



DOI 10.21178/2079-6080.2018.3-4.17  
УДК 630.165

## Микросателлитные маркеры для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной

© Г.В. Калько, Т.М. Котова

---

### **The microsatellite markers for estimation of genetic diversity of Scots pine**

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

The review discusses trends in using of microsatellite markers for evaluation of the genetic diversity in Scots pine populations. A brief historical outline of SSR marker appearance, development and using for population genetic studies of pine species is given. The characteristics of groups of the most frequently used microsatellite markers of pines 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 Scots pine are listed. Positive properties and disadvantages of individual loci are noted. The highly-valued microsatellites from expressed sequence tags (EST-SSR) of Scots pine were developed several groups of researchers. EST-SSRs 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 pine species studies. Of the 31 loci including in 24 published multiplexes of nuclear microsatellites of Scots pine, 19 loci were refused by authors because of the null alleles found in analyzed populations, low informativity and difficulties in interpreting the results of genotyping. Despite the fact that a large number of multiplexes of nuclear microsatellites for Scots pine have been published, the analysis of published data shows that the SSR-marker panels are still in the testing stage and are not ready-made recommended tools for pine 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 Scots pine remains relevant at the moment.

**Key words:** microsatellites, Scots pine, genetic diversity, nSSR, EST-SSR, cpSSR

**Микросателлитные маркеры для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной**

**Г.В. Калько, Т.М. Котова**

В обзоре обсуждаются тенденции в использовании микросателлитных маркеров для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной. Дан краткий исторический экскурс их появления, разработки и использования для популяционно-генетических исследований видов сосны. Приведена характеристика групп наиболее часто употребляемых микросателлитных маркеров этой породы. Описаны принципы формирования микросателлитных панелей. Перечислены опубликованные мультиплексы микросателлитных маркеров, предлагаемые для оценки генетической изменчивости сосны обыкновенной. Отмечены положительные свойства и недостатки предлагаемых локусов. Микросателлитные маркеры из транскрибируемых областей (EST-SSR), разработанные несколькими группами исследователей, 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. Из 31 локуса, составляющих проанализированные опубликованные 24 мультиплекса ядерных микросателлитов, апробированных на сосне обыкновенной, от 19 авторы отказались из-за обнаруженных при массовых анализах нулевых аллелей, малой информативности и сложностей в интерпретации результатов генотипирования. 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 сосны. Работа по оптимизации панелей микросателлитных маркеров, по определению состава и количества локусов, пригодных для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной, на настоящий момент остается актуальной.

**Ключевые слова:** микросателлиты, сосна обыкновенная, генетическое разнообразие, nSSR, EST-SSR, cpSSR

Калько Галина Валентиновна – заведующий исследовательской лабораторией

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

Котова Татьяна Михайловна – инженер-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**

Ядерные микросателлитные локусы или простые повторы (SSR – Simple Sequence Repeat) мотивов из 1–6 нуклеотидов являются одним из самых мощных и востребованных инструментов изучения генетического разнообразия разных видов живых существ [26, 27]. Они успешно применяются и для идентификации генотипов.

Микросателлитные маркеры были предложены в 1989 г. [18, 25, 31] и до настоящего времени они остаются востребованными [4].

На видах сосны применяют и ядерные [7, 10, 11, 14, 17, 23, 24, 32], и хлоропластные [8, 9, 20, 21, 22, 29, 30] микросателлиты. При их использовании возможна частичная автоматизация генотипирования с помощью фрагментного анализа на капиллярных секвенаторах. Поэтому в последнее время исследователями разработано значительное число мультиплексных панелей из SSR-локусов сосны [6, 8, 13, 15, 16, 19, 33]. Проведение мультиплексных ПЦП с праймерами, мечеными разными флуоресцентными красками, с последующей детекцией результатов на секвенаторе не только ускоряет процесс и ведет к экономии реагентов и приборного времени, но и приводит к более точному определению размеров аллелей.

**EST-SSR-маркеры видов сосны, созданные с использованием геномных библиотек**

N. Soranzo и соавторы [24] создали две геномные библиотеки сосны обыкновенной, обогащенные динуклеотидными повторами (AC<sub>n</sub>) и (AG<sub>n</sub>). Обогащение было достигнуто посредством гибридизации рестрицированных фрагментов геномной ДНК с (AC<sub>13</sub>) или (AG<sub>13</sub>) олигонуклеотидами, мечеными на 3' конце биотином и иммобилизованных на поверхности магнитных частиц, покрытых стрептавидином. Обогащенная фракция небольших (200–600 п.о.) фрагментов ДНК была клонирована в векторе λ-Zap фага. С помощью программы Primer (версия 5.0) на материале этой библиотеки было разработано

37 пар праймеров. 50% клонов давали мультилокусные профили амплификации ДНК. 25% клонов не амплифицировались или давали слабую ПЦП. Только 20% клонов показали однолокусную вариацию. Семь перспективных пар праймеров тестировали на панели из 11–14 образцов ДНК сосны обыкновенной. Полиморфность локусов оценивали по взвешенному индексу гетерозиготности Нея (unbiased Nei's heterozygosity index, H), который варьировал от 0,538 до 0,945. Для трех локусов – SPAC11.6, SPAC11.5 и SPAG3.7 – наблюдалась сегрегация по ожидаемому кодоминантному менделевскому типу наследования.

В связи со сложностью и трудоемкостью разработки микросателлитных маркеров для хвойных пород, часто микросателлиты, разработанные для одних видов, успешно применяют на родственных таксонах [29]. Так, большое количество генетических маркеров, впоследствии успешно применяемых на сосне обыкновенной, было разработано с использованием геномных библиотек *Pinus taeda* L.

