



УДК 630.165.4; 630.174.754:575.174.05.3; 630.174.755:174.015.3

## ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны

© Г.В. Калько

---

### The DNA markers for exploring of genetic resources of spruce and pine

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

The use of DNA markers for exploring the genetic resources of spruce and pine is discussed. Some classifications of DNA markers are considered. A brief historical review of appearance and using of different genetic markers for population genetic studies of spruce and pine is presented. The positive qualities and limitations of different types of these technics as a tools for exploring of population genetics of spruce and pine are discussed. The tendencies in changing of popularity of different DNA markers during last twenty years are noted. Different types of markers discover the differing levels of intraspecific polymorphism: low level show RAPD, RFLP and CAPS; intermediate – AFLP; relatively high – ISSR; high – SSR, SNPs and DAiT. So, microsatellites and SNPs have an advantage over a number of DNA markers. The positive property of microsatellite analysis is that for every gene locus it could be determined whether the individual is heterozygous or homozygous. It is advantage comparably with RAPD, AFLP and ISSR-PCR markers. Analysis of the range of 12-17 microsatellites is the most suitable for intraspecific population studies for population genetics of pine and spruce, particularly for the analysis of genetic diversity. SNPs are very promising markers with high density through the genome and low level of mutations per generation. This method is also very good for estimation of genetic diversity. It could be easily used for evaluation of functional and neutral variability. The preliminary choice of identifying SNPs or selection of SNPs from the databases and correct statistical estimate of data become a critical points. The markers of mitochondrial DNA, on the other hand, are most useful for phylogeographic and geographical research. The species of Pinaceae have three genomes inherited by different ways: the paternal chloroplast, the maternal mitochondrial and nuclear biparental. To obtain a reliable result in population studies of pine and spruce the various independently evolving markers, for example nuclear and mitochondria or nuclear and chloroplast should be used. It allows to study genetic diversity and genetic differentiation of pine and spruce populations more correctly.

**Key words:** DNA markers, microsatellites, SNPs, pine, spruce, genetic resources, genetic diversity

## **ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны**

**Г.В. Калько**

В обзоре обсуждается использование ДНК-маркеров для оценки генетических ресурсов ели и сосны. Представлены некоторые классификации ДНК-маркеров, дан краткий экскурс в историю их появления и использования для популяционно-генетических исследований ели и сосны. Обсуждены положительные свойства и ограничения разных видов генетических маркеров. Рассмотрены тенденции в изменении востребованности различных ДНК-маркеров в последние двадцать лет. Отмечено, что разные виды маркеров выявляют различные уровни внутривидового полиморфизма: низкий показывают RAPD, RFLP и CAPS; средний – AFLP; относительно высокий – ISSR; высокий – SSR, SNPs и DArT. То есть, микросателлиты и SNPs имеют преимущество перед целым рядом ДНК-маркеров. Положительным свойством монолокусного анализа микросателлитов является то, что для каждого генного локуса возможно определить, является ли данная особь гетерозиготой или гомозиготой, в чем и заключается преимущество этих маркеров над RAPD, AFLP и ISSR-PCR. ДНК-анализ с помощью линейки из 12-17 микросателлитов наиболее подходит для внутривидовых популяционно-генетических исследований, особенно для анализа генетического разнообразия. SNPs имеют высокую плотность в геноме и низкий уровень мутаций на поколение. Они также перспективны для изучения генетического разнообразия, их легко использовать в оценке функциональной и нейтральной изменчивости. Однако критической становится предварительная стадия выявления SNP или отбора SNP из базы данных, а также статистическая обработка результатов. Маркеры митохондриальной ДНК наиболее информативны для филогеографических и географических исследований. Для получения надежного результата в популяционных исследованиях ели и сосны важно использовать несколько независимо эволюционирующих маркеров, например, ядерных и хлоропластных или ядерных и митохондриальных. Это позволит не только оценить генетическое разнообразие, но и более корректно определить дифференциацию в популяциях хвойных.

**Ключевые слова:** ДНК-маркеры, микросателлиты, SNP, сосна, ель, генетические ресурсы, генетическое разнообразие

Калько Галина Валентиновна – заведующий исследовательской лабораторией

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

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

194021, Санкт-Петербург, Институтский пр., 21

Тел.: (812) 552-80-21, факс: (812) 552-80-42

### Введение

Генетические ресурсы, согласно определению, принятому в Конвенции ООН о биологическом разнообразии, – генетический материал, представляющий фактическую или потенциальную ценность [6], генетическое разнообразие, которое сохраняется внутри вида, включая разнообразие на уровне ДНК.

В 1995 году Российская Федерация ратифицировала Конвенцию ООН о биологическом разнообразии, взяв на себя ряд обязательств, в том числе – по разработке национальной стратегии по сохранению биоразнообразия.

Лесные генетические ресурсы (ЛГР) – это совокупность генофондов природных и культивируемых популяций лесных древесных растений, имеющих реальную или потенциальную ценность для определенной территории.

Важность глубокой и разносторонней оценки состояния ЛГР отмечена на мировом уровне в докладе «Лесные генетические ресурсы» [41], подготовленном и опубликованном в 2014 году на третьей сессии Межправительственной технической группы по лесным генетическим ресурсам Продовольственной и сельскохозяйственной организации Объединенных Наций (Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO, FAO).

В докладе FAO о состоянии ЛГР подчеркивается, что для эффективного сохранения лесов и управления ими особенно важно охарактеризовать генетическую изменчивость основных лесобразующих видов.

Информация о генетической изменчивости (генетическом разнообразии) в управлении лесами должна быть использована при осуществлении природоохранного планирования и связанной с ним лесохозяйственной практики, направленных на сохранение лесов, их воспроизводство и улучшение [41]. Универсальным инструментом исследования генетического разнообразия являются молекулярные маркеры [42].

Исследование состояния ресурсов ели и сосны, в том числе ели европейской и сосны обыкновенной, длительное время проводили, изучая

наследуемые морфологические признаки, в частности, признаки генеративных органов, косвенным образом отражающие состояние генетических ресурсов. Практическим выходом таких работ были дифференциация популяций ели и сосны в соответствии с морфологическими особенностями, определение таксономической принадлежности тех или иных разновидностей хвойных, ареалов их распространения, прояснение некоторых вопросов эволюции и расселения видов.

