



DOI 10.21178/2079-6080.2020.1.16
УДК 630.165+575.17

Использование кривых плавления ампликонов при оценке пригодности nSSR-локусов ели европейской для мультиплексирования

© Г.В. Калько, Р.Р. Мусина

Using of amplicon melting curves to assess the suitability of Norway spruce nSSR loci for multiplexing

G.V. Kalko, R.R. Musina (Saint Petersburg Forestry Research Institute)

Microsatellite, or SSR markers (Simple Sequence Repeats) are one of the most powerful tools for assessing genetic variation. They are widely used to study the genetic diversity and population genetic structure of coniferous species. The most promising is the multiplexing of SSR loci. It allows to automate microsatellite analysis, significantly increase the accuracy of studies and reduce their cost. At the moment, there are no universally accepted multiplexes of Norway spruce nuclear microsatellites and their creation is very important. The aim of the study is the selection from number of published nSSR the loci suitable for multiplexing and compilation from them the original multiplexes convenient for analyzing the genetic diversity and identification of valuable genotypes of *Picea abies* (L.) Karst. For the screening the loci with specific amplification in a wide range of annealing temperature, Real-Time PCR in a temperature gradient with the analysis of melting curves of amplicons for each locus separately was used. Initially, multiplexes were created using the Multiplex Manager 1.0 program. After their modification, 7 multiplex panels were proposed (3 of two, and 1 of three, and 3 of four loci). Multiplexes were tested on 30 trees, originating from four geographically different populations of the southern taiga region of the European part of the Russian Federation. Multiplex PCR was performed with direct primers labeled FAM, HEX, ROX fluorescent dyes and reverse unlabeled primers. PCR results were detected using the Applied Biosystems 3500 genetic analyzer. To determine the length of DNA fragments, the GeneScan 600 LIZ v2.0 size standard was used.

Key words: microsatellites, multiplex, Norway spruce, genetic diversity, real-time PCR, melting curves

Использование кривых плавления ампликонов при оценке пригодности nSSR-локусов ели европейской для мультиплексирования

Г.В. Калько, Р.Р. Мусина

Для изучения генетического разнообразия и популяционно-генетической структуры видов хвойных растений широко применяются микросателлитные, или SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats), которые являются одними из самых мощных инструментов оценки генетической изменчивости. Наиболее перспективным считают мультиплексирование SSR-локусов, которое позволяет автоматизировать микросателлитный анализ, существенно повысить точность исследований и сократить их стоимость. В настоящее время не существует общепринятых мультиплексов ядерных микросателлитов ели европейской и их создание весьма актуально. Целью исследования является отбор удобных для мультиплексирования опубликованных nSSR-локусов и составление из них оригинальных мультиплексов, пригодных для анализа генетического разнообразия *Picea abies* (L.) Karst. и идентификации ценных генотипов. Для отбора локусов со специфичной амплификацией в широком интервале температур отжига использовали ПЦР в реальном времени в градиенте температур с анализом кривых плавления амплификатов для каждого локуса по отдельности. Первоначально мультиплексы составляли с помощью программы Multiplex Manager 1.0. После их модификации было предложено 7 мультиплексов (три мультиплекса состояли из 4 локусов, один – из 3, остальные из 2 локусов). Мультиплексные панели были тестированы на 30 деревьях из четырех географически различающихся популяций южно-таёжного региона европейской части Российской Федерации. Мультиплексные ПЦР проводили с прямыми мечеными флуоресцентными красками FAM, HEX, ROX и обратными немечеными праймерами. Детекцию мультиплексных ПЦР выполняли с помощью генетического анализатора Applied Biosystems 3500. Для определения длин фрагментов ДНК использовали размерный стандарт GeneScan 600 LIZ v2.0.

Ключевые слова: микросателлиты, мультиплексы, ель европейская, генетическое разнообразие, ПЦР в реальном времени, кривые плавления

Калько Галина Валентиновна – заведующий исследовательской лабораторией

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

Мусина Рузанна Ринатовна – лаборант-исследователь исследовательской лаборатории

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

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Телефон: (812) 552-80-21, факс: (812) 552-80-42

Введение

Изучение генетического варьирования и внутривидовой дифференциации популяций лесообразующих видов хвойных, в том числе представителей рода *Picea*, является одной из важнейших задач популяционной генетики. В связи с изменением климата, участвовавшими пожарами, повреждениями вредными организмами и болезнями, увеличением антропогенного давления на природные растительные сообщества и экосистемы возникла угроза сокращения их биологического разнообразия. Владение информацией об уровне генетической изменчивости хвойных и о генетической структуре популяций важно для оценки потенциала видов и разработки комплекса мероприятий, направленных на сохранение генетического разнообразия в процессе их использования [1, 2, 8, 10].

В последние годы значительно увеличилось число генетических исследований хвойных растений с использованием ДНК-маркеров. По литературным данным, для изучения генетического разнообразия и популяционно-генетической структуры хвойных все более широко применяются молекулярные, в частности микросателлитные, или SSR-маркеры (Simple Sequence Repeats) [11, 12, 17, 29].

Микросателлиты распространены по всему эукариотическому геному в виде коротких, tandemно расположенных мотивов из 1–6 пар нуклеотидов. В геномах хвойных такие маркеры многочисленны и привлекательны тем, что имеют кодоминантный характер наследования, отличаются высокой вариабельностью и возможностью автоматизации их анализа и являются ценным и сравнительно дешевым инструментом для генетического анализа на популяционном и индивидуальном уровнях. Микросателлиты имеют относительно малые размеры и, следовательно, могут легко амплифицироваться при использовании ПЦР с ДНК, экстрагируемой из различных тканей [17, 19, 24, 27, 28, 29]. Несмотря на разработку других перспективных ДНК-маркеров, в настоящее время nSSR-локусы относят к самым

мощным инструментам по выявлению биологического разнообразия [14, 29].

Микросателлитные фрагменты выявляют методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), обеспечивающим многократное увеличение числа копий (амплификацию) данного фрагмента ДНК. Амплификация достигается в ходе циклического (30–40 циклов) комплементарного достраивания ДНК-матрицы с помощью термостабильной Taq-полимеразы. Циклическость обеспечивается программируемыми термостатами (амплификаторами) с автоматической сменой температур режимов плавления ДНК и ее репликации. Синтез данного фрагмента ДНК инициируется ДНК-затравками в виде пары праймеров – синтетических олигонуклеотидов, комплементарных нуклеотидным последовательностям на границах исследуемого фрагмента [9, 13].

