



DOI 10.21178/2079–6080.2018.1.32

УДК 630.165.4; 630.174.754:575.174.05.3; 630.174.755:174.015.3

## Применение микросателлитных маркеров для оценки генетического разнообразия ели европейской

© Г.В. Калько, М.В. Кузьмина

---

### **The application of microsatellite markers for estimation of genetic diversity of European spruce**

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

The review discusses trends in using of microsatellite markers for evaluation of the genetic diversity in European spruce populations. A brief historical outline of SSR marker appearance, development and using for population genetic studies of spruce species is given. The characteristics of groups of the most frequently used microsatellite markers of spruce are recited. The principles of the development of microsatellite multiplexes are described. The published multiplexes of microsatellite markers proposed for estimation of the genetic variability of European spruce are listed. Positive properties and disadvantages of a number of proposed multiplexes and individual loci are noted. Microsatellites from expressed sequence tags (EST-SSR) are highly-valued and they allow us to reveal the genetic diversity in functionally important parts of the genome. EST-SSRs and chloroplast microsatellites (cpSSRs) are characterized by a lower mutation rate than nuclear microsatellites (nSSR) from genomic libraries and they can be more easily applied for related tree species studies. Several kinds of multiplexes containing two or three pairs of WS EST-SSR primers are published. The loci WS0023.B03, WS0022.B15, WS0016.O09, WS0092.A19, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0092.M15 developed by D. Rungis and co-authors are the most popular.

Despite the fact that a large number of multiplexes of nuclear microsatellites have been published, the analysis of presented data shows that the SSR-marker panels are still in the testing stage and are not ready-made recommended tools for spruce population studies. The optimizing of the panels of microsatellite markers, specifying the composition and the number of loci suitable for assessing the genetic diversity of European spruce remains relevant at the moment.

**Key words:** microsatellites, European spruce, genetic diversity, nSSR, EST-SSR, cpSSR

## Применение микросателлитных маркеров для оценки генетического разнообразия ели европейской

Г.В. Калько, М.В. Кузьмина

В обзоре обсуждаются тенденции в использовании микросателлитных маркеров для оценки генетического разнообразия ели европейской. Дан краткий исторический экскурс их появления, разработки и использования для популяционно-генетических исследований видов елей. Приведена характеристика групп наиболее часто употребляемых микросателлитных маркеров ели. Описаны принципы формирования микросателлитных панелей. Перечислены опубликованные мультиплексы микросателлитных маркеров, предлагаемые для оценки генетической изменчивости ели европейской. Отмечены положительные свойства и недостатки ряда предлагаемых мультиплексов и отдельных локусов. Микросателлитные маркеры из транскрибируемых областей (EST-SSR) ценны тем, что выявляют генетическое разнообразие в функционально значимых частях генома. EST-SSR и хлоропластные микросателлиты (cpSSR) характеризуются меньшей скоростью мутирования, чем ядерные микросателлиты (nSSR), разработанные с применением метода геномных библиотек, и их с большей легкостью можно использовать на родственных видах древесных пород. Наиболее широко используются для анализа генетического разнообразия ели европейской мультиплексы, содержащие по две-три пары WS EST-SSR-праймеров. Наиболее востребованными являются локусы WS0023.B03, WS0022.B15, WS0016.O09, WS0092.A19, WS0073.H08, WS00111.K13, WS0092.M15, разработанные D. Rungis и соавторами. Несмотря на то, что опубликовано большое количество мультиплексов ядерных микросателлитов, из анализа представленных авторами данных следует, что панели SSR-маркеров все еще находятся в стадии апробирования и не являются готовыми рекомендованными инструментами для проведения популяционных исследований ели. Работа по оптимизации панелей микросателлитных маркеров, по определению состава и количества локусов, пригодных для оценки генетического разнообразия ели европейской, на настоящий момент остается актуальной.

**Ключевые слова:** микросателлиты, ель европейская, генетическое разнообразие, nSSR, EST-SSR, cpSSR

Калько Галина Валентиновна — заведующий исследовательской лабораторией

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

Кузьмина Марина Витальевна — 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

Молекулярные маркеры являются универсальным инструментом исследования генетического разнообразия [39].

Ядерные микросателлитные локусы, или простые повторы мотивов из 1–6 нуклеотидов благодаря специфичности, кодоминантности и высокому уровню полиморфизма являются ценным инструментом для генетического анализа на популяционном и индивидуальном уровнях [38]. Микросателлитные маркеры были предложены в 1989 г. [25, 37, 46]. В настоящее время они относятся к самым мощным инструментам по выявлению биологического разнообразия [8, 39]. Основным недостатком микросателлитов является то, что они должны быть изолированы *de novo* из видов, которые не были ранее секвенированы.

На видах ели используют как ядерные [4, 16, 17, 41], так и хлоропластные [6, 27, 28] маркеры.

### Характеристика групп микросателлитных маркеров

#### Маркеры из геномных библиотек

Ядерные микросателлитные локусы видов елей первоначально отбирали из геномных библиотек [22, 29, 30]. Этот метод разработки микросателлитных маркеров является очень трудоемким. Было предложено несколько протоколов обогащения геномных библиотек микросателлитами [50].

А. Pfeiffer и соавторы проводили скрининг геномной библиотеки ели европейской на наличие повторов AC/GT и AG/CT. В результате этой работы были предложены 7 монолокусных динуклеотидных маркеров группы SpA с числом аллелей от 6 до 22 и ожидаемой гетерозиготностью ( $H_c$ ) от 0,427 до 0,912 [29].

R. V. Hodgetts и соавторы использовали для разработки SSR-маркеров геномные библиотеки *Picea glauca* (Moench) Voss, обогащенные AG и AC мотивами [22]. Были предложены двенадцать динуклеотидных и один три-

нуклеотидный локус (UAPg) с числом аллелей от 3 до 32 и наблюдаемой гетерозиготностью ( $H_0$ ) от 0,33 до 0,94. Маркеры были протестированы на шести родственных видах елей, в том числе на ели европейской.

