Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой

_____ _____
подпись инициалы, фамилия

« ____»_____20 __ г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Разработка микросателлитных маркеров сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на основе полногеномного *de novo* секвенирования

Руководитель _____ доцент, к.б.н. Орешкова Н. В.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

_____ профессор, д.б.н. Ямских И. Е.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ Стенина Я. В.
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3
1 ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДА *PINUS SYLVESTRIS* L. 6
1.1 Таксономическое положение *P. sylvestris* 6
1.2 Подвиды сосны обыкновенной 7
1.3 Морфология и распространение сосны обыкновенной 8
1.4 Экономическое значение и использование сосны обыкновенной 12
2 ДНК-МАРКЕРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ИССЛЕДОВАНИЯХ 14
2.1 Преимущества и основные классы ДНК-маркеров 14
2.1 Микросателлитные маркеры 16
2.3 Микросателлитные маркеры для рода *Pinus* L. 18
3 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
3.1 Районы исследования ценопопуляций сосны обыкновенной ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
3.2 Разработка новых микросателлитных маркеров для сосны обыкновенной ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
3.3 Отбор и отработка полиморфных микросателлитных локусов сосны обыкновенной ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
3.4 Оценка показателей генетического разнообразия. **Ошибка! Закладка не определена.**
4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
4.1 Отбор полиморфных маркеров ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
4.2 Оценка показателей внутри- и межпопуляционного генетического разнообразия ценопопуляций *P. sylvestris* ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
5 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ **Ошибка! Закладка не определена.**
5.1 Обсуждение результатов разработки новых полиморфных ядерных микросателлитных локусов для *P. sylvestris* ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
5.2 Обсуждение полученных результатов для ценопопуляций *P. sylvestris* ..... **Ошибка! Закладка не определена.**
ВЫВОДЫ 22

ПРИЛОЖЕНИЕ А Существующие микросателлитные локусы для *P. sylvestris* 31
ПРИЛОЖЕНИЕ Б Разработанные микросателлитные локусы для *P. sylvestris* .....**Ошибка! Закладка не определена.**

ВВЕДЕНИЕ

Сохранение генетического разнообразия основных лесообразующих пород России является острой проблемой современности. В результате стрессового воздействия природных и антропогенных факторов среды, количество особей вида, участвующих в образовании нового поколения сокращается и, следовательно, снижается генетическое разнообразие и устойчивость популяций. Только предварительно изучив популяционно-генетическую структуру лесообразующего вида, можно успешно разрешить проблему сохранения его генетического разнообразия [1].

Одним из способов получения данных о генетической изменчивости являются ДНК-маркеры, позволяющие определить внутрипопуляционное аллельное и генное разнообразие, дифференциацию на различных иерархических уровнях, а также степень инбридинга [2].

Разновидностью ДНК-маркеров с повторяющимися последовательностями являются микросателлиты. Данные генетические маркеры обладают рядом преимуществ: высоким уровнем полиморфизма, относительно равномерным распределением в геноме и широкой представленностью, наличием большого числа аллелей, кодоменантностью [3].

Работы по разработке микросателлитных маркеров для различных хвойных пород активно осуществлялись в последние несколько лет, например, разработаны SSR (Simple Sequence Repeat) маркёры для *Taxus contorta* Griff. [4], *Taxus cuspidata* Siebold & Zucc. [5], *Larix sibirica* Ledeb [6], *Pinus sibirica* Du Tour [7]. Высокополиморфные микросателлитные локусы, имеющие

кодоминантное наследование часто используются для исследования полиморфизма в том числе и *Pinus sylvesrtis* L. [8].

Сосна обыкновенная является одной из основных лесообразующих пород России и сопредельных стран. Известно, что древесина сосны обыкновенной обладает хорошими физико-механическими свойствами, также она используется как источник живицы, из сосновых опилок делают гидролизный спирт и т.д. [9].

