



Генетический полиморфизм тополей Московского региона на основе высокопроизводительного секвенирования ITS-последовательностей

Е.В. Борхерт¹, Г.С. Краснов¹, Н.Л. Болшева¹, П. Кезимана^{1, 2}, О.Ю. Юркевич¹, О.В. Муравенко¹,
А.В. Кудрявцева¹, Н.В. Мельникова¹

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Российский университет дружбы народов, Москва, Россия

Тополь широко используется в озеленении Москвы благодаря способности эффективно очищать воздух от вредных примесей и выделять большое количество кислорода. Роду Тополь (*Populus*) свойствен высокий уровень внутривидового полиморфизма, а также наличие естественных межвидовых гибридов. Целью настоящей работы была оценка генетического разнообразия тополей, растущих на территории города Москвы, с использованием высокопроизводительного секвенирования внутренних транскрибируемых спейсеров генов 45S рРНК (ITS-последовательностей). На платформе Illumina (MiSeq) проведено секвенирование ITS-последовательностей 40 растений тополя и в среднем получено около 3000 прочтений для каждого образца. Биоинформатическая обработка данных проведена с использованием программы CLC Genomics Workbench. Исследованная выборка тополей имела высокий уровень генетического разнообразия: число выявленных в каждом генотипе однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) относительно референсных последовательностей ITS1 и ITS2 *P. trichocarpa* варьировало от 4 до 44. Показано, что даже деревья, посаженные на одной территории и, вероятно, в одно время, значительно различаются генетически. Можно предположить, что при посадке тополей в Москве использовался крайне полиморфный растительный материал. Для некоторых сайтов с SNP у одного и того же индивидуума выявлено несколько вариантов нуклеотидов, соотношение которых было различным. Мы предполагаем, что соотношение, близкое к 50/50, наблюдается в межвидовых гибридах и является следствием генетических различий в ITS-последовательностях между материнским и отцовским генотипами. Для SNP с преобладанием одного из вариантов вероятнее наличие паралогов среди многочисленных геномных копий ITS-последовательностей. Результаты работы закладывают основу для применения молекулярно-генетических маркеров с целью идентификации видов и межвидовых гибридов тополя, определения происхождения ряда естественных гибридов, а также мониторинга разнообразия представителей рода *Populus*, растущих на территории города Москвы.

Ключевые слова: *Populus*; тополь; Москва; высокопроизводительное секвенирование; ITS; полиморфизм; генетическое разнообразие.

Genetics polymorphism of poplars from Moscow region based on high-throughput sequencing of ITS

E.V. Borkhert¹, G.S. Krasnov¹, N.L. Bolsheva¹,
P. Kezimana^{1, 2}, O.Yu. Yurkevich¹, O.V. Muravenko¹,
A.V. Kudryavtseva¹, N.V. Melnikova¹

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, RAS, Moscow, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia (RUDN University), Moscow, Russia

Poplars are widely used in landscaping of Moscow due to the ability to effectively purify the air from harmful impurities and to release a large amount of oxygen. The genus *Populus* is characterized by a high level of intraspecific polymorphism, as well as the presence of natural interspecies hybrids. The aim of our work was to evaluate the genetic diversity of poplars, which are growing on the territory of Moscow city by high-throughput sequencing of internal transcribed spacers of 45S rRNA genes (ITS sequences). Sequencing of ITS of 40 poplar plants was performed on Illumina platform (MiSeq) and about 3000 reads were obtained for each sample in average. Bioinformatics analysis was performed using CLC Genomics Workbench tool. The involved set of poplars had a high level of genetic diversity – the number of single nucleotide polymorphisms (SNPs) detected in each genotype relative to the reference ITS1 and ITS2 sequences of *P. trichocarpa* varying from 4 to 44. We showed that even trees which were planted on the same territory and, probably, at the same time had significant genetic differences. It can be speculated that highly polymorphic plant material was used for planting poplars in Moscow. For some sites with SNPs, several variants of nucleotides were found in the same individual and the ratio of SNPs was different. We assume that close to 50/50 ratio is observed in interspecific hybrids due to genetic differences in the ITS sequences between maternal and paternal genotypes. For SNPs with a predominance of one of the variants, the presence of paralogues among numerous genomic copies of ITS sequences is more likely. The results of our work can provide a framework for molecular genetic markers application with the

purpose of *Populus* species and interspecific hybrids identification, determination the origin of a number of natural hybrids, and monitoring the diversity of genus *Populus* in the Moscow city.

