

УДК 630*1; 577.29

UDC 630*1; 577.29

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ КЛОНОВ ПЛЮСОВЫХ ДЕРЕВЬЕВ ЕЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PICEA ABIES L.*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR МАРКЕРОВ

DEVELOPING OF THE METHODOLOGY FOR THE IDENTIFICATION OF *PICEA ABIES L.* CLONES BY USING ISSR MARKERS

Шейкина Ольга Викторовна
к.с.-х.н., доцент

Sheikina Olga Viktorovna
Cand.Agr.Sci., associate professor

Прохорова Александра Александровна
аспирант

Prohkorova Alekcandra Aleksandrovna
postgraduate student

Новиков Петр Сергеевич
аспирант

Novikov Petr Sergejevitch
postgraduate student

Криворотова Татьяна Николаевна
аспирант
Поволжский государственный технологический университет, Йошкар-Ола, Россия

Krivorotova Tatiana Nikolaevna
postgraduate student
Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola, Russia

Разработана технология идентификации клонов плюсовых деревьев *Picea abies L.* на основе использования ISSR маркеров. Для генотипирования рекомендовано использовать 9 ISSR праймеров: (GA)₉T; (AC)₈C; (CA)₆RY; (CA)₆RG; (CA)₆(GT); (CA)₆(AC); (AG)₈T; (GA)₈C и (AG)₈YT. Отобранные праймеры показали высокий уровень полиморфности. Всего при использовании 9 ISSR праймеров было обнаружено 172 амплифицированных фрагмента, из которых 149 (86,6%) оказались полиморфными

The technology for the identification of *Picea abies L.* clones by using ISSR markers was developed. 9 ISSR primers ((GA)₉T; (AC)₈C; (CA)₆RY; (CA)₆RG; (CA)₆(GT); (CA)₆(AC); (AG)₈T; (GA)₈C и (AG)₈YT) were recommended to use for genotypes detection. The selected primers have shown the high level of polymorphism. A total of 172 amplified fragments were found by the selected primers and 149 (86.6%) of them were polymorphic

Ключевые слова: *PICEA ABIES L.*, ПЛЮСОВЫЕ ДЕРЕВЬЯ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ, ISSR МАРКЕРЫ

Keywords: *PICEA ABIES L.*, PLUS TREES, GENETIC IDENTIFICATION, ISSR MARKERS

Введение. До последнего времени в России исследования в области генетической идентификации проводились преимущественно для сельскохозяйственных, плодовых и декоративных растений [1, 2, 3, 4 и 5]. Однако, сейчас все чаще говорят о необходимости генетической идентификации плюсовых деревьев и паспортизации лесосеменных объектов [6, 7]. Актуальность паспортизации лесосеменных плантаций обусловлена двумя причинами: 1) необходимостью проверки схем смешения клонов с целью обеспечения пространственной изоляции одноименных клонов, так как известно, что самоопыление приводит к образованию пустых семян [8]; 2) возможностью выполнения

генетической сертификации семян с лесосеменных плантаций в будущем. Кроме практической значимости, клоновая идентификация является необходимым условием для проведения различных исследований, в частности изучения особенностей семеношения и роста разных клонов, пыльцевого режима, оценки степени самоопыления и др.

Важной задачей является выбор надежных признаков для идентификации плюсовых деревьев. Хвойные виды, как и лиственные виды, имеют внутривидовые различия по морфологическим признакам [9, 10, 11]. Но при этом практически невозможно выделить какой-либо морфологический признак, по которому можно абсолютно точно отличить все плюсовые деревья друг от друга. Одним из возможных подходов генотипирования растений является использование аллозимного полиморфизма [12, 13, 14, 15, 16]. Но, необходимо отметить, что данный тип маркера имеет ограниченный полиморфизм и не всегда удается идентифицировать все исследуемые клоны, так как часть клонов могут иметь одинаковый спектр по включенным в анализ энзимам [17, 18]. Например, в работе W.T. Adams и R.J. Joly показано, что с использованием 15 аллозимных локусов удалось идентифицировать только 47 клонов *Pinus taeda* из 50 [19].