Группа антропогенных факторов оказывает значительное влияние на рост и развитие популяций сосны обыкновенной, это подтверждается многочисленными исследованиями: с увеличением доли антропогенной нагрузки количество иголок на побеге растения уменьшается, а также происходит уменьшение длины самого побега и длины игл. Изменение данных морфологических признаков влияет на жизнеспособность сосны обыкновенной и при достижении определенного предела может привести к гибели популяции [10-16]. Экологический стресс в условиях техногенеза значительно влияет на репродуктивные способности сосны обыкновенной, в частности способствует образованию пыльцы низкого качества и снижению семенной продуктивности [17].

Таким образом, высокое экономическое значение сосны обыкновенной и её подверженность негативным влияниям техногенных эмиссий демонстрирует потребность регулярных мониторинговых наблюдений популяций данной хвойной породы. Одним эффективных способов определения влияния промышленных выбросов на сосну обыкновенную является исследование генетического разнообразия и популяционно-генетической структуры вида. Как было изложено выше высокополиморфные микросателлитные локусы могут использоваться для мониторинга состояния хвойных путём исследования полиморфизма. Можно резюмировать, что имеется объективная необходимость в разработке новых генетических маркеров, применимых к исследованиям популяционно-генетической структуры вида.

Большинство существующих микросателлитных маркеров для *P. sylvestris* являются локусами с динуклеотидными мотивами, генотипирование с помощью которых путем проведения гель-электрофореза крайне затруднительно [18, 19].

Целью данной работы является разработка новых микросателлитных маркёров с три-, тетра и пентануклеотидными мотивами для сосны обыкновенной на основе полногеномного *de novo* секвенирования.

Исходя из цели исследования, поставлены следующие задачи:

- отобрать тандемные повторы в геноме с определенными параметрами и провести дизайн праймеров для найденных повторяющихся последовательностей;
- протестировать найденные микросателлитные маркеры и выбрать полиморфные локусы для дальнейшего исследования;
- отработать выбранные маркеры на выборках из двух ценопопуляций сосны обыкновенной;
- провести тестовую оценку уровня генетического разнообразия, популяционной структуры и степени генетической подразделённости исследованных ценопопуляций.

Автор выражает искреннюю благодарность научному руководителю Орешковой Н.В. за неоценимую помощь на всех этапах работы. Также автор выражает искреннюю признательность сотрудникам отдела мониторинга состояния лесных генетических ресурсов ЦЗЛ г. Красноярска за предоставленные образцы сосны обыкновенной и помощь в проведении лабораторных исследований. Работа выполнена в лаборатории лесной геномики СФУ.

1 ХАРАКТЕРИСТИКА ВИДА *PINUS SYLVESTRIS* L.

1.1 Таксономическое положение *P. sylvestris*

Перед тем как перейти к таксономическому положению сосны обыкновенной, необходимо отметить место рода *Pinus* L. среди голосеменных. Род сосна *Pinus* относится к отделу голосеменных *Pinophyta*, классу хвойных *Coniferae* или *Pinopsida*. Класс делится на 2 подкласса кордаитовые *Cordaitanthidae* и хвойные *Pinidae*, в который и входит род сосна. Род *Pinus* относится к порядку сосновые *Pinales* семейству сосновые *Pinaceae,* это самое обширное семейство среди голосеменных, оно насчитывает 10 родов с 250 видами [20].

Семейство *Pinales* делится на 3 трибы: пихтовые (*Abieteae*), лиственничные (*Lariceae*) и сосновые (*Pineae*), которые отличаются друг от друга по наличию или отсутствию укороченных побегов: имеются у *Lariceae*, *Pineae* и отсутствуют у *Abieteae*. Триба лиственничных отличается от трибы сосновых наличием на длинных побегах обыкновенных листьев, у сосновых данные побеги несут чушуевидные, незеленые листья. Род *Pinus* входит в состав трибы сосновые (*Pineae*) [20, 21].

