



DOI 10.21178/2079-6080.2019.3.51
УДК 630*232.13

Использование RAPD- и SSR-маркеров для генетической паспортизации биотипов тополя

© С.Г. Ржевский, Т.А. Гродецкая, Т.П. Федулова, В.А. Царев

Use of RAPD and SSR markers for genetic certification of poplar biotypes

S.G. Rzhovsky, T.A. Grodetzkaya, T.P. Fedulova, V.A. Tsarev (“All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology”, Voronezh)

Results of the genetic certification of breeding valuable varieties and poplar hybrids, carried out by the genotyping using RAPD method are presented. The degree of genetic affinity of the studied samples based on the polymorphism of the amplification used RAPD locuses has shown up by means of the cluster analyses. These results were compared with the results of genotyping of the same poplar samples previously performed using microsatellite SSR markers. And we can conclude that the RAPD analysis is quite informative for the genetic certification of forest tree cultivars, and has several advantages. The results of cluster analysis correspond to the biological nature of the samples. Randomly amplified primers were characterized by high polymorphism of products, providing a sufficient amount of information for statistical processing. All RAPD primers used in one study have the same amplification parameters as the analysis of a large number of samples without selecting individual conditions for annealing. A comparison of the results of RAPD and SSR analyses carried out for the same samples shows their significant coincidence, with the exception of genotypes with the most complex hybrid origin. The correspondence of the results obtained by using of these methods of genetic certification confirms their reliability and practical value. Thus, despite the somewhat “archaic” features, genotyping method with using of RAPD is quite applicable in forestry; it can be carried out in addition to other certification methods; and it can be used as an express method for determining the genetic polymorphism of various tree species.

Key words: poplar, genetic certification, RAPD, SSR, similarity dendrograms

Использование RAPD- и SSR-маркеров для генетической паспортизации биотипов тополя

С.Г. Ржевский, Т.А. Гродецкая, Т.П. Федулова, В.А. Царев

В данной работе представлены результаты генетической паспортизации селекционно ценных сортов и гибридов тополя, осуществленной методом генотипирования с использованием RAPD-молекулярных маркеров. На основе полученных данных проведен кластерный анализ, показывающий степень генетического сродства исследуемых образцов, исходя из полиморфизма продуктов амплификации используемых RAPD-локусов. Осуществлено сравнение с результатами генотипирования тех же образцов тополя, ранее выполненного с использованием микросателлитных SSR-маркеров. По итогам проведенного исследования можно заключить, что RAPD-анализ является достаточно информативным для осуществления генетической паспортизации лесных древесных пород и обладает рядом преимуществ. Результаты кластерного анализа в целом соответствуют биологической природе образцов. Случайно амплифицируемые праймеры характеризуются высоким полиморфизмом продуктов, предоставляют достаточный массив информации для статистической обработки. Для всех RAPD-праймеров, используемых в исследовании, характерны одинаковые параметры амплификации, что позволяет проводить анализ большого количества образцов без подбора индивидуальных условий для отжига каждого праймера. Сопоставление результатов RAPD- и SSR-анализов, проведенных в отношении одних и тех же образцов, показывает их существенное совпадение, за исключением генотипов с наиболее сложным гибридным происхождением. Соответствие результатов подтверждает достоверность используемых методов генетической паспортизации, их практическую ценность. По итогам исследования можно заключить, что, несмотря на некоторую «архаичность» метода, генотипирование с использованием случайных декамерных нуклеотидов вполне применимо в лесном хозяйстве, его можно проводить в дополнение к другим способам паспортизации, используя данный анализ в качестве экспресс-метода определения генетического полиморфизма образцов различных видов и сортов древесных растений.

Ключевые слова: тополь, генетическая паспортизация, RAPD, SSR, дендрограммы сходства.

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

E-mail: slavaosin@yandex.ru

Гродецкая Татьяна Александровна – младший науч. сотр. лаборатории биотехнологии

Федулова Татьяна Петровна – ведущий науч. сотр., д-р биол. наук

Царев Вадим Анатольевич – старший науч. сотр. лаборатории селекции, канд. с.-х. наук

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

394000, Воронеж, ул. Ломоносова, 105.

