



DOI 10.21178/2079-6080.2017.1.23  
УДК 630.165.3+630.174.754

## Тестирование ядерных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной

© Г.В. Калько

---

### **The testing of nuclear microsatellite markers of Scots pine**

**G.V. Kalko** (Saint Petersburg Forestry Research Institute)

The aim of the study is the selection of polymorphic nuclear microsatellite loci available for population structure analysis of Scots Pine. We tested 37 microsatellite primer pairs on 15 *Pinus sylvestris* L. individual plants from two geographically distinct populations of North-West Russia and compared the Polymorphic Information Content (PIC) of chosen markers.

Twenty five of the tested markers belonged to EST-SSR type; they could be used to assess the functional diversity of natural populations. The exercising of such markers is particularly important to evaluate the status of genetic resources.

Twenty four of the thirty seven tested primers showed the stable amplification. Twenty three loci were polymorphic. Features of EST-SSR markers of pine were compared with the characteristics of polymorphism of eight promising n-SRR markers proposed by teams of A. Auckland, D. Chagne and N. Soranzo and tested by S.L. Ganea и M.R. Garcia Gil on Roumanian *Pinus sylvestris* L. plants. Compare the Polymorphic Information Content (PIC) of tested primers displayed that the most polymorphic were the loci SPAC 12.5 and lw\_isotig21953, having PIC 0,891 and 0,855, respectively. PIC of highly polymorphic EST-SSR markers lw\_isotig27940, lw\_isotig20215, lw\_isotig04306, lw\_isotig07383, lw\_isotig00080, lw\_isotig26230, lw\_isotig01420, lw\_isotig05123, lw\_isotig10603, lw\_isotig04204, lw\_isotig04195 varied from 0,506 to 0,748. Nuclear SSR loci PtTx3107, ctg1376, ctg4363 had PIC 0,749-0,770.

**Keywords:** DNA markers, microsatellites, Scots pine, Polymorphic Information Content (PIC), genetic diversity, genetic resources

### **Тестирование ядерных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной**

**Г.В. Калько**

Целью настоящей работы был отбор локусов сосны обыкновенной, пригодных для анализа структуры популяций этого вида. Тестирование тридцати семи ядерных микросателлитных маркеров, предложенных ранее для сосны обыкновенной, проводили на пятнадцати особях *Pinus sylvestris* L., из двух географически отличающихся популяций Северо-Запада России. Задачами исследования были: во-первых, выявление стабильно амплифицируемых полиморфных локусов; во-вторых, сравнение меры информационного полиморфизма (индекса полиморфности PIC) отобранных маркеров.

Двадцать пять тестированных ядерных микросателлитных праймеров, разработанных Pan Fang с соавторами для *Pinus sylvestris* var. *mongolica*, относились к типу EST-SSR. Они могут быть использованы для оценки функционального разнообразия естественных популяций, что особенно важно при определении состояния генетических ресурсов.

Двадцать четыре микросателлитных локуса из тридцати семи проанализированных показали стабильную амплификацию. Двадцать три локуса были полиморфными. Характеристики EST-SSR локусов были сравнены с характеристиками полиморфности восьми перспективных n-SRR маркеров, предложенных ранее группами исследователей, возглавляемыми A. Auckland; D. Chagne; N. Soranzo и апробированных S.L. Ganea и M.R. Garcia Gil на растениях сосны обыкновенной из Румынии. Анализ величины меры информационного полиморфизма PIC показывает, что выявлено шестнадцать высокополиморфных локусов, в том числе двенадцать из области транскрибируемой ДНК. Наиболее полиморфными были локусы SPAC 12.5 и lw\_isotig21953 (PIC – 0,891 и 0,855, соответственно). Мера информационного полиморфизма PIC EST-SSR локусов lw\_isotig27940, lw\_isotig20215, lw\_isotig04306, lw\_isotig07383, lw\_isotig00080, lw\_isotig26230, lw\_isotig01420, lw\_isotig05123, lw\_isotig10603, lw\_isotig04204, lw\_isotig04195 варьировала от 0,506 до 0,748. PIC ядерных микросателлитов PtTx3107, ctg1376, ctg4363 находился в пределах от 0,749 до 0,770.

**Ключевые слова:** ДНК-маркеры, микросателлиты, сосна обыкновенная, мера информационного полиморфизма PIC, генетическое разнообразие

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

### Введение

В настоящее время при анализе биологического разнообразия и дифференциации растений, животных и микроорганизмов в исследованиях используется большое количество молекулярных маркеров – их более двадцати типов [1]. В докладах о состоянии мировых лесных генетических ресурсов и животных приводится заключение, что достаточную информацию об изменчивости в популяциях может дать анализ 15-17 микросателлитов или использование большого числа однонуклеотидных полиморфизмов [26, 27].