В настоящее время наиболее перспективными являются методы идентификации, основанные на использовании ДНК маркеров. Признанное лидерство принадлежит SSR маркерам (Simple Sequence Repeats) [18, 20]. Несомненными достоинствами микросателлитного анализа являются: высокий индивидуальный полиморфизм, кодоминантный тип наследования, высокая воспроизводимость метода. Сдерживающим фактором применения данного вида молекулярного маркера является более высокая стоимость.

Наиболее доступными в техническом плане являются ДНК маркеры направленные на изучение анонимного полиморфизма длин

амплифицированных фрагментов ДНК (Random Amplified Polimorphic DNA (RADP) и Inter Simple Sequence Repeats (ISSR)) [21]. Доступность RADP обусловлена тем, что существует огромное количество RADP праймеров и, как правило, трудностей по подбору высокополиморфных маркеров не возникает. Данный вид маркера успешно был использован для идентификации древесных видов [16, 22]. Существенным недостатком RADP метода анализа ДНК является низкая воспроизводимость разработанных методик в условиях разных лабораторий, так как данный вид анализ требует максимальной стандартизации всех условий анализа [18]. Межмикросателлитный анализ (ISSR) обеспечивает высокую разрешающую способность, характерную для RADP метода, но при этом вследствие использования праймеров большей длины и его комплементарности микросателлитному району, данный метод обладает хорошей воспроизводимостью.

ISSR анализ вошел в практику генетических исследований с 1994 году [24, 25] и сейчас достаточно широко используется в различных лабораториях [22, 26]. Основой метода является использование олигонуклеотидных праймеров, которые состоят из микросателлитных последовательностей и произвольной пары оснований на 3'- или 5'-конце. Данный метод не требует предварительного знания последовательности анализируемой ДНК, обеспечивает высокую воспроизводимость результатов и, на наш взгляд, при условии подбора высокополиморфных праймеров, может быть успешно применен для генетической идентификации древесных растений.

Цель исследований заключалась в разработке технологии генетической идентификации клонов ели обыкновенной на основе использования ISSR маркеров.

Решаемые задачи.

Достижение поставленной цели предусматривает решение следующих задач:

1. обоснование выбора растительного материала - источника ДНК;
2. подбор высокополиморфных ISSR праймеров, являющихся перспективными для генетической идентификации ели обыкновенной и оптимизация режима полимеразной цепной реакции;
3. разработка протокола для подсчета молекулярных данных и составления генетического паспорта клона;
4. оценка уровня полиморфности отобранных ISSR праймеров.

Методы исследования.

Современные исследования показали, что ДНК можно выделить практически из всех растительных тканей [26, 27, 28, 29]. Поэтому источником ДНК для генетической идентификации растения могут служить практически все части растения. Однако к используемому материалу можно выдвинуть следующие требования: доступность материала в любое время года, не трудоемкость сбора образцов, простота хранения и пробоподготовки. Всем этим требованиям отвечает хвоя, которую достаточно легко заготовить, высушить и хранить в условиях лаборатории.

В качестве растительного материала, служащим источником ДНК, в эксперименте была изучена замороженная и сухая хвоя, собранная в вегетационный период. Заморозка хвои производилась в морозильной камере в полиэтиленовых пакетиках. Сушка хвои производилась при комнатной температуре. Экстракция ДНК выполнялась с использованием методики Doyle J.J., и Doyle J.L. [30]. Клеточные стенки замороженной хвои разрушались путем перетирания в фарфоровых ступках с жидким азотом. Гомогенизация сухой хвои производилась с использованием гомогенизатора SpeedMill Plus (Analyticjena). Измерения

концентраций выделенной ДНК проводилась на спектрофотометре SmartSpec™Plus (BIO-RAD).

Подбор высокополиморфных маркеров проводился путем тестирования группы ISSR праймеров, рекомендованных в работах Hui-yu и др. [28], Wolfe и др. [31], Wolfe & Liston [32], Blair и др. [33] и Abbot и др. [34]. Всего в анализ включено 15 праймеров (табл. 1).