E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

Введение

В настоящее время важной задачей лесной селекции является разработка методов генетической паспортизации и идентификации различных форм, гибридов и сортов древесных растений. В качестве одного из традиционных способов генотипирования выступает проведение полимеразной цепной реакции со случайными праймерами, т. е. декамерными нуклеотидными последовательностями – RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA). И хотя в последнее время широко распространены методы генотипирования с применением высокоспецифичных праймеров (микросателлитный анализ с SSR-или ISSR-маркерами), RAPD-анализ не утратил актуальности, в связи с некоторыми его особенностями.

Преимуществом данного метода является техническая простота его реализации, отсутствие необходимости получения информации о последовательности ДНК, малые количества матрицы ДНК, необходимые для анализа [14]. Для выполнения исследований не требуется применение радиоактивных веществ, метод относительно дешев и предоставляет возможности для автоматизации процесса [2, 16].

RAPD-анализ позволяет обнаруживать полиморфизмы ДНК с использованием одного праймера произвольной нуклеотидной последовательности. В этой реакции один вид праймеров отжигается на геномную ДНК в двух разных сайтах на комплементарных цепях матрицы. Если эти сайты находятся в пределах диапазона амплификации, образуется дискретный ДНК-продукт. Обычно каждый праймер инициирует амплификацию нескольких дискретных локусов в геноме, реакция дает ряд различных продуктов, что делает анализ полезным для эффективного скрининга полиморфизма нуклеотидных последовательностей, выявления различий между индивидуумами. Однако из-за стохастической природы амплификации ДНК-праймеров со случайной последова-

тельностью важно оптимизировать и поддерживать условия реакции для получения воспроизводимой амплификации ДНК. Для проведения RAPD-анализа используются короткие синтетических праймеры (обычно 10 нуклеотидов) случайной последовательности. Эти олигонуклеотиды служат как прямым, так и обратным праймером и обычно способны амплифицировать фрагменты от 1 до 10 геномных сайтов одновременно. Считается, что наблюдаемый в результате полиморфизм продуктов обусловлен главным образом вариацией сайтов отжига праймеров, но они также могут быть вызваны различиями в амплифицированной последовательности между сайтами отжига [12].

Более точные результаты позволяет получить анализ с применением микросателлитных маркеров (SSR – Simple Sequence Repeats). Этот метод ПЦП с фланкирующими праймерами к коротким tandemным повторам пригоден для обнаружения гетерозигот по заданному локусу. В подобном анализе используется пара праймеров – прямой и обратный, размером около 20 нуклеотидов. Фланкирующие последовательности для каждого SSR-локуса обычно являются видоспецифичными. К основным свойствам микросателлитных локусов можно отнести сложный характер распределения по генам, высокий уровень полиморфизма (они мутируют во много раз чаще, чем структурные гены) и наличие специфических механизмов возникновения аллельных вариантов (ошибки репликации, ошибки кроссинговера) [2].

Оба выше рассмотренных метода находят применение в генотипировании лесных древесных растений, однако предпочтение чаще отдается использованию специфичных праймеров, в частности SSR. Тем временем, проводятся исследования, сравнивающие эффективность различных способов генетической паспортизации. Так, на материале некоторых представителей рода *Artemisia* была определена конгруэнтность результатов RAPD- и ISSR-анализа. ISSR-маркеры также относятся

к микросателлитным участкам генома, однако принцип их действия иной: если использование фланкирующих праймеров в SSR-анализе дает в качестве продуктов амплификации сами фрагменты микросателлитной последовательности, то ISSR-анализ позволяет амплифицировать участки ДНК, находящиеся между микросателлитами. Результат данного исследования показал, что RAPD-маркеры оказались более эффективными в отношении выявления генетического полиморфизма по сравнению с ISSR [11].

Сходное исследование было проведено на материале образцов культурной сои *Glycine max* и ее дикого предка *G. soja*: сравнивалась эффективность методов RFLP (restriction fragment length polymorphism), AFLP (amplified fragment length polymorphism), а также RAPD и SSR. В результате SSR-маркеры продемонстрировали самую высокую ожидаемую гетерозиготность, в то время как AFLP-маркеры показали наиболее высокий эффективный коэффициент мультиплексирования. При сопоставлении матриц генетического сходства как культивируемых, так и диких соевых бобов, оценки, основанные на RFLP, AFLP и SSR, проявляют существенное сходство что указывает на конгруэнтность между этими анализами. Корреляция данных RAPD-анализа с результатами, полученными с использованием других систем маркеров, была ниже. Однако в пределах вида *G. max* оценки сходства RAPD и AFLP соответствуют в большей степени, чем оценки, включающие другие системы маркеров [15].