Впоследствии стали использовать для оценки генетических ресурсов ели и сосны молекулярные маркеры: маркеры белкового полиморфизма – менее опосредованно, по сравнению с морфологическими признаками, отражающие диапазон изменчивости наследственного материала хвойных пород (выявляющие изменчивость в кодирующей части ДНК, исключая интроны), а затем и ДНК-маркеры – непосредственно характеризующие состояние генетических ресурсов целевых объектов.

Генетические маркеры, впервые обозначенные А.С. Серебровским как «сигнальные гены», детерминируют наследуемый отчетливо выраженный фенотипический признак, различимый у разных особей, который сопряжен с изменчивостью другого качественного или количественного признака. Исследование наследования «сигнального гена», нейтрального по отношению к самому исследуемому гену или признаку, позволяет выявить характер наследования гена интереса.

В настоящее время в качестве маркера может выступать любой фрагмент ДНК, находящийся в тесной генетической связи с анализируемым геном.

Цель настоящей работы – оценить потенциальную пригодность разработанных на настоящий момент ДНК-маркеров для оценки генетического разнообразия, т. е. состояния генетических ресурсов ели и сосны.

Преимуществами ДНК-маркеров является целый ряд возможностей: тестирование любых последовательностей генома; поиск маркеров, равномерно распределенных по всему геному;

анализ материнского типа наследования (митохондриальная ДНК); анализ отцовского типа наследования (у семейства сосновых – ДНК пластид); стабильность наследования; отсутствие плейотропного эффекта; множественность аллелей; информативность о природе генетических изменений; проведение ретроспективных исследований. Дополнительными методическими удобствами можно считать возможность использования любых тканей, ДНК-анализ на любых стадиях развития, длительность хранения образцов ДНК, использование гербарного материала, ископаемых остатков. Для ДНК-маркеров практически отсутствуют ограничения: в числе маркеров на образец имеются маркеры для белок-кодирующих, некодирующих (интронные, межгенные, регуляторные области и т. д.) и повторяющихся последовательностей [13].

#### **Виды ДНК-маркеров**

Методов выявления полиморфизма ДНК на уровне последовательности изначально было предложено три: рестрикционный анализ (применен для этих целей в 1974 г.); полимеразная цепная реакция (ПЦР), открытая Кэри Мюллисом в 1983 г. (Нобелевская премия 1993 г.), и секвенирование, предложенное А. Максамом и У. Гилбертом в 1977 г. (Нобелевская премия за 1980 г. совместно с Ф. Сенгером и П. Бергом). Они описаны в ряде методических работ [7 и др.].

Метод рестрикционного анализа основан на способности ферментов рестрикции специфически разрезать ДНК в определенных сайтах.

Вторым способом выявления полиморфизма ДНК на уровне последовательности, является ПЦР. Метод ПЦР позволяет быстро и с относительно небольшими материальными затратами получить более 10 миллиардов копий определенной последовательности ДНК, представленной в геноме в виде одного или нескольких фрагментов. Существует более двадцати разновидностей или модификаций ПЦР.

Третий способ выявления полиморфизма ДНК – секвенирование. Секвенирование ну-

клеиновых кислот (ДНК или РНК) – это определение их нуклеотидной последовательности. В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде.

Для секвенирования применяют методы Эдмана, Сэнгера и другие. В настоящее время для секвенирования генов обычно используют метод Сэнгера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP). Как правило, до начала секвенирования производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, при помощи ПЦР. Секвенирование полного генома осуществляют при помощи технологий секвенирования нового поколения (next-generation sequencing) [23, 32].

Общепринятой классификации молекулярных маркеров на настоящий момент не существует. В последнее время вышло большое число обзоров, посвященных рассмотрению методов анализа ДНК растений, в том числе и ДНК-маркеров [3, 11, 13, 14 и др.].

Большинство используемых ДНК-маркеров создано на основе ПЦР. С. Schlatterer предложил разделять их на две большие группы: маркеры, созданные на основе небольших изменений в последовательностях ДНК уникальных локусов, и маркеры на основе изменения числа повторов в тандемно повторяющихся последовательностях ДНК [13].

Некоторые авторы классифицируют маркеры, созданные на основе ПЦР, по типу праймеров. ДНК-маркеры со случайными праймерами: RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA); UP-PCR (ПЦР с универсальными праймерами). Маркеры со специфическими праймерами: минисателлитные праймеры; праймеры микросателлитных локусов и др. Комбинированные праймеры: RAMP – (Random Amplified Microsatellite Polimorfism) произвольно амплифицированный микросателлитный полиморфизм; SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) – амплифицированная область, охарактеризованная нуклеотидной последовательностью. В таблице представлена

одна из классификаций ДНК-маркеров.

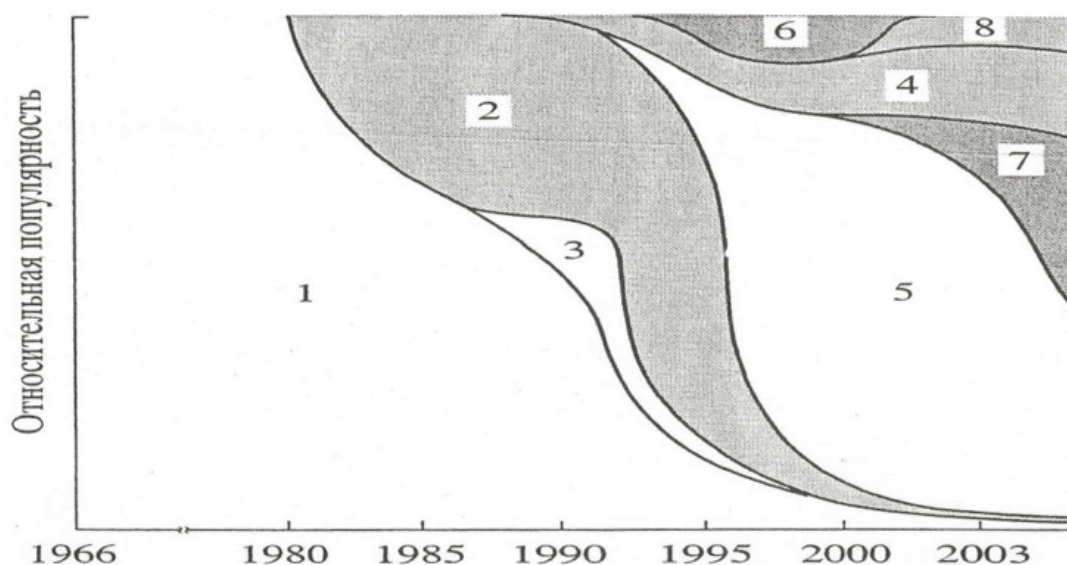
Таблица

Типы ДНК-маркеров и год их первого упоминания в публикациях [14]