O. P. Rajoga и соавторы для разработки микросателлитных маркеров использовали геномные библиотеки того же вида ели – *Picea glauca*, обогащенные мотивами AG/TC, и геномные библиотеки без обогащения [30]. Только 8 из разработанных 11 пар праймеров, обозначенных PGL, были однолокусными, и 6 из них были полиморфными. Всего в шести полиморфных локусах SSR было обнаружено 87 аллелей у 32 особей *P. glauca*. Количество аллелей, найденных в этих шести локусах SSR, варьировало от 2 до 22, составляя в среднем 14,5 на локус. Наблюдаемая гетерозиготность ( $H_0$ ) изменялась в пределах от 0,48 до 0,91, со средним значением 0,66 на локус. Парный анализ локусов показал полное сцепление между PGL13 и PGL14 и отсутствие сцепления между любыми остальными микросателлитными локусами. Предлагаемые маркеры были протестированы на 5 других видах елей, включая *Picea abies* (L.) Karst. За исключением локуса PGL12, в котором отсутствовала амплификация у тестируемых особей, все предлагаемые локусы могут быть использованы для популяционных исследований ели европейской.

Приемами обогащения геномных библиотек пользовались I. Scotti и соавторы для разработки тринуклеотидных, более удобных для типирования праймеров ели европейской [36]. Ими был использован метод иммобилизации радиоактивно меченых зондов на нитроцеллюлозных мембранах (Southern blot) с последующей гибридизацией на них ДНК клонов из геномной библиотеки. Итогом работы стала группа микросателлитных локусов EAT с числом аллелей ( $N_a$ ) от 1 до 7, существенно меньшим, чем число аллелей у разработанных ранее A. Pfeiffer и соавторами микросателлитных локусов SpA. Наблюдаемая гетерозиготность наиболее полиморфных локусов EATC1B02,

EATC1G02 и EATC1E03 составляла 0,471, 0,506 и 0,547, соответственно.

I. Scotti и соавторы также отбирали из геномной библиотеки ели европейской однокопийные (низкокопийные) клоны для разработки динуклеотидных микросателлитных локусов с использованием метода dot-blot отбора [33]. Было предложено 33 полиморфных локуса, названных EAC, с числом аллелей от 1 до 9, с четкими профилями амплификации. Авторы, протестировав локусы на выборке из 6 деревьев, отмечают довольно высокий уровень их изменчивости. Для 16 из 33 локусов было показано кодоминантное менделевское наследование.

Полиморфные микросателлитные маркеры, разработанные при скрининге геномных библиотек в конце 1990-х — начале 2000-х годов до сих пор широко используются в исследованиях по популяционной генетике ели европейской [2, 3, 4, 11, 14, 18, 20, 21, 35, 40].

#### ***EST-SSR-маркеры***

Усилия многих авторов были сосредоточены на разработке микросателлитных маркеров из транскрибируемых областей [16, 32, 34]. Положительными свойствами EST-SSR является возможность выявления генетического разнообразия в функционально значимых частях генома. Для этих маркеров характерны меньшие скорости мутирования и их с большей легкостью можно использовать на родственных видах древесных пород.

Внимание к поиску и характеристике микросателлитов в генах, кодирующих белок, и их нетранслируемых областях (UTR) связано с возможной регуляторной функцией микросателлитных повторов. Убедительные свидетельства указывают на то, что SSR неслучайно распределены по белок-кодирующим областям, UTR и интронам [24]. Данные указывают на то, что увеличение или сокращение длины повторов в белок-кодирующих областях могут приводить к усилению или потере функции гена посредством мутаций сдвига рамки или увеличения длины мРНК. Измене-

ния SSR в 5'-UTR регионах могут регулировать экспрессию генов, влияя на транскрипцию и трансляцию. Увеличение числа повторов в 3'-UTRs областях, вызываемые «проскальзыванием» цепи ДНК при транскрипции, продуцируют более длинную «токсичную» мРНК, которая может накапливаться и нарушать сплайсинг и, возможно, другие клеточные функции. Интронные SSRs могут влиять на транскрипцию гена, сращивание мРНК или ее экспорт в цитоплазму. Триплетные SSR, расположенные в UTR или интроне, могут также индуцировать выключение трансляции гена, опосредованного гетерохроматином. Все эти эффекты, вызванные увеличением или сокращением числа микросателлитных повторов внутри генов, могут в конечном итоге привести к фенотипическим изменениям. Микросателлитные локусы в генах эволюционируют с вовлечением мутационных процессов, аналогичных тем, которые происходят в nSSR, расположенных в других геномных областях, и включают проскальзывание репликации, точечную мутацию и рекомбинацию. Эти мутационные процессы генерируют изменения ДНК, которые должны быть устранены системой восстановления несоответствия ДНК (MMR). Мутации, которые избежали коррекционной репарации ДНК (MMR), станут новыми аллелями в локусах SSR, а затем будут регулировать и (или) изменять генные продукты и в конечном итоге могут приводить к изменениям фенотипа. Следовательно, nSSR в генах должны подвергаться более сильному избирательному давлению, чем в других регионах генома, из-за их функционального значения. Эти микросателлитные локусы могут обеспечить молекулярную основу для быстрой адаптации растений к изменениям окружающей среды.

Scotti I. и соавторы использовали библиотеки cDNA *P. abies* для поиска динуклеотидных микросателлитов с мотивами (AG)<sub>n</sub> и (AC)<sub>n</sub> [34]. По данным этих авторов, микросателлиты расположены в клонах не случайно: разные классы повторов локализируются раз-

личным образом относительно кодирующей области генов. Предлагаемые микросателлитные локусы чаще находились на 5' конце cDNA клонов, реже на 3' конце и в центральной, кодирующей части. Была оценена частота динуклеотидных микросателлитов в экспрессирующихся областях и показано, что SSR встречаются в библиотеках cDNA примерно в 20 раз реже, чем в геномных, причем мотив (AG)<sub>n</sub> более представлен, чем (AC)<sub>n</sub>.

Уровень полиморфизма зависит от свойств самих маркеров, а не от происхождения микросателлитных повторов: так, хлоропластные микросателлиты PCP71987 и PCP1289, использованные I. Scotti и соавторами, были менее полиморфны, чем предлагаемые ими EST-SSR-маркеры из группы PAAC (PAAC3, PAAC 11, PAAC13, PAAC17, PAAC19, PAAC23). Тем не менее, по данным G.G. Vendramin и соавторов, хлоропластные маркеры из группы Pt были высоко полиморфными [44]. I. Scotti и соавторы, секвенировав большую часть изучаемых клонов cDNA, не нашли гомологии с известными генами и полагают, что предлагаемые ими микросателлитные маркеры располагаются в генах, ранее не изучаемых [34].