Подобные результаты свидетельствуют о том, что RAPD-анализ, несмотря на простоту и неспецифичность, еще не стоит исключать из арсенала молекулярных лабораторий. Он может найти свое применение для решения определенного круга задач. Для того чтобы определить его применимость в сфере генетической паспортизации лесных древесных пород необходимо сопоставить результаты гено-

типирования одних и тех же образцов, проведенного с использованием «случайных праймеров» и специфичных к микросателлитным локусам праймеров.

Целью данной работы являлось осуществление генотипирования шести селекционно ценных образцов тополя с использованием RAPD-маркеров и сопоставление результатов с генетическими паспортами, ранее полученными для тех же образцов методом SSR-анализа. Для выполнения данной работы было необходимо провести выделение ДНК из исследуемых образцов, осуществить ПЦР-амплификацию со случайными праймерами, визуализировать получившиеся продукты и определить их размер, а также провести статистическую обработку результатов методом кластерного анализа.

Методика и объекты исследований

Представители рода *Populus L.* обладают существенной экономической и экологической значимостью, среди них имеются быстрорастущие и устойчивые к стрессовым факторам представители. Отечественными селекционерами создаются новые гибриды и сорта тополя, которые нуждаются в генетической паспортизации для идентификации и инвентаризации селекционно ценного посадочного материала.

В данной работе была оценена возможность использования различных типов молекулярных маркеров для осуществления генетической паспортизации селекционно ценных гибридов тополя, в том числе, официально получивших в 2017-2019 гг. статус сорта в Росреестре.

Для данного исследования были отобраны шесть образцов тополя, произрастающих в Семилукском лесопитомнике Воронежской области, а также прошедших ювенилизацию и размножение на коллекционно-маточной плантации в лесопарковом участке ФГБУ «ВНИИЛГИСБиотех» (табл. 1) [1, 5-9, 17, 18].

Таблица 1

Перечень и происхождение гибридов и сортов тополя, отобранных для проведения генетической паспортизации

Наименование гибрида (сорта)	Происхождение, автор гибрида (сорта)
'Болид' 'Ведуга'	Сорт А.П. Царева (<i>P. alba</i> L. × <i>P. bolleana</i> Lauche)
'Бриз'	Сорт Р.П. Царевой и В.А. Царева (<i>P. nigra</i> L., полусибс от тополя "Пионер" селекции А.С. Яблокова)
'Сюрприз'	Сорт Р.П. Царевой и В.А. Царева (<i>P. nigra</i> L., полусибс от тополя итальянского I-455)
'Степная Лада'	Сорт А.П. Царева (<i>P. deltoides</i> W. Bartram ex Marshall × тополь Пирамидально-осоконовый Камышинский селекции А.В. Альбенского (<i>P. pyramidalis</i> Roz. × <i>P. nigra</i> L.))
'Э.с.-38'	"Элитный сеянец, или Воронежский гигант" – гибрид М.М. Вересина (<i>P. deltoides</i> W. Bartram ex Marshall × <i>P. balsamifera</i> L., получен в присутствии смеси пыльцы <i>P. alba</i> и <i>P. tremula</i>)

Выделение ДНК осуществлялось преимущественно из только что распустившихся листьев (черенки для исследования были заготовлены в марте) модифицированным ЦТАБ-методом [10, 3]. Образцы ткани гомогенизировались в ступке с подогретым 2% ЦТАБ-буфером (содержащим 2% цетилтриметиламмоний бромид, 1,5 М NaCl, 100 мМ трис(гидроксиметил)аминометана, 50 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты; с рН 8,0). Полученный гомогенат инкубировался в термостате, в течение 30 минут при 65 °С, пробирки периодически встряхивали. После охлаждения к гомогенату добавляли равный объем смеси хлороформа и изоамилового спирта (в соотношении 24:1), содержимое перемешивалось. Затем, после центрифугирования в течение 15 минут (со скоростью 14000 об/мин, при комнатной температуре), к отобранному супернатанту добавлялся равный объем хлороформа и осуществлялось повторное центрифугирование. Полученный супернатант переносили в новые пробирки и добавляли двойной объем 96% этилового спирта для осаждения ДНК. Далее пробирки инкубировались в течение 30 минут при –20 °С, после чего их в течение 30 минут подвергали центрифугированию (со скоростью 14000 об/мин,

при 4 °С). Надосадочная жидкость отбиралась, осадок промывался 70% этанолом, затем высушивался и растворялся в очищенной воде.

