



DOI 10.21178/2079-6080.2022.3.15  
УДК 630\*232.13

## Использование ISSR- и SSR-маркеров для генотипирования некоторых видов клена (*Acer*)

© С.Г. Ржевский, А.М. Кондратьева

---

### Using ISSR and SSR markers for genotyping some maple species (*Acer*)

**S.G. Rzhevsky, A.M. Kondratyeva** (All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology)

At present, a promising area of research is the molecular genetic assessment of representatives of the local dendroflora, including various types of maple, widely distributed in Russia. The results of genotyping with using two sets of markers of different types (intermicrosatellite, ISSR and microsatellite, SSR) of representatives of four maple species: *Acer campestre* L. (field maple), *A. platanoides* L. (sharp maple), *A. negundo* L. (ash maple) and *A. tataricum* L. (Tatar maple) are presents. DNA was isolated from the studied samples using a CTAB buffer, followed by PCR with two sets of primers, and amplification products were detected by agarose gel electrophoresis. All primers used in the study gave amplification products; polymorphism between different species and within each species was revealed. There was a tendency to identify identical stripes for specimens of the same species, and amplification products varying within the species were also available. Dendrograms of genetic distances were compiled based on the evaluation of the amplicon spectra. The results showed that both genotyping methods used allow us to identify distinct differences between species (interspecific polymorphism significantly exceeds intraspecific), however, ISSR markers showed a more distinct separation of different species into clusters. The use of each type of markers has its own characteristics, making them suitable for solving problems of various kinds. The primer sets used in this work are suitable for genetic certification of the four analyzed maple species, with the prospect of their application to other species of the same genus. Microsatellite markers can be recommended for conducting population-genetic studies and compiling individual genetic passports that ensure the identification of individual genotypes, intermicrosatellitis markers are convenient to use for phylogenetic studies and identifying differences between close genotypes.

**Keywords:** field maple, sharp-leaved maple, ash maple, Tatar maple, intermicrosatellite markers, microsatellite, genetic certification

**Использование ISSR- и SSR-маркеров для генотипирования некоторых видов клёна (*Acer*)**

**С.Г. Ржевский, А.М. Кондратьева**

В настоящее время перспективным направлением исследований является молекулярно-генетическая оценка представителей местной дендрофлоры, в том числе – различных видов клёна, широко распространенных на территории России. В данной работе представлены результаты молекулярно-генетического анализа образцов четырёх видов клёна: *Acer campestre* L. (клёна полевого), *A. platanoides* L. (клёна остролистного), *A. negundo* L. (клёна ясенелистного) и *A. tataricum* L. (клёна татарского) с применением двух наборов молекулярных маркеров разного типа: межмикросателлитных (ISSR) и микросателлитных (SSR). ДНК выделялась из исследуемых образцов с применением СТАВ-буфера, далее проводилась ПЦР с двумя наборами праймеров, продукты амплификации детектировались при помощи электрофореза в агарозном геле. Все использованные в исследовании праймеры дали продукты амплификации, между различными видами и внутри каждого вида выявлен полиморфизм. На основе оценки спектров ампликонов составлены дендрограммы генетических расстояний. Полученные результаты показали, что оба используемых метода генотипирования позволяют выявлять отчетливые различия между видами (межвидовой полиморфизм существенно превышает внутривидовой), однако ISSR-маркеры продемонстрировали более отчетливое разделение образцов разных видов по кластерам. Используемые в данной работе наборы праймеров пригодны для генетической паспортизации четырёх проанализированных видов клёна, с перспективой их применения для других видов того же рода. Микросателлитные маркеры можно рекомендовать для проведения популяционно-генетических исследований и составления индивидуальных генетических паспортов, обеспечивающих идентификацию отдельных генотипов, межмикросателлитные маркеры удобно использовать для филогенетических исследований и выявления различий между близкими генотипами.

**Ключевые слова:** клён полевой, клён остролистный, клён ясенелистный, клён татарский, межмикросателлитные маркеры, микросателлиты, генетическая паспортизация

Ржевский Станислав Геннадьевич – младший научный сотрудник отдела лесной генетики и биотехнологии

E-mail: slavaosin@yandex.ru

Кондратьева Анна Михайловна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела лесной генетики и биотехнологии

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

394000, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 105

E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

## Введение

В настоящее время перспективным направлением исследований является молекулярно-генетическая оценка представителей местной дендрофлоры. Актуальными объектами для подобных исследований могут быть образцы различных видов клёна, широко распространённых на территории России. Клёны входят в состав естественных лесных массивов, многие из них представляют интерес в качестве декоративных растений [1]. В нашей стране встречается около 20 видов этой древесной породы, в Центрально-Черноземном регионе наиболее распространёнными являются *Acer campestre* L. (клён полевой), *A. platanoides* L. (клён остролистный), *A. negundo* L. (клён ясенелистный) и *A. tataricum* L. (клён татарский).