D. Rungis и соавторы отбирали перспективные микросателлитные локусы из 9 cDNA библиотек, полученных из разных видов тканей трех видов ели: *Picea glauca*, *P. sitchensis* и гибридной ели *P. glauca* × *P. engelmannii* [32]. Было предложено двадцать пять полиморфных EST-SSR-локусов, названных WS, для которых в базах данных EST с помощью программы BLAST были найдены соответствующие наиболее вероятные белки. Следует отметить, что они имели происхождение не только из хвойных растений, но и из лиственных, в том числе из модельного растения арабидопсис. В тестируемых образцах ели канадской число аллелей у предлагаемых маркеров варьировало от 1 до 23, в образцах ели ситхинской – от 1 до 11, ели черной – от 1 до 22. Ожидаемая гетерозиготность ( $H_e$ ), выявляемая с помощью разработанных праймеров,

составляла в образцах ели канадской 0,36–0,97, ели ситхинской – 0,10–0,90, ели черной – 0,05–0,96. Авторы также провели сравнительное исследование свойств nSSR из геномных библиотек и EST-SSR. Было показано, что для nSSR из геномных библиотек характерен несколько более высокий полиморфизм (разница в 7 % для групп исследуемых маркеров) и большее количество нулевых аллелей [32].

Хотя наличие нулевых аллелей и искажает популяционные характеристики, в последнее время такие маркеры используют, применяя алгоритмы корректировки популяционных данных [10, 14, 47].

S. Fluch и соавторы анализировали доступные EST-базы данных ели европейской с целью поиска микросателлитов, расположенных в транскрибируемых регионах генома [16]. После анализа 14022 сиквенсов они разработали праймеры для 60 микросателлитных три-, тетра-, пента- и гексануклеотидных повторов. По данным этих исследователей наиболее многочисленными в EST-последовательностях ели европейской были тринуклеотидные повторы. Известно что, количественные соотношения ди-, три-, гепто- и гексамеров в геномах хвойных зависят от методов, применяемых для выявления локусов. S. Fluch и соавторы предложили 23 полиморфных EST-SSR-локуса с количеством аллелей от 2 до 17.

EST-маркеры широко используются для изучения генетического разнообразия, структуры и дифференциации популяций ели европейской [2, 3, 5, 11, 12, 13, 19, 26, 42].

#### ***Хлоропластные микросателлиты***

G.G. Vendramin и соавторы предложили использовать для анализа генетического разнообразия хвойных пород микросателлитные маркеры хлоропластного происхождения. Хлоропластные микросателлиты показывают более низкие скорости мутирования, чем ядерные SSR, а в связи с однородительским наследованием (по отцовской линии у хвойных) они могут быть полезны для мониторинга потока

генов [44, 45]. Поиск cpSSR значительно облегчается благодаря полному секвенированию хлоропластных геномов для большого числа видов. Авторами были предложены 20 пар праймеров (Pt), фланкирующих мононуклеотидные участки у *Pinus thunbergii*. Маркеры были разработаны с использованием данных полногеномного секвенирования сосны черной и компьютерной программы PRIMER версии 0.5. Выявлен высокий полиморфизм предлагаемых локусов на шести видах сосен и на других видах из семейства *Pinaceae*, принадле-

жащих родам *Abies*, *Cedrus* и *Picea*.

Из-за высокой степени консервативности последовательностей хлоропластной ДНК возможна разработка праймеров, пригодных для широкого круга родственных видов. Так, хлоропластные маркеры, предложенные для сосны, были успешно применены для анализа изменчивости ели европейской [13].

Основные группы микросателлитных маркеров, разработанных для видов елей, широко используемые до настоящего времени, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Группы микросателлитных маркеров, разработанные для видов елей

Название группы локусов	Происхождение маркеров	Виды ели	Литературный источник
Pt	Chloroplast genome	<i>Pinaceae</i>	[44]
SpA	GL	<i>Picea abies</i>	[29]
PAAC	EST	<i>Picea abies</i>	[34]
PGL	GL	<i>Picea glauca</i> , <i>P. engelmannii</i> , <i>P. sitchensis</i> , <i>P. mariana</i> , <i>P. rubens</i> , <i>P. abies</i>	[30]
UAPg	GL	<i>Picea glauca</i> , <i>P. mariana</i> , <i>P. rubens</i> , <i>P. abies</i> , <i>P. pungens</i> , <i>P. sitchensis</i> , <i>P. engelmannii</i>	[22]
EAT	GL	<i>Picea abies</i>	[36]
EAC	GL	<i>Picea abies</i>	[33]
WS	EST	<i>Picea</i> spp.	[32]
Pa	EST	<i>Picea abies</i>	[16]

Ряд авторов работает с несколькими видами молекулярных маркеров и сравнивает их разрешающую способность в решении тех или иных задач. I. Scotti и соавторы изучали четыре популяции ели европейской в Италии с использованием 9 ядерных микросателлитных маркеров (3 тринуклеотидов и 6 динуклеотидов) и 4 маркеров хлоропластных SSR (все мононуклеотиды) [35]. Различные классы маркеров сравнивались по их изменчивости, скорости мутации и способности определе-

ния дифференциации между насаждениями. Динуклеотидные маркеры оказались наиболее изменчивой группой, а хлоропластные — наиболее стабильными. Различия в скорости мутирования между первыми и последними достигали более двух порядков. Авторы считают хлоропластные гаплотипы самой чувствительной маркерной системой, способной дифференцировать популяции и выявлять различия в генетической изменчивости между субрегионами.



**Мультиплексы микросателлитных маркеров ели**

Во многих исследованиях использовали по 5–6 локусов для анализа генетического разнообразия видов ели [4, 6, 7, 21, 42]. Затем наборы микросателлитов стали расширять, увеличивая число локусов до 10–14 [11, 12, 14]. Для снижения затрат предлагается использование мультиплексных ПЦР [11, 12, 13, 14, 19, 20, 21, 26, 45]. При выполнении нескольких амплификаций в одной пробирке экономятся реагенты, расходные материалы и приборное время. В последние годы начался процесс оптимизации наборов маркеров, на-

правленный на разумное сокращение числа исследуемых локусов без существенного влияния на качество оценки генетического разнообразия.