Для визуализации полученного препарата ДНК и оценки его качества проводился электрофорез в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в горизонтальной камере Power Pac TM Universal («BioRad», США). Полученный препарат ДНК хранился при –20 °С и в дальнейшем использовался для проведения ПЦР.

В процессе исследования, на основе литературных данных, было подобрано и протестировано 6 RAPD-локусов для видов рода *Populus* [13] (табл. 2). Для праймеров каждого локуса была оптимизирована температура отжига. Для проведения ПЦР-реакции использовался следующий режим амплификации:

- 1) 3 минуты – предварительная денатурация при 95 °С;
- затем 35 циклов 2-4:
- 2) 30 секунд – денатурация при 95 °С,
- 3) 45 секунд – отжиг при 35 °С,
- 4) 60 секунд – элонгация при 72 °С;
- 5) 5 минут – окончательная элонгация при 72 °С.

Таблица 2

Последовательности праймеров, использованных в исследовании	
Маркировка	Последовательность нуклеотидов
UBC-157	CCTCCGCAGG
UBC-180	CCGCCACGCT
UBC-99	CCTCCCCAC
UBC-457	CGACGCCCTG
UBC-459	CCCTCCACCC
UBC-515	CCCCCCTCA

Использовалась реакционная ПЦР-смесь (объем 25 мкл) следующего состава: ПЦР-буфер (2,5 мкл), смесь четырех dNTP, 2 мМ (2,5 мкл), смесь прямого и обратного праймера, 2 мкМ (1 мкл), ДНК-матрица 1 мкл, Taq-полимераза 5 ед./мкл (0,3 мкл), вода 18 мкл. ПЦР проводилась на аппарате CFX96 («BioRad», США).

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в горизонтальной камере Power Pac TM Universal («BioRad», США) в течение 50 минут при напряжении электрического поля 80 В, с охлаждением в холодильной камере. Применялся однократный ТАЕ-буфер. Окрашивание осуществлялось бромидом этидия. Визуализация полученных ампликонов проводилась на трансиллюминаторе TFP («Vilber Lourmat», Франция).

Размер полученных фрагментов определялся по сравнению с ДНК-маркерами 100 bp Ladder DNA marker с шагом 100 п. н. (100 п. н. – 1000 п. н.) («Ахуген», США), 50 bp Ladder DNA marker (100 п. н. + 50 п. н.) («СибЭнзим», Россия) и High Range DNA Marker 1000-10000 п. н. («Ахуген», США).

Оценка результатов анализа проводилась на основе ПЦР-ампликонов, представленных в достаточной концентрации. Распознавание размера продуктов амплификации на цифровых снимках и определение их диапазона осуществлялось при помощи программного обеспечения «Labimage» (Kapelan, Германия). Статистическая обработка данных проводилась в программе «Past v. 3.24» (yvind Hammer, Норвегия), дендрограммы сходства строились

по алгоритму UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) в режиме «correlation».

Генетические паспорта данных биотипов тополя, выполненные посредством метода SSR-анализа, были представлены в публикации ранее [4].

Результаты исследования

В результате проведенного анализа все использованные праймеры показали наличие полиморфизма у исследованных генотипов тополя. Анализ образцов проводился на основе электрофореграмм полученных ПЦР-продуктов. При этом в результате амплификации образовывались как «основные» продукты, находящиеся в высокой концентрации, повторяющиеся у образцов со сходным генотипом, так и дополнительные, присутствующие в низкой концентрации и переменные у всех проанализированных образцов (они были исключены из анализа). Наличие дополнительных продуктов может быть обусловлено особенностями метода, при котором в ходе ПЦР-амплификации отжиг декануклеотидных праймеров происходит при относительно низких температурах (35 °С), что повышает вероятность возникновения ошибок амплификации, появления неспецифических продуктов.