Метод, используемый для анализа	Тип ДНК-маркеров	
	Монолокусные	Мультилокусные
Блот-гибридизация	RFLP (1980) полиморфизм длины амплифицированных фрагментов	Минисателлиты (1985)
Полимеразная цепная реакция	SSR (1989) микросателлиты	RAPD (1990) случайные праймеры
	STS (1989) локус, маркированный нуклеотидной последовательностью	ISSR (1994) межсателлитный полиморфизм
	SSCP (1989) полиморфизм конформации одноцепочечной ДНК	AFLP (1995) полиморфизм длины амплифицированных фрагментов
	CAPS (1993) расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности	SSAP (1997) полиморфизм сиквенс специфичной амплификации
	SCAR (1993) амплифицированная область охарактеризованная нуклеотидной последовательностью	IRAP (2006) полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами
ДНК-чипы	SNP (1998)	DArT (2001) ДНК-чип технология

Об относительной популярности использования различных видов ДНК-маркеров исследователями до 2004 г. можно судить по рисунку. В целом можно отметить тенденцию к увеличению числа исследований с применением ДНК-

маркеров, основанных на прямом секвенировании. Также возрастает доля использования SNP и ДНК-чип технологий, не представленных на рисунке.



- 1 – биохимические маркеры (аллозимы)
- 2 – маркеры, полученные на основе рестриционного полиморфизма ДНК (ПДРФ и ПЦР-ПДРФ)
- 3 – минисателлиты
- 4 – маркеры, полученные прямым секвенированием фрагментов ДНК
- 5 – микросателлиты
- 6 – ПЦР-маркеры, полученные с помощью праймеров с произвольной последовательностью (RAPD)
- 7 – полиморфные маркеры с однонуклеотидными заменами (SNP)
- 8 – ПЦР-маркеры на основе полиморфизма длин продуктов амплификации (AFLP)

Рис. Относительная популярность использования молекулярных маркеров [13]

**Полиморфизм длин рестриционных фрагментов** основан на способности ферментов рестрикции специфически разрезать ДНК в определенных сайтах (длина рестриционного сайта 4–6 п. н.). Различия в последовательности ДНК приводят к разрезанию ДНК ферментами рестрикции в разных местах [35]. Полученные с помощью рестриктаз фрагменты ДНК служат маркерами различных процессов, происходящих внутри клетки исследуемого организма.

Таким образом, один из первых по времени возникновения ДНК-маркеров – полиморфизм длин рестриционных фрагментов – ПДРФ/RFLP (Restriction fragment length polymorphism) определяется при использовании ферментов рестрикции (рестриктаз), которые разрезают

ДНК только в точных местах «сайтов рестрикции». В настоящее время наиболее часто ПДРФ/RFLP используют вслед за ПЦР (ПЦР–ПДРФ/PCR–RFLP), для того, чтобы выявить аллели, отличающиеся по нуклеотидным последовательностям в сайте рестрикции. Фрагмент гена амплифицируется с использованием ПЦР и обрабатывается специфическим ферментом рестрикции, который разрезает только одну аллельную форму. Обработанные рестриктазами ампликоны затем разделяют с помощью электрофореза.

**CAPS-маркеры.** CAPS (Cleaved Amplified Polimorphic Sequence) – рестриционный полиморфизм амплифицированных последовательностей или расщепленные амплифицирован-



ные полиморфные последовательности. CAPS-маркеры считаются вторичными. Они фланкируются двумя праймерами, синтезированными на основе известного сиквенса ДНК (например, SCAR-фрагменты). Они специфически амплифицируют единичные фрагменты ДНК, полиморфизм которых выявляется при расщеплении данных фрагментов одной или несколькими эндонуклеазами рестрикции. Преимущества CAPS-маркеров – кодоминантность наследования и высокая надежность. Данный метод нетребователен к количеству матрицы и имеет невысокую стоимость [3].

*ДНК-маркеры на основе ПЦР* подразделяются на следующие группы:

1. *Мультилокусные маркеры (ДНК-фингерпринтинг)*

1) *ПЦР со случайными праймерами*

Одним из наиболее распространенных в недавнем прошлом методов являлся RAPD-метод (Random Amplified Polymorphic DNA) или произвольно амплифицируемая полиморфная ДНК.

Праймеры с произвольной последовательностью должны отвечать определенным требованиям по соотношению GC-пар (приблизительно 60%) и длине. Принцип метода – амплификация фрагмента ДНК с использованием единичного короткого праймера с низкой температурой отжига в реакции ПЦР. Праймер связывается с геномной ДНК в двух различных участках инвертированных повторов. Различия в ДНК-паттернах – наличие или отсутствие полосы или различие ПЦР-продуктов по размерам. Большинство RAPD-маркеров доминантны.

Одновременно с RAPD был предложен аналогичный метод со случайными праймерами большей длины – AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR). Затем были предложены аналогичные техники DAF (DNA Amplified Fingerprinting) и УП ПЦР (ПЦР с универсальными праймерами). Методы отличаются размерами и нуклеотидным составом праймеров: RAPD – 10-12 п. н. (пар нуклеотидов); AP-PCR – около 20 п. н.; DAF – 7-8 п. н.; УП-ПЦР – 25-27 п. н.

Различны также температура отжига и методы выявления продуктов реакции: окрашивание бромистым этидием, радиоавтография, серебрение [13].

При электрофоретическом разделении амплифицированных продуктов образуются дискретные полосы, размер которых достигает от 100 до 5000 пар оснований (ДНК-паттерны) [11]. Различия в ДНК-паттернах определяются модификациями в одном или обоих праймер-связывающих сайтах (наличие или отсутствие полосы ПЦР-продукта в спектре) или присутствием инсерции/делеции в амплифицируемом фрагменте (различие ПЦР-продуктов по размеру). Большинство RAPD-маркеров доминантны [13]. Преимуществом данного метода является техническая простота его проведения, отсутствие необходимости информации о последовательности ДНК, ее небольшое количество для анализа. Для выполнения исследования не требуется применение радиоактивных веществ, метод дешев, существует возможность автоматизации процесса [3].

