



DOI 10.21178/2079–6080.2021.4.19
УДК 630*232.13

Опыт генетической паспортизации ясеня с применением микросателлитных маркеров

© С.Г. Ржевский, Е.Ю. Аминова, Т.А. Гродецкая

The experience of genetic certification of ash using microsatellite markers

S.G. Rzhovsky, E.Yu. Amineva, T.A. Grodetzkaya (All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology)

At present, ash (*Fraxinus* spp.) are exposed to pests and pathogens (including the narrow-bodied ash emerald beetle *Agrilus planipennis* Fairmaire and the parasitic fungus *Hymenoscyphus fraxineus*), and therefore their populations in the European part of Russia suffer significant damage. For ash, which is a valuable forest species, in conditions of the threat of population decline, it is relevant to use genetic certification methods. For valuable forest species, it is relevant to use methods of genetic management. This article presents results of genetic certification of common ash (*Fraxinus excelsior* L.). For the analysis, ten pairs of primers for microsatellite loci were used. The result showed the complete specificity of these markers for the studied samples, and also made it possible to identify significant polymorphism among the studied representatives. Based on the results of PCR analysis, studied loci demonstrate the presence of a wide range of various amplification products, including double and triple ones. There is also a significant number of products differing in weight within one to two tens of nucleotides. Based on these results, it should be assumed that the studied samples are characterized by significant genetic diversity, despite growing in the same territory. As a result of the study, it can be concluded that the primers used are suitable for genotyping local ash representatives. The obtained genetic passports make it possible to demonstrate the profile of the microsatellite loci of the studied samples; they are suitable for their identification and comparison with other ash specimens.

Keywords: genotyping, *Fraxinus*, microsatellites, polymorphism, SSR-markers

Опыт генетической паспортизации ясеня с применением микросателлитных маркеров

С.Г. Ржевский, Е.Ю. Аминаева, Т.А. Гродецкая

В настоящее время популяции представителей рода ясень (*Fraxinus* spp.) во всем мире, в том числе и в Европейской части России, несут существенный урон из-за воздействия вредителей и инфекций (в частности – ясеновой изумрудной узкотелой златки *Agrilus planipennis* Fairmaire и патогенного гриба *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya). Поражение ясеня в естественных насаждениях наблюдается и на территории Воронежской области. В условиях угрозы сокращения численности и полного исчезновения хозяйственно ценной лесной породы, которой является ясень, актуально использование методов генетической паспортизации. В настоящей статье представлены результаты генетической паспортизации ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.). Для проведения анализа были использованы десять пар праймеров к микросателлитным локусам. Результат показал полную специфичность данных маркеров для исследуемых образцов, а также позволил выявить существенный полиморфизм среди проанализированных экземпляров. По итогам проведенного ПЦР-анализа изученные локусы демонстрируют наличие широкого спектра разнообразных продуктов амплификации, в том числе – двойных и тройных. Также наблюдается значительное количество продуктов, различающихся по массе в пределах одного-двух десятков нуклеотидов. Исходя из данных результатов, стоит предположить, что исследуемые образцы характеризуются существенным генетическим разнообразием, несмотря на произрастание на одной территории. Для уточнения степени их генетического родства следует продолжить работы по генотипированию. В результате проведенного исследования можно заключить, что использованные праймеры пригодны для генотипирования местных представителей ясеня. Полученные генетические паспорта позволяют продемонстрировать профиль микросателлитных локусов исследуемых образцов, они пригодны для их идентификации и сравнения с другими экземплярами ясеня.

Ключевые слова: генотипирование, микросателлиты, полиморфизм, *Fraxinus*, SSR-маркеры

Ржевский Станислав Геннадьевич – мл. науч. сотр. лаборатории биохимии, молекулярной генетики и физиологии растений

E-mail: slavaosin@yandex.ru.

