



DOI 10.21178/2079-6080.2019.1.4
УДК 630.165+575.17

Микросателлитный анализ для оценки дифференциации популяций ели европейской на Северо-Западе России

© М.В. Гермак (Кузьмина), Г.В. Калько

Microsatellite analysis for the evaluation of differentiation between Norway spruce populations in the Northwest of Russia

M.V. Germak (Kuzmina), G.V. Kalko (Saint Petersburg Forestry Research Institute)

Differentiation of the Norway spruce populations is a very important task for conducting of efficient forestry exploitation. One of the approaches to distinguishing spruce populations is the analysis of genetic diversity in neutral codominant microsatellite loci. The article presents the results of using 9 previously selected stably amplifying polymorphic nuclear microsatellite loci of spruce to estimate the differentiation between 3 natural and 2 artificial (half sibs families) Norway spruce populations from geographically different areas in Northwest Russia. DNA extraction was performed using the CTAB method. The forward primers labeled with fluorescent dyes FAM, HEX and ROX and unmarked reverse primers were used in PCR. The detection of the results of amplification was performed using fragment analysis on genetic analyzer ABI PRISM 3500, Applied Biosystems. To determine the length of the fragments the size standard GeneScan™ 600 LIZ™ was used. Data analysis was performed with the GenAIEx 6.503, PopGene32, Micro-checker and FreeNA software. Four of the used loci (SpAGC2, SpAC1F7, UAPgAG150A and Pa_33) had the probability of null alleles in the studied populations above 5%. The marker system of five microsatellite loci without null alleles was proposed. The analysis of variance (AMOVA, GenAIEx 6.503) showed significant (5%) differentiation between 5 tested Norway spruce populations.

Cluster analysis (UPGMA) based on the values of Nei's genetic distance coefficients (D_N) found out a great closeness of natural populations. Both artificial populations differed from the natural ones and most strongly distinguished from each other ($D_N = 0,181$). Nevertheless, all the studied populations were grouped into one cluster.

Key words: Norway spruce, microsatellite analysis, differentiation of populations, AMOVA, fixation index FST, null alleles, allelic diversity

Микросателлитный анализ для оценки дифференциации популяций ели европейской на Северо-Западе России

М.В. Гермак (Кузьмина), Г.В. Калько

Дифференциация популяций ели европейской является весьма актуальной задачей для ведения эффективной лесохозяйственной деятельности. Одним из подходов для разграничения популяций ели служит анализ генетического разнообразия в нейтральных кодоминантных микросателлитных локусах. В статье изложены результаты использования отобранных ранее 9 стабильно амплифицирующихся полиморфных ядерных микросателлитных локусов ели для оценки дифференциации трех естественных и двух искусственных (семьи полусибсов) популяций ели европейской из географически различающихся мест произрастания на Северо-Западе России. Выделение ДНК проводили методом со СТАВ. В ПЦР использовали прямые праймеры, меченые флуоресцентными красителями FAM, HEX и ROX, и обратные немеченые праймеры. Детекцию результатов амплификации SSR-локусов проводили с использованием фрагментного анализа на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500, Applied Biosystems. Для определения длины фрагментов был использован внутренний размерный стандарт GeneScan™ 600 LIZ™. Анализ данных проводили с помощью программ GenAlEx 6.503, PopGene32, Micro-checker и FreeNA. Четыре из использованных локусов SpAGC2, SpAC1F7, UAPgAG150A и Pa_33 имели вероятность наличия нулевых аллелей в исследованных популяциях выше 5%. Предложена маркерная система из пяти микросателлитных локусов, которая не включает локусы с нулевыми аллелями и выявляет существенную по данным дисперсионного анализа межпопуляционную дифференциацию ели европейской. Доля межпопуляционной изменчивости (AMOVA, программа GenAlEx 6.503) в исследованных 3 естественных и 2 искусственных популяциях составляет 5%. Кластерный анализ (UPGMA) на основе значений коэффициентов генетических расстояний Неи (D_N) показывает большую близость естественных популяций. Обе искусственные популяции отличаются от естественных и в еще большей степени – друг от друга ($D_N = 0,181$). Тем не менее, все изученные популяции группируются в один кластер.

