



DOI 10.21178/2079-6080.2016.4.4

УДК 630.165.4; 630.174.754:575.174.05.3; 630.174.755:174.015.3

## Апробация ядерных микросателлитных маркеров ели европейской

© Г.В. Калько, Ю.С. Зотова

---

### Testing of nuclear microsatellite markers of Norway spruce

G.V. Kalko, Yu.S. Zotova (Saint Petersburg Forestry Research Institute)

The aim of the study is the selection of polymorphic nuclear microsatellite loci available for population structure analysis of Norway spruce. We tested the microsatellite primers on a 30 *Picea abies* (L.) Karst. individual plants from three geographically distinct populations of North-West Russia and compared the Polymorphic Information Content (PIC) of chosen markers.

Twenty-three of the tested primers belonged to EST-SSR type; they were derived from transcripts and can be used to assess the functional diversity of natural populations. The exercising of such makers is particularly important to evaluate the status of genetic resources. Fourteen of the thirty tested primers showed the stable amplification. Twelve primers were polymorphic. Features of EST-SSR markers of spruce were compared with the characteristics of polymorphism of four promising n-SRR markers proposed by A. Pfeiffer and R.B. Hodgetts, which previously showed high polymorphism on the Italian and Russian populations of *P. abies* (L.) Karst. and *P. obovata* Ledeb. and 7 species of *Picea*, respectively.

Compare the index PIC of tested primers displayed that four EST-SSR markers Pa\_28 (PIC – 0,625), Pa\_36 (PIC – 0,633), Pa\_59 (PIC – 0,568) have almost the same high discriminatory ability as highly polymorphic n-SSR markers SpAGC2 (PIC – 0,811), SpAC1F7 (PIC – 0,747), UAPgAG150A (PIC – 0,718) and UAPgAG105 (PIC – 0,570).

Seven the most polymorphic loci can be used to assess the status of genetic resources of Norway spruce.

**Key words:** DNA markers, microsatellites, spruce, Polymorphic Information Content (PIC), genetic diversity, genetic resources

**Апробация ядерных микросателлитных маркеров ели европейской**

**Г.В. Калько, Ю.С. Зотова**

Целью настоящей работы был отбор линейки полиморфных ядерных микросателлитных локусов, пригодных для анализа структуры популяций ели европейской. Тестирование проводили на 30 особях *Picea abies* (L.) Karst., собранных в трех географически отличающихся популяциях Северо-Запада России. Задачи исследования заключались в тестировании тридцати ядерных микросателлитов и сравнении меры информационного полиморфизма (Polymorphic Information Content, индекса PIC) отселектированных маркеров.

Двадцать три тестированных праймера относились к типу EST-SSR, они являются производными транскриптов и могут быть использованы для оценки функционального разнообразия естественных популяций, что особенно важно при определении состояния генетических ресурсов. Четырнадцать из тридцати тестированных праймеров показали стабильную амплификацию. Двенадцать праймеров были полиморфными. Характеристики EST-SSR-маркеров ели европейской были сравнены с характеристиками полиморфности четырех перспективных n-SRR-маркеров, предложенных А. Pfeiffer и R.V. Hodgetts и показавших ранее высокий полиморфизм на нескольких итальянских и российских популяциях *P. abies* (L.) Karst. и российских популяциях *P. obovata* Ledeb. и на 7 видах *Picea*, соответственно.

Сравнение индексов полиморфизма (Polymorphic Information Content) PIC тестированных праймеров показывает, что три высоко полиморфных EST-SSR-маркера Pa\_28 (PIC – 0,625), Pa\_36 (PIC – 0,633), Pa\_59 (PIC – 0,568) обладают чуть меньшей дискриминационной способностью, что и n-SSR-маркеры SpAGC2 (PIC – 0,811), SpAC1F7 (PIC – 0,747), UAPgAG150A (PIC – 0,718) и UAPgAG105 (PIC – 0,570).

Семь наиболее полиморфных локусов могут быть использованы для оценки состояния генетических ресурсов ели европейской.

**Ключевые слова:** ДНК-маркеры, микросателлиты, ель, мера информационного полиморфизма PIC, генетическое разнообразие, генетические ресурсы

Калько Галина Валентиновна – заведующий исследовательской лабораторией  
E-mail: [gkalko@spb-niilh.ru](mailto:gkalko@spb-niilh.ru); [kagava0720@gmail.com](mailto:kagava0720@gmail.com)

Зотова Юлия Сергеевна – лаборант-исследователь исследовательской лаборатории

ФБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт лесного хозяйства»  
194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21  
Тел.: (812) 552-80-21, факс: (812) 552-80-42

### Введение

К настоящему времени разработано большое количество молекулярных маркеров, пригодных для анализа биологического разнообразия живых существ: более 20 типов [7]. Общепринятым является мнение, что достаточную информацию о генетическом разнообразии в популяциях может дать анализ по 15-17 микросателлитным маркерам или большого числа SNPs [23, 24].

