ГЕНЕТИКА РАСТЕНИЙ

УДК 575.113:582.475.4

РАЗРАБОТКА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ ЛИСТВЕННОЙ СИБИРСКОЙ (*Larix sibirica* Ledeb.) НА ОСНОВЕ ПОЛНОГЕНОМНОГО *DE NOVO* СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Н. В. Орешкова^{1,2}, Ю. А. Путинцева¹, В. В. Шаров¹, Д. А. Кузмин¹,
К. В. Крутовский^{1, 3, 4, 5 *}

¹Научно образовательный центр геномных исследований Сибирского
федерального университета, Красноярск 660041

e-mail: oreshkova@ksc.krasn.ru, yaputintseva@mail.ru, sharvadim07@yandex.ru,
dm.kuzmin@gmail.com, kkrutovsky@gmail.com

²Институт леса им. В.Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии
наук, Красноярск 660036

³Гёттингенский университет им. Георга-Августа, Гёттинген, Германия
e-mail: konstantin.krutovsky@forst.uni-goettingen.de

⁴Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук,
Москва 119991

⁵Техасский АМ университет, Колледж Стейшин, Техас 77843-2138, США
e-mail: k-krutovsky@tamu.edu

АННОТАЦИЯ

Данный выпуск журнала посвящён выдающемуся популяционному генетику Юрию Петровичу Алтухову, который много внимания в своих исследованиях уделял разработке молекулярно-генетических маркеров для популяционных исследований. За прошедшее время маркеры и методы их разработки претерпели существенные различия. Благодаря современным методам полногеномного секвенирования стала возможной разработка маркеров очень широкого класса – и селективно-нейтральных, и функциональных. Из них наиболее информативными, удобными, воспроизводимыми, относительно недорогими и полиморфными

остаются по-прежнему микросателлитные локусы. Полногеномное секвенирование значительно облегчает их поиск и разработку. Данная статья посвящена разработке новых микросателлитных маркеров для очень важного вида бореальных лесов лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.). Используя полученную сборку генома лиственницы были отобраны несколько тысяч контигов, содержащих микросателлитные локусы с ди-, три-, тетра- и пентануклеотидными мотивами. Всего было протестировано 59 пар праймеров для локусов с динуклеотидными мотивами как наиболее изменчивых. Из них в конечном итоге были отобраны 11 пар для 11 локусов с динуклеотидными повторами, которые показали высокий уровень полиморфизма и могут быть использованы в различных популяционно-генетических исследованиях и для идентификации происхождения древесины и растительного материала. Данная работа выполнена в Лаборатории лесной геномики Научно образовательного центра геномных исследований Сибирского федерального университета при поддержке Отделения лесной генетики и селекции Гёттингенского университета, Отдела генетики и селекции Центра защиты леса Красноярского края и Лаборатории лесной генетики и селекции Института леса им. В. Н. Сукачева Сибирского отделения Российской академии наук в рамках проекта «Геномные исследования основных бореальных лесообразующих хвойных видов и их наиболее опасных патогенов в Российской Федерации», финансируемого грантом Правительства РФ № 14.Y26.31.0004.

Ключевые слова: генетическое разнообразие, геном, гетерозиготность, лиственница сибирская, *Larix sibirica*, микросателлитные маркеры, полногеномное секвенирование

ВВЕДЕНИЕ

Разработка молекулярно-генетических маркеров для основных лесообразующих видов древесных с помощью методов, основанных на ДНК-анализе, и использование их в научных исследованиях и лесном хозяйстве является крайне важным и актуальным для решения задач лесоводства, лесовосстановления и лесоразведения. Для решения этих задач требуются оценки

уровня генетической изменчивости, данные о популяционной структуре и степени дифференциации лесонасаждений и эффективные методы генетической идентификации происхождения древесины и растительного материала. Среди имеющихся генетических маркеров ядерные микросателлитные локусы наиболее полно отвечают этим задачам. Данные маркеры характеризуются специфичностью, воспроизводимостью, кодоминантностью, полиаллельностью, высокой гетерозиготностью и, кроме того, не требуют сложного оборудования для анализа.