На основе обзора литературных данных нами был сделан вывод о том, что на первых этапах для изучения генетических ресурсов хвойных пород следует использовать ядерные маркеры, прежде всего микросателлитные [5]. 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 наиболее высокий уровень гетерозиготности и являются самым мощным на сегодняшний день инструментом изучения изменчивости живых существ [26, 27]. Несмотря на то, что ряд зарубежных и российских авторов применяли ядерные микросателлитные маркеры для оценки биоразнообразия и дифференциации популяций разных видов сосны, паспортизации лесосеменных плантаций и испытательных культур [3, 4, 12, 17; 18], создание линейки ядерных микросателлитов для проведения мониторинга генетических ресурсов сосны обыкновенной все еще остается актуальным.

Цель настоящей работы – отбор высоко полиморфных маркеров, пригодных для анализа структуры популяций сосны обыкновенной.

Для осуществления этой задачи были апробированы 37 ядерных микросателлитных локусов (25 EST-SSR и 12 n-SSR), разработанных ранее или протестированных на сосне обыкновенной [19, 23]. Исследования выполнены на образцах ДНК сосны обыкновенной из карельской и тихвинской популяций. Были оценены меры информационного полиморфизма PIC стабильно амплифицирующихся микросателлитных локусов и проведено сравнение дискриминационной способности ESR-SSR и зарекомендовавших себя полиморфных n-SSR маркеров.

### Материалы и методы

Образцы хвои из естественных насаждений сосны обыкновенной, собранные в 2015 г. в Республике Карелия и г. Тихвине Ленинградской области, высушенные в силикагеле, были использованы для выделения ДНК традиционным методом с применением цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ-метод) [10].

Тестирование микросателлитных локусов ядерной ДНК сосны осуществляли путем проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Процедуры амплификации первоначально выполняли в соответствии с условиями, предложенными авторами, ранее работавшими с конкретными праймерами [19, 23]. 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, геномной ДНК – 50 ng.

Свойства 37 апробируемых микросателлитных локусов, описанные в литературных источниках, представлены в таблице 1.

Таблица 1  
Характеристика микросателлитных локусов сосны обыкновенной 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
lw_isotig00542	(T) <sub>40</sub>	257	55	EST	2	[23]
lw_isotig04204	(CGGCT) <sub>5</sub>	230	55	EST	2	[23]
lw_isotig04600	(CAG) <sub>10</sub>	305	55	EST	3	[23]

lw_isotig06440	(AGGTTG) <sub>5</sub> (AGGCTG) <sub>6</sub>	298	55	EST	3	[23]
lw_isotig07383	(GAT) <sub>8</sub>	191	55	EST	3	[23]
lw_isotig10603	(CAG) <sub>7</sub>	196	55	EST	2	[23]
lw_isotig17679	(TTAA) <sub>5</sub>	277	55	EST	3	[23]
lw_isotig21953	(ATGGG) <sub>7</sub>	208	55	EST	7	[23]
lw_isotig26230	(TA) <sub>10</sub>	260	55	EST	3	[23]
lw_isotig27940	(TGGA) <sub>5</sub>	231	55	EST	3	[23]
lw_isotig00080	(CCG) <sub>6</sub>	177	55	EST	3	[23]
lw_isotig00081	(CCG) <sub>6</sub>	290	58	EST	3	[23]
lw_isotig01420	(CTG) <sub>5</sub>	174	50	EST	3	[23]
lw_isotig02138	(AG) <sub>6</sub>	124	42	EST	2	[23]
lw_isotig02347	(TG) <sub>7</sub>	198	50	EST	2	[23]
lw_isotig03088	(CA) <sub>6</sub>	235	45	EST	2	[23]
lw_isotig04931	(AC) <sub>6</sub>	132	40	EST	4	[23]
lw_isotig02842	(AGA) <sub>5</sub>	229	55	EST	2	[23]
lw_isotig04195	(GAG) <sub>5</sub>	189	55	EST	4	[23]
lw_isotig04306	(TCC) <sub>7</sub>	196	55	EST	3	[23]
lw_isotig05123	(GAG) <sub>6</sub>	166	55	EST	2	[23]
lw_isotig06215	(CAA) <sub>5</sub>	275	55	EST	2	[23]
lw_isotig11166	(TA) <sub>7</sub>	137	55	EST	5	[23]
lw_isotig12667	(CA) <sub>6</sub>	199	55	EST	2	[23]
lw_isotig20215	(TA) <sub>7</sub>	186	55	EST	8	[23]
PtTx3013	(GTT) <sub>10</sub>	100-130	52	ЯМ	Нет данных <sup>4)</sup>	[13, 19]
PtTx2093	(GAA) (CAA) <sub>9</sub> TAA(CAA) <sub>5</sub>	200-227	52	ЯМ	То же	[13, 19]
PtTx3016	(CAA) <sub>13</sub>	280-310	52	ЯМ	-«-	[13, 19]
PtTx3020	A <sub>16</sub> (CAA) <sub>9</sub>	200-230	52	ЯМ	-«-	[13, 19]
PtTx4011	(GT) <sub>20</sub>	250-277	52	ЯМ	-«-	[13, 19]
PtTx3049	(TG) <sub>16</sub>	300-327	52	ЯМ	-«-	[13, 19]
ctg4363	(AT) <sub>20</sub>	80-105	52	ЯМ	-«-	[16, 19]
SPAC 12.5	(GT) <sub>20</sub> (GA) <sub>10</sub>	115-210	52	ЯМ	-«-	[19, 25]
PtTx3025	(CAA) <sub>10</sub>	250-271	52	ЯМ	-«-	[13, 19]
ctg1376	(AT) <sub>10</sub>	80-130	52	ЯМ	-«-	[13, 19]
PtTx3107	(CAT) <sub>14</sub>	150-177	52	ЯМ	-«-	[13, 19]
PtTx4001	(GT) <sub>15</sub>	160-187	52	ЯМ	-«-	[13, 19]