Еще одним подходом, примененным для выявления микросателлитных повторов в геномах больших размеров, на 75–86% состоящих из повторяющихся последовательностей, является создание низкокопийных библиотек. С.G. Elisk и соавторы разработали 18 локусов на основе низкокопийных и геномных библиотек, генерированных из геномной ДНК *Pinus taeda* L. Их протестировали на соответствие менделевскому наследованию. Маркеры были апробированы на образцах ДНК 41 особи *Pinus taeda* L., произрастающих в пяти регионах юга Соединенных Штатов Америки. Из 18 маркеров 15 были информативными и содержали от 3 до 28 аллелей на локус. Наибольшее число аллелей и наивысший индекс полиморфизма PIC наблюдали у локусов со сложными повторами и (или) с последовательностями из более длинных совершенных повторов. Авторы считают, что из 18 разработанных локусов низкокопийные микросателлиты (13 локусов) несколько более

полиморфны, чем геномные (5 локусов). Тринадцать маркеров, разработанных с использованием низкокопийных библиотек (LC) с числом аллелей от 2 до 28 и индексом полиморфности PIC от 0,2965 до 0,9502 были названы PtTX2008, PtTX2037, PtTX3011, PtTX3013, PtTX3017, PtTX3019, PtTX3020, PtTX3025, PtTX3026, PtTX3030, PtTX3032, PtTX3034, PtTX3037. Пять локусов из геномных библиотек с числом аллелей от 3 до 14 и индексом PIC от 0,1283 до 0,7737 – PtTX2123, PtTX2128, PtTX2142, PtTX2146, PtTX2164. Из восемнадцати разработанных локусов восемь – тринуклеотидные с простыми повторами, шесть локусов тринуклеотидные со сложными повторами, три – со сложными комбинированными ди- и тринуклеотидными повторами и один локус с со сложными динуклеотидными повторами. Авторы указывают, что предлагаемые ими локусы из низкокопийных библиотек более полиморфны, чем разработанные ранее D.E. Hargy и соавторами (1998) локусы из cDNA библиотек [10].

В дальнейшем разработка маркеров *Pinus taeda* L. с использованием низкокопийных библиотек была продолжена. C.G. Elsik и C.G. Williams [11] предложили еще 16 ди-, три- и тетрануклеотидных локусов серии PtTX.

Альтернативным подходом для разработки микросателлитных маркеров сосны является использование библиотек полуметилированной ДНК (UM), характерной для транскрибируемых регионов генома. Обогащение фрагментами с полуметилированной ДНК (UM) использовали для создания геномных библиотек *Pinus taeda* L. [32].

Метил-чувствительный рестрикционный фермент MspI использовали для обогащения ДНК *Pinus taeda* L. полуметилированной ДНК (UM) до получения библиотеки. Затем фрагменты ДНК размером более 9 кб отделяли и переваривали рестриктазой RsaI. Авторами было создано девять библиотек, обогащенных динуклеотидными и тринуклеотидными. В общей сложности из 11904 клонов было

отобрано 1016, содержащих микросателлиты. Уникальными из отобранных клонов были 620. Клоны были секвенированы, и на основе анализа фрагментов ДНК, фланкирующих микросателлитные повторы, были разработаны 245 пар праймеров, дающих продукты амплификации. Авторы показали, что на основе 113 из них могут быть разработаны микросателлитные маркеры (UM-SSR). Было выявлено, что 70 из предложенных локусов являются полиморфными.

Из 36 тестированных полиморфных маркеров 31 микросателлит (86%) имел однолокусное наследование. У девятнадцати UM-SSR были высокоинформативные спектры амплификации. Число и частота аллелей были определены для одиннадцати SSR при тестировании этих маркеров на 141 дереве из природных популяций. Число аллелей для разработанных UM-SSR варьировало от 3 до 12 со средним значением 5,7 аллелей на локус. Из 63 аллелей только 14 были редкими ( $q < 0,05$ ). Мера информационного полиморфизма PIC варьировала для разработанных маркеров от 0,410 до 0,885. Авторы пришли к выводу, что обогащение ДНК полуметилированной ДНК является эффективным методом для разработки полиморфных микросателлитов для видов растений с очень большими геномами [32].

Тем не менее, по мнению C. Liewlaksaneeyanawin [17], маркеры, происходящие из UM библиотек, обладают меньшей полиморфностью, чем SSR, разработанные из библиотек, обогащенных низкокопийной ДНК.

Таким образом, на основе генома сосны ладанной разработаны микросателлитные маркеры с названием PtTX из геномных библиотек, не обогащенных и обогащенных динуклеотидами и тринуклеотидами (G), обогащенных низкокопийными (LC) и полуметилированными фрагментами ДНК (UM).

#### **EST-SSR-маркеры**

C. Liewlaksaneeyanawin и соавторы [17] разработали EST-SSR-маркеры, пригодные для исследований на *Pinus contorta*. С этой це-

люю авторами был проведен скрининг доступных баз данных EST ладанной сосны. Были идентифицированы 14 EST-SSR-маркеров и оценена возможность их использования для исследований видов *P. contorta* ssp. *latifolia*, *P. ponderosa* и *P. sylvestris*. По данным, приведенным авторами, 4 EST-SSR-маркера серии LOP были полиморфными на особях сосны обыкновенной. Число аллелей варьировало от 2 до 5.

D.E. Harry с соавторами [14] были разработаны маркеры из библиотек cDNA сосны ладанной – EST-SSR-маркеры. Библиотека cDNA клонов была первоначально использована для выявления полиморфизмов длины рестриционных фрагментов ПДПФ (RFLPs). Секвенированные клоны использовались в качестве зондов для создания генетической карты. Затем были выбраны клоны из относительно простых семейств генов и в них были секвенированы последовательности около 200 пар нуклеотидов на каждом конце вставки cDNA. На основе этих последовательностей были разработаны 22 пары праймеров, названных rPtIFG. Было показано, что для новых SSR-маркеров характерно менделевское кодоминантное наследование. Некоторые локусы были соотнесены с наиболее вероятными белками (ферментами), на основе сравнения последовательностей в GenBank. По мнению Elsiк и соавторов, эти маркеры обладали низким уровнем полиморфизма [10].