Род *Pinus* включает в себя около 100 видов и является самым большим родом в семействе [22]. Систематика рода *Pinus* изучается филогенетиками уже на протяжении более 250 лет, но она все ещё не была всеобще признана [23].

Род *Pinus* включает в себя два подрода – *Strobus* и *Pinus*, каждый из которых делится на две секции, а те в свою очередь – на подсекции. Подрод *Strobus* включает в себя 38 видов, в нём выделены две секции: *Quinquefolius*, включающая 3 подсекции (*Gerardianae, Strobi, Krempfianae*), и *Parrya,* включающая 4 подсекции (*Rzhedowskianae, Balfourianae, Cembroides, Nelsoniae*). Подрод *Pinus* включает в себя две секции: *Pinus*, подразделённую на 2 подсекции

(*Pinaster, Pinus*), и *Trifolius,* включающую 3 подсекции (*Australes, Contortae, Ponderosae*) и 1 группу «сосен с закрытыми шишками» [23].

К подроду *Strobus* относятся мягкие сосны, обладающие светлой древесиной и сравнительно небольшим количеством смолы. У лучевых трахеид стенки по форме гладкие или с мелкими зазубринами. К мягким соснам относятся "кедровая" европейская (*P. cembra* L.), корейская (*P. koraiensis* Siebold & Zucc.), сибирская, или сибирский кедр (*P. sibirica* Du Tour), кедровый стланик, или сосна карликовая (*P. pumila* (Pall.) Regel), сосна Ламберта (*P. lambertiana* Douglas), горная веймутова (*P. monticola* Douglas ex D. Don), долговечная (*P. longaeva* D.K. Bailey) и другие [21].

Подрод *Pinus* представляют твердые сосны, у которых в средней жилке листа проводящих пучка два, древесина у них твердая, темноокрашенная, с большим содержанием смолы. У твердых сосен внутренние стенки трахеид обладают большими выростами, в некоторых случаях образующими сетку. К этому подроду относятся такие сосны, как обыкновенная, или лесная (*P. sylvestris* L.), болотная (*P. palustris* Mill.), смолистая (*P. resinosa* Sol. ex Aiton), черная (*P. nigra* J.F.Arnold), Меркуза (*P. merkusii* Jungh. & de Vriese) и другие [21].

Таким образом, сосна обыкновенная *P. sylvestris* относится к подсекции *Pinus* секции *Pinus* подрода *Pinus*.

1.2 Подвиды сосны обыкновенной

В исследованиях разных авторов для *P. sylvestris* выделяется неодинаковое число подвидов [23].

Одна из самых обширных работ по выделению подвидов сосны обыкновенной была проведена Л.Ф. Правдиным. Исследователь выделил 5 подвидов *P. sylvestris*, ниже указаны характерные признаки для определения каждого из них и их распространение.

– *P. sylvestris* L. subsp. *sylvestris* — сосна обыкновенная, подвид — обыкновенная, лесная. Продолжительность жизни хвои от 3 до 4 лет, но зачатую менее. Количество находящихся в хвое смоляных каналов от 8 до 12, максимальное число от 12 до 15. Смоляные каналы прилегают к гиподерме. В зимний период хвоя приобретает желтый оттенок, с

наступлением весны зеленеет. Данный подвид распространен в Западной Европе, южнее 62° с. ш., за исключением Крыма и Кавказа.