Для лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) – одного из основных лесообразующих видов хвойных в Сибири подобных видоспецифичных маркеров до настоящего времени разработано не было. Лиственница сибирская произрастает в пределах лесной зоны востока и северо-востока европейской части России, Урала, Западной и Восточной Сибири. С севера на юг ареал простирается от тундры (71° с. ш.) до южных широт Алтая и Саян (46° с. ш.). На территории РФ лиственничные леса занимают 263 млн га, около 40% покрытой лесом площади страны (769,8 млн га).

Ранее для анализа популяционно-генетической изменчивости *L. sibirica* использовались маркеры на основе ядерных микросателлитных локусов, разработанные для других видов этого рода [1-3]. С помощью этих маркеров было изучено генетическое разнообразие и выявлены особенности ряда популяций данного вида [4, 5]. Однако, в этих работах было использовано небольшое число маркеров по причине плохой амплификации и наличию большого количества «нуль-аллелей» для многих невидоспецифичных маркеров.

В связи с работами по полногеномному секвенированию хвойных видов РФ в лаборатории лесной геномики Сибирского федерального университета появилась возможность разработать видоспецифичные микросателлитные праймеры для лиственницы сибирской [6-8]. Такие маркеры более надёжны и позволяют проводить более качественные работы по популяционно-генетическому анализу, по идентификации происхождения древесины в борьбе с нелегальными рубками, для контроля за правильным происхождением растительного материала для лесовосстановления, для идентификации клонового материала и т.д.

В связи с выше сказанным, целью данной работы было осуществить

разработку новых высокоинформативных микросателлитных генетических маркеров для *L. sibirica*, используя данные полногеномного секвенирования этого вида. Для этого был осуществлён поиск микросателлитных локусов с высокоповторяющимися простыми мотивами в последовательностях геномной ДНК, разработаны, синтезированы и протестированы олигонуклеотидные праймеры для амплификации этих локусов, сделана предварительная оценка аллельного разнообразия на двух тестовых выборках из хакасской популяции лиственницы сибирской, отобраны наиболее перспективные маркеры и составлены из них мультиплексные панели для анализа при помощи капиллярного электрофореза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

На приборе Illumina HiSeq 2000 было выполнено секвенирование генома лиственницы сибирской с покрытием 74X. При помощи Trimmomatic [9] осуществлена фильтрация результатов секвенирования по качеству, удалены прочтения с димерами адаптеров, выполнена черновая сборка генома при помощи ассемблера CLC Assembly Cell (<https://www.qiagenbioinformatics.com>). Полученная сборка содержала 4,4 млн. контигов общей длиной ~5 млрд. п.н. В полученной сборке с помощью программы GMATo [10] осуществлялся поиск контигов, содержащих микросателлитные локусы. Предварительный анализ показал, что микросателлитные локусы с три-, тетра- и пентануклеотидными мотивами гораздо менее изменчивы у лиственницы, чем локусы с динуклеотидными мотивами (данные авторов). Поэтому из всех найденных микросателлитных локусов в дальнейшем для дизайна праймеров отбирались локусы с динуклеотидными мотивами, повторяющимися не менее 20 раз. Праймеры для выбранных микросателлитных локусов в отобранных контигах разрабатывались при помощи веб-сервиса WebSat [11]. В итоге было отобрано 59 пар праймеров.

Биологическим материалом для данной работы послужили две выборки хвои, собранные в 2014 г. с двух участков лиственницы сибирской из Республики Хакасия. Первый участок расположен в Ширинском районе Хакасии близ шоссе Ши́ра-Бере́нжак (лиственничный лес с сосной на пологом склоне), второй - около п. Ефре́мкино (лиственничник на крутом склоне и у его подножия). Расстояние

между участками составляет 25 км. На каждом участке было взяты образцы с 50 деревьев.

ДНК из хвои выделяли методом с применением СТАВ [12]. Для проведения ПЦР использовали следующую смесь (пример для одного образца): H₂O – 6.8 мкл, 10X PCR-Buffer компании Solis BioDyne (<https://www.sbd.ee>) – 1.5 мкл, 25mM MCl₂ компании Solis BioDyne - 1.5 мкл, 2,5mM dNTP компании Thermo Scientific (<https://www.thermofisher.com>) - 1 мкл, прямой (F) и обратный (R) праймеры – по 1 мкл каждого, *Taq*-полимераза 5 Ун/мкл компании Solis BioDyne – 0.2 мкл, и образец ДНК – 1-2 мкл. Программа амплификации включала первичную денатурацию 15 мин. при 94°C, затем 10 циклов «touchdown» с понижением на 1°C каждый цикл: 1 мин. при 94°C, 1 мин. при 60°C, 1 мин. при 72°C, далее 25 циклов без «touchdown»: 1 мин. при 94°C, 1 мин. при 50°C, 1 мин. при 72°C, и финальная элонгация составляла 20 мин. при 72°C.

