

УДК 630\*1; 577.29

UDC 630\*1; 577.29

**ISSR-АНАЛИЗ ДЕРЕВЬЕВ СОСНЫ  
ОБЫКНОВЕННОЙ (PINUS SYLVESTRIS)  
РАЗЛИЧНЫХ СЕЛЕКЦИОННЫХ  
КАТЕГОРИЙ**

**ISSR ANALYSIS OF PINUS SYLVESTRIS  
TREES APPURTENANT TO DIFFERENT  
SELECTION CATEGORIES**

Новиков Петр Сергеевич  
аспирант

Novikov Petr Sergeyevitch  
postgraduate student

Шейкина Ольга Викторовна  
к.с.-х.н., доцент  
*Поволжский государственный технологический  
университет, Йошкар-Ола, Россия*

Sheikina Olga Viktorovna  
Cand.Agr.Sci., associate professor  
*Volga State University of Technology, Yoshkar-Ola,  
Russia*

Проведены исследования генетической изменчивости деревьев разных селекционных категорий сосны обыкновенной по ISSR-маркерам в плюсовом насаждении. С использованием 6 ISSR-праймеров всего было амплифицировано 178 локусов, в том числе 168 - полиморфных. Установлено, что генетическая дистанция между деревьями разной селекционной категории варьирует от 0,038 до 0,082. Рассчитаны основные параметры генетической изменчивости плюсового насаждения: индекс Шаннона (I) составил 0,4303, генетическое разнообразие по Нею (H) - 0,2735, а эффективное число аллелей - 1,4268

The genetic variability study of Pinus sylvestris trees appurtenant to different selection categories in the plus stand is carried out with ISSR markers. A total of 178 loci were amplified by 6 ISSR – primers and 168 of them were polymorphic. It is detected that the genetic distance between the trees appurtenant to difference selection categories varies from 0,038 to 0,082. Genetic variation parameters of the Pinus sylvestris plus stand are calculated. Shannon's index (I) was 0,4303, Nei's gene diversity (H) was 0,2735 and Effective number of alleles (Ne) was 1.4268

Ключевые слова: PINUS SYLVESTRIS, ПЛЮСОВОЕ НАСАЖДЕНИЕ, СЕЛЕКЦИОННЫЕ КАТЕГОРИИ ДЕРЕВЬЕВ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ, ISSR-АНАЛИЗ

Keywords: PINUS SYLVESTRIS, PLUS STAND, SELECTION CATEGORIES OF TREES, GENETIC DIVERSITY, ISSR ANALYSIS

**Введение.** Базой для организации лесного семеноводства на генетико-селекционной основе являются лучшие естественные или искусственные насаждения, выделяемые при селекционной инвентаризации. При селекционной инвентаризации выделяют следующие категории насаждений: плюсовые, нормальные и минусовые. Деревья также подразделяют на три категории: плюсовые, нормальные и минусовые. Признаки, по которым отбирают плюсовые деревья, определяются конечными целями селекции. При селекции на повышение продуктивности и качества лесов в категорию плюсовых в основных типах лесорастительных условий, в первую очередь в плюсовых насаждениях, отбирают деревья, отличающиеся прямоствольностью, полнодревесностью, хорошим очищением стволов от сучьев, отсутствием

вильчатости, устойчивостью к неблагоприятным факторам среды, вредителям и болезням. В одновозрастных, чистых по составу высокополнотных насаждениях плюсовые деревья должны превышать средние показатели древостоя (для соответствующей фенологической формы) по высоте на 10% и более, по диаметру - на 30% и более [1].

Однако до сих пор не выяснена роль генетической составляющей в продуктивности насаждений и отдельных деревьев. Хорошо известно, что генофонд - это эволюционно сложившаяся структура, которая управляет адаптационными механизмами, позволяя каждой популяции приспособляться к условиям внешней среды. Особенно актуально это для широко распространенных лесообразующих пород, таких как сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris*), которые играют важную роль как в формировании структуры и функций экосистем, так и в экономической ситуации в лесном секторе [2].