Таблица 1 - Характеристика отобранных для тестирования ISSR – праймеров

Праймер	Секвенинс (5'-3')	Ссылка
(GA) ₉ T	GAGAGAGAGAGAGAGAT	Blair и др., 1999
(AC) ₈ C	ACACACACACACACC	Abbot, 2001
(AC) ₈ G	ACACACACACACACG	Abbot, 2001
(CA) ₆ RY	CACACACACACAAGCT	Wolfe и др., 1998
(CA) ₆ RG	CACACACACACAAGG	Wolfe и др., 1998
(CA) ₆ (GT)	CACACACACACAGT	Wolfe и др., 1998
(CA) ₆ (AC)	CACACACACACAAC	Wolfe и др., 1998
(AG) ₈ T	AGAGAGAGAGAGAGAT	Hui-yu и др., 2005
(GA) ₈ T	GAGAGAGAGAGAGAT	Hui-yu и др., 2005
(AG) ₈ YT	AGAGAGAGAGAGAGAGGCT	Hui-yu и др., 2005
(AG) ₈ YA	AGAGAGAGAGAGAGAGGCA	Hui-yu и др., 2005
(AG) ₈ C	AGAGAGAGAGAGAGAGC	Hui-yu и др., 2005
(CA) ₈ G	CACACACACACACACAG	Hui-yu и др., 2005
(TG) ₈ A	TGTGTGTGTGTGTGTGA	Hui-yu и др., 2005
(CT) ₈ RC	CTCTCTCTCTCTCTATC	Hui-yu и др., 2005

Реакционная смесь полимеразной цепной реакции (ПЦР) общим объемом 10 мкл содержала 1 мкл ПЦР-буфера; 0,2 мкл 10Мм dNTPs; 0,1 мкл 100 мкМ праймера; 1 мкл образца ДНК; 0,1 мкл Taq-полимеразы (2 ед/мкл); 7,6 мкл воды. Для проведения реакции использовали набор реактивов «Encyclo PCR kit» (ЗАО Евроген). Режим амплификации: 5 мин денатурация при 94°C, 45 циклов: 30 сек. денатурация при 94°C, 45 сек отжиг при 60-65°C, 2 мин элонгация при 72°C; 7 мин окончательная элонгация при 72°C. Реакции проводили в тонкостенных пробирках, объемом 200 мкл на амплификаторе MJ Mini™ Gradient Thermal Cycler (BIO-RAD). Для улучшения качества получаемых электрофореграмм был проведен эксперимент по подбору оптимальной температуры отжига. При

этом для каждого праймера температура отжига устанавливалась в пределах в пределах от 50 до 65°C.

Выявление продукта ПЦР проводилось при помощи электрофореза в 1,5% агарозном геле. Разделение амплифицированных фрагментов выполняли в электрофорезной камере PowerPacTM Universal (BIO-RAD) в TBE буфере с добавлением бромистого этидия в течение 2,5 часов при напряжении электрического поля 70 V. Анализ результатов электрофореза проводился с использованием гель-документирующей системы GelDoc 2000 (BIO-RAD) с программным обеспечением Quantity One. Определение длин амплифицированных фрагментов проводилось по сравнению с ДНК – маркером 100bp+1.5kb+3kb (ООО «СибЭнзим»).

Оценка уровня полиморфности отобранных праймеров проводилась на основе изучения 26 клонов плюсовых деревьев ели обыкновенной, представленных на архиве клонов в Учебно-Опытном лесхозе МарГТУ.

Интерпретация результатов исследования.

Выделение ДНК является важным этапом выполнения генетического анализа, так как от качества и количества выделенной ДНК зависит успешность дальнейших этапов анализа. Качественный анализ выделенной ДНК проводился путем электрофореза в агарозном геле, который позволяет выявить степень деградации. Исследования показали, что при выделении ДНК как из сырой так из сухой хвои методом Doyle J.J. и Doyle J.L. [29] с использованием СТАВ буфера, наблюдается незначительная деградация нитей ДНК (рис. 1). Однако, из данного рисунка так же видно, что в каждом образце присутствует достаточно большое количество нативной ДНК.