Примечания. 1) мотив – повторяющаяся последовательность нуклеотидов; 2) п.о. – пары оснований; 3) T<sub>a</sub> – температура отжига праймера; 4) нет данных в доступной литературе.

Полимеразную реакцию проводили по программе: 95 °С – 10 мин, (95 °С – 30 с, T<sub>a</sub> – 30 с, 72 °С – 30 с) Ч 35, 72 °С – 105 с, 72 °С – 10 мин. Экспериментально уточненная температура отжига (T<sub>a</sub>) каждого праймера указана в таблице 2.

Оптимизированные температуры отжига праймеров уточняли путем выполнения ПЦР с градиентом температур отжига от 50 до 60 °С. В зависимости от полученных результатов при необходимости меняли концентрации компонентов ПЦР-коктейля.

Стабильность амплификации тестируемых локусов оценивали с помощью горизонтального электрофореза в 1,5% агарозном геле. Использовали камеру для горизонтального электрофореза Wide Mini-Sub Cell GT, производства Bio-Rad (США) с размером подложки 150×100 мм или камеру SE-2 (Хеликон Россия) с размером геля 120×170 мм.

Окрашивание гелей проводили с помощью бромистого этидия, визуализировали продукты амплификации в проходящем УФ-свете при длине волны 310 нм. Для определения размеров фрагментов амплифицированной ДНК в агарозном геле использовали маркеры длин ДНК 100+bp DNA Ladder (Евроген, Россия), ДНК 50+bp DNA Ladder (Евроген, Россия), ДНК-маркер GeneRuler™ для экспресс-анализа (Fermentas, Латвия).

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

Электрофорез осуществляли в соответствии с методикой [2] при напряжении электрического поля 300 В и силе тока не более 110 мА на камеру (на два геля). Для оценки относительного размера продуктов амплификации применяли размерные маркеры Thermo Scientific O'RangeRuler 20 bp DNA Ladder и 50+bp DNA Ladder (Евроген, Россия). В дальнейших исследованиях планируется использовать флуоресцентно меченые праймеры и фрагментный анализ на капиллярном секвенаторе, 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, где:  $p_i$  – частота i-го аллеля [11, 15].

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

### Результаты и обсуждение

Генетическими маркерами считаются аллели анализируемых микросателлитных локусов, и их число характеризует полиморфность самих локусов. Справочник по микросателлитам хвойных выпущен в начале 2000-х годов, технология была защищена патентом США [13, 28].

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

Предпочтительными свойствами микросателлитов, по сравнению с другими маркерами, являются кодоминантный характер наследования, высокая вариабельность и возможность автоматизации их анализа. В связи с тем, что микросателлитных маркеров в геномах хвойных растений очень много и они обладают отличающимися свойствами, отбор и тестирование набора микросателлитов важны: маркеры могут быть взяты разные в зависимости от целей дальнейших исследований. Для последующей оценки состояния генетических ресурсов в популяциях сосны обыкновенной мы брали наиболее полиморфные маркеры, а также маркеры, дифференцирующие разные популяции.