Изучению состояния генетических ресурсов растений СНГ в настоящее время посвящено лишь несколько работ и практически все они проведены для хвойных пород. При этом, достоверные результаты на основе анализа большой выборки (не менее 14-18) генов, кодирующих изоферменты из различных метаболических путей [3, 4], получены только для ряда восточно-европейских популяций сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. и ели европейской *Picea abies* L., а также нескольких популяций кедровой сосны сибирской *Pinus sibirica* Ldb. [5-9].

Применение более современных молекулярно-генетических методов для изучения древесных растений, и в том числе сосны обыкновенной, не имеет широкого распространения. Ряд исследований по изучению генетического разнообразия сосны были проведены за рубежом [10] и в России [11-13]. Однако все эти работы не носят системного характера и не раскрывают потенциал современных молекулярно-генетических методов

для научных исследований. Эта работа направлена на оценку деревьев сосны обыкновенной, относящихся к разным селекционным категориям с помощью ISSR-PCR анализа.

**Цель** работы – изучить особенности генетической структуры, оценить уровень генетического полиморфизма плюсового насаждения сосны обыкновенной и определить генетическую близость деревьев разных селекционных категорий по ISSR-фрагментам ДНК.

**Материалы, методы и объекты исследований.** В качестве объекта для исследований было выбрано плюсовое насаждение сосны обыкновенной, которое находится на территории Учебно-опытного лесничества Республики Марий Эл. Всего для анализа было взято 88 деревьев: 30 – минусовых, по 29 – плюсовых и нормальных.

У всех деревьев были определены следующие показатели: диаметр (D), высота (H), высоты до первого живого ( $H_{ж}$ ) и сухого сучков ( $H_{с}$ ). Для доказательства существенности различий между изученными показателями у деревьев различных селекционных категорий был рассчитан показатель достоверности различия [14].

Выделение суммарной ДНК производилось по протоколу Doyle J.J. and Doyle J.L. [15]. В качестве исходного материала для выделения ДНК была взята древесина. Для анализа были взяты 6 полиморфных ISSR праймеров (табл. 1) [16, 17].

Полимеразную цепную реакцию проводили в следующих условиях: реакционная смесь 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» (Evrogen).

Таблица 1.– Характеристика использованных ISSR праймеров

№	Праймер	Секвиенс	Температура отжига (T <sub>m</sub> ), °C
1.	(CA) <sub>6</sub> RY	CACACACACACAATGC	60
2.	(CA) <sub>6</sub> AG	CACACACACACAAGG	60
3.	(CA) <sub>6</sub> GT	CAC ACA CAC ACA GT	60
4.	(CA) <sub>6</sub> AC	CAC ACA CAC ACA AC	60
5.	(AG) <sub>8</sub> T	AGAGAGAGAGAGAGAGT	60
6.	(AG) <sub>8</sub> YT	AGA GAG AGA GAG AGA GGC T	60

Примечание: R обозначает A и T, Y обозначает G и C, соответственно.

Режим амплификации: 5 мин денатурация при 94°C (горячий старт), 0,5 мин денатурация при 94°C, 45 сек отжиг при 60°C, элонгация 45 сек при 72°C, 7 мин достройка при 72°C, 45 циклов амплификации. Реакции проводили в тонкостенных пробирках, объемом 200 мкл (QSP) на амплификаторе MJ Mini<sup>TM</sup> Gradient Thermal Cycler – BIO-RAD, США.

Электрофорез проводили в агарозных гелях с концентрацией агарозы 1,5%. Разделение проводили в электрофорезной камере PowerPac<sup>TM</sup> Universal (BIO-RAD) в TBE буфере (0,89 М Трис-ОН, 0,89 М борная кислота, 50 мМ ЭДТА) с добавлением бромистого этидия в течение 3-3,5 часов при напряженности электрического поля 70 V.

Визуализацию ДНК, обработку и анализ полученных изображений проводили с помощью системы гель-документации GelDoc 2000 (BIO-RAD) с использованием программного пакета Quantity One® Version 4.6.3.

Наличие амплифицированных фрагментов ДНК в гелях устанавливали по интенсивности окраски. Для дальнейшего определения длины амплифицированных фрагментов ДНК в крайние дорожки геля вносили стандарт, в качестве которого служит ДНК-маркер с фрагментами известной длины. В исследованиях в качестве стандарта использовался ДНК – маркер 100bp+1,5kb+3,0kb производство СибЭнзим (Россия).