Рисунок 1. - Результаты проверки качества ДНК выделенной из сухой хвои: 1 дорожка ДНК-маркер, 2-12 дорожки – выделенная из разных образцов ДНК

Спектрофотометрическое определение концентрации выделенной ДНК показало, что методом Doyle J.J. и Doyle J.L. при использовании механического разрушения тканей в жидком азоте в среднем выделялось 107,7 нгр/мкл, при этом концентрация варьировала в разных образцах от 14,2 до 194,4 нгр/мкл (табл. 2). Использование гомогенизатора для разрушения клеточных оболочек сухих тканей позволяет получать препараты более высокой концентрации (от 98,5 до 354,2 нгр/мкл).

Таблица 2. - Концентрация выделенной ДНК при разных способах выделения ДНК

Способ выделения ДНК	$M \pm m$ (нгр/мкл)	δ	Min- Max	V, %
Из сырой хвои Doyle J.J. и Doyle J.L. с использованием жидкого азота	107,7±13,3	67,8	14,2- 194,4	62,9
Из сухой хвои методом Doyle J.J. и Doyle J.L. с использованием гомогенизатора	210,5±18,9	75,7 7	98,5- 354,2	36,0

Цель подбора праймеров состоит в том, чтобы получить согласованный набор маркеров, которые могут быть надежно и повторно проанализированы, вычислены и зарегистрированы в различных лабораториях. С данной целью выполнили пробное тестирование 15 ISSR праймеров. Первые эксперименты показали, что рекомендуемая температура отжига праймеров не всегда дает хорошие результаты. Работа по подбору оптимальной температуры отжига заключалась в проведении ряда амплификаций при разных температурах, при этом для каждого праймера температура отжига устанавливалась в пределах от 50 до 65°C. Например, из рисунка 2 видно, что для (AG)₈YT праймера наиболее четкий ДНК профиль наблюдается при температуре в районе 60°C.

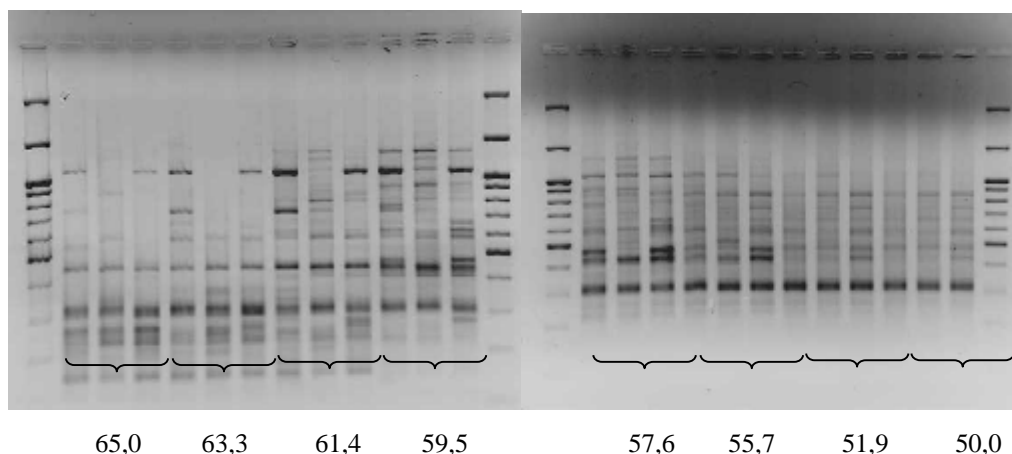


Рисунок. 2.- Подбор оптимальной температуры отжига для праймера (AG)₈YT: 1-3 – номера образцов ДНК, 50-65 – температура отжига °С, М – маркер молекулярных размеров (СибЭнзим, 100bp+1,5 kb+3,0kb)

В результате проведенных экспериментов из 15 протестированных ISSR праймеров для идентификации генотипов ели было отобрано 9. Примеры электрофореграмм разных клонов ели с праймами (CA)₆(GT) и (CT)₈RC приведены на рисунке 3.

