

УДК: 581.3:576.3:577.2

ОЦІНКА ГЕНЕТИЧНОГО ТА РЕПРОДУКТИВНОГО СТАНУ ІНВАЗИВНИХ ПОПУЛЯЦІЙ *ULMUS PUMILA* ТА *U. SUBEROSA* У СТЕПОВОМУ ПРИДНІПРОВ'Ї ЗА УМОВ ЗМІНИ КЛІМАТУ

О.А. КРАВЕЦЬ¹, Я.В. ПІРКО Я.В.¹, Л.О. КАЛАФАТ¹, А.М. РАБОКОНЬ¹, А.С. ПОСТОВОЙТОВА¹,
Ю.О. БІЛОНОЖКО¹, С.М. ПРИВАЛІХІН¹, Ю.В. ЛИХОЛАТ², Я.Б. БЛЮМ¹

¹ Інститут харчової біотехнології та геноміки НАН України, Україна, 04123, Київ, вул. Осиповського, 2а

² Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара, Україна, 49000, Дніпро, Дніпропетровська область, проспект Гагаріна, 72

E-mail: kravetshelen@gmail.com, blume.yaroslav@nas.gov.ua

*Проаналізовано ступінь внутрішньовидового генетичного поліморфізму та гетерозиготності, ембріональну загибель та життєздатність насіння, а також цитогенетичний стан вегетативних меристем *Ulmus pumila* та *U. suberosa* з метою з'ясування механізмів інвазивності їхніх популяцій в степовому Придніпров'ї за умов змін клімату. Досліджені популяції *U. pumila* відрізнялися за показниками ембріональної загибелі, життєздатності насіння, насінневої продуктивності. Популяції, що зростають у більш екологічно сприятливих умовах, відзначаються кращим репродуктивним, фізіологічним та генетичним станом. За більшістю використаних мікросателітних локусів досліджені популяції характеризувались відносно низьким рівнем генетичної мінливості, надлишком гомозиготних генотипів та дефіцитом гетерозигот, що вказує на певний рівень інбредності аналізованих рослин. Найбільший дефіцит гетерозигот встановлений у популяції *U. pumila* з високою щільністю деревостану та значними показниками ембріональної загибелі насіння; менший дефіцит — у популяції з відносно великою площею та низькою щільністю деревостану і, відповідно, низькими показниками ембріональної загибелі. Низький індекс хромосомних перебудов у вегетативних меристемах також підтверджує незначний рівень генетичної мінливості, ймовірну відсутність гібридизації та генетичний гомеостаз у *U. pumila*. Популяція *U. suberosa* характеризувалась підвищеними індексами ембріональної загибелі, пошкодження насіння та низькою насінневою продуктивністю, що корелювало з надлишком гомозиготних*

*генотипів. Всі досліджені екземпляри *U. suberosa* за мікросателітними локусами були мономорфними. В цілому, за генетичними та репродуктивними показниками, насінневе відтворення та поширення *U. pumila* у степовому Придніпров'ї в умовах кліматичних змін суттєво не лімітується. В той же час, насінневе відтворення *U. suberosa* може обмежуватися.*

Ключові слова: *Ulmus pumila*, *U. suberosa*, інвазивні популяції, мікросателітні локуси, ембріональна загибель, гетерозиготність, хромосомні перебудови, степове Придніпров'я.

Вступ. Ефекти глобальних кліматичних змін останніх десятиліть асоційовані із загальною тенденцією до розширення ареалу адвентивних видів рослин. Інвазивність адвентивних видів призводить до змін складу природних і штучних рослинних угруповань, знижує стійкість екосистем, створюючи загрозу їхньому існуванню. Так, посилення аридних рис регіонального клімату може спричиняти зсуви фенологічних ритмів та етапів онтогенезу рослин, зміни в їх репродуктивній системі [1]. Стратегія таких змін може бути пов'язана з вирішенням проблеми водного дефіциту та переходом на більш економне використання внутрішніх енергоресурсів [2]. За таких умов деякі адвентивні види успішно розширюють свої традиційні ареали та просуваються на північ. Тим не менш, в питанні, за допомогою яких механізмів відбувається зростання інвазивності адвентивних рослин, до сих пір не існує універсальних показників, які б точно і коректно відображали генетичний

© О.А. КРАВЕЦЬ, Я.В. ПІРКО, Л.О. КАЛАФАТ,
А.М. РАБОКОНЬ, А.С. ПОСТОВОЙТОВА,
Ю.О. БІЛОНОЖКО, С.М. ПРИВАЛІХІН,
Ю.В. ЛИХОЛАТ, Я.Б. БЛЮМ, 2020

стан популяцій та їх репродуктивний потенціал. Дослідження такого роду необхідні також для ефективного контролю та розробки шляхів запобігання міграції адвентивних видів рослин в умовах кліматичних змін.

Репродуктивна система рослин реагує на зміни клімату однією з перших. Рід *Ulmus* характеризується екологічною та репродуктивною пластичністю, що дозволяє його представникам адаптуватись до нових екологічних ніш [3, 4]. У природних умовах репродуктивна стратегія більшості видів в'язів зумовлена двома типами розмноження — вегетативним та статевим [3–5]. Якщо вегетативна репродукція обумовлює появу чисельних паростків на коренях (клонів) поблизу батьківських особин, то статєва, навпроти, забезпечує ріст нових паростків на віддалі, зумовлюючи розширення ареалу [5]. Насіння в'язів дуже летке і легко поширюється на великі території. Тому статєве розмноження ефективно через колонізацію територій на середніх та далеких відстанях, однак, його успіх залежить від структури та розмірів популяції, впливу біотичних та абіотичних чинників, тощо [3–6].

Важливим показником генетичного стану популяції є, як відомо, рівень гетерозиготності, який залежить від кількості особин, що утворюють інвазивні популяції, перезапильюючись в її межах, та від походження екземплярів цих рослин [6, 7]. Генетичне різноманіття адвентивних видів залежить також від гібридизаційних процесів зі спорідненими нативними видами місцевої флори [7, 8]. Одним з показників гетерозиготності популяцій є ембріональна загибель — досить мінлива репродуктивна ознака, яка вказує на відсоток насіння з відсутнім, недорозвинутим чи загиблим (абортованим) зародком у супліддях [8, 9]. Дійсно, у вітрозапильних рослин зародки досить часто абортуються після самоzapилєння внаслідок переходу в гомозиготний стан тих локусів, гетерозиготність яких забезпечується природним добором, що може супроводжуватися збільшенням експресії шкідливих рецесивних, летальних або сублетальних генів [9, 10]. Крім того, відсутність зародка в насінні може бути наслідком випадіння запилення/зaplіднення, партенокарпії, жіночої стерильності або пошкодження зародка тваринами

[3, 4, 9, 10]. Примітно, що у деяких видів в'язів періодично утворюється дуже велика частка порожнього (партенокарпічного) насіння (empty samara) [3, 4, 6]. Між насінневою продуктивністю і появою проростків відмічена позитивна кореляція, однак, виживаність останніх низька [6], що може бути наслідком неякісного насіння або зростання генетичного вантажу, в тому числі, через перехід в гомозиготний стан деяких локусів.

Відомо, що при колонізації нових територій, дерева в межах однієї популяції або насаджень, завдяки генетичній мінливості, відрізняються одне від одного за рівнем активації специфічних реакцій на стрес. Молекулярно-генетичні дослідження популяцій інвазивних видів можуть забезпечити ключове розуміння історії їхнього вторгнення, можливої гібридизації з аборигенними видами та подальшої еволюції, а також обґрунтувати заходи для своєчасного виявлення й ефективного контролю інвазій. Проте до сих пір мало інформації про генетичні фактори, які забезпечують поширення та процвітання інвазивних видів у різних екологічних та кліматичних зонах. Поглиблене вивчення механізмів інвазивності адвентивних видів рослин на основі молекулярно-генетичних досліджень є актуальною проблемою, що очікує свого вирішення. Отже, метою нашої роботи було оцінити генетичний та репродуктивний стан популяцій *Ulmus pumila* та *U. suberosa* за допомогою показників ембріональної загибелі насіння, рівня хромосомних перебудов у вегетативних меристемах та молекулярно-генетичного аналізу ДНК для з'ясування механізмів зростання інвазивності цих видів у Степовому Придніпров'ї за умов змін клімату.