В 1990-х и 2000-х годах RAPD-метод использовали для выявления генетического разнообразия сосны [25, 31 и др.] и ели [19, 36 и др.]. В настоящее время методы со случайными праймерами применяются все реже (см. рис.) из-за выявившихся ограничений: низкая воспроизводимость, из-за повышенной чувствительности к условиям реакции (к концентрации ионов  $Mg^{2+}$ , соотношению праймер/матрица, температурному режиму).

2) *ISSR-маркеры – межсателлитные повторы*

ISSR-маркеры (Inter Simple Sequence Repeats). Данный вид маркеров является специализированным вариантом RAPD-метода, в котором праймер состоит из микросателлитной последовательности. Используют один или несколько праймеров длиной 15-24 нуклеотида. Праймеры комплементарны микросателлитным повторам (4-12 единиц повтора) и несут на одном из концов последовательность из 2-4 произвольных нуклеотидов («якорь»). Метод позволяет амплифицировать фрагменты ДНК, которые находятся между достаточно

близко расположенными микросателлитными последовательностями (как правило, это уникальная ДНК). В результате амплифицируется много фрагментов (ISSR-фингерпринтинг). Полученные паттерны ПЦР-продуктов в значительной степени видоспецифичны. Маркеры имеют доминантный тип наследования (полиморфизм определяется по наличию/отсутствию полосы). Их используют для выявления меж- и внутривидовой изменчивости. ISSR-маркеры являются наиболее распространенными маркерами, используемыми в настоящее время совместно с методами ДНК-штрихкодирования или с данными секвенирования ITS для филогенетических исследований. Они дешевы в использовании, не требуют предварительных знаний о последовательности ДНК и вместе с тем дают более воспроизводимые результаты, чем RAPD-маркеры [8].

ISSR-маркеры использовали на ели [33, 36 и др.] и на сосне [31, 37 и др.].

3) *AFLP-маркеры* (Amplified fragment length polymorphism) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов. В качестве матрицы используются рестрицированные фрагменты ДНК, легированные со специфическими олигонуклеотидными адаптерами. Проводится амплификация со специально сконструированными праймерами, которые состоят из фиксированной части, содержащей последовательность комплементарную адаптеру и сайту рестрикции использованной эндонуклеазы (приблизительно 15 п. н.), и короткого фрагмента на 3' конце с произвольной последовательностью нуклеотидов (2-4 п. н.). Метод обладает хорошей воспроизводимостью. С каждой парой праймеров амплифицируется 75-100 фрагментов (AFLP-фингерпринтинг).

Маркер имеет доминантный тип наследования. Данная технология используется для изучения генетического разнообразия и перспективна для построения генетических карт у хвойных [17, 28, 30]. Данный вид маркеров совместно с SNP-маркерами был использован для картирования локусов количественных признаков у сосны обыкновенной [29].

## *II. Монолокусные маркеры*

### *1) Микросателлиты*

В особую группу выделены микросателлиты, высокополиморфные маркеры для индивидуальных локусов. Эти маркеры известны под несколькими названиями – STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site) или STR (short tandem repeat), или SSR (simple sequence repeat). Для создания STR подбираются праймеры к уникальным последовательностям ДНК, фланкирующим микросателлитный повтор (требует предварительного знания их нуклеотидной последовательности). Полиморфизм STR определяется копийностью мономерных единиц в кластере, что приводит к существованию множества аллельных вариантов. Гетерозиготность их очень высока (часто более 75%). При создании новых полиморфных маркеров, кроме динуклеотидов используются микросателлиты три- и тетрамерных мотивов. Справочник по микросателлитам хвойных выпущен еще в начале 2000-х годов [18].

Высокая скорость мутирования SSR-повторов, кодоминантный характер наследования, расположение в некодирующей части генома и равномерное распределение по всем хромосомам позволяет оценивать внутри- и межпопуляционный полиморфизм любых видов живых существ. Микросателлиты состоят из участков ДНК длиной в 2-6 п. н. – tandemно повторенных много раз (например, САСАСАСАСАСАСА). Они распространены по всему эукариотическому геному. Микросателлиты имеют относительно малые размеры и могут, следовательно, легко амплифицироваться при использовании ПЦР на ДНК, экстрагируемой из различных источников. Полиморфизмы могут быть визуализированы на секвенирующем геле, и при наличии генетического анализатора можно анализировать большое количество образцов. Микросателлиты гипервариабельны, они часто имеют десятки аллелей по одному локусу, отличающихся один от другого по числу повторов. Их используют для изучения разнообразия, а также для анализа отцовства и картирования локусов количествен-



ных признаков (QTL), родства, принадлежности к конкретной популяции, для исследования гибридизации, эволюционных процессов, для поиска паралогов. Применяются также микросателлитные последовательности с повторами небольшой длины, 2-6 нуклеотидов, при картировании геномов, в работе с редкими видами и т. д. [17, 22].

Уровень генетического разнообразия, выявляемый при использовании микросателлитных маркеров, очень высок. И, тем не менее, при секвенировании микросателлитных повторов у представителей семейства сосновых было установлено, что мутирование не всегда происходит ступенчато (кратно повтору), достаточно часто имеет место размерная гомоплазия (равные размеры микросателлитных повторов при различиях в их последовательностях) [27].

В монолокусном микросателлитном анализе праймеры подбираются на участки, фланкирующие микросателлитные повторы. Амплифицируется и анализируется сам микросателлит. Поскольку фланкирующие последовательности отличаются для разных локусов, то каждая пара праймеров определяет только один локус. Длины этих локусов различны, хотя последовательность одна и та же. Это и есть аллели, анализируемые в монолокусном микросателлитном анализе. Для каждого генного локуса возможно определить, является ли данная особь гетерозиготой или гомозиготой, что является преимуществом по сравнению с другими праймерами.

Критическая точка для анализа популяционной структуры – скорость мутаций микросателлитов, которая обычно на 1-2 порядка выше, чем у аллозимов. Высокая мутабельность и варьирование числа повторов могут приводить к гомоплазиям (когда одинаковые аллели возникают в результате разных мутаций из-за высокой мутабельности при некотором ограниченном числе аллельных состояний) и переоценке генетической дивергенции популяций. Кроме того, к недостаткам этих маркеров относят сложность объединения усилий разных лабораторий по изучению одних и тех же объектов, так

как это требует применения одинаковых праймеров. Монолокусный анализ микросателлитов наиболее подходит для внутривидовых исследований, видовой уровень уже практически исключен из рассмотрения с помощью этих маркеров [1].