Ключевые слова: ель европейская, микросателлитный анализ, дифференциация популяций, AMOVA, индекс фиксации Fst, нулевые аллели, аллельное разнообразие

Гермак (Кузьмина), Марина Витальевна – лаборант-исследователь исследовательской лаборатории

Калько Галина Валентиновна – заведующий исследовательской лабораторией

E-mail: gkalko@spb-niilh.ru; kagava0720@gmail.com

ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Тел.: (812) 552–80–21, факс: (812) 552–80–42

Молекулярно-генетические методы в настоящее время находят широкое применение в исследованиях генетических ресурсов хозяйственно ценных объектов, в том числе и в лесном хозяйстве. Одним из самых мощных инструментов для выявления биологического разнообразия и дифференциации популяций является микросателлитный анализ благодаря кодоминантности (возможности различать гомозиготы и гетерозиготы), селективной нейтральности и высокой полиморфности микросателлитных локусов [13, 1]. Микросателлиты (SSR-локусы) – это простые повторы 1–6 нуклеотидов, которые могут находиться как в нетранскибируемой, так и транскрибируемой части генома.

Цель работы – отбор микросателлитных локусов ели, не содержащих нулевые аллели,

и оценка дифференциации трех естественных и двух искусственных популяций ели европейской, произрастающих на Северо-Западе России.

Материалы и методы

Объектом исследования являются образцы ДНК ели европейской, выделенные из хвои деревьев из трех географически различающихся природных насаждений Северо-Запада России (г. Порхов Псковской области, г. Тихвин и г. Гатчина Ленинградской области) и двух семей полусибсов (455 и 512) из испытательных культур в Гатчинском лесничестве (Орлинское участковое лесничество, квартал № 4). Географические координаты мест сбора образцов представлены в таблице 1.

Таблица 1

Географические координаты исследованных насаждений *Picea abies* и кратчайшие попарные расстояния между ними

Популяция	Широта (с. ш.)	Долгота (в. д.)	Расстояние, км	
			Тихвин	Гатчина
Тихвин	59,6318055	33,6273610	-	-
Гатчина	59,3017300	30,1482835	192	-
Порхов	57,7621121	29,3387416	311	204

Образцы хвои ели европейской, отобранные в 2015 и 2016 гг., были высушены в силикагеле и хранились в бумажных конвертах при комнатной температуре до экстракции ДНК. Выделение ДНК из хвои проводили методом со СТАВ с модификациями [5]. Качество образцов ДНК оценивали на спектрофотометрах NanoDrop2000, Thermo Fisher Scientific (США) и СРЕКТРОstar Nano, BMG Labtech GmbH (Германия) по соотношению поглощения при длинах волн 260 и 280 нм (A260/280). В работе использовали образцы ДНК высокого качества с A260/280 от 1,7 до 1,99. Концентрации образцов доводили до 50 нг/мкл разведением в 1х ТЕ-буфере.

На образцах ДНК из 5 популяций тестировали 9 отобранных ранее полиморфных ми-

кросателлитных локусов с мерой информационного полиморфизма PIC от 0,427 до 0,811 [3]. Характеристика использованных в работе микросателлитных локусов представлена в таблице 2.

ПЦР проводили в амплификаторах T100, C1000, CFX96, BIO-RAD, США и Veriti Thermal Cycler, Applied Biosystems, США. Реакционная смесь в объеме 20 мкл содержала 1х Taq Buffer или 1х Taq Turbo Buffer (Евроген), смесь четырех dNTP (0,1–0,2 мМ), прямой, меченый флуоресцентными красителями FAM, HEX или ROX, и обратный не модифицированный праймеры, по 0,5–1,0 мкМ каждого, 1–2 е.а. Таq ДНК-полимеразы, геномной ДНК – 50 ng или 1х готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS фирмы Евроген (Россия).

Таблица 2

Характеристика микросателлитных локусов,
отобранных для анализа генетических ресурсов ели европейской

Локус	Мотив	Размер фрагмента, п.о.	T_a , °C	Тип маркера	Количество аллелей	Автор
SpAGC2	(TA) ₁₁ (GA) ₂₀	126	57	GL	11	[11]
SpAC1F7	(AC) ₁₂	109	57	GL	6	[11]
Pa_28	(TCG) _n	148–162	62	EST	8	[8]
Pa_33	(CGG) _n	91–104	62	EST	9	[8]
Pa_36	(CGG) _n	178–200	62	EST	5	[8]
Pa_41	(CTG) _n	176–183	62	EST	5	[8]
Pa_59	(CTCTG) _n	90–112	62	EST	3	[8]
UAPgAG150A	(AG) ₁₉	142–174	54	GL	15	[9]
UAPgAG105	(AG) ₁₁	161–171	56	GL	5	[9]

ПЦР с использованием праймеров, перечисленных в таблице 2, проводили по опубликованным авторами праймеров программам амплификации [11, 8, 9].

