

Молекулалық биология
және генетикаМолекулярная биология
и генетикаMolecular biology and
Genetics

ӘОЖ 57.084

¹С.Р. Бейсенова*, ²М. Шниттлер, ¹Р.И. Берсимбай¹Л.Н. Гумилев атындағы Еуразия ұлттық университеті, Қазақстан, Астана қ.²Грайфсвальд университеті, Германия, Грайфсвальд қ.

*E-mail: auez_salta@mail.ru

***Gagea pusilla*-ның (Liliaceae) репродуктивті жүйесін генетикалық алуан түрлілікті анықтау әдісі арқылы зерттеу**

Бұл жұмыста генетикалық алуан түрлілікті анықтау әдісі арқылы *Gagea pusilla*-ның репродуктивті жүйесі зерттелді. *Gagea pusilla* – аралас репродуктивті жүйемен ерекшеленген көктемдік геофит. Морфологиялық талдаулар олардың ерте даму сатысында жер асты жуашықтары арқылы вегетативті жолмен көбейетінін және ересек сатысында аналық баданасы белгілі мөлшерге жеткен кезде толығымен жынысты көбеюге ауысатынын көрсетті. AFLP фингерпринтинг әдісі арқылы *Gagea pusilla*-ның 178 үлгісіне жасалған талдаулар олардың жынысты көбеюмен қатар вегетативті жолмен көбейіп, клон түзетіні анықталды. Бірақ клон болып табылатын өсімдіктер мен генетикалық даралардың арасындағы арақатынаста жоғары айырмашылық байқалды. *Gagea pusilla* көбінесе генеративті жолмен көбею салдарынан популяция ішінде алуан түрлі генотиптер саны салыстырмды жоғары, ал генетикалық бірдей үлгілер саны аз болды.

Түйін сөздер: AFLP фингерпринтинг, *Gagea pusilla*, генетикалық алуан түрлілік, репродукция жүйесі.

S.R. Beisenova, M. Schnittler, R.I. Bersimbay

The study of reproductive system *G.pusilla* by method of detection of genetic diversity

Gagea pusilla is spring geophyt, characterized by mixed reproductive strategies. They relies on vegetative reproduction by subterranean bulbils in young stages but completely switches to sexual reproduction once a certain bulb size is attained. In this study AFLP-genotyping method was used to investigate the consequences of these reproductive strategies for genetic diversity. In most cases *G. pusilla* has generative reproduction and it is reflected by the comparatively high genotypic richness within populations and the low numbers of samples per clone.

Key words: AFLP fingerprinting, *G. pusilla*, genetic diversity, reproductive system.

С.Р. Бейсенова, М. Шниттлер, Р.И. Берсимбай

Исследование репродуктивной системы *G. pusilla* методом определения генетического разнообразия

Gagea pusilla – весенний геофит, характеризуется смешанной репродуктивной стратегией. На ранней стадии они размножаются вегетативным способом с помощью подземной луковички, но когда родительская луковичка достигает определенного размера, они полностью переключаются на генеративное размножение. Используя в данной работе метод AFLP генотипирования для определения генетического разнообразия, мы исследовали репродуктивную систему *G. pusilla*. В большинстве случаев *G. pusilla* размножается генеративным способом, и это приводит к сравнительно большому разнообразию генотипов внутри популяции и малому количеству генетически идентичных образцов.

Ключевые слова: AFLP фингерпринтинг, *G.pusilla*, генетическое разнообразие, репродуктивная система.

Репродукция тіршіліктің ең басты қасиеттерінің бірі: генетикалық алуан түрлілік жынысты көбею кезінде рекомбинация процестері арқылы қалыптасады, бұл – популяция мен биологиялық түрлер үшін маңызды процесс [1]. Бірақ жоғары сатыдағы өсімдіктердің көптеген түрлері вегетативті көбеюдің күрделі тәсілдерімен де көбейе алуға қабілетті.