В настоящее время для оценки изменчивости видов елей разными авторами предложено 18 мультиплексов, включающих от 2 до 6 локусов из вышеперечисленных групп [12, 13, 14, 19, 20, 21, 26, 45]. Мультиплексы сформированы с учетом температур отжига праймеров, их совместимости при проведении ПЦР в одной пробирке и величине продуктов амплификации. Предлагаемые мультиплексы перечислены в таблице 2.

Таблица 2

Мультиплексы микросателлитных маркеров, используемые для оценки генетического разнообразия ели европейской

№ п/п	Мультиплекс	Литературный источник
1	WS00716.F13 + WS0092.A19 + WS0022.B15	[13, 19, 26]
2	WS0073.H08 + WS00111.K13 + WS0023.B03	[13, 19, 26]
3	EATC1D02A + EATC1B02 + EATC2B02	[13]
4	EATC1E03 + EATC2G05	[13,40]
5	EAC2C08 + SPAC1F7	[13]
6	WS0022.B15 + WS0016.O09 + Pa_44	[13]
7	WS0092.A19 + WS0073.H08 + Pa_05 + Pa_28	[13]
8	Pt71936 + Pt26081 + Pt63718	[13, 45]
9	PAAC19 + PAAC23 + SpAGD1	[19, 26]
10	UAPgAC/AT6 + PGL15 + UAPgTG87 + UAPgCA91	[14]
11	UAPgGT8 + UAPgTG64 + UAPgAG105 + UAPgCT144	[14]
12	PGL12 + UAPgCA24 + UAPsTG25 + PGL14	[14]
13	SpAGC1 + SpAGC2 + SpAGG3	[20, 21]
14	SpAC1H8 + SpAC1F7	[20, 21]
15	EATC1E03 + EATC1D02 + EATC1B02	[20]
16	WS00716.F13 + WS0092.M15 + WS0022.B15	[12]
17	WS0073.H08 + WS00111.K13	[12]
18	WS0023.B03 + EAC1F04 + WS0046.M11 + Pa_47 + Pa_44 + Pa_51	[12]

Из 18 мультиплексов 7 содержат EST-SSR-маркеры из серии WS, разработанные D. Rungis и соавторами. Из 25 предложенных локусов используют 9, по всей видимости,

наиболее стабильно амплифицируемых и полиморфных. Маркеры сгруппированы в разных сочетаниях. Некоторые мультиплексы с WS-маркерами имели в своем составе локусы,

разработанные другими исследователями [12, 13]. Мультиплексы создавались при реализации проекта Trees for the Future [13] исследователями из трех разных европейских лабораторий и В. Свjetkovi [12]. Авторы, опубликовавшие мультиплексы, отказались от использования маркера WS0046.M11, мономорфного в одной из исследованных популяций (мультиплекс № 18) [12]. Маркер WS00716, имеющий много однонуклеотидных повторов, был забракован в трех европейских лабораториях: ASP, CNR и BFW (мультиплексы № 1 и № 16) [13].

Праймеры из серии SpA менее популярны у исследователей. Мультиплекс № 13 SpAGC1 + SpAGC2 + SpAGG3 (табл. 2) использовал только один автор [20, 21]. По одному разу в разных мультиплексах (№ 9 и № 14) были предложены праймеры SpAGD1 и SpAC1H8.

Мультиплекс № 3 (EATC1D02A + EATC1B02 + EATC2B02) был, в последствии отброшен предложившими его авторами из лаборатории CNR из-за сложностей в детекции продуктов, в частности, большого число однонуклеотидных повторов [13]. Лаборатория ASP заменила праймеры EAC6B01, EAC1A07, EAC6A10, EAC1F04, EAC1E03, как не очень хорошо амплифицируемые на WS-локусы [13]. Тем не менее, локус EAC1F04 входит в состав опубликованного мультиплекса № 18 [12]. В этом локусе авторы выявили 66 аллелей.

От мультиплексов № 4 (EATC1E03 + EATC2G05) и № 5 (EAC2C08 + SPAC1F7) его разработчики из лаборатории CNR отказались из-за большого числа однонуклеотидных повторов [13].

Мультиплекс № 12 (PGL12 + UAPgCA24 + UAPsTG25 + PGL14) требует проведения амплификации в двух пробирках: для трех маркеров PGL12 + UAPgCA24 + UAPsTG25 проводится совместная ПЦР, локус PGL14 из-за отличающейся температуры отжига амплифицируется отдельно [14].

Наличие однонуклеотидных повторов у

двух- и трехнуклеотидных локусов может свидетельствовать о том, что механизмом мутагенеза этих микросателлитов являются не только проскальзывание цепи ДНК, но и точечные мутации.

В наших исследованиях после проведения микросателлитного анализа в трех естественных и двух искусственных популяциях ели европейской (выборки от 27 до 31 особи) с использованием девяти отобранных ранее полиморфных локусов серий Pa, SpA и UAPg в результате отбраковки локусов с большим числом нулевых аллелей, сложным спектром амплификации и низким уровнем полиморфизма отказались от всех тестируемых локусов SpA и для дальнейшей работы были оставлены EST-SSR-маркеры Pa\_28, Pa\_36, Pa\_41, Pa\_59 и UAPgAG105 (неопубликованные данные). В мультиплексе № 7 также был использован маркер Pa\_28 [13].

От маркера Pa\_51 из мультиплекса № 18 авторы отказались из-за его мономорфности в трех исследованных популяциях и наличия всего двух аллелей в оставшихся популяциях [12].

Таким образом, можно отметить тенденцию отказа от праймеров на основе геномных библиотек в пользу EST-SSR-локусов серии WS. EST-маркеры серии Pa и PAAC менее популярны. Праймеры WS в популяционных исследованиях ели европейской использовали и российские исследователи [2, 6].

Для оценки генетического разнообразия ели канадской P. Eusemann с соавторами было предложено 3 мультиплекса ядерных микросателлитных маркеров, отобранных из геномных библиотек из групп UAPg, предложенных Hodgetts и соавторами [22], и PGL, разработанных Rajora и соавторами [30], по 4 маркера в каждом [14]. Из 12 использованных маркеров для 9 вероятность наличия нулевых аллелей превышала 5 % уровень. Некоторые из UAPg-локусов были использованы для микросателлитного анализа популяций ели европейской [3] и ели сибирской [7].

Мультиплекс, состоящий из хлоропласт-



ных праймеров Pt71936 + Pt26081 + Pt63718, применялся на ели европейской автором этих праймеров [45] и специалистами из лаборатории CNR [13].