- *P. sylvestris* L. subsp. *hamata* (Steven) — сосна обыкновенная, подвид — крючковатая. Продолжительность жизни хвои от 3 до 4 лет, но зачатую менее. Количество находящихся в хвое смоляных каналов от 4 до 8. Смоляные каналы прилегают к гиподерме. В зимний период хвоя не приобретает желтый оттенок. Распространен подвид в Крыму и на Кавказе.
- *P. sylvestris* L. subsp. *lapponica* Fries — сосна обыкновенная, подвид — лапландская. Продолжительность жизни хвои от 5 до 6 лет, но зачатую – от 7 до 9. Длина хвои варьирует от 3 до 3,5 см, максимально достигает 5 см. Длина шишек в среднем от 3 до 3,5 см, в редких случаях длиннее. Подвид распространен севернее 62° с. ш. в Азии и Европе.
- *P. sylvestris* L. subsp. *sibirica* Ledebour — сосна обыкновенная, подвид — сибирская. Продолжительность жизни хвои от 5 до 6 лет, но зачатую – от 7 до 9. Длина хвои варьирует от 4 до 5,5 см. Длина шишек в среднем от 4 до 5 см, в редких случаях длиннее. Количество находящихся в хвое смоляных каналов от 8 до 10, в редких случаях более 12. Данный подвид распространен в Азии южнее 62° с. ш. и до 52° с. ш.
- *P. sylvestris* L. subsp. *kulundensis* Sukaczew — сосна обыкновенная, подвид — степная. Продолжительность жизни хвои от 5 до 6 лет, но зачатую – от 7 до 9. Длина хвои варьирует от 6 до 8 см, максимальные значения достигают 10-12 см. Длина шишек в среднем более 5 см, при максимальных значениях достигает от 6,5 до 7 см. Количество находящихся в хвое смоляных каналов от 12 до 14, максимальное число достигает 20 и даже 26. Распространен подвид в степях Азиатской части России и Казахстана, в изолированных борах южнее 52° с. ш. и на южных остепенённых склонах Забайкалья.

В каждом из перечисленных подвидов Л. Ф. Правдин выделяет климатические экотипы, в пределах последних, если существуют, почвенные и другие экотипы, а также различные формы. Например, сосна меловая и сосна болотная [24].

1.3 Морфология и распространение сосны обыкновенной

Ствол сосны обыкновенной высоко очищен от ветвей, прямой, деревья достигают 20-40 метров в высоту. Форма кроны в молодости в виде конуса, в старости более широкая, зонтиковидная. Цвет коры красно-бурый, желтоватый на ветках, по форме глубоко-бороздчатая. Побеги у сосны обыкновенной зеленоватого оттенка, затем серо-бурые, голые. Почки по форме удлиненно-яйцевидные, острые, красновато-бурого цвета, 6-12 мм в длину. Хвоя сизовато-зеленого цвета, часто изогнутая, край зазубренный, на плоской стороне сильно выступают устьичные линии. Хвоинки расположены по 2, до 4-7 см в длину и 2 мм в ширину, держатся 3 года. Влагалища первоначально до 8 мм в длину, затем укорачиваются [9]. Мужские колоски располагаются у основания однолетних побегов, а женские шишки расположены по 1-3 на верхушке, до опыления они прямостоячие, затем загибаются и повисают [25]. Шишки созревают на второй год, зрелые имеют серый цвет, матовые, по форме удлиненно-яйцевидные, в длину от 2,5 до 7 см и 2-3 см в ширину, чешуи плотные. Шишки одиночные или бывают по 2-3 на отогнутых вниз ножках. Щитки у сосны обыкновенной имеют ромбическую форму, спереди слабо выдается поперечный киль, пупок светло-коричневый, не сильно выпуклый, небольшой. Семена достигают 3-4 мм в дину. По форме удлинено-яйцевидные, черного или серого цвета. Крыло семени в 3 раза длиннее его. В 1 кг содержится примерно 115-125 тысяч семян сосны обыкновенной. Всходы имеют от 4 до 7 семядолей. У свежесрубленной древесины заболонь и ядро не отличаются по цвету. Заболонь имеет желтовато-белый оттенок, а ядро розоватый или буровато-красный. Хорошо прослеживаются годичные слои на любых срезах. Годичные слои отличаются по цвету: ранняя часть имеет более светлый оттенок, а поздняя – более темный. Переход от ранней древесины к поздней древесине более или менее выражен. Серцевинные лучи слабо прослеживаются. Смоляные ходы располагаются в позднем слое, имеют вид светлых точек на поперечном срезе или беловато-матовых черточек на радиальном и тангентальном разрезах [9] (рисунок 1).