Вегетативті көбеюге негізделген өсімдік популяцияларында генетикалық алуан түрлілік деңгейі төмен болуы мүмкін. Бірақ молекулалық әдістерді қолдану арқылы жүргізілген зерттеулер осындай өсімдік таксондарында ауытқулардың болатынын көрсетті. Эллstrand пен Роосе [2] алғаш рет «клонды» түрлердің генетикалық алуан түрлілігін зерттеп, алғашқы нәтижелер алған. Олар зерттелген 27 түрдің ішінде 25 түріне изоферменттік талдаулар жасап, түр ішінде және сонымен қатар популяция арасындағы елеулі айырмашылықты байқап, популяцияның поликлонды болуы заңды екенін анықтады. Одан кейінгі басқа да молекулалық және биохимиялық әдістерді қолдану арқылы осыған ұқсас нәтижелерді [3] көрсетті.

Кейінгі жылдары генетикалық алуан түрлілікті зерттеуде молекулалық-генетикалық әдістер, соның ішінде микросателлиттік және AFLP (ағыл. *Amplified fragment length polymorphism*) әдістері кең қолданылуда. Бұл екі әдісті қолдану кезінде полиморфты «фингерпринтингтерге» талдау жасау арқылы, жеке генотипті, яғни жеке дараларды анықтауға жоғары мүмкіндік болады [4, 5]. Бірақ осы әдістер арқылы окшауланған популяцияларда генетикалық алуан түрлілікті анықтау тиімсіз, мысалы, *Wollemia nobilis* эндемикалық реликтте [3] немесе *Populus euphratica* популяциясында байқалды [6].

Толық вегетативті жолмен үнемі көбейетін түтікті өсімдіктер өте сирек. Көбінесе жынысты жолмен көбейетін таксондар жоғары стерильді популяция құрайды. Оларға, мысалы, Альпі тауларында таралған *Saxifraga cernua* [7], солтүстік аймақтарда кездесетін *Decodon verticillatus* [8] және *Gagea bohémica*-ның кейбір морфологиялық мономорфты популяциялары [9] кіреді.

Өсімдіктердегі репродуктивті жүйесінің өзгеруі гибридизация мен пloidтық деңгейге байланысты болуы мүмкін. Жынысты көбеюге қабілеті төмен немесе мүлдем жынысты жолмен

көбеймейтін гибридтер эволюция барысында вегетативті көбею, агамоспермия және полиплоидизация сияқты үш негізгі механизмдер арқылы сақталады [10].

Gagea Salisb. – *Liliaceae* тұқымдасының түрлерге бай туысының бірі. Бұл туысқа 250-300-ге жуық түр жатады [11]. Қазақстан жерінде 39 түрі кездеседі [12]. Олар екі түрлі жолмен көбейеді: вегетативті және генеративті. Бірақ осы туысқа жататын өсімдіктердің вегетативті және генеративті көбею белгілерін анықтау қиын, өйткені олардың тіршілік барысында бұл ерекшеліктер, әдетте тұрақсыз болады.

М. Шниттлер және оның әріптестері *Gagea* туысына жататын *Gagea lutea* және *Gagea spathacea* түрлерінің репродуктивті жүйесіне морфологиялық және молекулалық-генетикалық талдаулар жасап, олардың көбею жүйесіндегі ерекшеліктерді анықтаған. Гексаплоидты болып келетін *Gagea lutea* вегетативті әрі генеративті жолмен көбейеді, ал наонаплоидты *Gagea spathacea* тек вегетативті жолмен көбеюге қабілетті. Репродуктивті жүйедегі мұндай ерекшеліктер пloidтық деңгейге тәуелді болуы мүмкін деген болжамдар бар [13, 10].

Қазақстанның далалы, орманайналысындағы жазық жерлерде өсетін [14] *Gagea Davlianidze* секциясына жататын [15] диплоидты *Gagea pusilla* (F.W. Schmidt) өсімдігінің репродуктивті жүйесін зерттеу ерекше қызығушылық тудырады. Морфологиялық талдаулар нәтижесі бұл түрдің жас өсімдік сатысында жер асты жуашықтары арқылы вегетативті жолмен көбейетіні, содан аналық баданасы белгілі мөлшерге жеткен кезде толығымен жынысты көбеюге ауысып, тұқым түзетінін көрсетті. Біздің зерттеу жұмысымыздың мақсаты: осы *Gagea pusilla*-ның генетикалық алуан түрлілігіндегі ерекшеліктерді AFLP фингерпринтинг талдауы арқылы популяция ішінде салыстырып, олардың репродуктивті жүйесін анықтау.