На основе изучения литературных данных нами был сделан вывод о том, что на первых этапах для оценки генетического разнообразия хвойных пород следует использовать ядерные маркеры, прежде всего, микросателлитные [3]. Во-первых, они имеют двуродительское наследование; во-вторых, в геномах ели и сосны такие маркеры многочисленны, кодоминантны, вариабельны и распространены во всех частях генома; в-третьих, микросателлиты позволяют выявить самый высокий уровень гетерозиготности и являются самым мощным на сегодняшний день инструментом изучения изменчивости живых существ [23, 24].

Целью настоящей работы был выбор набора маркеров, пригодных для микросателлитного анализа структуры популяций ели европейской.

Тестирование выполнялось на образцах ДНК ели европейской *Picea abies* (L.) Karst. из трех географически отличающихся популяций северо-запада России. При этом проводился отбор наиболее полиморфных и стабильно амплифицирующихся микросателлитных локусов и сравнение меры информации

онного полиморфизма (индекса PIC) отселектированных маркеров.

Часть лабораторных работ в 2016 г. была выполнена авторами в Центре коллективного пользования научным оборудованием «Клеточные и молекулярные технологии изучения растений и грибов» Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

### Материалы и методы

ДНК выделяли традиционным методом с применением цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ-метод) [10]. Использовались высушенные в силикагеле образцы хвои из естественных насаждений ели европейской, которые были собраны в 2015 и 2016 гг. в Ленинградской (Гатчинское и Тихвинское лесничества), а также в Псковской (Порховское лесничество) областях.

Апробацию микросателлитных локусов ядерной ДНК ели европейской выполняли в процессе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процедуры амплификации первоначально проводили в соответствии с условиями, предложенными авторами, ранее работавшими с конкретными праймерами [8, 12, 15, 17, 22]. Реакции амплификации в объеме 20 мкл содержали 1x Taq Buffer или 1x Taq Turbo Buffer (Евроген), смесь четырех dNTP (0,1-0,2 мМ), прямой и обратный праймеры по 0,5-5,0 мкМ каждого, 1-2 е.а. Taq ДНК-полимеразы, 50 ng — геномной ДНК.

Свойства 30 апробируемых микросателлитных праймеров, описанные в литературных источниках, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика микросателлитных локусов ели европейской по литературным данным

Микросателлитный локус	Мотив <sup>1)</sup>	Размер фрагмента, п.о. <sup>2)</sup>	T <sub>a</sub> , °C <sup>3)</sup>	Тип маркера	Количество аллелей	Литературный источник
SpAG2	(TC) <sub>16</sub>	105	53	ЯМ	10	[8, 22]
SpAGC2	(TA) <sub>11</sub> (GA) <sub>20</sub>	126	57	ЯМ	11	[8, 22]
SpAGD1	(AG) <sub>25</sub>	147	57	ЯМ	22	[8, 22]

Микросателлитный локус	Мотив <sup>1)</sup>	Размер фрагмента, п.о. <sup>2)</sup>	T <sub>a</sub> , °C <sup>3)</sup>	Тип маркера	Количество аллелей	Литературный источник
SpAGG3	(GA) <sub>24</sub>	136	57	ЯМ	15	[8, 22]
SpAC1F7	(AC) <sub>12</sub>	109	57	ЯМ	6	[8, 22]
Pa_5	(CCG) <sub>n</sub>	136-158	53	EST	7	[15]
Pa_12	(AAG) <sub>n</sub>	136-138	53	EST	2	[15]
Pa_22	(TTC) <sub>n</sub>	169-188	55	EST	6	[15]
Pa_25	(CTG) <sub>n</sub>	131-165	55	EST	8	[15]
Pa_28	(TCG) <sub>n</sub>	148-162	62	EST	8	[15]
Pa_29	(CAA) <sub>n</sub>	97-108	62	EST	5	[15]
Pa_33	(CGG) <sub>n</sub>	91-104	62	EST	9	[15]
Pa_36	(CGG) <sub>n</sub>	178-200	62	EST	5	[15]
Pa_41	(CTG) <sub>n</sub>	176-183	62	EST	5	[15]
Pa_42	(CCG) <sub>n</sub>	160-163	62	EST	4	[15]
Pa_43	(GAA) <sub>n</sub>	168-175	62	EST	6	[15]
Pa_44	(GGA) <sub>n</sub>	274-293	62	EST	7	[15]
Pa_47	(CAG) <sub>n</sub>	106-118	62	EST	4	[15]
Pa_48	(CGG) <sub>n</sub>	131-195	62	EST	17	[15]
Pa_49	(ATG) <sub>n</sub>	117-128	62	EST	2	[15]
Pa_50	(CAG) <sub>n</sub>	124-129	62	EST	4	[15]
Pa_51	(CCA) <sub>n</sub>	119-140	62	EST	3	[15]
Pa_52	(CCA) <sub>n</sub>	135-145	62	EST	5	[15]
Pa_53	(TCG) <sub>n</sub>	176-178	62	EST	2	[15]
Pa_55	(GAA) <sub>n</sub>	148-158	62	EST	3	[15]
Pa_56	(AGGTG) <sub>n</sub>	113-128	62	EST	6	[15]
Pa_59	(CTCTG) <sub>n</sub>	90-112	62	EST	3	[15]
Pa_60	(GGCTG) <sub>n</sub>	241-264	62	EST	5	[15]
UAPgAG150A	(AG) <sub>19</sub>	142-174	-	ЯМ	15	[12, 17]
UAPgAG105	(AG) <sub>11</sub>	161-171	-	ЯМ	5	[12, 17]