D. Chagne и соавторы [7] также использовали скрининг двух доступных баз данных видов *Pinus taeda* и *P. pinaster* для поиска SSR, пригодных для использования на родственных видах сосны. С целью обнаружения повторяющихся ди-, три- и тетра-нуклеотидов использовали программу SSRITscript. Всего было выявлено 419 простых повторов (SSR). Было показано, что только 12,8% локусов перекрывались между наборами данных двух видов. Положение SSR в пределах кодирующих последовательностей было предсказано с использованием программы FrameD. Тринук-

леотиды оказались наиболее распространенным повторяющимся мотивом, составляя 63 и 51% у *Pinus taeda* L. и *P. pinaster* Ait., соответственно. Как правило, тринуклеотидные повторы находились внутри транскрибируемых регионов (76% у обоих видов), тогда как динуклеотидные повторы преимущественно локализовались в 5'- и 3'-нетранскрибируемых областях (75 и 65%, соответственно). Пятьдесят три пары праймеров, амплифицирующие один фрагмент, входящие в обе базы данных, были испытаны на образцах ДНК шести других видов сосны. Доля перенесения EST-SSR-маркеров на родственные виды сосен была высокой и соответствовала филогенетическим расстояниям между видами, составляя от 64,6% у *P. canariensis* до 94,2% у *P. radiata*. Было обнаружено, что геномные SSR менее пригодны для использования на других видах: у *P. pinaster* амплифицировалось 54% локусов, найденных у *P. radiata*. Эту же тенденцию отмечали и другие авторы [17]. D. Chagne и соавторы приводят последовательности праймеров, амплифицирующихся у особей сосны обыкновенной, но не представляют данных об аллельном разнообразии и уровне полиморфизма на этом виде [7].

F. Sebastiani и соавторы [23] разработали EST-SSR-праймеры сосны обыкновенной серии Pysl различной полиморфности. Локусы были получены из cDNA библиотек сосны обыкновенной. Из 6641 последовательностей было отобрано 55 пар праймеров, которые тестировали на 44 особях из двух российских и одной финской популяций сосны обыкновенной. Десять пар праймеров давали четкие продукты амплификации ожидаемого размера, в то время как остальные не амплифицировались или имели множественные продукты. Число эффективных аллелей на локус варьировало от 1 до 4,6. Средняя ожидаемая гетерозиготность (He) составила 0,79 на популяцию. В итоге для дальнейшего использования авторами были предложены 10 полиморфных EST-SSR-локусов.

Китайскими исследователями в 2014 г.

были предложены 25 полиморфных EST-SSR-локусов, названных *lw\_isotig*, для оценки биологического разнообразия *P. sylvestris* var. *mongolica*. Этот вид сосны, происходящий из региона Внутренней Монголии, оказался близким к виду *P. tabuliformis* по результатам кластерного анализа. Авторы использовали 31653 EST-последовательности (*isotigs*) этого вида для поиска микросателлитов. Первоначально были разработаны и синтезированы 175 EST-SSR простых праймеров. На последних этапах разработки 25 отобранных локусов были апробированы на 48 деревьях *P. sylvestris* var. *mongolica*. Количество аллелей варьировало от 2 до 8, наблюдаемые и ожидаемые гетерозиготности находились в пределах от 0,0435 до 0,8125 и от 0,0430 до 0,7820, соответственно [12]. Часть из предложенных китайскими исследователями *lw\_isotig* EST-SSR-локусов была протестирована нами на трех естественных (по 30 особей в каждой) и четырех искусственных популяциях (по 15 деревьев) сосны обыкновенной из разных регионов Северо-Запада России [2]. Мы отобрали 9 нейтральных локусов из серии *lw\_isotig*, не содержащих нулевые аллели в исследованных популяциях. Число аллелей у выбранных локусов варьировало от 3 до 5, индекс полиморфизма PIC изменялся от 0,543 до 0,704 [3].

#### Хлоропластные микросателлиты

W. Powell с соавторами [20] отмечают важность применения хлоропластных маркеров для изучения популяций растений, обусловленную асимметричным наследованием и, следовательно, тем, что хлоропластный геном может иметь отличные от ядерного генома закономерности генетического варьирования. Кроме того, у хлоропластных микросателлитов существенно более низкие скорости мутации. Авторами было показано, что хлоропластные моноповторы (однонуклеотидные микросателлиты) варьиабельны по длине, как и ядерные микросателлиты, и у однолетних, и у многолетних растений. Полиморфизм по длине обусловлен изменением количества по-

второв. Также было показано неслучайное географическое распределение вариаций в этих локусах.

Полиморфный мононуклеотидный хлоропластный микросателлит с повторами (dA)-(dT), расположенный в межгенной области между генами *trnK* и *psbA*, был выявлен у трех видов сосны (*Pinus contorta*, *P. sylvestris* и *P. thunbergii*). После амплификации этого микросателлита на 11 видах сосны было выявлено 9 вариантов длины фрагмента [21].