С целью экономии времени и реагентов разрабатывается и применяется мультиплексный ПЦР-анализ, когда в одну пробирку с ДНК-матрицей добавляют целый набор праймеров для одновременной амплификации нескольких интересующих фрагментов [4, 5, 17]. Ряд авторов составляли из ранее опубликованных микросателлитных локусов и тестировали несколько наборов мультиплексов микросателлитов для исследования генетической изменчивости ели европейской [7, 15, 16, 17, 20]. После апробации предлагаемых мультиплексов на массовом популяционном материале исследователи отказывались от части локусов или целых мультиплексов из-за нестабильной амплификации, наличия однонуклеотидных повторов, нулевых аллелей или малой информативности [7, 15, 16]. Необходимо отметить, что в настоящее время не существует общепринятых мультиплексов ядерных микросателлитов ели европейской и создание таких мультиплексных панелей до сих пор является актуальным.

Цель наших исследований заключалась в создании надежных, хорошо работающих оригинальных мультиплексов из ранее опубликованных локусов. В работе также была проведена проверка возможности использо-

вания кривых плавления ампликонов в режиме реального времени для отбора локусов, удобных для мультиплексирования и оптимизации условий мультиплексной ПЦР.

Материалы и методы

Использовались образцы хвои ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.), которые

были любезно предоставлены сотрудниками разных подразделений ФБУ «Рослесозащита». Образцы хвои были собраны в Вологодской (Тотемское лесничество), Костромской (Макарьевское лесничество), Новгородской (Хвойнинское лесничество) и Нижегородской (Шахунское лесничество) областях (табл. 1).

Таблица 1

Происхождение образцов хвои ели европейской, использованных в работе

Регион (область)	Лесничество / лесхоз, уч. лесничество, населенный пункт	Координаты		Название выборки (год сбора образцов)	Кол-во образцов, шт.
		°с. ш.	°в. д.		
Новгородская	Хвойнинское, Песькое	58,94	34,38	Песь (2016)	7
Вологодская	Тотемское, Тотемское	59,95	42,78	Тотемская (2013)	8
Нижегородская	Шахунское, Полетаевское	57,51	46,70	Шахунская (2013)	8
Костромская	Макарьевское, Нейское	58,01	43,43	Макарьевская (2016)	7

Перед измельчением хвои в гомогенизаторе Precellys 24 (Bertin Technologies, Франция) дополнительно было проведено обезживание хвоинок в лиофильной сушке Free zone Plus 2,5L Cascade Freeze Dryer (Labconco, США). Выделение ДНК из хвои проводилось сразу после гомогенизации по стандартному протоколу для растительных тканей с применением цетилтриметиламмонийбромидом (метод СТАВ) [11, 26].

Чистоту выделенной ДНК и ее концентрацию определяли спектрофотометрически на приборе SPECTROstar Nano (BMG Labtech GmbH, Германия). В работу были взяты образцы ДНК с соотношением поглощения при длинах волн 260 и 280 нм (A260/280) от 1,7 до 1,9.

В исследовании использовали nSSR-локусы ели европейской, охарактеризованные в таблице 2.

ПЦР в реальном времени проводили в объеме 15 мкл в термоциклерах CFX96, (BioRad, США). Реакционная смесь содержала готовую смесь для ПЦР qPCRmix-HS фирмы

Евроген (Россия), 0,1–0,3 мкМоль прямого и обратного праймеров, 100 ng BSA, 15 ng геномной ДНК. В качестве интеркалирующего флуоресцентного красителя использовали водный раствор EvaGreen, Biotium в рекомендованных производителем концентрациях. До необходимого объема смесь доводили деионизированной водой.

ПЦР-реакция проводилась по следующей программе: 5 мин при 95 °С, затем 40 циклов (45 с при 95 °С, 45 с при T_a °С, 45 с при 72 °С) и заключительная элонгация 10 мин при 72 °С, кривая плавления от 65 °С до 95 °С с шагом 0,5 °С по 5 с. Графический анализ данных выполнен с помощью программы BioRad CFX Manager 3.1 (США). В каждом эксперименте ставили контроль без матричной ДНК. Для выявления оптимальных температур отжига использовали программу с градиентом температур от 53 °С до 63 °С.

Для составления мультиплексных панелей использовали программу Multiplex Manager 1.0, доступную на сайте www.multiplexmanager.com [21].

Таблица 2

Характеристика nSSR-локусов ели европейской, отобранных для мультиплексирования

№ п/п	Локус	Мотив	Размер (п. н.)	T _a (°C)	Число аллелей N _a	Литературный источник
1	SpAGC1	(TC)5TT(TC)10	103	57	8	[24]
2	SpAGG3	(GA)24	136	57	17	[24]
3	SpAGD1	(AG)25	124–204	57	22	[24]
4	SpAC1H8	(GT)27	135	60	18	[24]
5	Pa_36	(CGG)n	178–200	62	5	[19]
6	Pa_47	(CAG)n	106–118	62	4	[19]
7	Pa_44	(GGA)n	274–293	62	7	[19]
8	Pa_41	(CTG)n	176–183	62	5	[19]
9	Pa_28	(TCG)n	148–162	62	8	[19]
10	WS0023.B03	(AT)10	170–216* (214–216)	62	14	[27]
11	WS0016.O09	(AT)9	396–424* (416–418)	53	11	[27]
12	WS0092.A19	(AC)9	213–221* (232–244)	53	4	[27]
13	WS0073.H08	(AT)14	202–236* (228–230)	53	12	[27]
14	WS0092.M15	(TCC)6	204–216 (217–229)	53	1	[27]
15	PAAC19	(CT)23CAA (TG)12	141–207	53	5	[28]
16	PAAC23	(GT)14	266–314	58	3	[28]
17	UAPgAC/AT6	(AC)10/(AT)7	114–128*	60	7	[17]
18	UAPgGT8	(CA)20	204–230*	58	23	[17]
19	UAPgAG105	(TG)16	167–175*	56	12	[17]
20	UAPgCT144	(AG)11	134–180*	58	17	[17]
21	UAPsTG25	(AC)23	94–100*	62	9	[17]
22	PGL15	(CT)4N16(CT)11	176–248*	60↓54	15	[25]

Примечание. * – Размеры аллелей для вида *Picea glauca*.