Схема тестирования включала первичную проверку отжига праймеров на образцах ДНК от четырех особей *L. sibirica* с окрашиванием продуктов ПЦР после электрофореза в агарозных гелях при помощи красителя Roti-GelStain компании ROTH (https://www.carlroth.com/website/nl-nl/pdf/Roti_GelStain_E.pdf). После оптимизации условий амплификации каждый локус тестировали уже в 4–8 образцах из одной выборки с целью выявления полиморфизма. Затем локусы, которые оказались полиморфными, тестировали на 50 деревьях в каждой из двух выборок при помощи капиллярного электрофореза на секвенаторе ABI PRISM 3730 (Applied Biosystem). В качестве маркера длин использовали стандартный маркер производства ABI - Applied Biosystems. Визуализацию и обработку результатов фрагментного анализа (электроферограм) проводили при помощи программы GeneMapper 4.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первичный анализ ПЦР–продуктов 59 пар праймеров показал, что из них 20 пар не дали никакого амплифицированного продукта, а для 12 пар наблюдалась неспецифичная амплификация (рис. 1). Остальные пары устойчиво амплифицировали 27 локусов в подобранных условиях, давали однолокусный продукт и хорошо генотипировались на гелях (табл. 1).

После проведенного отбора, для дальнейшей работы на секвенаторе, один из двух праймеров в каждой из 27 пар для 27 локусов (в нашем случае маркировали прямой «forward» праймер) был маркирован либо «синей» (FAM) либо «зеленой» (HEX) флуоресцентными метками (табл. 2). Синтез меченных олигонуклеотидов осуществлялся компанией Sigma (Германия). Из двух или трёх пар этих праймеров были составлены пробные ПЦР мультиплексы с учетом размера фрагментов локусов. Мультиплексирование осуществлялось на стадии подготовки ПЦР реакции, для чего вместо одной пары добавляли несколько пар праймеров и уменьшали соответственно объем воды, а остальные составляющие ингредиенты оставались в таком же объеме и использовали ту же программу ПЦР как указано выше в разделе «МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ». Полученный ПЦР-амплификат обязательно разводили перед электрофорезом в среднем в 50-100 раз.

Тестирование полиморфных локусов на данном этапе проводили с использованием 8-16 образцов с каждой из двух выборок. После тестирования локусов на капиллярном секвенаторе пришлось отказаться еще от 9 пар праймеров по причине плохой или неспецифичной амплификации, и большого количества нуль-аллелей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В итоге, в результате тщательного многоступенчатого тестирования микросателлитных праймеров были отобраны 11 надёжных локусов с высоким уровнем полиморфизма (табл. 3), хотя в трех локусах, возможно, наблюдаются единичные нуль-аллели. Окончательное тестирование было проведено уже на 50 образцах с каждой из двух выборок. Это было необходимо для составления мультиплексных панелей для одновременного генотипирования нескольких локусов на одних и тех же образцах (табл. 4). Нуклеотидные последовательности контигов, на основе которых были разработаны праймеры, могут быть предоставлены авторами по запросу.

Дальнейший анализ уровней изменчивости природных и искусственных популяций вида с помощью разработанных маркеров позволит получить надёжные количественные оценки параметров их генетической структуры, таких как внутрипопуляционное аллельное и генное разнообразие, генетическая

подразделенность и дифференциация на разных иерархических уровнях, степень инбридинга и т.д.