Клён полевой (равнинный, паклён) распространён в Евразии. Имеет обычно прямой и широкий ствол, плотные листья с тупыми лопастями. Плоды – крылатки, краснеющие по мере созревания семян. Обладает хорошей устойчивостью в условиях средней полосы, востребован при создании парков и аллей [5].

Клён остролистный распространён от Франции до европейской территории России. Обладает густой кроной и широким, мощным стволом. Имеет простые листья, с зубчатыми, крупнозубчатыми лопастями. От клёна полевого отличается более крупными листьями с заостренными краями. Плод – двойная крылатка. Вид является весьма востребованной породой для создания садов и парков, благодаря стройному массивному стволу, широкой и густой кроне [1].

Клён татарский (черноклён), происходит из Европы и Юго-Западной Азии. В настоящее время вид распространён в Центральной и Восточной Европе, а также в юго-западной Азии и Восточной Сибири. Представлен небольшими деревцами, либо кустарниками. Имеет простые листья, цельные, овальной либо дельтовидной формы. Отличительной особенностью являются крылатки семян, приобретающие к середине лета ярко-красный цвет [5].

Клён ясенелистный (американский) происходит из Северной Америки. Был преднаме-

ренно интродуцирован в Европу в ходе колонизации Нового Света в XVII веке. В России стал инвазивным видом, интенсивно размножаясь и угрожая исконной флоре, в настоящее время считается сорняком. Представляет собой дерево с относительно узкими и зачастую разветвляющимися у основания стволами. Листья сложные, непарноперистые, с отдельными листочками, по строению напоминают листья ясеня. Плод представлен крылаткой, которая к концу летнего сезона краснеет. В отличие от других местных видов клёнов, опыляется ветром (следовательно, не выполняет медоносной функции), выбрасывает в воздух большое количество пыльцы, являющейся аллергеном. Успешное распространение обусловлено неприхотливостью данного вида к почвенным условиям, высокой устойчивостью к загрязнению воздуха и хорошей зимостойкостью [2, 5].

Генотипирование представителей древесных видов используется для решения широкого круга задач. Молекулярно-генетические методы применимы как для фундаментальных исследований, так и для решения прикладных вопросов. В первую очередь стоит рассмотреть следующие области применения данных методов: 1) популяционно-генетические исследования; 2) филогенетические исследования; 3) оценка сохранности генотипа при культивации растений *in vitro*; 4) идентификация конкретных образцов растительного материала с целью определения источника их происхождения. Однако различные задачи требуют использования разных методических подходов.

Основной задачей предварительного этапа работ в молекулярно-генетических анализах является поиск и апробация информативных маркеров, которые можно использовать для генотипирования представителей различных видов. В настоящее время для выполнения подобных исследований используется несколько типов молекулярных маркеров. К одному из них относятся микросателлитные маркеры (SSR, от англ. Simple Sequence Repeats). Микросателлитные сайты генома принадлежат к некодирующей части ДНК, они представляют собой короткие

повторяющиеся последовательности нуклеотидов, практически случайно рассредоточенные на хромосомах. Данные участки значительно подвержены мутациям, заключающимся в изменении количества нуклеотидных повторов [3]. Для генотипирования данным методом проводят полимеразную цепную реакцию (ПЦР) с праймерами, специфичными к фланкирующим последовательностям микросателлитных фрагментов генома. При наличии в геноме заданной последовательности будет амплифицироваться продукт ПЦР, который идентифицируется при помощи гель-электрофореза или другим методом. Следует учесть, что SSR-маркеры чаще всего специфичны для представителей одного рода или близких родов.

Микросателлитные маркеры успешно применялись в решении следующих задач: для оценки сортообразия (в том числе – сортов и гибридов тополя (*Populus* sp.) [6]), в исследовании популяционной структуры и выявлении межвидовых различий (к примеру, для двух видов клёна – *Acer davidii* Franchi. и *A. morrisonense* Hayata [9]), а также для оценки сохранности генотипов в культуре *in vitro* (в частности – для микрокультур тополя [4]).

