ТРУДЫ САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОГО
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО
ИНСТИТУТА ЛЕСНОГО ХОЗЯЙСТВА

www.journal.spb-niilh.ru
ISSN 2079-6080

DOI 10.21178/2079-6080.2024.2.99
УДК 575.17: 582.632.2

Оценка генетического разнообразия дуба черешчатого в Российской Федерации с применением ДНК-анализа

© В.А. Сиволапов[1], Е.А. Воробьева[1], В.Н. Вепринцев[1], Е.Е. Кулаков[2]

Assessment of the genetic diversity of the pedunculate oak in the Russian Federation using DNA analysis

V.A. Sivolapov, E.A. Vorobyova, V.N. Veprintsev, E.E. Kulakov (Branch of the Federal Budget Institution "Russian Forest Protection Center" – "Forest Protection Center of the Voronezh Region"; Federal State Budgetary Institution «All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology»)

The results of molecular genetic studies of the populations of the pedunculate oak from 23 regions of Russia are presented. The high representation of samples made it possible to assess the level of heterozygosity and identify the most valuable populations. Highly polymorphic loci such as QrZAG5b, QrZAG65, QrZAG112, QrZAG7, QrZAG87, QrZAG96, QrZAG39, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG110 were selected for molecular genetic analysis using ISSR-PCR markers flanked by inverted repeats of microsatellites. In total, 419 alleles were identified, which reflect the variability of genotypes for each subject under study. The greatest polymorphism was observed in the Bryansk, Chuvash and Kirov populations. The predominance of homozygous genotypes was noted in the Pskov and Nizhny Novgorod populations. The studied samples differ insignificantly in the observed and effective number of alleles. To assess the genetic variability of populations, an indicator of expected and observed heterozygosity was calculated, which indicates a high deficiency of heterozygous genotypes. The greatest deficit of heterozygotes was observed in the populations of the Volga and Southern Federal Districts. Closer values of heterozygosity to optimal values were established for samples from the Central Federal District. It was found that each individual tree in the studied populations shows an 80 % deficiency of heterozygotes relative to the population and 84 % relative to the species. It was noted that among all the studied alleles, 81 % were unique, and they occur only in any one locus. On the dendrogram constructed on the basis of the genetic distance, clustering of populations of pedunculate oak into three separate groups is observed. Further studies of oak polymorphism in the uncovered regions are certainly necessary to obtain a complete picture of the structure of the species within the range within the borders of Russia.

Key words: pedunculate oak, microsatellite markers, polymorphism, genetic diversity

Оценка генетического разнообразия дуба черешчатого в Российской Федерации с применением ДНК-анализа

В.А. Сиволапов, Е.А. Воробьева, В.Н. Вепринцев, Е.Е. Кулаков

Приведены результаты молекулярно-генетических исследований популяций дуба черешчатого из 23 регионов России. Высокая представленность выборок позволила оценить уровень гетерозиготности и выделить наиболее ценные популяции. Для молекулярно-генетического анализа с применением ISSR-PCR маркеров, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов, отобраны высокополиморфные локусы, такие как QrZAG5b, QrZAG65, QrZAG112, QrZAG7, QrZAG87, QrZAG96, QrZAG39, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG110. В общей сложности было выявлено 419 аллелей, которые отражают изменчивость генотипов по каждому исследуемому субъекту. Наибольшая полиморфность отмечена у брянской, чувашской и кировской популяций. Преобладание гомозиготных генотипов отмечено в псковской и нижегородской популяциях. Изученные выборки несущественно отличаются по наблюдаемому и эффективному числу аллелей. Для оценки генетической изменчивости популяций рассчитан показатель ожидаемой и наблюдаемой гетерозиготности, который указывает на высокий дефицит гетерозиготных генотипов. Наибольший дефицит гетерозигот отмечен в популяциях Приволжского и Южного федерального округа. Более близкие значения гетерозиготности к оптимальным установлены для выборок из Центрального федерального округа. Установлено, что каждое отдельное дерево в изученных популяциях обнаруживает 80% дефицит гетерозигот относительно популяции и 84% относительно вида. Отмечено, что среди всех изученных аллелей 81 % составили уникальные, причем они встречаются только в каком-либо одном локусе. На дендрограмме, построенной на основании генетического расстояния наблюдается кластеризация популяций дуба черешчатого в три отдельные группы. Продолжение исследований полиморфизма дуба в других регионах безусловно необходимы для получения полной картины структуры вида в рамках ареала в границах России.