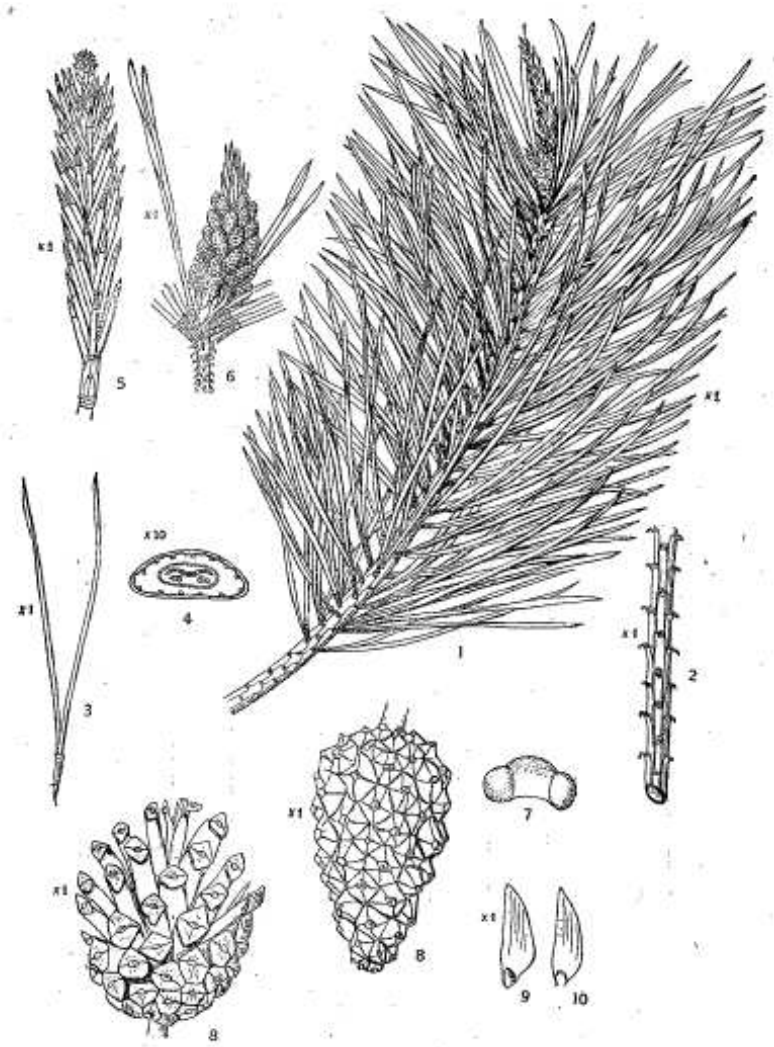

Рисунок 1 – Сосна обыкновенная. 1- побег с хвоей, 2 - побег без хвои, 3 - укороченный побег с хвоей, 4 - поперечный разрез хвои, 5 - побег с мужским колоском, 6 - побег женским колоском, 7 - пыльца, 8 - шишка, 9 - семя с крылом, 10 - крыло без семени [9]

Сосна обыкновенная является распространенным растением в лесной, лесостепной и степной зонах, также заходит в прилежащие к высокогорным районам, в горах встречается до высоты 1000 м. *P. sylvestris* может образовывать как чистые насаждения, так и принимать участие в образовании смешанных лесов, особенно с елью и дубом. Распространена преимущественно на песчаных почвах [26]. В степной зоне рост сосны обыкновенной ограничивается приречными мелами, не выходит на водоразделы, на севере преимущественно произрастает на развеянных ледниковых песках и по неровностям, предпочитает сухие солнечные склоны.

Сосна обыкновенная может встречаться при любых условиях, в состоянии меньшего или большего угнетения [27].