Тестировали мультиплексы с помощью проведения классической мультиплексной ПЦР. Состав ПЦР-смесей: 1× готовая смесь для ПЦР qPCRmix-HS фирмы Евроген (Россия), 0,1–0,3 мкМоль прямых, меченых флуоресцентной краской FAM, HEX или ROX и 0,1–0,3 мкМоль обратных немеченых праймеров, 100 ng BSA, 15 ng геномной ДНК. Объем реакции доводили до 15 мкл.

Программа амплификации мультиплексных ПЦР: 5 мин при 95 °C, затем 40 циклов (45 с при 95 °C, 45 с при T_a °C, 45 с при 72 °C) и заключительная элонгация 10 мин при 72 °C.

Графический анализ кривых плавления продуктов амплификации выполнен в программе Bio-Rad CFX Manager 3.1 (США).

Результаты мультиплексных ПЦР детектировали с использованием фрагментного

анализа методом капиллярного гель-электрофореза на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (Thermo Fisher Scientific, США). Для определения длин фрагментов использовали размерный стандарт LIZ600 (Thermo Fisher Scientific, США).

Результаты исследований

Локусы, взятые в работу, происходили из геномных библиотек [17, 24] и из транскрибируемых областей ДНК (EST) [19, 27, 28].

Для отбора локусов удобных для мультиплексирования был уточнен диапазон температур отжига, в котором проходит специфичная ПЦР для каждой пары праймеров с помощью ПЦР в реальном времени в градиенте температур от 53 °С до 63 °С.

ПЦР в реальном времени обычно включает в себя анализ кривой плавления после проведения ПЦР для подтверждения амплификации единственного продукта или для детекции возможного присутствия праймер-димеров или других продуктов амплификации [3, 13, 18].

Кроме оценки диапазона температур, при которых идет амплификация, в этих же экспериментах были получены данные о специфичности продуктов реакций при разных температурах отжига. По форме пиков плавления,

то есть обработанным данным кривых плавления ($d(RFU)/dT$, где RFU – relative fluorescence units – относительные единицы флуоресценции (ОЕФ)), можно сделать предварительный вывод об оптимизации амплификации. Если пик один, острый – ПЦР специфичная, так как продукт ПЦР плавится в узком интервале температур.

Анализ кривых плавления в настоящее время широко используется для различных прикладных целей: выявления SNP (Single nucleotide polymorphism – однонуклеотидных полиморфизмов) [6, 18], идентификации видов организмов, изучения профилей метилирования ДНК, а также для подтверждения специфичности реакций амплификации [30]. Кривая плавления получается путем наблюдения изменений в интенсивности флуоресценции продуктов ПЦР (ампликонов) при ступенчатом изменении температуры [3, 4, 5].

При сравнении пиков плавления ампликонов в этих экспериментах было выявлено, что специфичность амплификации в большинстве локусов стабильна в широких диапазонах температур (табл. 3). Такие локусы, как, например SpAGC1, SpAGD1, SpAGG3, SpAC1H8, Pa_36, Pa_47, Pa_44, Pa_41, Pa_28, удобны для составления мультиплексов (табл. 3).

Таблица 3

Температуры отжига отобранных праймеров, при которых проходит специфичная амплификация

№ п/п	Локус	Размер, п. н.	T _a , °С	Число аллелей (N _a)
1	SpAGC1	103	54,0–63,0	8
2	SpAGG3	136	54,0–63,0	17
3	SpAGD1 ¹	124–204	57,0–59,0	22
4	SpAC1H8	135	54,0–61,0	18
5	Pa_36	178–200	54,0–62,0	5
6	Pa_47	106–118	53,0–63,0	4
7	Pa_44	274–293	54,0–62,0	7
8	Pa_41	176–183	57,0–63,0	5
9	Pa_28	148–162	59,0–63,0	8
10	WS0023.B03 ³	170–216 (214–216)	59,5–61,3	14

№ п/п	Локус	Размер, п. н.	T _a , °C	Число аллелей (N _a)
11	WS0016.O09 ³	396–424 (416–418)	53,0–63,0	11
12	WS0092.A19	213–221 (232–244)	59,4–62,5	4
13	WS0073.H08 ³	202–236 (228–230)	53,0–63,0	12
14	WS0092.M15	204–216 (217–229)	53,0–63,0	1
15	PAAC19	141–207	57,0–59,5 ¹	5
16	PAAC23	266–314	53,0–63,0	3
17	UAPgAC/AT6 ^{1,2}	114–128	59,4–62,5	7
18	UAPgGT8 ¹	204–230	55,0–61,0	23
19	UAPgAG105 ²	167–175	53,0–63,0	12
20	UAPgCT144 ^{1,2}	134–180	53,0–57,0	17
21	UAPsTG25 ¹	94–100	54,0–62,0	9

Примечания. ¹ Интервалы температур отжига зависят от образца ДНК.

² Праймеры разработаны для *Picea glauca*.

³ Кривые плавления ампликонов выявляют димеры праймеров.

На рисунках 1 и 2 представлены примеры кинетических кривых, кривых плавления (RFU) и пиков плавления (d(RFU)/dT) продуктов ПЦР в экспериментах с градиентом температур (63,0; 62,6; 61,7; 60,1; 58,2; 56,6; 55,5; 55,0 °C).