Ключевые слова: дуб черешчатый, микросателлитные маркеры, полиморфизм, генетическое разнообразие

Сиволапов Владимир Алексеевич – директор
E-mail: sivolapovva@rcfh.rosleshoz.gov.ru

Воробьева Елена Анатольевна – начальник отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов
E-mail: vorobyevaea@rcfh.rosleshoz.gov.ru

Вепринцев Владислав Николаевич – заместитель начальника отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов
E-mail: veprintsevvn@rcfh.rosleshoz.gov.ru

Кулаков Евгений Евгеньевич – инженер отдела селекции и семеноводства
E-mail: evgenyykulakov@yandex.ru

[1]Филиал Федерального бюджетного учреждения «Российский центр защиты леса» - «Центр защиты леса Воронежской области»
394087 Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105
Телефон: (473) 235-71-45; 235-77-11
E-mail: czl136@rcfh.rosleshoz.gov.ru

[2]ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»
394087 Россия, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105
Телефон: (473) 253-71-89
E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

Введение

Исследование полиморфизма и внутривидовой дифференциации дуба черешчатого имеет важное биоресурсное значение. В настоящее время особую важность приобретают вопросы, связанные с сохранением биоресурсного потенциала аборигенных видов. Систематическое антропогенное давление на растительные сообщества снижает устойчивость растений и приводит к сокращению генетического разнообразия. Поэтому его сохранение возможно только при использовании методов ДНК-анализа, которые позволяют анализировать генетическую изменчивость, характер распределения внутри вида и между изучаемыми популяциями [3]. Применение конкретных методов ДНК-анализа зависит от целей исследования и изученности элементов генома [9]. В настоящее время оценка полиморфизма, исследование дефицита гетерозигот и поиск уникальных фрагментов в генотипе невозможно без микросателлитных (ISSR) маркеров [10, 12]. В качестве праймеров для ISSR-анализа полиморфизма ДНК в ПЦР используют короткие ди- и тринуклеотидные микросателлитные повторы. Данные локусы амплифицируют близко расположенные фрагменты ДНК, как правило, это уникальные фрагменты. В геномах растений количество микросателлитных повторов очень велико, что позволяет оценить и провести сравнение полиморфизма не только отдельных растений, но и популяций [4, 8]. В связи с чем цель исследований состояла в изучении генетической изменчивости ISSR-маркеров для характеристики генетического разнообразия популяций дуба черешчатого в 23 субъектах Российской Федерации. Первоочередными задачами являлись получение данных о количестве аллелей, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, доле гетерозиготных генотипов, построение проекции генетических координат на основании основных генетических параметров популяций.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования послужили 23 популяции дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) из разных регионов Российской Федерации. Географическое происхождение популяций, отобранных для молекулярно-генетического анализа, представлено в таблице 1.