ISSR профили анализировались по наличию (1) или отсутствию (0) полос на геле. Для создания матрицы характеризующей генетические профили исследуемых образцов использовали программу BioImage Geles.

Математическую обработку данных проводили в среде POPGENE Version 1.32 [18]. На основании полученных данных рассчитывались относительные частоты ISSR фрагментов, которые использовались для оценки основных параметров генетической изменчивости деревьев сосны. Для этого были рассчитаны следующие параметры оценки генетической изменчивости: наблюдаемое число аллелей -  $N_a$ , эффективное число аллелей -  $N_e$ , общее генетическое разнообразие –  $H$  (индекс Нея) и индекс Шеннона –  $I$ .

**Результаты и обсуждение.** В плюсовом насаждении была проведена сплошная подеревная селекционная инвентаризация с выделением плюсовых деревьев. К плюсовым нами были отнесены деревья, превышающие средние показатели древостоя по высоте на 10% и более, по диаметру - на 30% и более. К нормальным деревьям относили деревья, составляющие основную часть насаждения, хорошие и средние по росту, качеству и состоянию. За минусовые принимались деревья низкокачественные с различными пороками и дефектами (кривоствольность, вильчатость, фаутность и т.д.) деревья верхнего яруса, а также деревья, отставшие в росте от средних по насаждению.

Для определения селекционной категории деревьев были измерены их основные таксационные характеристики. Средние значения таксационных показателей представлены в таблице 2.

Таблица 2. – Средние таксационные характеристики селекционных групп деревьев

Селекционные категории деревьев	Диаметр, см	Высота, м	Высота до сухого сучка, м	Высота до живой ветви, м
Минусовые	21,2±0,5	30,0±0,6	16,5±0,5	23,0±0,5
Нормальные	31,5±0,5	33,4±0,6	12,1±0,9	24,0±0,6
Плюсовые	40,5±0,5	38,66±0,5	14±0,7	26,7±0,5

Как видно из таблицы величины диаметра, высоты ствола и высоты до живого сучка увеличиваются от минусовых к плюсовым деревьям.

Только в случае с высотой до сухого сучка у минусовых деревьев этот показатель оказался выше других. Возможно, это объясняется тем, что минусовые деревья, отстав в росте и оказавшись не в первом ярусе, формировали крону только в верхней части ствола.

Для подтверждения достоверности различия между средними значениями высоты, диаметра, высоты до сухого сучка и высоты до живой ветви у деревьев разных селекционных категорий были рассчитаны соответствующие показатели –  $t$  (табл. 3). Значения  $t$ - критерия Стьюдента для 5%-ного уровня значимости для данной выборки равно – 2,00. Если полученное в эксперименте значение больше табличного значения  $t_{0,05} = 2,00$ , то различия между группами деревьев считаются достоверными (при 5% уровне значимости). В случае, когда полученное в эксперименте значение  $t$  меньше табличного значения  $t_{0,05}$ , то различия недостоверны, и различия между группами имеет случайный характер.

Как видно из таблицы, различия между группами деревьев по диаметру и высоте ствола всегда достоверны. Случайный характер имеют различия по высоте  $H_{ж}$  между группой нормальных и минусовых деревьев, а также по  $H_c$  между группами нормальных и плюсовых. Но для отнесения деревьев к той или иной селекционной категории первичными признаками являются диаметр и высота ( $H$  и  $D$ ). По данным показателям все группы достоверно отличаются друг от друга.