Матеріал та методи. *Ulmus pumila* L. — в'яз приземкуватий (син. низький, туркестанський, сибірський, карагач) з родини Ulmaceae — один з найбільш проблемних південно-європейських інвазивних видів азійського походження, поширений на південному сході та центральній частині України. *U. suberosa* Moench, або *U. campestris* var. *suberosa* Wahl — в'яз корковий, теж адвентивний інвазивний вид азійського походження, розповсюджений майже по всій території України (крім Карпат і крайнього півдня). Обидва види диплоїди; каріотип *U. pumila*

та *U. suberosa* складає $2x = 2n = 28$ хромосом [11, 12].

Ембріональна загибель та життєздатність насіння. Насіння *U. pumila* було зібрано в травні-червні 2018 р. в трьох популяціях передмістя Дніпра. Перша природна популяція (ПП1) була угрупованням різновікових особин з високою щільністю деревостану (11,9 шт./м²), що займала площу 70 × 80 м². Друга популяція (ПП2), що характеризувалась присутністю деревних рослин інших видів, займала площу 90 × 80 м² із щільністю деревостану 0,02 шт./м². Третя популяція (ПП3) також відзначалась присутністю інших видів дерев. Разом із різновіковими деревними і чагарниковими видами ПП3 займала площу 250 × 30 м². Щільність рослин *U. pumila* у ПП3 складала 0,1 шт./м². З 7 дерев у кожній популяції було проаналізовано по 200 насінин. Популяція іншого виду, *U. suberosa*, розташована у Міжнародному біосферному стаціонарі ім. О.Л. Бельгарда. Вона займає площу 60 × 5 м²; щільність різновікових особин в'яза коркового становила 0,3 шт./м². Для *U. suberosa* було проаналізовано 355 насінин з 14 дерев.

Ембріональну загибель та життєздатність насіння вивчали шляхом пророщування насіння на вологому фільтрувальному папері та за допомогою цитологічних, анатомічних і статистичних методів. Для отримання проростків використовували повноцінне за морфологічними показниками насіння, хоча його схожість теж варіювала. Для аналізу ембріональної загибелі (ЕЗ) диференціювали 5 категорій насіння (див. далі). Індeksi цих категорій підраховували в відсотках як $EZ = (H3 + PH) \cdot 100 / 3C$, де H3 – насіння з недорозвиненим зародком, PH – партенокарпічне насіння, 3C – все проаналізоване насіння разом.

Аналіз та підрахунки ембріональної загибелі проводилися за допомогою стереооптичного мікроскопу та цифрової камери для макрозйомки (Canon).

Цитогенетичний аналіз. Матеріалом для цитогенетичних досліджень слугувала апікальна меристема коренів пророслого насіння *U. pumila* та *U. suberosa*. Першу хвилю мітозів аналізували на 3-денних проростках з корінцями довжиною 4–5 мм. Подальші мітози визначали на корінцях довжиною від 6 до 10 мм. Об'єм вибірки

на кожен популяцію складав 8–10 корінців. Досліджували також стеблову/листяну меристему вегетативних бруньок укорінених черенків одно-дворічних гілок *U. pumila*. Оскільки частка клітин з хромосомними перебудовами була низькою, ми враховували всі цитопатології в мітозах (та наявність мікроядер в інтерфазі) по відношенню до загальної суми мітозів (або клітин) в полі зору. Кореневі та стеблові апекси фіксували в оцетоалкоголі; корені мацерували в 5N HCl (50 хв при кімнатній температурі), стеблову меристему мацерували в 1N HCl (30 хв), фарбували оцетогематоксиліном та виготовляли давлені препарати згідно загальноприйнятої цитологічної методики. Препарати аналізували за допомогою світлової та люмінесцентної мікроскопії (мікроскопи AxioStar та AxioScope, Zeiss); фотографували їх, користуючись цифровою камерою AxioCam MRc5 (Zeiss) та програмним забезпеченням AxioVision 4.7 (Zeiss). Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою функцій програми Microsoft Excel.

Молекулярно-генетичний аналіз. ДНК виділяли з вегетативних тканин (листові пластинки) з 20 дерев *U. pumila* в кожній з трьох досліджених популяцій (ПП1, ПП2 та ПП3) та з 20 дерев *U. suberosa* в межах однієї популяції. Геномну ДНК екстрагували за допомогою ЦТАБ-методу [13]. Якість ДНК перевіряли за допомогою електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі і визначали її концентрацію спектрофотометрично на біофотометрі «Eppendorf». Зразки ДНК зберігали при –20 °С. ПЛР проводили на ампліфікаторі ThermalCycler 2720 («Applied Biosystems», США). Реакційна суміш (об'ємом 25 мкл) містила п'ятикратний ПЛР буфер з сульфатом амонію, 2,5 мМ MgCl₂, 50 нг рослинної ДНК, 1 мкМ кожного з праймерів, 0,2 мМ кожного дНТФ, 0,5 од. Таq полімерази («Fermentas», Литва). Ампліфікацію проводили за наступним протоколом: початкова денатурація (94 °С) – 3 хв, 35 циклів ампліфікації (денатурація 94 °С – 15 с, відпал праймерів 55 °С/60 °С – 1 хв 30 с, елонгація 72 °С – 2 хв), кінцева елонгація 72 °С – 15 хв, 10 °С – утримання.

ПЛР-продукт SSR-локусів розділяли за допомогою електрофорезу в 6%-ному неденатуруючому поліакриламідному гелі в 1 × TBE-

буфері [14] протягом 2 год при напрузі 300 В у присутності ДНК-маркеру (O'Gene Ruler™ 100bp Plus DNA Ladder, ready-to-use; «Fermentas», Литва). Візуалізацію фрагментів проводили шляхом фарбування гелів нітратом срібла [15], після чого гель фотографували у видимому світлі, а отримані зображення піддавали подальшому аналізу. При обробці зображень гелів алелі SSR-локусів позначались як кодомінантні маркери, при цьому назві алеля привласнювався оціночний розмір амплікону (п.н.). Аналіз зображень електрофоретичних гелів визначали за допомогою програми GelAnalyzer: (<http://www.gelanalyzer.com/>).

ПЛР-аналіз проводили із застосуванням SSR-локусів UR101, UR138, UR153, UR158, UR173b для *U. pumila* та *U. suberosa* (таблиця). Послідовності праймерів для ПЛР взято з літературних джерел [16]. Первинна статистична обробка генетичних даних проводилася в програмі GenA1EX [17].

Результати та обговорення. *U. pumila* та *U. suberosa* – вітрозапильні, алогамні види, цвітіння яких в дослідженому регіоні України (степове Придніпров'я) відбувається в березні і триває 1–2 тижні до появи перших листків. Плоди швидко дозрівають із завершенням формування насіння вже в травні. Схожість насіння значно варіює (від 0 до 80 %). Плід – плоский крилатий горішок з перетинчастими крилами – крилатка (рис. 1). Дозріле насіння сочевицеподібне, з добре сформованим зародком, без ендосперму.