Еще одним методом генотипирования является использование межмикросателлитных (ISSR, от англ. Inter Simple Sequence Repeats) маркеров. Они представляют собой праймеры, комплементарные последовательностям микросателлитных локусов, и позволяют амплифицировать фрагменты ДНК, находящиеся между достаточно близко расположенными микросателлитными вставками [15]. Данный метод имеет ряд преимуществ: использование одного праймера для каждого локуса, возможность применения одних и тех же маркеров на разных видах живых организмов при достаточно высокой повторяемости результатов анализа. Однако ISSR-маркеры не являются узкоспецифичными, принцип их действия во многом напоминает использование случайных (RAPD, от англ. Random Amplified Polymorphic DNA) маркеров, хотя по сравнению с ними межмикросателлитные маркеры обеспечивают более воспроизводимый результат за счёт

большей длины праймера и более высокой температуры отжига [3].

Межмикросателлитные маркеры успешно применялись для генетического анализа родственных видов (в частности, клёна красного – *A. rubrum* L., серебристого – *A. saccharinum* L., а также их природного гибрида *Acer × freemanii* [7]), для исследования внутривидовой генетической структуры морфологически варьирующих особей клёна каппадокийского – *A. cappadocicum* Gled. [13]. Также ISSR-маркеры использовались в популяционно-генетических исследованиях. Так, с их помощью была проведена оценка генетической изменчивости в популяциях клёна красного в Северном Онтарио для выявления влияния загрязнения почвы тяжёлыми металлами [10]. Кроме того, ISSR-маркеры использовались для проверки сохранности генотипа размножаемых в культуре *in vitro* растений – такой анализ, к примеру, был проведен для микрокультур стевии медовой (*Stevia rebaudiana* Bert.) [12].

Таким образом, использование SSR и ISSR молекулярных маркеров позволяет решать сходный круг задач. Но в каждом конкретном случае анализа предпочтение может быть дано одному из методов – в зависимости от его специфических особенностей. Актуальным является сопоставление данных, полученных обоими методами, реализованными на одном генетическом материале.

Целью данной работы являлось генотипирование образцов четырех описанных выше видов клёна с использованием двух наборов маркеров: из шести ISSR- и шести пар SSR-праймеров, с дальнейшим сравнением их результатов. Данный анализ должен предоставить выводы о применимости используемых маркеров для генетической паспортизации клёна, а также о том, какому из двух использованных методов следует отдавать предпочтение для решения определенных исследовательских задач.

#### **Объекты и методы исследования**

Образцы исследуемых видов клёна были собраны в вегетационный период 2021 года на

территории г. Воронежа (в лесопарковом участке ФГБУ «ВНИИЛГИСбиотех»). Для постановки ПЦР-анализа использовались по три образца для каждого вида. Экстракция ДНК осуществлялась из листьев модифицированным СТАВ-методом [8].

Для оптимизации условий проведения анализа со всеми ISSR-праймерами и двумя SSR (Sm14 и Am116) была поставлена предва-

рительная ПЦР с температурным градиентом: температура отжига варьировала от 50 °С до 65 °С, (тестирование проводилось на одном образце *A. platanoides*).

В исследовании были задействованы шесть ISSR-маркеров (табл. 1). Праймеры данного набора ранее были использованы для проведения анализа с китайским видом ясеня *Fraxinus hupehensis* Chiú Shang et Su [14].

Таблица 1

Праймеры для межмикросателлитных локусов, использованные в исследовании

Наименование локуса	Последовательность нуклеотидов	Температура отжига, °С
UBC_807	(AG) <sub>8</sub> T	50
UBC_815	(CT) <sub>8</sub> G	52
UBC_822	(TC) <sub>8</sub> A	50
UBC_823	(TC) <sub>8</sub> C	51
UBC_824	(TC) <sub>8</sub> G	51
UBC_866	(CTC) <sub>8</sub>	60

Протокол ПЦР-реакции для ISSR-маркеров включал следующие этапы [14]:

- 1) предварительная денатурация (94 °С, 5 мин);
- 2) денатурация (94 °С, 30 сек);
- 3) отжиг (50–60 °С, 90 сек);
- 4) удлинение цепочки (72 °С, 90 сек), пункты 2–4 повторялись 38 циклов;

5) финальная элонгация (7 мин, 72 °С).