Примечания. Мотив – повторяющаяся последовательность нуклеотидов; п.о. – пары оснований; Та – температура отжига праймера.

Для оптимизации ПЦР с каждым праймером проводили амплификацию с градиентом температуры отжига от 50 °C до 60 °C. В зависимости от полученных результатов при необходимости меняли концентрации компонентов ПЦР-коктейля.

Результаты полимеразной реакции визуализировали с помощью горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. При этом использовали камеру Wide Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad, США) с размером под-

ложки 150×100 мм или камеру SE-2 (Хеликон, Россия) с размером геля 120×170 мм.

Окрашивание гелей проводили с помощью бромистого этидия, визуализировали синтезированные фрагменты ДНК в проходящем УФ-свете при длине волны 310 нм. Для определения размеров амплификатов в агарозном геле использовали следующие маркеры: Маркер длин ДНК 100+bp DNA Ladder (Евроген, Россия), Маркер длин ДНК 50+bp DNA Ladder (Евроген, Россия),

ДНК-маркер GeneRuler™ для экспресс-анализа (Fermentas, Латвия).

Для выявления полиморфизма ДНК использовали электрофоретическое разделение продуктов амплификации в неденатурирующем 6% полиакриламидном геле (ПААГ) в трис-ЭДТА-боратном буфере с pH=8,0 [6]. Исследование проводили в камере для вертикального электрофореза VE-20 (Хеликон, Россия). Использовали стекла размером 20×20 см.

Электрофоретическое разделение выполняли в соответствии с существующей методикой [2]. Длительность процесса составляла 5-6 часов, в зависимости от длин исследуемых фрагментов, при напряжении электрического поля 300 В и силе тока не более 110 мА на камеру (на два геля). Для оценки длин фрагментов ДНК применяли ДНК-маркеры Thermo Scientific O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder и Маркер длин ДНК 50+bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Величину каждому бэнду присваивали относительную: в образцах рядом с маркером она была определена более точно, полосы, находящиеся далеко от ДНК-маркера (или размерного стандарта), соизмеряли с его шкалой и размером амплификатов на соседних дорожках (более низко расположенному фрагменту присваивали число пар оснований на шаг повтора меньше, чем у выше расположенного: например, 80 п.о. и 83 п.о. при трехнуклеотидном простом повторе). В дальнейших исследованиях планируется использовать флуоресцентно меченые праймеры, что позволит уточнить величину амплифицированных фрагментов и ускорить проведение исследований.

Для характеристики маркеров вычисляли индекс полиморфизма PIC по формуле для мультиаллельных маркеров:  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ , где  $p_i$  – частота  $i$ -го аллеля [11]. В расчет принимали амплифицируемые фрагменты ДНК ожидаемого размера.

### Результаты и обсуждение

Генетическими маркерами считаются аллели анализируемых микросателлитных локу-

сов, и их число характеризует полиморфность самих локусов [3]. Справочник по микросателлитам хвойных был выпущен в начале 2000-х годов, технология защищена патентом США [13, 25].

Монолокусный анализ микросателлитов наиболее подходит для внутривидовых исследований. Поэтому они представляют больший интерес для популяционной генетики, чем для филогенетики [1].

Микросателлитные маркеры привлекательны тем, что имеют кодоминантный характер наследования, отличаются высокой вариабельностью и возможностью автоматизации их анализа. В связи с тем, что микросателлитных маркеров в геномах хвойных растений очень много и они обладают разными свойствами, отбор микросателлитов зависит от целей дальнейших исследований. Для последующей оценки состояния генетических ресурсов в популяциях ели европейской мы выбрали наиболее полиморфные маркеры, а также маркеры, дифференцирующие разные популяции.