Таблица 1

Географическое происхождение образцов для ДНК-анализа

№ п/п	Регион	Лесничество	Географические координаты, °	
			Широта	Долгота
	Центральный федеральный округ			
1	Воронежская обл.	Теллермановское	51,3309	42,1330
2	Калужская обл.	Медынское	54,9600	35,9100
3	Курская обл.	Курское	51,7610	36,4728
4	Белгородская обл.	Шебекинское	50,6205	36,9811
5	Тамбовская обл.	Тамбовское	52,6902	41,7080
6	Рязанская обл.	Можарское	53,9072	41,4813
7	Брянская обл.	Севское	52,0074	34,2579
	Приволжский федеральный округ			
8	Самарская обл.	Ново-Буянское	53,5300	49,7900
9	Республика Татарстан	Бавлинское	54,3250	52,8488
10	Пензенская обл.	Кададинское	53,3219	46,7491
11	Республика Мордовия	Краснослободское	54,3797	43,8644

№ п/п	Регион	Лесничество	Географические координаты, °	
			Широта	Долгота
12	Саратовская обл.	Аткарское	51,5600	45,0200
13	Кировская обл.	Суводское	57,6152	48,9230
14	Нижегородская обл.	Сергачское	55,5572	46,0913
15	Самарская обл.	Ставропольское	53,4500	49,3800
16	Ульяновская обл.	Сурское	54,5097	46,9103
17	Республика Башкортостан	Аскинское	56,1641	56,2841
18	Республика Чувашия	Ядринское	56,2600	46,5700
19	Оренбургская обл.	Бузулукское	52,7886	52,3330
Южный федеральный округ				
20	Республика Адыгея	Майкопское	44,3994	40,0219
21	Волгоградская обл.	Калачевское	48,7135	43,6126
Северо-Кавказский федеральный округ				
22	Республика Дагестан	Дербентское	42,0219	48,1280
Северо-Западный федеральный округ				
23	Псковская обл.	Печорское	57,3916	28,4833

Оценка генетического разнообразия проводилась на базе лаборатории отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов филиала ФБУ «Рослесозащита» — «ЦЗЛ Воронежской области» в ходе работ по государственному заданию № 053—00007—23—00 на 2023 год и на плановый период 2024 и 2025 годов от 09.01.2023 «Государственный лесопатологический мониторинг в лесах, расположенных на землях лесного фонда Российской Федерации с использованием лабораторных методов диагностики». Образцы для ДНК-анализа представлялись центрами защиты леса из большинства регионов произрастания дуба черешчатого в России. Выделение ДНК проведено CTAB-методом, который модифицирован сотрудниками лаборатории для дуба черешчатого [7].

Концентрацию и качество полученной ДНК определяли с помощью прибора NanoPhotometer P-Class P330. Постановка полимеразной цепной реакции проведена на амплификаторе BIORAD T100. В качестве маркерных участков были использованы локусы QrZAG5b, QrZAG65, QrZAG112, QrZAG7, QrZAG87, QrZAG96, QrZAG39, QrZAG11, QrZAG20, QrZAG110. Детальная характеристика отобранных для работы ядерных микросателлитных маркеров, амплификация ДНК, электрофоретическое разделение приведены в других публикациях [5, 6].

Статистическая обработка полученных генетических профилей проведена с помощью компьютерных программ POPGENE 1.31 и специализированного макроса GenAlEx6 для MS-Excel [11].

Результаты исследований

Широкая географическая представленность популяций дуба черешчатого в исследованиях позволила установить значения числа аллелей на локус, эффективное число аллелей на локус, наблюдаемую и ожидаемую гетерозиготность, индекс фиксации Райта (табл. 2). Стоит отметить, что исследуемые популяции дуба черешчатого произрастают достаточно длительное время (средний возраст насаждений составляет 70 лет) и уровень полиморфизма, вероятно, адаптирован к условиям их произрастания. Поэтому отклонение значений генетического разнообразя от оптимальных значений для конкретных лесорастительных условий (увеличение или уменьшение) приводит к ухудшению состояния популяции [1, 2].