Сосна обыкновенная является быстро растущим хвойным деревом, главным образом в молодом возрасте. Наблюдается максимальный прирост на лучших почвах в 15-20 лет, на более плохих – в 25 лет, начиная с 40-50 лет, сосна обыкновенная растет более медленно. Начинает плодоносить с 15 лет, а в насаждениях только с 40 лет. Чередование семенных лет через каждые 2-4 года, в менее благоприятных условиях через каждые 5-6 лет. Семена прорастают через 15-20 дней после посева, они содержат 30-33% жирного масла. Время жизни сосны обыкновенной достигает 300-350 лет [9].

Родиной сосны обыкновенной является Западная Европа, Европейская часть России, Сибирь.

В Западной Европе *P. sylvestris* распространена от 70° с. ш. на Скандинавском полуострове, также по всей средней Европе, на юге в Пиренеях и горах Балканского полуострова, в Альпах сосна обыкновенная доходит до 1800-2100 м абсолютной высоты.

В России северная граница ареала проходит южнее Мурманска к горлу Белого моря и далее к востоку на 65-68° с. ш. в Сибирь, где доходит до 70 ° с. ш. и выходит к Охотскому морю около 60° с. ш.; отсюда граница распространения уходит на юго-запад к низовью р. Буреи, Буреинским горам и р. Амгунь и далее идет на запад через сев. Маньчжурию и сев. Монголию к Алтаю, где *P. sylvestris* растет в северной части, доходя до 800-1000 м абсолютной высоты. Затем граница ареала проходит на севере Средней Азии (до 48˚33′ с. ш.), идет к Челябинску, Жигулям и вдоль Волги к Саратову. В южной части своего ареала сосна обыкновенная распространена прерывисто, так что южная граница ее сплошного распространения проходит севернее от Рязани к устью Камы и затем через Южный Урал, далее она идет по северной границе степей Сибири [9].

1.4 Экономическое значение и использование сосны обыкновенной

Древесина сосны обыкновенной обладает хорошими физико-механическими свойствами. Она по своей доступности для обработки и малому объемному весу является одной из основных пород, которые применяют в строительстве жилых зданий, различных судов, авиационной техники. Из древесины сосны обыкновенной производят крепления в шахтах. Причиной выбора именно этого материала служит предостерегающий хруст, который древесина издает при смещении пород [9].

Древесина растущего дерева *P. sylvestris* – источник живицы, сосновой смолы, которую используют для получения скипидара, канифоли, лечебных бальзамов и дёгтя [4]. Из сосновых опилок делают гидролизный спирт. Охвоенные побеги содержат эфирное масло и используются в парфюмерии для получения экстракта для ванн. Из корней сосны, гибких во влажном состоянии и твердых при высыхании, изготавливают плетеную утварь [25]. Ценность древесины сосны обыкновенной зависит от факторов её произрастания: на сухих почвах образуется жесткая кондовая древесина, а на более влажных почвах – мяндовая древесина, которая уступает кондовой по прочности. В составе хвои *P. sylvestris* находится большое количество витамина С, а также каротина. Поэтому зелень сосны обыкновенной используется для изготовления хвойно-витаминной муки для подкормки животных, хлорофилло-каротиновой пасты и хлорофиллина натрия [28]. Предложена так называемая «зеленая» технология получения продукта, обогащенного «условно незаменимой аминокислотой» – L-аргинином путем водного экстрагирования из хвои *P. sylvestris* [29].

Сосны не подходят для озеленения городов, так как очень чувствительны к загрязнению воздуха, хотя они являются весьма декоративными деревьями [21]. *P. sylvestris*, обладающие одной из разновидностей соматических мутаций – почковой вариацией («ведьмины метлы»), активно используются для получения многих низкорослых садовых

форм растений, которые широко распространены в современном декоративном садоводстве [30].