G.G. Vendramin и соавторы разработали для анализа генетического разнообразия хвойных пород другие микросателлитные маркеры хлоропластного происхождения. Хлоропластные микросателлиты показывают более низкие скорости мутирования, чем ядерные SSR, и в связи с однородительским наследованием (по отцовской линии у хвойных) они могут быть полезны для мониторинга потока генов [29, 30]. Поиск *cpSSR* значительно облегчается благодаря полному секвенированию хлоропластных геномов для большого числа видов. Авторами были предложены 20 пар праймеров (Pt), фланкирующих мононуклеотидные участки в хлоропластном геноме *Pinus thunbergii*. Маркеры были разработаны с использованием данных полногеномного секвенирования сосны черной и компьютерной программы PRIMER версии 0.5. Праймеры были разработаны таким образом, чтобы продукты амплификации имели разные размеры, и их можно было мультиплексировать в одном геле (или в одном капилляре). Авторы полагают, что из-за высокой степени консервативности хлоропластных геномов, особенно в кодирующей области, возможно разработать праймеры, которые будут пригодны для использования у широкого круга видов.

Универсальность предлагаемых 20 пар праймеров проверяли на других видах рода *Pinus* (*P. leucodermis* Ant., *P. brutia* Ten., *P. halepensis* Mill., *P. pinaster* Ait., *P. pinea* L., *P. sylvestris* L.), а также на других видах из семейства *Pinaceae*, принадлежащих родам *Abies*, *Cedrus* и *Picea*.

Другая группа хлоропластных маркеров была разработана J. Provan с соавторами [22]. Эти исследователи также проанализировали полную последовательность генома хлоропластов черной сосны (*Pinus thunbergii*). Для поиска мононуклеотидных повторов (A/T)<sub>n</sub> и (G/C)<sub>n</sub> они использовали программное обеспечение STRINGSEARCH. Было обнаружено 19 мононуклеотидных повторов, содержащих более 10 нуклеотидов. Праймеры были разработаны с помощью программы PRIMER, версия V0.5. Эти авторы, напротив, избегали отбора микросателлитов из

транскрибируемого региона. Так, повтор в позиции 107569 (bp), находящийся в кодирующей последовательности гена *grl32*, был не принят во внимание, так как авторы полагают, что локусы SSR в кодирующих областях находятся под давлением селективного отбора и могут иметь незначительный полиморфизм или вовсе не иметь его. Группе локусов было дано название РСР.

Обобщенные данные о SSR-локусах, разработанных для сосен, и применяемых образцах ДНК сосны обыкновенной приведены в таблице 1.

Таблица 1

## Группы SSR-локусов, апробированные на сосне обыкновенной

№ п/п	Название группы локусов	Вид библиотеки	Ботанический вид, для которого разработаны праймеры (тестированы)	Литературный источник
1	SPA	G – обогащенные (AC <sub>n</sub> ) и (AG <sub>n</sub> )	<i>Pinus sylvestris</i>	[24]
2	PtTX	LC	<i>P. taeda</i>	[10, 11]
3	PtTX	UM	<i>P. taeda</i>	[32]
4	LOP	EST	<i>P. taeda</i>	[17]
5	pPtIFG	EST	<i>P. taeda</i>	[14]
6	ctg	EST	<i>P. taeda</i> , <i>P. pinaster</i>	[7]
7	psyl	EST	<i>P. sylvestris</i>	[23]
8	lw_isotig	EST	<i>P. tabuliformis</i> ( <i>P. sylvestris</i> var. <i>mongolica</i> )	[12]
9	Pt	Cp	<i>Pinaceae</i>	[29]
10	PCP	Cp	<i>Pinus thunbergii</i>	[22]

В последнее десятилетие ряд авторов начал разработку мультиплексов микросателлитных маркеров.

Теоретически, принципы, по которым отбирают локусы для мультиплексов, должны основываться на их кодоминантности, нейтральности маркеров, воспроизводимости амплификации, отсутствии множественных полос. В генетике животных исследователи выбирают маркеры, расположенные на разных хромосомах, и при большом числе маркеров на одной хромосоме – на большом расстоянии друг от друга.

Проведение мультиплексной ПЦР, позволяющей в одной пробирке получать продукты амплификации нескольких локусов, ведет к экономии реагентов и времени работы приборов. Это достигается за счет использования разных флуоресцентных красителей для нескольких локусов, амплифицирующихся в одной пробирке. При подборе локусов для мультиплексирования учитываются возможности отжига праймеров разных локусов друг на друга, конкуренция праймеров и длины амплифицируемых фрагментов. Микросателлитный анализ на капиллярных

секвенаторах позволяет быстро получить более точные и достоверные, по сравнению с детекцией в полиакриламидных гелях, результаты по аллельному разнообразию в изучаемых SSR-локусах.

В таблице 2 перечислены 34 опубликованных мультиплекса сосны обыкновенной: из них 24 содержат ядерные микросателлиты (мультиплексы 1–24) и 11 – хлоропластные SSR-локусы (мультиплексы 25–35).

Таблица 2

Мультиплексы микросателлитных маркеров, используемые для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной

№ п/п	Мультиплекс	Литературный источник
1	<i>psyl2</i> , <i>psyl25</i> , <i>psyl42</i> , <i>SPAG7.14</i>	
2	<i>psyl57</i> , <i>psyl18</i>	[8]
3	<i>psyl16</i> , SPAC11.4, <i>psyl44</i> , <i>PtTX4011</i> , <i>SPAC12.5</i> , PtTX4001	
4	<i>SPAC 11.8</i> , SPAC11.4, <i>SPAC11.6</i> , <i>SPAG7.14</i>	
5	<i>SPAC12.5</i> , <i>SPAG3.7</i> , <i>SPAC11.5</i>	
6	<i>psyl19</i>	
7	<i>psyl2</i> , <i>psyl25</i> , <i>psyl42</i> , <i>SPAG7.14</i>	
8	<i>psyl57</i> , <i>psyl17</i> , <i>SPAC11.6</i> , <i>psyl18</i>	
9	<i>psyl16</i> , SPAC11.4, <i>psyl36</i> , <i>PtTX3107</i> , <i>psyl44</i> , <i>PtTX4011</i> , <i>SPAC12.5</i> , PtTX4001	
10	<i>psyl2</i> , <i>psyl16</i> , <i>psyl17</i> , <i>psyl18</i> , <i>psyl44</i>	
11	<i>psyl36</i> , SPAC11.4	[19]
12	<i>psyl42</i> , <i>psyl57</i> , <i>SPAC12.5</i>	
13	<i>SPAG7.14</i> , <i>PtTX4011</i> , PtTX4001, <i>PtTX3107</i>	
14	<i>psyl2</i> , <i>psyl16</i> , <i>psyl18</i> , <i>psyl19</i> , <i>psyl25</i> , <i>psyl36</i> , <i>psyl42</i> , <i>psyl44</i> , <i>psyl57</i>	
15	<i>PtTX2146</i> , <i>PtTX3107</i> , <i>SPAG7.14</i>	[33]
16	PtTX3025, SPAC11.4, <i>PtTX4011</i> , PtTX4001, <i>PtTX3032</i>	
17	PtTX3016, PtTX3020, <i>PtTX4011</i> , <i>PtTX3049</i>	[13]
18	Ctg4363, <i>Ctg1376</i> , <i>PtTX3107</i> , PtTX4001	
19	<i>psyl2</i> , <i>psyl25</i> , <i>psyl42</i> , <i>SPAG7.14</i>	
20	<i>psyl18</i> , <i>psyl57</i>	[15]
21	<i>psyl16</i> , <i>psyl44</i> , SPAC11.4, <i>SPAC12.5</i> , PtTX4001, <i>PtTX4011</i>	
22	<i>PtTX2146</i> ; LOP 1; LOP 3	
23	LOP 5; <i>SPAG7.14</i>	[16]
24	PtTX4001, <i>SPAC 11.8</i> ; <i>PtTX3107</i>	
25	Pt36480, Pt110048, Pt87268, Pt26081, Pt15169	[8]
26	Pt45002, Pt9383, Pt71936, Pt48210, Pt107148	
27	Pt26081, Pt30204, Pt87268	
28	Pt15169, Pt71936	
29	Pt15169, Pt26081, Pt30204, Pt36480, Pt45002, Pt71936	
30	PCP1289, PCP26106, PCP30277, PCP36567, PCP41131, PCP45071, PCP87314, PCP102652	[33]



№ п/п	Мультиплекс	Литературный источник
31	Pt26081, Pt71936, Pt36480	[6]
32	Pt15169, Pt30204, Pt87268	
33	Pt41903, Pt71963, Pt15169, Pt30204	[15]
34	PCP1289, PCP87314, PCP71987, PCP30277, PCP26106, PCP45071	
35	PCP87314, Pt26081, Pt15169, Pt30204, Pt36480, Pt71936	[9]

Примечание. Названия локусов, забракованных авторами мультиплексов, выполнены полужирным курсивом.

Из ядерных микросателлитов чаще всего в мультиплексах были использованы локусы SPAG7.14 и PtTX4001 (в 7 из 24 мультиплексов). Несколько меньше представлены локусы SPAC11.4 и PtTX4011 (в 6 мультиплексах). Локусы *psyl2*, *psyl16*, *psyl18*, *psyl42*, *psyl44*, *psyl57*, SPAC12.5, PtTX3107 встречаются в 5 мультиплексах. В 4 мультиплексах используют локус *psyl25*. Локус *psyl36* встречается в 3 мультиплексах. В 2 мультиплексах присутствуют локусы *psyl17*, *psyl19*, SPAC11.6, PtTX2146, SPAC11.8. Остальные локусы используются только в 1 мультиплексе – PtTX3032, PtTX3025, PtTX3016, PtTX3020, PtTX3049, Ctg4363, Ctg1376, LOP1, LOP3, LOP5, SPAG3.7, SPAC11.5.

Среди хлоропластных микросателлитов самым популярным является локус Pt15169, который встречается в 6 из 11 хлоропластных мультиплексах. Чуть менее часто встречаются локусы Pt26081, Pt30204 и Pt71936 (в 5 мультиплексах), и Pt36480 (в 4-х). В 3 мультиплексах используются локусы Pt87268 и PCP87314. В 2 мультиплексах представлены локусы Pt45002, PCP1289, PCP30277, PCP26106, PCP45071. По 1 разу встречаются следующие локусы: Pt41903, Pt71963, PCP36567, PCP41131, PCP102652, PCP71987, Pt107148, Pt48210, Pt9383, Pt110048.

Несмотря на широкое использование большого числа микросателлитов в предлагаемых мультиплексных панелях, многие авторы не рекомендуют использование ряда локусов из-за наличия однонуклеотидных повторов, плохой амплификации, сложностей в

интерпретации результатов, наличия нулевых аллелей или малой информативности.

В проекте Trees for the Future [8] в лаборатории CNR локус *psyl19* амплифицировали отдельно из-за конкуренции с праймерами для других локусов.

P. Machova с соавторами в своей работе [19] характеризует локусы *psyl2* и *psyl36* как мало информативные. С помощью программы Micro-Checker установлено наличие нулевых аллелей в локусах *psyl16*, PtTX 3107, PtTX4011 и SPAG7.14.

W.B. Zukowska с соавторами [33] по результатам своих исследований рекомендуют опустить некоторые локусы nSSR с частотой нулевых аллелей, превышающей 5%, включая *psyl18*, PtTX3107, SPAG7.14 и PtTX4011. Авторы предлагают 5 хорошо продуманных мультиплексов, состоящих из хлоропластных и ядерных микросателлитов, которые могут быть применены в популяционных генетических исследованиях как *Pinus sylvestris*, так и *P. mugo*. Маркер PCP30277, который входит в состав мультиплекса № 30, показывает видоспецифические аллельные структуры и, по мнению авторов, идеален для изучения межвидового потока генов в зонах контакта этих видов.