Таблица 2

Показатели генетической изменчивости дуба черешчатого, рассчитанные по результатам микросателлитного анализа

Регион	Na	Ne	Ho	He	F
Воронежская обл.	8,500	4,915	0,417	0,601	0,327
Калужская обл.	7,700	5,070	0,133	0,585	0,777
Курская обл.	9,500	6,598	0,107	0,838	0,874
Белгородская обл.	7,200	4,547	0,165	0,584	1,000
Тамбовская обл.	7,500	4,229	0,170	0,556	0,722
Рязанская обл.	6,800	3,951	0,434	0,607	0,271
Брянская обл.	18,100	4,400	0,889	0,190	0,473
Самарская обл.	7,800	5,029	0,027	0,724	0,967
Республика Татарстан	8,700	5,208	0,063	0,778	0,916
Пензенская обл.	7,900	5,276	0,030	0,776	0,962
Республика Мордовия	9,000	4,916	0,117	0,743	0,827
Саратовская обл.	7,500	4,959	0,094	0,720	0,863
Кировская обл.	10,300	6,772	0,090	0,769	0,890
Нижегородская обл.	6,900	3,484	0,133	0,498	0,747
Самарская обл.	8,600	5,043	0,045	0,691	0,945
Ульяновская обл.	8,400	4,874	0,056	0,725	0,833
Республика Башкортостан	10,200	5,876	0,090	0,814	0,888
Республика Чувашия	13,600	8,466	0,014	0,853	0,984
Оренбургская обл.	7,500	4,184	0,399	0,603	0,322
Республика Адыгея	9,100	4,923	0,094	0,748	0,873
Волгоградская обл.	7,800	5,252	0,133	0,732	0,840
Республика Дагестан	7,100	4,462	0,077	0,707	0,903
Псковская обл.	6,300	3,723	0,406	0,575	0,266

Примечание: Na – число аллелей на локус, Ne – эффективное число аллелей на локус, Ho – наблюдаемая гетерозиготность, He – ожидаемая гетерозиготность, F – индекс фиксации Райта.

По результатам ДНК-анализа отмечено, что все используемые ISSR-маркеры полиморфны. Всего выявлено 419 аллелей, среди которых 10,4 % оказались уникальными. Наибольшее количество аллелей наблюдается в Брянской (18,1), Чувашской (13,6) и Кировской (10,3) выборках. Минимальным количеством аллелей характеризуются популяции из Псковской и Нижегородской областей (6,3 и 6,9 соответственно). Среднее число эффективных аллелей составило 4,968 что характеризует выбранные локусы как высокоэффективные. Стоит отметить, что данный показатель значительно варьировал между исследуемыми популяциями. Наибольшие значения Na установлены для Республики

Чувашия (8,466 ед.) и Кировской области (6,598 ед.), наименьшие – для Брянской области (2,515 ед.).

Среди популяционно-генетических показателей изменчивости популяций одной из самых распространенных является степень гетерозиготности. Для всех изученных популяций уровень наблюдаемой гетерозиготности значительно ниже ожидаемого. Наибольший дефицит гетерозигот наблюдается у популяций из Приволжского федерального округа (Самарская область – 97,3 % дефицит гетерозигот, Ульяновская – 94,4 %, Саратовская – 90,6 %, Нижегородская – 86,7 %) и Южного федерального округа (Волгоградская область – 86,7 %, Республика Адыгея – 90,6 %). Это может быть связано с усыханием дубрав и возрастанием степени изолированности популяций под влиянием в первую очередь антропогенных факторов. Более близкие к оптимальным значения гетерозиготности отмечены в Центральном федеральном округе. Для большинства популяций индекс фиксации Райта оказался положительным, что свидетельствует о дефиците гетерозигот (табл. 3).