Благодаря осуществлению проектов по полногеномному секвенированию ряда хвойных пород открываются широкие возможности для разработки новых SSR-маркеров. Проведены и продолжаются геномные исследования таких видов хвойных растений как ель обыкновенная (Швеция), ель белая (Канада), сосна ладанная (США), сахарная сосна, псевдоцуга (США), сосна обыкновенная (Европейский Союз, Испания), лиственница сибирская, сосна сибирская кедровая (Россия) [4, 5, 14, 18, 19, 20, 26, 27].

Для математической обработки микросателлитных данных из разных популяций предлагаются методы многомерного анализа или кластеризации на основе подходов Байеса [21].

Была принята гипотеза о том, что EST-SSR-маркеры несут существенную информацию о внутривидовом разнообразии, так как эти простые повторы находятся в транскрибируемой области. EST-последовательности

являются производными транскриптов, они могут быть применены для оценки функционального разнообразия естественных популяций. Приложения данного типа маркеров – функциональный геном, ассоциативное картирование, анализ генетического разнообразия, изучение количественных признаков и др. В случаях маркирования генов, ответственных за фенотипические признаки, эти маркеры полезны для использования в селекции [9].

В связи с вышеизложенным было выбрано большое число EST-SSR-маркеров ели евро-

пейской для первичного тестирования их полиморфности. Апробацию маркеров проводили сначала на небольшом количестве образцов ДНК (15 шт.) ели европейской из тихвинской популяции, а затем из гатчинской и порховской (по 7-8 шт.). Тестирование маркеров на образцах из разных популяций важно для оценки их пригодности для анализа структуры популяций ели европейской.

Основные результаты апробации микросателлитных праймеров ели европейской с целью отбора линейки маркеров сведены в таблицы 2 и 3.

Таблица 2

Результаты апробации ядерных микросателлитных праймеров ели европейской

Микросателлитный локус	Мотив <sup>1)</sup>	Источник сведений	Размер фрагмента, п.о. <sup>2)</sup>	T <sub>a</sub> , °C <sup>3)</sup>	Количество аллелей
SpAGC2	(TA) <sub>11</sub> (GA) <sub>20</sub>	эксперимент [8, 22]	88-130	54	9
			126	57	11
SpAC1F7	(AC) <sub>12</sub>	эксперимент [8, 22]	102-126	52	8
			109	57	6
Pa_28	(TCG) <sub>n</sub>	эксперимент [15]	156-175	62	4
			148-162	62	8
Pa_33	(CGG) <sub>n</sub>	эксперимент [15]	101-121	62	5
			91-104	62	9
Pa_36	(CGG) <sub>n</sub>	эксперимент [15]	190-199	62	4
			178-200	62	5
Pa_41	(CTG) <sub>n</sub>	эксперимент [15]	179-198	62	5
			176-183	62	5
Pa_42	(CCG) <sub>n</sub>	эксперимент [15]	175-178	62	2
			160-163	62	4
Pa_44	(GGA) <sub>n</sub>	эксперимент [15]	277-289	62	2
			274-293	62	7
Pa_59	(CTCTG) <sub>n</sub>	эксперимент [15]	96-115	62	3
			90-112	62	3
Pa_60	(GGCTG) <sub>n</sub>	эксперимент [15]	264-269	62	2
			241-264	62	5
UAPgAG150A	(AG) <sub>19</sub>	эксперимент [12, 17]	136-171	52	7
			142-174	-	15
UAPgAG105	(AG) <sub>11</sub>	эксперимент [12, 17]	158-164	53	3
			161-171	-	5

Примечания. Мотив – повторяющаяся последовательность нуклеотидов; п.о. – пары оснований; T<sub>a</sub> – температура отжига праймера.

Обращают на себя внимание некоторые несоответствия в экспериментальных данных по количеству аллелей в локусах и информации о праймерах, опубликованной в литературных источниках (SpAGC2, SpAC1F7, Pa\_33, Pa\_36, Pa\_42, Pa\_44, Pa\_60). По литературным данным, часто случается и расхождение фактических и ожидаемых длин амплифицируемых фрагментов ДНК. Так, отмечается, что при визуализации продуктов амплификации 300 SSR-маркеров, разработанных для сосны, с использованием электрофореза в агарозном геле, только 31 праймер имел ожидаемый размер продукта и, соответственно, амплифицировался в искомом локусе [16].