Определение размеров ампликонов и статистическая обработка полученных данных RAPD-анализа свидетельствуют о том, что исследуемые образцы ДНК с используемыми праймерами дают от одного до шести четко выраженных ампликонов длиной от 380 до

2025 п. н. При этом наименее полиморфным оказался праймер UBC-157, наиболее полиморфными – UBC-99 и UBC-457. В таблице 3 приведены генетические формулы проанализированных образцов, содержащие перечень отчетливых продуктов амплификации, и указание их размера для каждого образца.

Таблица 3

Генетические формулы исследованных образцов тополя

Праймер	Размер продуктов амплификации, п. н.					
	'Болид'	'Ведуга'	'Сюрприз'	'Бриз'	'Степная Лада'	'Э.с.-38'
UBC-515	1100	964	1003	2023	946	928
	1013	438	522	1540	522	
	451			1003		
UBC-459	767	738	1012	1608	966	975
	506	492	889	1361	739	732
			420	575	559	559
UBC-157	1443	–	–	–	1509 1321	–
UBC-99	1506	1065	1524	1524	1934	1229
	1065	819	1172	1144	1737	
	819			1091	1215	
				533 441	890	
UBC-457	1668	1197	1259	1243	1212	1152
	1228	521	1137	1137	1137	1137
	556	446	826	903	826	826
	465	366	459	826	459	459
	379			459		
UBC-180	1683	944	1359	891	1483	1483
	926		921	679	701	
			665		646	
			610			

Далее, на основе полученной матрицы продуктов RAPD-анализа был проведен кластерный анализ с применением алгоритма UPGMA, его результаты, в виде дендрограммы генетического сходства, представле-

ны на рисунке. Здесь же приведена схема, построенная для тех же образцов, на основе ранее полученных методом SSR-анализа генетических паспортов [4].

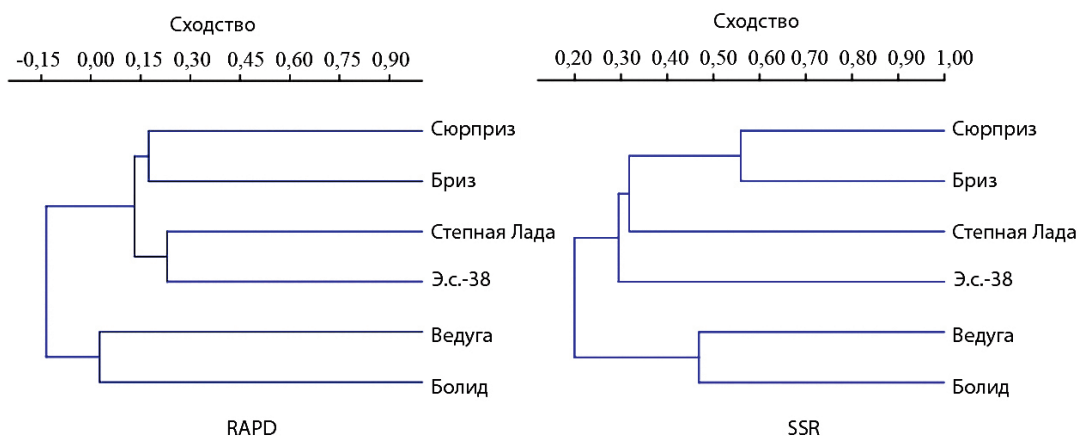


Рис. Дендрограммы генетического сходства исследованных образцов тополя, полученные разными методами анализа

Результаты статистической обработки данных RAPD-анализа свидетельствуют о том, что близкие по происхождению сорта, в частности, 'Болид' и 'Ведуга', являющиеся гибридами тополя белого, оказались на полученной дендрограмме в одном кластере, в другом – гибриды тополя черного 'Бриз' и 'Сюрприз'. Также в одном кластере находятся гибриды тополя дельтовидного 'Степная Лада' и 'Э.с.-38'. Результат подтверждает возможность использования данного метода для установления филогенетических взаимоотношений исследованных генотипов тополя.