В популяционных исследованиях используются микросателлитные маркеры не только ядерного происхождения [9, 10, 16, 21, 24], но и цитоплазматического: митохондриальные [5, 15, 34, 40] и хлоропластные [12, 16, 21, 26].

Использование хлоропластных и митохондриальных маркеров интересно еще и потому, что у сосновых показана двойная односторонняя передача, свойственная хвойным: хпДНК передается потомству гаметой мужского родителя, а мтДНК – женского [5].

2) *SNP* являются вариантами по одному нуклеотиду, которые не меняют общую длину последовательности ДНК в этом регионе. *SNP* встречаются по всему геному. Они широко распространены и их отмечают, например, в геноме человека с частотой один *SNP* на каждую 1000 пар оснований [39].

Большинство *SNP* локализуется в некодирующих областях и не имеет прямого влияния на фенотип индивидуума. Однако некоторые введенные мутации в экспрессирующиеся последовательности или области, влияющие на экспрессию генов (промоторы, энхансеры), могут вызывать изменения в структуре белка или регуляции. Такие *SNP* предоставляют определенные возможности для выявления количественных признаков. Так были использованы *SNP*- и *AFLP*-маркеры для картирования локусов количественных признаков у сосны обыкновенной [29]. *SNP* используется в изучении полиморфизма ДНК как альтернатива микросателлитам [41, 42], а также для генотипирования и построения генетических карт. Это было показано для ладанной сосны [23].

*SNP* могут быть использованы в геномной селекции, что позволит многократно ускорить темпы классической селекции [14].

Несмотря на высокую перспективность, маркеры однонуклеотидного полиморфизма

также обладают рядом недостатков: достаточно сложна предварительная стадия выявления SNPs или отбора SNPs из базы данных [38]; очень важны математические инструменты для адекватного анализа, позволяющие избежать искажения информации [41].

*III. Специфические (вторичные) маркеры.* SCAR – это основанные на ПЦР молекулярные маркеры, происходящие из отдельных RAPD- или ISSR-фрагментов, выявляемые с помощью протяженных специфических праймеров. Для создания SCAR-маркеров полиморфные RAPD- или ISSR-фрагменты вырезают из геля, клонируют и секвенируют. После определения первичной последовательности к концевым участкам фрагмента подбирают SCAR-праймеры длиной около 20-25 оснований [3, 31].

#### **Обсуждение**

Как видно из целого ряда публикаций, в настоящее время для популяционных исследований ели и сосны используют подходы с применением мультилокусных ISSR ДНК-маркеров [31, 33, 36], а также митохондриальных [5, 15, 34], хлоропластных [12, 15, 16, 21, 26] и ядерных микросателлитных маркеров [9, 10, 16, 20, 21, 24].

На основе обзора имеющихся в литературе сведений можно заключить, что достаточную информацию о генетическом разнообразии в популяциях может дать анализ по 15-17 микросателлитным маркерам или большому количеству SNPs [41, 42].

Положительным свойством применения микросателлитов является то, что каждый из двух аллелей локуса может быть идентифицирован. То есть для каждого генного локуса возможно определить, является ли данная особь гетерозиготой или гомозиготой, в чем и заключается неоспоримое преимущество этих маркеров над RAPD, AFLP и ISSR-PCR.

Бипарентальное наследование вместо унипарентального наследования мтДНК и хпДНК определяет достоинство этих маркеров по сравнению с анализом митохондриальных и хлоропластных гаплотипов. Анализ микросателлитов

наиболее подходит для внутривидовых исследований, представляя больший интерес для популяционной генетики, чем для филогенетики [1]. Маркеры митохондриальной ДНК, напротив, наиболее информативны для филогеографических и географических исследований [34, 40].

Разные виды маркеров выявляют различные уровни внутривидового полиморфизма: низкий показывают RAPD, RFLP и CAPS; средний – AFLP; относительно высокий – ISSR; высокий – SSR, SNPs и DAiT [14]. То есть микросателлиты и SNPs имеют преимущество перед целым рядом ДНК-маркеров и на настоящий момент являются самыми перспективными инструментами для исследования генетического разнообразия любых видов живых существ.

Для SSR-маркеров возможна частичная автоматизация процесса исследования (генетические анализаторы). Ускоряет и удешевляет использование микросателлитных маркеров применение мультиплексной ПЦР [24].

Критическая точка для анализа популяционной структуры – скорость мутаций микросателлитов, которая выше скорости мутаций всех известных на настоящий момент генетических маркеров [4]. Она обычно на 1-2 порядка выше, чем у аллозимов. К недостаткам этих маркеров относят сложность объединения усилий разных лабораторий по изучению одних и тех же объектов, так как это требует применения одинаковых праймеров [41].

В.В. Горбачев, применяя коалесцентные модели, показал возможность ошибки I рода при использовании микросателлитов для оценки дифференциации популяций и сделал вывод, что указанный тип локусов подходит более для оценки биологического разнообразия, нежели популяционно-генетической дифференциации [2].

Таким образом, общим выводом из анализа методов выявления полиморфизма ДНК ели и сосны, других растений и животных является то, что наиболее информативными и многообещающими генетическими маркерами для анализа генетического разнообразия на настоящий

момент являются микросателлиты (SSR) и маркеры однонуклеотидного полиморфизма (SNPs) [41, 42].

#### Заключение

Мы полагаем, что на первых этапах для анализа генетического разнообразия хвойных пород следует использовать ядерные маркеры, прежде всего микросателлитные. Во-первых, они имеют двуродительское наследование; во-вторых, в геномах ели и сосны такие маркеры многочисленны, кодоминантны, вариабельны и распространены во всех частях генома; в-третьих, микросателлиты позволяют выявить са-

мый высокий уровень гетерозиготности.

Для получения надежного результата в анализе генетических ресурсов необходимо использовать несколько независимо эволюционирующих маркеров разных типов, например, ядерных и хлоропластных, или ядерных и митохондриальных, микросателлитов и маркеров других видов, что позволит не только выявить генетическое разнообразие хвойных, но и более корректно оценить дифференциацию их популяций, что повысит разрешающую способность ДНК-анализа.