Для аналізу ембріональної загибелі насіння диференціювали декілька його типів: 1) повноцінне насіння з добре сформованими зародком та перикарпієм (рис. 1, б, в, ж, з); 2) насіння з зародком, сім'ядолі якого сягають менше 1/2 від повністю сформованого зародка (рис. 1, в, и); 3) насіння з нерозвинутим зародком, розміри якого становлять 1/4 та менше від повністю сформованого зародка (рис. 1, г, і); 4) насіння без зародку з перикарпієм (партенокарпічне насіння) (рис. 1, д, к); 5) насіння, зародок якого пошкоджено комахами або іншими тваринами (рис. 1, е, л).

Ulmus pumila. Показники ембріональної загибелі насіння у першій популяції (ПП1) широко варіювали (17–64 %), складаючи в середньому, 41 % (рис. 2). Частка насіння, ушкодженого комахами, дорівнювала 19 % (9–30 %). Відсоток повноцінного життєздатного насіння складав 40 % (21–69 %). Схожість такого насіння варіювала (35–100 %), в середньому складаючи 57 %. Насіння з недорозвиненим зародком в лабораторних умовах протягом трьох тижнів залишалось непророслим. Показники ембріональної загибелі насіння в другій популяції (ПП2) були менш варіабельними (6–39 %) і в середньому дорівнювали 26 % (рис. 2). Частка насіння, ушкодженого комахами, варіювала (0–10 %), в середньому складаючи 2 %. Відсоток повноцінного насіння сягав 72 % (34–88 %), значно перевищуючи цей показник у ПП1. Схожість насіння збільшувалась до

Послідовності праймерів та основні характеристики SSR-локусів

Локус	Послідовність праймерів (5'–3')	Характер повторів	Ta (°C)	A	N	Діапазон ампліконів (п.н.)	He	Ho
UR101	F-GGGAAGTCAAATTCATGA R-CTCCAATGGCATCTTCACAA	(TA)5(CA)9	60	7	20	120–150	0,463	0,325
UR138	F-CTAGAACCCCTTCGAAACC R-ACAAAAGCCCACACACCTC	(GA)8	60	5	20	224–242	0,181	0,125
UR153	F-AGATTCATGCCTCCAGTCG R-CCTTTCGAAATGCAGAGGTAG	(CTT)7	55	6	20	178–208	0,198	0,213
UR158	F-TTCTTCATAGGCGCTGAGGT R-TGCACCCTGTCAAAGCTAAA	(TGTA)5	55	5	20	175–187	0,287	0,325
UR173b	F-CCGTGCAACTTTCCTGCTAC R-TGACTGCCTTAGCGTCTTTAT	(TATTT)3	55	3	20	153–168	0,384	0,188

79 % (65–90 %). Насіння з недорозвиненим зародком (на 1/2–1/3 від повністю сформованого зародка) характеризувалось досить показовою схожістю (23–74 %). Цей факт вказує на тенденцію до зменшення розмірів зародка в зрілому насінні.

Індекси ембріональної загибелі насіння дерев у ППЗ склали 13 % (0–23 %) (рис. 2). Частка насіння, ушкодженого комахами, дорівнювала 4 % (0–12 %). Відсоток повноцінного насіння сягав 83 % (68–100 %); схожість – 80 % (64–91 %) – це найкращі показники серед досліджених популяцій. Отже, в передмісті м. Дніпра зустрічаються різні за репродуктивним та генетичним станом популяції *U. pumila*. У ПП1 показники ембріональної загибелі та пошкодженого насіння були досить високими, сягаючи 60%; відсоток життєздатного насіння складав менше 50 %. ПП2 та, особливо, ПП3 характеризувались низькими індексами ембріональної загибелі/пошкодження насіння (28/17 %) та, відповідно, високою його життєздатністю (79–80 %). Розміри сформованого зародка в насінні мали тенденцію до зменшення.

Ulmus suberosa. Крилатки коркового в'язу за розмірами трохи поступаються плодам в'язу призмкуватого, а за формою є більш симетричними. Для дерев аналізованої популяції властиві високі показники ембріональної загибелі насіння – 56 % (варіювання в межах 36–71 %) та низька насіннева продуктивність. Частка пошкодженого тваринами насіння дорівнювала 18 % (4–29 %). Відсоток повноцінного насіння складав 26 % (4–59 %); його схожість становила 54 % (рис. 2). Схожість насіння з недорозвиненим зародком складала всього 5,2 %. Отже, популяція *U. suberosa* характеризується не тільки підвищеними індексами ембріональної загибелі, але й низькими показниками формування повноцінного насіння, що може бути наслідком зниження рівня гетерозиготності популяції.

Цитогенетичний стан вегетативних меристем. Мітотичний індекс (МІ) в апікальній меристемі коренів проростків в першій хвилі мітозів складав для *U. pumila* 6,2 %, для *U. suberosa* 7 %. При цьому, абсолютна більшість мітозів у кореневій меристемі в обох видів та листковій меристемі у *U. pumila* характеризувалась пра-

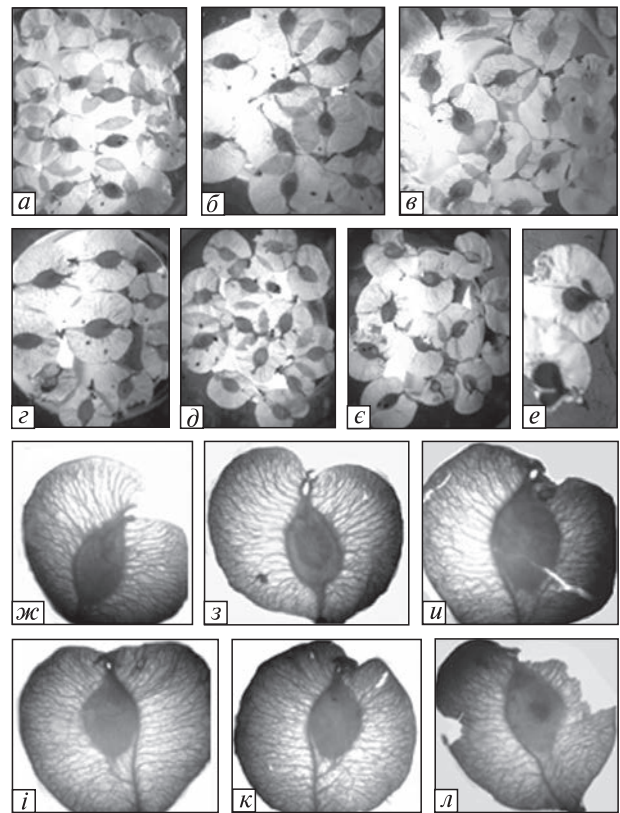
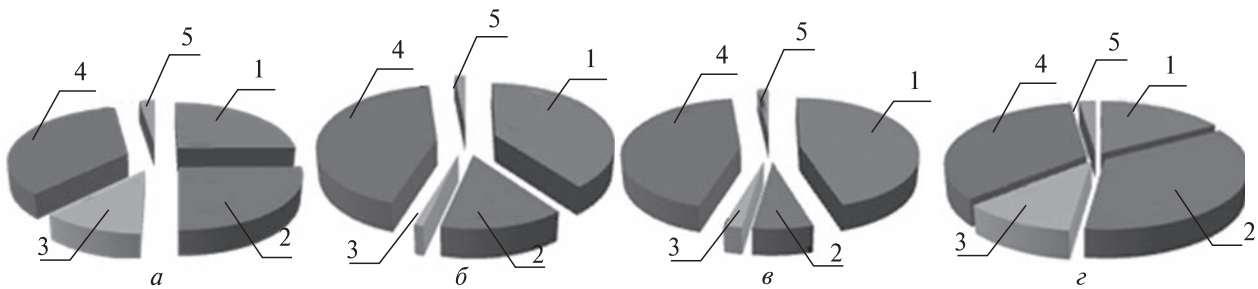