Работа выполнена в рамках проекта “Геномные исследования основных бореальных лесообразующих хвойных видов и их наиболее опасных патогенов в Российской Федерации”, финансируемого грантом Правительства РФ (договор No 14.Y26.31.0004).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Khasa D.P., Newton C.H., Rahman M.H. et al.* Isolation, characterization, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch // *Genome*. 2000. V. 3. № 43. P. 439-448. doi 10.1139/g99-131
2. *Isoda K., Watanabe A.* Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // *Molecular Ecology Notes*. 2006. V. 6. № 3. P. 664-666. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01291.x
3. *Chen C., Liewlaksaneeyanawin C., Funda T. et al.* Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) // *Molecular Ecology Resources*. 2009. V. 9. № 3. P. 843-845. doi: 10.1111/j.1755-0998.2008.02289.x
4. *Орешкова Н.В., Белоконь М.М.* Оценка генетической изменчивости лиственницы сибирской с использованием микросателлитных маркеров // *Вестник МГУЛ - Лесной вестник*. 2012. № 1 (84). С. 118-122.
5. *Орешкова Н.В., Белоконь М.М., Жамъянсурен С.* Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация лиственниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров // *Генетика*. 2013. Т. 49, № 2. С. 204-213. (*Oreshkova N.V., Belokon M.M., Jamiyansuren S.* Genetic Diversity, Population Structure, and Differentiation of Siberian Larch, Gmelin Larch, and Cajander Larch on SSR-Marker Data // *Russian Journal of Genetics*. 2013. V. 49. № 2. P. 178–186.)
6. *Крутовский К.В., Орешкова Н.В., Путинцева Ю.А. и др.* Предварительные результаты полногеномного *de novo* секвенирования лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) // *Сиб. лесн. журн.* 2014. № 4. С. 79–83. (*Krutovsky K.V., Oreshkova N.V.,*

- Putintseva Y. *et al.* Preliminary results of *de novo* whole genome sequencing of the Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and the Siberian Stone Pine (*Pinus sibirica* Du Tour) // Siberian Journal of Forest Science 2014. V. 1. № 4. P. 79–83. in Russian, English abstract)
7. Орешкова Н.В., Путинцева Ю.А., Кузмин Д.А. и др. Секвенирование и сборка геномов лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) и сосны сибирской кедровой (*Pinus sibirica* Du Tour) и предварительные данные анализа транскриптома // Материалы 4-го международного совещания “Сохранение лесных генетических ресурсов Сибири”. 24-29 августа 2015, Барнаул, Россия. С. 127-128. (Oreshkova N.V., Putintseva Yu.A., Kuzmin D.A. *et al.* Genome sequencing and assembly of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) and Siberian pine (*Pinus sibirica* Du Tour) and preliminary transcriptome data // Proceedings of the 4th International Conference on Conservation of Forest Genetic Resources in Siberia. Barnaul, Russia, 24–29 August, 2015. P. 127–128.)
 8. Sadovsky M.G., Putintseva Y.A., Birukov V.V. *et al.* De novo assembly and cluster analysis of Siberian larch transcriptome and genome // Lecture Notes in Bioinformatics. 2016. V. 9656. P. 455-464.
 9. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data // Bioinformatics. 2014. V. 30. № 15. P. 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu17
 10. Wang X., Lu P., Luo Z. GMATo: A novel tool for the identification and analysis of microsatellites in large genomes // Bioinformation. 2013. V. 9. № 10. P. 541–544.
 11. Martins W.S. Lucas D.C.S., Neves K.F.S., Bertioli D.J. WebSat - a web software for microsatellite marker development // Bioinformation. 2009. V. 3. № 6. P. 282–283.
 12. Devey M.E., Bell J.C., Smith D.N. *et al.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. № 6. P. 673–679. doi:10.1007/BF00226088

Таблица 1. ПЦР праймеры для 27 микросателлитных локусов лиственницы сибирской с наиболее стабильной амплификацией по результатам первичного тестирования