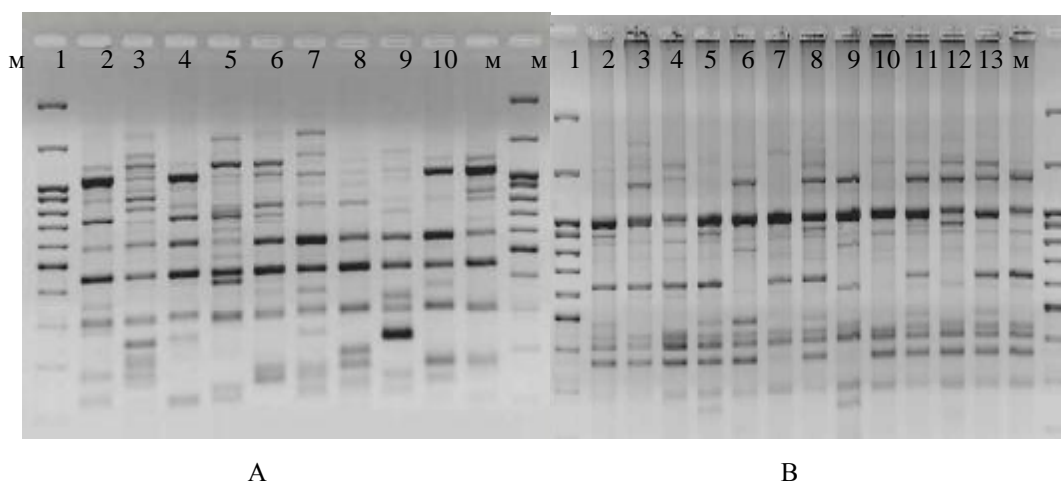


Рисунок. 3. - Результаты электрофореза продуктов ПЦР с праймером (CA)₆(GT) (А) и праймером (CT)₈RC (В): М – ДНК - маркер 100bp+1.5kb+3kb (СибЭнзим), 1-13 номера образцов соответствующие разным клонам

Характеристика рекомендуемых для клоновой идентификации ели ISSR праймеров приведена в таблице 3. Всего при использовании комбинации девяти ISSR праймеров было обнаружено 172 амплифицированных фрагментов ДНК. Разные праймеры давали от 5 до 26 маркеров, длина которых варьировала от 140 до 2210 пар нуклеотидов.

После выполнение генетического анализа все данные по каждому клону необходимо занести в таблицу, входными данными которой служат: код маркера

(метод генетического анализа), название праймера и коды локусов, отражающие наличие или присутствие соответствующего амплифицированного фрагмента в исследуемом образце. В таблице 4 приведен пример ISSR анализа с использованием использованием праймеров (GA)₉T и (CA)₆RY для клона плюсового дерева ели М97. Предлагаемая форма таблицы позволяет систематизировать полученные данные, что весьма важно для дальнейшего анализа и составления генетической формулы объекта идентификации.

Таблица 3. - Характеристика ISSR праймеров, рекомендуемых для идентификации

Праймер	Температура отжига, °С	Количество амплифицированных фрагментов ДНК	Длина амплифицированных фрагментов ДНК, bp
(GA) ₉ T	60	20	200-2540
(AC) ₈ C	60	5	470-950
(CA) ₆ RY	60	18	210-1930
(CA) ₆ RG	60	19	210-1480
(CA) ₆ (GT)	60	20	300-2210
(CA) ₆ (AC)	60	18	110-1710
(AG) ₈ T	65	23	300-2120
(GA) ₈ T	60	26	260-2480
(AG) ₈ YT	60	23	140-1980
Итого		172	140-2480

В дальнейшем на основе составленной таблицы составляется генетическая формула изученного растения. В формулу генотипа вносятся сведения об использованном методе, праймерах и обнаруженных у данной особи амплифицированных фрагментах ДНК. Так, например, для плюсового дерева М97 генетическая формула выглядит следующим образом:

ISSR / (GA)₉T – 2310, 2020, 1540, 1280, 1160, 940, 810, 770, 710, 520, 490, 450, 310, 200 / (AC)₈C – 940, 710, 470 / (CA)₆RY - 1800, 1620, 980, 830, 730, 620, 510, 470, 340, 210 / (CA)₆RG – 1070, 920, 890, 800, 750, 610, 540, 460, 390, 210 / (CA)₆(GT) – 2210, 1850, 1670, 1530, 1380, 1050, 980, 880, 790, 650, 600, 450, 420, 370, 300 / (CA)₆(AC) – 1250, 1130, 1030, 940, 760, 470, 390, 370, 340, 270, 210, 160, 110 / (AG)₈T – 1450, 1340, 1060, 860, 690, 650, 610, 570, 510, 320 / (GA)₈C – 2210, 2020, 1770, 1640, 1260, 1180,