В течение нескольких последних лет велись работы по полногеномному секвенированию ряда видов хозяйственно ценных хвойных растений. Результаты этих исследований облегчают разработку 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) [6, 7, 14, 20, 21, 22, 29, 30].

Для анализа смешения микросателлитных данных из разных популяций предлагаются методы многомерного анализа или методы кластеризации на основе подходов Байеса [24].

Мы считаем, что EST-SSR маркеры незаменимы для оценки внутривидового разнообразия сосны обыкновенной, поскольку полиморфизм выявляется в транскрибируемой области ядерной ДНК. Приложения исполь-

зования данного типа маркеров – функциональный геном, ассоциативное картирование, анализ генетического разнообразия, анализ количественных признаков и др. В случаях маркирования генов, ответственных за фенотипические признаки, эти маркеры полезны для использования в селекции [9]. Поэтому выбрано большое число EST-SSR-маркеров сосны обыкновенной для первичного тестирования их полиморфности.

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

Таблица 2  
Результаты апробации ядерных микросателлитных праймеров сосны обыкновенной

Микросателлитный локус	Мотив <sup>1)</sup>	Размер фрагмента, п.о. <sup>2)</sup>		T <sub>a</sub> , °C <sup>3)</sup>		Количество аллелей	
		Эксперимент	Литература	Эксперимент	Литература	Эксперимент	Литература
lw_isotig04204	(CGGCT) <sub>5</sub>	230-250	230	60	55	3	2
lw_isotig04600	(CAG) <sub>10</sub>	296-305	305	60	55	3	3
lw_isotig07383	(GAT) <sub>8</sub>	191-209	191	60	55	4	3
lw_isotig10603	(CAG) <sub>7</sub>	190-199	196	60	55	3	2
lw_isotig17679	(TTAA) <sub>5</sub>	280-302	277	60	55	4	3
lw_isotig21953	(ATGGG) <sub>7</sub>	190-280	208	60	55	9	7
lw_isotig26230	(TA) <sub>10</sub>	254-258	260	60	55	3	3
lw_isotig27940	(TGGA) <sub>5</sub>	231-259	231	60	55	5	3
lw_isotig00080	(CCG) <sub>6</sub>	177-183	177	60	55	3	3
lw_isotig00081	(CCG) <sub>6</sub>	293-296	290	60	58	2	3
lw_isotig01420	(CTG) <sub>5</sub>	177-189	174	60	50	4	3
lw_isotig02842	(AGA) <sub>5</sub>	229-232	229	60	55	2	2
lw_isotig04195	(GAG) <sub>5</sub>	189-195	189	60	55	3	4
lw_isotig04306	(TCC) <sub>7</sub>	181-193	196	56	55	4	3
lw_isotig05123	(GAG) <sub>6</sub>	166-172	166	60	55	3	2
lw_isotig20215	(TA) <sub>7</sub>	186-200	186	60	55	5	8
PtTx3013	(GTT) <sub>10</sub>	119-125	100-130	60	52	2	Нет данных <sup>4)</sup>
PtTx3016	(CAA) <sub>13</sub>	260-263	280-310	58	52	2	-«-

PtTx3020	A <sub>16</sub> (CAA) <sub>9</sub>	180-186	200-230	56	52	2	-«-
PtTx3049	(TG) <sub>16</sub>	300	300-327	54	52	1	-«-
ctg4363	(AT) <sub>20</sub>	94-116	80-105	58	52	7	-«-
SPAC 12.5	(GT) <sub>20</sub> (GA) <sub>10</sub>	130-170	115-210	60	52	12	-«-
ctg1376	(AT) <sub>10</sub>	90-126	80-130	56	52	5	-«-
PtTx3107	(CAT) <sub>14</sub>	150-171	150-177	56	52	6	-«-

Примечания. 1) мотив – повторяющаяся последовательность нуклеотидов; 2) п.о. – пары оснований; 3) T<sub>a</sub> (°C) – температура отжига праймера; 4) нет данных в доступной литературе.