Локус	Мотив и число его повторов в контиге	Нуклеотидная последовательность ПЦР праймера	Размер ПЦР фрагмента, пн
<i>Ls_798886</i>	(AC) ₂₆	F: ACATGGTGAGGAGTTGAAGGAC R: GGAGACAAAGAGGTAATGTGCC	150-180
<i>Ls_955052</i>	(CT) ₂₁	F: CTCTTGTGGTGAAGACATTGGA R: AACCCAAACCCTAGACTTCGAT	220-280
<i>Ls_796783</i>	(CT) ₂₁	F: TTCAAGAGGCCAACATCCTTTA R: GACTCAAGCAAACCACAATAATAGC	160-190
<i>Ls_19333</i>	(TC) ₂₀	F: TTGGCCTCCCTTACATCTCATA R: CCTCACCTCCAATTCTCCAAG	230-270
<i>Ls_440296</i>	(TC) ₂₀	F: AGAGCACCTGAAGACTCCGATA R: AGAAACCCAAAAGGTACAGCAA	170-190
<i>Ls_123209</i>	(CA) ₂₁	F: ATGGTGTTTTCTCTTCTTGGA R: TCTACATCAAATCGCTCATCGT	250-255
<i>Ls_250604</i>	(GA) ₂₁	F: AAATTGTAGGAGCCCACTTCAT R: ACCCAATATCTCACCATCGTTT	170-200
<i>Ls_318520</i>	(TC) ₂₅	F: CAACAAATCTCCCAATCACAT R: GAACTGTATGAGGCAACAAGCA	240-270
<i>Ls_264438</i>	(TC) ₂₀	F: GGGGAGATCAAATCCACTATCA R: TTGTGCAGGAGTGAAGAAAAGA	180-200
<i>Ls_621673</i>	(TC) ₂₃	F: CCCACATGCCAATAAAGGATTA R: TACCATTACCCACCAGGAAGAC	180-220
<i>Ls_648755</i>	(AT) ₂₂	F: TCGCATACATAAAGAGACGCAT R: GGAGGCGATTTGCATTTG	180-220
<i>Ls_1274831</i>	(CT) ₂₀	F: CCATGTTCAAATTCGGCTAAC R: AGACATTTGACCCTTGCTAAA	200-220
<i>Ls_199446</i>	(AG) ₂₃	F: CAATAAATGGTTGTCTTTGGGG R: GGCCAATGCTTGTCGTTTA	200-220

Локус	Мотив и число его повторов в контиге	Нуклеотидная последовательность ПЦР праймера	Размер ПЦР фрагмента, пн
<i>Ls_1106920</i>	(AG) ₂₁	F: TTGGTTGGATTCGATGAACT R: GATACTCTCCCCATTTGGCTAC	200-220
<i>Ls_1089834</i>	(AG) ₂₁	F: GTTTTGTAAGGGTGCGATTTGT R: TTTTACGTGGAAACCCAACTG	200-220
<i>Ls_245817</i>	(CT) ₂₀	F: ATCCAATGCCTCACAATTTC R: GGAAACGAGATGTATATTTGGG	200-240
<i>Ls_540394</i>	(AG) ₂₀	F: CAAGTTCTCCAAGGCAAGACAT R: CACATCGTATTGTTGGTATCCCT	200-300
<i>Ls_66831</i>	(CA) ₂₁	F: TGTCCTCCATAACCTAAGAATG R: AGCTCAAGGAAAAGACCCTACC	220-240
<i>Ls_326284</i>	(GT) ₂₁	F: TTGTATAAGCTCCCTCCAACG R: CCCTTGGGGTTAATAGATTTCA	220-260
<i>Ls_396253</i>	(AG) ₂₀	F: CAAGTTCTCCAAGGCAATTCAT R: CACATCGTATTGTTGGTATCCCT	220-260
<i>Ls_915025</i>	(AT) ₂₁	F: TTGTTAATTTCCATGCACGC R: GGAATAGGTTTATAGGGCAGTCG	170-190
<i>Ls_1287563</i>	(CA) ₂₂	F: GGTTGTACCCTCTTCATTCCTTT R: CCTGTGGATGGGAAATCTATATG	230-240
<i>Ls_1295092</i>	(CT) ₂₀	F: CAATCCTTGATCTCTTCATGGT R: CAATCCTTGATCTCTTCATGGT	210-220
<i>Ls_12590</i>	(TG) ₂₄	F: AGCATAAGCACACATCATCACA R: TGATACAACCTATGGAAGGCAA	160-170
<i>Ls_68475</i>	(CT) ₂₀	F: TGGTATATGTGGTTGTGATGCTC R: GGGAATAGTTAAGGAGGGAAGG	150-170
<i>Ls_263105</i>	(TG) ₂₁	F: AAACCTTGGTGCTTCAGACGG R: TCACTAGCCTGACATTTGCATC	220-240
<i>Ls_304106</i>	(GA) ₂₂	F: ATTAGTGTCCAACCTCCTCCCA R: ATTGGTTCTTTGTTCAAGGGTG	230-240

Примечание. Температура отжига была в соответствии с ПЦР программой «touchdown» (60–50⁰ C); пн - пар нуклеотидов.