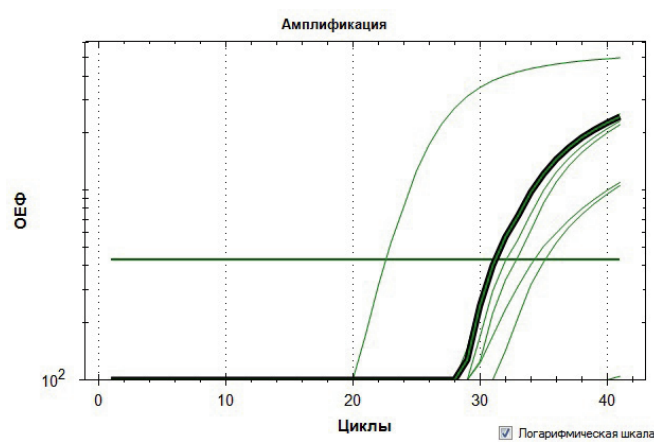
В большинстве локусов наблюдалась специфичная ПЦР в широком диапазоне температур отжига (рис. 1). В некоторых локусах при разных температурах отжига синтезировались разные продукты (с разными пиками плавления). При некоторых температурах продуцировались разные фрагменты ДНК, на что указывает наличие двух пиков плавления (рис. 2). Эти локусы были забракованы как неудобные для мультиплексирования.

Отобранные локусы со специфичной амплификацией в широком диапазоне температур были распределены по мультиплексам с использованием программы Multiplex Manager 1.0. По данным разработчиков, эта программа учитывает и оптимизирует несколько факторов: диапазон размеров аллеля, тем-

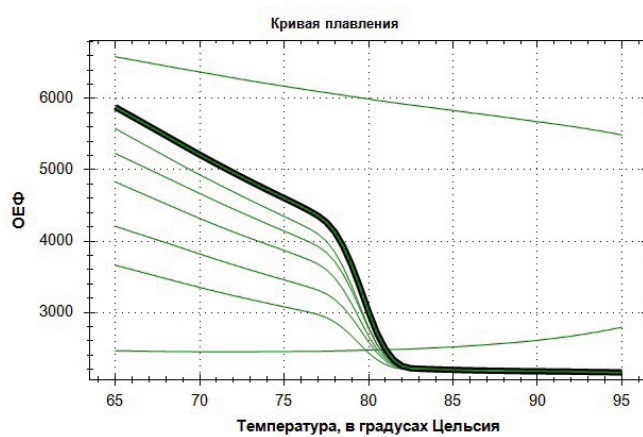
пературы отжига, комплементарность праймеров, гетерозиготность, количество аллелей, распределение локусов по группам сцепления.

Программа Multiplex Manager 1.0. облегчила составление мультиплексов из отобранных микросателлитных локусов, однако, как показало тестирование предложенных мультиплексов, она не является достаточным инструментом для получения работающих панелей микросателлитов. Нам не удалось использовать составленные программой мультиплексы из-за отсутствия амплификации в части локусов при проведении каждой из мультиплексных ПЦР. Аналогичные результаты были получены при мультиплексировании локусов сосны [22]. Возможно, это связано с большим сходством ряда праймеров между собой, которое было выявлено с помощью программы.

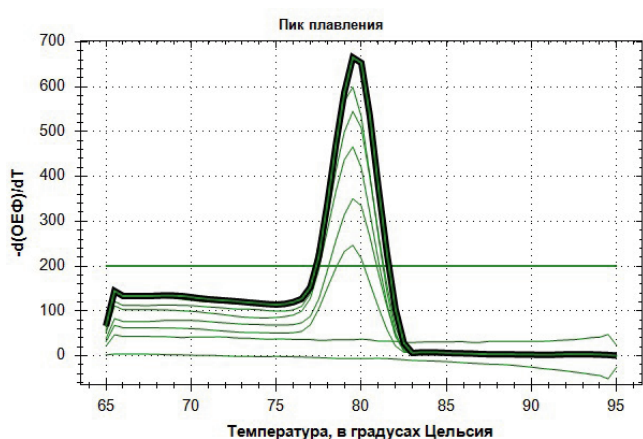
После ряда модификаций отобранных программой мультиплексов, проверки сочетания локусов из разных мультиплексов мы предлагаем использовать мультиплексы, охарактеризованные в таблице 4.



а) кинетические кривые

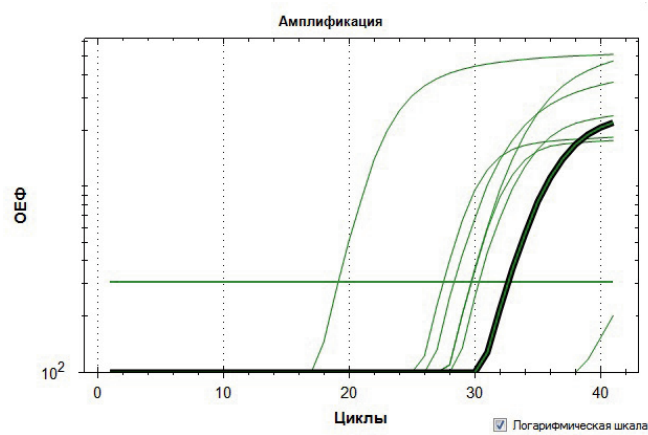


б) кривые плавления

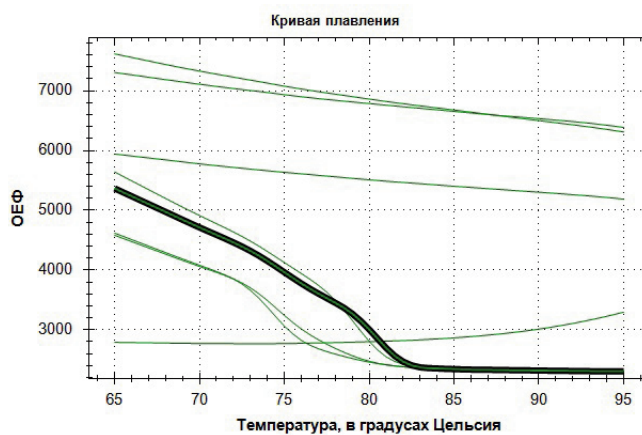


в) пики плавления

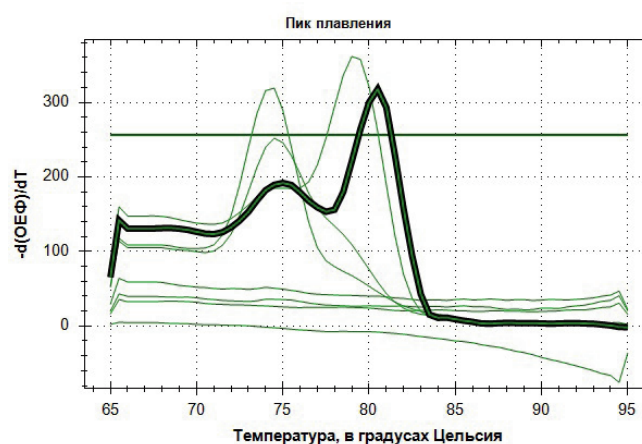
Рис. 1. Результаты ПЦР в реальном времени в локусе RAAC23 в опыте с градиентом температур (а–в). Выделены графики результатов амплификации при температуре отжига 63,0 °С