Аминаева Елена Юрьевна – науч. сотр. лаборатории биотехнологии

Гродецкая Татьяна Александровна – мл. науч. сотр. лаборатории биотехнологии

E-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

394000, Воронеж, ул. Ломоносова, 105

E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

Введение

К настоящему времени молекулярно-генетические методы нашли широкое применение в лесном хозяйстве. Так, например, их используют для мониторинговых исследований состояния лесных насаждений, в ходе лесовосстановительных работ и т. д. [15]. Объектами молекулярно-генетических исследований зачастую служат хозяйственно ценные лесные древесные породы, к которым относится ясень.

Являясь породой светолюбивой, быстрорастущей, требовательной к почве, ясень в благоприятных условиях произрастания представляет собой дерево первой величины, в высоту может достигать 40 м, в диаметре — 1,5 м, максимальная продолжительность жизни колеблется от 150 до 300 лет. Род ясень (*Fraxinus* spp.) насчитывает свыше 60 видов. На территории России наиболее распространены ясень обыкновенный (*F. Excelsior* L.), естественно произрастающий в европейской части России (на север его ареал доходит до Санкт-Петербурга), и ясень маньчжурский (*F. mandshurica* Rupr.), распространённый на Дальнем Востоке. Чаще всего ясень растёт в виде примеси в составе широколиственных лесов, его опад ускоряет разложение листьев дуба, осины и других пород, интенсифицируя тем самым круговорот веществ в системе «почва-древостой», а также увеличивая влагоемкость подстилки [8, 7, 13]. В равнинных лесах ясень произрастает в дубравах на наиболее плодородных почвах, также его можно встретить в одних насаждениях вместе с ольхой черной на влажных и сырых местах в поймах рек. По качеству древесины и по характеру роста ясень считается, наряду с дубом, второй главной породой в дубравах [9].

В последние годы исследователи уделяют ясеню особенное внимание в связи с появлением и стремительным распространением его вредителя — ясеновой изумрудной узкотелой златки (*Agrilus planipennis* Fairmaire) и грибного патогена — *Hymenoscyphus fraxineus* (T. Kowalski) Baral, Queloz & Hosoya), вызы-

вающего некроз ветвей и суховершинность деревьев [12]. В 2003 г. был найден первый экземпляр *A. planipennis* в Москве [14], к 2012 г. область распространения златки расширилась в сторону регионов, располагающихся на севере, западе, юго-западе относительно Московской области [1, 2]. *H. fraxineus* на территории России впервые зарегистрирован в 2012 г. на северо-западе — в Красносельском районе Санкт-Петербурга [17], а также в центре европейской части России. В августе 2015 г. патоген был обнаружен на пораженных листьях ясеня обыкновенного в насаждениях Теллермановского опытного лесничества (Воронежская область) [6].

Для ценных лесных пород, в особенности находящихся под угрозой сокращения их площадей, таких как ясень, актуально использование методов генотипирования. Наличие генетического паспорта позволяет идентифицировать отдельные генотипы, определять уровень генетического полиморфизма среди близкородственных видов и внутри вида, оценивать степень гетерозиготности, а также осуществлять другие популяционные исследования [16]. Кроме того, генетические паспорта востребованы при введении в культуру *in vitro* ценных экземпляров представителей древесных пород, для дальнейшего контроля генетической стабильности и идентичности исходному материалу при их длительном хранении [11].

Для паспортизации древесных растений успешно применяются методы молекулярной генетики, позволяющие описывать специфические профили генотипов, одним из которых является генетическая паспортизация с использованием микросателлитных маркеров (SSR, англ. Simple Sequence Repeats). Микросателлитные фрагменты генома являются некодирующими областями ДНК, они содержат повторяющиеся короткие последовательности нуклеотидов. Данные участки случайным образом распределены в хромосомах, они обладают существенной нестабильностью и способны мутировать, что выражается в изме-

нении количества нуклеотидных повторов. Метод молекулярно-генетический паспортизации с применением SSR-маркеров заключается в детекции наличия или отсутствия определенного микросателлитного фрагмента в геноме исследуемого вида, а также, в установлении количества его копий [4].