Рис. 1. Крилатки *U. pumila* (а, в, г, ж–л) та *U. suberosa* (б, д–е), що відрізняються за ступенем розвитку зародка: а – суміш насіння; б, в – повноцінне насіння, ступінь розвитку зародка в якому варіює; г – насіння з недорозвинутим зародком; д – насіння з відсутнім зародком (партенокарпічне насіння); е – насіння, пошкоджене комахами; е – насіння з близнюковими зародками різного ступеню розвитку. Категорії крилаток: ж, з – повноцінне насіння; и–і – недорозвинений зародок; к – партенокарпічне насіння; е – насіння, пошкоджене комахами. Масштаб: 1 см

вильним проходженням, тобто без хромосомних перебудов та інших цитопатологій (рис. 3 і 4). В метафазних пластинках налічувалось по 28 хромосом (рис. 3, е–з, 4, а). Хромосомні перебудови траплялись лише в першому мітозі (рис. 4). Так, в метафазі зустрічались порушення у формуванні метафазної пластинки, випадіння хромосом, хромосомні «хвости» або хромосоми, що відстають при розходженні в ана-телофазі, рідше, хроматидні мости та фрагменти (рис. 3, в, г, с, т, у–ц), 4, е, і–к). Зрідка, в кореневій меристемі траплялися поліплоїдні або анеуплоїдні клітини (рис. 3, ч–ш; 4, е). За-



1 – повноцінне насіння, %; 2 – ембріональна загибель та партенокарпічне насіння, %; 3 – насіння, пошкоджене комахами, %; 4 – схожість насіння, %; 5 – цитопатології в першому мітозі, %

Рис. 2. Діаграма показників стану насіння в *Ulmus pumila* (три популяції а–в) та *U. suberosa* (г). Категорії: повноцінне, партенокарпічне (ембріональна загибель) та пошкоджене насіння – разом складають 100 %; схожість та цитопатології першого мітозу – окремі індекси, які додавались для загальної характеристики репродуктивного стану популяції

гальна частота порушень в мітозі у кореневій меристемі складала для *U. pumila*: $3,9 \pm 0,4$ % (ПП1), $3,1 \pm 0,3$ % (ПП2), $3,3 \pm 0,3$ % (ПП3); для *U. suberosa* – $3,4 \pm 0,4$ % (рис. 2). У подальших мітозах зустрічались лише наслідки хромосомних аберацій у вигляді мікроядер та/або викидів хромосом (рис. 3, ч, ш). Формування двох метафазних пластинок в межах однієї клітини (у *U. suberosa*) (рис. 4, е) може свідчити про гібридне походження насінини. У листковій меристемі *U. pumila* частота хромосомних аберацій складала $1,8 \pm 0,2$ % (рис. 2). Тож, проростки *U. pumila* та *U. suberosa* характеризувались низькими показниками цитогенетичного навантаження, що може вказувати на низький рівень гомозиготності та/або шкідливих алелей.

Вважають, що індекс ембріональної загибелі свідчить про рівень гетерозиготності [3, 4, 6, 8]. Варіювання індивідуальних показників ембріональної загибелі може вказувати на гетерогенність популяції за віком, генетичним та фізіологічним станом. Вік дерев нерідко корелює з рівнем їх генетичного поліморфізму [8, 9]. Зрілі дерева, старші за віком, можуть відноситись до більш ранніх інтродуцентів, які не були залучені до природних гібридизаційних процесів і, як наслідок, будуть відрізнятися за генетичним станом від молодих дерев. На частоту ембріональної загибелі також впливають абіотичні та біотичні чинники, зокрема, погодні умови – на варіювання ембріональної загибелі по роках [6, 18]. Отже, погодні умови по роках, а також індивідуальний стан дерев, їхній вік, мають зна-

чний вплив на рівень та коливання ембріональної загибелі.

Враховуючи високу насінневу продуктивність в'язів, варіювання ембріональної загибелі у *U. pumila* в межах 26–36 % можна вважати незначним. Так, за даними літератури, у *U. laevis* показник ембріональної загибелі дуже різнився по роках та індивідуумах, складаючи, в середньому, 25 ± 24 % (min-max: 3–95 %) [6]. Отже, підвищення індексів ембріональної загибелі *U. pumila* в ПП1 до 41 % та її варіюванні від 17 до 64 %, ймовірно, не є екстремальним. Зважаючи на інші показники насіння (пошкодження тваринами та зниження життєздатності), це може свідчити про гетерогенність популяції та можливе послаблення фітоімунітету. Окремо слід зауважити на високу щільність деревостану в ПП1, що може бути наслідком вегетативного (клонального) розмноження і впливати на ступінь гетерозиготності.

Між насінневою продуктивністю і появою проростків у *U. americana* L. відмічена позитивна кореляція, однак, виживаність останніх низька [5]. Це може бути пов'язано як з генетичною навантаженістю меристеми хромосомними перебудовами, так і високою залежністю молодих проростків від кліматичних та інших абіотичних факторів. Рівень цитогенетичного вантажу може варіювати в залежності від генотипу та віку проростків. У різних деревних порід для виживання проростка допустимим є різний рівень хромосомних аберацій, наприклад, для сосни критичним було 7–8 % аберантних

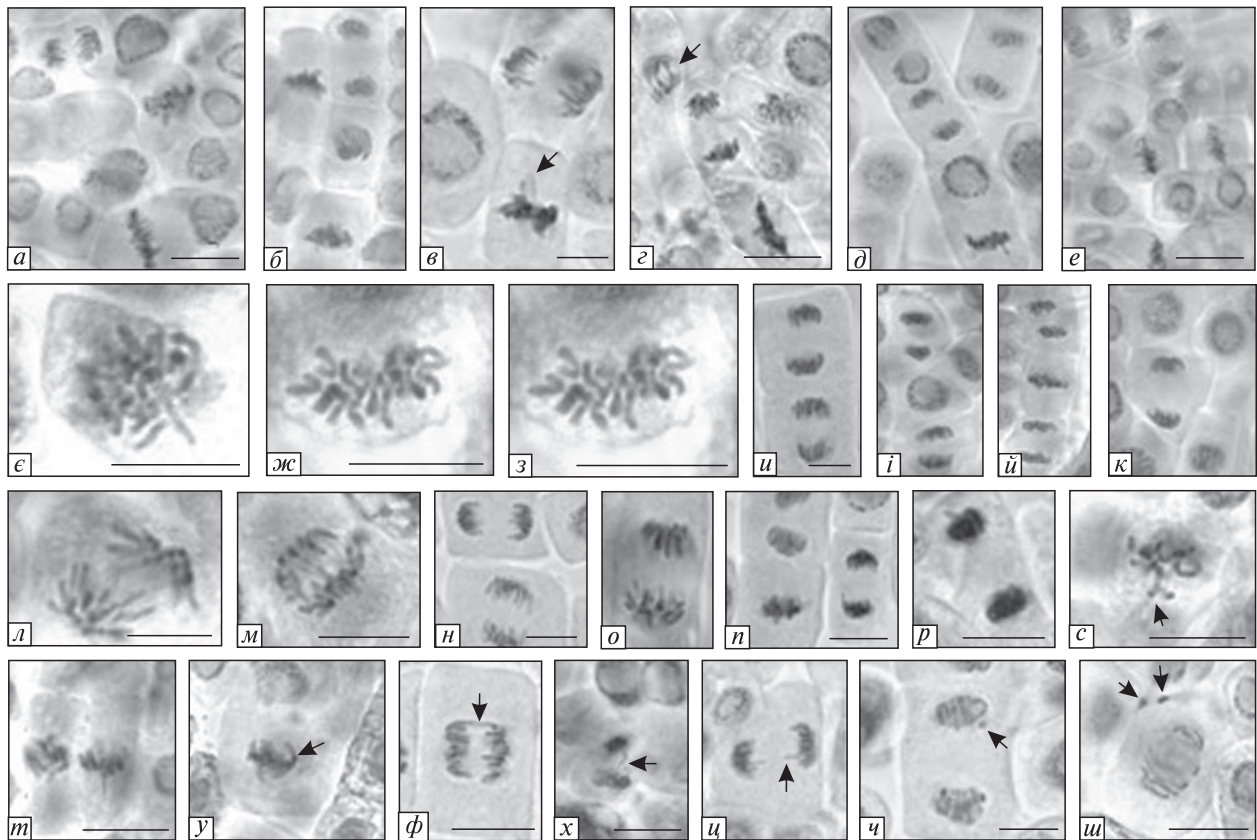


Рис. 3. Мітози в кореневій меристемі проростків *U. pumila*: а-б, е-р – мітози без порушень; е-з – метафазні пластинки ($2n = 28$); в, с, т, у – хромосоми, що відстають «хвости», або випадають з метафазної пластинки; г, ф-ц – хроматидні мости в телофазі, ч, ш – мікроядра. Масштаб: 10 мкм