1090, 1040, 990, 910, 820, 780, 650, 600, 550, 500, 440, 390, 340, 300, 260 / (AG)₈YT – 1090, 810, 750, 610, 470, 400, 310, 250, 200, 170

Таблица 4. - Пример записи результатов генетического анализа при идентификации генотипов

ISSR	Коды локусов (длина фрагмента ДНК / наличие (0) или присутствие (1) фрагмента)									
M97										
(GA) ₉ T	2540	2310	2020	1810	1540	1280	1160	1070	940	870
	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0
	810	770	710	570	520	490	450	310	260	200
	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
(CA) ₆ RY	1930	1800	1620	1500	1210	1080	980	880	830	730
	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1
	620	510	470	400	340	300	270	210		
	1	1	1	0	1	0	0	1		

На наш взгляд, одним из показателей, характеризующих пригодность использования ДНК маркера для идентификации, является уровень полиморфности. Полиморфными считают локусы, при исследовании которых обнаруживается два аллеля. В случае с ISSR маркерами у полиморфных локусов выявляется либо отсутствие (0) либо наличие (1) соответствующего аллеля в электрофореграмме исследуемого генотипа. В противоположном случае, у мономорфных локусов наблюдается только один аллель (1). Высокий уровень полиморфности используемых праймеров обеспечивает хорошую разрешающую способность разработанной технологии, так как будут наблюдаться большие различия в генотипах идентифицируемых клонов.

Для оценки уровня полиморфности отобранных праймеров были проведены исследования клонов плюсовых деревьев ели обыкновенной, представленных на клоновом архиве в Учебно-Опытном лесхозе МарГТУ. Всего в анализ включено 26 клонов. В результате исследований было установлено, что из обнаруженных 172 амплифицированных фрагментов 149 (86,6%) являются полиморфными. Такая достаточно большая доля

полиморфных локусов позволяет проводить генетическую идентификацию практически не ограниченного количества образцов.

Выводы

1. Эксперимент показал, что использование методики Doyle J.J. и Doyle J.L. [29] позволяет получить ДНК в достаточном для ISSR анализа количестве. Применяя различные способы разрушения тканей хвои ели было получено от 14,2 до 354 нгр/мкл ДНК.

2. По результатам литературного анализа достоинств и недостатков некоторых методов генетического анализа было принято решение разработку технологии идентификации генотипов ели проводить на основе использования ISSR праймеров. Данный тип маркеров позволяет анализировать большую часть генома и выявлять высокий уровень полиморфизма ДНК. В результате эксперимента были отобраны 9 ISSR праймеров, полимеразно-цепная реакция с которыми дает высоковариабельные и стабильные электрофоретические профили.

3. При изучении клонов плюсовых деревьев ели обыкновенной с использованием рекомендуемых 9 ISSR маркеров было выявлено 172 локуса, из которых 149 (86,6%) оказались полиморфными. Высокий полиморфизм отобранных праймеров позволяет провести идентификацию большого количества генотипов ели.

4. В целом, исследовательская работа показала возможность применения ISSR анализа для идентификации плюсовых генотипов ели обыкновенной и разработанная технология может быть рекомендована для практического применения.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (соглашение

№ 14.132.21.1331) с использованием оборудования ЦКП «ЭБЭЭ» ФГБОУ ВПО «ПГТУ».