При сравнении данного результата с дендрограммой, построенной для тех же образцов по аналогичным алгоритмам, но на основе данных SSR-анализа, мы видим, что обе схемы в существенной мере совпадают. Различие наблюдается для образцов 'Степная Лада' и 'Э.с.-38'.

Таким образом, становится очевидным, что анализы, проведенные разными методами, с интервалом в несколько лет, дают сопоставимые результаты, хотя и не абсолютно идентичные. Наблюдаемые расхождения для некоторых образцов могут быть обусловлены их сложной гибридной природой. 'Степная Лада' является гибридом от гибрида: *P. deltooides* × (*P. pyramidalis* × *P. nigra*). Гибрид

'Э.с.-38' был получен от скрещивания *P. deltooides* × *P. balsamifera* в присутствии смеси пыльцы *P. alba* и *P. tremula*. Более достоверный результат генотипирования может быть получен при использовании большего количества маркеров, однако в данном исследовании их количество было ограничено, применялись 6 RAPD- и 12 пар SSR-праймеров.

Выводы

1. По итогам проведенного исследования можно заключить, что RAPD-анализ является достаточно информативным для осуществления генетической паспортизации лесных древесных пород и обладает рядом преимуществ. Случайно амплифицируемые праймеры характеризуются высоким полиморфизмом продуктов, предоставляющим достаточный массив информации для статистической обработки. Для всех RAPD-праймеров, используемых в одном исследовании, характерны одинаковые параметры амплификации, что позволяет проводить анализ большого количества образцов в одном приборе-термоциклере, не подбирая индивидуальные условия для отжига каждого праймера. Немаловажной является дешевизна данного метода: для анализа необходим синтез коротких декануклеотидных цепочек, причем каждый праймер

играет роль прямого и обратного, что исключает необходимость создания пары праймеров для каждого локуса, как в микросателлитном анализе.

2. Данный метод также обладает рядом недостатков. Он характеризуется невысокой повторяемостью по причине образования побочных продуктов амплификации. Случайно амплифицируемые праймеры не обладают узкой видовой специфичностью. Наличие большого количества продуктов амплификации, близких по размеру и проявляющихся в низкой концентрации, затрудняет распознавание результатов. Эти особенности сужают круг задач, для реализации которых пригодны RAPD-маркеры.

3. Сопоставление результатов RAPD- и SSR-анализов, проведенных в отношении од-

них и тех же образцов, показывает их существенное совпадение, за исключением генотипов с наиболее сложным гибридным происхождением. Соответствие результатов подтверждает достоверность используемых методов генетической паспортизации, их практическую ценность.

Таким образом, несмотря на некоторую «архаичность» метода, генотипирование с использованием случайных декамерных нуклеотидов вполне применимо для лесных древесных растений, его можно проводить в дополнение к другим способам паспортизации (например, SSR- и ISSR-генотипирование), применяя данный анализ в качестве экспресс-метода определения генетического полиморфизма образцов различных форм, гибридов и сортов древесных растений.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Вересин, М.М. Новый гибридный тополь для лесных культур и озеленения / М.М. Вересин // Лесохозяйственная информация. – 1974. – № 6. – С. 14–15.
2. 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. 51–55.
3. Рябушкина, Н.А. Специфика выделения ДНК из растительных объектов / Н.А. Рябушкина, М.Е. Омашева, Н.Н. Галиакпаров // Eurasian Journal of Applied Biotechnology. – 2012. – № 2. – С. 9–26.
4. Федулова, Т.П. Изучение генетического разнообразия сортообразцов тополя (*Populus L.*) на основе SSR-маркеров / Т.П. Федулова, А.М. Кондратьева, П.М. Евлаков, И.И. Марчук // Лесотехнический журнал. – 2016. – Т. 6. – № 4 (24). – С. 105–111.
5. Царев, А.П. Динамика сохранности и продуктивности настоящих тополей при испытании в условиях умеренного климата / А.П. Царев, Р.П. Царева, В.А. Царев // Информационный вестник ВОГиС. – 2010. – Т. 14. – № 2. – С. 255–264.
6. Царев, А.П. Испытание клонов и гибридов тополей подрода *Leuce Dode* / А.П. Царев, Р.П. Царева, В.А. Царев // Вестник Московского государственного университета леса – Лесной Вестник. – 2012. – Т. 84. – Вып. 1. – С. 91–98.
7. Царев, А.П. Новые сорта тополей Всероссийского НИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии / А.П. Царев, Р.П. Царева, В.А. Царев // Биотехнология, генетика, селекция в лесном и сельском хозяйстве, мониторинг экосистем : Материалы международной научно-технической конференции 21–22 июня 2017 г. – 2017. – Воронеж: ООО «Издательство РИТМ». – С. 229–234.
8. Царев, А.П. Сортоведение тополя : монография. – Воронеж: Издательство ВГУ, 1985. – 152 с.
9. Царев, В.А. Ювенилизация хозяйственно ценных генотипов тополей и их репродуктивная способность в ЦЧР // Тезисы докладов Международного конгресса «VII Съезд Вавиловского Общества Генетиков