Также в исследовании были использованы шесть SSR-маркеров (табл. 2). Ранее маркеры Am118 и Am116 были протестированы на *A. campestre*, MAP9 и MAP46 – на *A. pseudoplatanus*, SM14 – на *A. saccharum* Marshall (клёне сахарном), Aop943 – на *A. opalus* Mill. (клёне итальянском) [11].

Таблица 2

Праймеры для микросателлитных локусов, использованные в исследовании

Наименование локуса	Последовательность нуклеотидов	Температура отжига, °С
MAP9	F – ACAATAAAAGAGCCCACATAGATAG R – TCTCTTCAATTGCAAGGCTTC	57
MAP46	F – CATAATGTAGGGACACATATGAATG R – GAGCGTCAAAGATTGACTTGG	57
Am116	F – AACGCTACCGACTTCGCCAACT R – TGGAGGTCAAGTGCTGGAACAA	60
Sm14	F-TTTTATGTAGAGCAACTCAACCCA R – TATCTGCTGCTTGACATGAACTT	60
Am118	F – GAGGGAGGAGGCTGAGAAGA R – TATCAAAGAAGCCAAGGAAGGTG	57

Наименование локуса	Последовательность нуклеотидов	Температура отжига, °С
Аор943	F – ACTGTGTAGGAGAGTGAGTGTGAA R – CTTCCCAAAGGTAGGAACCA	57

Протокол ПЦР-реакции для SSR-маркеров включал следующие этапы [11]:

- 1) предварительная денатурация (95 °С, 15 мин);
- 2) денатурация (94 °С, 30 сек);
- 3) отжиг (57–60 °С, 90 сек);
- 4) удлинение цепочки (72 °С, 30 сек), пункты 2–4 повторялись 35 циклов;
- 5) финальная элонгация (7 мин, 72 °С).

Продукты ПЦР разделялись посредством электрофореза в 2 % агарозном геле в горизонтальной камере («Power Pac Universal», Bio-Rad, США) в течение 120 мин при напряжении 80 В. Применялся однократный ТВЕ-буфер. Окрашивание осуществлялось красителем SYBR Green и бромистым этидием. Визуализация полученных ампликонов проводилась на трансиллюминаторе («TFR», Vilber Lourmat, Франция). Размер фрагментов ДНК определялся по сравнению с маркером 100 bp Ladder DNA marker («Ахуген», США).

Размер ПЦР-продуктов на цифровых изображениях устанавливался при помощи программы «Labimage». Для статистической обработки данных и построения дендрограммы ис-

пользовалась программа «Past v3.24» (с применением алгоритма Евклидовых расстояний).

### Результаты и их обсуждение

В результате проведенного анализа установлено, что все использованные в данном исследовании праймеры дали продукты амплификации с ДНК всех четырех видов клёна. Анализ спектра ампликонов показал наличие как межвидового, так и внутривидового полиморфизма. Наблюдалась тенденция выявления идентичных полос для образцов одного вида, также были в наличии варьирующие внутри вида продукты амплификации.

Анализ ПЦР с температурным градиентом выявил существенные различия в профиле продуктов амплификации для ISSR-маркеров, в то же время картина амплификации SSR-праймеров практически не изменялась в зависимости от температуры. Очевидно, ISSR-метод более чувствителен к изменениям условий проведения ПЦР, что роднит его с примитивным RAPD- анализом.

На рисунке представлены дендрограммы генетических расстояний между образцами исследуемых видов, полученные двумя методами.

