

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра защиты и современных технологий мониторинга лесов

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

И.Е.Ямских

подпись инициалы, фамилия

« _____ » _____ 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Генетическая структура популяций сосны кедровой сибирской
(*Pinus sibirica* Du Tour) на восточном макросклоне Кузнецкого Алатау
06.04.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Научный руководитель	_____	<u>к. б. н.</u> должность, ученая степень	<u>Орешкова Н.В.</u> инициалы, фамилия
Выпускник	_____		<u>Рычина Ю.К.</u> инициалы, фамилия
Рецензент	_____	<u>д. б. н.</u> должность, ученая степень	<u>Седельникова Т.С.</u> инициалы, фамилия

Красноярск, 2019

АННОТАЦИЯ

Магистерская диссертация содержит 58 страниц текстового документа, 9 рисунков, 10 таблиц, 6 формул, 87 использованных источников.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ПОПУЛЯЦИЙ СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ (*PINUS SIBIRICA* DU TOUR) НА ВОСТОЧНОМ МАКРОСКЛОНЕ КУЗНЕЦКОГО АЛАТАУ

Целью работы является определение уровня генетического разнообразия, структуры и степени внутривидовой дифференциации сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) на территории Кузнецкого Алатау.

Объектами исследования послужили выборки хвои из семи ценопопуляций сосны кедровой сибирской.

В работе были использованы 11 SSR-локусов, разработанных для проведения популяционно-генетических исследований *P. sibirica*. Проведен популяционно-генетический анализ выборок из семи ценопопуляций сосны кедровой сибирской, рассчитаны основные показатели внутри- и межпопуляционной изменчивости, и генетической дифференциации популяций.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1 ХАРАКТЕРИСТИКА РОДА <i>PINUS</i> L.....	8
1.1 Морфологические особенности	8
1.2 Систематическое положение.....	10
1.3 Распространение и экология произрастания	10
1.4 Краткая характеристика сосны кедровой сибирской <i>Pinus sibirica</i> Du Tour 12	
2 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ	16
2.1 Основные понятия и критерии оценки молекулярного маркера	17
2.2 Основные классы молекулярных маркеров	18
3 МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ.....	20
3.1 Определение и свойства	20
3.2 Микросателлиты в генетике растений	21
4 МЕТОДИКА РАЗРАБОТКИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ И ПРОВЕДЕНИЕ SSR АНАЛИЗА	23
4.1 NGS-технологии в разработке микросателлитных маркеров.....	24
4.2 Идентификация tandemных повторов и подбор праймеров для микросателлитных локусов.....	25
4.3 Оптимизация условий ПЦР и применение гель-электрофореза для идентификации SSR локусов	25
5 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	27
5.1 Отбор полиморфных маркеров.....	27
5.2 Отработка полиморфных маркеров на нескольких популяциях	30
<i>P. sibirica</i>	30
5.3 Оценка показателей генетического разнообразия	34
6 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ	36

6.1 Отбор полиморфных маркеров.....	36
6.2 Оценка показателей внутрипопуляционного генетического разнообразия вида <i>P.sibirica</i>	Ошибка! Закладка не определена.
6.3 Популяционная структура.....	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ	37
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	38

ВВЕДЕНИЕ

Одними из ключевых инструментов для получения информации о генетических процессах, как в природных, так и в искусственных популяциях являются молекулярно-генетические маркеры. Наибольшее значение их использование приобрело у лесообразующих видов хвойных, обладающих длительным периодом онтогенеза, что значительно затрудняет применение традиционных генетических методов.

Сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour), является одним из основных лесообразующих видов бореальных лесов северного полушария. Вопросам дифференциации популяций сосны кедровой сибирской в различных экологических условиях посвящены несколько работ. Несмотря на проведенные для различных регионов Западной и Восточной Сибири обширные исследования аллозимной изменчивости в популяциях, определяемой их географическим положением [66, 79, 80], работы по выявлению роли экологических барьеров в формировании генетической структуры и дифференциации данного вида в разных местопроизрастаниях выполнены на единичных объектах [76].

Очевидно, что полученные к настоящему времени данные по сравнительному анализу морфо-физиологических признаков репродуктивной сферы, цитогенетических параметров, а также полиморфизма белок-кодирующих последовательностей (изоферментов) популяций сосны кедровой сибирской из разных экотопов немногочисленны и достоверно диагностируют лишь их экотипическую дивергенцию, оставляя открытым вопрос о возможной генетической дифференциации на уровне непосредственного носителя наследственной информации – ДНК [70, 72, 76].

Ранее уже были проведены исследования генетического полиморфизма в различных популяциях сосны кедровой сибирской с использованием ДНК-

маркеров, разработанных для вида сосна кедровая европейская (*Pinus cembra* L.) [72].

Актуальность настоящего исследования обусловлена тем, что ранее не производилось исследование генетического полиморфизма в популяциях сосны кедровой сибирской с использованием молекулярно-генетических маркеров, разработанных специально для данного вида [46].

В настоящей работе планируется получить качественно новые данные по оценке генетической изменчивости, структуре и дифференциации популяций *P. sibirica*, основанные на исследовании полиморфизма ДНК с использованием маркеров ядерного генома (SSR-маркеры).

Достоинством микросателлитного анализа является большое число локусов (независимых маркеров) и аллелей, высокий уровень полиморфизма, кодоминантность, что позволяет легко идентифицировать гомозиготные и гетерозиготные генотипы. Все эти качества SSR-маркеров делают их высокоинформативными и удобными для изучения генетической структуры и дифференциации исследуемых популяций.

Целью работы является определение уровня генетического разнообразия, структуры и степени внутривидовой дифференциации сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) на территории Кузнецкого Алатау.

В задачи исследования входило:

1. Отобрать наиболее перспективные полиморфные микросателлитные локусы и провести оценку уровня их аллельного разнообразия.

2. Изучить генетическую структуру и определить параметры генетического разнообразия сосны кедровой сибирской.

3. Оценить подразделенность и степень дифференциации выборок в зависимости от расположения относительно макросклона.

4. Выявить влияние гетерогенности экологических условий среды, вызванной высотной поясностью, на генетическую структуру и степень дифференциации горных ценопопуляций сосны кедровой сибирской.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю Орешковой Н.В за неоценимую помощь на всех этапах работы, руководителю лаборатории лесной геномики Крутовскому К.В. Так же автор благодарен сотрудникам Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН д.б.н. Пименову А.В., д.б.н. Седельниковой Т.С. и д.б.н. Ефремову С.П. за предоставленный материал и помощь в описании экологических характеристик объектов исследования. Автор выражает искреннюю признательность сотрудникам отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов ЦЗЛ г. Красноярска за помощь в проведении лабораторных исследований.

Магистерская диссертация выполнена в лаборатории лесной геномики СФУ и на базовой кафедре защиты и современных технологий мониторинга лесов (зав. каф. д.б.н. И.Е. Ямских) при частичной финансовой поддержке в рамках проекта «Геномные исследования основных бореальных лесообразующих хвойных видов и их наиболее опасных патогенов в Российской Федерации», руководимого проф. К.В. Крутовским и финансируемого Правительством РФ (договор №14.Y26.31.0004).

1 ХАРАКТЕРИСТИКА РОДА *PINUS* L.

1.1 Морфологические особенности

Виды рода сосна (*Pinus* L.) - это крупное хвойное дерево, достигающее высоты 40-50 м и диаметра ствола до 2-4 м. Длительность жизни в среднем около 350-500 лет [51, 87]. Форма кроны видоизменяется в зависимости от возраста и может быть ширококонической, яйцевидно-притупленной или зонтиковидной. Кора стволов изменяется от гладкой, с малым количеством трещин, в раннем возрасте до более толстой, темно-серого цвета, с большим количеством трещин у взрослых деревьев. Для представителей данного рода характерно правильное моноподиальное ветвление [8]. Побеги двух типов - удлиненные (ауксибласти) и укороченные (брахибласти). На брахибластах хвоя располагается пучками по 2-3 или 5 (у отдельных видов от 1 до 8) хвоинок. Ауксибласти покрыты бурьими чешуйками, в пазухах которых располагаются сильно укороченные побеги. Морфологическое строение ростовых материнских почек ауксибластов является более сложным, чем у других родов [47, 86].

Первая хвоя распускается перед окончанием роста ауксибластов. Полное охвоение побегов происходит значительно позже, чем у других хвойных пород: в начале - первой половине лета [81]. Хвоя сосны колючая, узкая (1-2 мм шириной), различающаяся по длине у разных видов: от 2-5 до 45 см (сосна болотная). По количеству хвоинок в пучке сосны делятся на двуххвойные, треххвойные и пятихвойные. В поперечном сечении хвоя различна, для двуххвойных наиболее характерно плосковыпуклое сечение, у трех-пятихвойных - ромбическое. Продолжительность жизни хвоинок от 2-3 до 6-11 лет, что зависит от видовой принадлежности и условий среды [8]. Отмирание хвои может происходить в любые сезоны года, при этом опадая пучками вместе с брахибластами.

Вступление в репродуктивный период зависит от вида и условий произрастания, и колеблется от 5 до 50 лет [9]. Все виды данного рода однодомны, с разделением кроны на три генеративных части. В верхней части располагаются только женские шишки, в средней - как мужские, так и женские, в нижней - только мужские стробилы. Микростробилы располагаются в нижней и средней частях растущего удлиненного побега. Мегастробилы располагаются по 2-6 на верхнем конце растущего ауксибласта. В репродуктивный период мегастробилы мелкие, красного, пурпурно-фиолетового или желтого цвета, располагаются на побегах вертикально [62]. Опыление у сосны происходит перед распусканием молодой хвои, пыльца переносится ветром на достаточно большие расстояния [48].

Зрелые шишки могут иметь разную форму - яйцевидную, шаровидную или цилиндрическую. Размер шишек варьирует от 2-3 см до 35 см у разных видов. Семенные чешуи деревянистые или плотнокожистые. В шишках семена располагаются по два на семенной чешуе. Сверху они прикрыты кроющей чешуей, более короткой по сравнению с семенной и не выступающей за пределы шишки [85]. Семена сосен по типу распространения разделяются на анемохорные (распространяются ветром) и зоохорные (распространяются животными). У анемохорных сосен зрелые шишки раскрываются и высвобождают крылатые семена. Шишки зоохорных сосен после созревания опадают вместе с семенами. Семена зоохорных сосен не имеют крыльев, семенная кожура более плотная, что придает семени вид ореха (чаще характерно для пятихвойных) [65].

По отношению к экологическим условиям род неоднороден, встречаются и олиготрофы и мезотрофы, мезофиты и ксерофиты [23]. Встречаются теплолюбивые и холодостойкие виды. Большинство видов сосен светолюбивы и характеризуются низкой дымо- и газоустойчивостью [58].

1.2 Систематическое положение

Род *Pinus* входит в класс хвойных (*Coniferopsida*), семейство сосновых (*Pinaceae* (Spreng ex F.Rudolphi)), подсемейство Сосновые (*Pinoideae*). Впервые описан в 1753 Карлом Линнеем [19]. Данный род является самым большим в семействе сосновые (*Pinaceae*). Количество видов, входящих в данный род, Род *Pinus* разделен на два подрода – *Strobus* и *Pinus*. К подроду *Pinus* относят около 70 видов, а к подроду *Strobus* более 40 видов [9].