Для этих целей проводится полимеразная цепная реакция (ПЦР) со специфическими праймерами, комплементарными началу и концу исследуемого фрагмента ДНК. При наличии искомой последовательности ПЦР дает продукт амплификации, впоследствии идентифицируемый методом электрофореза [23]. Набор из достаточного количества маркеров позволяет выявлять различия в микросателлитных профилях даже между близкими подвидами и сортами одного вида, а также исследовать генетический полиморфизм на популяционном уровне [22].

В работе F. Lefort с соавт. сообщается о характеристике 10 новых микросателлитных маркеров у *Fraxinus excelsior* L. и демонстрируется их потенциал для дальнейшего использования в различных видах семейства *Oleaceae*, которое помимо важного рода *Fraxinus* spp., включает род оливковых деревьев *Olea* spp. и множество декоративных растений [19].

Однако до сих пор работы по генетической паспортизации проводились по большей части за рубежом. В то же время наша страна располагает богатыми генетическими ресурсами представителей рода ясень. Среди его видов, помимо ясеня обыкновенного и маньчжурского, встречаются *Fraxinus pennsylvanica* Marsh. – ясень пенсильванский, *Fraxinus americana* L. – ясень американский, *Fraxinus angustifolia* Vahl. – ясень узколистный и др. При этом отдельные виды ясеня обладают значительным фенотипическим сходством, что затрудняет их диагностику, в особенности в период покоя, при отсутствии листьев и плодов. Изготовление генетических паспортов различных видов ясеня также будет способствовать и решению проблемы межвидовой дифференциации.

Цель данного исследования – генетическая паспортизация, с использованием микросателлитных маркеров образцов ясеня обыкновенного (*Fraxinus excelsior* L.), отобранных в ООПТ «Воронежская нагорная дубрава».

Объекты и методы исследования

Объектами исследования послужили деревья вида *Fraxinus excelsior* L., произрастающие в «Воронежской нагорной дубраве» (Правобережное лесничество, г. Воронеж), являющейся уникальным природно-ландшафтным комплексом, расположенным в черте города, имеющим мозаичное распространение [5, 10]. Материалом для проведения работ являлись листья, отобранные с шести деревьев в мае 2020 года.

Выделение ДНК осуществляли модифицированным ЦТАБ-методом. Разрушение мембран растительных клеток проводили с помощью растирания ткани листа пестиком в ступке с 2 % ЦТАБ-буфером [18].

Для визуализации полученного препарата ДНК и определения его качества проводили электрофорез в 0,7 % агарозном геле с добавлением интеркалирующего красителя SYBR Green.

В ходе исследования было протестировано 10 пар праймеров к специфическим микросателлитным локусам для видов рода *Fraxinus* spp., подобранных на основе литературных источников [19] (табл. 1). Для проведения ПЦР-реакции использовался следующий режим амплификации:

- 1) 5 мин, 96 °С – предварительная денатурация;
- 2) 1 мин, 94 °С – денатурация;
- 3) 1 мин – отжиг при специфической для праймеров температуре;
- 4) 30 сек, 72 °С – элонгация;
- (стадии 2–4) повторялись 28–35 циклов;
- 5) 8–10 мин, 72 °С – финальная элонгация.

ПЦР проводилась на амплификаторе «Bio-Rad C1000» (Bio-Rad, США).

Таблица 1

Характеристика микросателлитных локусов, использованных в исследовании для паспортизации ясеня обыкновенного