Зерзаты және әдістері

Өсімдік материалдары 2012 жылдың сәуір айында Астана қаласынан шамамен 115 км қашықтықта орналасқан Қорғалжын ауданы Қорғалжын ұлттық қорығынан жинап алынды. Зерттеу үлгілері үш түрлі популяциядан трансекта салу әдісін қолдану арқылы жиналды. Барлық популяцияларда жұп құрайтын екі өсімдіктер арасындағы ара қашықтық 0,1 метр ал екі жұп

арасындағы өсімдік үлгілерінің ара қышықтығы 1 метрден жоғары болды. Барлық өсімдік үлгілері ретті түрде нөмірленіп, жұп құрайтын өсімдіктер арнайы белгілермен белгіленді. Әр популяциядан 30 жұпты өсімдік жиналды. AFLP (ағыл. *Amplified fragment length polymorphism*) анализін жүргізу үшін өсімдік жапырақтары немесе сыртқы қабыршақтан тазаланған аналық баданасы бар өсімдіктер алынды. Олар ДНҚ-ны бөлуге дейін силикагельде сақталды.

30-40 мг құрғақ өсімдік материалынан ДНҚ бөлініп алынды. ДНҚ-ны бөліп алу Стеин [16] әдістемесіне сәйкес жүргізілді, бірақ бұл әдістемеге кейбір өзгертулер енгізілді: хлороформ-изоамил спиртін қосқаннан кейін супернатантты жаңа пробиркаларға құйып, артынан 6,86 М аммоний ацетатын қосып, 30 минут – 20°C-та инкубация жүргіздік. Содан кейін 800 мкл хлороформ-изоамил спиртін (24:1) қосып, үлгілерді 4°C-та 15 минут шайқайды, 15 минут 17000 gcf жағдайында центрифугаға қояды. Одан кейінгі сатыда РНҚ-ны ыдыратып, ДНҚ-ны изопропанол арқылы тұнбаға түсіреді де,

тұнбаны тазалайды. Содан тұнбаны вакуумды концентраторда (RVC 2-18, Christ) 37 °C-та 10 минут кептіреді. Кептірілген тұнбаны 100 мкл TE-буферінде ерітеді (көлемі алынған тұнба мөлшеріне байланысты).

AFLP фингерпринтинг жүргізуге қажетті мөлшерде матрицалық ДНҚ-ны алғаннан кейін рестрикция, лигирлеу, преамплификация және селективті амплификация сатыларын рет-ретімен жасалады [10]. Преселективті амплификациядан кейін алынған ПТР (полимеразалы тізбекті реакция) өнімін 20 есе сұйытып, үш селективті негіздері бар праймерлер көмегімен (EcoRI + ANNN және VspI + GNNN, N – таңдап алынған селективті негіздер) амплификация жүргізілді.

Бірнеше праймерлер комбинацияларына (адаптердағы негіздер реттілігін салыстыра отыра алынған үш немесе төрт негізден тұратын праймер, EcoRI – праймері флуоресцентті таңбаланған) белгілі өсімдік үлгілерімен сынақтама жүргізілді. *Gagea pusilla*-ның 32 үлгісі сегіз праймерлер комбинацияларымен сынақталып, талданды:

I EcoRI + AGCC/VspI + GTAC;
II EcoRI + AGCC/VspI + GCAT;
III EcoRI + AGCC/VspI + CTAG;
IV EcoRI + AGCC/VspI + CTGAT;

V EcoRI + AGCG/VspI + GTAC;
VI EcoRI + AGCG/VspI + GCAT;
VII EcoRI + AGCG/VspI + CTAG;
VIII EcoRI+AGCG/VspI+CTGAT.

Үлгілерді генотиптеу үшін V праймер таңдап алынды, өйткені бұл праймер электрофореграммада біршама сапалы және айқын көрініс берді.

Селективті амплификация нәтижесінде алынған 1,5 мкл ПТР өнімін 8,41 мкл Hi-Di формамид және 0,09 мкл Liz 500 өлшемді стандартымен араластырып, 95°C-та 5 минут денатурациялайды. Амплификацияланған өнімдер ABI 310 капиллярлы секвинаторда (Applied Biosystems) талданды.