К подроду *Strobus* относятся мягкодревесные сосны, характеризующиеся светлой древесиной с малым количеством смолы. Главная отличительная особенность этого подвида - наличие на укороченных побегах по 5 хвоинок в пучке. В поперечном сечении хвоя с более светлыми внутренними гранями, длина хвоинки от 4 до 20 сантиметров. Кора сравнительно тонкая и долго остается гладкой, побеги собраны в мутовки. Распространение видов данного подрода очень широко [25].

К подроду *Pinus* относятся сосны с более плотной и темной древесиной. Так же отличительным признаком является более жесткая, по сравнению с подродом *Strobus*, хвоя, собранная в пучки по 2 хвоинки. Длина хвоинок достигает 30 см [9].

1.3 Распространение и экология произрастания

Наряду с родами *Larix* Mill и *Picea* Mill. представители рода *Pinus* относятся к наиболее распространенным на Земле хвойным видам. Распространение сосен ограничено северным полушарием, однако есть исключение, которым является сосна Меркуза (*Pinus merkusii* Jungh. et de Vriese), ареалом которой является остров Суматра в Индонезии. Наибольшее разнообразие видов данного рода наблюдается в США и Мексике (Рисунок 1). Около 10-15 видов сосны являются основными лесообразующими видами

северного полушария [9, 23]. Самый большой ареал наблюдается у сосны обыкновенной (*P. sylvestris* L.). Ареал других видов более ограничен и в большинстве случаев это связано с адаптацией только к определенным условиям. В различных частях ареала выделяют более 20 морфологических форм и до 10 экотипов сосен, с которыми эти формы часто связаны [42, 74].

На территории России выделяют 8 видов сосен, из которых наиболее распространенными являются два - сосна обыкновенная (*P. sylvestris*) и сосна сибирская кедровая (*P. sibirica*). Сосна обыкновенная распространена от Кольского полуострова и Белого моря до берегов Тихого океана. Ареал сосны сибирской кедровой меньше, и охватывает районы севера-востока Европейской части России, Урала и Сибири [44, 47].

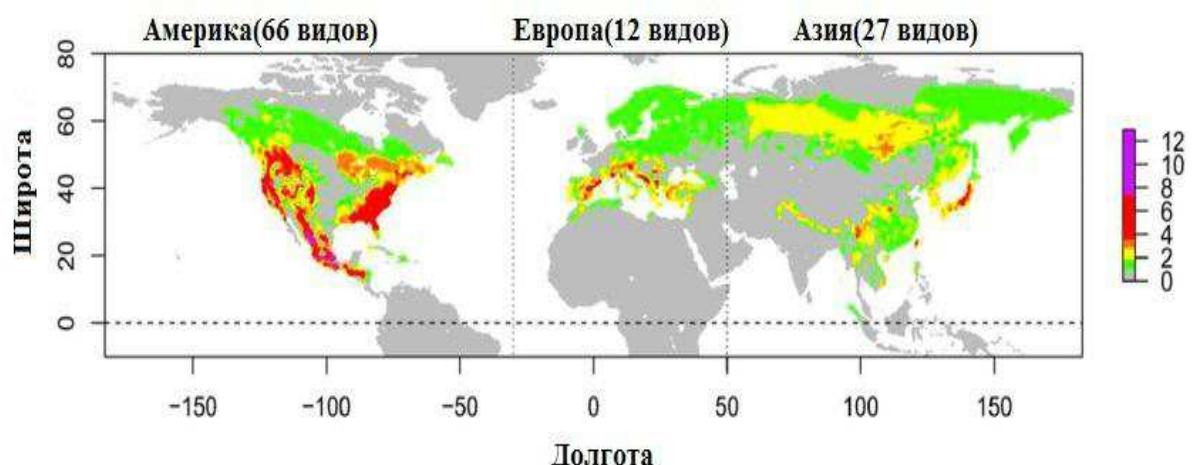


Рисунок 1 - Естественный ареал рода *Pinus* [23]

Примечание: цветовая шкала – обозначение плотности видов на выделенной территории

Сосновые леса обладают средообразующей функцией, влияя на влажность воздуха и почвы, так как ажурные кроны и менее сомкнутый полог леса пропускают больше осадков [58]. Так же это способствует накоплению снега. Корневая система сосен скрепляет почвы, препятствуя процессам выветривания. Под полог лесов проникает достаточно света, тем самым создавая благоприятные условия для развития напочвенного покрова, травяно-кустарничковой растительности. Подлесок может различаться в зависимости от условий произрастания - берёза, ива, рябина, кедровый стланик и др [60, 68].

1.4 Краткая характеристика сосны кедровой сибирской *Pinus sibirica* Du Tour

Сосна кедровая сибирская - важнейшая лесная порода Сибири. Свое название получила по сходству шишек с шишками настоящего кедра (Рисунок 2).

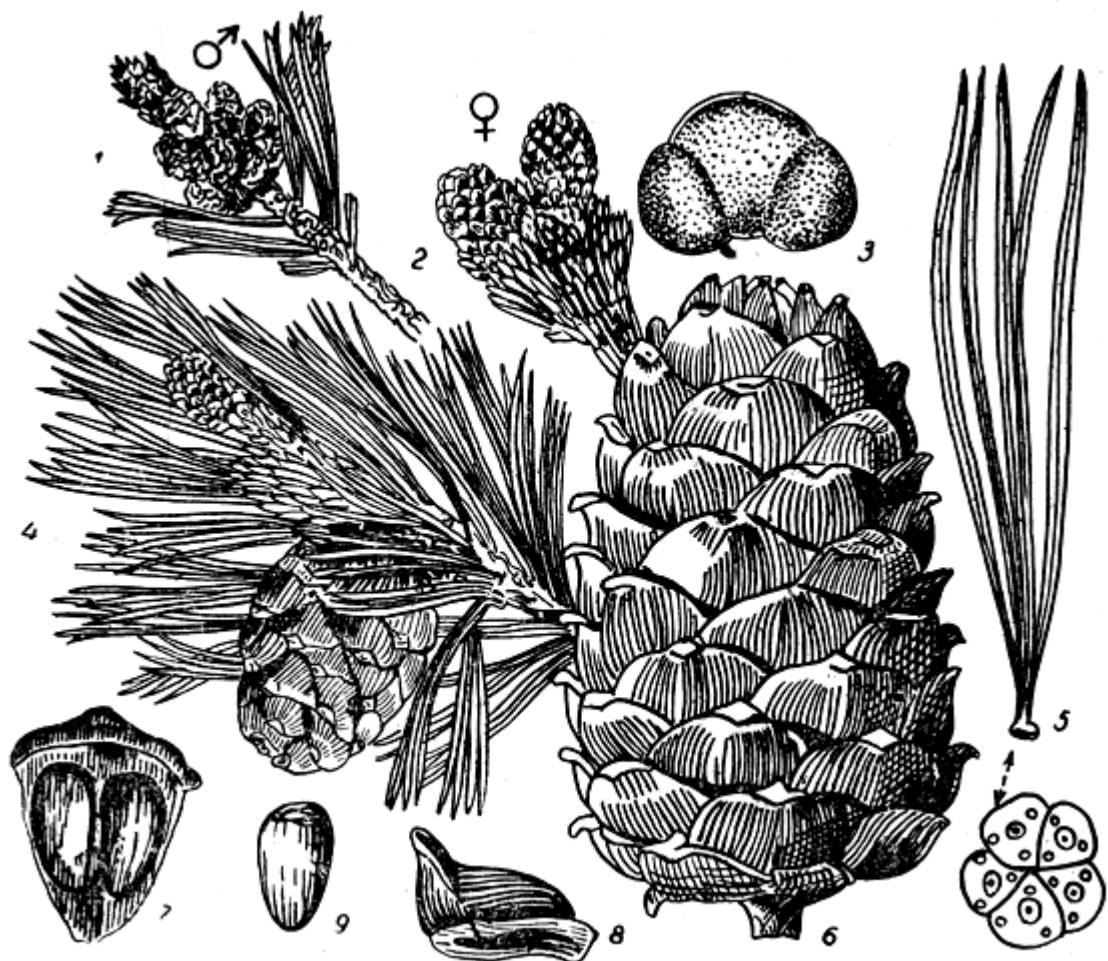


Рисунок 2 – *Pinus sibirica*: 1 - ветвь с хвоей и мужскими колосками; 2 — женские шишечки (цветение); 3 — пыльца- 4 — охвоенная ветвь с шишкой; 5 — пучок хвоинок и снизу разрез у его основания; 6 — шишка; 7 — семенная чешуя с двумя семенами; 8 — вид чешуйки сбоку; 9 — семя [86]

Высота ствола в зависимости от возраста и условий произрастания варьирует от 20 до 40 метров, встречаются экземпляры высотой 50-60 метров [60]. Диаметр ствола до 1,5 метров. Отличается пышной густой кроной. Форма кроны с возрастом меняется от яйцевидно заостренной до более широкой,

округлой [85]. Известны формы *P. sibirica* с широкопирамидальными кронами [74, 83]. Ствол пепельно-серый, уже к 100 годам образует грубо трещиноватую чешуйчатую корку. Ветвление мутовчатое, два типа побегов [56]. Удлинённые побеги покрыты буро-рыжими чешуйками. Более многочисленные укороченные побеги имеют на концах пучки хвоинок по 5 штук. Пучки окружены пленчатыми желто-бурыми влагалищами, которые опадают в первый год жизни хвои. В каждом пучке имеется по три смоляных хода [86]. Хвоя плотная зеленая, с внутренней стороны сизоватая, длина хвоинки от 7 до 15 сантиметров, ширина около 1-2 мм. В разрезе хвоя трехгранная, края хвоинки зубчатые. Возраст хвоинки в пучке от 3 до 6 лет, опадение происходит в любой период года. [56].

Корневая система сосны сибирской развита хорошо. Кроме стержневого, не особенно крупного корня, образует длинные крепкие боковые корни. На болотах и в местах с вечной мерзлотой развивает поверхностную корневую систему. При наличии толстого мохового покрова в сырых местах выпускает придаточные корни. На корневых мочках у кедра обычно имеются эктотрофные и эктоэндотрофные микоризы [86].

Пыление сосны сибирской кедровой происходит в июне. Пыление совпадает с появлением новых пучков хвои. Пыльца переносится ветром на достаточно большие расстояния за счет наличия у нее летательных мешков [43]. Мужские колоски оранжево-малинового цвета, собраны в крупные пучки у основания побегов. Женские шишки в количестве от двух до пяти штук малиново-фиолетовые, располагаются в хвое около конечной почки [52]. После опыления форма шишки меняется на более круглую, сама шишка приобретает светло-охристый оттенок [65]. Процесс оплодотворения заканчивается лишь во второй половине июня следующего года. К этому моменту шишка начинает усиленно расти. В семенных чешуях находится множество смоляных ходов, поэтому шишки очень смолянисты. Полное созревание шишечек происходит в сентябре, в середине октября - ноябре шишки раскрываются и полностью опадают. Описаны формы сосны кедровой сибирской с шишками различной

окраски - от дымчато-охристой до малиново-фиолетовой [73]. Размер шишек варьирует от 5 до 15 сантиметров, форма округлая или овальная, с острой или тупой верхушкой [54]. Чешуйки плотные, покрыты жесткими волосками, широкая часть заканчивается более светлым, чем сама чешуя, валиком. Под каждой чешуей располагаются два коричневых бескрылых семени. Каждое семя состоит из твердой оболочки, пленки, эндосперма и погруженного в него зародыша. В утолщенной части семени заметен темный уплотнение (“глазок”) - заросшее отверстие, через которое ранее питалась семяпочка [54].