Таблица 3

Значения F-статистики Райтадля популяций дуба черешчатого

Локус	Fis	Fit	Fst
QrZAG5b	0,805	0,877	0,370
QrZAG65	0,964	0,982	0,500
QrZAG112	0,922	0,961	0,497
QrZAG7	0,787	0,812	0,121
QrZAG87	0,761	0,788	0,116
QrZAG96	0,807	0,913	0,547
QrZAG39	0,721	0,762	0,147
QrZAG11	0,790	0,816	0,123
QrZAG20	0,682	0,730	0,152
QrZAG110	0,773	0,808	0,153

По результатам исследований отмечен 80 % дефицит гетерозигот относительно популяции (Fis = 0.801), незначительно больше относительно вида – 84 % (Fit = 0,845). Основной вклад в избыток гомозигот вносят локусы QrZAG5b, QrZAG65, QrZAG112, QrZAG96. Предположительно, причиной высокой доли гомозиготных генотипов является эффект Валунда (Wahlund, 1928), когда исследуемые популяции характеризуются неоднородной частотой аллелей. Тогда доля гомозигот в таких популяциях будет больше, чем предсказывается соотношением Харди–Вайнберга. Значения Fst варьировали от 0,116 у локуса QrZAG87 до 0,547 (QrZAG96), что указывает на высокий уровень межпопуляционной дифференциации дуба черешчатого в исследуемых регионах.

В рамках исследований оценен уровень генетической подразделенности между популяциями с использованием генетических дистанций Nei. Наглядное изображение представлено в виде проекции координат PCoA (рис.).

Стоит отметить, что генетические дистанции популяций относительно близки, однако наблюдается четкое разделение по Федеральным округам. В первую группу объединились практически все популяции из ПФО. Второй кластер наблюдается у образцов из ЦФО – Воронежской, Тамбовской и Белгородской областей, средние генетические расстояния которых составляют 3,321.

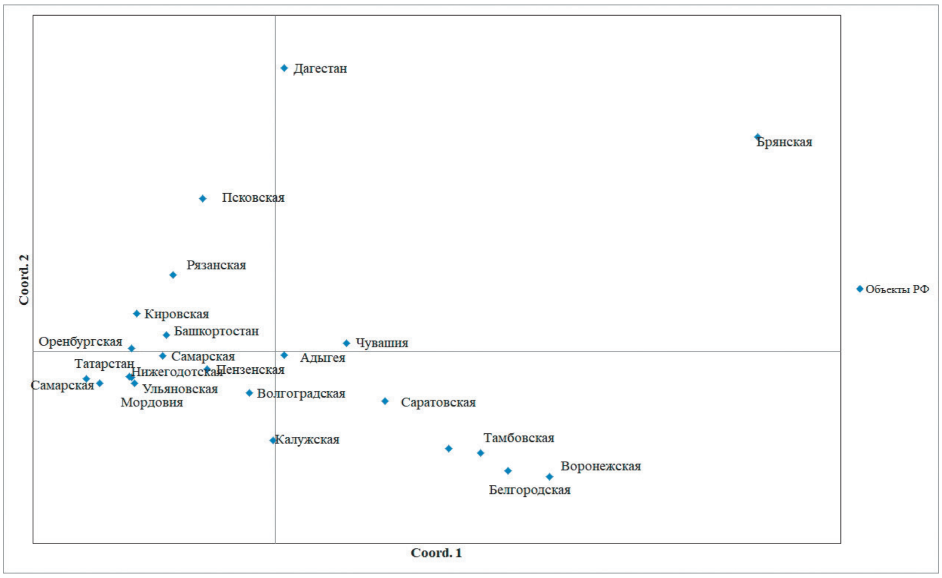

Рис. Проекция генетических расстояний PCoA популяций дуба черешчатого

Выводы

1. Анализ десяти микросателлитных праймеров выявил 419 аллельных вариантов, большинство которых высокополиморфные. Данные фрагменты могут быть использованы при генетической паспортизации и контроле оборота репродуктивного материала.

2. Сопоставленные значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности показали высокий дефицит гетерозиготных генотипов по всем изученным локусам.

3. Установленные значения основных показателей генетического полиморфизма свидетельствуют о высоком уровне генетического разнообразия выборок.

4. В целом выявленная с помощью ядерных микросателлитных локусов популяционная структура дуба черешчатого в различных регионах Российской Федерации свидетельствует о генетической близости большинства исследованных популяций. Обособленность популяций из Брянской области и Республики Дагестан может отражать отличия в уровне генетического разнообразия этих популяций, связанные с особенностями произрастания и распространения дуба черешчатого в послеледниковый период.