На стадии апробации маркеров и оптимизации ПЦР результаты амплификации с использованием немеченых праймеров визуализировали с помощью вертикального электрофореза в 6% полиакриламидном геле. Для проведения электрофореза использовали камеры вертикального электрофореза VE-20 (Хеликон, Россия) и Protean II xi Cell 20 (BIO-RAD, США) и источники питания PowerPack HV, PowerPack Universal (BIO-RAD, США) и Эльф-8 (Хеликон, Россия). Приготовление трис-боратного буфера (ТВЕ) для электрофореза и процесс электрофореза проводили в соответствии с общепринятыми методиками [4, 2]. Для оценки длины амплификатов в гель вносили размерный маркер (ДНК плазмиды pBR322, обработанной рестриктазой HpaII). Также использовали отрицательный контроль (амплификат ПЦР без матричной ДНК).

Микросателлитный анализ заключался в оценке аллельного разнообразия в изучаемых локусах. Результаты ПЦР с мечеными праймерами визуализировали с помощью фраг-

ментного анализа на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500, Applied Biosystems, с использованием программы GeneMapper. Для определения размера фрагментов применяли внутренний размерный стандарт GeneScan™ 600 LIZ™.

Последующий анализ популяционных характеристик (N_a – число аллелей на локус; N_e – число эффективных аллелей на локус; частота аллелей, индексы фиксации F_{st}) проводили с помощью надстройки для MS Excel GenAlEx 6.503 [10]. Анализ наличия нулевых аллелей осуществляли с использованием программы Micro-Checker [14]. Для популяций с высокой, более 5%, вероятностью наличия нулевых аллелей величины индекса фиксации F_{st} (по B.S. Weir, 1996 [15]) были пересчитаны с использованием алгоритма коррекции данных EM (Expectation Maximization) в программе FreeNA (Chapius, Estoup, 2007) [6].

С помощью программы PopGene32 был проведен невзвешенный парно-групповой кластерный анализ (UPGMA) на основе значений коэффициентов генетических расстояний D_N и построены дендрограммы генетического сходства изученных популяций [16].

Результаты

Данные по аллельному разнообразию в изучаемых локусах у 145 особей ели европейской из 5 популяций приведены в таблице 3. Как видим, всего при анализе в 9 локусах было выявлено

72 аллеля. Все изученные локусы полиморфны и имеют от 4 до 18 аллелей. Исключение составляет только локус Pa_33, который в одной из пяти популяций (искусственная популяция полусибсов 455) оказался мономорфным.

Таблица 3

Число аллелей (Na) и число эффективных аллелей (Ne) в девяти локусах в изучаемых популяциях ели европейской (GenAlEx 6.503)

Локус	Число аллелей в популяции						Na/локус среднее	Ne/локус среднее
	Тихвин	Порхов	Гатчина	Гатчина, семья 455	Гатчина, семья 512	Всего		
SpAGC2	12	10	11	9	9	18	10,2	5,4
SpAC1F7	8	6	9	6	2	11	6,2	2,4
Pa28	6	5	5	5	5	6	5,2	2,5
Pa33	2	3	5	1	2	5	2,6	1,2
Pa36	4	4	4	4	3	5	3,8	1,6
Pa41	4	3	4	2	4	4	3,4	1,6
Pa59	4	5	4	4	4	5	4,2	2,4
UAPgAG150A	11	7	8	6	7	14	7,8	3,3
UAPgAG105	4	3	3	3	3	4	3,2	1,6
Среднее число аллелей на локус в популяции	6,1	5,1	5,9	4,4	4,3	8,0	5,2	2,4

Во всех исследованных локусах число аллелей на локус в искусственных популяциях меньше или равно числу аллелей в естественных популяциях. Это более наглядно видно по усредненным данным: среднее число аллелей на локус в популяциях полусибсов близко по значениям и составляет 4,3–4,4, в естественных популяциях оно варьирует от 5,1 до 6,1.