Семеношение у свободностоящих деревьев кедра начинается с 25-40 лет, одиночные шишки могут появляться и раньше. В древостоях возраст начала семеношения изменяется в зависимости от сомкнутости крон – при низкой сомкнутости начинается в 50-80 лет, при высокой сомкнутости крон в 70-100 лет.

Наиболее активное семеношение происходит в период с 100 до 260 лет, после чего постепенно затухает. Древостой в возрасте более 300 лет дает урожай только при крайне благоприятных условиях [59]. Наибольшие урожаи дают 120-160-летние деревья. Урожайность периодическая (период 4-6 лет) и сильно зависит от области произрастания и климатических условий [50]. С 1 гектара кедровника в среднем собирают около 100 кг семян, однако убирают лишь часть; большинство их осыпается или разворовывается животными[59].

Так как семена сосны сибирской кедровой довольно тяжелые, естественное возобновление и распространение затруднено, особенно в горных областях [53, 55]. Семена относятся к зоохорным, распространителями являются в основном белка, бурундук и кедровка. Из опавших шишек и кучек семян вырастают пучки кедрового подроста, образующего куртины молодняков. Однако в большинстве лесов Сибири преобладают насаждения в возрасте от 150 до 300 лет, называемые кедрачами или кедровниками. Подобные насаждения обычно включают в состав темнохвойной тайги. В примеси к кедру так же встречаются ель сибирская и пихта [49].

Область распространения *P. sibirica* охватывает районы Северо – Востока Европейской части России, Урала, Западной и Восточной Сибири и Северной Монголии (Рисунок 3). По современному географическому распространению сосны кедровой сибирской ареал ее относится к Евроазиатскому типу, Монголо–Сибирско-Европейскому подтипу [9, 23, 81].

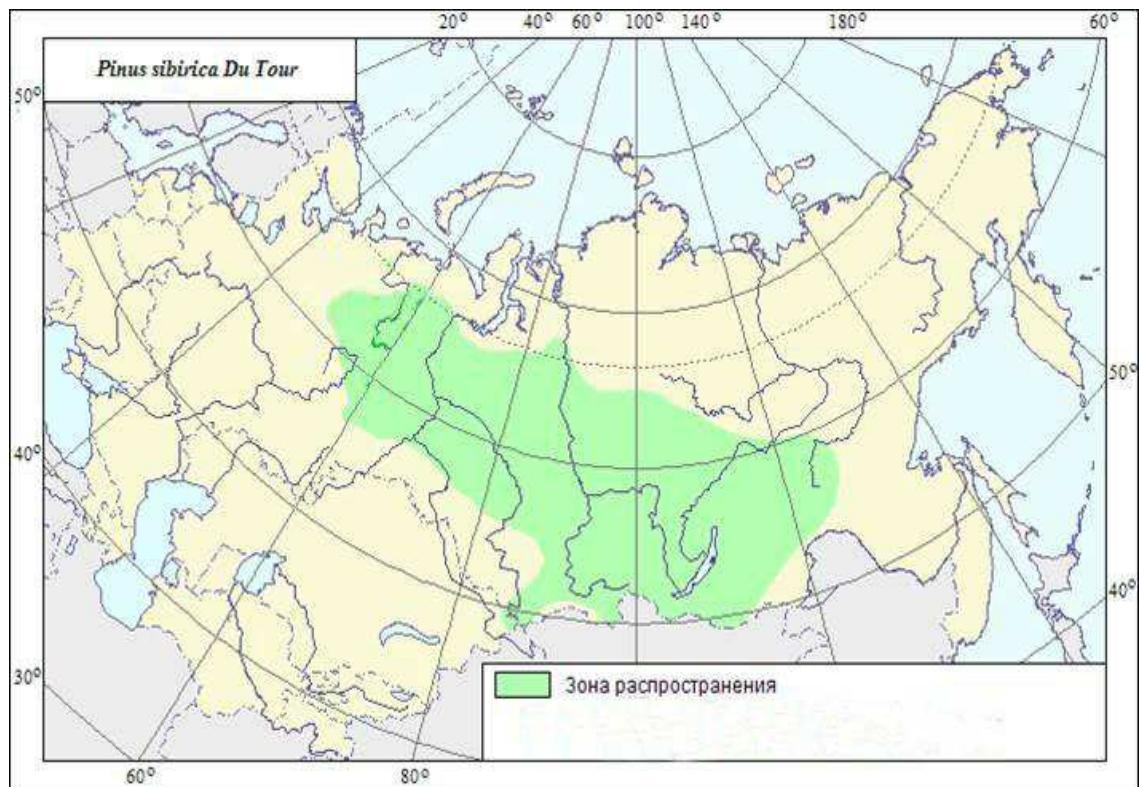


Рисунок 3 - Область распространения сосны кедровой сибирской [44]

Наиболее подробно изучены западные, уральские и южно – сибирские участки ареала сосны кедровой сибирской. Иногда ареал разделяют на сплошной и островной, однако для данного вида подобное деление весьма условно. В равнинной части насаждения *P. sibirica* чередуются с другими хвойными [9]. Главная особенность – приуроченность к долинам рек, в частности аллювиальным почвам долин, на которых рост даже в самых северных условиях произрастания характеризуется высокой активностью [85]. Область распространения в основном ограничена двумя факторами – климатическими условиями и наличием животных-распространителей семян.

2 ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ В ПОПУЛЯЦИЯХ И ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Развитие методов молекулярной генетики в последние десятилетия вывело использование молекулярно-генетических маркеров на новый уровень. Их роль в современной генетике чрезвычайно важна. Без них было бы невозможно составление подробных молекулярных карт человеческого генома и разнообразных видов растений и животных, с нанесенными на них важнейшими генами, отвечающими за рост и развитие организма, его морфологию и фенотип, предрасположенность к заболеваниям и устойчивость к негативным факторам. Молекулярные маркеры широко используются в популяционно-генетических исследованиях, сравнительной генетике и геномике, филогенетике. Использование данных, полученных с помощью этих маркеров, позволяет расширить возможности медицинской диагностики, способствует развитию более точных методов паспортизации селекционно-значимых пород животных и сортов растений, значительно ускоряет процесс селекции, позволяет сократить площади, занятые селекционным материалом, добиваясь существенной экономии трудовых и материальных ресурсов [83].

Вопросы эффективной идентификации видов растений, а также выявление их филогенетических связей вызывали интерес на всем протяжении развития биологической науки. Отличия между представителями близких видов бывают минимальны, или же их выявление осложнено высоким уровнем внутривидового полиморфизма. Умение точно и эффективно определять видовую принадлежность исследуемых организмов очень важно и в экологогенетических исследованиях. Развитие молекулярных методов дало возможность применять молекулярные маркеры для видоидентификации и филогенетических исследований. Данные методы не являются заменой классическим подходам, однако успешно их дополняют. В основе молекулярных методов лежит закономерность, согласно которой степень

родства между живыми организмами обычно коррелирует с уровнем сходства в гомологичных последовательностях нуклеиновых кислот и белков [83].

2.1 Основные понятия и критерии оценки молекулярного маркера

Молекулярные маркеры так же, как и генетические, можно характеризовать понятиями «доминантность» и «кодоминантность». Аллели являются различными вариантами одного и того же маркера, расположенными в одинаковом участке (локусе) гомологичных хромосом. Различными вариантами являются различия в длине нуклеотидной последовательности, или наличие в данной последовательности нуклеотидных замен. Соответственно, если при анализе маркера возможно выявить оба аллеля, то такой тип наследования маркера называется кодоминантным. В случае выявления только одного аллеля маркер относится к домinantному типу наследования.

Так же имеются различия и по количеству локусов, характерных для данного маркера. По данному признаку маркеры подразделяются на монолокусные и мультилокусные. Для монолокусных маркеров характерен кодоминантный тип наследования, в свою очередь для мультилокусных – доминантный [83].

Выбор оптимального маркера определяется следующими критериями:

- Универсальность: последовательность должна быть легко амплифицирована и отсеквенирована для максимального количества растительных видов.
- Качество сиквенса и степень перекрывания: локусы должны быть наиболее пригодны для получения перекрывающихся сиквенсов с прямого и обратного праймеров, с минимумом ошибок секвенирования.
- Способность различать виды: с помощью каких локусов возможно различить как можно больше видов? Для этого внутривидовой полиморфизм должен быть ниже межвидового, а формы, относящиеся к одному виду

кластеризоваться отдельно от форм других видов [69].

2.2 Основные классы молекулярных маркеров

Молекулярно-генетические маркеры (ДНК-маркеры) – это генетические последовательности, анализируемые на уровне ДНК с использованием методов молекулярной биологии. Данный вид маркеров относят к третьему поколению генетических маркеров. Ко второму поколению относились белковые маркеры, а к первому - классические генетические маркеры. Классическим генетическим маркером принято считать ген, аллеи которого ясно проявляются на фенотипическом уровне. Белковым маркером считается ген, аллеи которого различаются на уровне итогового белкового продукта - например, имеют значимую разницу в молекулярной массе. ДНК-маркер, в свою очередь, соответствует участку генома, разные аллеи которого отличаются на уровне нуклеотидной последовательности, причем это может быть, как кодирующий участок, так и некодирующая ДНК. Методы выявления полиморфизма на уровне ДНК:

- гибридизация с известными нуклеотидными последовательностями;
- секвенирование нуклеотидной последовательности интересующего участка генома;
- сравнение длин фрагментов, полученных с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- обработка ДНК эндонуклеазами рестрикции.

На данный момент не существует общепринятой классификации ДНК-маркеров. В последние годы вышло большое число обзоров, посвященных описанию методов анализа ДНК растений, в том числе и молекулярно-генетических маркеров [17, 64, 69]

Количество молекулярных маркеров с каждым годом растет и на сегодняшний день насчитывает несколько десятков разновидностей.

Классификация наиболее широко используемых ДНК-маркеров (Таблица 1) приведена в работе Е.К. Хлесткиной [83].

Таблица 1 - Схематическая классификация молекулярных маркеров, разделенных на три группы, согласно основному методу анализа: маркеры, исследуемые с помощью blot-гибридизации, ПЦР и ДНК-чипов [83]

Тип маркера	Основной метод анализа		
	Блот-гибридизация	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	ДНК-чипы
Монолокусные	RFLP ₁₉₈₀	SSR ₁₉₈₉ STS ₁₉₈₉ SSCP ₁₉₈₉ CAPS ₁₉₉₃ SCAR ₁₉₉₃	SNP ₁₉₉₈
Мультилокусные	Минисателлиты ₁₉₈₅	RAPD ₁₉₉₀ ISSR ₁₉₉₄ AFLP ₁₉₉₅ SSAP ₁₉₉₇ IRAP ₂₀₀₆	DArT ₂₀₀₁

Данная классификация разделяет маркеры на группы по времени их разработки. Первая группа представляет собой первое поколение ДНК-маркеров, получивших наиболее широкое распространение в 1980-е годы. В 1990-е годы ключевые позиции заняли ПЦР-маркеры, в 2000-е годы их место заняли молекулярные маркеры, основанные на использовании ДНК-чипов. В последние годы для анализа полиморфизма ДНК все чаще используют метод прямого секвенирования генома или его отдельных участков.

3 МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РАЗНООБРАЗИЯ РАСТЕНИЙ

3.1 Определение и свойства

Микросателлитные маркеры известны под несколькими названиями - STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site) или STR (short tandem repeat), или SSR (simple sequence repeat). Разница названий заключается в разных областях применения понятий: в исследованиях растений используют аббревиатуру SSR, для животных и человека более характерно использование STR [69].