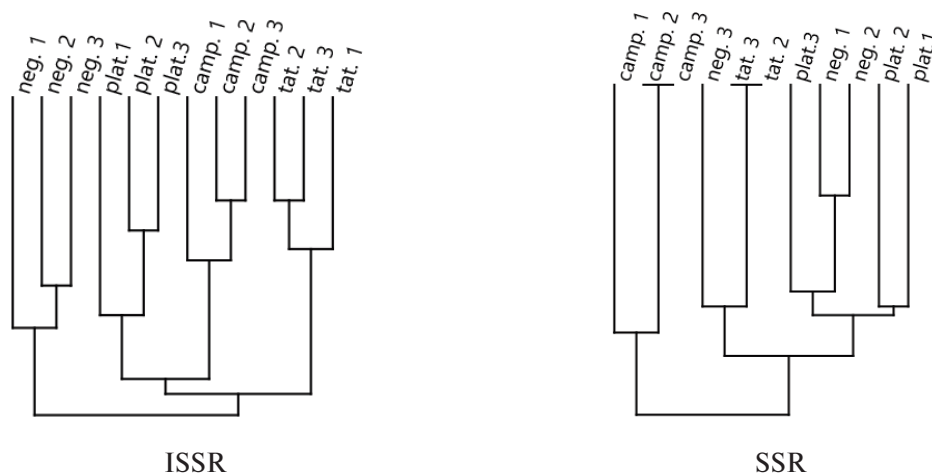


Рис. Дендрограммы генетического сходства исследуемых видов, полученные с использованием ISSR- и SSR-маркеров

Сопоставляя данные результаты, следует заключить, что анализ, проведенный с использованием как ISSR-, так и SSR-маркеров, способен демонстрировать эволюционную дифференциацию данных видов. Однако межмикросателлитные маркеры обеспечили более четкое разделение видов на полученной дендрограмме. В случае применения SSR-маркеров один образец клёна ясенелистного попал в общий кластер с двумя образцами клёна татарского, хотя эти виды происходят с разных континентов. По всей видимости, более высокая точность ISSR-маркеров для разграничения видов может быть обусловлена тем, что они дают большое количество продуктов амплификации, предоставляя обильный материал для математической обработки – за счёт больших объемов полученных данных нивелируются погрешности выполнения анализа.

Стоит отметить ещё одно различие в результатах, полученных двумя методами. В случае использования SSR-маркеров некоторые образцы одного вида продемонстрировали идентичный профиль, в то время как ISSR выявили полиморфизм между этими экземплярами. Однако и здесь видна тенденция к соответствию результатов: образцы клёна полевого под № 2 и № 3 и клёна татарского № 2 и № 3, проявившие идентичный SSR-профиль внутри вида, в ISSR-анализе также показали минимальные генетические расстояния. Таким образом, можно заключить, что межмикросателлитные маркеры являются высокочувствительным инструментом для выявления как внутривидовых, так и межвидовых генетических различий. Преимуществами межмикросателлитного анализа, являются его большая дешевизна (по сравнению с методом SSR) и универсальность: в данном случае для получения серии межмикросателлитных локусов необходимо заказывать синтез только одного праймера, а одни и те же праймеры можно использовать для генотипирования широкого перечня видов, в том числе – не родственных между собой.

Использование микросателлитных маркеров открывает и другие возможности. В SSR-анализе количество продуктов амплификации отчётливо отражает гомо- или гетерозиготность особи по данному локусу. Также ценным параметром для определения филогенетических соотношений различных видов является разница в размере ампликонов, указывающая на накапливающиеся в микросателлитных участках мутации (дополнительные вставки стереотипно повторяющихся последовательностей нуклеотидов). Данный метод удобен для проведения популяционно-генетических исследований, оценки степени гетерозиготности отдельных особей и составления индивидуальных генетических паспортов, с расчётом на высокую повторяемость результата.

Необходимо отметить, что ISSR-анализ обладает рядом недостатков. Хотя данный метод предоставляет обширный массив информации, однако, наличие большого количества продуктов амплификации, разной степени выраженности на электрофореze, затрудняет их точный анализ. Возникает необходимость разделения минорных и мажорных ампликонов. К тому же зачастую образуются продукты большой массы (1000 и более п. н.), что затрудняет определение их размеров методом гель-электрофореza: ДНК-маркеры расходятся согласно нелинейной закономерности, наиболее точные результаты измерения получаются в области продуктов небольшой массы (100–400 п. н.). Разделение обширных спектров ампликонов, полученных в ISSR-анализе, требует длительного времени проведения электрофореza, что чревато техническими трудностями (нагревом буфера в электрофореzной камере, размыванием продуктов амплификации, обесцвечиванием красителей и т. д.). Для получения отчетливо выраженных ампликонов в данном виде анализа важно соблюдение рекомендованной температуры отжига. Чувствительность к условиям протекания реакции снижает повторяемость результатов анализа.

### Выводы

Подводя итоги исследования, можно сделать следующие выводы.

1) Микросателлитные праймеры к локусам MAP9, MAP46, Am116, Sm14, Am118, Aop943 и межмикросателлитные к локусам UBC\_807, UBC\_815, UBC\_822, UBC\_823, UBC\_824, UBC\_866 можно использовать для генетической паспортизации следующих видов клёна: *Acer campestre*, *A. platanoides*, *A. negundo* и *A. tataricum*.