клітин [19]. За нашими даними, у *U. pumila* та *U. suberosa* рівень цитогенетичного навантаження меристеми соматичних тканин є досить низьким. Тим більш, що клітини кореневої меристеми, які несуть хромосомні перебудови в першому-другому мітозах, у подальших поділах підлягають негативному добору. Тому можна вважати, що твірні тканини у досліджених видів характеризуються відносно оптимальним генетичним станом, тобто генетичним гомеостазом. Тож, вірогідність спонтанних гібридизаційних процесів у досліджених популяцій низька, хоча повністю не виключається. Вважають, що диплоїдні види *Ulmus* досить легко перезапилюються між собою, в тому числі, з нативними видами роду *Ulmus*, утворюючи добре адаптовані гібриди [8, 11], що дозволило деяким видам в'язів поширитись та адаптуватись до надзвичайно різних і складних екологічних ніш

та кліматичних зон. Серед тетраплоїдів відомі види *U. americana* L. та *U. glabra* Huds [11]. За деякими даними, гібридизаційні процеси між диплоїдними та тетраплоїдними видами *Ulmus* можуть призводити до формування міжвидових гібридів (як, наприклад, *U. thomasii*) та поліплоїдних комплексів [21, 22]. Однак, міжвидова гібридизація *Ulmus* обмежується завдяки природній несумісності взаємодії пилку та тканин стовпчика [20, 22].

Низький рівень хромосомних аберацій у вегетативних меристемах *U. pumila* узгоджується з тим, що у цього виду при самозапиленні може утворюватися життєздатне насіння [3, 5], що непрямо свідчить про низький рівень шкідливих мутацій у твірних тканинах та виживаність гомозигот. Отже, *U. pumila* здатний підтримувати свій генетичний гомеостаз навіть в несприятливих умовах зростання.

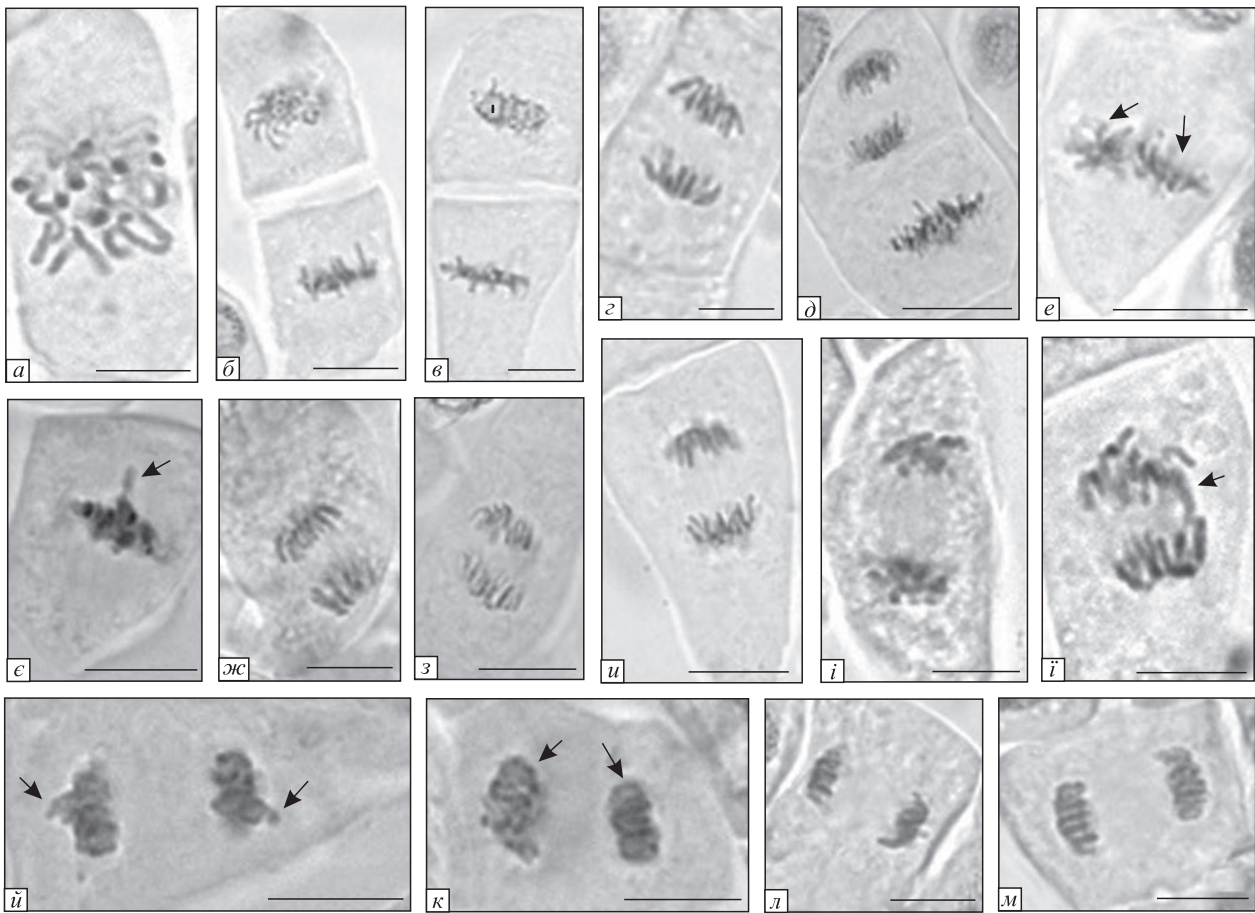


Рис. 4. Мітотичні поділи в кореневій меристемі проростків *U. suberosa*: а – метафазна пластинка ($2n = 28$); а–д, е, ж–і, л–м – мітози без порушень; е – дві окремі метафазні пластинки в одній клітині; е – викиди хромосоми з метафазної пластинки, і – анафазний міст, й – «хвости» телофазних ядер, к – асиметричні телофазні ядра. Масштаб: 10 мкм

Адаптивна стратегія деяких видів в'язів спрямована на оптимізацію кількості насіння та захист від поїдання тваринами енерговитратного спадкового матеріалу [6, 23]. Деякі види в'язів вдаються до регульованої жіночої стерильності [3, 4, 9]. Тому висока частка партенокарпічного насіння не завжди є негативним сигналом, тож може свідчити про адаптивну стратегію виду у відповідь на антропогенний тиск, зміни клімату, екологічних ніш, тощо. Щодо механізмів ембріональної загибелі, то вона може відбуватися за ознаками автофагії та програмованої клітинної загибелі [24, 25]. Так, при поліембріонії, програмована клітинна загибель слугує припиненню конкуренції між монозиготними ембріонами для забезпечення виживання лише

одного з них [25]. У *U. suberosa*, як відзначалось, у випадку формування двох зародків один з них зупиняв свій розвиток (рис. 1, е).