AFLP фрагменттері GeneMapper v3.7 (Applied Biosystems) бағдарламасында жартылай автоматты түрде талданды, шындар бағдарламадағы «Bin set» функциясы арқылы анықталды, бірақ барлық шындардың бар немесе жоқ болуы бағдарламадан тыс, қолмен тексерілді: фрагменттердегі шындар ≥ 50 RFU болса, онда оны үнемі «1» деп, егер кіші шын-

дар анық байқалса оны да 1 деп, егер болса да 0 немесе «х» деп алып, есептедік. Алынған AFLP профильдерін талдау үшін олар бинарлы матрицаға көшірілді.

Алынған әр үлгінің фрагменттеріне бинарлы матрица жасалды. Осы бинарлы AFLP профильдерінен жұптардың арақашықтығы әртүрлі фрагменттердің абсолютті саны ұқсастық көрсеткіші мен Жаккард коэффициенті үшін есептелді. Үлгілер арасындағы генотипті идентификациялау үшін *Excel*-де есептеу алгоритмі жасалды, бұл генотиптердің ұқсастық табалдырығын анықтауға мүмкіндік береді [17, 18]. Егер топтағы үлгілердің әрбіреуі табалдырықтан төмен басқа үлгіге сәйкес келсе, онда біз оны ұқсас генотип ретінде қарастырамыз (көбінесе, барлық комбинациялар таңдап алынған табалдырық мәнінен төмен болды). Мұндай табалдырық *Gagea pusilla* үшін анықталды.

Зерттеу нәтижелері және оларды талдау

Gagea pusilla өсімдігіне AFLP фингерпринтинг жүргізу үшін 500 нг матрицалық ДНҚ қажет екені анықталды. AFLP талдауын жүргізуге қажетті праймерді таңдап алу мақсатында бірнеше үлгілерге (32 үлгі) жүргізілген сынақтама нәтижесі V праймердің (EcoRI-AGCG/VspI-GTAC) ең полиморфты екендігін көрсетті. Осыған байланысты осы праймерді қолдана отырып, *Gagea pusilla*-ның 178 үлгісі AFLP фингерпринтинг әдісі арқылы талданды. Барлық талдауларда AFLP фрагменттері 100-ден 500-ге дейін жұп негіздерден тұрды.

Тәжірибе барысында қателіктерді болдырмау үшін кейбір өсімдік үлгілерін екі рет қайталап жасады. Барлық популяциядан алынған 17 қайталанған үлгілердің арасындағы орташа қателігі төмен болды (0,004-0,005).

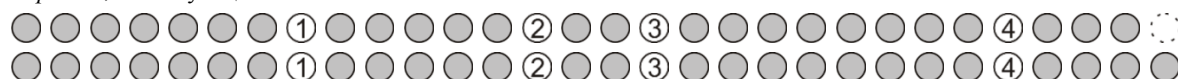
Бірінші және үшінші популяциядан 29, ал екінші популяциядан барлық 30 жұп үлгілері сақталып, талданды. 1-кестеде көрсетілгендей барлық үш популяцияда 4-7 өсімдік үлгілері клонды өсімдіктерді, 80,7%-ы генетикалық алуан түрлі дараларды құрады (1-кесте; 2-сурет).

1-кесте – *G.pusilla*-ның зерттелген үш популяциясы үшін генотиптік ауытқуларды салыстыру

	I популяция	II популяция	III популяция
Өсімдік үлгілерінің саны	59	60	59
Генотиптер саны	52	54	55
Клонды генотиптер (%)	7 (13,5%)	6 (11,1%)	4 (7,3%)
Көлденең жазықтықта салыстырылған жұп үлгілерінің саны	29	30	29
Көлденең жазықтықта жұп құрайтын екі ұқсас өсімдіктердің саны (бірдей генотиптер) (%)	7 (24,1%)	6 (20%)	4 (13,8%)

Барлық популяциялардағы үлгілерді генотиптеу нәтижесінде барлығы 161 генотип анықталды. Әр генотип бір популяция шегінде салыстырылды. Бірінші популяцияда 52 генотиптің 45-і тек бір рет кездесетін қайталанбайтын генотип екені, ал қалған

басқа генотиптер клон құрайтыны анықталды. Екінші популяцияда 48 қайталанбайтын генотип және 6 клонды генотип айқындалды. Үшінші популяциядағы 55 генотип 51 қайталанбайтын және 4 клонды генотиптерді құрады (1-сурет).