Key words: *Populus*; poplar; Moscow; high-throughput sequencing; ITS; polymorphism; genetic diversity.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Борхерт Е.В., Краснов Г.С., Большева Н.Л., Кезимана П., Юркевич О.Ю., Муравенко О.В., Кудрявцева А.В., Мельникова Н.В. Генетический полиморфизм тополей Московского региона на основе высокопроизводительного секвенирования ITS-последовательностей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(5):531-535. DOI 10.18699/VJ18.391

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Borkhert E.V., Krasnov G.S., Bolsheva N.L., Kezimana P., Yurkevich O.Yu., Muravenko O.V., Kudryavtseva A.V., Melnikova N.V. Genetics polymorphism of poplars from Moscow region based on high-throughput sequencing of ITS. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektzii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(5):531-535. DOI 10.18699/VJ18.391

Москва – один из крупнейших мегаполисов мира, в котором постоянно проживает более 12 млн человек. Развитая инфраструктура и большое население обуславливают неблагоприятную экологическую обстановку. Для улучшения ситуации необходимо эффективное озеленение города. Тополь активно используется в озеленении Москвы благодаря способности эффективно очищать воздух от вредных примесей и выделять большое количество кислорода.

Род Тополь (*Populus*), согласно классификации J.E. Eckenwalder (1996), включает 29 видов, преимущественно распространенных в Северном полушарии. Тополя – двудомные ветроопыляемые растения, чем объясняется их высокое внутривидовое разнообразие (Rae et al., 2007). Различные виды тополя легко скрещиваются, образуя естественные межвидовые гибриды (Roe et al., 2014; Jiang et al., 2016), что затрудняет определение систематического статуса. Геном тополя вида *P. trichocarpa*, секвенированный в 2006 г., был первым геномом среди деревьев (Tuskan et al., 2006). Показано, что для оценки генетического полиморфизма, таксономической классификации и определения филогенетических отношений тополей эффективно использование нуклеотидных последовательностей внутренних транскрибируемых спейсеров генов 45S рРНК (ITS – internal transcribed spacer) (Hamzeh, Dayanandan, 2004). ITS-регион включает высоковариабельные ITS1 и ITS2 последовательности, расположенные с двух сторон от высококонсервативной последовательности, кодирующей 5.8S рибосомную РНК. В отличие от хлоропластных и митохондриальных маркеров, ITS-последовательности наследуются от обоих родителей, обладают высокой вариабельностью, а процедура их амплификации достаточно стандартизована (Poczai, Huvonen, 2010). Все вышеперечисленное способствует активному применению ITS-последовательностей для баркодирования растений (Li et al., 2011).

ITS-последовательности представлены многими копиями в геноме, и в одном индивидууме возможно присутствие нескольких различных ITS-паралогов, что требует особого внимания при анализе данных и даже может препятствовать получению качественных данных секвенирования по Сэнгеру (Hollingsworth et al., 2011). Высокопроизводительное секвенирование позволяет преодолеть названные сложности, так как для одного образца секвенируются сотни ITS-последовательностей, при этом пробоподготовка не требует предварительного клонирования.

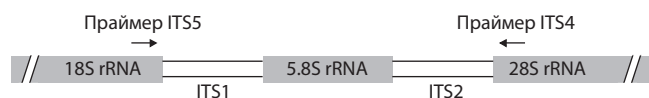
В нашей работе проведено высокопроизводительное секвенирование ITS-последовательностей и определен генетический полиморфизм выборки тополей, растущих на территории г. Москвы.