Также представляет интерес наличие 3-х и более аллелей в генотипе в единичных образцах при амплификации ДНК в локусах Pa\_28, Pa\_44, Pa\_59. Скорее всего, этот феномен связан с миксоплоидией, характерной для многих видов растений. Выявление три- и гексаплоидов ели менее вероятно. Авторы праймеров объясняют наличие дополнительных фрагментов «избыточностью» ДНК у хвойных и при-

сутствием большого числа псевдогенов [15]. В работе М.Н. Мельниковой с соавторами, как видно из представленных рисунков, были образцы с 3 и 4 полосами ожидаемого размера [8]. Мы будем проводить эксперименты снова, начиная с выделения ДНК. Необычные фрагменты ДНК, при их обнаружении, будут секвенированы. Образцы с атипичными спектрами ампликонов в расчете PIC не учитывали.

Предполагается уточнение размера и количества амплификатов при последующем использовании фрагментного анализа на капиллярном секвенаторе с применением флуоресцентно меченых праймеров.

Анализ полиморфизма амплифицирующихся ДНК-маркеров ели европейской на протестированных образцах ДНК представлен в таблице 3. Была вычислена мера информационного полиморфизма PIC, которая выявляет дискриминационную способность маркера и фактически зависит от числа известных (устанавливаемых) аллелей и распределения их частот и тем самым эквивалентна генному разнообразию [11].

Таблица 3

Показатели полиморфизма микросателлитных маркеров ели европейской

Локус	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей	PIC <sup>1)</sup>	Число редких аллелей
SpAGC2	(TA) <sub>11</sub> (GA) <sub>20</sub>	9	88-130	0,811	3
SpAC1F7	(AC) <sub>12</sub>	8	102-126	0,747	1
Pa_28	(TCG) <sub>n</sub>	4	156-175	0,625	0
Pa_33	(CGG) <sub>n</sub>	5	101-121	0,461	2
Pa_36	(CGG) <sub>n</sub>	4	190-199	0,633	0
Pa_41	(CTG) <sub>n</sub>	5	179-198	0,427	2
Pa_42	(CCG) <sub>n</sub>	2	175-178	0,133	1
Pa_44	(GGA) <sub>n</sub>	2	277-289	0,124	0
Pa_59	(CTCTG) <sub>n</sub>	3	96-115	0,568	0
UAPgAG150A	(AG) <sub>19</sub>	7	136-171	0,718	2
UAPgAG105	(AG) <sub>11</sub>	3	158-164	0,570	0

Примечание. PIC – мера информационного полиморфизма.

Как и предполагалось, наиболее эффективными при определении полиморфизма ДНК ели европейской оказались ядерные микросателлитные маркеры SpAGC2,

SpAC1F7, UAPgAG150A, UAPgAG105, имеющие от 3 до 9 аллелей в локусе. Эти маркеры обладали высокой мерой информационного полиморфизма – от 0,570 до 0,811. Из

тестируемых микросателлитных праймеров в транскрибируемой части ядерной ДНК (EST-SSR) самыми полиморфными и имеющими близкие величины показателей были Pa\_28 (4 аллеля, PIC=0,835), Pa\_36 (4 аллеля, PIC=0,633), Pa\_59 (3 аллеля, PIC=0,568). Средней полиморфностью обладали Pa\_33 (5 аллелей, PIC=0,461) и Pa\_41 (5 аллелей, PIC=0,427), способные выявлять редкие аллели (до 40% выявляемых аллелей – редкие).

У остальных EST-SSR-маркеров коэффициент PIC ниже.

В высоко полиморфных локусах UAPgAG105, Pa\_28 и Pa\_59 не обнаружено уникальных аллелей, в локусах SpAGC2, и UAPgAG150A, напротив, отмечали их в большом количестве (до 30% от числа обнаруженных аллелей). Редкие аллели и частоты их распределения могут быть существенными для дифференциации популяций хвойных пород.

### Заключение

Принимая во внимание соответствие размера амплифицируемого фрагмента ожидаемому, четкость разделения амплификатов, количество аллелей в локусе и величину коэффициента полиморфности PIC, мы будем продолжать исследования с праймерами SpAGC2, SpAC1F7, UAPgAG150A, UAPgAG105, Pa\_28, Pa\_36, Pa\_59, а также Pa\_33 и Pa\_41. Планируются дальнейшие эксперименты по оценке полиморфизма ДНК в естественных популяциях ели европейской на выборках большей величины и вычисление популяционных характеристик анализируемых насаждений.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ФБУ «СПБНИИЛХ»: А.С. Бондаренко – за консультации по определению объектов, Д.А. Шабунину, О.Ю. Бутенко и О.И. Антонову – за помощь в сборе образцов хвои ели европейской в 2015 и 2016 гг.