M.R. Garcia Gil с коллегами в своем исследовании [13] обнаружили частоту встречаемости нулевых аллелей более 25% в локусах PtTX4011, PtTX3049 и Ctg1376 и исключили их из дальнейшей работы. А.А. Ильинов и Б.В. Раевский [1] отмечали нулевые аллели в локусах PtTX2146, SPAC12.5, SPAC11.8.

G.M. Unger с соавторами [28] сообщают об исключении локусов *psyl2*, *psyl16*, *psyl19*, *PtTX3107*, *SPAG7.14*, *SPAC11.6* и *SPAC12.5* из статистического анализа из-за проблем с генотипированием, анализом данных или слабой амплификации. Локус *psyl25* был мономорфным для сосны обыкновенной, распределение аллелей в локусе *PtTX4011* значительно отклонялось от равновесия Харди-Вайнберга.

P. Belletti с соавторами [5] тестировали 12 микросателлитов, 10 из которых (*SPAC11.4*, *SPAC11.6*, *SPAC11.8*, *SPAC12.5*, *SPAG7.14*, *PtTX3032*, *PtTX3107*, *PtTX3116*, *PtTX4001* и *PtTX4011*) показали четкие и воспроизводимые результаты. Авторы отмечают, что локус *SPAC11.5* не амплифицировался ни в одном образце, а локус *SPAC3.7* не амплифицировался в большинстве образцов. Поэтому эти два маркера были исключены из анализа; *SPAC11.8* также был исключен из-за высокой частоты возможных нулевых аллелей (0,57). Было обнаружено наличие нулевых аллелей для 6 из оставшихся 9 локусов с частотами от 0,07 (*PtTX3032*) до 0,19 (*SPAC11.6*).

Рассмотрев литературные данные по применению ядерных микросателлитных локусов сосны обыкновенной, входящих в состав разработанных и апробированных ранее мультиплексов, можно отметить, что из 31 использованного локуса авторы рекомендуют отказаться от 19. При этом из наиболее используемых в опубликованных мультиплексах 12 локусов авторы забраковали 10.

Самыми частыми причинами отказа от использования микросателлитов были наличие нулевых аллелей и малая информативность. Можно предположить, что исследователи на первых этапах скрининга отбирали стабильно амплифицируемые локусы, от большей части из которых впоследствии были вынуждены отказаться после их апробации на массовом материале из-за наличия большого количества нулевых аллелей и низкой полиморфности в тестируемых популяциях. Также авторы браковывали микросателлиты, для которых возникали сложности в интерпретации результатов из-за наличия однонуклеотидных повторов.

Таким образом, несмотря на то, что разработано и предложено значительное число мультиплексов ядерных микросателлитов, из анализа литературных данных следует, что опубликованные панели SSR-маркеров все еще находятся в стадии разработки и не являются готовыми инструментами для проведения исследований по изучению генетического разнообразия. Работа по составлению более удобных панелей SSR-маркеров, по изменению состава и количества локусов пригодных для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной, на настоящий момент остается актуальной. По нашему мнению, намечается тенденция к отбору для микросателлитного анализа ядерных локусов из транскрибируемых областей ДНК и хлоропластного генома сосны, для которых характерны меньшие скорости мутирования.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Ильинов, А.А. Состояние генофонда сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Карелии / А.А. Ильинов, Б.В. Раевский // Сибирский лесной журнал. – 2016. – Вып. 5. – С. 45–54.
2. Калько, Г.В. Микросателлитный анализ природных и искусственных популяций *Pinus sylvestris* L. на Северо-Западе России / Г.В. Калько, Т.М. Котова, М.В. Кузьмина // Современная лесная наука: проблемы и перспективы. Материалы Всероссийской научно-практической конференции 20–22 декабря 2017 года. – Воронеж: Истоки, 2017. – С. 27–32. – ISBN 978–5–4473–0181–1.

3. Калько, Г.В. Тестирование ядерных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной / Г.В. Калько // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства / ФБУ «СПбНИИЛХ», председатель редкол., гл. ред. А.В. Константинов. – 2017. – № 1. – С. 23–34.
4. Сулимова, Г.Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – С. 260–271. – ISSN 0042–1324.
5. Belletti, P. Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy / P. Belletti, D. Ferrazzini, A. Piotti, I. Monteleone & F. Ducci // European Journal of Forest Research. – 2012, July. – Vol. 131, № 4. – P. 1127–1138. –DOI 10.1007/s10342–011–0584–3. – Online ISSN: 1612–4669.
6. Bilgen, B.B. Genetic diversity among *Pinus sylvestris* L. populations and its implications for genetic conservation: comparison of nuclear and chloroplast microsatellite markers / B.B. Bilgen, N. Kaya // Fresenius Environmental Bulletin. – 2017. – Vol. 26, № 11. – P. 6873–6881.
7. 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. Frigerio, C. Echt, T. Richardson, C. Plomion // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Vol. 109 (6). – P. 1204–1214. – ISSN 0040–5752.
8. 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.
9. Dzialuk, A. PCR-Multiplex of Six Chloroplast Microsatellites for Population Studies and Genetic Typing in *Pinus sylvestris* / A. Dzialuk, J. Burczyk // Silvae Genetica. – 2004. – Vol. 53 (5–6). – P. 246–248. – DOI: 10.1515/sg-2004–0045.
10. Elsik, C.G. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. / C.G. Elsik, V.T. Minihan, S.E. Hall, A.M. Scarpa, C.G. Williams // Genome. – 2000. – Vol. 43. – P. 550–555.
11. Elsik, C.G. Low-copy microsatellite recovery from a conifer genome / C.G. Elsik, C.G. Williams // Theoretical and Applied Genetics. – 2001. – Vol. 103, issue 8. – P. 1189–1195.
12. Fang, P. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*) / P. Fang, S. Niu, H. Yuan, Z. Li, Y. Zhang, L. Yuan, W. Li // Applications in Plant Sciences. – Электрон. дан. – 2014. – Vol. 2 (1). – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1300057>. – Загл. с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения: 15.01.2016.
13. García Gil, M.R. Genetic diversity and inbreeding in natural and managed populations of Scots pine / M.R. García Gil, V. Floran, L. Östlund, T.J. Tim Mullin, B. Andersson Gull // Tree Genetics & Genomes. – Электрон. дан. – 2015. – 11:28. – P. 1–12. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1007/s11295–015–0850–5>. – Загл. с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения: 17.03.2017. – Online ISSN: 1614–2950.
14. Harry, D.E. Codominant PCR-based markers for *Pinus taeda* developed from mapped cDNA clones / D.E. Harry, B. Temesgen, D.B. Neale // Theoretical and Applied Genetics. – 1998. – Vol. 97. – P. 327–336.
15. Kavaliauskas, D. Genetic structure and genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Lithuania: PhD Thesis / D. Kavaliauskas. – Kaunas: Akademija, 2015. – 147 p.
16. Koubová, M. Screening of selected microsatellite markers for population genetic studies of hybrid pines (*Pinus mugo* × *Pinus sylvestris*) / M. Koubová, J. Michalko, A. Kormuťák // Proceedings of the 15th International scientific conference of PhD students, young scientists and pedagogues. – Slovak Republic: Nitra, 2014. – October 22. – P. 118–125. – ISBN 978–80–558–0650–1.