а) кинетические кривые



б) кривые плавления



в) пики плавления

Рис. 2. Результаты ПЦР в реальном времени в локусе PGL15 в опыте с градиентом температур (а–в). Выделены графики результатов амплификации при температуре отжига 61,7 °C

Таблица 4

Описание мультиплексов nSSR-локусов ели европейской

Мультиплекс	Локус	Мотив	T _a , °C	Краситель	Размер фрагмента, п. н.
I	WS0092.A19 UAPgCT144	(AC)9 (AG)11	57,0	FAM HEX	213–221 (232–244) 134–180
II	SpAGG3 PAAC23	(GA)24 (GT)14	62,0	FAM ROX	136 266–314
III	WS0023.B03 WS0073.H08	(AT)10 (AT)14	62,0	HEX FAM	170–216 (214–216) 202–236 (228–230)
IV	UAPgAC/AT6 UAPgAG105 SpAGC1 SpAGD1	(AC)10/(AT)7 (TG)16 (TC)5TT(TC)10 (AG)25	59,0	HEX HEX FAM ROX	114–128 167–175 103 124–204
V	Pa_41 Pa_47 UAPsTG25 WS0092.M15	(CTG)n (CAG)n (AC)23 (TCC)6	62,0	ROX ROX HEX ROX	176–183 106–118 94–100 204–216 (217–229)
VI	PAAC19 SpAC1H8 UAPgGT8	(CT)23CAA(TG)12(GT)27 (CA)20	58,5	HEX FAM ROX	141–207 135 204–230
VII	Pa_36 WS0016.O09 Pa_44 Pa_28	(CGG)n (AT)9 (GGA)n (TCG)n	62,0	FAM HEX HEX ROX	178–200 396–424 (416–418) 274–293 148–162

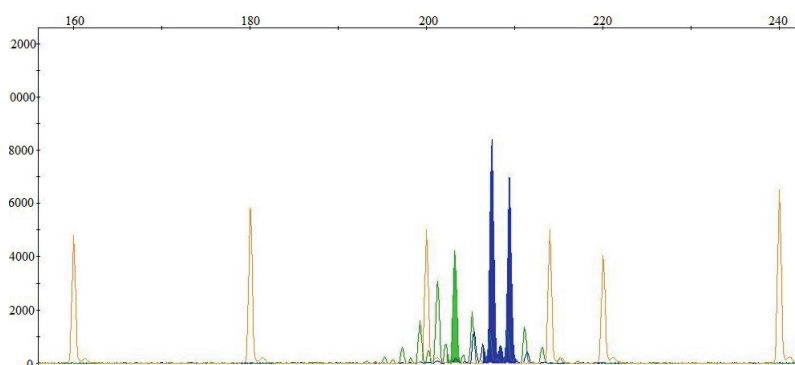
Тестирование этих мультиплексов было проведено на небольшом числе образцов ДНК (7–8) ели европейской из разных популяций южно-таёжного региона европейской части России (табл. 1). Результаты мультиплексных ПЦР с мечеными прямыми и немечеными обратными праймерами визуализировали с применением фрагментного анализа на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500. У этого прибора более высокая, по сравнению с ПЦР в реальном времени и ПЦР с детекцией в гелях, чувствительность, поскольку учитывается флуоресценция конкретных красителей, которыми были мечены праймеры. Анализ результатов проводили с использованием программного

обеспечения GeneMapper 4, Applied Biosystems.

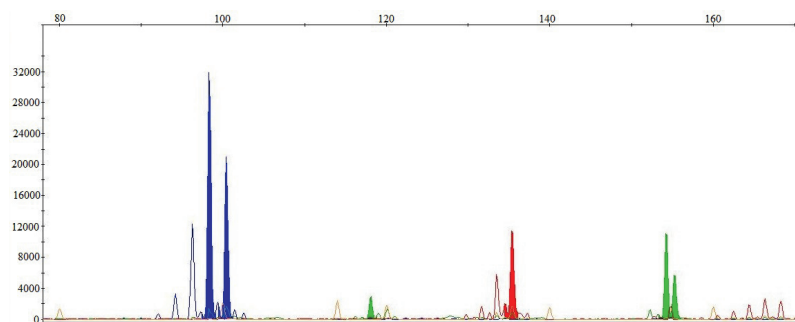
В локусах Pa_28, Pa_36, Pa_44, Pa_47, WS0092.M15, UAPsTG25 синтезировались продукты во всех образцах ДНК.

На рисунке 3 представлен пример детектирования предлагаемых мультиплексов ели европейской на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500.

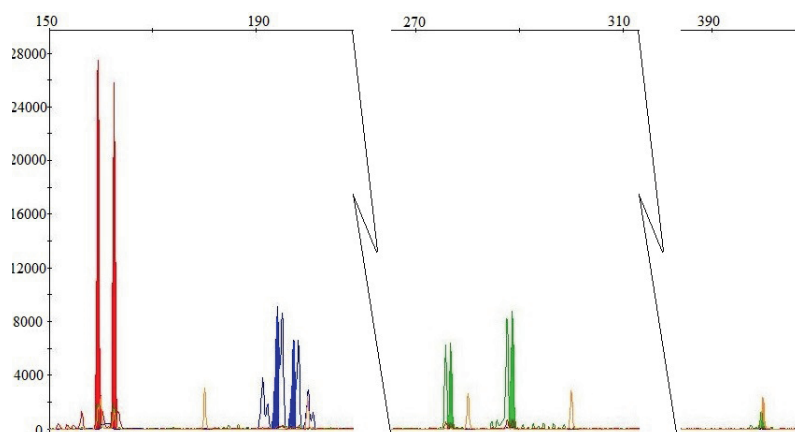
Планируется провести тестирование предложенных мультиплексов на массовом популяционном материале и снизить количество локусов до минимального числа, достаточного для получения удовлетворяющих результатов при оценке генетического разнообразия ели европейской.