Список литературы:

1. *Оганисян, А. С.* Маркирование видов и сортов картофеля с помощью метода RAPD-PCR / А. С. Оганисян, Е. З. Кочнева, А. П. Рысков // Генетика. – 1996. – Т. 32. – С. 448-451.
2. *Сиволап, Ю. М.* Идентификация и паспортизация сортов мягкой пшеницы методами RAPD- и SSRP- анализа / Ю. М. Сиволап, Е. А. Топчиева, С. В. Чеботарь // Генетика. – 2000. – том. 36. - №1. – С. 44-51.
3. *Баранов, О. Ю.* Использование RAPD-анализа для паспортизации хозяйственно-ценных сортов голубики / О. Ю. Баранов, Е. В. Спиридович, В. Н. Решетникова [и др.] // Проблемы лесоведения и лесоводства на радиоактивно загрязненных землях: Сб. науч. Тр. Вып. 60. – Гомель: ИЛ НАНБ, 2004. – С. 117-123.
4. *Мальшев, С. В.* Идентификация и паспортизация сортов сельскохозяйственных культур (мягкой пшеницы, картофеля, томата, льна и свеклы) на основе ДНК-маркеров: Методические рекомендации / С. В. Мальшев, О. Ю. Урбанович, Н. А. Картель. – Мн., 2006. – 28с.
5. *Яковлева, А. А.* Методика генетической паспортизации сортов растений на примере рода *Phododendron* / А. А. Яковлева, П. С. Новиков, О. В. Шейкина [и др.] //Россия в глобальном мире: вызовы и перспективы развития. Четырнадцатые Вавиловские чтения: материалы постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной научной конференции с международным участием. - Йошкар-Ола: Марийский государственный технический университет, 2011.-Ч.2.-с.369-370.
6. *Шишкина О.К.* Первая отраслевая генетическая лаборатория для анализа ДНК лесных растений / О. К. Шишкина //Лесная Россия. – 2008. - № 9. – С.36-39.
7. *Мирошников А.И.* Опыт использования достижений лесной генетики, селекции и семеноводства в России и за рубежом / А. И. Мирошников //Лесохозяйственная информация. – 2008. - №3-4. – С. 4-9.
8. *Franklin, E. C.* Artificial self-pollination and natural inbreeding in *Pinus taeda* L.: PhD dissertation / E. C. Franklin. –N. C. State University, Raleigh, 1968.
9. *Правдин, Л. Ф.* Сосна обыкновенная. Изменчивость, внутривидовая систематика и селекция / Л. Ф. Правдин. – М.: Наука, 1964. – 191с.
10. *Прохорова, Е. В.* Анализ фенотипической структуры клоновых потомств ели в архиве / Е. В. Прохорова, А.А. Прохорова // Лесной журнал. – 2011. - №1. – С.15-19.
11. *Шейкина, О.В.* Семеношение клонов плюсовых деревьев сосны обыкновенной на лесосеменной плантации в Чувашской Республике / О. В. Шейкина, Э. П. Лебелева // Лесной журнал. - 2010. - №1. – С. 48-52.
12. *Ladislav, P.* Clone identity and contamination in a Scots pine seed orchard //Proceeding of the Meeting of the Nordic Group for Tree Breeding (Ed. D. Lindgren). - Swedish Univ. of Agricultural Sciences, Dept of Forest Genetics and Plant Physiology Umea rep.10, 1991. – 22-32р.
13. *Wheeler N. C.* The use of electrophoretic markers in seed orchard research / N. C. Wheeler, K. S. Jech // New Forest . – 1992. – № 6. – P. 311-328.
14. *Рисованная, В. И.* Идентификация фенотипов винограда по спектрам изоферментов / В. И. Рисованная, Л. П. Трошин, Т. А. Ракитская [и др.] // Виноград и вино России. – 1996. - № 4. – С. 14-17.
15. *Kaya, N.* Genetic identification of clones and the genetic structure of seed crops in a *Pinus brutia* seed orchard / N. Kaha, K. Isik // Turk J Agric For. – 2010. - № 34. – P. 127-134.