G. pusilla, I популяция*G. pusilla*, II популяция*G. pusilla*, III популяция

1-сурет – *G. pusilla*-ның зерттелген үш популяциясында генотиптердің кеңістіктік таралуы. Әр популяция үшін ретті түрде нөмірленген ақ түсті дөңгелектер клонды өсімдіктерді, ал сұр дөңгелектер алуан түрлі генотипті өсімдіктерді көрсетеді

Алынған нәтижелер негізінде көптеген көпжылдық шөпті өсімдіктер сияқты *Gagea pusilla*-ның жыныстық көбеюмен қатар вегетативті жолмен көбейіп, клон түзетіні анықталды. Бірақ клон болып табылатын өсімдіктер мен генетикалық даралардың арасындағы арақатынаста жоғары айырмашылық байқалды.

Генеративті көбею тәсілі ретінде тұқым жеміс қауашақтарында түзіліп, жел арқылы бірнеше метрге дейін немесе құмырскалар арқылы ондаған метрге дейін таралуы мүмкін. Ал жуашықтар вегетативті көбею тәсілі ретінде жер астында түзілу салдарынан аз қозғалмалы. Дегенмен олар солифлюкация (ылғалданған топырақтың баяу жылжып, қозғалуы) нәтижесінде және жануарлардың, мысалы, қабандардың жерді қазу кезінде бірнеше сантиметрге дейін орын ауыстыруы мүмкін. Жалпы айтқанда, жуашықтардың орташа таралу арақашықтығы тұқымның таралу арақашықтығынан төмен болады.

Осы екі әртүрлі таралу жолдары талданған нәтижелерде айқын байқалады. Барлық үш популяцияда үлгілердің 19,3%-ы клонды өсімдіктерді құрады, бұл вегетативті көбеюдің шағын территорияларды алатынын дәлелдейді. 80,7%-ды құрайтын генетикалық алуан түрлі болып табылатын үлгілер генеративті көбеюдің кең көлемді территорияларда болатынын айқындайды.

Алынған генетикалық құрылым мәліметтері *Gagea pusilla*-ның аралас репродукция жүйесіне ие екендігін және қоныстану жерлерін айқын көрсетеді. Тұқым арқылы көбею кезінде бастапқы популяциядан бірнеше қышықтықта жаңа тіршілік ортасына қоныстанып таралуы мүмкін, ал жуашық арқылы көбеюде генетикалық даралар белгілі бір тұрақты тіршілік ортасында таралады [19-21]. Вегетативті көбею генетикалық даралардың ерте даму сатыларында ерекше маңызды, өйткені ересек өсімдік сатысында көбею жолы генеративті көбеюге ауысады да, гүлдей бастай салысымен жуашықтарды түзбейді [13].

Сонымен, *Gagea pusilla* жартылай клонды стратегияға ие және клон болып табылатын өсімдік үлгілері аз популяцияда салыстырымды көп әртүрлі генотиптерді береді. Бұл *Gagea pusilla* өсімдігінде генеративті көбеюдің басым екендігін айқындайды. AFLP фингерпринтинг әдісін қолдана отыра генетикалық алуан түрлілікті анықтау арқылы *Gagea* туысына жататын түрлердің репродуктивті жүйесін анықтау өте тиімді болды. Қазақстанның басқа жерлерінде таралған *Gagea* туысының басқа да түрлерінің репродуктивті жүйесін зерттеп, көбею жүйесіндегі заңдылықтарды анықтау – алдағы зерттеу жұмыстарымыздың міндеті.