№	Локус	Последовательность (прямая и обратная)	Температура отжига, °С
1	FEMSATL_1	AGCAGCATTTATGAATGTTC ATCAACTGAAGATGACGACG	60
2	FEMSATL_2	TCTTTATCATCAAAAAATAA TACAAGGTGATATCACTTCT	50
3	FEMSATL_4	TTCATGCTTCTCCGTGTCTC GCTGTTTCAGGCGTAATGTG	52
4	FEMSATL_5	GGATTGAGATTCAATTTGCA TCCGAGTGATGCCTACTCTA	54
5	FEMSATL_8	TGTAGCTCAGGATTGGCAAT AGCGTTGTCCTTAACTTTT	52
6	FEMSATL_10	TTGAGCAACATGTAATTATG AAATATCCGGTGCTTGTGTA	51
7	FEMSATL_11	GATAGCACTATGAACACAGC TAGTTCTACTACTTCAAGAA	52
8	FEMSATL_12	TTTTTGGAACCCCTTGATTTT GATGGACGGGCATTCTTAAT	52
9	FEMSATL_16	TTTAACAGTTAACTCCCTTC CAACATACAGCTACTAATCA	52
10	FEMSATL_19	CTGTTCAATCAAAGATCTCA TGCTCGCATATGTGCAGATA	52

Продукты ПЦР визуализировались путем проведения электрофореза в 2 % агарозном геле в горизонтальной камере в течение 60 мин при напряжении электрического поля 80 В. Применялся однократный ТАЕ-буфер [20]. Окрашивание осуществлялось красителем SYBR Green. Визуализация полученных ампликонов проводилась на ультрафиолетовом трансиллюминаторе.

Размер полученных фрагментов определялся по сравнению с ДНК-маркерами 100 bp Ladder DNA marker («Ахуген», США) и 100 bp + 50 bp («СибЭнзим», Россия).

Распознавание размера продуктов амплификации на цифровых снимках осуществлялось при помощи программного обеспечения «Labimage».

Результаты и их обсуждение

В результате проведенного ПЦР-анализа исследуемых образцов ясеня установлено, что праймеры ко всем задействованным в исследовании локусам дали продукты амплификации. Во всех исследованных локусах наблюдался полиморфизм по количеству продуктов, либо по их размеру. В локусах FEMSATL_1, FEMSATL_2, FEMSATL_5, FEMSATL_8, FEMSATL_11, FEMSATL_19, FEMSATL_10, FEMSATL_12 выявлены отчетливо разделившиеся двойные и тройные продукты. У локусов FEMSATL_16 и FEMSATL_4, давших одиночные, в рамках чувствительности метода, продукты амплификации, выявился полиморфизм размера продуктов, близкий к пределу разрешающей способности метода геле-

электрофореза, что затрудняет однозначную констатацию их сходства или различия по массе.

В таблице 2 приведены данные генетических паспортов исследуемых образцов. Оптимизация гель-электрофореза путем использования концентрированного раствора высококачественной агарозы (3,0–3,5 %), дающей высокое разрешение визуализации продуктов, а также подбора других параметров электрофореза (концентрация буфера, сила тока и напряжение источника питания) позволила обеспечить разделение продуктов, отличающихся по массе на десятки пар нуклеотидов. Определение размера продуктов

производилось с использованием программы «Labimage», позволяющей получить, определить и рассчитать размер (массу) относительно используемого ДНК-маркера, в пределах точности, обеспечиваемой данным методом. Метод электрофореза в агарозном геле позволяет достоверно оценить результат в отношении количества продуктов амплификации, при условии, что полученные ампликоны существенно различаются по массе. Однако для ампликонов, чья масса разнится в пределах единиц пар нуклеотидов, необходимо использование более высокоразрешающих методов, в частности капиллярного электрофореза.

Таблица 2

Генетические паспорта исследуемых образцов ясеня, составленные на основе SSR-маркеров

Локус	Генетические паспорта исследуемых образцов, размер продуктов амплификации (п. н.)					
	4	5	7	9	11	16
FEMSATL_1	~188 ~160	~190 ~182	~202 ~184	~190 ~160 ~112	~180 ~166	~170
FEMSATL_2	~202 ~154	-	-	~208	~208	-
FEMSATL_5	~108	~132	~138	~100	~136 ~100	~138
FEMSATL_8	~140	~169 ~138	~170 ~120	~124	~164 ~116	~156
FEMSATL_10	~422 ~356 ~258	~244 ~184	~160	~410 ~168	~234	~244 ~184
FEMSATL_11	~208	~196 ~180	~186	~188	~184	~182
FEMSATL_12	~182	~188	~174	~230 ~170	~184	~188
FEMSATL_16	~198	~196	~194	~196	~194	~198
FEMSATL_19	~190 ~168	~166 ~142	~184 ~158	~172 ~156	~208 ~186 ~162	~146