Теоретически, принципы, по которым отбирают локусы для мультиплексов, должны основываться на их кодоминантности, нейтральности маркеров, воспроизводимой амплификацией, отсутствием множественных полос. При изучении генетики животных исследователи выбирают маркеры, расположенные на разных хромосомах, и при большом числе маркеров на одной хромосоме – на большом расстоянии друг от друга.

V. Achere с соавторами в работах 2004 и 2005 гг. локализовали опубликованные к этому времени SSR-маркеры по 12 группам сцепления [8, 9]. В соответствии с опубликованными данными, маркеры из серии EAT распределяются в 9 и 11 группах сцепления; SpA – во 2, 5, 9 и 10; праймер PAAC19 – в 12; PGL15 – в 5; UAPgCA91 и UAPgCA24 – в 1, UAPsTG2 – в 3. Следует отметить, что не все предложенные ранее 2004 года маркеры были локализованы.

При разработке хлоропластных маркеров для хвойных пород некоторые авторы, используя данные секвенирования хлоропластного генома, обращали внимание на то, чтобы локусы были распределены приблизительно равномерно по хлоропластной плазмиде и не приходились на участки гипервариабельной ДНК [48].

В связи с многокопийностью геномов хвойных и трудоемкостью разработки маркеров авторы часто апробируют однолокусные полиморфные микросателлиты, предложенные для одних видов, на других видах и даже родах хвойных [32, 44].

По мере все большего использования и изучения микросателлитов накопился некоторый критический материал, указывающий на необходимость предварительного изучения тех или иных маркеров перед их массовым применением. Так, по данным R. Yazdani и соавторов, при изучении наследования микроса-

теллитных маркеров в семьях полусибсов *Picea abies* из изучаемых 67 SSR-маркеров около половины оказались доминантными [49].

Для статистической обработки данных микросателлитного анализа может быть задействовано большое количество (более 20) компьютерных программ, описанных в ряде обзоров и статей [15, 23].

Одной из проблем использования микросателлитов является наличие нулевых аллелей, то есть мутаций в области отжига разработанных праймеров, которые приводят к отсутствию амплификации у гомозигот и амплификации одного фрагмента ДНК вместо двух у гетерозигот. Существуют методы оценки вероятности нулевых аллелей и компьютерные программы, автоматизирующие такие вычисления [31, 43]. Предложены алгоритмы для коррекции популяционных данных в случае обнаружения нулевых аллелей [10, 47].

У микросателлитных маркеров появилось еще одно ограничение, связанное с особенностями применения и интерпретацией данных. Ранее микросателлиты считали универсальными маркерами, пригодными для идентификации генотипов, оценки генетического разнообразия и дифференциации популяций. В.В. Горбачев полагает, что микросателлитные маркеры следует использовать для оценки генетического разнообразия и с осторожностью относиться к выводам о дифференциации популяции на основе микросателлитного анализа [1]. Его мнение основано на том, что с применением коалесцентных моделей была показана возможность ошибки I рода при использовании микросателлитов в популяционно-генетических исследованиях. Установлено, что даже для панмиктических популяций величина ошибки может составлять CI 95 % ~ 11–18 %. Высказывается предположение, что возможной причиной полученных результатов является высокое аллельное разнообразие, вызванное нестабильностью микросателлитных маркеров.

Это еще один довод в пользу предпочтительного использования менее вариабельных

ядерных EST-SSR- и cpSSR-локусов. Микросателлитные маркеры по-прежнему считают наилучшими для идентификации особей и установления родства.

Таким образом, к настоящему времени наметилась устойчивая тенденция к отбору для микросателлитного анализа ядерных локусов из транскрибируемых областей ДНК и хлоропластного генома ели. Наиболее востребованными для оценки генетического разнообразия ели европейской являются ESR-SSR-маркеры группы WS. Несмотря на то, что

опубликовано большое количество мультиплексов ядерных микросателлитов, из анализа представленных авторами данных следует, что панели SSR-маркеров все еще находятся в стадии апробирования и не являются готовыми рекомендованными инструментами для проведения популяционных исследований. Работа по оптимизации панелей микросателлитных маркеров, по определению состава и количества локусов, пригодных для оценки генетического разнообразия ели европейской, на настоящий момент, остается актуальной.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Горбачев, В.В. Новое ограничение микросателлитных маркеров для их применения в популяционных исследованиях (на примере панмиктических популяций) / В.В. Горбачев // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2011. – Том 15, № 4. – С. 746–749.
2. Захарова, К.В. Роль экологических факторов в формировании генетической структуры популяций *P. abies* (L.) Karst. / К.В. Захарова, К.С. Сейц // Экологическая генетика. – 2017. – Том 15, № 2. – С. 11–20.
3. Калько, Г.В. Апробация ядерных микросателлитных маркеров ели европейской / Г.В. Калько, Ю.С. Зотова // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2016. – № 4. – С. 4–15.
4. 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. – ISSN 0016–6758.
5. 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.
6. Потокина, Е.К. Использование маркеров оргanelльной ДНК для анализа филогеографии восточноевропейской популяции ели европейской *Picea abies* (L.) H. Karst. / Е.К. Потокина [и др.] // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 4/1. – С. 818–829. – ISSN 1814–554X.
7. Экарт, А.К. Применение различных типов генетических маркеров для оценки уровня внутривидовой дифференциации ели сибирской / А.К. Экарт [и др.] // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 84–91. – ISSN 2311–1410.
8. Achere, V. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers / V. Achere [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 108. – P. 1602–1613. – ISSN 0040–5752.
9. Achere, V. Genomic organization of molecular differentiation in Norway spruce (*Picea abies*) / V. Achere, M. Favre, G. Besnard, S. Jeandroz // Molecular Ecology. – 2005. – Vol. 14. – P. 3191–3201. – DOI: 10.1111/j. 1365–294X. 2005.02646.x.
10. Chapuis, Marie-Pierre. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation / Marie-Pierre Chapuis, A. Estoup // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – Vol. 24 (3). – P. 621–631. – DOI: 10.1093/molbev/msl191.