Таблица 3

## Полиморфизм микросателлитных локусов сосны обыкновенной

Локус	Повторяющийся мотив	Число аллелей	Размер аллелей	PIС	Число редких аллелей
lw_isotig04204	(CGGCT) <sub>5</sub>	3	230-250	0,543	0
lw_isotig04600	(CAG) <sub>10</sub>	3	296-305	0,184	1
lw_isotig07383	(GAT) <sub>8</sub>	4	191-209	0,700	0
lw_isotig10603	(CAG) <sub>7</sub>	3	190-199	0,556	1
lw_isotig17679	(TTAA) <sub>5</sub>	4	280-302	0,401	2
lw_isotig21953	(ATGGG) <sub>7</sub>	9	190-280	0,855	1
lw_isotig26230	(TA) <sub>10</sub>	3	254-258	0,620	0
lw_isotig27940	(TGGA) <sub>5</sub>	5	231-259	0,748	1
lw_isotig00080	(CCG) <sub>6</sub>	3	177-183	0,624	0
lw_isotig00081	(CCG) <sub>6</sub>	2	293-296	0,133	1
lw_isotig01420	(CTG) <sub>5</sub>	4	177-189	0,575	1
lw_isotig02842	(AGA) <sub>5</sub>	2	229-232	0,391	0
lw_isotig04195	(GAG) <sub>5</sub>	3	189-195	0,506	0
lw_isotig04306	(TCC) <sub>7</sub>	4	181-193	0,704	0
lw_isotig05123	(GAG) <sub>6</sub>	3	166-172	0,560	1
lw_isotig20215	(TA) <sub>7</sub>	5	186-200	0,708	2
PtTx3013	(GTT) <sub>10</sub>	2	119-125	0,420	0
PtTx3016	(CAA) <sub>13</sub>	2	260-263	0,282	0
PtTx3020	A <sub>16</sub> (CAA) <sub>9</sub>	2	180-186	0,231	0
ctg4363	(AT) <sub>20</sub>	7	94-116	0,749	2
SPAC 12.5	(GT) <sub>20</sub> (GA) <sub>10</sub>	12	130-170	0,891	5
ctg1376	(AT) <sub>10</sub>	5	90-126	0,769	1
PtTx3107	(CAT) <sub>14</sub>	6	150-171	0,770	2

Примечание. PIС – мера информационного полиморфизма



Размеры продуктов амплификации во всех исследованных локусах близки к приведенным в литературных источниках, за исключением локусов PtTx3016 и PtTx3020. По опубликованным данным, несовпадение фактических и ожидаемых длин амплифицируемых фрагментов ДНК случается часто. Приводятся сведения, что из 300 микросателлитов, разработанных для видов сосны, продукты только 31 праймера имели ожидаемый размер [19].

Наблюдается некоторая разница в количестве аллелей в большинстве локусов в наших экспериментах и в данных авторов, предложивших или тестировавших праймеры ранее (табл. 2). Это можно объяснить различиями в происхождении образцов растений. Тем не менее, у локусов lw\_isotig04600, lw\_isotig26230, lw\_isotig00080 и lw\_isotig02842 в экспериментах было выявлено такое же число аллелей, как и в цитируемых источниках [23].

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

Результаты анализа полиморфизма ДНК в стабильно амплифицирующихся локусах микросателлитов сосны обыкновенной на протестированных образцах представлены в таблице 3. Был вычислен индекс PIC (мера информационного полиморфизма), который выявляет дискриминационную способность маркера и фактически зависит от числа известных (устанавливаемых) аллелей и распределения их частот и тем самым эквивалентен генному разнообразию [11].

Высокоэффективными по выявлению полиморфизма ДНК сосны обыкновенной оказались ядерные микросателлитные маркеры SPAC 12.5, PtTx3107, ctg1376 и ctg4363, позволяющие выявить от 5 до 12 аллелей в локусе. Эти маркеры обладали высоким уровнем полиморфизма (PIC – от 0,749 до 0,891). Из тестированных микросателлитных праймеров в транскрибируемой части ядерной ДНК (EST-SSR) высокополиморфными были двенадцать маркеров: lw\_isotig21953 (PIC – 0,855), lw\_isotig27940 (PIC – 0,748),

lw\_isotig20215 (PIC – 0,708), lw\_isotig04306 (PIC – 0,704), lw\_isotig07383 (PIC – 0,700), lw\_isotig00080 (PIC – 0,624), lw\_isotig26230 (PIC – 0,620), lw\_isotig01420 (PIC – 0,575), lw\_isotig05123 (PIC – 0,560), lw\_isotig10603 (PIC – 0,556), lw\_isotig04204 (PIC – 0,543), lw\_isotig04195 (PIC – 0,506). В данных EST-SSR-локусах было выявлено от 3 до 9 аллелей.