Поліморфізм ядерних мікросателітних локусів у *U. pumila* та *U. suberosa*. Для оцінки поліморфізму ДНК було проаналізовано ряд специфічних алелей в мікросателітних маркерах. В ході аналізу п'яти ядерних мікросателітних локусів рослин *U. pumila* та *U. suberosa* виявлено 28 алелей. В кожній вибірці виявлено унікальні алелі: найбільше для ПП1 – 5 (UR138: 240 п.н.; R153: 200 п.н., 208 п.н.; UR101: 122 п.н., 131 п.н.); для ПП2 – 3 (UR158: null, 183 п.н.; UR101: null); для ПП3 – 1 (UR153: 189 п.н.), для *U. suberosa* – 2 (UR153: 191 п.н.; UR158: 177 п.н.). В останнього всі дослідже-

ні мікросателітні локуси були мономорфні (таблиця).

Порівнюючи наші результати з даними, які було отримано для *U. pumila* у зразках з 10 різних географічних провінцій Китаю, можна зазначити відповідність кількості алелів, виявлених за локусом UR153, зменшення кількості алелів за локусом UR138 та збільшення за локусами UR101, UR158 та UR173b у рослин досліджуваних популяцій [26]. Алелі, яких не відмічено для китайських популяцій, частіше були присутні у вибірці з ПП1. Для дерев *U. rubra*, з якими *U. pumila* може перезапилюватись, кількість алелів в досліджених локусах була меншою (UR101: 3 алеля, UR138: 5, UR153: 3, UR158: 3, UR173b: 1) [16, 27]. Локуси UR 153, UR 158 у всіх ділянках виявилися більш гетерозиготними ніж UR 101, UR 138 та UR 173b, в яких був надлишок гомозигот. Наявна гетерозиготність (Ho) для локусів UR 138, UR 173b та UR 101 варіювала від 0,125 до 0,325, і була нижче за очікувану гетерозиготність (He) (0,181–0,463), для локусів UR153, UR158 наявна гетерозиготність (0,213; 0,325) була більшою, ніж очікувана (0,198; 0,287, відповідно).

Оцінка відмінності між аельним складом двох порівнюваних вибірок, за частотами кожного з проаналізованих алелів, виявила значимі відмінності (модифікований χ^2 метод) між дослідженими вибірками, окрім локусів UR138 та UR153. Середня кількість алелів за даними отриманими для мікросателітних локусів складала 3,4 алеля на локус у рослин *U. pumila* з ПП3 та 3,6 і 4,0 алеля на локус з ПП1 та ПП2. Кількість рідкісних алелів (з частотою $<0,05$) була найбільшою у ПП2 (3,2 алеля на локус) та найнижчою (2,6) у ПП3. Основні оцінки поліморфізму вибірки рослин *U. pumila* за проаналізованими мікросателітними локусами наведені на рис. 5.

Ефективна кількість алелів на локус була мінімальною для ПП3 ($N_e = 1,635$) та вищою для ПП1 ($N_e = 1,973$) та ПП2 ($N_e = 1,861$). Інформаційний індекс Шенона значимо не відрізнявся у порівнюваних вибірок та був також самим низьким з ПП3 ($I = 0,660$) та вищим і майже однаковим у ПП1 та ПП2 ($I = 0,791$ та $0,775$, відповідно). В усіх досліджених вибірках спостерігали помірний рівень очікуваної гетерозиготності (рис. 5). Найбільший її рівень був

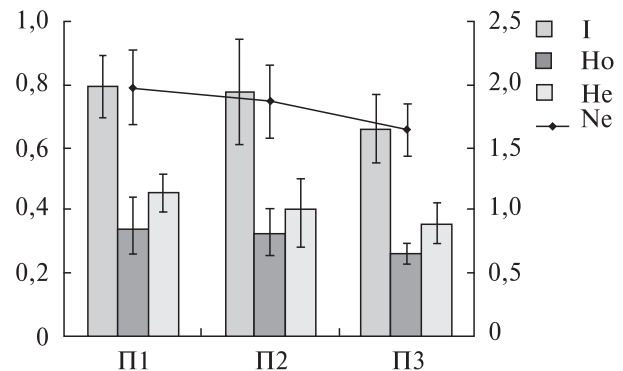


Рис. 5. Оцінки поліморфізму вибірок рослин *Ulmus pumila*. (I – інформаційний індекс Шенона; Ho – наявна гетерозиготність; He – очікувана гетерозиготність; Ne – ефективна кількість алелів)

властивий деревам *U. pumila* з популяції ПП1 ($N_e = 0,455$), яка характеризувалась моновидовим угрупованням з високою щільністю дерев. На ділянках, де були присутні інші деревні рослини, значення N_e були нижчими: для ПП2 та ПП3 ($N_e = 0,402$ та $0,354$, відповідно). Наявна гетерозиготність за мікросателітними локусами на всіх ділянках була нижчою очікуваною за рахунок надлишку гомозиготних генотипів ($N_o = 0,350$; $0,330$; $0,260$, відповідно). У досліджених вибірок майже за всіма локусами (окрім локусу UR153 у всіх вибірках, локусу UR158 у вибірці ПП1 та ПП3 і локусу UR101 у ПП1) підтверджено наявність відхилень від рівноваги Харді-Вайнберга (у бік дефіциту гетерозиготних генотипів). Невисокі показники генетичної мінливості в проаналізованих вибірках рослин *U. pumila*, порівняно з 53 популяціями в Північній Америці східноазійського походження ($N_e = 0,36$ – $0,62$) [8], можуть свідчити про збідненість генетичної структури досліджених популяцій *U. pumila*. Наявна гетерозиготність досліджених вибірок *U. pumila* за аналізованими локусами нижча, порівняно із гетерозиготністю східноазійських популяцій ($N_o = 0,35$ – $0,70$) [8], особливо для ПП3 ($N_o = 0,260$). Низький рівень генетичної мінливості було виявлено і в дослідженнях популяцій *U. pumila*, що зростають у Степовому Придніпров'ї, шляхом оцінки поліморфізму довжини інтронів генів β -тубуліну [28].

Для всіх досліджених вибірок був характерний значний дефіцит гетерозиготних генотипів

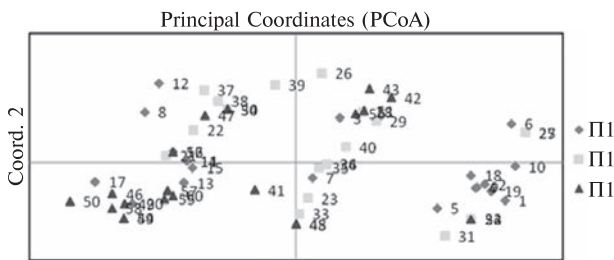


Рис. 6. Розташування представників вибірок рослин *Ulmus pumila* в просторі перших двох головних компонент

(рис. 5): найбільший – у ПП1 ($F = 0,217$), дерева якої мали найбільшу щільність, а насіння – найвищу ембріональну загибель та погану схожість; найменший дефіцит гетерозигот ($F = 0,136$) – у дерев ПП2, де найменша щільність рослин та низькі показники ембріональної загибелі. Для порівняння, – в популяції *U. pumila* східноазійського походження в Північній Америці коефіцієнт інбридингу варіював від $-0,14$ до $0,10$ [8].

Аналіз розподілу молекулярно-генетичної мінливості (AMOVA) вказує на деяку підрозділеність досліджених вибірок рослин. Так, на міжвибіркову мінливість приходилося 9 % загальної мінливості, на внутрішньовибіркову – 91 %. В природних популяціях *U. glabra* Іберійського півострова міжпопуляційна мінливість складала значну частку – 34 %, а мінливість, пов'язана з популяційною структурою, була 76 %, що, вірогідно, є наслідком невеликої кількості особин в окремих популяціях, а також підвищення впливу клонального відновлення на порушених ділянках [29].