17. Liewlaksaneeyanawin, Ch. Single-copy, speciestransferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs / Ch. Liewlaksaneeyanawin, C.E. Ritland, Y.A. El-Kassaby, K. Ritlan // *Theoretical and Applied Genetics*. – 2004. – Vol. 109. – P. 361–369.
18. 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.
19. Máchová, P. Genetic variability of selected populations of scots pine in the Czech Republic / P. Máchová, H. Cvrčková, L. Poláková, O. Trčková // *Zprávy lesnického výzkumu – Reports of Forestry Research*. – 2016. – Vol. 61, issue 3. – P. 223–229.
20. Powell, W. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines / W. Powell, M. Morgante, R. McDevitt, G.G. Vendramin, J.A. Rafalski // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1995. – Vol. 92. – P. 7759–7763.
21. Powell, W. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome / W. Powell, M. Morgante, C. Andre et al. // *Current Biology*. – 1995. – Vol. 5. – P. 1023–1029.
22. Provan, J. Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats / J. Provan, N. Soranzo, N.J. Wilson, J.W. McNicol, G.I. Forrest, J. Cottrell, W. Powell // *Proceedings of the Royal Society of London B: biological sciences*. – Электрон. дан. – 1998. – Vol. 265, issue 1407. – P. 1697–1705. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0491>. – Загл. с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения: 20.02.2018.
23. Sebastiani, F. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. / F. Sebastiani, F. Pinzauti, S.T. Kujala, S.C. Gonzalez-Martinez, G.G. Vendramin // *Conservation Genetics Resources*. – 2012. – Vol. 4, issue 2. – P. 231–234. – DOI: 10.1007/s12686-011-9513-5.
24. Soranzo, N. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. / N. Soranzo, J. Provan, W. Powell // *Molecular Ecology*. – 1998. – Vol. 7. – P. 1260–1261.
25. 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.
26. The state of the world's animal genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2007. – 512 p.
27. The state of the world's forest genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2014. – 304 p.
28. Unger, G.M. Estimating exotic gene flow into native pine stands: zygotic vs. gametic components / G.M. Unger, G.G. Vendramin, J.J. Robledo-Arnuncio // *Molecular Ecology*. – 2014. – Vol. 23. – P. 5435–5447. – DOI: 10.1111/mec.12946.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Zhou, Y. Undermethylated DNA as a source of microsatellites from a conifer genome / Y. Zhou, T. Bui, L.D. Auckland, C.G. Williams // *Genome*. – 2002. – Vol. 45. – P. 91–99. – DOI: 10.1139/G01-119.
33. Żukowska, W.B. Cross-amplification and multiplexing of cpSSRs and nSSRs in two closely related pine species (*Pinus sylvestris* L. and *P. mugo* Turra) / W.B. Żukowska, B. Wójkiewicz, M. Litkowiec, W. Wachowiak // *Dendrobiology*. – Электрон. дан. – 2017. – Vol. 77. – P. 59–64. – Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.077.005>. – Загл. с экрана. – Яз. англ. – Дата обращения: 25.01.2018.