11. Chen, J. Clinal Variation at Phenology-Related Genes in Spruce: Parallel Evolution in *FTL2* and *Gigantea*? / J. Chen, Y. Tsuda, M. Stocks, T. Källman, N. Xu, K. Kärkkäinen, T. Huotari, V. Semerikov, G. Vendramin, M. Lascoux // *Genetics*. – 2014. – July, Vol. 197. – P. 1025–1038.
12. Cvjetković, B. Norway spruce (*Picea abies* Karst.) variability in progeny tests in Bosnia and Herzegovina / B. Cvjetković, M. Konnerth, B. Fussi, M. Mataruga, M. Šijačić-Nikolić, V. Daničić, A. Lučić // *Genetika*. – 2017. – Vol. 49 (1). – P. 259–272.
13. 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.
14. 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 // *Silvae Genetica*. – 2014. – December, Vol. 53 (5). – P. 230–234. – DOI: 10.1515/sg-2014-0029.
15. Excoffier, L. Computer programs for population genetics data analysis: A survival guide / L. Excoffier, G. Heckel // *Nat. Rev. Genet.* – 2006. – Vol. 7. – P. 745–758. – ISSN: 1471-0056 (Print). – 1471-0064 (Electronic). – 1471-0056 (Linking).
16. 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.
17. Fluch, M.S. DNA marker development for plant genetic analysis: doktor der Naturwissenschaften dissertation / Fluch Mag. *Silvia*. – Wien, 2010. – 217 p.
18. Galović, V. Genetic differentiation of norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) trees with different crown types from the mountain Golija / V. Galović, M. Šijačić-nikolić, R. Šafhauzer, D. Čortan, S. Orlović // *Genetika*. – 2015. – Vol. 47, No. 3. – P. 849–861. – DOI: 10.2298/GENSR1503849G.
19. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových marker. : Certifikovaná metodika. 8/2015 / Ing. Helena Cvrčková, Ph. D. Ing. Pavlína Máchová, Ph.D. – Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., 2015. – 38 s. – ISBN 978-80-7417-102-4.
20. Hazubska-Przybył, T. Somaclonal variation during *Picea abies* and *P. omorika* somatic embryogenesis and cryopreservation / T. Hazubska-Przybył, M. Dering // *Series Botanica*. – 2017. – Vol. 59/1. – P. 93–103. – DOI: 10.1515/absb-2017-0003.
21. Hazubska-Przybył, T. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method / T. Hazubska-Przybył, P. Chmielarz, M. Michalak, M. Dering, K. Bojarczuk // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2013. – Vol. 113. – P. 303–313. – DOI 10.1007/s11240-012-0270-2.
22. Hodgetts, R.B. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca*) and related species / R.B. Hodgetts, M.A. Aleksuk, A. Brown, C. Clarke, E. Macdonald, S. Nadeem, D. Khasa // *Theor. Appl. Genet.* – 2001. – Vol. 102. – P. 1252–1258. – ISSN 0040-5752.
23. Labate, J.A. Software for population genetics analyses of molecular marker data / J.A. Labate // *Crop Sci.* – 2000. – Vol. 40. – P. 1521–1528. – ISSN: 1435-0653 (Online). – ISSN: 0011-183X (Print).
24. Li, You-Chun. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution / You-Chun Li, A.B. Korol, T. Fahima, E. Nevo // *Molecular Biology and Evolution*. – 2004. – Vol. 21 (6). – P. 991–1007. – DOI: 10.1093/molbev/msh073.
25. Litt, M. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene / M. Litt, J.A. Luty // *American Journal of Human Genetics*. – 1989. – Vol. 44. – P. 397–401.

26. Máchová, P. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého evaluation of norway spruce seed orchard using microsatellite markers / P. Máchová, H. Cvrčková, J. Malá // Zpravy lesnického vyzkumu. – 2014. – Vol. 59 (4). – P. 243–249.
27. Meng, L. Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* Kom. (Pinaceae) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands / L. Meng, R. Yang, R.J. Abbott, G. Miede, T. Hu, J. Liu // Mol. Ecol. – 2007. – Vol. 16. – P. 4128–4137. – Online ISSN: 1365–294X. – ISSN 0962–1083 (print).
28. Nasri, N. Population genetic structure of the relict Serbian spruce, *Picea omorika*, inferred from plastid DNA // N. Nasri, S. Bojovic, G.G. Vendramin, B. Fady // Pl. Syst. Evol. – 2008. – Vol. 271. – P. 1–7. – ISSN 0378–2697 (Print). – 2199–6881 (Online). – DOI 10.1007/s00606–007–0594–2.
29. 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.
30. 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.
31. Raymon, M. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism / M. Raymon, F. Rousset // J. Hered. – 1995. – Vol. 86. – P. 248–249.
32. 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.
33. Scotti, I. Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection / I. Scotti, G.P. Paglia, F. Magni, M. Morgante // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 104. – P. 1035–1041. – ISSN 0040–5752.
34. 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.
35. Scotti, I. Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation / I. Scotti, G. Paglia, F. Magni, M. Morgante // Annals of Forest Science, Springer Verlag/EDP Sciences. – 2006. – Vol. 63 (5). – P. 485–491. – DOI: 10.1051/forest:2006029.
36. Scotti, I. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers / I. Scotti, F. Magni, G.P. Paglia, M. Morgante // Theor. Appl. Genet. – 2002. – Vol. 106. – P. 40–50. – ISSN 0040–5752.
37. Tautz, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers / D. Tautz // Nucleic Acids Research. – 1989. – Vol. 17. – P. 6463–6471.
38. The state of the world's animal genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2007. – 512 p.
39. The state of the world's forest genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2014. – 304 p.
40. Tollefsrud, M.M. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies* / M.M. Tollefsrud, J.H. Sonstebo, C. Brochmann, O. Johnsen, T. Skroppa, G.G. Vendramin // Heredity. – 2009. – Vol. 102. – P. 549–562. – ISSN 0018–067X.
41. Tsuda, Y. The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? / Y. Tsuda, J. Chen, M. Stocks, T. Kallman, J.H. Sonstebo, L. Parducci, V. Semerikov, C. Sperisen, D. Politov, T. Ronkainen, M. Valiranta, G.G. Vendramin, M.M. Tollefsrud, M. Lascoux // Molecular Ecology. – 2016. – Vol. 25 (12). – P. 2773–2789. – DOI: 10.1111/mec. 13654.