Розташування представників вибірок у просторі головних компонент на основі генетичних дистанцій, отриманих для аельного складу, вказує на розподіл досліджених вибірок на три групи, але в кожній групі присутні дерева з усіх ділянок (рис. 6). Рослини з ПП3 і, в деякій мірі, з ПП2 в більшому ступені проявляють ознаки групування, тоді як рослини з ПП1, в просторі перших двох головних компонент розташовані більш дифузно.

Таким чином в інвазивних популяціях *U. pumila* та *U. suberosa* встановлено надлишкову кількість гомозиготних генотипів, що вказує на певний рівень інбредності аналізованих рослин.

Дерева, що зростають у більш екологічно сприятливих умовах, характеризуються кращим репродуктивним станом. Більший показник ембріональної загибелі у зрілих дерев, відносно з молодими, може також вказувати на нестачу гетерозигот ще у ранніх інтродуцентів. Отже, підвищена гомозиготність інвазивних популяцій може бути пов'язаною з умовами зростання (висока щільність деревостану), випадками самозапилення, клональною репродукцією, а також вихідною генетичною структурою материнських деревостанів. Популяція *U. suberosa* характеризується підвищеними індексами ембріональної загибелі й низькими показниками формування повноцінного насіння та насінневої продуктивності, що, очевидно, також є наслідком інбредності. Всі досліджені екземпляри *U. suberosa* за мікросателітними локусами були мономорфними.

Таким чином, можна зробити висновок, що досліджені популяції *U. pumila* та *U. suberosa* в регіоні степового Придніпров'я відрізняються за показниками ембріональної загибелі, життєздатності насіння, насінневої продуктивності. Популяції, що зростають у більш екологічно сприятливих умовах, відзначаються кращим репродуктивним, фізіологічним та генетичним станом. За більшістю використаних мікросателітних локусів досліджені популяції характеризувались відносно низьким рівнем генетичної мінливості, надлишком гомозиготних генотипів та дефіцитом гетерозигот, що вказує на певний рівень інбредності аналізованих рослин. Найбільший дефіцит гетерозигот був встановлений у першій популяції *U. pumila* з високою щільністю деревостою та значними показниками ембріональної загибелі насіння; найменший – у дерев другої популяції, з відносно великою площею та низькою щільністю деревостану і, відповідно, низькими показниками ембріональної загибелі та пошкодження насіння. Низький індекс хромосомних перебудов у вегетативних меристемах також підтверджує незначний рівень генетичної мінливості, ймовірну відсутність гібридизації та генетичний гомеостаз *U. pumila*. Популяція *U. suberosa* характеризується підвищеними індексами ембріональної загибелі, пошкодження насіння та низькою насінневою продуктивністю, що корелює з надлишковою кількістю гомозиготних генотипів.

Всі досліджені екземпляри *U. suberosa* за мікросателітними локусами були мономорфними. В цілому, за генетичними та репродуктивними показниками, насіннєве відтворення та поширення *U. pumila* у степовому Придніпров'ї в умовах кліматичних змін суттєво не лімітується ні генетичними, ні фізіологічними, ні екологічними чинниками. В той же час, насіннєве відтворення *U. suberosa* за тих самих умов може обмежуватися.

Дотримання етичних стандартів. Ця стаття не містить будь-яких досліджень з використанням людей і тварин в якості об'єктів дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Публікація містить результати досліджень, проведених при грантовій підтримці Держаного фонду фундаментальних досліджень за конкурним проектом (Ф76/39-2018).

ASSESSMENT OF GENETIC AND REPRODUCTIVE STATE OF *ULMUS PUMILA* AND *U. SUBEROSA* INVASIVE POPULATIONS IN THE DNIEPER STEPPE TO CLIMAT CHANGE

O.A. Kravets, Ya.V. Pirko, L.O. Kalafat, A.M. Rabokon, A.C. Postovoiitova, Yu.O. Bilonozhko, S.M. Privalikhin, Yu.V. Lykholat, Ya.B. Blume

Institute of Food Biotechnology and Genomics of NAS of Ukraine, 04123, Kyiv, vul. Osypovskoho, 2a, Oles Honchar Dniprovsky National University, Ukraine, 49000, Dnipro, Gagarin ave., 72
E-mail: kravetshelen@gmail.com, blume.yaroslav@nas.gov.ua

The degree of interspecific genetic polymorphism and heterozygosity, embryonic death and seed viability, as well as the cytogenetic state of the *Ulmus pumila* and *U. suberosa* vegetative meristems were studied to determine the mechanisms of invasiveness of their populations in the Dnieper steppe under conditions of climate change. The *U. pumila* populations differed on indexis of the embryonic death, seed viability and seed productivity. Populations growing in more favorable environmental conditions are distinguished by a better reproductive, physiological, and genetic conditions. For the vast majority of used microsatellite loci, the studied populations were characterized by a relatively low level of genetic variability, an excessive homozygous genotype and a deficit of heterozygotes, which indicates a certain level of inbreediness of the analyzed plants. The largest heterozygous deficiency is found in the population of

U. pumila with a high density of trees and significant rates of on seed embryonic death; a smaller deficit is in populations with a relatively large area and low density of plantations and, consequently, low rates of embryonic death. The low index of chromosomal rearrangements in vegetative meristems also confirms the insignificant level of genetic variability, the probable absence of hybridization and genetic homeostasis in *U. pumila*. The *U. suberosa* population was characterized by increased embryo death, seed damage, and low seed production which correlated with an excessive homozygous genotype. All studied *U. suberosa* samples on microsatellite loci were monomorphic. Generally, according to genetic and reproductive indicators, seed reproduction and expansion of *U. pumila* in the Dnieper steppe in conditions of climate change are not significantly limited. At the same time the seed reproduction and expansion of *U. suberosa* can be limited.

ОЦЕНКА ГЕНЕТИЧЕСКОГО И РЕПРОДУКТИВНОГО СОСТОЯНИЯ ИНВАЗИВНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *ULMUS PUMILA* И *U. SUBEROSA* В СТЕПНОМ ПРИДНЕПРОВЬЕ В УСЛОВИЯХ ИЗМЕНЕНИЯ КЛИМАТА

Е.А. Кравец, Я.В. Пирко, Л.А. Калафат, А.Н. Рабоконь, А.С. Постовойтова, Ю.А. Белоножко, С.Н. Привалихин, Ю.В. Лихолат, Я.Б. Блум

Изучены степень внутривидового генетического полиморфизма и гетерозиготности, эмбриональная гибель и жизнеспособность семян, а также цитогенетическое состояние вегетативных меристем *Ulmus pumila* и *U. suberosa* с целью выяснения механизмов инвазивности их популяций в степном Приднепровье в условиях изменений климата. Исследованные популяции *U. pumila* отличались по показателям эмбриональной гибели, жизнеспособности семян, семенной продуктивности. Популяции, растущие в более благоприятных экологических условиях, выделяются лучшим репродуктивным, физиологическим и генетическим состоянием. По большинству использованных микросателлитных локусов исследованные популяции характеризовались относительно низким уровнем генетической изменчивости, избытком гомозиготных генотипов и дефицитом гетерозигот, что указывает на определенный уровень инбредности анализируемых растений. Наибольший дефицит гетерозигот установлен в популяции *U. pumila* с высокой плотностью древостоя и значительными показателями эмбриональной гибели семян; меньший дефицит — у популяций с большей площадью и низкой плотностью древостоя и, соответственно, низкими показателями эмбриональной гибели. Низкой индекс хромосомных перестроек в