Микросателлиты состоят из участков ДНК длиной в 2 - 8 пар нуклеотидов, тандемно повторенных от 5 до 50 раз. Данный вид повторов распространен по всему эукариотическому геному. Появление микросателлитов происходит главным образом из-за проскальзывания ДНК-полимеразы и последующих ошибок в процессе репликации [14]. Минимальным порогом для возникновения мутации в микросателлитном локусе является длина в 8 нуклеотидов [27].

Для создания SSR-маркеров подбираются праймеры к уникальным последовательностям ДНК, фланкирующим микросателлитный повтор (требует предварительного знания их нуклеотидной последовательности). Из-за относительно малого размера микросателлиты могут легко амплифицироваться при использовании ПЦР на ДНК, экстрагируемой из различных тканей. Фланкирующие последовательности уникальны для каждого локуса, следовательно, каждая пара праймеров определяет лишь один локус. Длины изучаемых локусов различны, хотя последовательность одна и та же. Собственно это и есть аллели, анализируемые в монолокусном микросателлитном анализе. Для каждого локуса можно определить, является ли данная особь гетерозиготой или гомозиготой, что является преимуществом по сравнению с другими праймерами.

Полиморфизм данного вида маркеров определяется количеством копий

мономерных единиц в кластере, что приводит к существованию множества аллельных вариантов. Полиморфизмы могут быть визуализированы, и при наличии генетического анализатора можно анализировать большое количество образцов. Микросателлиты высоко вариабельны, часто обнаруживаются десятки аллелей по одному и тому же локусу, отличающихся один от другого по числу повторов. Гетерозиготность их очень высока (часто более 75%). При создании полиморфных маркеров, кроме динуклеотидов используются микросателлиты три- и тетрамерных мотивов. В более редких случаях встречаются пента- и гексамерные мотивы. Вследствие большей длины звена, применение таких мотивов позволяет упростить методику анализа аллельного полиморфизма [64].

3.2 Микросателлиты в генетике растений

Общепринято мнение, что в геноме большинства растений количество повторов достаточно высоко (до 60% от общей массы). По способу организации, повторы ДНК подразделяются на класс тандемных и класс диспергированных повторов. Несмотря на то, что такой вид структурной организации характерен и для некоторых генов (например, рибосомальная ДНК), все же большинство тандемных повторов находятся в некодирующих участках генома [83]. Высокая скорость мутирования (10^{-3} - 10^{-6} на поколение) [40], кодоминантный характер наследования, расположение в некодирующей части генома и равномерное распределение по всем хромосомам позволяет высокоточно оценивать внутри- и межпопуляционный полиморфизм [64]. Одним из главных преимуществ микросателлитного анализа является его относительная простота и экономическая выгода. Данный вид маркеров требует лишь проведения ПЦР реакции с уже известными праймерами, визуализацию продуктов реакции и генотипирование можно осуществить с помощью гель-электрофореза, обычно в полиакриламиде. Эти свойства позволяют применять

микросателлитный анализ для маркерной селекции и анализа генетического разнообразия практически в любых лабораториях, с минимальным оснащением. Было показано успешное применение микросателлитных маркеров для различения между видами внутри рода, а также для определения происхождения дерева. [22, 32, 35].

Одним из весомых недостатков микросателлитных маркеров считается необходимость в наличии обогащенных геномных библиотек, что ограничивает исследование новых видов. Размер генома и его сложность сделали поиск монолокусных, воспроизводимых SSR-маркеров для хвойных лесообразующих видов сложной задачей. Польза микросателлитов, как генетических маркеров для хвойных видов также была ограничена ввиду недостатка данных о собственно геномных последовательностях. Кроме того, уже известные праймеры часто могут не амплифицировать тот же самый локус у родственных таксонов, если фланкирующие последовательности не являются строго консервативными. Так же проблемой SSR-маркеров является наличие «нуль» аллелей, то есть отсутствие продукта амплификации из-за неполной комплементарности праймеров в зоне отжига ввиду наличия мутаций в данном регионе. В свою очередь это усложняет оценку гетерозиготности и подсчет аллельных вариантов. [40].

Для популяционных исследований помимо ядерных микросателлитов используются цитоплазматические микросателлитные маркеры: митохондриальные [83] и хлоропластные. [38]. Средний уровень вариации последовательности в этих геномах низкий, однако, хлоропластные SSR-маркеры часто являются результатом мутаций в ограниченном числе аллельных состояний, что может приводить к одинаковым мутациям, возникающим независимо в разных популяциях (гомоплазиям). Для уточнения надежности результатов, получаемых с помощью данного вида маркеров, требуется более детальное сравнение с другими маркерами [37].

4 МЕТОДИКА РАЗРАБОТКИ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ И ПРОВЕДЕНИЕ SSR АНАЛИЗА

Процесс создания нового набора полиморфных SSR-маркеров для конкретного вида заключается в выделении микросателлитных повторов, с достаточной информацией о фланкирующих последовательностях для подбора соответствующих праймеров, с последующей оптимизацией условий ПЦР, визуализацией результатов реакции с помощью гель-электрофореза и тестированием праймеров на образцах ДНК особей данного вида. Достаточно часто разработанные маркеры тестируют так же на близкородственных видах, с целью проверить переносимость маркеров и оценить их полиморфность. Первый протокол для *de novo* выделения микросателлитных маркеров был предложен в 1991 году К. Рассманом с соавторами [26], которые определяли SSR-содержащие клоны при помощи гибридизации колоний с SSR-пробами. Однако такой метод оказался достаточно трудоемким и дорогостоящим, что не оправдывало себя для видов с низкой частотой встречаемости SSR-локусов.

Выделение микросателлитных маркеров может быть достигнуто путем конструирования и секвенирования SSR-обогащенных геномных библиотек. Среди большинства протоколов для обогащения геномных библиотек доминирующим является метод захвата при помощи селективной гибридизации [10]. Данный метод является простым и воспроизводимым, и позволяет выделять микросателлитные маркеры для многих видов растений с достаточно высокой эффективностью [14]. Известны случаи использования продуктов других молекулярных маркеров, таких как RAPD, AFLP или ISSR-маркеры, а также доступные в базах данных последовательности EST и хлоропластных геномов [29]. И, наконец, возможна адаптация для конкретного вида микросателлитных локусов, известных для другого, близкородственного вида

или рода. Фланкирующие имеют более низкую скорость мутации, чем сами SSR-повторы, что позволяет кросс-видовое применение некоторых праймеров [12].

4.1 NGS-технологии в разработке микросателлитных маркеров

Одним из главных ограничений в разработке SSR-маркеров остается необходимость в предварительном знании нуклеотидной последовательности для создания праймеров для ПЦР. До недавнего времени, подавляющее большинство последовательностей ДНК, получались при помощи дорогих, низкопроизводительных электрофоретических методов. Сильное изменение в ситуации в лучшую сторону произошло с появлением технологий секвенирования нового поколения. Две NGS технологии, наиболее часто используемые для поиска SSR-маркеров это 454 Life Sciences и Illumina. Наиболее значимым отличием между технологиями 454 и Illumina является общее число пар нуклеотидов, генерируемых за один пробег. Первая было наиболее популярной в исследованиях по разработке маркеров, поскольку продуцирует более длинные риды. В недавних исследованиях [15] была продемонстрирована эффективность использования NGS для масштабного поиска SSR-локусов в транскриптоме и геноме растений.

Этап обогащения необходимо проводить только для одно- или динуклеотидных мотивов. Также, подходы с SSR обогащением используют в случае низкого покрытия при секвенировании [5]. При среднем и высоком покрытии выполнение данного шага может быть необязательным. Технологии 454 и Illumina при секвенировании produцируют огромный размер данных, и без того повышающий вероятность нахождения tandemного повтора. Уменьшение сложности генома при этом может быть достигнуто за счет асSEMBЛИРОВАНИЯ последовательности. Таким образом, выполнение шага по обогащению ДНК для разработки SSR-маркеров при использовании NGS может не принести реальной выгоды при поиске повторов [41], однако использование только лишь NGS способствует уменьшению сложности и

стоимости разработки новых SSR-маркеров.

4.2 Идентификация tandemных повторов и подбор праймеров для микросателлитных локусов

Поиск tandemных повторов может быть осуществлен при помощи разнообразного программного обеспечения. Существуют инструменты, направленные только на поиск tandemных повторов, такие как Tandem Repeat Finder (TRF) [2], MISA [33], и SciRoko [16]. Однако существуют программы, позволяющие не только находить повторы, но и так же подбирать праймеры - SSRLocator [4] и SSRPoly [7]. Для быстрого и точного обнаружения микросателлитных повторов в геномных данных большого размера было разработано программное обеспечение GMATo [36].

Следующим шагом является подбор праймеров и их проверка с помощью ПЦР амплификации. Длина прямого и обратного праймеров может варьироваться от 15 до 30 п.н. Оптимальной для амплификации микросателлитных регионов считается длина в 21–23 п.н. [13]. Так же желательно, чтобы праймеры имели 40–60% GC-состав. Добавление некомплементарной некомплементарной последовательности к 3'-концу праймеров позволит избежать образования димеров праймеров.

4.3 Оптимизация условий ПЦР и применение гель-электрофореза для идентификации SSR локусов

При проведении SSR-анализа полимеразная цепная реакция используется для определения полиморфизма длин фрагментов, амплифицированных с использованием подобранных праймеров, фланкирующих микросателлитный локус. В классическом варианте ПЦР программа состоит из примерно 35 циклов смены температурного режима, каждый из которых включает в себя стадию денатурации при 92-95°C, отжига праймеров при 55–65°C и элонгации

при 72°C. Оптимизация ПЦР программы необходима для наиболее успешной амплификации маркерных участков, в противном случае велика вероятность различных осложнений, таких как отсутствие амплификации, низкий выход целевого продукта и большое количество неспецифичных фрагментов, возникающих вследствие ошибок в связывании праймеров и образовании праймер-димеров. Крайне важную роль играет подбор правильной температуры отжига праймеров. Необходимо подобрать оптимальную температуру, так как при слишком высокой температуре не произойдет связывание праймера с ДНК-матрицей, а при слишком низкой происходит больше неспецифического связывания. Чрезмерное количество циклов также ведет к появлению неспецифичных продуктов.

Еще одним способом уменьшения количества неспецифичных продуктов амплификации является использование программ с “touchdown”(постепенным понижением температуры). При такой программе первые несколько циклов амплификации проводятся при высокой температуре отжига для снижения вероятности неспецифического связывания праймера с ДНК, а затем постепенно снижается до оптимальной.

Разделение локусов на основании длин фрагментов возможно при проведении разных разновидностей гель-электрофореза. Наиболее простой и часто встречающейся из них является электрофорез в агарозном геле высокого разрешения с окрашиванием в растворе бромистого этидия [1]. Чуть более дорогим, но при этом и более точным является проведение электрофореза в полиакриламидном геле. И, наконец, максимально точным вариантом является методика капиллярного электрофореза (с использованием секвенаторов ABI PRISM (Applied Biosystems)). Данная методика показывает крайне высокую эффективность, а также позволяет создавать мультиплексные панели, с помощью которых возможен анализ образцов сразу по нескольким локусам, что уменьшает затраты времени на проведение исследования. Основным минусом является его высокая стоимость, и недоступность для некоторых лабораторий, ввиду отсутствия специализированного оборудования.