Таблица 2. Протестированные ПЦР-мультиплексы для 20 пар праймеров

Локус	Флуоресцентная метка	ПЦР мультиплекс
<i>Ls_798886</i>	FAM	1
<i>Ls_955052</i>	FAM	
<i>Ls_796783</i>	XEX	
<i>Ls_19333</i>	XEX	
<i>Ls_440296</i>	FAM	2
<i>Ls_123209</i>	FAM	
<i>Ls_250604</i>	XEX	
<i>Ls_318520</i>	XEX	
<i>Ls_264438</i>	FAM	3
<i>Ls_621673</i>	XEX	
<i>Ls_648755</i>	FAM	4
<i>Ls_1274831</i>	XEX	
<i>Ls_199446</i>	FAM	5
<i>Ls_1106920</i>	XEX	
<i>Ls_1089834</i>	FAM	6
<i>Ls_245817</i>	XEX	
<i>Ls_540394</i>	FAM	7
<i>Ls_66831</i>	XEX	
<i>Ls_326284</i>	FAM	8
<i>Ls_396253</i>	XEX	
<i>Ls_915025</i>	FAM	9
<i>Ls_1287563</i>	XEX	
<i>Ls_1295092</i>	FAM	10
<i>Ls_12590</i>	XEX	
<i>Ls_68475</i>	FAM	11
<i>Ls_263105</i>	XEX	
<i>Ls_304106</i>	FAM	12

Таблица 3. Характеристика 11 отобранных наилучших ядерных микросателлитных локусов готовых для дальнейшего использования в популяционно-генетических исследованиях лиственницы сибирской и для идентификации происхождения древесины и растительного материала

Локус	Мотив	Размер фрагмента, пн	Число выявленных аллелей*
<i>Ls_1106920</i>	(AG) ₂₁	145-263	18
<i>Ls_796783</i>	(CT) ₂₁	151-177	13
<i>Ls_955052</i>	(CT) ₂₁	225-347	20
<i>Ls_19333</i>	(TC) ₂₀	223-255	13
<i>Ls_440296</i>	(TC) ₂₀	169-243	13
<i>Ls_621673</i>	(TC) ₂₃	184-218	16
<i>Ls_1089834</i>	(AG) ₂₁	187-235	26
<i>Ls_1274831</i> **	(CT) ₂₀	203-229	14
<i>Ls_66831</i> **	(CA) ₂₁	207-231	14
<i>Ls_915025</i>	(AT) ₂₁	132-186	16
<i>Ls_12590</i> **	(TG) ₂₄	151-201	23

Примечание. Температура отжига была в соответствии с ПЦР программой «touchdown» (60–50⁰ C); пн - пар нуклеотидов. *По данным генотипирования 100 деревьев в двух выборках лиственницы. **Локусы, в которых были обнаружены нуль-аллели в 2-3 образцах.

Таблица 4. Рекомендуемые мультиплексные панели отобранных микросателлитных локусов для лиственницы сибирской

Локус	Флуоресцентная метка	ПЦР мультиплексы
<i>Ls_1106920</i>	XEX	1
<i>Ls_955052</i>	FAM	
<i>Ls_796783</i>	XEX	
<i>Ls_19333</i>	XEX	2
<i>Ls_621673</i>	XEX	
<i>Ls_440296</i>	FAM	
<i>Ls_1089834</i>	FAM	3
<i>Ls_1274831</i> *	XEX	
<i>Ls_66831</i> *	XEX	4
<i>Ls_915025</i>	FAM	
<i>Ls_12590</i> *	XEX	

Примечание. *Локусы в которых были обнаружены нуль-аллели в 2-3 образцах.

Рис. 1. Образец геля с результатами ПЦР амплификации 8 пар ПЦР праймеров при первичном тестировании разных условий амплификации с ограниченным числом образцов.