Таблица 3. – Показатель достоверности различия ( $t$ ) между средними значениями признаков у деревьев разной селекционной категории

Селекционные категории	Таксационные показатели	Минусовые				Нормальные			
		D	H	$H_{ж}$	$H_c$	D	H	$H_{ж}$	$H_c$
Нормальные	D	14,6	-	-	-	-	-	-	-
	H	-	4,0	-	-	-	-	-	-
	$H_{ж}$	-	-	1,3	-	-	-	-	-
	$H_c$	-	-	-	4,3	-	-	-	-
Плюсовые	D	27,3	-	-	-	12,7	-	-	-
	H	-	11,1	-	-	-	6,7	-	-
	$H_{ж}$	-	-	5,2	-	-	-	3,5	-
	$H_c$	-	-	-	2,9	-	-	-	1,7

В результате ISSR-анализа ДНК изучаемых деревьев были получены электрофоретические профили в виде растровых изображений гелей (рис. 1). Всего с использованием 6 ISSR-праймеров было получено 178 ампликонов, из них 168 оказались полиморфными, что составляет 94 % от общего их количества.

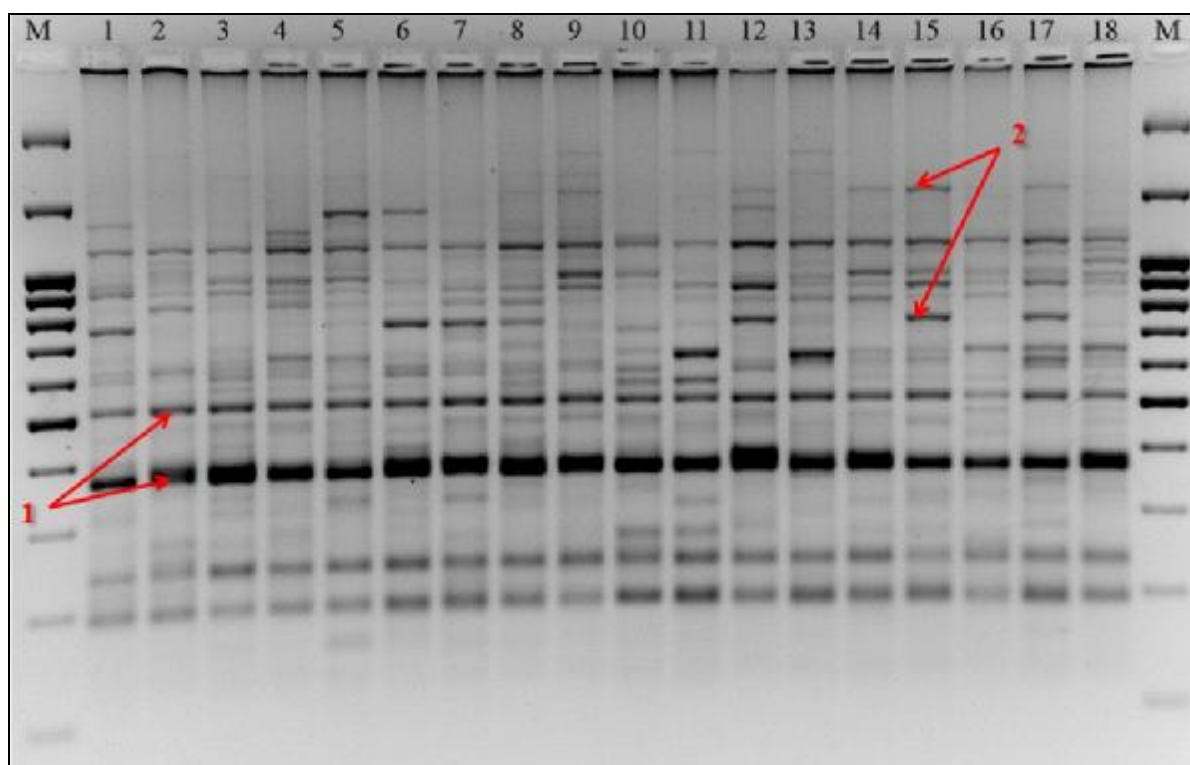


Рисунок 1 – Результат ПЦР-детекции ДНК сосны с праймером - (CA)<sub>6</sub>AC  
1-18 – номера анализируемых образцов; М – маркер молекулярного размера 100bp+3,0к  
(СибЭнзим); 1 – мономорфные ампликоны, 2 – полиморфные ампликоны.

Используемые праймеры позволили идентифицировать от 24 до 35 ампликонов, длины фрагментов ДНК варьировали от 140 до 2500 пар нуклеотидов (табл. 4).