5 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

5.1 Отбор полиморфных маркеров

Из ранее разработанных в лаборатории лесной геномики СФУ микросателлитных локусов для сосны кедровой сибирской были отобраны 18 пар праймеров, указанных авторами статьи как наиболее перспективные [46]. Для исследуемых нами выборок проводили ряд модификаций в программе ПЦР-амплификации. Биологическим материалом послужили образцы хвои *P. sibirica*, собранные в 2014 году на восточном макросклоне Кузнецкого Алатау сотрудниками Института леса им. В.Н. Сукачева ФИЦ КНЦ СО РАН.

Таблица 2 – Праймеры для вида *P. sibirica* [46]

Локус	Мотив	Последовательности праймеров	Длина фрагмента
<i>Ps_2040062</i>	(GAT) ₁₂	F: TGGTATGAAAACCTTCAGCCTC R: TAATGTCGTCTCGTCGTCGT	175-175
<i>Ps_31489</i>	(AGA) ₆	F: CACCCAAACAAGACAAACCTCT R: TTCTTCCTCCTCCCCCTTATTCT	182-188
<i>Ps_25463</i>	(GGT) ₇	F: ACTACTCCCGAAGGCGTAAAC R: TTTTGAGATGTGT GGAGAGGAC	107-116
<i>Ps_80612</i>	(AAG) ₁₀	F: CTTCTAAGTGGGTCATCTTGGC R: CTGTCTAGGCTTTGGCCTTTA	162-180
<i>Ps_1502048</i>	(AAT) ₁₁	F: AGATCCATCCCAATCACAGTTC R: AGGGACCTAGCACCTTCATCCT	177-201
<i>Ps_2040062</i>	(GAT) ₁₂	F: TGGTATGAAAACCTTCAGCCTC R: TAATGTCGTCTCGTCGTCGT	175-175
<i>Ps_1915155</i>	(TAT) ₁₁	F: TTGTTGGATTGGCTCATGG R: TCTCCAGTACACACCTCGATTG	160-205
<i>Ps_30675</i>	(ATG) ₆	F: GGCTCATAGTGCTGATAAAGGC R: GACTGGTCTCATGGCTGCTAAC	194-200
<i>Ps_718958</i>	(TAT) ₁₀	F: CTATGTATGGGTCAATGGTGTCC R: GATGCAACAAATGCACATGACT	198-210
<i>Ps_26193</i>	(TGA) ₆	F: ACGATAACATGGACTCGGTGA R: AGGAGTTCTCATCATCAACAAAGAG	131-152
<i>Ps_364418</i>	(TGA) ₁₀	F: TCGGACCTAAAGAAAAGAGGTG R: AAGATTCGTCTGAGTGGACGTT	162-177
<i>Ps_806389</i>	(ATA) ₁₁	F: AACTTCTCGTCCCACACTCAAT R: ATGGTTGTCGATTACCTCACC	214-241
<i>Ps_1375177</i>	(CAT) ₁₀	F: ATGGGCTAGATGGTAGCAGTTC R: GGTGGTTGGCTCTCTTAAATG	206-239

<i>Ps_25981</i>	(TATT) ₅	F: TTGAGTGGGATGGACATAGAG R: TTGCCCAAGTCTACAAGAT	170-178
Окончание таблицы 2			
<i>Ps_39709</i>	(ATGT) ₅	F: GTTCTCTAACCTCGAACTTGTGAT R: CTGAAAACCCTGTCAAACAAACA	202-226
<i>Ps_86750</i>	(ATAC) ₆	F: ATGATCCCTAACGAGCCTG R: TCTGTCGATGTTGTGCATGT	234-242
<i>Ps_31919</i>	(AATA) ₅	F: TGAGTTGCTCTGAAGTGTGTTG R: GGTGCAGATCCGAGTTAACAGAT	188-208
<i>Ps_1179752</i>	(TGC) ₁₀	F: GCTGCTGAAAGACACTGCTACT R: CAGAGAAAGGAAGCAACAAACAG	191-206

Схема первичного тестирования включала проверку отжига праймеров на образцах ДНК четырех деревьев *P. sibirica*, с последующим проведением электрофореза в полиакриламидном геле и окрашиванием продуктов ПЦР при помощи раствора бромистого этидия. После оптимизации условий амплификации каждый локус тестировался на 8-10 образцах из одной выборки сосны кедровой сибирской с целью выявления полиморфизма и наличия нуль-аллелей. При отработке использовалась программа ПЦР с «touchdown» (Таблица 3) для уменьшения неспецифической амплификации. По результатам данной проверки были отобраны локусы, демонстрирующие наиболее стабильные интерпретируемые спектры.

Таблица 3 - Программа ПЦР амплификации

Этап амплификации	Температура	Время	Количество циклов
Первичная денатурация	94°C	1 мин	1
Денатурация	94°C	30 сек	
Отжиг праймеров	60°C, с понижением на 1°C каждый цикл (до 50°C)	30 сек,	9
Элонгация	72°C	1 мин	
Денатурация	94°C	30 сек	
Отжиг праймеров	50°C	30 сек	24
Элонгация	72°C	30 сек	
Денатурация	72°C	10 мин.	1
Охлаждение	4°C	—	—

Препараты тотальной ДНК были выделены модифицированным методом с применением цетилtrimетиламмониумбромида (СТАВ) из образцов тканей хвои, высушенной при помощи силикагеля (Рисунок 4) [6]. Для проведения ПЦР использовали готовые реакционные смеси для амплификации ДНК «GenePak PCR Core» производства ООО «Лаборатория Изоген», содержащие ингибиранную для «горячего старта» Таq-ДНК-полимеразу, дизоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6%-ом полиакриламидном геле с использованием трис-EDTA-бортного электродного буфера в камерах для вертикального фореза. Окраску геля проводили в растворе бромистого этидия с последующей визуализацией в ультрафиолетовом свете. В качестве маркера стандартных длин использовали ДНК плазмиды pBR322 *E. coli*, обработанную рестриктазой *Hpa*II. Методики, используемые в работе были взяты из учебно-методического пособия к лабораторным занятиям, составленного Н.В. Орешковой и И.Е. Ямских [77].

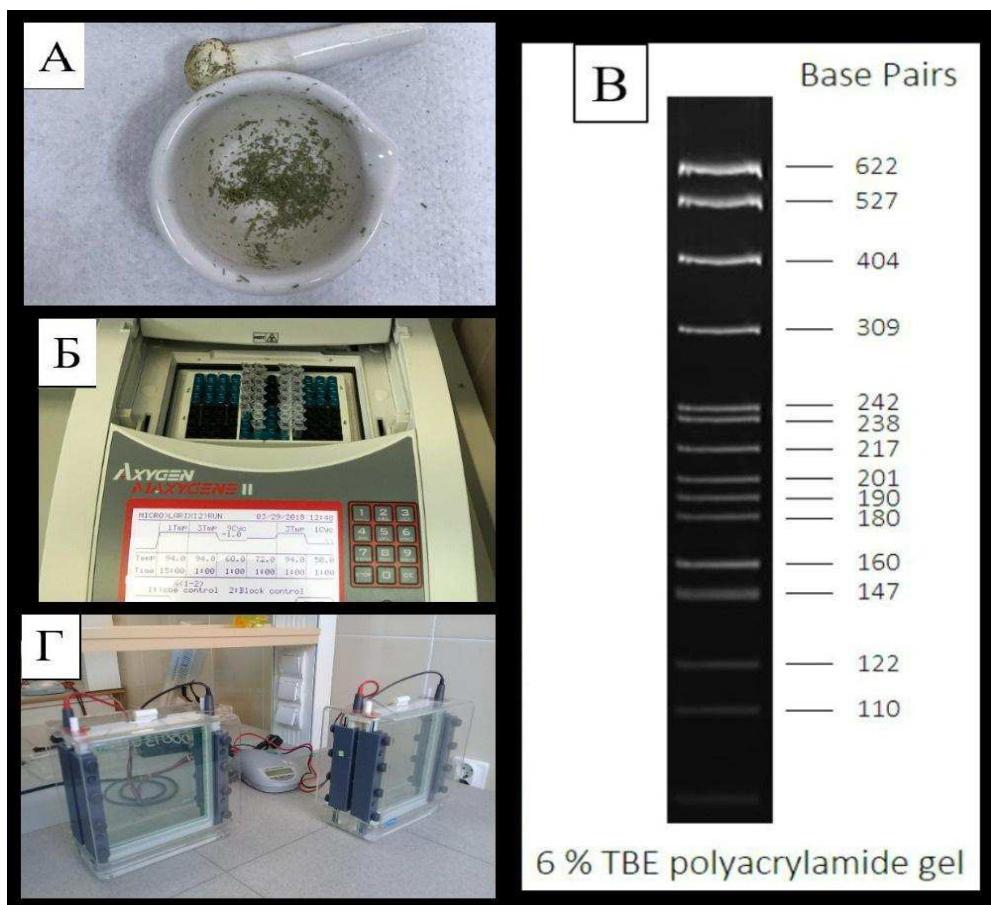


Рисунок 4 - Лабораторное оборудование, используемое для проведения тестового популяционно-генетического исследования сосны кедровой сибирской: А - высушенная хвоя в ступке для измельчения, Б - амплификатор и стрипы с образцами для проведения ПЦР, В - маркер стандартных длин *HpaII*, Г - вертикальный электрофорез в полиакриламидном геле.

5.2 Отработка полиморфных маркеров на нескольких популяциях

P. sibirica

Объектами окончательного тестирования полиморфных локусов послужили выборки из 7 ценопопуляций сосны кедровой сибирской, расположенных на разных участках макросклона. Названия выборок и их местоположения представлены в таблице 4. Объем выборок составил 30 деревьев.

Таблица 4 - Географическое расположение популяций сосны сибирской кедровой, использованных для тестирования отобранных микросателлитных локусов

Номер популяционной выборки	Географические координаты, высота над ур. моря	Условия произрастания, тип леса, морфологические особенности <i>Pinus sibirica</i>	Таксационные показатели		
			высота, м	диаметр, см	возраст, лет
K-1	54°37'44'' с.ш. 88°35'37'' в.д. 1300 м	Плоскобугристая вершина перевала на Кузнецком Алатау (гора Булка). Мохово-ерниковая тундра с латками кустистых лишайников. Древесная растительность представлена <i>Betula nana</i> , <i>Betula tortuosa</i> , <i>Sorbus sibirica</i> , <i>Salix</i> sp. Встречаются «юбочные» формы пихты и ели, подрост лиственницы. <i>P. sibirica</i> представлена кустарникомидными (многоствольными) формами. Побеги выше 1 м обмерзают.	0,5-1	5-12	80-110
K-2	54°36'91'' с.ш. 88°36'18'' в.д. 1290 м	Верхняя часть ручьевого распадка на западном макросклоне Кузнецком Алатау (гора Булка). Кедровник чернично-кустарниковый (<i>Salix</i> sp.) с пихтой и можжевельником. У многих деревьев <i>P. sibirica</i> множественные признаки снеголома и перевершинивание, щитовидная форма кроны.	7-10	27-53	более 200