Материалы и методы

Растительный материал собирали в период цветения тополя на юге и севере Москвы. Молодые листья замораживали в жидком азоте и хранили при температуре –70 °С. Выделение ДНК проводили, как описано ранее (Melnikova et al., 2014). Качество ДНК оценивали методом электрофореза в 1 % агарозном геле. Концентрацию ДНК измеряли на флуориметре Qubit 2.0 (Life Technologies, США). Для дальнейшей работы использовали тестовую выборку ДНК из 40 растений тополя.

Для подготовки ДНК-библиотек для высокопроизводительного секвенирования использовалась двустадийная полимеразная цепная реакция (ПЦР): первая стадия – амплификация выбранных участков генома и добавление на ампликоны универсальной последовательности, вторая – добавление последовательностей, необходимых для высокопроизводительного секвенирования, и двойных индексов для идентификации образцов. Для амплификации ITS-региона применялись праймеры, предложенные в работах (White et al., 1990; Hsiao et al., 1995) (см. рисунок), с добавленным универсальным адаптером; для второй ПЦР использовались праймеры Nextera XT v2 (табл. 1). Дизайн праймеров проведен согласно рекомендациям протокола Illumina (https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf).

ПЦР для подготовки ДНК-библиотек проводили на амплификаторе Geneamp 9700 (Applied Biosystems, США). Объем реакции составлял 25 мкл, в него входили 1х полимеразы Tersus («Евроген», Россия), 1х буфер для полимеразы Tersus, 0.5 мкМ каждого праймера («Евроген»), 200 мкМ dNTP (Thermo Scientific, США) и 40 нг totalной ДНК. Использовали следующие условия реакции: 3 мин – 95 °С; 10 циклов для первой ПЦР и 35 циклов для второй ПЦР: 15 с – 95 °С, 30 с – 58 °С и 1 мин – 72 °С; 3 мин – 72 °С. Качество и концентрацию полученных 40 ДНК-библиотек оценивали с помощью биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technologies) и флуориметра Qubit 2.0 (Life Technologies, США). ДНК-библиотеки секвенировали на высокопроизводительном секвенаторе



Локализация праймеров для амплификации ITS-последовательностей на гене 45S рРНК.

MiSeq (Illumina, США) с использованием набора MiSeq Reagent Kit v2 (500 cycles). Длина прочтения составила по 250 нуклеотидов с каждой стороны для целевой последовательности, также были прочитаны двойные индексы (Multiplexed Paired-End Run).

Для биоинформатической обработки полученных данных применяли пакет программ CLC Genomics Workbench (Qiagen, США). Прочтения картировали на последовательности ITS *P. trichocarpa* (GenBank: AJ006440.1), геном которого является референсным для рода Тополь. Использовали следующие параметры для работы программы: длина окна (window length) – 11, максимальное число разрывов и несовпадений (maximum number of gaps and mismatches) – 2, минимальное среднее качество прочтения соседних нуклеотидов (minimum average quality of surrounding bases) – 15, минимальное качество прочтения центрального нуклеотида (minimum quality of central base) – 20, минимальное покрытие (minimum coverage) – 500, минимальное покрытие парно-концевыми прочтениями (minimum paired-end coverage) – 0, максимальное покрытие (maximum coverage) – 20000, минимальная частота полиморфизма (minimum variant frequency) – 20 % или 50 прочтений (reads).

Результаты

Нами проведено высокопроизводительное секвенирование ITS-последовательностей 40 растений тополя, растущих на территории г. Москвы. Длина прочтений составила по 250 нуклеотидов с каждой стороны, в среднем для каждого образца получено около 3000 прочтений. Проведен биоинформатический анализ секвенированных ITS-последовательностей. Его результаты представлены в табл. 2 и электронном Приложении¹.

Исследованная группа деревьев характеризовалась высоким уровнем генетического разнообразия: число выявленных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) относительно использованных в качестве референса последовательностей ITS *P. trichocarpa* (GenBank: AJ006440.1) варьировало от 4 до 44. Одна из подгрупп деревьев (номера 17–28) была посажена на одной территории и, вероятно, в одно время – с двух сторон от пешеходной дороги. Из табл. 2 видно, что даже эта группа растений была крайне гетерогенна – число выявленных SNP составило от 6 до 44.