В результате анализа распределения отдельно взятых аллелей по популяциям стоит отметить локус SpAGC2, в котором аллель 87 встречается чаще в искусственных (41 и 45%), чем в естественных популяциях (от 0 до 22%). Распределение этого аллеля в изучаемых популяциях представлено на рисунке 1. Этот локус может быть кандидатом для проверки его сцепления с количественными признаками, отбираемыми у плюсовых деревьев.

На основе данных аллельного разнообразия высчитывают популяционные характеристики, в том числе оценивают дифференциацию популяций. Для точности рассчитываемых индексов была оценена вероятность наличия нулевых аллелей. Их присутствие обозначает, что в некоторых сайтах связывания праймеров произошли мутации, из-за чего праймер не свяжется с ДНК и амплификация не пройдет. В результате могут возникнуть ошибки в интерпретации данных: то есть мы, видя у образца локус с одним аллелем и признавая его гомозиготным, можем оказаться не правы, если второй аллель отличался от первого и имел мутацию, то есть исследуемая особь на самом деле гетерозиготна по исследуемому локусу. Поэтому маркеры SpAGC2, SpAC1F7, Pa_33 и UAPgAG150A, в которых была высокая вероятность наличия нулевых аллелей, не использовались в дальнейшем анализе.

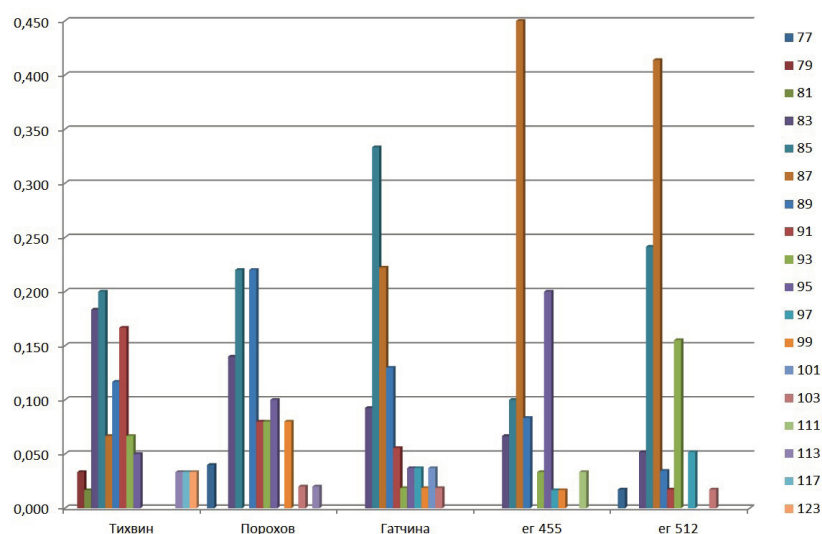


Рис. 1. Доля 87 аллеля в локусе SpAGC2 в разных популяциях ели европейской

Таким образом, на данном этапе исследования была отобрана маркерная система из 5 локусов: Pa_28, Pa_36, Pa_41, Pa_59 (EST-маркеры, из транскрибируемых частей генома) и UAPgAG105 (из геномной библиотеки).

При использовании маркерной системы из 5 локусов, для которых вероятность нулевых аллелей менее 5% выявлено 32 аллеля.

Был проведен дисперсионный анализ (AMOVA) индексов фиксации F_{st} . Показано, что доля межпопуляционного разнообразия составила 5% (рис. 2). Низкое значение F_{st} свидетельствует о слабой дифференциации популяций, что характерно для хвойных и ели европейской в частности [7].

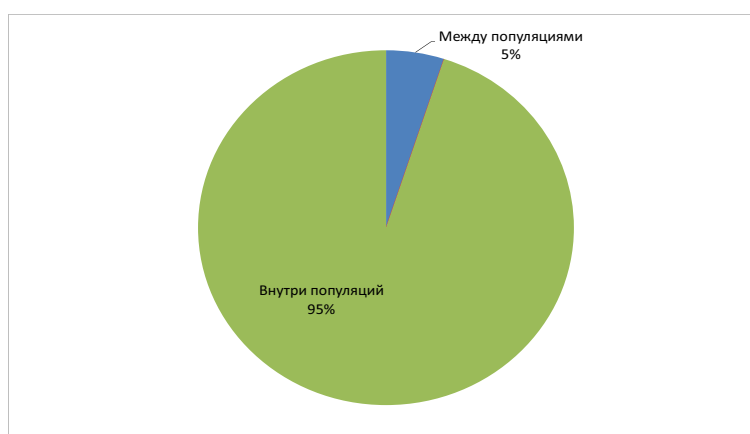


Рис. 2. Результаты статистической обработки индексов фиксации F_{st} методом AMOVA (Analysis of Molecular Variance, 999 пермутаций, программа GenAlex 6.503) с использованием пяти микросателлитных локусов ели европейской