У остальных EST-SSR-маркеров коэффициент PIC ниже и варьирует от 0,184 до 0,420. Тестируемые маркеры в различной степени выявляли редкие аллели. Высокополиморфные локусы lw\_isotig04204, lw\_isotig07383, lw\_isotig26230, lw\_isotig00080, lw\_isotig04195, lw\_isotig04306 не обнаружили редких аллелей в исследованных образцах ДНК сосны. В локусах lw\_isotig10603, lw\_isotig21953, lw\_isotig27940, lw\_isotig05123, lw\_isotig20215, lw\_isotig01420, ctg4363, SPAC 12.5, ctg1376, PtTx3107, напротив, были найдены уникальные аллели, наибольшее их число отмечено в локусах SPAC 12.5 (42% из выявленных аллелей), PtTx3107 (33%), ctg4363 (29%), lw\_isotig20215 (40%).

### Заключение

Принимая во внимание соответствие длин амплифицируемых фрагментов ожидаемым, четкость разделения фрагментов ДНК, количество аллелей в локусе и значение меры информационного полиморфизма PIC, мы будем продолжать исследования с праймерами lw\_isotig04204, lw\_isotig07383, lw\_isotig26230, lw\_isotig00080, lw\_isotig04195, lw\_isotig04306, lw\_isotig10603, lw\_isotig21953, lw\_isotig27940, lw\_isotig05123, lw\_isotig20215, lw\_isotig01420, ctg4363, SPAC 12.5, ctg1376 и PtTx3107. Планируются эксперименты по оценке полиморфизма ДНК в естественных древостоях сосны обыкновенной и вычисление популяционных характеристик.

Для получения более точного результата при изучении изменчивости сосны обыкновенной в будущем желательно использовать несколько независимо эволюционирующих маркеров разных типов, например, ядерных и хлоропластных или ядерных и митохондриальных, микросателлитов или маркеров других видов, что позволит не только



выявить генетическое разнообразие хвойных, а также более корректно оценить дифференциацию их популяций, что повысит разрешающую способность ДНК-анализа.

### 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 общ. генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 2014. – 68 с.
3. Белоконь, М.М. Разработка ядерных микросателлитных маркеров сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) по данным полногеномного секвенирования / М.М. Белоконь [и др.] // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: Материалы 4-го Международного совещания, 24-29 августа 2015 г., Барнаул / Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН; Ред.: В.В. Тараканов, К.В. Крутовский, С.Р. Кузьмин, И.В. Тихонова. – Красноярск: Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, 2015. – С. 14-16. – ISBN 978-5-906740-08-3.
4. Белоконь, Ю.С. Применение ДНК-маркеров для паспортизации ЛСП и сертификации семян хвойных пород / Ю.С. Белоконь [и др.] // Лесохозяйственная информация. – 2008. – № 3-4. – С. 35-38. – ISSN 2304-3083.
5. 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.
6. Крутовский, К.В. Перспективы использования геномных исследований в лесном хозяйстве / К.В. Крутовский // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 11-15.
7. 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.
8. 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.
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. Шейкина, О.В. Изменчивость микросателлитных локусов в смежных болотных и суходольных популяциях сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Республике Марий Эл / О.В. Шейкина, Ю.Ф. Гладков, О.В. Унженкина // Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири: Материалы 4-го Международного совещания, 24-29 августа 2015 г., Барнаул / Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН; Ред.: В.В. Тараканов, К.В. Крутовский, С.Р. Кузьмин, И.В. Тихонова. – Красноярск: Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, 2015. – С. 189. – ISBN 978-5-906740-08-3.
13. Auckland, L., Conifer Microsatellite Handbook / L. Auckland, T. Bui, Y. Zhou, M. Shepherd, C. Williams – 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, A. Raymond, S.D. Jackman, S. Pleasance, R. Coope, G.A. Taylor, M.M. Yuen, C.I. Keeling, D. Brand, B.P. Vandervalk, H. Kirk, P. Pandoh, R.A. Moore, Y. Zhao, A.J. Mungall,