Для некоторых сайтов с SNP выявлено больше одного варианта нуклеотидов. Надо отметить, что для таких SNP соотношение аллельных вариантов в одних случаях было близко к 50/50, а в других – неравномерным (см. Приложение). Можно предположить, что соотношение 50/50 наблюдается в гибридах и является следствием генетических различий в ITS-последовательностях между отцовскими и

Таблица 1. Последовательности праймеров для подготовки ДНК-библиотек

Название праймера	Последовательность праймера
ITS5_IIIu_F	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGA CAGTCGTAACAAGGTTCCGTTAGGTG
ITS4_IIIu_R	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAG ACAGTCCTCCGCTTATTGATATGC
Nextera XT v2 (i7)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i7] GTCTCGTGGGCTCGG
Nextera XT v2 (i5)	AATGATACGCGCCACCAGAGATCTACAC [i5]TCGTCGGCAGCGTC

Примечание. Участки праймеров, необходимые для амплификации ITS-последовательностей, выделены курсивом; i7 и i5 – последовательности для двойного индексирования образцов.

материнским растениями. Для SNP со значительным преобладанием одного нуклеотидного варианта над другим вероятнее наличие полиморфизма среди многочисленных геномных копий ITS-последовательностей.

Обсуждение

Тополь служит модельным объектом для биологических исследований деревьев (Jansson, Douglas, 2007). За последние десятилетия разработаны и применены многочисленные подходы для анализа генома тополя, изучения взаимодействия генотипа и среды, а также выявления меж- и внутривидового полиморфизма у представителей рода *Populus* (Jansson et al., 2010; Melnikova et al., 2017). Морфологические признаки активно используются в исследованиях представителей *Populus*, растущих на территории Москвы и Московской области. Показана высокая гетерогенность популяций тополей Москвы и широкое распространение межвидовых гибридов (Костина, Насимович, 2014; Kostina et al., 2017).

Помимо морфологических признаков, для оценки разнообразия растений эффективно применение молекулярно-генетических маркеров (Melnikova et al., 2009–2011; Khadeeva et al., 2011; Bolsheva et al., 2015). В нашей работе мы впервые использовали высокопроизводительное секвенирование ITS-последовательностей для оценки генетического разнообразия тополей г. Москвы. ITS-последовательности также применялись для изучения полиморфизма и баркодирования видов тополя, растущих в Западном Китае: число выявленных SNP было высоким и составило 38 (Feng et al., 2013), что сопоставимо с полученными нами данными. Стоит отметить, что по сравнению с секвенированием по Сэнгеру высокопроизводительное секвенирование ITS-последовательностей, использованное в нашей работе, позволило получить значительно более полную картину генетического полиморфизма тополей, растущих в Москве, и выявить высокий уровень генетического разнообразия исследованных растений. Можно предположить, что столь гетерогенные популяции тополей высокоадаптивны и имеют преимущество при выживании в экологически неблагоприятных городских условиях. Мы также показали, что при посадке тополей в Москве, вероятно, использовался крайне полиморфный растительный материал: даже деревья, поса-

¹ Приложение см. по адресу:
<http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/appx8.pdf>

Таблица 2. Однонуклеотидные полиморфизмы тополей, растущих на территории г. Москвы, по ITS-последовательностям

№ п/п	Число			№ п/п	Число		
	парных прочтений	SNP*	SNP с несколькими вариантами нуклеотидов		парных прочтений	SNP*	SNP с несколькими вариантами нуклеотидов
1	4886	11	0	21	2530	7	2
2	4447	16	11	22	2169	10	8
3	3274	8	3	23	1606	6	2
4	4465	4	0	24	2740	16	12
5	7812	30	13	25	4463	44	37
6	5920	29	13	26	2586	9	7
7	1329	6	2	27	2619	10	8
8	1685	7	5	28	3086	39	37
9	4863	16	2	29	2727	10	8
10	321	10	10	30	2443	10	8
11	3171	13	9	31	1482	8	6
12	2597	18	6	32	4008	39	31
13	2829	10	8	33	2722	25	21
14	2740	9	6	34	3017	9	5
15	2567	9	7	35	1784	9	6
16	3908	25	21	36	2916	18	15
17	6592	30	14	37	2944	12	10
18	2150	8	6	38	1117	8	6
19	2373	9	7	39	1186	8	6
20	2163	10	8	40	1217	22	20

* Число однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) относительно ITS-последовательностей *P. trichocarpa* (GenBank: AJ006440.1).