a) мультиплекс III: WS0023.B03 – зеленый пик; WS0073.H08 – синие пики; оранжевые пики – внутренний размерный стандарт LIZ 600



б) мультиплекс IV: SpAGC1 – синий пик; UAPgAC/AT6 – зеленый пик слева; UAPgAG105 – зеленый пик справа; SpAGD1 – красный пик; оранжевые пики – внутренний размерный стандарт LIZ 600



в) мультиплекс VII: Pa_28 – красные пики; Pa_36 – синие пики; Pa_44 – зеленые пики в центре; WS0016.O09 – маленький зеленый пик справа (400 п. н.); оранжевые пики – внутренний размерный стандарт LIZ 600

Рис. 3. Результаты детектирования микросателлитных локусов на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (*a–в*)

Заключение

При отборе удобных для мультиплексирования микросателлитных локусов, пригодных для оценки биологического разнообразия популяций и идентификации клонового потомства плюсовых деревьев и других ценных генотипов ели весьма полезным является использование ПЦР в реальном времени с интеркалирующими красителями для двухцепочечной ДНК (EvaGreen, SybrGreen I) и анализом кривых плавления амплификатов.

В экспериментах с ПЦР в реальном времени для каждого локуса по отдельности были уточнены интервалы температур отжига, при которых происходит синтез специфического продукта.

Согласно полученным данным, программа Multiplex Manager 1.0 облегчает составление мультиплексов из ранее опубликованных и апробированных микросателлитных локу-

сов ели европейской, но не является достаточно точным инструментом для получения работающих мультиплексов. Не все SSR-локусы ели европейской, сгруппированные программой в один мультиплекс, амплифицируются в мультиплексных ПЦР.

После модификации предложены 7 оригинальных мультиплексов, которые были успешно апробированы в мультиплексных ПЦР с детекцией результатов с помощью фрагментного анализа на генетическом анализаторе 3500, Applied Biosystems. Тестирование мультиплексов было проведено на 30 деревьях, происходящих из четырех географически различающихся популяций южно-таёжного региона европейской части Российской Федерации.

Исследование выполнено за счет средств федерального бюджета в рамках государственного задания ФБУ «СПБНИИЛХ» (№ 053-00008-19-00).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Актуальные проблемы генетики: учеб. пособие / колл. авт., под общ. ред. С.В. Боронниковой. Перм. гос. нац. исслед. ун-т. – Пермь, 2013. – 126 с. – ISBN 978-5-7944-2278-8.
2. Амирханов, А.М. Национальная стратегия и План действий по сохранению биологического разнообразия в России / А.М. Амирханов, А.А. Тишков // Бюлл.: Использование и охрана природных ресурсов России, 1999, № 5–6, с. 87–93.
3. Белов, Д.А. Методика обработки данных при плавлении продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени / Д.А. Белов, Ю.В. Белов, В.В. Манойлов // Научное приборостроение. – 2016. – Т. 26. – № 3. – С. 10–14. – ISSN 0868-5886.
4. Белов, Ю.В. Двухкомпонентный количественный ПЦР-анализ / Ю.В. Белов, А.И. Петров, В.Е. Курочкин // Научное приборостроение. – 2012. – Т. 22. – № 4. – С. 72–76. – ISSN 0868-5886.
5. Белов, Ю.В. Многокомпонентный количественный ПЦР-анализ / Ю.В. Белов, В.Е. Курочкин, А.И. Петров // Научное приборостроение. – 2013. – Т. 23. – № 2. – С. 5–8. – ISSN 0868-5886.
6. Белов, Ю.В. Построение калибровочной линии при фрагментном анализе ДНК / Ю.В. Белов, И.А. Леонтьев, В.В. Панчук, А.И. Петров, В.Е. Курочкин // Научное приборостроение. – 2013. – Т. 23. – № 3. – С. 26–31. – ISSN 0868-5886.
7. Калько, Г.В. Применение микросателлитных маркеров для оценки генетического разнообразия ели европейской / Г.В. Калько, М.В. Кузьмина // Труды СПБНИИЛХ. – 2018. – № 1. – С. 32–47. – ISSN 2079-6080.
8. Конвенция о биологическом разнообразии // Организация Объединенных Наций: Конвенции и соглашения: офиц. сайт ООН. – Электрон. дан. – Рио-де-Жанейро. – Дата вступления в силу: 5 июня 1992 года: Ратифицирована РФ 17.02.1995. – URL: https://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml (дата обращения: 02.10.2019).