При сравнении размеров обнаруженных продуктов амплификации с данными анализа западноевропейских образцов *F. excelsior*, полученных F. Lefort с соавторами [19], обнаруживается сходство диапазона вариации этого параметра. Однако масса некоторых продуктов оказалась ниже крайней границы, приведенной в статье. Существенная разница наблюдается для маркера FEMSATL_10, давшего в том числе продукты с большой массой (~422, ~410, ~356). Подобные ампликоны могут являться неспецифическими артефактами ПЦР-реакции.

Известно, что представители вида ясень обыкновенный обычно содержат диплоидный набор из 46 хромосом [3, 21]. Однако в результате проведенного анализа у образцов 4, 9 и 11 выявлены тройные продукты, что может свидетельствовать о триплоидном наборе хромосом (при этом растительный организм должен быть тригетерозиготой). Но для окончательных выводов о пloidности необходимо проведение цитогенетических исследований.

Количество выявленных двойных продуктов варьирует от 1 до 5 из 10 локусов. Наличие двойного продукта амплификации обычно свидетельствует о гетерозиготности диплоидного организма по данному локусу. Однако следует учитывать, что триплоидные генотипы также могут давать двойной продукт амплификации в случае, если локус гетерозиготен не по всем трем аллелям [16, 4].

Представляет собой интерес и выявленный полиморфизм продуктов амплификации по размеру. В данном случае наблюдается большое количество продуктов, различающихся по массе в пределах одного-двух десятков нуклеотидов. Этот факт свидетельствует о наличии высокого генетического полиморфизма исследуемых образцов ясеня. Изменение массы продуктов амплификации микросателлитных локусов может

быть обусловлено накоплением мутаций в виде стереотипных повторов групп нуклеотидов, которые не влияют на метаболизм растения и поэтому не отбраковываются отбором [4].

Исходя из наличия тройных продуктов амплификации и высокого полиморфизма размеров микросателлитных участков, стоит предположить, что исследуемые образцы характеризуются существенным генетическим разнообразием, несмотря на произрастание на одной территории. Для уточнения степени их генетического родства следует продолжить работы по генотипированию.

Подводя итоги анализа, следует заключить, что полиморфные локусы FEMSATL_1, FEMSATL_2, FEMSATL_5, FEMSATL_8, FEMSATL_11, FEMSATL_19, FEMSATL_10 и FEMSATL_12 следует рекомендовать в качестве маркеров для генетической паспортизации ясеня.

Заключение

В результате проведенного исследования по генетической паспортизации образцов ясеня можно заключить, что использованные праймеры пригодны для генотипирования местных представителей рода *Fraxinus* spp. По итогам проведения ПЦР-анализа они демонстрируют наличие полиморфных продуктов амплификации, в том числе – двойных и тройных.

