity in population of *Silybum marianum* (L.) Gaertn in Egypt / M. Hamouda // J. Gen. Eng. Biotechnol. – 2019. – Vol. 17, N 1. – Art. 12. <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0011-6>
3. Neel, M. C. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae) / M. C. Neel, N. C. Ellstrand // Conservation Genetics. – 2003. – Vol. 4, N 3. – P. 337–352. <https://doi.org/10.1023/A:1024017029933>
4. Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe / M. Szczecińska [et al.] // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, N 3. – P. e0151730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730>
5. Красная книга Республики Беларусь. Растения: редкие и находящиеся под угрозой исчезновения виды дикорастущих растений / И. М. Качановский [и др.]. – 4-е изд. – Минск : Беларус. энцыкл., 2015. – 448 с.
6. Созинов, О. В. *Ophrys insectifera* L. – новый вид сем. Orchidaceae для флоры Беларуси / О. В. Созинов // Ботаника (исследования) : сб. науч. тр. / Ин-т эксперим. бот. НАН Беларуси. – Минск, 2010. – Вып. 38. – С. 428–431.
7. Оценка морфо-экологических характеристик *Ophrys insectifera* L. двух удаленных ценопопуляций / А. В. Кручонок [и др.] // Мониторинг и оценка состояния растительного мира : материалы 5-й Междунар. науч. конф. (Беларусь, Минск, Беловежская пуца, 8–12 октября 2018 г.). – Минск, 2018. – С. 246–248.
8. Sanford, M. The Orchids of Suffolk / M. Sanford. – Ipswich : Suffolk Naturalists Society, 1991. – 123 p.
9. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales-suitable for diverse PCR based downstream applications / K. D. Devi [et al.] // SpringerPlus. – 2013. – Vol. 2. – Art. 669. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-669>

10. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing / M. A. Nadeem [et al.] // *Biotechnol. Biotechnol. Equipment.* – 2018. – Vol. 32, N 2. – P. 261–285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
11. IPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation / R. Kalendar [et al.] // *Theor. Appl. Gen.* – 2010. – Vol. 121, N 8. – P. 1419–1430. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1398-2>
12. Mobile genomic element diversity in world collection of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) panel using iPBS-retrotransposon markers / F. Ali [et al.] // *PLoS ONE.* – 2019. – Vol. 14, N 2. – P. e0211985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211985>
13. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium spp.*) / I. Roldán-Ruiz [et al.] // *Mol. Breeding.* – 2000. – Vol. 6. – P. 125–134. <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>
14. Genetic diversity and population structure of naturally rare *Calibrachoa* species with small distribution in southern Brazil / A. L. de Wallau John [et al.] // *Gen. Mol. Biol.* – 2019. – Vol. 42, N 1. – P. 108–119. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0314>
15. Зарецкая, М. В. Генетическое разнообразие и популяционная структура вида *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. острова Валаам / М. В. Зарецкая, О. М. Федоренко // *Тр. Карельск. науч. центра Рос. акад. наук.* – 2016. – № 11. – С. 9–16.
16. Analysis of genetic population structure and diversity in *Mallotus oblongifolius* using ISSR and SRAP markers / W. Yan [et al.] // *PeerJ.* – 2019. – Vol. 7. – P. e7173. <https://doi.org/10.7717/peerj.7173>
17. Changing world: challenges for landscape research / ed. : F. Kienast, O. Wildi, S. Ghosh. – Berlin : Springer, 2007. – 297 p.
18. Resmi, L. Population genetic structure and diversity analysis of South Indian banana cultivars / L. Resmi, A. R. Nair, A. S. Nair // *J. Plant Breed. Crop Sci.* – 2016. – Vol. 8, N 1. – P. 1–12. <https://doi.org/10.5897/jpbcs2015.0519>
19. Дьяконов, В. П. Matlab 6.5 SP1/7/7 SP1/7 SP2 + Simulink 5/6. Инструменты искусственного интеллекта и биоинформатики / В. П. Дьяконов, В. В. Круглов. – М. : Солон Пресс, 2020. – 454 с.