9. Мельникова, М.Н. Тестирование микросателлитных праймеров на разных популяциях евразийских елей *Picea abies* (L.) Karst. и *Picea obovata* Ledeb. / М.Н. Мельникова, Н.Б. Петров, А.А. Ломов, N. la Porta, Д.В. Политов // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 5. – С. 660–665. – ISSN 0016-6758.
10. Оценка и сохранение биоразнообразия лесного покрова в заповедниках Европейской России: научное издание / отв. редактор А.В. Заугольнова. – М.: Научный мир, 2000. – 185 с. – ISBN 5-89176-083-5.
11. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
12. Потокина, Е.К. Генетическая дифференциация популяций ели на северо-западе России по результатам маркирования микросателлитных локусов / Е.К. Потокина, Л.В. Орлова, М.С. Вишневская, Е.А. Алексеева, А.Ф. Потокин, А.А. Егоров // Генетика популяций и эволюция. – 2012. – Том X, № 2. – С. 40–49. – ISSN 1811-0932.
13. Ребриков, Д.В. ПЦР в «реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов, П.А. Семенов, А.М. Савилова, И.А. Кофиади, Д.Д. Абрамов. – Изд. 2-е, испр. – М.: БИНОМ, 2009. – 223 с. – ISBN 978-5-9963-0086-0.
14. Acheré, V. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers / V. Acheré, P. Faivre-Rampant, S. Jeandroz, G. Besnard, T. Markussen, A. Aragones, V. Fladung, E. Ritter, J.-M. Favre // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 108. – P. 1602–1613. – ISSN 0040-5752.
15. Cvjetković, B. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina / B. Cvjetković, M. Konnert, B. Fussi, M. Mataruga, M. Šijačić-Nikolić, V. Daničić, A. Lučić. – DOI 10.2298/GENSR1701259C // Genetika. – 2017. – Vol. 49 (1). – P. 259–272.
16. Designing Trees for the Future. Project no. 284181. D7.2 – Report on cross-validation of molecular marker identification protocols / Bavarian Office for Forest Seeding and Planting (ASP); WP7 Leader: Berthold Heinze. – Teisendorf (Germany): Bavarian Office for Forest Seeding and Planting, Start date of project: 1 November 2011. – 46 p.
17. Eusemann, P. Three microsatellite multiplex PCR assays allowing high resolution genotyping of white spruce, *Picea glauca* / P. Eusemann, P. Herzig, M. Kieb, S. Ahlgrimm, P. Herrmann, M. Wilmking, M. Schnittler. – DOI 10.1515/sg-2014-0029 // Silvae Genetica. – 2014. – December, Vol. 53 (5). – P. 230–234.
18. Fisher, C. High resolution melt parameter considerations for optimal data resolution / C. Fisher, R. Meng, F. Bizouarn, R. Scott // Bio-Rad Bulletin 6009. – Bio-Rad Laboratories, Inc. – 2010. – URL: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6009.pdf. (дата обращения: 12.10.2019).
19. Fluch, S. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.) / S. Fluch, A. Burg, D. Kopecky, A. Homolka, N. Spiess, G.G. Vendramin // BMC Research Notes. – Электрон. дан. – 2011. – 12 October. – URL: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/401> (дата обращения: 12.10.2019).
20. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových markerů: Certifikovaná metodika. 8/2015 / Helena Cvrčková, Pavlína Máchová. – Strnady, Jiloviště: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., 2015. – 38 с. – ISBN 978-80-7417-102-4.
21. Holleley, C.E. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR / C.E. Holleley, P.G. Geerts // BioTechniques. – 2009. – Vol. 46 (7). – P. 511–517. – ISSN 0736-6205 (Print). – ISSN 1940-9818 (Online).
22. Kalko, G. Real-Time PCR and analysis of amplicon melting curves to assess the suitability of SSR loci of Scots pine for multiplexing / G. Kalko, T. Kotova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science: Лесные экосистемы как глобальный ресурс биосферы: вызовы, угрозы, пути решения. Forestry – 2019, 3–4 октября 2019 г., Воронеж / ФГБОУ ВО «ВГЛТУ им. Г.Ф. Морозова». – Accepted, in print.

23. Máchová P., Cvrčková H., Malá J. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého. *Zpravy lesnického výzkumu*, 2014, vol. 59 (4), pp. 243–249.
24. 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.
25. Rajora, O.P. Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species / O.P. Rajora, M.H. Rahman, S. Dayanandan, A. Mosseler // *Mol. Gen. Genet.* – 2001. – Vol. 264. – P. 871–882.
26. Rogers, S.O. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues / S.O. Rogers, A.J. Bendich. – DOI 10.1007/BF00020088 // *Plant Mol. Biol.* – 1985. – V. 5. – P. 69–76.
27. Rungis, D. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags / D. Rungis, Y. Berube, J. Zhang, S. Ralph, C.E. Ritland, B.E. Ellis, C. Douglas, J. Bohlmann, K. Ritland // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – Vol. 109 (6). – P. 1283–1294. – ISSN 0040-5752.
28. Scotti, I. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences / I. Scotti, F. Magni, R. Fink, W. Powell, G. Binelli, P.E. Hedley // *Genome*. – 2000. – Vol. 43 (1). – P. 41–46. – ISSN 0831-2796.
29. The state of the world's forest genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2014. – 304 p. – ISBN 978-92-5-108402-1.
30. Ujino-Ihara, Tokuko. An efficient method for developing SNP markers based on EST data combined with high resolution melting (HRM) analysis / Tokuko Ujino-Ihara, Yuriko Taguchi, Yoshinari Moriguchi, Yoshihiko Tsumura // *BMC Research Notes*. – Электрон. дан. – 2010. – 2 March. – URL: <http://www.biomed-central.com/1756-0500/3/51> (дата обращения: 20.10.2019). – Загл. с экрана. – Яз. англ.

REFERENCES

1. Aktualnyye problemy genetiki, ucheb. Posobiye. Koll. avt. pod obshch. red. S.V. Boronnikovoy. Perm. gos. nats. issled. un-t, Perm, 2013, 126 p. ISBN 978-5-7944-2278-8. (In Russian)
2. Amirkhanov A.M., Tishkov A.A. Natsionalnaya strategiya i Plan deystviy po sokhraneniyu biologicheskogo raznoobraziya v Rossii. *Byull. Ispolzovaniye i okhrana prirodnnykh resursov Rossii*, 1999, no. 5–6, pp. 87–93. (In Russian)
3. Belov D.A., Belov Ju.V., Manojlov V.V. Metodika obrabotki dannyh pri plavlenii produktov polimeraznoj cepnoj reakcii v real'nom vremeni. *Nauchnoe priborostroenie*, 2016, vol. 26, no. 3, pp. 10–14, ISSN 0868-5886. (In Russian)
4. Belov Ju.V., Petrov A.I., Kurochkin V.E. Dvuhkomponentnyj kolichestvennyj PCR-analiz. *Nauchnoe priborostroenie*, 2012, vol. 22, no. 4, pp. 72–76, ISSN 0868-5886. (In Russian)
5. Belov Ju.V., Kurochkin V.E., Petrov A.I. Mnogokomponentnyj kolichestvennyj PCR-analiz. *Nauchnoe priborostroenie*, 2013, vol. 23, no. 2, pp. 5–8, ISSN 0868-5886. (In Russian)
6. Belov Ju.V., Leont'ev I.A., Panchuk V.V., Petrov A.I., Kurochkin V.E. Postroenie kalibrovochnoj linii pri fragmentnom analize DNK. *Nauchnoe priborostroenie*, 2013, vol. 23, no. 3, pp. 26–31, ISSN 0868-5886. (In Russian)
7. Kal'ko G.V., Kuz'mina M.V. Primenenie mikrosatelitnykh markerov dlja ocenki geneticheskogo raznoobrazija eli evropejskoj. *Trudy SPbNILH*, 2018, no. 1, pp. 32–47. ISSN 2079-6080. (In Russian)
8. Konvencija o biologicheskom raznoobrazii. Organizatsiya Ob'yedinennykh Natsiy, Konvencii i soglasenija, ofic. sait OON. Rio-de-Zhanejro. Data vstuplenija v silu 5 ijunja 1992 goda: Ratificirovana RF 17.02.1995, URL: https://www.un.org/ru/documents/decl_conv/conventions/biodiv.shtml (In Russian)