- M.M.B. Jaquish, A. Yanchuk, C. Ritland, B. Boyle, J. Bousquet, K. Ritland, J. Mackay, J. Bohlmann, S.J.M. Jones. // *Bioinformatics*. – 2013. – Vol. 29 (12). – P. 1492-1497.
15. Botstein, D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism / D. Botstein, R.L. White, M.H. Skalnick, R.W. Davies // *Am. J. Hum. Genet.* – 1980. – Vol. 32, pp. 314-331.
  16. Chagne, D. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines / D. Chagne, P. Chaumeil, A. Ramboer, C. Collada, A. Guevara, M.T. Cervera, G.G. Vendramin, V. Garcia, J.M. Frigero, C. Echt, T Richardson, C. Plomion // *Theor. Appl. Genet.* – 2004. – Vol. 109. – P. 1204-1214.
  17. De-Lucas, A.I. Admixture, one-source colonization or long-term persistence of maritime pine in the Castilian Plateau? Insights from nuclear microsatellite markers / A.I. De-Lucas [et al.] // *Investigaciyn Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*. – 2009. – Vol. 18 (1). – P. 3-12.
  18. Dzialuk, A. Examination of chloroplast and nuclear microsatellite DNA sequence for individual identification of coniferous trees / A. Dzialuk, J. Burczyk // *Problems of Forensic Sciences*. – 2005. – Vol. LXIV. – P. 395-400. – ISSN 1230-7483.
  19. 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.
  20. Krutovsky, K.V. The *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* genome projects / K.V. Krutovsky // The 2013 conifer genome sequencing summit in Bjurkliden, 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.
  21. 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.
  22. Nystedt, B. The Norway spruce genome sequence and conifer genome evolution / B. Nystedt [et al.] // *Nature*. – 2013. – Vol. 497, (30 May). – P. 579-584.
  23. Pan, Fang. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*) / Pan Fang [et al.] // *Applications in Plant Sciences*. – 2014. – Vol. 2 (1). – Электрон. дан. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1300057>. – Загл. с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения: 28.04.2015.
  24. 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.
  25. Soranzo, N. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. / N. Soranzo, J. Provan, W. Powell // *Molecular Ecology*. – 1998. – Vol. 7 (9). – P. 1260-1261.
  26. The state of the world's forest genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2014. – 304 p.
  27. The state of the world's animal genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2007. – 512 p.
  28. 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.
  29. Wegrzyn, J.L. Unique features of the Loblolly Pine (*Pinus taeda* L.) megagenome revealed through sequence annotation / J.L. Wegrzyn [et al.] // *Genetics*. – 2014. – Vol. 196 (3). – P. 891-909.
  30. 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 mlekopitayushchikh. *Zhurnal obshchey biologii*, 2004, vol. 65, no. 4, pp. 278-306. (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. Moscow, FGBUN In-t obshch. genetiki im. N.I. Vavilova RAN, 2014, 68 p. (In Russian).
3. Belokon' M.M., Polyakova T.A., SHatokhina A.V., Mudrik E.A., Belokon' U.S., Putintseva U.A.,