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания Федерального Агентства лесного хозяйства в период 2020–2023 гг., в том числе № 053–00011–24–00 от 26 декабря 2023 г. для ФБУ «Рослесозащита» на проведение Государственного лесопатологического мониторинга в лесах, расположенных на землях лесного фонда Российской Федерации с использованием лабораторных методов диагностики.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Алтухов, Ю.П. Генетические процессы в популяциях / Ю.П. Алтухов. – М. : ИКЦ «Академкнига», 2003. – 431 с.
2. Алтухов, Ю.П. Динамика популяционных генофондов при антропогенных воздействиях / Ю.П. Алтухов, И.А. Захаров, Ю.А. Столповский и др. / под ред. Алтухова Ю.П. – М. : Наука, 2004. – 619 с. – ISBN 5-02-002859-2.
3. Боронникова, С.В. Молекулярно-генетическая идентификация и паспортизация редких и находящихся под угрозой исчезновения видов растений : монография / С.В. Боронникова. – Пермь : Перм. ун-т., 2008. – 120 с.

4. Боронникова, С.В. Исследование генетической изменчивости популяций редкого вида Урала *Adenophoralilifolia* (L.) DC. на основании анализа полиморфизма ISSR-маркеров / С.В. Боронникова // Генетика. – 2009. – Т. 45, № 5. – С. 1–4.
5. Габитова, А.А. Дуб черешчатый (*Quercus róbur* L.) на Южном Урале: эколого-генетический анализ популяционной структуры : автореф. дис. … канд. биол. наук / А.А. Габитова. – Уфа, 2012. – 18 с.
6. Кулаков, Е.Е. Оценка полиморфизма дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) с помощью SSR-анализа / Е.Е. Кулаков, Е.А. Воробьева, В.А. Сиволапов, Н.А. Карпеченко // Лесной вестник / ForestryBulletin. – 2021. – Т. 25, № 4. – С. 44–51. – DOI 10.18698/2542-1468-2021-4-44-51.
7. Программа и Методика по пункту 59. План мероприятий («дорожной карты») «Развитие биотехнологий и генной инженерии», утв. распоряжением Правительства РФ Природопользование от 18 июля 2013 г. № 1247-р. Программа и Методика утверждена ФБУ «Рослесозащита» 12.02.2014. – Пушкино, 2014. – 205 с.
8. Светлакова, Т.Н. Генетическая дифференциация популяций *Populus tremula* L. в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров / Т.Н. Светлакова, И.В. Бобошина, Ю.С. Нечаева и др. // Аграрный Вестник Урала. – 2012. – № 3 (95). – С. 11–13.
9. Харченко, П.Н. ДНК-технологии в развитии агробиологии / П.Н. Харченко, В.И. Глазко. – М. : Воскресенье, 2006. – 480 с.
10. Lexer, C. Microsatellite analysis of small anonymous seed lot samples from pedunculate oak (*Quercus robur*): a promising approach to monitor the number of different seed parents and pollen donors / C. Lexer, B. Heinze, S. Gerber [et al.] // Forest Sciences. – 2001. – Vol. 70. – P. 239–250.
11. Sambrook, J. Gel electrophoresis of DNA / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis // Molecular Cloning: a Laboratory Manual. – New York : Could Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989. – Chapter 6.
12. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. – 1994. – Vol. 20. – P. 176–183.