Таблица 4. – Результаты ISSR анализа

Праймеры	Количество фрагментов ДНК		Длины амплифицируемых фрагментов, п.н.
	Всего	Полиморфных	
(CA)6RY	24	22	205, 240, 265, 300, 340, 370, <b>385</b> , 405, 430, 455, <b>530</b> , 580, 610, 665, 770, 830, 870, 910, 1015, 1175, 1225, 1265, 1450, 1510
(CA)6AG	32	29	<b>210</b> , 250, 265, 285, 325, 340, 360, <b>390</b> , 410, 435, 460, 480, 500, <b>540</b> , 590, 615, 635, 670, 700, 745, 785, 830, 870, 940, 1000, 1055, 1120, 1200, 1370, 1700, 2030, 2500
(CA)6GT	28	28	140, 190, 260, 280, 300, 315, 364, 390, 400, 430, 440, 465, 485, 510, 555, 585, 640, 710, 780, 810, 860, 990, 1050, 1210, 1300, 1460, 1860, 2150
(CA)6AC	35	32	<b>220</b> , 300, 365, 375, 390, 410, 420, 445, 460, 470, 515, 555, 580, 600, 620, 640, 670, 690, 715, <b>760</b> , <b>850</b> , 900, 995, 1005, 1040, 1080, 1190, 1250, 1350, 1430, 1600, 1760, 1820, 2350, 2480
(AG)8T	27	26	185, 300, 315, 330, 340, 345, 410, 420, 430, 465, 515, 540, 570, 575, 625, 650, 690, 725, 740, 785, 850, <b>960</b> , 1115, 1140, 1185, 1210, 1260
(AG)8YT	32	31	<b>160</b> , 175, 210, 245, 260, 280, 295, 320, 335, 345, 365, 390, 410, 445, 455, 475, 490, 520, 565, 585, 630, 635, 660, 695, 720, 735, 750, 780, 860, 980, 1000, 1070

Примечание: жирным шрифтом обозначены мономорфные фрагменты ДНК

На основе анализа полученных электрофореграмм были рассчитаны частоты встречаемости аллелей обнаруженных локусов для анализируемых совокупностей деревьев различных селекционных категорий. Полученные частоты ISSR фрагментов использовались для оценки основных параметров генетической изменчивости деревьев сосны: эффективное число аллелей ( $N_e$ ), общее генетическое разнообразие (H) и индекс Шеннона (I) (табл. 5) [19, 20]. Для сравнительного анализа также в таблице приведены данные для архива клонов в Республике Марий Эл, где произрастают клоновые потомства плюсовых деревьев сосны обыкновенной из Республики Марий Эл, Мордовской Республики, Чувашской Республики, Ульяновской и Кировской областей [11].



Как видно из таблицы все показатели в целом для насаждения оказались выше, чем отдельно по группам. Наивысшие значения параметров генетической изменчивости характерны для нормальных деревьев, низшие – для минусовых. Плюсозовые деревья по данным показателям занимают среднее положение.

Таблица 5. – Основные параметры генетической изменчивости деревьев сосны

Селекционные категории деревьев	Показатели		
	$N_e$	H	I
Минусовые	1,3800	0,2360	0,3669
Нормальные	1,4152	0,2586	0,4019
Плюсовые	1,3864	0,2419	0,3781
В целом для насаждения	1,4268	0,2735	0,4303
Архив клонов в Республике Марий Эл	1,4050	0,2570	0,4070

Для оценки уровня генетической изменчивости плюсовых деревьев по ISSR маркерам необходим сравнительный анализ с показателями присущими виду в данном регионе в целом. Как показывает анализ таблицы 3, в целом уровень генетической изменчивости плюсового насаждения превышает уровень генетической изменчивости плюсовых деревьев на архиве клонов. То есть можно предположить, что генетическое разнообразие изученного насаждения не уступает уровню генетической изменчивости на видовом уровне в Среднем Поволжье, так как на архиве клонов представлены плюсовые деревья из нескольких областей этого региона.

Для оценки степени генетической дифференциации деревьев разной селекционной категории были рассчитана генетическая дистанция (таб. 6) и на основании невзвешенного парно-группового метода кластерного анализа (UPGMA) была построена дендрограмма (рис. 2).