Әдебиеттер

- 1 Maynard S.J. The evolution of sex. – Cambridge: Cambridge University Press, 1978. – 260 p.
- 2 Ellstrand N.C., Roose M.L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant-species // American Journal of Botany. – 1987. – Vol. 74. – P. 123-131.
- 3 Peakall R., Ebert D., Scott L.J., Meagher P.F., Offord C.A. Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollemia nobilis* (Araucariaceae) // Mol. Ecol. – 2003. – Vol. 12. – P. 2331-2343.
- 4 Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting // Trends Ecol. Evol. – 1999. – Vol. 14. – P. 389-394.
- 5 Selkoe K.A., Toonen R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers // Ecol. Lett. – 2006. – Vol. 9. – P. 615-629.
- 6 Fay M.F., Lledo M.D., Kornblum M.M., Crespo M.B. From the waters of Babylon? *Populus euphratica* in Spain is clonal and probably introduced // Biodiv. Cons. – 1999. – Vol. 8. – P. 769-778.
- 7 Bauert M.R., Kalin M., Baltisberger M., Edwards P.J. No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers // Mol. Ecol. – 1998. – Vol. 7. – P. 1519-1527.
- 8 Dorken M.E., Eckert C.G. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae) // J. Ecol. – 2001. – Vol. 89. – P. 339-350.
- 9 Peterson A., Harpke D., Peruzzi L., Tison J.-M., John H., Peterson J. *Gagea bohemica* (Liliaceae), a highly variable monotypic species within *Gagea* sect. *Didymobulbos* // Plant Biosyst. – 2010. – Vol. 144. – P. 308-322.
- 10 Pfeiffer T., Klahr A., Heinrich A., Schnittler M. Does sex make a difference? Genotypic diversity and spatial genetic structure in two co-occurring *Gagea* species with contrasting reproductive strategies (*G. lutea*, *G. spathacea*, Liliaceae) // Plant Systematics and Evolution. – 2011. – Vol. 281. – P. 189-201.
- 11 Peterson A., Levichev I. G., Peterson J. Systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae) and infrageneric classification of *Gagea* based on molecular and morphological data // Molecular Phylogenetics and Evolution. – 2008. – Vol. 46. – P. 446-465.

- 12 Байтенов М.С. Флора Казахстана. – Алматы: Ғылым, 2001. – 280 с.
- 13 Schnittler M., Pfeiffer T., Harter D., Hamann A. Bulbils contra seeds: reproductive investment in two species of *Gagea* (Liliaceae) // *Plant Syst. Evol.* – 2009. – Vol. 279. – P. 29-40.
- 14 Байтенов М.Б., Голоскоков В.П., Дмитриева А.А. Флора Казахстана. Т. II. – Алма-Ата: Академия наук КазССР, 1958. – 123 с.
- 15 Peterson A., Levichev I.G., Peterson J. Systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae) and infrageneric classification of *Gagea* based on molecular and morphological data // *Mol. Phyl. Evol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 446-465.
- 16 Stein N., Herren G., Keller B. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum* // *Plant Breed.* – 2001. – Vol. 120. – P. 354-356.
- 17 Douhovnikoff V., Dodd R.S. Intra-clonal variation and a similarity threshold for identification of clones: application to *Salix exigua* using AFLP molecular markers // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 106. – P.1307-1315.
- 18 Schnittler M., Eusemann P. Consequences of genotyping errors for estimation of clonality – a case study from *Populus euphratica* Oliv. (Salicaceae) // *Evol. Ecol.* – 2010. – Vol. 24. – P.1417-1432.
- 19 Ronsheim M.L. Distance-dependent performance of asexual progeny in *Allium vineale* (Liliaceae) // *Am. J. Bot.* – 1997. – Vol. 84. – P. 1279-1284.
- 20 Ziegenhagen B., Bialozyt R., Kuhlenkamp V., Schulze I., Ulrich A., Wulf M. Spatial patterns of maternal lineages and clones of *Galium odoratum* in a large ancient woodland: inferences about seedling recruitment // *J. Ecol.* – 2003. – Vol. 91. – P. 578-586.
- 21 Pfeiffer T., Gunzel C., Frey W. Clonal reproduction, vegetative multiplication and habitat colonisation in *Tussilago farfara* (Asteraceae): a combined morpho-ecological and molecular study // *Flora.* – 2008. – Vol. 203. – P. 281-291.