В таблице 4 представлена попарная матрица индексов фиксации F_{st} . Этот показатель характеризует генетическую дифференциацию популяций. Из полученных данных видно, что наименьшая дифференциация наблюдается между естественными популяциями. Это можно объяснить небольшими для ветроопыляемых растений расстояниями между популяциями (200–300 км) и сходными условиями местообитания. Значительно большая дифференциация существует между естественными и искусственными популяциями, и наибольшее значение дифференциации – между искусственными популяциями.

Таблица 4

Индексы фиксации F_{st} между популяциями ели европейской при анализе в пяти микросателлитных локусах (GenAIEх 6.503)

Популяция	Тихвин	Порхов	Гатчина	Гатчина, семья 455	Гатчина, семья 512
Тихвин	0,000	-	-	-	-
Порхов	0,005	0,000	-	-	-
Гатчина	0,003	0,010	0,000	-	-
Гатчина, семья 455	0,045	0,046	0,041	0,000	-
Гатчина, семья 512	0,030	0,023	0,035	0,085	0,000

Еще один показатель генетической дифференциации популяций – генетические расстояния N_{ey} . В таблице 5 представлены попарные генетические расстояния N_{ey} между популяциями. Данные этого вида анализа полностью подтверждают тенденцию распределения индексов фиксации F_{st} в изучаемых популяциях (табл. 4). Корреляция между данными таблиц 4 и 5 составляет 0,99.

Таблица 5

Генетические дистанции N_{ey} между популяциями ели европейской при анализе в пяти микросателлитных локусах (GenAIEх 6.503)

Популяция	Тихвин	Порхов	Гатчина	Гатчина, семья 455	Гатчина, семья 512
Тихвин	0,000	-	-	-	-
Порхов	0,008	0,000	-	-	-
Гатчина	0,004	0,014	0,000	-	-
Гатчина, семья 455	0,078	0,086	0,066	0,000	-
Гатчина, семья 512	0,051	0,042	0,058	0,181	0,000

Для визуализации полученных данных в программе PopGene32 был проведен кластерный анализ и построены дендрограммы на основе данных по генетическим расстояниям N_{ey} (табл. 5, рис. 3).

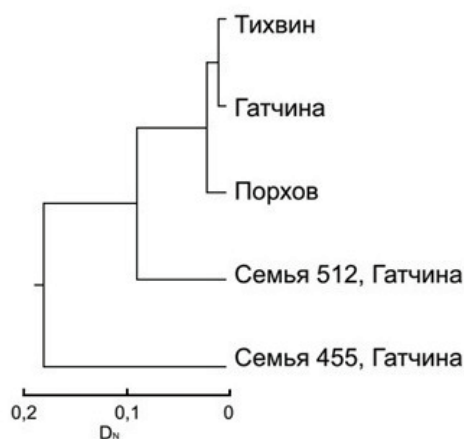


Рис. 3. Дендрограмма, построенная на основе генетических расстояний Нея с использованием метода попарной невзвешенной кластеризации (UPGMA, PopGene32)

Изученные популяции не разделились на отдельные кластеры, а распределились в одном большом, что свидетельствует о значительном генетическом сходстве популяций. Видно, что естественные популяции теснее связаны между собой, полусибсы отличаются от всех естественных популяций.

Интересно, что при анализе данных при использовании маркерной системы из 9 локусов в программе GenAlEx Fst также был равен

5%. Эти данные подтверждаются и при использовании программного обеспечения FreeNA [15]. При этом величины Fst (по Weir, 1996), вычисленные с применением алгоритма коррекции ENA (Expectation Maximization Algorithm) и без его использования для всей маркерной системы из 9 SSR-локусов близки. Величины Fst, вычисленные по методу Weir (1996) [15] и статистически обработанные в программе FreeNA, представлены в таблице 6.