Окончание таблицы 4

K-3	54°40'52'' с.ш. 88°38'69'' в.д. 1370 м	Плоская вершина перевала на Кузнецком Алатау (гора Арарат). Ерниково-кустарничковая тундра с латками кустистых лишайников, одиночными экземплярами пихты и ели «юбочной» формы. Взрослые экземпляры <i>P. sibirica</i> представлены кустовидными формами.	2-3	12-18	100-130
K-4	54°40'52'' с.ш. 88°38'69'' в.д. 1370 м	Плоская вершина перевала на Кузнецком Алатау (гора Арарат). Ерниково-кустарничковая тундра с латками кустистых лишайников, одиночными экземплярами пихты и ели «юбочной» формы. Возобновление <i>P. sibirica</i> представлено гнездовыми группами в количестве 100-200 групп/га.	0,2-0,3	1-3	10-20
K-5	54°41'33'' с.ш. 88°49'29'' в.д. 780 м	Каменистые склоны южной экспозиции в долине р. Сарала (восточный макросклон Кузнецкого Алатау). Кедровник осочково-мертвопокровный с караганой. <i>P. sibirica</i> представлена крупносуковатыми деревьями с шаровидной формой кроны.	12-15	40-65	180-250
K-6	54°46'07'' с.ш. 88°53'08'' в.д. 650 м	Нижняя часть склона южной экспозиции в долине р. Сарала (восточный макросклон Кузнецкого Алатау). Кедровник мохово-разнотравный с елью, пихтой и березой. <i>P. sibirica</i> представлена деревьями классического морфотипа с овально-конусовидной формой кроны.	14-20	25-60	100-180
K-7	54°20'53'' с.ш. 89°16'41'' в.д. 830 м	Выложенная нижняя часть склона южной экспозиции в районе пос. Коммунар. Монодоминантный редкостойный кедровник мертвопокровно-разнотравный с караганой. <i>P. sibirica</i> представлена крупносуковатыми деревьями с шаровидной формой кроны.	8-12	35-40	10-120

Кузнецкий Алатау – горная система, входящая в состав Алтае-Саянской горной страны и являющаяся одной из частей Салаиро-Кузнецкоалатауской

горно-равнинной области. Территория данной горной системы ограничена на западе - Кузнецкой впадиной, на севере и северо-западе - Колывань-Томским плато, на востоке – Минусинской межгорной впадиной, на юге - Горной Шорией. Общая площадь составляет 38 тыс. квадратных километров. Западный макросклон находится на территории Кемеровской области, восточный - в Республике Хакасии.

Климат на Кузнецком Алатау подвержен влиянию не только вертикальной поясности, но и ориентации макросклонов. Для западного макросклона характерен более влажный и мягкий климатическим режим, для восточного макросклона - более континентальный. В каждом конкретном районе климат определяется совокупностью ориентации макросклона и ландшафтного типа климата, а также местными условиями. Почвы на макросклонах так же различаются. Для восточного макросклона наиболее характерны темно-серые слабоподзолистые почвы, для западного - подзолистые и светлые горно-луговые ненасыщенные почвы [45, 51].

По характеру растительности выделяются следующие пояса: высокогорный (горно-тундровый и субальпийский), лесной (таежный, черневой или подтаежный) и лесостепной. Лесной пояс занимает наибольшую часть площади Кузнецкого Алатау. На макросклонах его образуют следующие древесные формации: пихтово-елово-кедровая (*Pinus sibirica* – *Picea obovata* Ledeb. - *Abies sibirica* Ledeb.) горная тайга, пихтово-осиновая (*Populus tremula* L. – *A. sibirica*) [67, 68].

Выборки К-1, К-3, К-4, К-5, К-6 и К-7 были собраны на восточном макросклоне, выборка К-2 – на западном (Рисунок 5, 6).

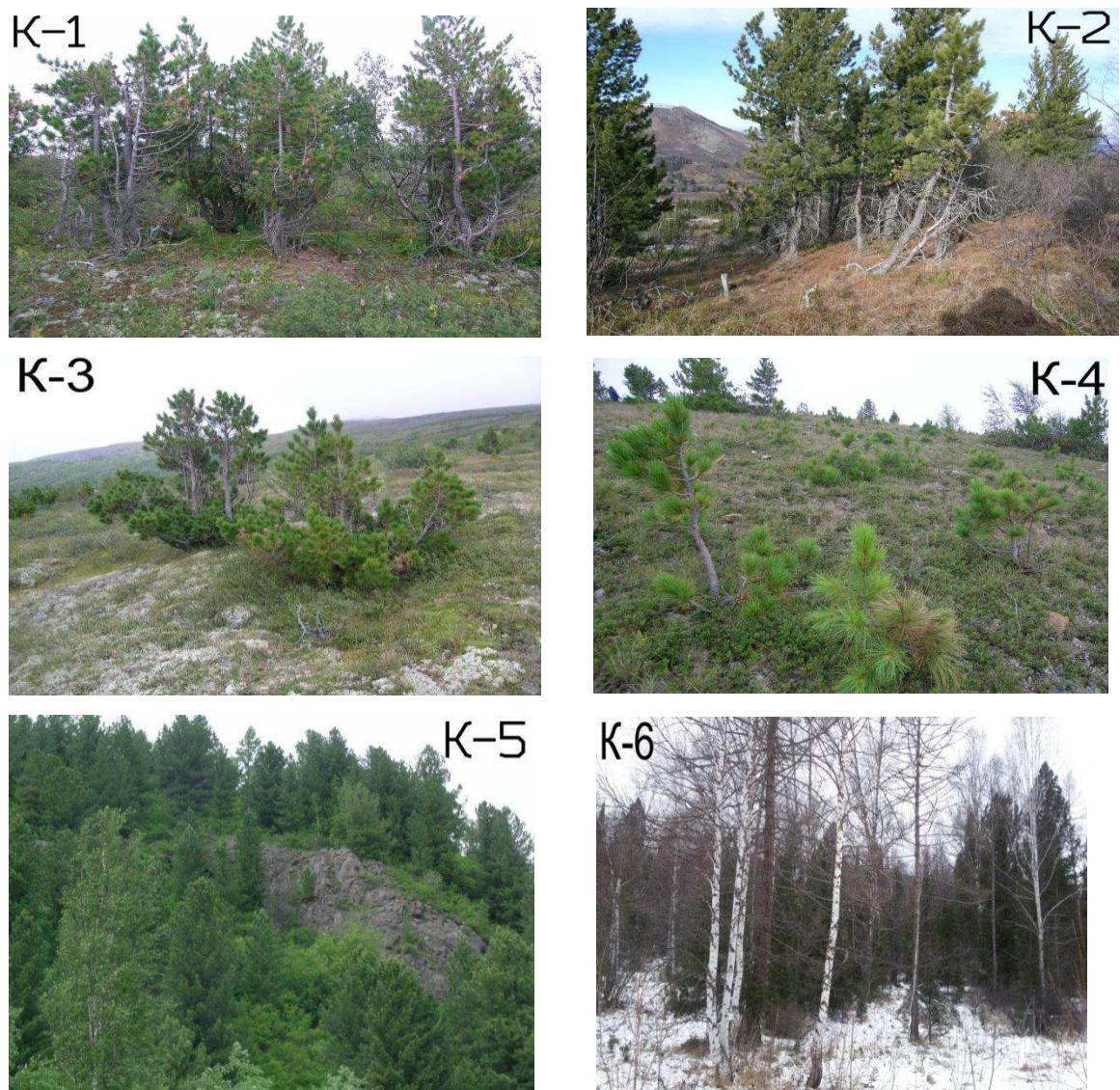


Рисунок 5 – Ценопопуляции сосны кедровой сибирской в разных точках сбора (фото Пименова А.В.)

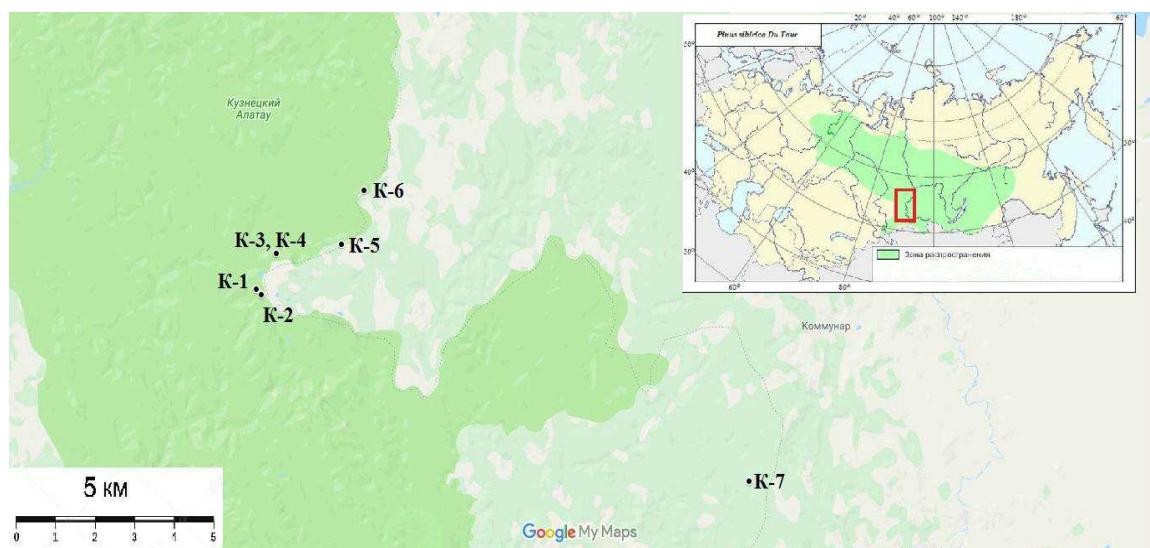


Рисунок 6 – Карта расположения выборок сосны кедровой сибирской на территории Кузнецкого Алатау

5.3 Оценка показателей генетического разнообразия

Для оценки уровня генетического разнообразия были рассчитаны такие параметры, среднее число аллелей на локус (A), средняя наблюдаемая (H_o) и ожидаемая гетерозиготность (H_e), эффективное число аллелей (N_E).

Среднее число аллелей на локус (N_A) было оценено путем деления общего числа обнаруженных аллелей на число исследуемых локусов. Наблюдаемая гетерозиготность (H_o) рассчитывалась как отношение числа гетерозиготных образцов к общему числу проанализированных по данному локусу образцов.

Расчет показателя ожидаемой гетерозиготности производился по формуле:

$$H_e = 1 - \sum f_k^2, \quad (1)$$

где f_k — частоты аллелей, выявленных для k -го локуса.

Эффективное число аллелей было рассчитано по формуле:

$$n_e = 1 / (1 - H_e), \quad (2)$$

где H_e — уровень гетерозиготности по всем проанализированным локусам.

Для оценки популяционной структуры и степени генетической подразделённости популяций были рассчитаны показатели F -статистик Райта [70]. Коэффициент инбридинга особей в субпопуляциях (F_{IS}):

$$F_{IS} = 1 - \frac{H_o}{H_{\bar{e}}} \quad (3)$$

где H_o — наблюдаемая гетерозиготность;

$H_{\bar{e}}$ — средняя ожидаемая гетерозиготность.

Коэффициент инбридинга особи относительно вида (F_{IT}) вычислялся из соотношения:

$$F_{IT} = F_{IS} + (1 - F_{IS})F_{ST} \quad (4)$$

Коэффициент межпопуляционной дифференциации (F_{ST}) был рассчитан для каждого i -того аллеля конкретного локуса, и далее усреднялся для всего локуса:

$$F_{ST} = \frac{H_T - \bar{H}_E}{H_T}, \text{ в которой } H_T = 1 - \sum \bar{p}_i^2 \quad (5)$$

где \bar{p}_i — средняя частота i -го аллеля.

Значения данных параметров, рассчитанные для каждого локуса отдельно, далее усреднялись по всем локусам.