Полученные генетические паспорта позволяют оценить профиль микросателлитных локусов исследуемых образцов, пригодны для их идентификации и сравнения с другими экземплярами. Паспорта использованных для введения в культуру *in vitro* экземпляров в дальнейшем можно сопоставлять с результатами паспортизации их потомства, выращенного в культуре *in vitro*, для оценки сохранности генетической информации.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Баранчиков, Ю.Н. Инвазийный ареал ясеневой узкотелой златки в Европе: на западном фронте без перемен? / Ю.Н. Баранчиков, В.В. Куртеев // Экологические и экономические последствия инвазий дендрофильных насекомых. – Красноярск, ИЛСОРАН, 2012. – С. 91–94.
2. Гниненко, Ю.И. Выявление ясеневой узкотелой изумрудной златки в лесах европейской части России / Ю.И. Гниненко, Е.Г. Мозолевская, Ю.И. Баранчиков, М.С. Ключкин, Г.И. Юрченко // Защита и карантин растений. – 2012. – № 3. – С. 36–38.
3. Инге-Вечтомов, С.Г. Генетика с основами селекции: Учебник для биологических специальностей университетов / С.Г. Инге-Вечтомов. – М.: Высшая школа, 1989. – 591 с.
4. Календарь, Р.Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р.Н. Календарь, В.И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34. – № 4. – С. 279–296.
5. Кирик, А.И. Количественная оценка популяционных стратегий представителей древесного яруса Воронежской нагорной дубравы / А.И. Кирик, Т.М. Парахневич, В.Т. Попова, А.К. Кондратьева // Лесотехнический журнал. – 2016. – Т. 4. – С. 7–13.
6. Колганихина, Г.Б. Первое обнаружение опасного фитопатогенного гриба *Hymenoscyphus fraxineus* в Теллермановском лесу (южная лесостепь европейской части России) / Г.Б. Колганихина, С.В. Пантелеев // Биология, систематика и экология грибов и лишайников в природных экосистемах и агрофитоценозах. – 2016. – С. 115–118.
7. Кудрявцев, А.Ю. Ясень обыкновенный на восточной границе распространения. Теоретические проблемы экологии и эволюции. Теория ареалов: виды, сообщества, экосистемы / А.Ю. Кудрявцев // V Любимцевские чтения. – Тольятти, 2010. – С. 83–87.
8. Леонтьев, Л.Л. Строение древесины: Учебное пособие по курсу «Древесиноведение с основами лесного товароведения» (специальности 060802, 07200, 260400, 553700, 560900) / Л.Л. Леонтьев. – СПб, 2002. – 84 с.
9. Леса СССР. Леса юга Европейской части СССР и Закавказья (глав. ред. А.Б. Жуков). Т. 3. – М.: Наука, 1966. – 466 с.
10. Луговская, Л.А. Геоэкологический анализ уникальных нагорных дубрав бассейна среднего Дона / Л.А. Луговская, А.В. Землякова, Л.А. Межова, А.М. Луговской // Успехи современного естествознания. – 2016. – № 11. – С. 151–155.
11. Машкина, О.С. Молекулярно-генетическая и цитогенетическая оценка перспективных гибридов и размноженных *in vitro* клонов тополя и осины / О.С. Машкина, Т.П. Федулова, Т.М. Табацкая, А.М. Кондратьева, Е.А. Шабанова // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 2. – С. 60–69.
12. Мусолин, Д.Л. Меж двух огней: ясеневая изумрудная златка и халаровый некроз ясеня в Российской Федерации / Д.Л. Мусолин, А.В. Селиховкин, Ю.Н. Баранчиков, В.Б. Звягинцев, Д.А. Шабунин // Леса России: политика, промышленность, наука, образование. Материалы научно-технической конференции. – СПб., 2016. – Т. 2. – С. 44–46.
13. Новосёлов, А.С. Экологические аспекты лесопользования. Учебное пособие / А.С. Новосёлов. – Вологда, 2016. – 88 с.
14. Орлова-Беньковская, М.Я. Ясени девяти областей центральной России гибнут из-за ясеневой изумрудной узкотелой златки / М.Я. Орлова-Беньковская // Защита и карантин растений. – 2014. – № 1. – С. 32–34.
15. Падутов, В.Е. Применение молекулярно-генетических методов в лесном хозяйстве Беларуси / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Д.И. Каган, О.А. Ковалевич, М.Я. Острикова, С.В. Пантелеев, С.И. Ивановская, Д.В. Кулагин // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 16–20.