42. Unger, G.M. Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria / G.M. Unger, H. Konrad, T. Geburek // *Plant Syst. Evol.* – 2011. – Vol. 292. – P. 133–141. – DOI: 10.1007/s00606-010-0407-x.
43. Van Oosterhout, C. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data / C. Van Oosterhout, W.F. Hutchison, D.P.M. Wills, P. Shipley // *Molecular Ecology Notes.* – 2004. – Vol. 4. – P. 535–538. – Online ISSN: 1471–8286.
44. Vendramin, G.G. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae* / G.G. Vendramin, L. Lelli, P. Rossi, M. Morgante // *Molecular Ecology.* – 1996. – Vol. 5. – P. 595–598.
45. Vendramin, G.G. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.) / G.G. Vendramin, M. Anzidei, A. Madaghiele, C. Sperisen, G. Bucci // *Genome.* – 2000. – Vol. 43. – P. 68–78.
46. Weber, J.L. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction / J.L. Weber, P.E. May // *American Journal of Human Genetics.* – 1989. – Vol. 44 (3). – P. 388–396.
47. Westergren, M. Genetic diversity of core vs. peripheral Norway spruce native populations at a local scale in Slovenia / M. Westergren, G. Bozic, H. Kraigher // *iForest – Biogeosciences and Forestry.* – 2018. – Vol. 11. – P. 104–110. – DOI: 10.3832/for2444-011.
48. Wofford, A.M. A set of plastid loci for use in multiplex fragment length genotyping for intraspecific variation in *Pinus* (*Pinaceae*) / A.M. Wofford, K. Finch, A. Bigott, A. Willyard // *Applications in Plant Sciences.* – 2014. – Vol. 2 (5). – 10 p. – DOI: 10.3732/apps.1400002.
49. Yazdani, R. Inheritance and diversity of simple sequence repeat (SSR) microsatellite markers in various families of *Picea abies* / R. Yazdani, I. Scotti, G. Jansson, C. Plomion, G. Mathur // *Hereditas.* – 2003. – Vol. 138 (3). – P. 219–227. – Online ISSN: 1601–5223.
50. Zane, L. Strategies for microsatellite isolation: a review / L. Zane, L. Bargelloni, T. Patarnello // *Molecular Ecology.* – 2002. – Vol. 11 (1). – P. 1–16. – DOI: 10.1046/j.0962-1083.2001.01418.x.

## REFERENCES

1. Gorbachev V.V. Novoe ogranichenie mikrosatellitnykh markerov dlya ikh primeneniya v populyatsionnykh issledovaniyakh (na primere panmikticheskikh populyatsij). *Vavilovskij zhurnal genetiki i selektsii*, 2011, vol. 15, no. 4, pp. 746–749. (In Russian).
2. Zakharova K.V., Sejts K.S. Rol' ehkologicheskikh faktorov v formirovanii geneticheskoy struktury populyatsij *P. abies* (L.) Karst. *Ehkologicheskaya genetika*, 2017, vol. 15, no. 2, pp. 11–20. (In Russian).
3. Kal'ko G.V., Zotova YU.S. Aprobatsiya yadernykh mikrosatellitnykh markerov eli evropejskoj. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyajstva*, 2016, no. 4, pp. 4–15. (In Russian).
4. Mel'nikova M.N., Petrov N.B., Lomov A.A., La Porta N., Politov D.V. Testirovanie mikrosatellitnykh prajmerov na raznykh populyatsiyakh evrazijskikh elej *Picea abies* (L.) Karst. i *Picea obovata* Ledeb. *Genetika*, 2012, vol. 48, no. 5, pp. 660–665, – ISSN 0016–6758. (In Russian).
5. Potokina E.K., Orlova L.V., Vishnevskaya M.S., Alekseeva E.A., Potokin A.F., Egorov A.A. Geneticheskaya differentsiatsiya populyatsij eli na severo-zapade Rossii po rezul'tatam markirovaniya mikrosatellitnykh lokusov. *Genetika populyatsij i ehvoljutsiya*, 2012, vol. X, no. 2, pp. 40–49, ISSN 1811–0932. (In Russian).
6. Potokina E.K., Kiseleva A.A., Nikolaeva M.A., Ivanov S.A., Ul'yanich P.S., Potokin A.F. Ispol'zovanie markerov organel'noj DNK dlya analiza filogeografii vostochnoevropejskoj populyatsii eli evropejskoj *Picea abies* (L.) H. Karst. *Vavilovskij zhurnal genetiki i selektsii*, 2014, vol. 18, no. 4/1, pp. 818–829, ISSN 1814–554KH. (In Russian).



7. Ehart A.K., Semerikova S.A., Semerikov V.L., Kravchenko A.N., Dymshakova O.S., Larionova A.Y. Primenenie razlichnykh tipov geneticheskikh markerov dlya otsenki urovnya vnutrividovoy differentsiatsii eli sibirskoj. *Sibirskij lesnoj zhurnal*, 2014, no. 4, pp. 84–91, ISSN 2311–1410.
8. Acheré V., Faivre-Rampant P., Jeandroz S., Besnard G., Markussen T., Aragones A., Fladung M., 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.
9. Acheré V., Favre M., Besnard G., Jeandroz S. Genomic organization of molecular differentiation in Norway spruce (*Picea abies*). *Molecular Ecology*, 2005, vol. 14, pp. 3191–3201, DOI: 10.1111/j. 1365–294X. 2005.02646.x.
10. Chapis M.-P., Estoup A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, vol. 24 (3), pp. 621–631, DOI: 10.1093/molbev/msl191.
11. Chen J., Tsuda Y., Stocks M., Källman T., Xu N., Kärkkäinen K., Huotari T., Semerikov V., Vendramin G., Lascoux M. Clinal Variation at Phenology-Related Genes in Spruce: Parallel Evolution in FTL2 and Gigantea? *Genetics*, 2014, July, vol. 197, pp. 1025–1038.
12. Cvjetković B., Konert 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.
13. 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.
14. 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.
15. Excoffier L., Heckel G. Computer programs for population genetics data analysis: A survival guide. *Nat. Rev. Genet.*, 2006, vol. 7, pp. 745–758, ISSN: 1471–0056 (Print), 1471–0064 (Electronic), 1471–0056 (Linking).
16. 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>.
17. Fluch M.S. DNA marker development for plant genetic analysis: doktor der Naturwissenschaften dissertation. Wien, 2010, 217 p.
18. Galović V., Šijačić-nikolić M., Šafhauzer R., Čortan D., Orlović S. Genetic differentiation of norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) trees with different crown types from the mountain Golija. *Genetika*, 2015, vol. 47, no. 3, pp. 849–861, DOI: 10.2298/GENSR1503849G.
19. Genetická charakterizace smrku ztepilého pomocí mikrosatelitových marker.: Certifikovaná metodika. 8/2015. Ing. Helena Cvrčková, Ph.D. Ing. Pavlína Máčková, Ph.D, Strnady: Výzkumný ústav lesního hospodářství a myslivosti, v. v. i., 2015, 38 p., ISBN 978–80–7417–102–4.
20. Hazubska-Przybył T., Dering M. Somatic variation during *Picea abies* and *P. omorika* somatic embryogenesis and cryopreservation. *Series Botanica*, 2017, vol. 59/1, pp. 93–103, DOI: 10.1515/abcsb-2017–0003.
21. Hazubska-Przybył, T., Chmielarz P., Michalak M., Dering M., Bojarczuk K. Survival and genetic stability of *Picea abies* embryogenic cultures after cryopreservation using a pregrowth-dehydration method. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.*, 2013, vol. 113, pp. 303–313, DOI 10.1007/s11240–012–0270–2.
22. 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*) and related species. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, vol. 102, pp. 1252–1258, ISSN 0040–5752.