9. Mel'nikova M.N., Petrov N.B., Lomov A.A., N. la Porta, Polítov D.V. Testirovanie mikrosatellitnyh prajmerov na raznyh populjacijah evrazijskih elej *Picea abies* (L.) Karst. i *Picea obovata* Ledeb. *Genetika*, 2012, vol. 48, no. 5, pp. 660–665, ISSN 0016-6758.
10. Ocenka i sohranenie bioraznoobrazija lesnogo pokrova v zapovednikah Evropejskoj Rossii, nauchnoe izdanie, otv. redaktor A.V. Zaugol'nova, Moscow, 2000, 185 p., ISBN 5-89176-083-5.
11. Padutov V.E., Baranov O. Ju., Voropaev E.V. Metody molekulyarno-geneticheskogo analiza. Minsk, 2007, 176 p. (In Russian)
12. Potokina E.K., Orlova L.V., Vishnevskaja M.S., Alekseeva E.A., Potokin A.F., Egorov A.A. Geneticheskaja differenciacija populjacij eli na severo-zapade Rossii po rezul'tatam markirovanija mikrosatellitnyh lokusov. *Genetika populjacij i jevoljucija*, 2012, vol. X, no. 2, pp. 40–49, ISSN 1811-0932. (In Russian)
13. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D. Ju., Semjonov P.A., Savilova A.M., Kofiadi I.A., Abramov D.D. PCR v «real'nom vremeni». Izd. 2-e, Moscow, 2009, 223 p, ISBN 978-5-9963-0086-0. (In Russian)
14. Acheré V, Faivre-Rampant P, Jeandroz S., Besnard G., Markussen T., Aragones A., Fladung V., Ritter E., Favre J.-M. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, vol. 108, pp. 1602–1613, ISSN 0040-5752.
15. Cvjetković B., Konnert 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, DOI 10.2298/GENSRI701259C.
16. Designing Trees for the Future. Project no. 284181. D7.2 – Report on cross-validation of molecular marker identification protocols. Bavarian Office for Forest Seeding and Planting (ASP); WP7 Leader: Berthold Heinze, Teisendorf (Germany): Bavarian Office for Forest Seeding and Planting, Start date of project 1 November 2011, 46 p.
17. Eusemann P., Herzig P., Kieb M., Ahlgrimm S., Herrmann P., Wilmking M., Schnittler M. Three microsatellite multiplex PCR assays allowing high resolution genotyping of white spruce, *Picea glauca*. *Silvae Genetica*, 2014, December, vol. 53 (5), pp. 230–234, DOI 10.1515/sg-2014-0029.
18. Fisher C., Meng R., Bizouarn F, Scott R. High resolution melt parameter considerations for optimal data resolution. *Bio-Rad Bulletin 6009*, 2010, Bio-Rad Laboratories, Inc. URL: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6009.pdf
19. 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. URL: <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/4/401>.
20. Cvrčková H., Máchová P. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových marker. *Lesnický průvodce 8/2015*, certifikovaná metodika, Strnady, Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., 2015, 38 p., ISSN 0862-7657, ISBN 978-80-7417-102-4. (In Czech)
21. Holleley C.E., Geerts P.G. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR. *BioTechniques*, 2009, vol. 46 (7), pp. 511–517, ISSN 0736-6205 (Print), ISSN 1940-9818 (Online).
22. Kal'ko G.V., Kotova T.M. Real-Time PCR and analysis of amplicon melting curves to assess the suitability of SSR loci of Scots pine for multiplexing. IOP Conference Series: *Earth and Environmental Science : Lesnye jekosistemy kak global'nyj resurs biosfery: vyzovy, ugrozy, puti reshenija. Forestry*, 2019, 3–4 oktjabrja 2019 g., Voronezh, VGLTU im. G.F. Morozova, accepted, in print.
23. Máchová P., Cvrčková H., Malá J. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého. *Zpravy lesnického vyzkumu*, 2014, vol. 59 (4), pp. 243–249. (In Czech)

24. 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.
25. Rajora O.P., Rahman M.H., Dayanandan S., Mosseler A. Isolation, characterization, inheritance and linkage of microsatellite DNA markers in white spruce (*Picea glauca*) and their usefulness in other spruce species. *Mol. Gen. Genet.*, 2001, vol. 264, pp. 871–882.
26. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.*, 1985, vol. 5, pp. 69–76, DOI 10.1007/BF00020088.
27. Rungis D., Berube Y., Zhang J., Ralph S., Ritland C.E., Ellis B.E., Douglas C., Bohlmann J., Ritland K. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, vol. 109 (6), pp. 1283–1294, ISSN 0040-5752.
28. Scotti I., Magni F., Fink R., Powell W., Binelli G., Hedley P.E. Microsatellite repeats are not randomly distributed within Norway spruce (*Picea abies* K.) expressed sequences. *Genome*, 2000, vol. 43 (1), pp. 41–46, ISSN 0831-2796.
29. The state of the world's forest genetic resources. FAO, Rome, FAO, 2014, 304 p., ISBN 978-92-5-108402-1.
30. Ujino-Ihara Tokuko, Yuriko Taguchi, Yoshinari Moriguchi, Yoshihiko Tsumura. An efficient method for developing SNP markers based on EST data combined with high resolution melting (HRM) analysis. *BMC Research Notes*, 2010, 2 March. URL: <http://www.biomed-central.com/1756-0500/3/51>.

Статья поступила в редакцию 17.12.2019