женные в одно время на одной ограниченной территории, значительно различаются генетически.

Результаты нашей работы закладывают основу для разработки молекулярно-генетических маркеров для идентификации видов и межвидовых гибридов тополя, растущих на территории Москвы, а также для определения происхождения ряда естественных гибридов. Кроме того, в недавних исследованиях показано, что пол тополя генетически детерминирован, и лишь небольшая доля деревьев с рекомбинациями в ассоциированном с полом участке генома, вероятно, может изменять пол (Gerald et al., 2015; Борхерт и др., 2017; McKown et al., 2017). Это открывает новые возможности для молекулярного маркирования и использования в озеленении только мужских, не образующих пуха тополей, а генетическое баркодирование с применением секвенирования ITS-последовательностей позволит проводить оценку полиморфизма и поддерживать разнообразие адаптивных к неблагоприятным городским условиям популяций.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 15-34-70054 «мол_а_мос». Работа выполнена на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы / References

- Борхерт Е.В., Дмитриев А.А., Краснов Г.С., Большева Н.Л., Кудрявцева А.В., Мельникова Н.В. Однонуклеотидные полиморфизмы генома тополя, ассоциированные с полом. *Acta Naturae*. 2017; Спецвып.1(9):61. [Borkhert E.V., Dmitriev A.A., Krasnov G.S., Bolsheva N.L., Kudryavtseva A.V., Melnikova N.V. Sex associated single nucleotide polymorphisms in the poplar genome. *Acta Naturae*. 2017; Spec. Iss. 1(9):61. (in Russian)]
- Костина М.В., Насимович Ю.А. К систематике рода *Populus* L. II. Значение признаков коробочек для определения систематического статуса тополей, культивируемых и дичающих в Московском регионе. *Бюл. Моск. о-ва испытателей природы*. Отд. биол. 2014; 119(5):74-79. [Kostina M.V., Nasimovich J.A. On the taxonomy of *Populus* L. II. The importance of fruit characters for identification of cultivated and adventive species in the Moscow region. *Byulleten' Moskovskogo Obschestva Ispytateley Prirody = Bulletin of the Moscow Society of Naturalists*. Biol. Ser. 2014; 119(5):74-79. (in Russian)]
- Bolsheva N.L., Zelenin A.V., Nosova I.V., Amosova A.V., Samatadze T.E., Yurkevich O.Y., Melnikova N.V., Zelenina D.A., Volkov A.A., Muravenko O.V. The diversity of karyotypes and genomes within section *Syllinum* of the genus *Linum* (Linaceae) revealed by molecular cytogenetic markers and RAPD analysis. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0122015. DOI 10.1371/journal.pone.0122015.
- Eckenwalder J.E. Systematics and evolution of *Populus*. In: Stetler R.F., Bradshaw H.D., Heilman P.E., Hinckler T.M. (Eds.). *Bio-*