- и Селекционеров (ВОГиС), посвященный 100-летию кафедры генетики СПбГУ и ассоциированные симпозиумы» в г. Санкт-Петербурге 18-22 июня 2019 г. – Санкт-Петербург: СПбГЛТУ. – 2019. – С. 892.
10. Doyle, J.J. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue // *Phytochemistry Bull.* – 1987. – No. 19. – P. 11–15.
 11. Kumar, J. Congruence of inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplification of polymorphic deoxyribonucleic acid (RAPD) markers in genetic characterization of *Artemisia annua* in the Trans-Himalayan region / J. Kumar, G.P. Mishra, H. Singh, R.B. Srivastava, P.K. Naik // *Journal of Medicinal Plants Research.* – 2011. – Vol. 5. – No. 23. – P. 5568–5576.
 12. Kumar, P. Potential of molecular markers in plant biotechnology / P. Kumar, V.K. Gupta, A.K. Misra, D.R. Modi, B.K. Pandey // *Plant Omics.* – 2009. – Vol. 2. – No. 4. – P. 141.
 13. McArthur, E.D. Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of *Artemisia subgenus* Tridentatae species and hybrids / E.D. McArthur, J. Mudge, R. van Buren, W. Andersen, R.S.C. Sanderson, D.G. Babbal // *The Great Basin Naturalist.* – 1998. – P. 12–27.
 14. Nybom, H. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants / H. Nybom, I.V. Bartish // *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics.* – 2000. – Vol. 3. – No. 2. – P. 93–114.
 15. Powell, W. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis / W. Powell, M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, A. Rafalski // *Molecular breeding.* – 1996. – No. 2 (3). – P. 225–238.
 16. Rani, V. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh / V. Rani, A. Parida, S.N. Raina // *Plant cell reports.* – 1995. – Vol. 14. – No. 7. – P. 459–462.
 17. Tsarev, A.P. Poplars Breeding in Temperate Climate of Russia / A.P. Tsarev, R.P. Tsareva, V.A. Tsarev // *Proceedings from the German Russian Conference on Forest Genetics 21-23 November 2017. – Ahrensburg (Braunschweig/Germany).* – Thünen Report. 62. – 2018. – P. 29-34. / available online at: <https://www.thuenen.de/en/info-desk/publications/thuenen-report/thuenen-report-all-issues/>.
 18. Tsarev, A.P. Hybridization of Poplars in the Central Chernozem Region of Russia (Ed. by the Thünen Institute of Forest Genetics Germany) / A.P. Tsarev, G. von Wühlisch, R.P. Tsareva // *Silvae Genetica.* – 2017. – Vol. 66. – No. 6. – P. 10.

REFERENCES

1. Veresin M.M. Novyi gibridnyi topol' dlya lesnykh kul'tur i ozeleneniya. *Lesokhozyaistvennaya informatsiya*, 1974, no. 6, pp. 14–15. (In Russian)
2. Kalendar' R.N., Glazko V.I. Tipy molekulyarno-geneticheskikh markerov i ih primenenie. *Fiziologiya i biohimija kul'turnyh rastenij*, 2002, vol. 34, no. 4, pp. 51–55. (In Russian)
3. Rjabushkina N.A., Omasheva M.E., Galiakparov N.N. Specifika vydelenija DNK iz rastitel'nyh objektov. *Eurasian Journal of Applied Biotechnology*, 2012, no. 2, pp. 9–26. (In Russian)
4. Fedulova T.P., Kondrat'eva A.M., Evlakov P.M., Marchuk I.I. Izuchenie geneticheskogo raznoobrazija sortoobrazcov topolja (*Populus L.*) na osnove SSR-markerov. *Lesotekhnicheskij zhurnal*, 2016, vol. 6, no. 4 (24), pp. 105–111. (In Russian)
5. Tsarev A.P., Tsareva R.P., Tsarev V.A. Dynamika sokhrannosti y produktyvnosti nastoiashchyykh topolei pry ispytanii v uslovyakh umerennogo klymata. *Vestnyk-VOHyS*, 2010, vol. 14, no. 2, pp. 255–264. (In Russian)