### 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.
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 общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 2014. – 68 с.
3. Калько, Г.В. ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны / Г.В. Калько // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2015. – № 4. – С. 19-34.
4. Крутовский, К.В. Перспективы использования геномных исследований в лесном хозяйстве / К.В. Крутовский // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 11-15.
5. Крутовский, К.В. Предварительные результаты полногеномного de novo секвенирования лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* du Tour) / К.В. Крутовский [и др.] // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 79-83.
6. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж Сэмбрук; пер. с англ.; под ред. акад. А.А. Баева и д-ра биол. наук К.Г. Скрыбина. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
7. Матвеева, Т.В. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т.В. Матвеева, О.А. Павлова, Д.И. Богомаз [и др.] // Экол. генетика. – 2011. – Т. IX. – С. 32-43.

8. Мельникова, М.Н. Тестирование микросателлитных праймеров на разных популяциях евразийских елей *Picea abies* (L.) Karst. и *Picea obovata* Ledeb. / М.Н. Мельникова [и др.] // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 5. – С. 660-665.
9. Омашева, М.Е. Молекулярные маркеры. Причины и последствия ошибок генотипирования / М.Е. Омашева, К.П. Аубакирова, Н.А. Рябушкина // Биотехнология. Теория и практика. – 2013. – № 4. – С. 20-28.
10. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.
11. Чесноков, Ю.В. Оценка меры информационного полиморфизма генетического разнообразия / Ю.В. Чесноков, А.М. Артемьева // Сельскохозяйственная биология. – 2015. – Т. 50, № 5. – С. 571-578.
12. Экарт, А.К. Применение различных типов генетических маркеров для оценки уровня внутривидовой дифференциации ели сибирской / А.К. Экарт, С.А. Семерикова, В.Л. Семериков, А.Н. Кравченко, О.С. Дымшакова, А.Я. Ларионова // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 84-91.
13. Auckland, L. Conifer Microsatellite Handbook / L. Auckland [et al.]. – Texas: A&M University, College Station, 2002. – 57 p.
14. Birol, I. Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data / I. Birol [et al.] // Bioinformatics. – 2013. – Vol. 29 (12). – P. 1492–1497.
15. 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.
16. Ganea, S.L. Multiplex Nuclear SSR Amplification in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) / S.L. Ganea, M.R. Garcia Gil // Bulletin UASVM Horticulture. – 2011. – Vol. 68 (1). – P. 47-53.
17. Hodgetts, R.B. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca* Moench) and related species / R.B. Hodgetts [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2001. – Vol. 101. – P. 1252-1258.
18. Krutovsky, K.V. The *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* genome projects / K.V. Krutovsky // The 2013 conifer genome sequencing summit in Björkliden, Lapland, Sweden, June 14–17, 2013. – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://www.upsc.se/about-upsc/other-information/events/4368-the-2013-conifer-genome-sequencing-summit.html>. – Загл. с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения: 28.01.2015.
19. Neale, D.B. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies / D.B. Neale [et al.] // Genome Biology. – 2014. – Vol. 15 (3). – P. 1-13.
20. Nystedt, B. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution / B. Nystedt [et al.] // Nature. – 2013. – Vol. 497, (30 May). – P. 579-584.
21. Pritchard, J.K. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data / J.K. Pritchard, M. Stephens, P. Donnelly // Genetics. – 2000. – Vol. 155. – P. 945-959.
22. 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.
23. The state of the world's forest genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2014. – 304 p.
24. The state of the world's animal genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2007. – 512 p.
25. United States, Patent Application, Publication. Pub. No.: US 2003/0049612 A1, Pub. Date: Mar. 13, 2003. Microsatellite dna markers and uses thereof / Inventors: Craig S. Echt, Rotorua (NZ); C. Dana Nelson, Bainbridge, GA (US). – Appl. No.: 09/232,785; Filed: Jan. 19, 1999; Int. Cl. C12Q 1/68; C07H 21/02; C07H 21/04; C12P 19/34. U.S. Cl. 435/6; 435/91.2; 536/23.1. 28 [1] p.

26. Węgrzyn, J.L. Unique features of the Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) megagenome revealed through sequence annotation / J.L. Węgrzyn [et al.] // *Genetics*. – 2014. – Vol. 196 (3). – P. 891-909.
27. Zimin, A. Sequencing and Assembly of the 22-Gb Loblolly Pine Genome / A. Zimin [et al.] // *Genetics*. – 2014. – Vol. 196. – P. 875-890.