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Банникова, А.А. Молекулярные маркеры и современная филогенетика млекопитающих / А.А. Банникова // Журнал общей биологии. – 2004. – Т. 65, № 4. – С. 278–306.
2. 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. – Т. 15, № 4. – С. 746–749.
3. Гостимский, С.А. Изучение организации и изменчивости генома растений с помощью молекулярных маркеров / С.А. Гостимский, З.Г. Кокаева, Ф.А. Коновалов // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 4. – С. 480–492.
4. Животовский, Л.А. Микросателлитная изменчивость в популяциях человека и методы ее изучения / Л.А. Животовский // Информ. вестник ВОГиС. – 2006. – Т. 10, № 1. – С. 74–96.
5. Захаров-Гезехус, И.А. Цитоплазматическая наследственность / И.А. Захаров-Гезехус // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2014. – Т. 18, № 1. – С. 93–102.
6. Конвенция о биологическом разнообразии. Рио-де-Жанейро, дата вступления в силу: 5 июня 1992 года. Ратифицирована РФ 17.02.1995.
7. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ.; под ред. акад. А.А. Баева и д-ра биол. наук К.Г. Скрыбина. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
8. Матвеева, Т.В. Молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетики растений / Т.В. Матвеева, О.А. Павлова, Д.И. Богомаз [и др.] // Экол. генетика. – 2011. – Т. IX. – С. 32–43.
9. Мельникова, М.Н. Тестирование микросателлитных маркеров на разных популяциях евразийских елей *Picea abies* (L.) Karst. и *Picea obovata* Ledeb. / М.Н. Мельникова, Н.Б. Петров, А.А. Ломов [и др.] // Генетика. – 2012. – Т. 48, № 5. – С. 660–665.
10. 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 [и др.] // Экол. генетика. – 2012. – Т. X, № 2. – С. 40–49.

11. Потокина, Е.К. Современные методы геномного анализа в исследованиях генетики количественных признаков у растений (обзор) / Е.К. Потокина, Ю.В. Чесноков // Сельскохозяйственная биология. – 2005. – № 3. – С. 3–18.
12. Семериков, В.Л. Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Азии и Восточной Европе / В.Л. Семериков [и др.] // Генетика. – 2014. – Т. 50, № 6. – С. 660–669.
13. 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.
14. Хлесткина, Е.К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е.К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2013. – Т. 17, № 4/2. – С. 1044–1054.
15. Шилкина, Е.А. Разработка цитоплазматических SSR-маркеров для исследований сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) / Е.А. Шилкина [и др.] // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 21–24.
16. Экарт, А.К. Применение различных типов генетических маркеров для оценки уровня внутривидовой дифференциации ели сибирской / А.К. Экарт, С.А. Семерикова, В.Л. Семериков [и др.] // Сибирский лесной журнал. – 2014. – № 4. – С. 84–91.
17. Acher, V. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers / V. Acher, P. Faivre-Rampant, S. Jeandroz [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 108. – P. 1602–1613.
18. Auckland, L. Conifer Microsatellite Handbook / L. Auckland [et al.]. – Texas: A&M University, College Station, 2002. – 57 p.
19. Bucci, G. Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. / G. Bucci, P. Menozzi // Mol. Ecol. – 1993. – Vol. 2(4). – P. 227–232.
20. De-Lucas, A.I. Admixture, one-source colonization or long-term persistence of maritime pine in the Castilian Plateau? Insights from nuclear microsatellite markers / A.I. De-Lucas [et al.] // Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales. – 2009. – Vol. 18(1). – P. 3–12.
21. Dzialuk, A. Examination of chloroplast and nuclear microsatellite DNA sequence for individual identification of coniferous trees / A. Dzialuk, J. Burczyk // Problems of Forensic Sciences. – 2005. – Vol. LXIV. – P. 395–400.
22. Echt, C.S. An annotated genetic map of loblolly pine based on microsatellite and cDNA markers / C.S. Echt, S. Saha, K.V. Krutovsky [et al.] // BMC Genetics. – 2011. – Vol. 12. – P. 1–16.
23. Eckert, A.J. High-throughput genotyping and mapping of single nucleotide polymorphisms in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) / A.J. Eckert, B. Pande, E.S. Ersoz [et al.] // Tree Genetics & Genomes. – 2009. – Vol. 5(1). – P. 225–234.
24. Ganea, S.L. Multiplex Nuclear SSR Amplification in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) / S.L. Ganea, M.R. Garcia Gil // Bulletin UASVM Horticulture. – 2011. – Vol. 68(1). – P. 47–53.
25. Hicks, M. The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) / M. Hicks, D. Adams, S. O’Keefe [et al.] // Genome. – 1998. – Vol. 41. – P. 797–805.
26. Joung, Y.H. Mapping characterization of *Pinus sylvestris* var. *sylvestriformis* based on chloroplast DNA microsatellite markers / Y.H. Joung, M.S. Roh // Forest Genetics. – 2005. – Vol. 12(2). – P. 89–98.
27. Karhu, A. Evolution and applications of pine microsatellites: doctor dissertation / Auli Karhu. – Oulu, 2001. – 43 p.
28. Lerceteau, E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. / E. Lerceteau, A.E. Szmidt // Heredity (Edinb). – 1999. – Vol. 82(3). – P. 252–260.