16. Чесноков, Ю.В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю.В. Чесноков, А.М. Артемьева // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50. – № 5. – С. 571–578.
17. Шабунин, Д.А. Усыхание ясеня на территории памятника природы «Дудергофские высоты», вызванное грибом *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, и морфологические особенности его аскоспор / Д.А. Шабунин, Т.А. Семакова, Е.В. Давиденко, Р.А. Васаятис // Труды Санкт–Петербургского НИИ лесного хозяйства. – 2012. – № 1–2. – С. 70–79.
18. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochemistry Bull. – 1987. – No. 19. – P. 11–15.
19. Lefort, F. Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (*Oleaceae*) / F. Lefort, S. Brachet, N. Frascaria, Lacoste, K.J. Edwards, G.C. Douglas // Molecular Ecology. – 1999. – Vol. 8. – No. 6. – P. 1088–1089.
20. Sanderson, B.A. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis / B.A. Sanderson, N. Araki, J.L. Lilley, G. Guerrero, L.K. Lewis // Analytical biochemistry. – 2014. – No. 454. – P. 44–52.
21. Thomas, P.A. Biological flora of the British Isles: *Fraxinus excelsior* // Journal of Ecology. – 2016. – Vol. 104. – No. 4. – P. 1158–1209.
22. Turchetto, C. Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species / C. Turchetto, A.L.A. Segatto, J. Beduschi, S.L. Bonatto, L.B. Freitas // AoB Plants. – 2015. – Vol. 7. – doi: 10.1093/aobpla/plv084
23. Weber, J.L. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction / J.L. Weber, P.E. May // American journal of human genetics. – 1989. – Vol. 44. – No. 3. – P. 388.

REFERENCES

1. Baranchikov Ju.N., Kurteev V.V. Invazijnyj areal jasenevoj uzkoteloj zlatki v Evropе: na zapadnom fronte bez peremen? *Jekologicheskie i jekonomicheskie posledstvija invazij dendrofil'nyh nasekomyh*. Krasnojarsk, 2012, pp. 91–94. (In Russian)
2. Gninenko Ju.I., Mozolevskaja E.G., Baranchikov Ju.I., Kljukin M.S., Jurchenko G.I., Vyjavlenie jasenevoj uzkoteloj izumrudnoj zlatki v lesah Evropejskoj chasti Rossii. *Zashita i karantin rastenij*, 2012, no. 3, pp. 36–38. (In Russian)
3. Inge-Vechtomoв S.G., Genetika s osnovami selekcii: Ucheb. dlja biologicheskikh specialnostei universitetov. Moscow, 1989, 591 p. (In Russian)
4. Kalendar' R.N., Glazko V.I. Tipy molekulyarno-geneticheskikh markerov i ih primenenie. *Fiziologija i biohimija kul'turnyh rastenij*, 2002, vol. 34, no. 4, pp. 279–296. (In Russian)
5. Kirik A.I., Parahnevich T.M., Popova V.T., Kondrat'eva A.K. Kolichestvennaja ocenka populjacionnyh strategij predstavitelej drevesnogo jarusa Voronezhskoj nagornoj dubravy. *Forestry engineering journal*, 2016, no. 4, pp. 7–13. (In Russian)
6. Kolganihina G.B., Panteleev S.V. Pervoe obnaruzhenie opasnogo fitopatogenного гриба *Hymenoscyphus fraxineus* v Tellermanovskom lesu (juzhnaja lesostep' evropejskoj chasti Rossii). *Biologija, sistematika i jekologija gribov i lishajnikov v prirodnyh jekosistemah i agrofitocenozah*, 2016, pp. 15–118. (In Russian)
7. Kudrjavcev A.Ju. Jasen' obyknovennyj na vostochnoj granice rasprostraneniya. Teoreticheskie problemy jekologii i jevoljucii. Teorija arealov: vidy, soobshhestva, jekosistemy. *V Ljubishhevskie chtenija*, Tol'jatti, 2010, pp. 83–87. (In Russian)