23. Labate J.A. Software for population genetics analyses of molecular marker data. *Crop Sci.*, 2000, vol. 40, pp. 1521–1528, ISSN: 1435–0653 (Online), ISSN: 0011–183X (Print).
24. Li Y.-C., Korol A.B., Fahima T., Nevo E. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, vol. 21 (6), pp. 991–1007, DOI: 10.1093/molbev/msh073.
25. Litt M., Luty J.A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 1989, vol. 44, pp. 397–401.
26. Máchová P., Cvrčková H., Malá J. Využití mikrosatelitových markerů pro hodnocení semenného sadu smrku ztepilého evaluation of norway spruce seed orchard using microsatellite markers. *Zpravy lesnického výzkumu*, 2014, vol. 59 (4), pp. 243–249.
27. Meng L., Yang R., Abbott R.J., Miede G., Hu T., Liu J. Mitochondrial and chloroplast phylogeography of *Picea crassifolia* Kom. (*Pinaceae*) in the Qinghai-Tibetan Plateau and adjacent highlands. *Mol. Ecol.*, 2007, vol. 16, pp. 4128–4137, Online ISSN: 1365–294X, ISSN 0962–1083 (print).
28. Nasri N., Bojovic S., Vendramin G.G., Fady B. Population genetic structure of the relict Serbian spruce, *Picea omorika*, inferred from plastid DNA. *Pl. Syst. Evol.*, 2008, vol. 271, pp. 1–7, ISSN pp. 0378–2697 (Print), 2199–6881 (Online), DOI pp. 10.1007/s00606–007–0594–2.
29. 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.
30. 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.
31. Raymon M., Rousset F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Hered.*, 1995, vol. 86, pp. 248–249.
32. 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.
33. Scotti I., Paglia G.P., Magni F., Morgante M. Efficient development of dinucleotide microsatellite markers in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) through dot-blot selection. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, vol. 104, pp. 1035–1041, ISSN 0040–5752.
34. 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.
35. Scotti I., Paglia G., Magni F., Morgante M. Population genetics of Norway spruce (*Picea abies* Karst.) at regional scale: sensitivity of different microsatellite motif classes in detecting differentiation. *Annals of Forest Science, Springer Verlag/EDP Sciences*, 2006, vol. 63 (5), pp. 485–491, DOI: 10.1051/forest:2006029.
36. Scotti I., Magni F., Paglia G.P., Morgante M. Trinucleotide microsatellites in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, vol. 106, pp. 40–50, ISSN 0040–5752.
37. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, vol. 17, pp. 6463–6471.
38. The state of the world's animal genetic resources. FAO, Rome: FAO, 2007, 512 p.
39. The state of the world's forest genetic resources. FAO, Rome: FAO, 2014, 304 p.
40. Tollefsrud M.M., Sonstebo J.H., Brochmann C., Johnsen O., Skroppa T., Vendramin G.G. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies*. *Heredity*, 2009, vol. 102, pp. 549–562, ISSN 0018–067X.

41. Tsuda Y., Chen J., Stocks M., Kallman T., Sonstebo J.H., Parducci L., Semerikov V., Sperisen C., Politov D., Ronkainen T., Valiranta M., Vendramin G.G., Tolledrud M.M., Lascoux M. The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? *Molecular Ecology*, 2016, vol. 25 (12), pp. 2773–2789, DOI: 10.1111/mec. 13654.
42. Unger G.M., Konrad H., Geburek T. Does spatial genetic structure increase with altitude? An answer from *Picea abies* in Tyrol, Austria. *Plant Syst. Evol.*, 2011, vol. 292, pp. 133–141, DOI: 10.1007/s00606-010-0407-x.
43. Van Oosterhout C., Hutchison W.F., Wills D.P.M., Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 2004, vol. 4, pp. 535–538, Online ISSN: 1471–8286.
44. Vendramin G.G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in *Pinaceae*. *Molecular Ecology*, 1996, vol. 5, pp. 595–598.
45. Vendramin G.G., Anzidei M., Madaghiale A., Sperisen C., Bucci G. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.). *Genome*, 2000, vol. 43, pp. 68–78.
46. Weber J.L., May P.E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 1989, vol. 44 (3), pp. 388–396.
47. Westergren M., Bozic G., Kraigher H. Genetic diversity of core vs. peripheral Norway spruce native populations at a local scale in Slovenia. *iForest – Biogeosciences and Forestry*, 2018, vol. 11, pp. 104–110, DOI: 10.3832/ifor2444-011.
48. Wofford A.M., Finch K., Bigott A., Willyard A. A set of plastid loci for use in multiplex fragment length genotyping for intraspecific variation in *Pinus* (*Pinaceae*). *Applications in Plant Sciences*, 2014, vol. 2 (5), 10 p., DOI: 10.3732/apps. 1400002.
49. Yazdani R., Scotti I., Jansson G., Plomion C., Mathur G. Inheritance and diversity of simple sequence repeat (SSR) microsatellite markers in various families of *Picea abies*. *Hereditas*, 2003, vol. 138 (3), pp. 219–227, Online ISSN: 1601–5223.
50. Zane L., Bargelloni L., Patarnello T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 2002, vol. 11 (1), pp. 1–16, DOI: 10.1046/j. 0962–1083.2001.01418.x.

Статья поступила в редакцию 20.03.2018