Development of Microsatellite Genetic Markers in Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.) Based on the *De Novo* Whole Genome Sequencing

**N. V. Oreshkova^{1,2}, Yu. A. Putintseva¹, V. V. Sharov¹, D. A. Kuzmin¹,
K. V. Krutovsky^{1,3,4,5*}**

¹*Genome Research and Education Center, Siberian Federal University, 660036
Krasnoyarsk, Russia*

*e-mail: yaputintseva@mail.ru, sharvadim07@yandex.ru, dm.kuzmin@gmail.com,
kkrutovsky@gmail.com*

²*V. N. Sukachev Institute of Forest, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences,
660036 Krasnoyarsk, Russia
e-mail: oreshkova@ksc.krasn.ru*

³*Georg-August University of Göttingen, 37077 Göttingen, Germany
e-mail: konstantin.krutovsky@forst.uni-goettingen.de*

⁴*N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, 119333
Moscow, Russia
e-mail: kkrutovsky@gmail.com*

⁵*Texas A&M University, College Station, TX 77843-2138, USA
e-mail: k-krutovsky@tamu.edu*

This special issue of the journal is devoted to the outstanding population geneticist Yuri Petrovich Altukhov, who paid much attention in his research to the development of molecular genetic markers for population studies. Over the past time markers and methods of their development have undergone significant change. Thanks to modern methods of whole genome sequencing, it became possible to develop markers of very different types - selectively neutral, as well as functional. Among them, microsatellite markers remain the most informative, convenient, reproducible, relatively inexpensive, and polymorphic. Whole genome sequencing greatly facilitates their discovery and development. This paper is devoted to the development of new microsatellite markers for a very important species of boreal forest - Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb.).

Using a draft assembly of the larch genome, several thousand contigs containing microsatellite loci with di-, tri, tetra- and pentanucleotide motifs were selected. A total of 59 pairs of PCR primers were tested for loci with dinucleotide motifs as the most variable. From them, 11 pairs were finally selected for 11 loci with dinucleotide repeats, which showed a high level of polymorphism and can be used in various population genetic studies and to identify the origin of wood and plant material. This study was done at the Laboratory of Forest Genomics of the Genome Research and Education Center of the Siberian Federal University with support of the Department of Forest Genetics and Forest Tree Breeding of the Georg-August University of Göttingen, the Department for Monitoring of Forest Genetic Resources of the Forest Protection Center of the Krasnoyarsk Territory, and the Laboratory of Forest Genetics and Selection of the V. N. Sukachev Institute of Forest of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences within the framework of the project “Genomics of the key boreal forest conifer species and their major phytopathogens in the Russian Federation” funded by the Government of the Russian Federation (grant no. 14.Y26.31.0004).

Keywords: genetic diversity, genome, heterozygosity, Siberian larch, *Larix sibirica*, microsatellite markers, NGS, whole genome sequencing

**Ф.И.О. всех авторов полностью, полный почтовый адрес,
контактные телефоны:**

Крутовский Константин Валерьевич, профессор, зав. отделом
Department of Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg August University of
Göttingen, Büsgenweg 2, D-37077 Göttingen, Germany; +49-551-393-35-37; e-mail:
konstantin.krutovsky@forst.uni-goettingen.de или kkrutovsky@gmail.com
(автор для контактов)

Орешкова Наталья Викторовна, к.б.н.
Старший научный сотрудник лаборатории лесной генетики и селекции Института
леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, Россия
660036 Красноярск, Академгородок. д. 50, стр. 28
Email: oreshkova@ksc.krasn.ru; тел. 8-983-147-95-59

Путинцева Юлия Андреевна
Младший научный сотрудник лаборатории лесоведения и почвоведения
Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН, Красноярск, Россия
660036 Красноярск, Академгородок. д. 50, стр. 28
Email: yuraintseva@mail.ru; тел. +7 (913) 527-79-96

Шаров Вадим Витальевич
Научный сотрудник лаборатории лесной геномики Научно-образовательного
центра геномных исследований Сибирского федерального университета,
Красноярск, Россия
660036, г. Красноярск, Академгородок, 50 «а», корп.2., каб. 133
Email: sharvadim07@yandex.ru

Кузмин Дмитрий Александрович, к.ф.-м.н., доцент
Заведующий кафедрой Высокопроизводительных вычислений Института
космических и информационных технологий и Директор центра
высокопроизводительных вычислений Сибирского федерального университета
660036, г. Красноярск, Академгородок, 50 «а», корп.2., каб. 133
Email: dm.kuzmin@gmail.com; тел. +8-(902)-921-0891