29. Li, Z. Functional Multi-Locus QTL Mapping of Temporal Trends in Scots Pine Wood Traits / Z. Li, H.R. Hallingbäck, S. Abrahamsson [et al.] // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2014. – Vol. 4(12). – P. 2365–2379.
30. Mariette, S. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers / S. Mariette, D. Chagné, C. Lézier [et al.] // *Heredity*. – 2001. – Vol. 86(4). – P. 69–79.
31. Mehes, M.S. Genetic analysis of *Pinus strobus* and *Pinus monticola* populations from Canada using ISSR and RAPD markers: development of genome-specific SCAR markers / M.S. Mehes, K.K. Nkongolo, P. Michael // *Plant Systematics and Evolution*. – 2007. – Vol. 267(1). – P. 47–63.
32. Metzker, M.L. Sequencing technologies – the next generation / M.L. Metzker // *Nature Review Genetics*. – 2010. – Vol. 11(1). – P. 31–46.
33. Narendrula, R. Genetic variation in *Picea mariana* × *P. rubens* hybrid populations assessed with ISSR and RAPD markers / R. Narendrula, K.K. Nkongolo // *American Journal of Plant Sciences*. – 2012. – Vol. 3(6). – P. 731–737.
34. Naydenov, K. Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor / K. Naydenov [et al.] // *BMC Evolutionary Biology*. – 2007. – Vol. 7. – P. 233–244.
35. Neale, D.B. Use of DNA makers in forest tree improvement research / D.B. Neale [et al.] // *New Forests*. – 1992. – Vol. 6. – P. 391–407.
36. Nkongolo, K.K. Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids / K.K. Nkongolo, P. Michael, T. Demers // *Genome*. – 2005. – Vol. 48(2). – P. 302–311.
37. Parasharami, V.A. Inter population genetic diversity analysis using ISSR markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian provenances / V.A. Parasharami, S.R. Thengane // *International Journal of Biodiversity and Conservation*. – 2012. – Vol. 4(5). – P. 219–227.
38. Plomion, C. High-density SNP assay development for genetic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*) / C. Plomion, J. Bartholomé, I. Lesur [et al.] // *Mol. Ecol. Resour.* – 2015. – doi: 10.1111/1755-0998.12464. [Epub ahead of print].
39. Sachidanandam, R. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms / R. Sachidanandam, D. Weissman, S.C. Schmidt [et al.] // *Nature*. – 2001. – Vol. 409(6822). – P. 928–933.
40. Sinclair, W.T. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation / W.T. Sinclair, J.D. Morman, R.A. Ennos // *Molecular Ecology*. – 1999. – Vol. 8(1). – P. 83–88.
41. The state of the world's forest genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2014. – 304 p.
42. The state of the world's animal genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2007. – 512 p.

## REFERENCES

1. Bannikova, A.A. Molekulyarnye markery i sovremennaya filogenetika mlekopitayushchikh / A.A. Bannikova // *Zhurnal obshchey biologii*. – 2004. – T. 65, № 4. – S. 278–306.
2. Gorbachev, V.V. Novoye ogranicheniye mikrosatellitnykh markerov dlya ikh primeneniya v populyatsionnykh issledovaniyakh (na primere panmikticheskikh populyatsy) / V.V. Gorbachev // *Vavilovsky zhurnal genetiki i selektsii*. – 2011. – T. 15, № 4. – S. 746–749.

3. Gostimsky, S.A. Izucheniye organizatsii i izmenchivosti genoma rasteny s pomoshchyu molekulyarnykh markerov / S.A. Gostimsky, Z.G. Kokayeva, F.A. Konovalov // Genetika. – 2005. – T. 41, № 4. – S. 480–492.
4. Zhivotovsky, L.A. Mikrosatellitnaya izmenchivost v populyatsiyakh cheloveka i metody eye izucheniya / L.A. Zhivotovsky // Inform. vestnik VOGiS. – 2006. – T. 10, № 1. – S. 74–96.
5. Zakharov-Gezekhus, I.A. Tsitoplazmaticheskaya nasledstvennost / I.A. Zakharov-Gezekhus // Vavilovsky zhurnal genetiki i selektsii. – 2014. – T. 18, № 1. – S. 93–102.
6. Konventsiya o biologicheskom raznoobrazii. Rio-de-Zhaneyro, data vstupleniya v silu: 5 iyunya 1992 goda. Ratifitsirovana RF 17.02.1995.
7. Maniatis, T. Metody geneticheskoy inzhenerii. Molekulyarnoye klonirovaniye / T. Maniatis, E. Frich, Dzh. Sembruk; per. s angl.; pod red. akad. A.A. Bayeva i d-ra biol. nauk K.G. Skryabina. – M.: Mir, 1984. – 480 s.
8. Matveyeva, T.V. Molekulyarnye markery dlya vidoidentifikatsii i filogenetiki rasteny / T.V. Matveyeva, O.A. Pavlova, D.I. Bogomaz [i dr.] // Ekol. genetika. – 2011. – T. IX. – S. 32–43.
9. Melnikova, M.N. Testirovaniye mikrosatellitnykh markerov na raznykh populatsiyakh evraziyskikh eley *Picea abies* (L.) Karst. i *Picea obovata* Ledeb. / M.N. Melnikova, N.B. Petrov, A.A. Lomov [i dr.] // Genetika. – 2012. – T. 48, № 5. – S. 660–665.
10. Potokina, Ye.K. Geneticheskaya differentsiatsiya populyatsy eli na Severo-Zapade Rossii po rezultatam markirovaniya mikrosatellitnykh lokusov / Ye.K. Potokina, L.V. Orlova, M.S. Vishnevskaya [i dr.] // Ekol. genetika. – 2012. – T. X, № 2. – S. 40–49.
11. Potokina, Ye.K. Sovremennyye metody genomnogo analiza v issledovaniyakh genetiki kolichestvennykh priznakov u rasteny (obzor) / Ye.K. Potokina, Yu.V. Chesnokov // Selskokhozyaystvennaya biologiya. – 2005. – № 3. – S. 3–18.
12. Semerikov, V.L. Polimorfizm mikrosatellitnykh lokusov khloroplastnoy DNK sosny obyknovnoy (*Pinus sylvestris* L.) v Azii i Vostochnoy Yevrope / V.L. Semerikov [i dr.] // Genetika. – 2014. – T. 50, № 6. – S. 660–669.
13. Sulimova, G.E. DNK-markery v geneticheskikh issledovaniyakh: tipy markerov, ikh svoystva i oblasti primeneniya / G.E. Sulimova // Uspekhi sovremennoy biologii. – 2004. – T. 124. – S. 260–271.
14. Khlestkina, Ye.K. Molekulyarnye markery v geneticheskikh issledovaniyakh i v selektsii / Ye.K. Khlestkina // Vavilovsky zhurnal genetiki i selektsii. – 2013. – T. 17, № 4/2. – S. 1044–1054.
15. Shilkina, Ye.A. Razrabotka tsitoplazmaticheskikh SSR-markeroov dlya issledovaniya sosny kedrovoy sibirskoy (*Pinus sibirica* Du Tour) / Ye.A. Shilkina [i dr.] // Sibirsky lesnoy zhurnal. – 2014. – № 4. – S. 21–24.
16. Ekart, A.K. Primneneniye razlichnykh tipov geneticheskikh markerov dlya otsenki urovnya vnutrividovoy differentsiatsii eli sibirskoy / A.K. Ekart, S.A. Semerikova, V.L. Semerikov [i dr.] // Sibirsky lesnoy zhurnal. – 2014. – № 4. – S. 84–91.
17. Acher, V. A full saturated linkage map of *Picea abies* including AFLP, SSR, ESTP, 5S rDNA and morphological markers / V. Acher, P. Faivre-Rampant, S. Jeandroz [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2004. – Vol. 108. – P. 1602–1613.
18. Auckland, L. Conifer Microsatellite Handbook / L. Auckland [et al.]. – Texas: A&M University, College Station, 2002. – 57 p.
19. Bucci, G. Segregation analysis of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in *Picea abies* Karst. / G. Bucci, P. Menozzi // Mol. Ecol. – 1993. – Vol. 2(4). – P. 227–232.
20. De-Lucas, A.I. Admixture, one-source colonization or long-term persistence of maritime pine in the Castilian Plateau? Insights from nuclear microsatellite markers / A.I. De-Lucas [et al.] // Investigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales. – 2009. – Vol. 18(1). – P. 3–12.