#### REFERENCES

1. Bannikova A.A. Molekulyarnye markery i sovremennaya filogenetika mlekoopitayushchih [Molecular Markers and Modern Phylogenetics of Mammals]. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 2004, vol. 65, no. 4, pp. 278-306. (In Russian).
2. Belokon M.M., Belokon Y.S., Bannikova A.A., Politov D.V. *Molekulyarno-geneticheskie metody v zoologicheskoy praktike na Zvenigorodskoj biostancii MGU: Metodicheskoe posobie k letnej uchebnoj praktike studentov-biologov na Zvenigorodskoj biostancii im. S.N. Skadovskogo*, Moscow, FGBUN In-t obshch. genetiki im. N.I. Vavilova RAN, 2014, 68 p. (In Russian).
3. Kalko G.V. DNK-markery dlya ocenki geneticheskikh resursov eli i sosny [The DNA markers for exploring of genetic resources of spruce and pine]. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo hozyajstva*, 2015, no. 4, pp. 19-34. (In Russian).
4. Krutovsky K.V. Perspektivy ispol'zovaniya genomnyh issledovaniy v lesnom hozyajstve [Prospects for Genomic Research in Forestry]. *Sibirskij lesnoj zhurnal*, 2014, no. 4, pp. 11-15. (In Russian).
5. Krutovsky K.V., Oreshkova N.V., Putintseva Yu.A., Ibe A.A., Deych K.O., Shilkina E.A. Predvaritel'nye rezul'taty polnogenomnogo de novo sekvenirovaniya listvennicy sibirskoj (*Larix sibirica* Ledeb.) i sosny kedrovoy sibirskoj (*Pinus sibirica* du Tour) [Preliminary Results of De Novo Whole Genome Sequencing of the Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and the Siberian Stone Pine (*Pinus sibirica* Du Tour)]. *Sibirskij lesnoj zhurnal*, 2014, no. 4, pp. 79-83. (In Russian).
6. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoe klonirovanie*, per. s angl.; pod red. akad. A.A. Baeva i d-ra biol. nauk K.G. Skryabina. Moscow, Mir, 1984, 480 p. (In Russian).
7. Matveeva T.V., Pavlova O.A., Bogomaz D.I., Lutova L.A., Demkovich A.E. Molekulyarnye markery dlya vidoidentifikacii i filogenetiki rasteniy [Molecular markers for plant species identification and phylogenetics]. *Ecological genetics*, 2011, vol. IX, pp. 32-43. (In Russian).
8. Melnikova M.N., Petrov N.B., Lomov A.A., Porta N.La, and Politov D.V. Testirovanie mikrosatellitnyh prajmerov na raznyh populyაციyah evrazijskikh elej *Picea abies* (L.) Karst. i *Picea obovata* Ledeb. [Testing of Microsatellite Primers with Different Populations of Eurasian Spruces *Picea abies* (L.) Karst. and *Picea obovata* Ledeb.]. *Genetika*, 2012, vol. 48, no. 5, pp. 660-665. (In Russian).
9. Omasheva M.E., Aubakirova K.P., Ryabushkina N.A. Molekulyarnye markery. Prichiny i posledstviya oshibok genotipirovaniya. *Biotechnology. Theory and practice*, 2013, no. 4, pp. 20-28. (In Russian).
10. Padutov V.E., Baranov O.Yu., Voropayev E.V. *Metody molekulyarno-geneticheskogo analiza* [Methods of molecular-genetic analysis]. Minsk: Yunipol, 2007, 176 p. (In Russian).
11. Chesnokov Yu.V., Artemyeva A.M. Ocenka mery informacionnogo polimorfizma geneticheskogo raznoobraziya [Evaluation of the measure of polymorphism information of genetic diversity]. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya*. 2015, vol. 50, no. 5, pp. 571-578. (In Russian).
12. Ekart A.K., Semerikova S.A., Semerikov V.L., Kravchenko A.N., Dymshakova O.S., Larionova A.Ya. *Primenenie razlichnyh tipov geneticheskikh markerov dlya ocenki urovnya vnutrividovoj differenciacii eli*