- Oreshkova N.V., Politov D.V., Krutovskij K.V. Razrabotka yadernykh mikrosatellitnykh markerov sosny kedrovoy sibirskoy (*Pinus sibirica* Du Tour) po dannym polnogenomnogo sekvenirovaniya. Sokhraneniye lesnykh geneticheskikh resursov Sibiri. *Materialy 4-go Mezhdunarodnogo soveshchaniya*, 24-29 avgusta 2015 g., Barnaul / Institut lesa im. V.N. Sukacheva SO RAN; Red.: V.V. Tarakanov, K.V. Krutovsky, S.R. Kuzmin, I.V. Tikhonova. Krasnoyarsk, Institut lesa im. V.N. Sukacheva SO RAN, 2015, pp. 14-16. (In Russian).
4. Belokon' U.S., Gordeeva N.V., Gordon N.U., Belokon' M.M., Politov D.V. Primeneniye DNK-markero dlya pasportizatsii LSP i sertifikatsii semyan khvoynykh porod. *Lesokhozyaystvennaya informatsiya*, 2008, no. 3-4, pp. 35-38. (In Russian).
  5. Kalko G.V. DNK-markery dlya otsenki geneticheskikh resursov eli i sosny. *Trudy Sankt Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyaystva*, 2015, no. 4, pp. 19-34. (In Russian).
  6. Krutovsky K.V. Perspektivy ispolzovaniya genomnykh issledovaniy v lesnom khozyaystve. *Sibirskiy lesnoy zhurnal*, 2014, no. 4, pp. 11-15. (In Russian).
  7. Krutovsky K.V., Oreskova N.V., Putinceva U.A., Ibe A.A., Dejch K.O., Shilkina E.A. Predvaritelnye rezultaty polnogenomnogo de novo sekvenirovaniya listv ennitsy sibirskoy (*Larix sibirica* Ledeb.) i sosny kedrovoy sibirskoy (*Pinus sibirica* Du Tour). *Sibirskiy lesnoy zhurnal*, 2014, no. 4, pp. 79-83. (In Russian).
  8. Maniatis T., Frich E., Sembruk Dzh. Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoye klonirovaniye. – Moskva, 1984, 480 p. (In Russian).
  9. Omasheva M.E., Aubakirova K.P., Ryabushkina N.A. Molekulyarnye markery. Prichiny i posledstviya oshibok genotipirovaniya. *Biotekhnologiya. Teoriya i praktika*, 2013, no. 4, pp. 20-28. (In Russian).
  10. Padutov V.E., Baranov O.U., Voropayev E.V. Metody molekulyarno-geneticheskogo analiza. Minsk, 2007, 176 p. (In Russian).
  11. Chesnokov U.V., Artemyeva A.M. Otsenka mery informatsionnogo polimorfizma geneticheskogo raznoobraziya. *Selskokhozyaystvennaya biologiya*, 2015, vol. 50, no. 5, pp. 571-578. (In Russian).
  12. Sheykina O.V., Gladkov U.F., Unzhenina O.V. Izmenchivost mikrosatellitnykh lokusov v smezhnykh bolotnykh i sukhodolnykh populyatsiyakh sosny obyknovennoy (*Pinus sylvestris* L.) v Respublike Mary El. *Sokhraneniye lesnykh geneticheskikh resursov Sibiri. Materialy 4-go Mezhdunarodnogo soveshchaniya*, 24-29 avgusta 2015 g., Barnaul, Institut lesa im. V.N. Sukacheva SO RAN, Red.: V.V. Tarakanov, K.V. Krutovsky, S.R. Kuzmin, I.V. Tikhonova. Krasnoyarsk, 2015, p. 189. (In Russian).
  13. Auckland L., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C. Conifer Microsatellite Handbook, Texas, 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 M.M.B., Yanchuk A., Ritland C., Boyle B., Bousquet J., Ritland K., Mackay J., Bohlmann J., Jones S.J.M. Assembling the 20 Gb white spruce (*Picea glauca*) genome from whole-genome shotgun sequencing data. *Bioinformatics*, 2013, vol. 29 (12), pp. 1492-1497.
  15. Botstein D., White R.L., Skalnick M.H., Davies R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, vol. 32, pp. 314-331.
  16. Chagne D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M.T., Vendramin G.G., Garcia V., Frigero J.M., Echt C., Richardson T., Plomion C. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, vol. 109, pp. 1204-1214.
  17. De-Lucas A.I., González Martínez S. C., Hidalgo E., Bravo F., Heuertz M. Admixture, one-source colonization or long-term persistence of maritime pine in the Castilian Plateau? Insights from nuclear microsatellite markers. *Investigaciun Agraria: Sistemas y Recursos Forestales*, 2009, vol. 18, no. 1, pp. 3-12.
  18. Dzialuk A., Burczyk J. Examination of chloroplast and nuclear microsatellite DNA sequence for individual identification of coniferous trees. *Problems of Forensic Sciences*, 2005, vol. LXIV, pp. 395-400.
  19. 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.
  20. Krutovsky K.V. The *Pinus sibirica* and *Larix sibirica* genome projects. The 2013 conifer genome sequencing summit in Bjtsrkliiden, Lapland, Sweden, June 14-17, 2013. <http://www.upsc.se/about-upsc/other-information/events/4368-the-2013-conifer-genome-sequencing-summit.html>.
  21. 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.D., Lorenz W.W., Whetten R.W., Sederoff R., Wheeler N., McGuire P.E., Main D., Loopstra C.A., Mockaitis K., deJong P.J., Yorke J.A., Salzberg S.L., Langley C.H. Decoding the massive genome of loblolly pine using haploid DNA and novel assembly. *Genome Biology*, 2014, vol. 15, no. 3, pp. 1-13.
22. 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., Rossello 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.
23. Pan Fang, Shihui Niu, Huwei Yuan, Zhixin Li, Yucheng Zhang, Lu Yuan, Wei Li. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (Pinaceae). *Applications in Plant Sciences*. 2014, vol, 2 (1). <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1300057>.
24. Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*, 2000, vol. 155, pp. 945-959.
25. Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 1998, vol. 7 (9), pp. 1260-1261.
26. The state of the world's forest genetic resources. Rome, 2014, 304 p.
27. The state of the world's animal genetic resources. Rome, 2007, 512 p.
28. 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.
29. Wegrzyn J.L., Liechty J.D., Stevens K.A., Wu L.-S., Loopstra C.A., VasquezGross 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., de Jong 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.
30. Zimin A., Stevens K.A., Crepeau M.W., Holtz-Morris A., Koriabine M., Marçais G., Puiu D., Roberts M., Wegrzyn 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 10.01.2017