21. Dzialuk, A. Examination of chloroplast and nuclear microsatellite DNA sequence for individual identification of coniferous trees / A. Dzialuk, J. Burczyk // *Problems of Forensic Sciences*. – 2005. – Vol. LXIV. – P. 395–400.
22. Echt, C.S. An annotated genetic map of loblolly pine based on microsatellite and cDNA markers / C.S. Echt, S. Saha, K.V. Krutovsky [et al.] // *BMC Genetics*. – 2011. – Vol. 12. – P. 1–16.
23. Eckert, A.J. High-throughput genotyping and mapping of single nucleotide polymorphisms in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) / A.J. Eckert, B. Pande, E.S. Ersoz [et al.] // *Tree Genetics & Genomes*. – 2009. – Vol. 5(1). – P. 225–234.
24. Ganea, S.L. Multiplex Nuclear SSR Amplification in Scots Pine (*Pinus sylvestris* L.) / S.L. Ganea, M.R. Garcia Gil // *Bulletin UASVM Horticulture*. – 2011. – Vol. 68(1). – P. 47–53.
25. Hicks, M. The development of RAPD and microsatellite markers in lodgepole pine (*Pinus contorta* var. *latifolia*) / M. Hicks, D. Adams, S. O’Keefe [et al.] // *Genome*. – 1998. – Vol. 41. – P. 797–805.
26. Joung, Y.H. Mapping characterization of *Pinus sylvestris* var. *sylvestriformis* based on chloroplast DNA microsatellite markers / Y.H. Joung, M.S. Roh // *Forest Genetics*. – 2005. – Vol. 12(2). – P. 89–98.
27. Karhu, A. Evolution and applications of pine microsatellites: doctor dissertation / Auli Karhu. – Oulu, 2001. – 43 p.
28. Lerceteau, E. Properties of AFLP markers in inheritance and genetic diversity studies of *Pinus sylvestris* L. / E. Lerceteau, A.E. Szmidt // *Heredity (Edinb)*. – 1999. – Vol. 82(3). – P. 252–260.
29. Li, Z. Functional Multi-Locus QTL Mapping of Temporal Trends in Scots Pine Wood Traits / Z. Li, H.R. Hallingbäck, S. Abrahamsson [et al.] // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2014. – Vol. 4(12). – P. 2365–2379.
30. Mariette, S. Genetic diversity within and among *Pinus pinaster* populations: comparison between AFLP and microsatellite markers / S. Mariette, D. Chagné, C. Lézier [et al.] // *Heredity*. – 2001. – Vol. 86(4). – P. 69–79.
31. Mehes, M.S. Genetic analysis of *Pinus strobus* and *Pinus monticola* populations from Canada using ISSR and RAPD markers: development of genome-specific SCAR markers / M.S. Mehes, K.K. Nkongolo, P. Michael // *Plant Systematics and Evolution*. – 2007, Vol. 267(1). – P. 47–63.
32. Metzker, M.L. Sequencing technologies – the next generation / M.L. Metzker // *Nature Review Genetics*. – 2010. – Vol. 11(1). – P. 31–46.
33. Narendrula, R. Genetic variation in *Picea mariana* × *P. rubens* hybrid populations assessed with ISSR and RAPD markers / R. Narendrula, K.K. Nkongolo // *American Journal of Plant Sciences*. – 2012. – Vol. 3(6). – P. 731–737.
34. Naydenov, K. Glacial vicariance in Eurasia: mitochondrial DNA evidence from Scots pine for complex heritage involving genetically distinct refugia at mid-northern latitudes and in Asia Minor / K. Naydenov [et al.] // *BMC Evolutionary Biology*. – 2007. – Vol. 7. – P. 233–244.
35. Neale, D.B. Use of DNA makers in forest tree improvement research / D.B. Neale [et al.] // *New Forests*. – 1992. – Vol. 6. – P. 391–407.
36. Nkongolo, K.K. Application of ISSR, RAPD, and cytological markers to the certification of *Picea mariana*, *P. glauca*, and *P. engelmannii* trees, and their putative hybrids / K.K. Nkongolo, P. Michael, T. Demers // *Genome*. – 2005. – Vol. 48(2). – P. 302–311.
37. Parasharami, V.A. Inter population genetic diversity analysis using ISSR markers in *Pinus roxburghii* (Sarg.) from Indian provenances / V.A. Parasharami, S.R. Thengane // *International Journal of Biodiversity and Conservation*. – 2012. – Vol. 4(5). – P. 219–227.

38. Plomion, C. High-density SNP assay development for genetic analysis in maritime pine (*Pinus pinaster*) / C. Plomion, J. Bartholomé, I. Lesur [et al.] // Mol. Ecol. Resour. – 2015. – doi: 10.1111/1755-0998.12464. [Epub ahead of print].
39. Sachidanandam, R. A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms / R. Sachidanandam, D. Weissman, S.C. Schmidt [et al.] // Nature. – 2001. – Vol. 409(6822). – P. 928–933.
40. Sinclair, W.T. The postglacial history of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) in western Europe: evidence from mitochondrial DNA variation / W.T. Sinclair, J.D. Morman, R.A. Ennos // Molecular Ecology. – 1999. – Vol. 8(1). – P. 83–88.
41. The state of the world's forest genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2014. – 304 p.
42. The state of the world's animal genetic resources / FAO. – Rome: FAO, 2007. – 512 p.