REFERENCES

1. Altuhov Ju.P. Geneticheskie processy v populjacijah [Genetic processes in populations]. Moscow, ICC "Akademkniga", 2003, 431 p. (In Russian).
2. Altuhov Ju.P., Zaharov I.A., Stolpovskij Ju.A., Pukhal'skiy V.A., Pomortsev A.A., Upelniyek V.P., Kalabushkin B.A. Dinamika populjacionnyh genofondov pri antropogennyh vozdejstvijah [Dynamics of population gene pools under anthropogenic influences]. Moscow, Science, 2004, 619 p. (In Russian).
3. Boronnikova S.V. Molekuljarno-geneticheskaja identifikacija i pasportizacija redkih i nahodjashhihsja pod ugrozoj ischeznovenija vidov rastenij : monografija [Molecular genetic identification and certification of rare and endangered plant species : monograph]. Perm', Perm. un-t, 2008, 120 p. (In Russian).
4. Boronnikova S.V. Issledovanie geneticheskoj izmenchivosti populjacij redkogo vida Urala *Adenophora lilifolia* (L.) DC. na osnovanii analiza polimorfizma ISSR-markerov [Study of genetic variability of populations of a rare species of the Urals *Adenophora lilifolia* (L.) DC. based on the analysis of the polymorphism of ISSR markers]. *Genetika*, 2009, v. 45, no. 5, pp. 1–4. (In Russian).
5. Gabitova A.A. Dub chereshchatyj (*Quercus róbur* L.) na Juzhnom Urale: jekologo-geneticheskij analiz populjacionnoj struktury : avtoref. dis. … kand. biol. nauk. [Petiolate oak (*Quercus robur* L.) in the Southern Urals: ecological and genetic analysis of population structure. Abstract. dis. ... cand. biol. sciences]. Ufa, 2012, 18 p. (In Russian).
6. Kulakov E.E., Vorob'eva E.A., Sivolapov V.A., Karpechenko N.A. Ocenka polimorfizma duba chereshchatogo (*Quercus robur*) s pomoshh'ju SSR-analiza [Evaluation of polymorphism of oak petiolate (*Quercus robur*) using SSR analysis]. *Lesnoj vestnik* [*Forestry Bulletin*], 2021, v. 25, no. 4, pp. 44–51. (In Russian).
7. Programma i Metodika po punktu 59. Plan meroprijatij («dorozhnoj karty») «Razvitie biotehnologij i gennoj inzhenerii», utv. rasporjazheniem Pravitel'stva RF Prirodopol'zovanie ot 18 ijulja 2013 g. № 1247-r. Programma i Metodika utverzhdena FBU «Roslesozashhita» 12.02.2014 [Program and Methodology under item 59. The Action plan ("roadmap") "Development of biotechnologies and genetic engineering", approved by the Decree of the Government of the Russian Federation Nature Management dated July 18, 2013, N 1247-R. The Program and Methodology were approved by the Federal State Budgetary Institution "Roslesozashchita" on 12.02.2014.]. Pushkino, 2014, 205 p. (In Russian).

8. Svetlakova T.N., Boboshina I.V., Nechaeva Ju.S. Geneticheskaja differenciacija populjacij *Populus tremula* L. v Permskom krae na osnovanii polimorfizma ISSR-markerov [Genetic differentiation of populations of *Populus tremula* L. in the Perm Region based on the polymorphism of ISSR markers]. *Agrarnyj Vestnik Urala* [*Agrarian Bulletin of the Urals*], 2012, no. 3 (95), pp. 11–13. (In Russian).
9. Harchenko P.N., Glazko V.I. DNK-tehnologii v razvitii agrobiologii [DNA technologies in the development of agrobiology]. Moscow, Voskresen'e [Moscow, Sunday], 2006, 480 p. (In Russian).
10. Lexer C., Heinze B., Gerber S., Macalka-Kampfer S., Steinkellner H., Ziegenhagen B., Kremer A., Glössl J. Microsatellite analysis of small anonymous seedlot samples from pedunculate oak (*Quercus robur*): a promising approach to monitor the numberof different seed parents and pollen donors. *Forest Sciences*, 2001, vol. 70, pp. 239–250.
11. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Gel electrophoresis of DNA. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA,* 1989, Chapter 6.
12. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, vol. 20, pp. 176–183.

Статья поступила в редакцию 4.12.2023