Количественная оценка уровня дивергенции между исследованными популяциями была определена с использованием стандартного генетического расстояния М. Нея [21] по формуле:

$$D = -\ln I_N, \text{ в которой } I_N = \frac{\sum \sum_{jk}^x Y_{jk}}{\sqrt{(\sum \sum x_{jk}^2)(\sum \sum y_{jk}^2)}}, \quad (6)$$

где I — показатель генетического сходства;

x_{jk} и y_{jk} — частоты j -го аллеля k -го локуса в сравниваемых популяциях.

Для обнаружения и исключения возможных ошибок генотипирования и выявления скрытых *null*-аллелей была использована программа MICRO-CHECKER [34]. При помощи данного ПО была проведена оценка частот возможных *null*-аллелей в локусах и скорректировано число гомозиготных генотипов, а также частота амплифицированных аллелей в популяциях. После корректировки генотипы изученных семи выборок сосны кедровой сибирской были использованы для расчета внутри- и межпопуляционных параметров при помощи утилиты GenAlEx 6.5 [24]. Кластеризацию по методу невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) проводили в программе STATISTICA [30]. Для анализа связи между географическими и генетическими расстояниями использовали тест Мантела [20].

6 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

6.1 Отбор полиморфных маркеров

Изъято 13 страниц.

ВЫВОДЫ

1. 11 наиболее перспективных микросателлитных локусов, демонстрирующих средне- и высоко-полиморфные спектры для сосны кедровой сибирской, предложены нами для дальнейших популяционно-генетических исследований этого вида.

2. Для проанализированных локусов было выявлено 44 аллельных варианта. Число редких аллелей варьирует в выборках от 4 до 12.

3. Наиболее высокие внутривидовые показатели генетического разнообразия выявлены в самой старой выборке К-5 ($N_A = 3,545$; $H_O = 0,494$).

Тогда как аналогичные показатели низкого уровня определены у выборки К-6, расположенной в самой нижней части склона южной экспозиции в долине р. Сарала ($N_A = 2,818$; $H_O = 0,415$).

4. Оценка популяционной структуры изученных выборок показала, что в выборках наблюдается 10%-ный дефицит гомозигот относительно популяции ($F_{IS} = -0,100$) и почти 5%-ный ($F_{IT} = -0,046$) относительно вида. Около 5% от всей наблюдаемой изменчивости ($F_{ST} = 0,049$) приходится на межпопуляционную. Это свидетельствует о невысокой подразделенности изученных выборок.

5. Расчет уровня генетической дифференциации показал, что значения генетической дистанции М. Нея (D_N) между популяциями варьируют в широких пределах (от 0,019 до 0,061). Наиболее генетически удаленными друг от друга являются выборки К-2 и К-4 ($D_N = 0,061$), расположенные на разных макросклонах Кузнецкого Алатау. Наименьшее значение генетического расстояния наблюдается между выборками К-6 и К-7 ($D_N = 0,019$).

6. В результате проведенного исследования выявлено, что отсутствует корреляция между географическим и генетическим расстоянием, на что оказывает серьезное воздействие экологическая гетерогенность среды обитания в разных высотных поясах Кузнецкого Алатау.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Asif, M. High resolution metaphor agarose gel electrophoresis for genotyping with microsatellite markers / M. Asif, M. Rahman, J. Mirza // Pak. J. Agri. Sci. - 2008. - V. 45. - I. 1. - P. 75-79.
2. Benson, G. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences / G. Benson // Nucleic Acids Res. - 1999. - V. 27. - P. 573–580.
3. Chakraborty, R. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications / R.Chakraborty //Annals of human genetics. – 1992. – Т. 56. – №. 1. – С. 45-57.
4. da Maia, L. C. SSR locator: tool for simple sequence repeat discovery integrated with primer design and PCR simulation / L. C. da Maia, et al. // Int. J. Plant Genomics. — 2008. —P. 412-696.
5. Delmas, C.E. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Rhododendron ferrugineum* (*Ericaceae*) using pyrosequencing technology / C.E. Delmas, E. Lhuillier, A. Poron, N. Escaravage // American Journal of Botany. - 2011 - V. 98. - I 5. - P. 120-2.
6. Devey, M.E. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers /M.E. Devey, J.C. Bell, D.N. Smith et al. //Theoretical and Applied Genetics. – 1996. – Т. 92. – №. 6. – С. 673-679.
7. Duran, C. Predicting polymorphic EST-SSRs in silico / C. Duran, R. Singhania, H. Raman et al.// Mol. Ecol. Resour. - 2013. - V.13. - P. 538–545.
8. Farjon, A. Pines: drawings and descriptions of the genus *Pinus* / A. Farjon// Brill, 2018. – 235 p.
9. Gernandt, D.S. Phylogeny and classification of *Pinus* /D.S. Gernandt, G.G. López, S.O. García //Taxon. – 2005. – Т. 54. – №. 1. – С. 29-42.
10. Glenn, T.C Isolating microsatellite DNA loci /T.C. Glenn, N.A. Schable //Methods in enzymology. – Academic Press, 2005. – Т. 395. – С. 202-222.

11. Guries, R.P. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) /R.P. Guries, F.T. Ledig//Evolution. – 1982. – T. 36. – №. 2. – C. 387-402.
12. Holmen, J. Cross-species amplification of 36 cyprinid microsatellite loci in *Phoxinus phoxinus* (L.) and *Scardinius erythrophthalmus* (L.) / J. Holmen, L.A. Vollestad, K.S. Jakobsen, C.R. Primmer // BMC Res Notes. - 2009. - V. 2. - P. 248.
13. Jewell, E. SSR primer and SSR taxonomy tree: Biome SSR discovery / E. Jewell, A. Robinson, D. Savage // Nucl. Acids Res. - 2006. - V. 34. - P. 656–659.
14. Kalia, R.K. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants / R.K. Kalia, M.K. Rai, S. Kalia et al. // Euphytica.- 2011. - V. 177. - P.309-334.
15. Karam, M. J. Genomic exploration and molecular marker development in a large and complex conifer genome using RADseq and mRNASeq / M.J. Karam, F. Lefèvre, M.B. Dagher-Kharrat et. al. // Mol Ecol Resour. - 2015 - V.15. - I. 3. - P. 601-12.
16. Katti, M. V. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences / M.V. Katti, P.K. Ranjekar, V.S. Gupta // Mol Biol Evol. - 2001. - V. 18: - P. 1161-1167.
17. Kaur, S. Simple Sequence Repeat Markers in Genetic Divergence and Marker-Assisted Selection of Rice Cultivars: A Review / S. Kaur, P.S. Panesar, M.B. Bera, V. Kaur // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. - 2015. - V. 55. -I. 1. - P. 41-49.
18. Kofler, R. SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation / R. Kofler, C. Schlötterer, T. Lelley // Bioinformatics. - 2007. - V. 23. - P. 1683–1685.
19. Linnaeus C. Species Plantarum, exhibentes plantas rite cognitas, ad genera relatas, cum differentiis specificis, nominibus trivialibus, synonymis selectis, locis natalibus, secundum systema sexuale digestas. Tomus II. - Holmiae: Impensis Laurentii Salvii, 1753.

20. Mantel, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach / N. Mantel //Cancer research. – 1967. – T. 27. – №. 2 Part 1. – C. 209-220.
21. Nei, M. Genetic Distance between Populations / M. Nei // Am. Nat. - 1972. - V. 106. - P. 283–291.
22. Ng, K.K.S. Forensic timber identification: a case study of a CITES listed species, *Gonystylus bancanus* (*Thymelaeaceae*) / K.K.S. Ng, S.L. Lee, L.H. Tnah, Z. Nurul-Farhanah et al. // Forensic Sci Int Genet. - 2016. - V. 23. - P. 197-209.
23. Nobis, M.P Latitudinal variation in morphological traits of the genus *Pinus* and its relation to environmental and phylogenetic signals / M.P. Nobis, C Traiser, A. Roth-Nebelsick //Plant Ecology & Diversity. – 2012. – T. 5. – №. 1. – C. 1-11.
24. Peakall, R. GenAlEx V6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. Peakall, P.E. Smouse // Mol. Ecology Notes. - 2006. - V. 6. № 1. P. 288–295.
25. Price, R.A. Phylogeny and systematics of *Pinus* /R.A. Price, A. Liston, S.H. Strauss //Ecology and biogeography of *Pinus*. – 1998. – C. 49-68.
26. Rassman, K. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting / K. Rassman, C. Schlötterer, D. Tautz // Electrophoresis. - 1991. - V. 12. - P. 113–118.
27. Rose, O. A threshold size for microsatellite expansion / O. Rose, D. Falush // Mol Biol Evol. - 1998. - V. 15. - P. 613-615.
28. Salzer, K. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L / K. Salzer, F. Sebastiani, F. Gugerli, A. Buonamici //Molecular ecology resources. – 2009. – T. 9. – №. 3. – C. 858-861.
29. Senan, S. Methods for development of microsatellite markers: an overview / S. Senan, D. Kizhakayil, B. Sasikumar, T. E. Sheeja. // Not Sci Biol. - 2014. -V. 6. - P.1-13.
30. StatSoft Inc., STATISTICA Data Analysis Software System, Version 8.0, www.statsoft.com. 2007.

31. Teoh, S.B. Nuclear DNA amounts in populations of *Picea* and *Pinus* species / S.B. Teoh, H. Rees // Heredity. – 1976. – T. 36. – №. 1. – P. 123.
32. Tereba, A. Analysis of DNA profiles of ash (*Fraxinus excelsior* L.) to provide evidence of illegal logging / A. Tereba, S. Woodward, A. Konecka, M. Borys // Wood Science and Technology. - 2017. - V. 51. - I. 6. - P. 1377–1387.
33. Thiel, T. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) / T. Thiel, W. Michalek, R. Varshney, A. Graner // Theor. Appl. Genet. - 2003. - V. 106. - P. 411–422.
34. Van Oosterhout, C. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite date / C. Van Oosterhout, W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills, P. Shipley // Mol. Ecology Notes. 2004. - № 4. P. 353–538.
35. Varshney, R.K. Exciting journey of 10 years from genomes to fields and markets: Some success stories of genomics-assisted breeding in chickpea, pigeonpea and groundnut / R.K. Varshney // Plant Sci. - 2016. - V. 242. - P. 98-107.
36. Wang, X. GMATo: a novel tool for the identification and analysis of microsatellites in large genomes / X. Wang, P. Lu, Z. Luo // Bioinformation. - 2013. - V. 9. - P. 541–544.
37. Wang, X.R. Molecular Markers in Population Genetics of Forest Trees / X.R. Wang, A.E. Szmidt // Scandinavian Journal of Forest Research. - 2001. - V. 16. - № 3. - P. 199-220.
38. Wheeler, G.L. A review of the prevalence, utility, and caveats of using chloroplast simple sequence repeats for studies of plant biology / G.L. Wheeler, H.E. Dorman, A. Buchanan et al // Applications in Plant Sciences. - 2014. - V. 2. - I. 12.
39. Wheeler, N.C. Biosystematics of the genus *Pinus*, subsection *Contortae* / N.C. Wheeler, R.P. Guries, D.M. O’Malley // Biochemical Systematics and Ecology. – 1983. – T. 11. – №. 4. – C. 333-340.
40. Xu, X. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length / X. Xu, M. Peng, Z. Fang // Nat Genet. - 2000. - V. 24: - P. 396–399.