References

1. Kaye T. N., Bahm M. A., Thorpe A. S., Gray E. C., Pfingsten I., Waddell C. Population extinctions driven by climate change, population size, and time since observation may make rare species databases inaccurate. *PLoS ONE*, 2019, vol. 14, no. 10, p. e0210378. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210378>
2. Hamouda M. Molecular analysis of genetic diversity in population of *Silybum marianum* (L.) Gaertn in Egypt. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2019, vol. 17, no. 1, art. 12. <https://doi.org/10.1186/s43141-019-0011-6>
3. Neel M. C., Ellstrand M. C. Conservation of genetic diversity in the endangered plant *Eriogonum ovalifolium* var. *vineum* (Polygonaceae). *Conservation Genetics*, 2003, vol. 4, no. 3, pp. 337–352. <https://doi.org/10.1023/A:1024017029933>
4. Szczecińska M., Sramko G., Wołosz K., Sawicki J. Genetic diversity and population structure of the rare and endangered plant species *Pulsatilla patens* (L.) Mill in East Central Europe. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 3. p. e0151730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151730>
5. Kachanovskii I. M., Nikiforov M. E., Parfenov V. I., Borodin O. I., Pugachevskii A. V., Baichorov V. M., Gapienko O. S., Giryayev A. S., Evdaseva T. P. *The Red Book of the Republic of Belarus. Plants: rare and endangered species of wild plants. 4th ed.* Minsk, Belaruskaya Entsyklopedyya Publ., 2015. 448 p. (in Russian).
6. Sozinov O. V. *Ophrys insectifera* L. – new species of Orchidaceae for flora of Belarus. *Botanika (issledovaniya): sbornik nauchnykh trudov* [Botany (research): collection of scientific papers]. Minsk, 2010, iss. 38, pp. 428–431 (in Russian).
7. Kruchonok A. V., Kozlova O. N., Ivkovich E. N., Avtushko S. A., Ivkovich V. S. Assessment of the morpho-ecological characteristics of two remote coenopopulations of *Monitoring i otsenka sostoyaniya rastitel'nogo mira: materialy 5 Mezhdunarodnoi nauchnoi konferentsii (Belarus', Minsk, Belovezhskaya pushcha, 8–12 oktyabrya 2018 goda)* [Monitoring and assessment of the state of the flora: materials of the 5th International scientific conference (Belarus, Minsk, Belovezhskaya Pushcha, October 8–12, 2018)]. Minsk, 2018, pp. 246–248 (in Russian).
8. Sanford M. *The Orchids of Suffolk.* Ipswich, Suffolk Naturalists Society, 1991. 123 p.
9. Devi K. D., Punyarani K., Singh N. S., Devi H. S. An efficient protocol for total DNA extraction from the members of order Zingiberales- suitable for diverse PCR based downstream applications. *SpringerPlus*, 2013, vol. 2, art. 669. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-669>
10. Nadeem M. A., Nawaz M. A., Shahid M. Q., Doğan Y., Comertpay G., Yildiz M. [et al.]. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2018, vol. 32, no. 2, pp. 261–285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
11. Kalendar R., Antonius K., Smýkal P., Schulman A. H. IPBS: a universal method for DNA fingerprinting and retrotransposon isolation. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, vol. 121, no. 8, pp. 1419–1430. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1398-2>
12. Ali F., Yılmaz A., Nadeem M. A., Habyarimana E., Subaşı I., Nawaz M. A. [et al.]. Mobile genomic element diversity in world collection of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) panel using iPBS-retrotransposon markers. *PLoS ONE*, 2019, vol. 14, no. 2, p. e0211985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211985>
13. Roldán-Ruiz I., Dendaauw J., van Bockstaele E., Depicker A., De Loose M. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrass (*Lolium spp.*). *Molecular Breeding*, 2000, vol. 6, pp. 125–134. <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>

14. De Wallau John A. L., Geraldo M., Jeferson F. N., Loreta F. B. Genetic diversity and population structure of naturally rare *Calibrachoa* species with small distribution in southern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 2019, vol. 42, no. 1, pp. 108–119. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2017-0314>
15. Zaretskaya M. V., Fedorenko O. M. Genetic diversity and population structure of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. of Valaam Islands. *Trudy Karel'skogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk* [Proceedings of the Karelian Scientific Center of the Russian Academy of Sciences], 2016, no. 11, pp. 9–16 (in Russian).
16. Yan W., Li J., Zheng D., Friedman C., Wang H. Analysis of genetic population structure and diversity in *Mallotus oblongifolius* using ISSR and SRAP markers. *PeerJ*, 2019, vol. 7, p. e7173. <https://doi.org/10.7717/peerj.7173>
17. Kienast F., Wildi O., Ghosh S. (eds.). *A changing world: challenges for landscape research*. Berlin, Springer, 2007. 297 p.
18. Resmi L., Nair A. R., Nair A. S. Population genetic structure and diversity analysis of South Indian banana cultivars. *Journal of Plant Breeding and Crop Science*, 2016, vol. 8, no. 1, pp. 1–12. <https://doi.org/10.5897/jpbcs2015.0519>
19. D'yakonov V. P., Kruglov V. V. *Matlab 6.5 SPI/7/7 SPI/7 SP2 + Simulink 5/6. Artificial intelligence and bioinformatics tools*. Moscow, Solon Press Publ., 2020. 455 p. (in Russian).

Информация об авторах

Самохвалова Наталья Владимировна – мл. науч. сотрудник. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: N.Samakhvalava@cbg.org.by

Кручонок Аlesia Владимировна – науч. сотрудник, заведующий сектором. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: A.Kruchonok@cbg.org.by

Аношенко Борис Юрьевич – канд. биол. наук, заведующий лабораторией. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: B.Anoshenko@cbg.org.by

Титок Владимир Владимирович – член-корреспондент, д-р биол. наук, доцент, директор. Центральный ботанический сад НАН Беларуси (ул. Сурганова, 2в, 220012, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: V.Titok@cbg.org.by

Information about the authors

Natalia V. Samokhvalova – Junior Researcher. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: N.Samakhvalava@cbg.org.by

Alesia V. Kruchonok – Researcher, Sector Manager. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: A.Kruchonok@cbg.org.by

Boris Yu. Anoshenko – Ph. D. (Biol.), Head of the Laboratory. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: B.Anoshenko@cbg.org.by

Vladimir V. Titok – Corresponding Member, D. Sc. (Biol.), Associate Professor, Director. Central Botanical Garden of the National Academy of Sciences of Belarus (2v, Surganov Str., Minsk, 220012, Republic of Belarus). E-mail: V.Titok@cbg.org.by