References

- 1 Maynard S.J. The evolution of sex. – Cambridge: Cambridge University Press, 1978. – 260 p.
- 2 Ellstrand N.C., Roose M.L. Patterns of genotypic diversity in clonal plant-species // *American Journal of Botany.* – 1987. – Vol.74. – P. 123-131.
- 3 Peakall R., Ebert D., Scott L.J., Meagher P.F., Offord C.A. Comparative genetic study confirms exceptionally low genetic variation in the ancient and endangered relictual conifer, *Wollemia nobilis* (Araucariaceae) // *Mol. Ecol.* – 2003. – Vol. 12. – P. 2331-2343.
- 4 Mueller U.G., Wolfenbarger L.L. AFLP genotyping and fingerprinting // *Trends Ecol. Evol.* – 1999. – Vol. 14. – P. 389-394.
- 5 Selkoe K.A., Toonen R.J. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers // *Ecol. Lett.* – 2006. – Vol. 9. – P. 615-629.
- 6 Fay M.F., Lledo M.D., Kornblum M.M., Crespo M.B. From the waters of Babylon? *Populus euphratica* in Spain is clonal and probably introduced // *Biodiv. Cons.* – 1999. – Vol. 8. – P. 769-778.
- 7 Bauert M.R., Kalin M., Baltisberger M., Edwards P.J. No genetic variation detected within isolated relict populations of *Saxifraga cernua* in the Alps using RAPD markers // *Mol. Ecol.* – 1998. – Vol. 7. – P. 1519-1527.
- 8 Dorken M.E., Eckert C.G. Severely reduced sexual reproduction in northern populations of a clonal plant, *Decodon verticillatus* (Lythraceae) // *J. Ecol.* – 2001. – Vol. 89. – P. 339-350.
- 9 Peterson A., Harpke D., Peruzzi L., Tison J.-M., John H., Peterson J. *Gagea bohemica* (Liliaceae), a highly variable monotypic species within *Gagea* sect. *Didymobulbos* // *Plant Biosyst.* – 2010. – Vol. 144. – P. 308-322.
- 10 Pfeiffer T., Klahr A., Heinrich A., Schnittler M. Does sex make a difference? Genotypic diversity and spatial genetic structure in two co-occurring *Gagea* species with contrasting reproductive strategies (*G. lutea*, *G. spathacea*, Liliaceae) // *Plant Systematics and Evolution.* – 2011. – Vol. 281. – P. 189-201.
- 11 Peterson A., Levichev I. G., Peterson J. Systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae) and infrageneric classification of *Gagea* based on molecular and morphological data // *Molecular Phylogenetics and Evolution.* – 2008. – Vol. 46. – P. 446-465.
- 12 Bajtenov M.S. Flora Kazakhstan. – Almaty: Fylym, 2001. – 280 p.
- 13 Schnittler M., Pfeiffer T., Harter D., Hamann A. Bulbils contra seeds: reproductive investment in two species of *Gagea* (Liliaceae) // *Plant Syst. Evol.* – 2009. – Vol. 279. – P. 29-40.
- 14 Bajtenov M.B., Goloskokov V.P., Dmitrieva A.A. Flora Kazakhstan. Т. II. – Алма-Ата: Академия наук КазССР, 1958. – 123 с.
- 15 Peterson A., Levichev I.G., Peterson J. Systematics of *Gagea* and *Lloydia* (Liliaceae) and infrageneric classification of *Gagea* based on molecular and morphological data // *Mol. Phyl. Evol.* – 2008. – Vol. 46. – P. 446-465.
- 16 Stein N., Herren G., Keller B. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome species such as *Triticum aestivum* // *Plant Breed.* – 2001. – Vol. 120. – P. 354-356.
- 17 Douhovnikoff V., Dodd R.S. Intra-clonal variation and a similarity threshold for identification of clones: application to *Salix exigua* using AFLP molecular markers // *Theor. Appl. Genet.* – 2003. – Vol. 106. – P.1307-1315.
- 18 Schnittler M., Eusemann P. Consequences of genotyping errors for estimation of clonality – a case study from *Populus euphratica* Oliv. (Salicaceae) // *Evol. Ecol.* – 2010. – Vol. 24. – P.1417-1432.
- 19 Ronsheim M.L. Distance-dependent performance of asexual progeny in *Allium vineale* (Liliaceae) // *Am. J. Bot.* – 1997. – Vol. 84. – P. 1279-1284.
- 20 Ziegenhagen B., Bialozyt R., Kuhlenkamp V., Schulze I., Ulrich A., Wulf M. Spatial patterns of maternal lineages and clones of *Galium odoratum* in a large ancient woodland: inferences about seedling recruitment // *J. Ecol.* – 2003. – Vol. 91. – P. 578-586.
- 21 Pfeiffer T., Gunzel C., Frey W. Clonal reproduction, vegetative multiplication and habitat colonisation in *Tussilago farfara* (Asteraceae): a combined morpho-ecological and molecular study // *Flora.* – 2008. – Vol. 203. – P. 281-291.