8. Leont'ev L.L. Stroenie drevesiny: Uchebnoe posobie po kursu "Drevesinovedenie s osnovami lesnogo tovarovedenija" (special'nosti 060802, 07200, 260400, 553700, 560900), St. Petersburg, 2002, 84 pp. (In Russian)
9. Djukov A.B. Lesa SSSR. Lesa juga Evropejskoj chasti SSSR i Zakavkaz'ja, vol. 3, Moscow, 1966, 466 pp. (In Russian)
10. Lugovskaja L.A., Zemljakova A.V., Mezхова L.A., Lugovskoj A.M. Geojekologicheskij analiz unikal'nyh nagornyh dubrav bassejna srednego Dona, *Advances in current natural sciences*, 2016, no. 11, pp. 151–155. (In Russian)
11. Mashkina O.S., Fedulova, T.P., Tabackaja T.M., Kondrat'eva A.M., Shabanova E.A. Molekuljarno-geneticheskaja i citogeneticheskaja ocenka perspektivnyh gibridov i razmnozhenykh *in vitro* klonov topolja i osiny. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, 2016, no. 2, pp. 60–69. (In Russian)
12. Musolin D.L., Selihovkin A.V., Baranchikov Ju.N., Zvjagincev V.B., Shabunin D.A. Mez dvuh ognjej: jasenevaja izumrudnaja zlatka i halarovyy nekroz jasenja v Rossijskoj Federacii. *Lesa Rossii: politika, promyshlennost', nauka, obrazovanie. Materialy nauchno–tehnicheckoj konferencii*, St. Petersburg, 2016, vol. 2, pp. 44–46. (In Russian)
13. Novosjolov A.S. Jekologicheskie aspekty lesopol'zovanija. Uchebnoe posobie, Vologda, 2016, 88 pp. (In Russian)
14. Orlova-Ben'kovskaja M.Ja. Jaseni devjati oblastej central'noj Rossii gibnut iz-za jasenevoj izumrudnoj uzkoteloj zlatki. *Zashita i karantin rastenij*, 2014, no. 1, pp. 32–34. (In Russian)
15. Padutov V.E., Baranov O.Ju., Kagan D., Kovalevich O.A., Ostrikova M.Ja., Pantelev S.V., Kulagin D.V. Primenenie molekuljarno-geneticheskikh metodov v lesnom hozjajstve Belarusi. *Siberian Journal of Forest Science*, 2014, no. 4, pp. 16–20. (In Russian)
16. Chesnokov Yu.V., Artemyeva A.M. Evaluation of the measure of polymorphism Information of genetic diversity. *Agricultural Biology*, 2015, no. 5, pp. 571–578. (In Russian)
17. Shabunin D.A., Semakova T.A., Davidenko E.V., Vasaitis R.A. Usyhanie jasenja na territorii pamjatnika prirody «Dudergofskie vysoty», vyzvannoe gribom *Hymenoscyphus pseudoalbidus*, i morfologicheskie osobennosti ego askospor. *Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute*, 2012, no. 1–2, pp. 70–79. (In Russian)
18. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bull.*, 1987, no. 19, pp. 11–15.
19. Lefort F., Brachet S., Frascaria Lacoste N., Edwards K.J., Douglas G.C. Identification and characterization of microsatellite loci in ash (*Fraxinus excelsior* L.) and their conservation in the olive family (*Oleaceae*). *Molecular Ecology*, 1999, vol. 8, no. 6, pp. 1088–1089.
20. Sanderson B.A., Araki N., Lilley J.L., Guerrero G., Lewis L.K. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Analytical biochemistry*, 2014, no. 454, pp. 44–52.
21. Thomas P.A. Biological flora of the British Isles: *Fraxinus excelsior*. *Journal of Ecology*, 2016, vol. 104, no. 4, pp. 1158–1209.
22. Turchetto C., Segatto A.L.A., Beduschi J., Bonatto S.L., Freitas L.B. Genetic differentiation and hybrid identification using microsatellite markers in closely related wild species. *AoB Plants*, 2015, 7 p.
23. Weber J.L., May P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American journal of human genetics*, 1989, vol. 44, no. 3, p. 388. (In Russian)

Статья поступила в редакцию 7.06.2021