Таблица 6. – Генетическая дистанция по Nei (под диагональю) и генетическая идентичность (над диагональю) групп деревьев разной селекционной категории

	Минусовые деревья	Нормальные деревья	Плюсовые деревья
Минусовые деревья	-	0,9623	0,9209
Нормальные деревья	0,0384	-	0,9494
Плюсовые деревья	0,0824	0,0520	-

Дендрограмма демонстрирует, что все три группы деревьев генетически дифференцированы друг от друга, при этом наибольшая генетическая дистанция наблюдается между минусовыми и плюсовыми деревьями (0,0824), а наименьшая между минусовыми и нормальными (0,0384). Однако, не смотря на то, что между изученными селекционными группами деревьями были установлены генетические различия, из 178 полученных фрагментов ДНК не было выявлено ампликонов, присутствующих только в одной группе и отсутствующей в других. То есть маркеры, которые были бы идентифицирующими для какой-либо селекционной категории деревьев, обнаружены не были. В целом, полученные результаты говорят о сходстве генетической структуры всех проанализированных селекционных групп.

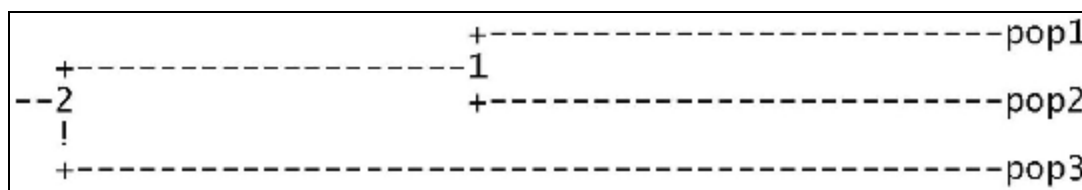


Рисунок 2 – Дендрограмма, построенная на основании коэффициентов генетической дистанции Нея, показывающая степень генетической дифференциации селекционных групп *P. Sylvestris*: pop 1 – минусовые деревья, pop 2 – нормальные деревья, pop 3 – плюсовые деревья

Проведенные исследования показали, что изученное плюсовое насаждение в Республике Марий Эл, характеризуется достаточно высоким уровнем генетической изменчивости по ISSR маркерам. Результаты работы позволят внести задел в исследования по маркированию <http://ej.kubagro.ru/2012/08/pdf/65.pdf>

хозяйственно-ценных признаков древесных растений на уровне ДНК и могут быть использованы при исследованиях биоразнообразия сосны обыкновенной в пределах вида.

### **Выводы.**

С использованием 6 ISSR праймеров было выявлено 178 фрагментов ДНК, 94% из которых оказались полиморфными. Используемые праймеры позволили идентифицировать от 24 до 35 ампликонов, длины которых варьировали от 140 до 2500 пар нуклеотидов.

Группа плюсовых деревьев оказалась на значительном генетическом расстоянии от группы минусовых (генетическая дистанция по Нею 0,0824) и нормальных (генетическая дистанция по Нею 0,0520). Однако, фрагменты ДНК, идентифицирующие какую-либо селекционную категорию деревьев, не были установлены.

В целом уровень генетической изменчивости плюсового насаждения оказался достаточно высок, что подтверждено сравнением параметров генетической изменчивости с ранее исследованными объектами.

*Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 - 2013 годы» при финансовой поддержке Минобрнауки России (Государственный контракт №14.518.11.7055 от 20.07.2012 г.) на базе Биотехнологического комплекса по воспроизводству высших растений в условиях «чистой комнаты».*