41. Zalapa, J.E. Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (SSR) loci in the plant sciences/ J.E. Zalapa, H. Cuevas, H. Zhu et al. // American Journal of Botany. - 2012. - V. 99. - I. 2. - P. 193–208.
42. Аболин, Р.И. Болотные формы *Pinus sylvestris* L ./Р.И. Аболин //Тр. Бот. музея АН. – 1915. – №. 14. – С. 62-84.
43. Авров, Ф.Д. Генетический обмен между насаждениями кедра сибирского в различных лесорастительных условиях / Ф.Д. Авров //Проблемы кедра. Экология кедровых лесов. – 1992. – №. 5. – С. 61-68.
44. Агроклиматический атлас России и сопредельных стран: экономически значимые растения, их болезни, вредители и сорные растения [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.agroatlas.ru/ru/index.html>
45. Алпатьев, А.М. Физическая география СССР: Азиатская часть /А.М. Алпатьев //Высшая школа, 1976. - Т. 2.- 360 с.
46. Белоконь, М.М. Разработка микросателлитных маркеров сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) по результатам полногеномного de novo секвенирования /М.М. Белоконь, Д.В. Политов, Е.А. Мудрик и др. // Генетика. 2016. - том 52, № 12, С. 1418–1427.
47. Бобров, Е.Г. Лесообразующие хвойные СССР / Е.Г. Бобров // Л., 1978. - 188 с.
48. Бударагин, В.А. Типы аномальных пыльцевых зерен сосны обыкновенной / В.А. Бударагин, А.И. Бреусова //Половая репродукция хвойных. Новосибирск: Наука. – 1973. – С. 100-103.
49. Велисевич, С.Н. Семенная продуктивность *Pinus sibirica* (*Pinaceae*) в заболоченных и суходольных экотопах юга Западной Сибири / С.Н. Велисевич, О.Г. Бендер, А.П. Зотикова //Растительные ресурсы. – 2011. – Т. 47. – №. 2. – С. 1-14.
50. Велисевич, С.Н. Формирование структуры популяций сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) в заболоченных экотопах юга Томской области /С.Н. Велисевич, Е.А. Петрова, О.Г. Бендер и др. //Вестник

Томского государственного университета. Биология. – 2008. – №. 1 (2). С. 13–22.

51. Власенко, В.И. Структура и динамика лесной растительности заповедных территорий Алтае-Саянской горной страны : дис./В.И. Власенко. - Красноярск: Институт леса СО РАН, 2003. 484 с.
52. Воробьев В.Н. Рост и пол кедра сибирского/В.Н. Воробьев, Н.А. Воробьева, С.Н. Горошкевич – Новосибирск: Наука, 1989. 167 с.
53. Воробьев, В.Н. Особенности плодоношения кедра сибирского в горных условиях / В.Н. Воробьев //Биология семенного размножения хвойных в Западной Сибири. Новосибирск: Наука. – 1974. – С. 15-70.
54. Горошкевич, С.Н. Внутрипопуляционное разнообразие шишек и семян *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение 1. Уровень и характер изменчивости признаков / С.Н. Горошкевич, О.В. Хоторной // Растительные ресурсы. 1996. Т. 32, № 3. С. 1–11.
55. Горошкевич, С.Н. Морфогенез жизненной формы стланца у кедра сибирского на верхнем пределе распространения в горах Западного Саяна / С.Н. Горошкевич, Е.А. Кустова // Экология. – 2002. – №. 4. – С. 243-249.
56. Горошкевич, С.Н. О морфологической структуре и развитии побегов *Pinus sibirica* (*Pinaceae*) /С.Н. Горошкевич //Ботанический журнал. – 1994. – Т. 79. – №. 5. – С. 63-71.
57. Горошкевич, С.Н. Структура урожая семян в таежных и припоселковых кедровниках: уровень, характер и природа различий / С.Н. Горошкевич //Лесное хозяйство. – 2010. – №. 2. – С. 30-31.
58. Горчаковский, П.Л. Фитоиндикация условной среды и природных процессов в высокогорьях /П.Л. Горчаковский, С.Г. Шиятов – Наука, 1985.
59. Дюкарев, А.Г. Припоселковые кедровники как объект охраны и реконструкции / А.Г. Дюкарев, Н.Н. Пологова, С.А. Кривец и др. // Вестник Томского гос. ун-та. Биология, 2009. № 2 (6). С. 75–83.

60. Ефремов, С.П. Биологическая продуктивность и углеродный пул фито- массы лесных болот Западной Сибири / С.П. Ефремов, Т.Т. Ефремова, В. Блойтен // Сиб. экологический журн. 2005. - № 1. С. 29–44.
61. Ефремов, С.П. Влияние осушения низинных болот на рост кедра сибирского / С.П. Ефремов. - Лесоведение, 1967.
62. Зауер, В.В. Морфология пыльцы *Gymnospermae*-голосеменных растений /В.В. Зауер //Пыльцевой анализ. Л. – 1950. – С. 154.
63. Захаров-Гезехус, И.А. Цитоплазматическая наследственность / И.А. Захаров-Гезехус // Вавиловский журнал генетики и селекции. - 2014. - Т. 18, № 1. - С. 93–102.
64. Калько Г.В. ДНК-маркеры для оценки генетических ресурсов ели и сосны / Г.В. Калько // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. - 2015. - № 4. - С. 19-34.
65. Кожевников, А.М. Плодоношение кедра сибирского в западной части Забайкалья / А.М. Кожевников //Труды Ин-та леса и древесины. – 1963. – Т. 62. – С. 76-93.
66. Крутовский, К.В. Генетическая изменчивость сибирской кедровой сосны *Pinus sibirica* Du Tour. Сообщение IV. Генетическое разнообразие и степень генетической дифференциации между популяциями / К.В. Крутовский, Д.В. Политов, Ю.П. Алтухов и др. // Генетика. 1989. - Т. 25. № 11. С. 2009–2032.
67. Куминова, А.В. Растительность Кемеровской области / А.В. Куминова //Новосибирск, 1950. - 167 с.
68. Маскаев, Ю.М. Леса / Ю.М. Маскаев // Растительный покров Хакасии. - Новосибирск, 1976. - С. 153 - 216.
69. 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.
70. Мудрик, Е.А. Генетическая изменчивость и дифференциация сибирской и европейской кедровых сосен по микросателлитным локусам / Е.А.

Мудрик, М.М. Белоконь, Ю.С. Белоконь и др. // Популяционная генетика: современное состояние и перспективы: Материалы Междунар.молодежной конф. М.: Цифровичок, 2011. С. 225–226.

71. Мудрик, Е.А. Генетическая изменчивость и доля перекрестного опыления *Pinus cembra* L. в Украинских Карпатах и Австрийских Альпах по аллозимным и микросателлитным локусам / Е.А. Мудрик, М.М. Белоконь, Ю.С. Белоконь и др. //Лесной вестник/Forestry bulletin. – 2012. – №. 1 (84).

72. Мудрик, Е.А. Генетическая изменчивость кедровых сосен Европы и Сибири по данным микросателлитных локусов / Е.А. Мудрик, М.М. Белоконь, Ю.С. Белоконь и др. // Актуальные проблемы прикладной генетики, селекции и биотехнологии растений: Материалы Междунар. науч. конф. Ялта, 2009. С. 47.

73. Некрасова, Т.П. Биологические основы семеношения кедра сибирского / Т.П. Некрасова. Новосибирск: Наука, 1972. - 272 с.

74. Николаева, С.А. Жизненные формы *Pinus sibirica* (*Pinaceae*) в лесотундровом экотоне Северо-Чуйского хребта (Центральный Алтай) / С.А. Николаева, Е.О. Филимонова //Растительный мир Азиатской России. – 2016. – №. 1. – С. 16-23.

75. Орешкова, Н. В. Изменчивость ядерных микросателлитных локусов в популяциях кедрового стланика (*Pinus pumila* (Pallas) Regel) из российской части ареала / Н.В. Орешкова, В.П. Ветрова, С.Н. Горошкович и др. //Генетика. – 2017. – Т. 53. – №. 3. – С. 324-333.

76. Орешкова, Н.В. Генетическая структура и дифференциация болотных и суходольных популяций сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) по ядерным микросателлитным локусам / Н.В. Орешкова, Т.С. Седельникова, А.В. Пименов, С.П. Ефремов // Генетика. 2014. - том 50, № 9, с. 1059–1066.

77. Орешкова, Н.В. Методы молекулярно-генетических исследований [Электронный ресурс]: учеб.-методическое пособие к лабораторным занятиям / Н.В. Орешкова, И.Е. Ямских. – Красноярск: Сиб. федеральный ун-т, 2018. Режим доступа: <http://Lib3.sfu-kras.ru/ft/LIB2/ELIB/b28/i-930815313.pdf>

78. Петрова, Е.А. Генетическое разнообразие кедра сибирского *Pinus sibirica* Du Tour: распределение вдоль широтного и долготного профилей / Е.А. Петрова, С.Н. Горошкевич, М.М. Белоконь и др. //Генетика. – 2014. – Т. 50. – №. 5. – С. 538-538.
79. Петрова, Е.А. Распределение аллозимной изменчивости у кедра сибирского: три уровня разнообразия / Е.А. Петрова, С.Н. Велисевич, Д.В. Политов и др. // Хвойные бореальной зоны. 2010. Т. XXVII. № 1–2. С. 160–168.
80. Политов, Д.В. Характеристика генофондов популяций кедровых сосен по совокупности изоферментных локусов / Д.В. Политов, К.В. Крутовский, Ю.П. Алтухов // Генетика. 1992. - Т. 28. № 1. С. 93–114.
81. Седых, В.Н. Формирование кедровых лесов Приобья/ Н.В. Седых. - Новосибирск: Наука, 1979. - 110 с.
82. Тахтаджян, А.Л. Высшие растения, т.1. От псилофитовых до хвойных / А.Л. Тахтаджян. - М., Л.: Изд. АН СССР, 1956 - 485 с.
83. 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.
84. Храмов, А.А. Необычная форма *Pinus sibirica* (Rupr.) Mayr на верховом болоте / А.А. Храмов, В.И. Валуцкий // Ботан. журн. 1970. - Т. 55. № 2. С. 280–284.
85. Хуторной, О.В. Экологическая изменчивость морфоструктуры кроны кедра сибирского на верхней границе распространения / О.В. Хуторной, С.Н. Велисевич, В.Н. Воробьев // Экология. 2001. - № 6. С. 427–433.
86. Шиманюк, А.П. Дендрология / А.П. Шиманюк. - Москва: Лесная промышленность, 1974 - с.264 - с 62.
87. Шиятов, С.Г. Дендрохронология верхней границы леса на Урале / С.Г. Шиятов. - М.: Наука, 1986. - 136 с.

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра защиты и современных технологий мониторинга лесов

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

И.Е.Ямских

подпись инициалы, фамилия

« _____ » 20 ____ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Генетическая структура популяций сосны кедровой сибирской
(*Pinus sibirica* Du Tour) на восточном макросклоне Кузнецкого Алатау
06.04.01 – Биология

06.04.01.06 – Геномика и биоинформатика

Научный руководитель


подпись, дата

к. б. н.
должность, ученая
степень

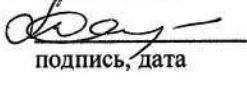
Орешкова Н.В.
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

Рычина Ю.К.
инициалы, фамилия

Рецензент


подпись, дата

д. б. н.
должность, ученая
степень

Седельникова Т.С.
инициалы, фамилия

Красноярск, 2019