2) ISSR-маркеры обеспечивают более отчетливое разделение разных видов по результатам кластерного анализа.

3) SSR-маркеры менее чувствительны к условиям проведения ПЦР-реакции, обеспечивают большую степень воспроизводимости результатов.

4) Микросателлитные маркеры можно рекомендовать для проведения популяционно-генетических исследований и составления индивидуальных генетических паспортов, обеспечивающих идентификацию отдельных генотипов, межмикросателлитные маркеры удобно использовать для филогенетических исследований и выявления различий между близкими генотипами.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аксенова, Н.А. Клены / Н.А. Аксенова. М. : Изд-во Московского ун-та, 1975. – 95 с.
2. Жуков, Р.С. Клён ясенелистный в городских лесах Москвы / Р.С. Жуков, Л.М. Ломоносова // Научное обозрение. Биологические науки. – 2016. – № 3. – С. 49–50.
3. 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.
4. 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. Шабановаз // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 2. – С. 60–69.
5. Пояркова, А.И. Род 870. Клён – *Acer* / А.И. Пояркова / ред. тома Б.К. Шишкин, Е.Г. Бобров // Флора СССР: в 30 т. – М.-Л. : Изд-во АН СССР, 1949. – Т 4 – С. 596–597.
6. 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.
7. Boyd, M. Development and characterization of species-diagnostic ISSR and SCAR DNA markers for differentiating red maple (*Acer rubrum*) and silver maple (*A. saccharinum*) / M. Boyd, M.A. Panoyan, P. Michael, K.K. Nkongolo // Genome. – 2019. – Vol. 62. – No. 8. – P. 527–535. – DOI: 10.1139/gen-2019-0037
8. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // Phytochemistry Bull. – 1987. – No 9. – P. 11–15.
9. He, Y.L. Population genetic structure and interspecific differentiation between *Acer davidii* Franchi. and *A. morrisonense* Hayata (*Aceraceae*) based on SSR markers / Y.L. He, Y. He, L.L. Gong, M.F. Fang, Z.H. Li // Biochemical Systematics and Ecology. – 2017. – Vol. 71. – P. 42–49.
10. Kalubi, K.N. Molecular analysis of red maple (*Acer rubrum*) populations from a reclaimed mining region in Northern Ontario (Canada): soil metal accumulation and translocation in plants / K.N. Kalubi, M. Mehes-Smith, R. Narendrula, P. Michael, A. Omri // Ecotoxicology. – 2015. – Vol. 24. – No. 3. – P. 636–647. – DOI: 10.1007/s10646-014-1411-7
11. Kvesić, S. Genetic variation of a widespread subdominant tree species (*Acer campestre L.*) in Bosnia and Herzegovina / S. Kvesić, M.M. Hodžić, D. Ballian, D. Gömöry, B. Fussi // Tree Genetics & Genomes. – 2020. – Vol. 16. – No. 6. – P. 1–12. – DOI: 10.1007/s11295-020-01473-9



12. Lata, H. Molecular analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Stevia rebaudiana* Bert. using ISSR marker / H. Lata, S. Chandra, N. Techen, Y.H. Wang, I.A. Khan // *American Journal of Plant Sciences* – 2013. – Vol. 4. – No. 5. – DOI:10.4236/ajps.2013.45119
13. Nikzat-Siahkolaee, S. Infra-specific variation of *Acer cappadocicum* (*Sapindaceae*): morphological and molecular approaches / S. Nikzat-Siahkolaee, M. Sheidai, M. Assadi, Z. Noormohammadi, S. Ghasemzadeh-Baraki // *Brazilian Journal of Botany*. – 2021. – Vol. 44. – No. 1. – P. 149–163. – DOI: doi.org/10.1007/s40415-020-00692-7
14. Zheng, P.L. Assessment of genetic diversity of an endangered species *Fraxinus hupehensis* based on ISSR markers / P.L. heng, J.R. Cheng, C.H.E.N. Long-Qing, Z.H.O.U. Ming-Qin // *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. – 2019. – Vol. 47. – No. 4. – P. 1308–1315.
15. Zietkiewicz, E. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // *Genomics*. – 1994. – Vol. 20. – No. 2. – P. 176–183.