- sibirskoj [The Use of Genetic Markers of Various Types for Evaluation of Intraspecific Differentiation Level of the Siberian Spruce]. *Sibirskij lesnoj zhurnal*, 2014, no. 4, pp. 84-91. (In Russian).
13. Auckland L., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C. *Conifer Microsatellite Handbook*. Texas, A&M University, College Station, 2002, 57 p.
  14. Birol I., Raymond A., Jackman S.D., Pleasance S., Coope R., Taylor G.A., Yuen M.M., Keeling C.I., Brand D., Vandervalk B.P., Kirk H., Pandoh P., Moore R.A., Zhao Y., Mungall A.J., Jaquish B., Yanchuk A., Ritland C., Boyle B., Bousquet J., Ritland K., Mackay J., Bohlmann J., Jones S.J. Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. *Bioinformatics*. 2013, vol. 29, no. 12, pp. 1492-1497.
  15. 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.biomedcentral.com/1756-0500/4/401>.
  16. Ganea S.L., Garcia Gil M.R. Multiplex Nuclear SSR Amplification in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.). *Bulletin UASVM Horticulture*, 2011, vol. 68, no. 1, pp. 47-53.
  17. Hodgetts R.B.; Aleksyuk M.A., Brown A., Clarke C., Macdonald E., Nadeem S., Khasa D. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca* Moench) and related species. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, vol. 101, pp. 1252-1258.
  18. Krutovsky K.V. The *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* genome projects. The 2013 conifer genome sequencing summit in Björkliden, Lapland, Sweden, June 14–17, 2013. <http://www.upsc.se/about-upsc/other-information/events/4368-the-2013-conifer-genome-sequencing-summit.html>.
  19. Neale D.B., Wegrzyn J.L., Stevens K.A., Zimin A.V., Puiu D., Crepeau M.W., Cardeno C., Koriabine M., Holtz-Morris A.E., Liechty J.D., Martínez-García P.J., Vasquez-Gross H.A., Lin B.Y., Zieve J.J., Dougherty W.M., Fuentes-Soriano S., Wu L.S., Gilbert D., Marçais G., Roberts M., Holt C., Yandell M., Davis J.M., Smith K.E., Dean J.F., Lorenz W.W., Whetten R.W., Sederoff R., Wheeler N., McGuire P.E., Main D., Loopstra C.A., Mockaitis K., de Jong P.J., Yorke J.A., Salzberg S.L., Langley C.H. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly strategies. *Genome Biology*, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 1-13.
  20. Nystedt B., Street N.R., Wetterbom A., Zuccolo A., Lin Y.C., Scofield D.G., Vezzi F., Delhomme N., Giacomello S., Alexeyenko A., Vicedomini R., Sahlin K., Sherwood E., Elfstrand M., Gramzow L., Holmberg K., Hällman J., Keech O., Klasson L., Koriabine M., Kucukoglu M., Käller M., Luthman J., Lysholm F., Niittylä T., Olson A., Rilakovic N., Ritland C., Rosselló J.A., Sena J., Svensson T., Talavera-López C., Theißen G., Tuominen H., Vanneste K., Wu Z.Q., Zhang B., Zerbe P., Arvestad L., Bhalerao R., Bohlmann J., Bousquet J., Garcia Gil R., Hvidsten T.R., de Jong P., MacKay J., Morgante M., Ritland K., Sundberg B., Thompson S.L., Van de Peer Y., Andersson B., Nilsson O., Ingvarsson P.K., Lundeberg J., Jansson S. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution. *Nature*, 2013, vol. 497, pp. 579-584.
  21. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 2000, vol. 155, pp. 945-959.
  22. 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.
  23. The state of the world's forest genetic resources. Rome, FAO, 2014, 304 p.
  24. The state of the world's animal genetic resources. Rome, FAO, 2007, 512 p.
  25. United States, Patent Application, Publication. Pub. No.: US 2003/0049612 A1, Pub. Date: Mar. 13, 2003. Microsatellite dna markers and uses thereof / Inventors: Craig S.Echt, Rotorua (NZ);

- C. Dana Nelson, Bainbridge, GA (US). – Appl. No.: 09/232,785 ; Filed: Jan. 19, 1999; Int. Cl. C12Q 1/68; C07H 21/02; C07H 21/04; C12P 19/34. U.S. Cl. 435/6; 435/91.2; 536/23.1. 28 [1] p.
26. Węgrzyn J.L., Liechty J.D., Stevens K.A., Wu L.S., Loopstra C.A. Vasquez-Gross H.A., Dougherty W.M., Lin B.Y., Zieve J.J., Martínez-García P.J., Holt C., Yandell M., Zimin A.V., Yorke J.A., Crepeau M.W., Puiu D., Salzberg S.L., Dejong P.J., Mockaitis K., Main D., Langley C.H., Neale D.B. Unique features of the Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) megagenome revealed through sequence annotation. *Genetics*, 2014, vol. 196, no. 3, pp. 891-909.
27. Zimin A., Stevens K.A., Crepeau M.W., Holtz-Morris A., Koriabine M., Marçais G., Puiu D., Roberts M., Węgrzyn J.L., de Jong P.J., Neale D.B., Salzberg S.L., Yorke J.A., Langley C.H. Sequencing and Assembly of the 22-Gb Loblolly Pine Genome. *Genetics*, 2014, vol. 196, pp. 875-890.

Статья поступила в редакцию 1.11.2016