- logy of *Populus* and its Implications for Management and Conservation. Ottawa: Can. Government Publ., 1996;7-32.
- Feng J., Jiang D., Shang H., Dong M., Wang G., He X., Zhao C., Mao K. Barcoding poplars (*Populus* L.) from western China. PLoS One. 2013;8(8):e71710. DOI 10.1371/journal.pone.0071710.
- Geraldes A., Hefer C.A., Capron A., Kolosova N., Martinez-Nunez F., Soolanayakanahally R.Y., Stanton B., Guy R.D., Mansfield S.D., Douglas C.J., Cronk Q.C. Recent Y chromosome divergence despite ancient origin of dioecy in poplars (*Populus*). Mol. Ecol. 2015; 24(13):3243-3256. DOI 10.1111/mec.13126.
- Hamzeh M., Dayanandan S. Phylogeny of *Populus* (Salicaceae) based on nucleotide sequences of chloroplast *trnT-trnF* region and nuclear rDNA. Am. J. Bot. 2004;91(9):1398-1408. DOI 10.3732/ajb.91.9.1398.
- Hollingsworth P.M., Graham S.W., Little D.P. Choosing and using a plant DNA barcode. PLoS One. 2011;6(5):e19254. DOI 10.1371/journal.pone.0019254.
- Hsiao C., Chatterton N.J., Asay K.H., Jensen K.B. Phylogenetic relationships of the monogenomic species of the wheat tribe, Triticeae (Poaceae), inferred from nuclear rDNA (internal transcribed spacer) sequences. Genome. 1995;38(2):211-223.
- Jansson S., Bhalerao R.P., Groover A.T. Genetics and Genomics of *Populus*. New York: Springer-Verlag, 2010. DOI 10.1007/978-1-4419-1541-2.
- Jansson S., Douglas C.J. *Populus*: a model system for plant biology. Annu. Rev. Plant Biol. 2007;58:435-458. DOI 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103956.
- Jiang D., Feng J., Dong M., Wu G., Mao K., Liu J. Genetic origin and composition of a natural hybrid poplar *Populus × jrtyschensis* from two distantly related species. BMC Plant Biol. 2016;16:89. DOI 10.1186/s12870-016-0776-6.
- Khadееva N.V., Goryunova S.V., Kochumova A.A., Yakovleva Y.Y., Mel'nikova N.V., Zholobova O.O., Korotkov O.I., Kudryavtsev A.M. Genetic monitoring of populations of *Matthiola fragrans* (Bunge) using RAPD and AFLP analysis. Biol. Bull. 2011;38(4): 325-331. DOI 10.1134/S1062359011040078.
- Kostina M.V., Puzryov A.N., Nasimovich J.A., Parshevnikova M.S. Representatives of the sections *Aigeiros* Duby and *Tacamahaca* Spach (genus *Populus* L., Salicaceae) and their hybrids in cities of central and eastern European Russia. Skvortsovia. 2017;3(3): 97-119.
- Li D.Z., Gao L.M., Li H.T., Wang H., Ge X.J., Liu J.Q., Chen Z.D., Zhou S.L., Chen S.L., Yang J.B., Fu C.X., Zeng C.X., Yan H.F., Zhu Y.J., Sun Y.S., Chen S.Y., Zhao L., Wang K., Yang T., Duan G.W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011;108(49):19641-19646. DOI 10.1073/pnas.1104551108.
- McKown A.D., Klapste J., Guy R.D., Soolanayakanahally R.Y., La Mantia J., Porth I., Skyba O., Unda F., Douglas C.J., El-Kassaby Y.A., Hamelin R.C., Mansfield S.D., Cronk Q.C.B. Sexual homomorphism in dioecious trees: extensive tests fail to detect sexual dimorphism in *Populus*. Sci. Rep. 2017;7(1):1831. DOI 10.1038/s41598-017-01893-z.
- Melnikova N.V., Borhert E.V., Martynov S.P., Okuneva I.B., Molkanova O.I., Upelnik V.P., Kudryavtsev A.M. Molecular genetic marker-based approaches to the verification of lilac *Syringa vulgaris* L. *in vitro* germplasm collections. Russ. J. Genet. 2009;45(1):85-90. DOI 10.1134/S1022795409010128.
- Melnikova N.V., Borkhert E.V., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Dmitriev A.A. Sex-specific response to stress in *Populus*. Front. Plant Sci. 2017;8:1827. DOI 10.3389/fpls.2017.01827.