#### REFERENCES

1. Aksenova N.A. Kljony. Moskow, 1975, 95 p. (In Russian)
2. Zhukov R.S., Lomonosova L.M. Klyon yasenelistnyj v gorodskih lesah Moskvyy [The ash-leaved maple in urban forests of Moscow. Scientific Review. Biological science], *Nauchnoe obozrenie. Biologicheskie nauki*, 2016, no. 3, pp. 49–50. (In Russian)
3. Kalendar R.N., Glazko V.I. Tipy molekularno-geneticheskikh markerov i ih primenenie. *Physiologiya i biokhimiya kulturnykh rasteniy*, 2002, vol. 34, no. 4, pp. 279–296. (In Russian)
4. Mashkina O.S., Fedulova T.P., Tabackaya T.M., Kondrat'eva A.M., Shabanova E.A. Molekulyarno-geneticheskaya i citogeneticheskaya ocenka perspektivnykh gibridov i razmnozhenykh *in vitro* klonov topolya i osiny [Molecular genetic and cytogenetic evaluation of perspective hybrids and propagated *in vitro* clones of poplar and aspen. *Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy*, *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta*. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2016, no. 2, pp. 60–69. (In Russian)
5. Poyarkova A.I. Rod 870. Klyon – *Acer*, red. toma B.K. Shishkin, E.G. Bobrov, *Flora SSSR v 30 t., t. 14* [Rod 870. Kljon – *Acer*. In: *Flora SSSR: in 30 volumes, v. 14*], Moskow, Leningrad, 1949, pp. 596–597. (In Russian)
6. Fedulova T.P., Kondrat'eva A.M., Evlakov P.M., Marchuk I.I. Izuchenie geneticheskogo raznoobraziya sortoobrazcov topolya (*Populus L.*) na osnove SSR-markerov [Investigation of genetic diversity of poplar variety samples (*Populus L.*) based on SSR markers. *Forest Engineering Journal*], *Lesotekhnicheskij zhurnal*, 2016, vol. 6, no. 4, pp. 596–597. (In Russian)
7. Boyd M., Panoyan M.A., Michael P., Nkongolo, K.K. Development and characterization of species-diagnostic ISSR and SCAR DNA markers for differentiating red maple (*Acer rubrum*) and silver maple (*A. saccharinum*). *Genome*, 2019, vol. 62, no. 8, pp. 527–535. DOI: 13.1139/gen-2019-0037
8. 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.
9. He Y.L., He Y., Gong L.L., Fang M.F., Li Z.H. Population genetic structure and interspecific differentiation between *Acer davidii* Franchi. and *A. morrisonense* Hayata (*Aceraceae*) based on SSR markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2017, vol. 71, pp. 42–49.
10. Kalubi K.N., Mehes-Smith M., Narendrula R., Michael P., Omri A. Molecular analysis of red maple (*Acer rubrum*) populations from a reclaimed mining region in Northern Ontario (Canada): soil metal accumulation

- and translocation in plants. *Ecotoxicology*, 2015, vol. 24, no. 3, pp. 636–647. DOI: 10.1007/s10646-014-1411-7
11. Kvesić S., Hodžić M.M., Ballian D., Gömöry D., Fussi B. Genetic variation of a widespread subdominant tree species (*Acer campestre* L.) in Bosnia and Herzegovina. *Tree Genetics & Genomes*, 2020, vol. 16, no. 6, pp. 1–12. DOI: 10.1007/s11295-020-01473-9
  12. Lata H., Chandra S., Techen N., Wang Y.H., Khan I.A. Molecular analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Stevia rebaudiana* Bert. using ISSR marker. *American Journal of Plant Sciences*, 2013, vol. 4, no. 5. DOI:10.4236/ajps.2013.45119
  13. Nikzat-Siahkolaee S., Sheidai M., Assadi M., Noormohammadi Z., Ghasemzadeh-Baraki S. Infra-specific variation of *Acer cappadocicum* (*Sapindaceae*): morphological and molecular approaches. *Brazilian Journal of Botany*, 2021, vol. 44, no. 1, pp. 149–163. DOI: doi.org/10.1007/s40415-020-00692-7
  14. Zheng P.L., Cheng J.R., Long-Qing C.H.E.N., Ming-Qin Z.H.O.U. Assessment of genetic diversity of an endangered species *Fraxinus hupehensis* based on ISSR markers. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2019, vol. 47, no. 4, pp. 1308–1315.
  15. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, no. 20, pp. 176–183.

Статья поступила в редакцию 25.06.2022