вегетативных меристемах также подтверждает незначительный уровень генетической изменчивости, вероятное отсутствие гибридизации и генетический гомеостаз у *U. pumila*. Популяция *U. suberosa* характеризовалась повышенными индексами эмбриональной гибели, повреждения семян и низкой семенной продуктивностью, что коррелировало с избыточным количеством гомозиготных генотипов. Все исследованные экземпляры *U. suberosa* по микросателлитным локусам были мономорфными. В целом, по генетическим и репродуктивным показателям, семенное воспроизводство и распространение *U. pumila* в степном Приднепровье в условиях изменений климата существенно не лимитируется. В то же время, семенное воспроизводство *U. suberosa* может ограничиваться.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Forrest, J., Miller-Rushing, A.J., Toward a synthetic understanding of the role of phenology in ecology and evolution, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 2010, vol. 365, no. 1555, pp. 3101–12. doi: 10.1098/rstb.2010.0145.
- Lurgi, M., Wells, K., Kennedy, M., Campbell, S., and Fordham, D.A., A Landscape approach to invasive species management, *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 7, pp. 1–20. doi:10.1371/journal.pone.0160417
- López-Almansa, J.C., Review. Reproductive ecology of riparian elms, *Invest Agrar: Sist. Recur. For.*, 2004, vol. 13, no. 1, pp. 17–27.
- López-Almansa, J.C., Yeung, E.C., and Gil, L., Abortive seed development in *Ulmus minor* Mill. (Ulmaceae), *Bot. J. Linnean Soc.*, 2004, vol. 145, no. 4, pp. 455–67. doi: 10.1111/j.1095-8339.2004.00297.x
- Streng, D.R., Glitzenstein, J.S., and Harcombe, P.A., Woody seedling dynamics in an east Texas floodplain. *Ecological Monographs*, 1989, vol. 59, pp. 177–204.
- Perea, R., Venturas, M., and Gil, L. Empty seeds are not always bad: Simultaneous effect of seed emptiness and masting on animal seed predation, *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 6, pp. 1–9. doi:10.1371/journal.pone.0065573.
- Sakai, A.K., Allendorf, F.W., Holt, J.S., Lodge, D.M., Molofsky, J., With, K.A., Baughman, S., Cabin, R.J., Cohen, J.E., Ellstrand, N.C., McCauley, D.E., O’Neil, P., Parker, I.M., Thompson, J.N., and Weller S.G., The population biology of invasive species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 2001, vol. 32, pp. 305–32. doi:10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114037.
- Zalapa, J.E., Brunet, J. and Guries, R.P., The extent of hybridization and its impact on the genetic diversity and population structure of an invasive tree, *Ulmus pumila* (Ulmaceae), *Evol. Applic.*, 2010, vol. 3, no. 2, pp. 157–68. doi:10.1111/j.1752-4571.2009.00106.x
- López-Almansa, J.C., Gil, L., Empty samara and parthenocarp in *Ulmus minor* s. l., *Silvae Genet*, 2003, vol. 52, pp. 241–43.
- Venturas, M., Fuentes-Utrilla, P., Ennos, R., Collada, C., and Gil, L., Human induced changes on fine-scale genetic structure in *Ulmus laevis* Pallas wetland forests at its SW distribution limit, *Plant Ecol.*, 2013; vol. 214, no. 2, pp. 317–27. doi.org/10.1007/s11258-013-0170-5.
- Santamour, F.S.Jr. Ware, G.H., Chromosome numbers of new *Ulmus* (elm) taxa introduced from China. *Rhodora*, 1997, vol. 99, pp. 148–51.
- Chromosome numbers of flowering plants. [Directory]. Leningrad: Science. Leningrad Sep., 1969. 927 p. (in Russ.).
- Hirsch, H., Brunet, J., Zalapa, J.E., and von Wehrden H., Intra- and interspecific hybridization in invasive Siberian elm. *Biol. Invasions*, 2017, vol. 19, no. 6, pp. 1889–904. doi: 10.1007/s10530-017-1404-6.
- Sambrook, J., David, W.R., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor, 2001, vol. 2.
- Zalapa, J.E., Brunet, J., and Guries, R.P., Patterns of hybridization and introgression between invasive *Ulmus pumila* (Ulmaceae) and native *U. rubra*. *Am. J. Bot.*, 2009, vol. 96, no. 6, pp. 1116–28. doi: 10.3732/ajb.0800334.
- Zalapa, J.E., Brunet, J., and Guries, R.P. Isolation and characterization of microsatellite markers for red elm (*Ulmus rubra* Muhl.) and cross-species amplification with Siberian elm (*Ulmus pumila* L.), *Mol. Ecol. Resour.*, 2008, no. 8, pp. 109–12. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01805.x.
- Lazar, I., GelAnalyzer.com [homepage on the Internet], 2010. Available from: <http://www.gelanalyzer.com/>.
- Kelly, D., Sork, V., Mast seeding in perennial plants: Why, how, where?, *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 2002, vol. 33, pp. 427–47. doi:10.1146/annurev.ecolsys.33.020602.095433.
- Oficerov, M.V., Igonina, E.V., Genetic consequences radiation exposure of the Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Genetics*, 2009, vol. 45, no. 2, pp. 209–14 (Russian).
- Bob, C.F., Redmond, B.L. and Karnosky, D.F., on the nature of intra-and interspecific incompatibility in *Ulmus*. *Am. J. Bot.*, 1986, vol. 73, no 4, pp. 465–74.
- Santamour, F.S., Jr. A natural hybrid between American and Siberian elms [*Ulmus americana*, *Ulmus pumila*]. *Forest Sci.*, 1970, 16: 149–53.
- Elowsky, C.G., I.E. Jordon-Thaden, and R.B. Kaul. A morphological analysis of a hybrid swarm of native

- Ulmus rubra* Muhl. and introduced *U. pumila* L. (Ulmaceae) in southeastern Nebraska. *Phytoneuron*, 2013, vol. 44, pp. 1–23.
23. Silvertown, J.W., The evolutionary ecology of mast seeding in trees. *Biol. J. Linn. Soc.*, 1980; vol. 14, pp. 235–50.
24. Bozhkov, P.V., Filonova, L.H., and Suarez, M.F., Programmed cell death in plant embryogenesis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2005, vol. 67, pp. 135–79.
25. Filonova, L.H., von Arnold, S., Daniel, G., and Bozhkov, P.V., Programmed cell death eliminates all but one embryo in a polyembryonic plant seed. *Cell Death Differ.*, 2002, vol. 9, no. 10, pp. 1057–62.
26. Zalapa, J.E., Brunet, J., and Guries, R.P., Guries Genetic diversity and relationships among Dutchelm disease tolerant *Ulmus pumila* L. accessions from China. *Genome*. 2008b, no. 51. pp. 492–500. doi: 10.1139/G08-034.
27. Zalapa J.E., Brunet J., Guries R.P., Isolation and characterization of microsatellite markers for red elm (*Ulmus rubra* Muhl.) and cross-species amplification with Siberian elm (*Ulmus pumila* L.). *Mol. Ecol.* 2008. no. 8. P. 109–112.13.
28. Pirko, Ya.V., Kalafat, L.O., Pirko, N.M., Rabokon, A.N., Privalikhin, S.N., Demkovych, A.Ye., Bilonozhko, Yu.O., Kravets, O.A., Alexeyeva, A.A., Khromykh, N.O., and Lykholat, Yu.V., Intron length polymorphism of β -tubulin genes in *Ulmus pumila* L. plants in the Steppe Prydniprov'ya, *Visnyk ukrayinskoho tovarystva henetykiv i selektsioneriv*, 2018, vol.16, no. 1, pp. 28–34 (in Ukrainian).
29. Nielsen, L.R., Kjær, E.D., Gene flow and mating patterns in individuals of Wych elm (*Ulmus glabra*) in forest and open land after the influence of Dutch elm disease. *Conserv. Genet.* 2010, no. 11. P. 257–68.

Надійшла в редакцію 06.05.19
Після доопрацювання 03.07.19
Прийнята до друку 18.01.20