REFERENCES

1. Ilyinov A.A., Rayevsky B.V. Sostoyaniye genofonda sosny obyknovnoy *Pinus sylvestris* L. v Karelii. *Sibirsky lesnoy zhurnal*, 2016, vol. 5, pp. 45–54. (In Russian)
2. Kalko G.V., Kotova T.M., Kuzmina M.V. Mikrosatellitny analiz prirodnykh i iskusstvennykh populyatsy *Pinus sylvestris* L. na Severo-Zapade Rossii. *Sovremennaya lesnaya nauka: problemy i perspektivy. Proceedings of the Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy conference 20–22 dekabrya 2017 goda*. Voronezh: Istoki, 2017, pp. 27–32, ISBN 978–5-4473–0181–1. (In Russian)
3. Kalko G.V. Testirovaniye yadernykh mikrosatellitnykh markerov sosny obyknovnoy. *Proceedings of the Saint Petersburg Forestry Research Institute*, 2017, № 1, pp. 23–34. (In Russian)
4. Sulimova G.E. DNK-markery v geneticheskikh issledovaniyakh: tipy markerov, ikh svoystva i oblasti primeneniya. *Uspekhi sovremennoy biologii*, 2004, vol. 124, pp. 260–271, ISSN 0042–1324. (In Russian)
5. Belletti P., Ferrazzini D., Piotti A., Monteleone I., Ducci F. Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy. *European Journal of Forest Research*, 2012, july, vol. 131, № 4, pp. 1127–1138, DOI 10.1007/s10342–011–0584–3, online ISSN: 1612–4669.
6. Bilgen B.B., Kaya N. Genetic diversity among *Pinus sylvestris* L. populations and its implications for genetic conservation: comparison of nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2017, vol. 26, № 11, pp. 6873–6881.
7. Chagne D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M.T., Vendramin G.G., Garcia V., Frigerio J.M., Echt C., Richardson T., Plomion C. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, vol. 109 (6), pp. 1204–1214, ISSN 0040–5752.
8. 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.
9. Dzialuk A., Burczyk J. PCR-Multiplex of Six Chloroplast Microsatellites for Population Studies and Genetic Typing in *Pinus sylvestris*. *Silvae Genetica*, 2004, vol. 53 (5–6), pp. 246–248, DOI: 10.1515/sg-2004–0045.
10. Elsik C.G., Minihan V.T., Hall S.E., Scarpa A.M., Williams C.G. Low-copy microsatellite markers for *Pinus taeda* L. *Genome*, 2000, vol. 43, pp. 550–555.
11. Elsik C.G., Williams C.G. Low-copy microsatellite recovery from a conifer genome. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, vol. 103, issue 8, pp. 1189–1195.
12. Fang P., Niu S., Yuan H., Li Z., Zhang Y., Yuan L., Li W. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*). *Applications in Plant Sciences*, elektron. dan., 2014, vol. 2 (1), <http://dx.doi.org/10.3732/apps.1300057>
13. García Gil M.R., Floran V., Östlund L., Tim Mullin T.J., Andersson Gull B. Genetic diversity and inbreeding in natural and managed populations of Scots pine. *Tree Genetics & Genomes*, elektron. dan., 2015, 11:28, pp. 1–12, <https://doi.org/10.1007/s11295–015–0850–5>, online ISSN: 1614–2950.
14. Harry D.E., Temesgen B., Neale D.B. Codominant PCR-based markers for *Pinus taeda* developed from mapped cDNA clones. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, vol. 97, pp. 327–336.
15. Kavaliauskas D. Genetic structure and genetic diversity of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) populations in Lithuania: *PhD Thesis*. Kaunas, Akademiija, 2015, 147 p.
16. Koubová M., Michalko J., Kormuťák A. Screening of selected microsatellite markers for population genetic studies of hybrid pines (*Pinus mugo* × *Pinus sylvestris*). *Proceedings of the 15th International scientific conference of PhD students, young scientists and pedagogues*. Slovak Republic, Nitra, 2014, october 22, pp. 118–125, ISBN 978–80–558–0650–1.

17. Liewlaksaneeyanawin Ch., Ritland C.E., El-Kassaby Y.A., Ritlan K. Single-copy, speciestransferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, vol. 109, pp. 361–369.
18. 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.
19. Máchová P., Cvrčková H., Poláková L., Trčková O. Genetic variability of selected populations of scots pine in the Czech Republic. *Zprávy lesnického výzkumu – Reports of Forestry Research*, 2016, vol. 61, issue 3, pp. 223–229.
20. Powell W., Morgante M., McDevitt R., Vendramin G.G., Rafalski J.A. Polymorphic simple sequence repeat regions in chloroplast genomes: Applications to the population genetics of pines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1995, vol. 92, pp. 7759–7763.
21. Powell W., Morgante M., Andre C. et al. Hypervariable microsatellites provide a general source of polymorphic DNA markers for the chloroplast genome. *Current Biology*, 1995, vol. 5, pp. 1023–1029.
22. Provan J., Soranzo N., Wilson N.J., McNicol J.W., Forrest G.I., Cottrell J., Powell W. Gene-pool variation in Caledonian and European Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) revealed by chloroplast simple-sequence repeats. *Proceedings of the Royal Society of London B: biological sciences*, elektron. dan., 1998, vol. 265, issue 1407, pp. 1697–1705, <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0491>
23. Sebastiani F., Pinzauti F., Kujala S.T., Gonzalez-Martinez S.C., Vendramin G.G. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conservation Genetics Resources*, 2012, vol. 4, issue 2, pp. 231–234, DOI: 10.1007/s12686-011-9513-5.
24. Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*, 1998, vol. 7, pp. 1260–1261.
25. Tautz D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, vol. 17, pp. 6463–6471.
26. The state of the world's animal genetic resources. FAO, Rome, 2007, 512 p.
27. The state of the world's forest genetic resources. FAO, Rome, 2014, 304 p.
28. Unger G.M., Vendramin G.G., Robledo-Arnuncio J.J. Estimating exotic gene flow into native pine stands: zygotic vs. gametic components. *Molecular Ecology*, 2014, vol. 23, pp. 5435–5447, DOI: 10.1111/mec.12946.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. Zhou Y., Bui T., Auckland L.D., Williams C.G. Undermethylated DNA as a source of microsatellites from a conifer genome. *Genome*, 2002, vol. 45, pp. 91–99, DOI: 10.1139/G01-119.
33. Żukowska W.B., Wójkiewicz B., Litkowiec M., Wachowiak W. Cross-amplification and multiplexing of cpSSRs and nSSRs in two closely related pine species (*Pinus sylvestris* L. and *P. mugo* Turra). *Dendrobiology*, elektron. dan., 2017, vol. 77, pp. 59–64, <http://dx.doi.org/10.12657/denbio.077.005>

Статья поступила в редакцию 26.11.2018