6. Tsarev A.P., Tsareva R.P., Tsarev V.A. Ispytanie klonov i gibridov topolej podroda *Leuce Dode* A.P. *Vestnik Moskovskogo gosudarstvennogo universiteta lesa – Lesnoj Vestnik*, 2012, vol. 84, no. 1, pp. 91–98. (In Russian)
7. Tsarev A.P., Tsareva R.P., Tsarev V.A. Novye sorta topolei Vserossiiskogo NII lesnoi genetiki, selektsii i biotekhnologii. *Biotekhnologiya, genetika, selektsiya v lesnom i sel'skom khozyaistve, monitoring ekosistem: Materialy mezhdunarodnoi nauchno-tekhnicheskoi konferentsii 21-22 iyunya 2017*, Voronezh, pp. 229–234. (In Russian)
8. Tsarev A.P. Sortovedenie topolja (monografija). Voronezh, 1985, 152 p. (In Russian)
9. Tsarev V.A. Yuvenilizatsiya khozyaistvenno-tsennykh genotipov topolei i ikh reproduktivnaya sposobnost' v TsChR. *Tezisy dokladov Mezhdunarodnogo kongressa "VII S"ezd Vavilovskogo Obshchestva Genetikov i Selektionerov (VOGiS), posvyashchennyi 100-letiyu kafedry genetiki SPbGU i assotsiirovannye simpoziumy" v g. Sankt-Peterburg 18-22 iyunya 2019*. – St. Petersburg, SPbGLTU, 2019, p. 892. (In Russian)
10. Doyle J.J. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemistry Bull*, 1987, no. 19, pp. 11–15.
11. Kumar J., Mishra G.P., Singh H., Srivastava R.B., Naik P.K. Congruence of inter simple sequence repeats (ISSR) and random amplification of polymorphic deoxyribonucleic acid (RAPD) markers in genetic characterization of *Artemisia annua* in the Trans-Himalayan region. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011, vol. 5, no. 23, pp. 5568–5576.
12. Kumar P., Gupta V.K., Misra A.K., Modi D.R., Pandey B.K. Potential of molecular markers in plant biotechnology. *Plant Omics*, 2009, vol. 2, no. 4, p. 141.
13. McArthur E.D., Mudge J., van Buren R., Andersen W., Sanderson R.S.C., Babbel D.G. Randomly amplified polymorphic DNA analysis (RAPD) of *Artemisia subgenus* *Tridentatae* species and hybrids. *The Great Basin Naturalist*, 1998, pp. 12–27.
14. Nybom H., Bartish I.V. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in plant ecology, evolution and systematics*, 2000, vol. 3, no. 2, pp. 93–114.
15. Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular breeding*, 1996, no. 2 (3), pp. 225–238.
16. Rani V. Parida A., Raina S.N. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoides* Marsh. *Plant cell reports*, 1995, vol. 14, no. 7, pp. 459–462.
17. Tsarev A. Tsareva R.P., Tsarev V.A. Poplars Breeding in Temperate Climate of Russia. *Proceedings from the German Russian Conference on Forest Genetics 21-23 November 2017*. Ahrensburg (Braunschweig/Germany). Thünen Report, 2018, no. 62, pp. 29–34, available online at: <https://www.thuenen.de/en/info-desk/publications/thuenen-report/thuenen-report-all-issues/>.
18. Tsarev A. Wühlisch G. von, Tsareva R. Hybridization of Poplars in the Central Chernozem Region of Russia. *Silvae Genetica*, 2017, vol. 66, no. 6, p. 10, DOI: <https://doi.org/10.1515/sg-2016-0011>.

Статья поступила в редакцию 19.09.2019