- Melnikova N.V., Konovalov F.A., Kudryavtsev A.M. Long terminal repeat retrotransposon *Jeli* provides multiple genetic markers for common wheat (*Triticum aestivum*). Plant Genet. Resour. 2011;9(2):163-165. DOI 10.1017/S1479262111000487.
- Melnikova N.V., Kudryavtseva A.V., Zelenin A.V., Lakunina V.A., Yurkevich O.Y., Speranskaya A.S., Dmitriev A.A., Krinitsina A.A., Belenikin M.S., Uroshlev L.A., Snezhkina A.V., Sadritdinova A.F., Koroban N.V., Amosova A.V., Samatadze T.E., Guzenko E.V., Lemesh V.A., Saviлова A.M., Rachinskaja O.A., Kishlyan N.V., Rozhmina T.A., Bolsheva N.L., Muravenko O.V. Retrotransposon-based molecular markers for analysis of genetic diversity within the genus *Linum*. BioMed Res. Int. 2014;2014:231589. DOI 10.1155/2014/231589.
- Melnikova N.V., Mitrofanova O.P., Liapounova O.A., Kudryavtsev A.M. Global diversity of durum wheat *Triticum durum* Desf. for alleles of gliadin-coding loci. Russ. J. Genet. 2010;46(1):43-49. DOI 10.1134/S1022795410010072.
- Poczai P., Hyvonen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects. Mol. Biol. Rep. 2010;37(4):1897-1912. DOI 10.1007/s11033-009-9630-3.
- Rae A.M., Street N.R., Rodriguez-Acosta M. *Populus* Trees. In: Kole C. (Ed.). Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants. Vol. 7. Forest Trees. Berlin; Heidelberg: Springer-Verlag, 2007;1-28. DOI 10.1007/978-3-540-34541-1_1.
- Roe A.D., MacQuarrie C.J., Gros-Louis M.C., Simpson J.D., Lamarche J., Beardmore T., Thompson S.L., Tanguay P., Isabel N. Fitness dynamics within a poplar hybrid zone. II. Impact of exotic sex on native poplars in an urban jungle. Ecol. Evol. 2014;4(10):1876-1889. DOI 10.1002/ece3.1028.
- Tuskan G.A., Dfazifio S., Jansson S., Bohlmann J., Grigoriev I., Hellsten U., Putnam N., Ralph S., Rombauts S., Salamov A., Schein J., Sterck L., Aerts A., Bhalerao R.R., Bhalerao R.P., Blaudez D., Boerjan W., Brun A., Brunner A., Busov V., Campbell M., Carlson J., Chalot M., Chapman J., Chen G.L., Cooper D., Coutinho P.M., Couturier J., Covert S., Cronk Q., Cunningham R., Davis J., Degroove S., DeJardin A., Depamphilis C., Detter J., Dirks B., Dubchak I., Duplessis S., Ehrling J., Ellis B., Gendler K., Goodstein D., Gribskov M., Grimwood J., Groover A., Gunter L., Hamberger B., Heinze B., Helariutta Y., Henrissat B., Holligan D., Holt R., Huang W., Islam-Faridi N., Jones S., Jones-Rhoades M., Jorgensen R., Joshi C., Kangasjarvi J., Karlsson J., Kelleher C., Kirkpatrick R., Kirst M., Kohler A., Kalluri U., Larimer F., Leebens-Mack J., Leple J.C., Locascio P., Lou Y., Lucas S., Martin F., Montanini B., Napoli C., Nelson D.R., Nelson C., Nieminen K., Nilsson O., Pereda V., Peter G., Philippe R., Pilate G., Poliakov A., Razumovskaya J., Richardson P., Rinaldi C., Ritland K., Rouze P., Ryabov D., Schmutz J., Schrader J., Segerman B., Shin H., Siddiqui A., Sterky F., Terry A., Tsai C.J., Uberbacher E., Unneberg P., Vahala J., Wall K., Wessler S., Yang G., Yin T., Douglas C., Marra M., Sandberg G., Van de Peer Y., Rokhsar D. The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). Science. 2006;313(5793):1596-1604. DOI 10.1126/science.1128691.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. New York: Acad. Press, 1990;315-322. DOI 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1.