16. Ивановская С. И. Молекулярно-генетический анализ *Pinus sylvestris* на лесосеменных плантациях / С. И. Ивановская, Е. Н. Химченко, О. М. Новикова // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. науч. Трудов ИЛ НАН Белоруссии. Вып. 67. – Гомель: ИЛ НАН Белоруссии, 2007. – С. 155-162.
17. Cottrell, J. E. The use of isozyme genetic markers to estimate the rate of outcrossing in a sitka spruce (*Picea sitchensis* (Bong.) Carr.) seed orchard in Scotland / J. E. Cottrell, I. M. S. White // New Forest. – 1995. – № 10. – P. 111-122.
18. Vendramin, G.G. Molecular markers for characterizing diversity in forest trees /G.G. Vendramin, O.K. Hansen // Conservation and management of forest genetic resources in Europe. Zvolen, 2005.-P.337-368.
19. Adams, W.T. Allozyme studies in Lobloly Pine seed orchards: clonal variation and frequency of progeny due to self-fertilization / W.T. Adams, R.J. Joly // Silvae Genetica. – 1980. – 29. P.1-4.
20. Белоконь, Ю. С. Применение ДНК-маркеров для паспортизации ЛСП и сертификации семян хвойных пород / Ю. С. Белоконь, Н. В. Гордеева, Н. Ю. Гордон [и др.] // Лесохозяйственная информация. – 2008. - №3-4. – С. 35-38.
21. Nielsen, L.R. Identity verification of trees in the 61 years old common ash (*Fraxinus excelsior*) clonal seed orchard FP202 (Birkemarken, Humlebaek) by DNA genotyping with microsatellite markers / L.R. Nielsen, L.V. McKinney, D.C. Jensen et al. //Forest & Landscape Working Papers. – 2009. - № 34. – P. 37.
22. Куцев, М.Г. Фрагментный анализ ДНК растений: RAPD, DAF ISSR / М. Г. Куцев. – Барнаул: АРТИКА, 2009. – 164с.
23. Scheepers, D. Use of RAPD patterns for clone verification and in studying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). / D. Scheepers, M.C. Eloy, M.Briquet // Theor Appl Genet. – 1997. - P. 940-485.
24. Gupta, M. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats / M. Gupta, J. Chyi, J. Romero-Severson et al. // Theoretical AND Applied Genetics. – 1994. - № 89. – P. 998-1006.
25. Zietkiewicz, E. Repeat (SSR)-Anchored PolymERASE Chain Reaction Amplification / E. Zietkiewicz, A. Rafalski, D. Labuda // Genomics. – 1994. – V. 20. - № 2. – P. 176-183.
26. Grivet, D. A novel approach to an old problem: tracking dispersed seeds / D. Grivet, P.E. Smouse, V.L. Sork // Mol. Ecol. – 2002. - № 14. – P. 3585-3595.
27. Ziegenhagen, B. Molecular identification of individual oak and fir trees from maternal tissue of their fruits or seeds / B. Ziegenhagen, S. Liepelt, V. Kuhlenkamp et al. // Trees.- 2003. - № 17. – P. 345-350.
28. Hui-yu, L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers / L. Hui-yu, J. Jing, L. Gui-feng at al. // Journal of Forest Reseach. – 2005. – V. 16. - № 3. – P. 216-218.
29. Asif, M.J. DNA extraction from processed wood: a case study for the identification of an endangered timber species (*Gonystylus bancanus*) / M.J. Asif, C.H. Cannon // Plant Mol Biol Report. – 2005. - № 23. – P. 185-192.
30. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue /Doyle J.J., Doyle J.L. // Phytochemical Bulletin.-1991.-№ 19.-P. 11-15.
31. Wolfe, A.D. Assessing hybridization (in natural population of Pestermon (*Scrophulariaceae*) using hypervariable inter-simple sequence repeat markers / A.D.Wolfe, Q.Y. Xiang, S.R. Kephart // Mol Ecol. – 1998. - №7. – P. 1107-1125.
32. Wolfe, A.D. & Liston A. Contributions of PCR-based methods to plant systematic and evolutionary biology. In book: Molecular systematic of plants II-DNA sequencing. – Kluwer Academic Pull., Boston, Dordrecht, London. – P. 43-86.

33. *Blair, M.W.* Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.) / M.W. Blair, O. Panaud, S.R. McCouch // *Theor Appl Genet.* – 1999. - №98. – P. 780-792.

34. *Abbot, P.* Individual and population variation in invertebrates revealed by inter-simple sequence repeats (ISSRs) / P. Abbot // *Journal of Insect Science.* – 2001. -- V. 1. - № 8. – P. 1-4.