Таблица 6

Fst, вычисленные для девяти SSR-локусов с использованием и без использования коррекции данных ENA (Expectation Maximization Algorithm)

Лocus	Fst без коррекции ENA	Fst с коррекцией ENA
SpAGC2	0,054151	0,041212
SpAC1F7	0,080830	0,081470
Pa_28	0,029694	0,030014
Pa_33	0,016267	0,062412
Pa_36	0,035383	0,035381
Pa_41	0,044097	0,038824
Pa_59	0,087596	0,088710
UAPgAG150A	-0,004028	-0,000575
UAPgAG105	0,050623	0,050997
Для 9 локусов	0.046161	0.046178

Как видим, наибольшая разница между F_{st} , вычисленными с ENA коррекцией и без, наблюдается в локусах с большой вероятностью нулевых аллелей Pa_33, UAPgAG150A и SpAGC2.

Выводы

Результатом проведенных исследований стала маркерная система из 5 локусов (Pa_28, Pa_36, Pa_41, Pa_59 и UAPgAG105), пригодная для дифференциации популяций ели европейской.

Отобранные локусы могут быть использованы не только для дифференциации популяций, но и для изучения генетического разнообразия, а при увеличении числа полиморфных локусов и для идентификации генотипов плюсовых деревьев и клонов. В дальнейших работах планируется дополнение маркерной систе-

мы другими высокополиморфными нейтральными локусами. Апробированные локусы SpAGC2, SpAC1F7, Pa_33 и UAPgAG150A также могут быть использованы с применением алгоритмов по коррекции данных с нулевыми аллелями [6, 12]. Информативность проведения исследований зависит от свойств и количества применяемых маркеров.

Научная новизна работы заключается в разработке и использовании для анализа дифференциации ели европейской на Северо-Западе России оригинального набора микросателлитных маркеров, большей частью из кодирующих регионов ДНК ели [8]. Данные по дифференциации популяций в сочетании с данными по генетическому разнообразию могут быть основанием для выделения резерватов и определения мест сбора семян в конкретных лесосеменных районах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Банникова, А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих / А.А. Банникова // Журнал общей биологии. – 2004. – Т. 65, № 4. – С. 278–306. – ISSN 0044–4596.
2. Белоконь, М.М. Молекулярно-генетические методы в зоологической практике на Звенигородской биостанции МГУ: Методическое пособие к летней учебной практике студентов-биологов на Звенигородской биостанции им. С.Н. Скадовского / М.М. Белоконь [и др.]. – Москва: ФГБУН Ин-т общ. генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 2014. – 68 с. – ISBN 978–5–91587–095–5.
3. Калько, Г.В. Апробация ядерных микросателлитных маркеров ели европейской / Г.В. Калько, Ю.С. Зотова // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2016. – № 4. – С. 4–15.
4. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; под ред. акад. А.А. Баева и д-ра биол. наук К.Г. Скрябина. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
5. Разработка методики мониторинга состояния генетических ресурсов хозяйственно-ценных древесных пород с применением методов анализа ДНК на Северо-Западе России: Анализ отечественного и зарубежного опыта мониторинга генетических ресурсов древесных пород и других хозяйственно-ценных объектов: отчет о НИР (промежуточ.) / ФБУ «СПбНИИЛХ»; рук. Калько Г.В.; исполн.: Зотова Ю.С. – СПб., 2016. – 106 с. – Библиогр.: с. 90–98. – № ГР 115032520030.
6. Chapuis, Marie-Pierre. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation / M.-P. Chapuis, A. Estoup // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – Vol. 24. (3). – P. 621–631. – DOI: 10.1093/molbev/msl191.
7. Cvjetković, B. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina / B. Cvjetković, M. Konnerth, B. Fussi, M. Mataruga, M. Šijačić-Nikolić, V. Daničić, A. Lučić // Genetika. – 2017. – Vol. 49 (1). – P. 259–272.