## Список литературы:

1. Указания по лесному семеноводству в Российской Федерации (утв. Рослесхозом 11.01.2000).
2. Падутов, В.Е., Генетическая изменчивость у *Pinus sylvestris* L./ В.Е. Падутов, Г.Г. Гончаренко, З.С. Поджарова // Доклады АН БССР. - 1989. - Т. 33, N 11. - С. 1039 - 1042.
3. Левонтин Р. Генетические основы эволюции: Пер. с англ. - М., 1978. - 350с.
4. Айала Ф. Введение в молекулярную и эволюционную генетику: Пер. с англ. - М., 1984. - 230 с.
5. Гончаренко, Г.Г. Генетическая изменчивость у кедровой сосны сибирской / Г.Г. Гончаренко, В.Е. Падутов, З.С. Поджарова и др. // Доклады АН БССР. - 1987. - Т. 31. - N 9. - С. 848 - 851.
6. Гончаренко, Г.Г. Параметры генетической изменчивости и дифференциации в популяциях ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) / Г.Г. Гончаренко, В.В. Потенко // Генетика. - 1991. - Т. 27, N 10. - С. 1759 - 1772.
7. Гончаренко, Г.Г. Генетическая структура, изменчивость и дифференциация в популяциях *Pinus sibirica* Du Tour / Г.Г. Гончаренко, В.Е. Падутов, А.Е. Силин // Генетика. - 1992. - Т. 28, N 10. - С. 114 - 128.
8. Духарев, В.А. Гетерозиготность и семенная продуктивность особей сосны обыкновенной / В.А. Духарев, М.Г. Романовский, С.М. Рябоконт // Лесоведение. - 1987. - N 2. - С. 87 - 90.
9. Крутовский, К.В. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение 4. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями / К.В. Крутовский, Д.В. Политов, Ю.П. Алтухов и др. // Генетика. - 1989. - Т. 25, N 11. - С. 2009 - 2032.
10. Li Hui-yu Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers / Li Hui-yu, Jing Jing, Liu Gui-frng, Ma Xu-jun, Dong Jing-xiang, Lin Shi-jie // Journal of Forest Research. - 2005. - 16(3). - P. 216-218.
11. Новиков, П.С. Изменчивость плюсовых деревьев сосны обыкновенной на архиве клонов по ISSR-маркерам / П.С. Новиков, О.В. Шейкина, Т.Н. Милютин // Вестник МарГТУ. Серия «Лес. Экология. Природопользование», 2011, №3 (13), С. 82-87.
12. Новиков, П.С. Оптимизация проведения ПЦР-реакции при ISSR-анализе ДНК плюсовых деревьев сосны обыкновенной / П.С. Новиков, О.В. Шейкина, Т.Н. Милютин // Плодоводство, семеноводство, интродукция древесных растений: материалы XIV Международной научной конференции. - Красноярск: СибГТУ, 2011, - С. 79-81.
13. Шейкина, О.В. Молекулярно-генетические исследования плюсовых деревьев *Pinus sylvestris* на лесосеменной плантации в Пензенской области / О.В. Шейкина, Т.Н. Милютин, П.С. Новиков // Плодоводство, семеноводство, интродукция древесных растений: материалы XIV Международной научной конференции. - Красноярск: СибГТУ, 2011, - С. 127-130.
14. Котов, М.М. Применение биометрических методов в лесной селекции: учебное пособие / М.М. Котов, Э.П. Лебедева. - Горький: Горьковский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 1977. - 120с.
15. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / Doyle J.J. and Doyle J.L. // Phytochem. Bull. - 1987. - 19: 11-15.

16. Wolfe, A.D. Assessing hybridization (in natural population of *Pestemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable inter-simple sequence repeat markers / A.D.Wolfe, Q.Y. Xiang, S.R. Kephart // *Mol Ecol.* – 1998. - №7. – P. 1107-1125.
17. Hui-yu, L. Genetic variation and division of *Pinus sylvestris* provenances by ISSR markers / L. Hui-yu, J. Jing, L. Gui-feng et al. // *Journal of Forest Reseach.* – 2005. – V. 16. - № 3. – P. 216-218.
18. Yeh, F.C. POPGENE Version 1.32. Ag/For Molecular Biology and Biotechnology Centre / F.C. Yeh, R. Yang, T. Boyle // University of Alberta and Center for International Forestry Research 1997.
19. Lewontin, RC. The apportionment of human diversity / RC Lewontin, T Dobzhansky, MK Hecht et al. // *Evolutionary Biology* 6. New York: Appleton-Century-Crofts. 1972. p 381–398.
20. Kimura, M. The number of alleles that can be maintained in a finite population / M. Kimura, J. F. Crow // *Genetics* 49:725-38, 1964.