8. Fluch, S. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.) / S. Fluch [et al.] // BMC Research Notes. – 2011. – 12 October. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/401>. – Загл. с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения: 28.04.2015.
9. Hodgetts, R.B. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species / R.B. Hodgetts, M.A. Aleksasuk, A. Brown, C. Clarke, E. Macdonald, S. Nadeem, D. Khasa // Theor. Appl. Genet. – 2001. – Vol. 102. – P. 1252–1258. – ISSN 0040-5752.
10. Peakall, R. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, and P.E. Smouse // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Vol. 6. – P. 288–295. – Online ISSN: 1471-8286.
11. Pfeiffer, A. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.) / A. Pfeiffer, A.M. Olivieri, M. Morgante // Genome. – 1997. – Vol. 40. – P. 411–419.
12. Raymon, M. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism / M. Raymon, F. Rousset // J. Hered. – 1995. – Vol. 86. – P. 248–249.
13. The state of the world's forest genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2014. – 304 p. – ISBN 978-92-5-108402-1.
14. Van Oosterhout, C. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data / C. Van Oosterhout, W.F. Hutchison, D.P.M. Wills, P. Shipley // Molecular Ecology Notes. – 2004. – Vol. 4. – P. 535–538. – Online ISSN: 1471-8286.
15. Weir, B.S. Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data / Bruce S. Weir, Sunderland Mass.: Sinauer Associates. – 1996. – 445 p. – ISBN: 0878939024.
16. Yeh, F.C. PopGene32, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32. 2000 / F.C. Yeh, R. Yang, T.J. Boyle, Z. Ye, J.M. Xiyuan // Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada. – 2000.

REFERENCES

1. Bannikova A.A. Molekulyarnye markery i sovremennaya filogenetika mlekopitayushchikh. Zhurnal obshchey biologii, 2004, vol. 65, no. 4, pp. 278–306, ISSN 0044-4596. (In Russian)
2. Belokon' M.M., Belokon' U.S., Bannikova A.A., Politov D.V. Molekulyarno-geneticheskiye metody v zoologicheskoy praktike na Zvenigorodskoy biostantsii MGU: Metodicheskoye posobiye k letney uchebnoy praktike studentov-biologov na Zvenigorodskoy biostantsii im. S.N. Skadovskogo. Moskow, FGBUN In-t obshch. genetiki im. N.I. Vavilova RAN, 2014, 68 p., ISBN 978-5-91587-095-5. (In Russian)
3. Kal'ko G.V., Zotova YU.S. Aprobatsiya yadernykh mikrosatellitnykh markerov eli evropejskoj. Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyajstva, 2016, no. 4, pp. 4–15. (In Russian)
4. Maniatis T., Frich E., Sembruk Dzh. Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoye klonirovaniye, Moskow, 1984, 480 p. (In Russian)
5. Razrabotka metodiki monitoringa sostoyaniya geneticheskikh resursov khozyaystvenno-tsennykh drevesnykh porod s primeneniyyem metodov analiza DNK na Severo-Zapade Rossii: Analiz otechestvennogo i zarubezhnogo opyta monitoringa geneticheskikh resursov drevesnykh porod i drugikh khozyaystvenno-tsennykh obyektov: otchet o NIR (promezhutoch.), FBU «SPbNIILKh», ruk. Kalko G.V., ispoln. Zotova Yu.S., Saint Petersburg, 2016, 106 p. – Bibliogr., pp. 90–98, № GR 115032520030 (In Russian)
6. Chapuis M.-P., Estoup A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, vol. 24 (3), pp. 621–631, DOI: 10.1093/molbev/msl191.

7. Cvjetković B., Konnerth M., Fussi B., Mataruga M., Šijačić-Nikolić M., Daničić V., Lučić A. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina. *Genetika*, 2017, vol. 49 (1), pp. 259–272.
8. Fluch S., Burg A., Kopecky D., Homolka A., Spiess N., Vendramin G.G. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.). *BMC Research Notes*, 2011, 12 October, <http://www.biomed-central.com/1756-0500/4/401>.
9. Hodgetts R.B., Aleksasuk M.A., Brown A., Clarke C., Macdonald E., Nadeem S., Khasa D. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, vol. 102, pp. 1252–1258, ISSN 0040–5752.
10. Peakall R., Smouse P.E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 2006, vol. 6, pp. 288–295, ISSN: 1471–8286.
11. Pfeiffer A., Olivieri A.M., Morgante M. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 1997, vol. 40, pp. 411–419.
12. Raymon M., Rousset F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 1995, vol. 86, pp. 248–249.
13. The state of the world's forest genetic resources. FAO, Rome: FAO, 2014, 304 p. ISBN 978–92–5-108402–1.
14. Van Oosterhout C., Hutchison W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 2004, vol. 4, pp. 535–538, ISSN: 1471–8286.
15. Weir Bruce S., Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, 1996, 445 p., ISBN: 0878939024.
16. Yeh F.C., Yang R., Boyle T.J., Ye Z., Xiyan J.M. PopGene32, Microsoft Windows-based Freeware for Population Genetic Analysis, Version 1.32. 2000. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada, 2000.

Статья поступила в редакцию 26.12.2018