Была исследована способность *P. sylvestris* выступать в качестве биоиндикатора загрязняющих химических соединений атмосферы, в том числе тяжелых металлов. Выяснено, что хвоя сосны обыкновенной и её ассимиляционный аппарат чувствительны к наличию в атмосферном воздухе техногенных выбросов, они проявляют реакцию на достаточно невысокое содержание вредных поллютантов, недоступное для обнаружения человеком. Индикаторами присутствия загрязнителей являются изменение длины побегов и хвои, изменение содержания эфирного масла, увеличение содержания золы в пробе при сжигании, а также аккумуляция тяжелых металлов в биомассе хвои сосны обыкновенной. Таким образом, предложено проводить оценку состояния загрязнения атмосферы вредными поллютантами и экологической ситуации на территории, используя в качестве биоиндикатора ассимиляционный аппарат сосны обыкновенной [31].

2 ДНК-МАРКЕРЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ИССЛЕДОВАНИЯХ

2.1 Преимущества и основные классы ДНК-маркеров

Полиморфизм древесных растений изучают для разработки методов сохранения генофонда основных лесообразующих пород, поддержания генного разнообразия на высоком уровне, постановки и решения задач лесоразведения и лесовосстановления. Одним из способов получения данных о величине внутривидовой изменчивости, популяционных процессах являются ДНК-маркеры. ДНК-маркеры позволяют определить внутрипопуляционное аллельное и генное разнообразие, дифференциацию на различных иерархических уровнях, а также степень инбридинга.

Генетический полиморфизм может быть оценен как на уровне продуктов генов (биохимический полиморфизм), так и на уровне генома (полиморфизм ДНК), в связи с эти выделяют соответственно 2 тест-системы.

Применение в качестве маркера полиморфизма ДНК признано более перспективным в связи с тем, что данная тест-система имеет ряд преимуществ. Во-первых, по сравнению с биохимическим полиморфизмом она дает возможность маркировать даже некодирующие участки. Во-вторых, данная маркерная тест-система предполагает использование в качестве источника ДНК любых органов и тканей, причем стадия развития организма этому не препятствует. Помимо указанных ранее, к преимуществам ДНК-маркеров также можно отнести: возможность анализа материнского (митохондриальная ДНК) и отцовского (Y-хромосома) типа наследования, стабильность передачи генетического материала, неимение плейотропного эффекта, гены представлены многими аллелями, возможность узнавать о происхождении генетических перестроек, осуществимость ретроспективного анализа. Необходимо отметить методическое удобство применения ДНК-маркеров: использование в качестве источника ДНК любых органов и тканей, на любых стадиях развития, а также продолжительность хранения образцов ДНК и возможность использования в исследовании ископаемых остатков. Самыми главными преимуществами ДНК-маркеров можно назвать неограниченное

число маркеров на один образец, наличие маркеров из любых областей генома, существование маркеров для повторяющихся последовательностей [2].

В настоящее время существует несколько десятков ДНК-маркеров и нет общепринятой системы их классификации, существуют различные варианты, предложенные разными авторами [32]. Согласно Е. К. Хлесткиной все ДНК-маркеры можно разделить по главному методу анализа на три группы:

1. Маркеры, исследуемые с помощью методов, основанных на блот-гибридизации;
2. Маркеры, исследуемые с помощью методов, основанных на полимеразной цепной реакции;
3. Маркеры, исследуемые с помощью методов, основанных на применении ДНК-чипов.

Также молекулярные маркеры разделяются на монолокусные, наследуемые, как правило, по кодоминантному типу, и мультилокусные, наследуемые зачастую по доминантному типу. Классификация, объединяющая эти признаки, для основных ДНК-маркеров представлена в таблице 1 [33].

Таблица 1 – Классификация основных ДНК-маркеров [33]

Классификация	Монолокусные маркеры	Мультилокусные маркеры
Тип наследования	Кодоминантный	Доминантный
Методы, основанные на блот-гибридизации	– RFLP (1980) – полиморфизм длины рестрикционных фрагментов	– Минисателлиты (1985)
Методы, основанные на ПЦР	– SSR (1989) – простые повторяющиеся последовательности (микросателлиты) – STS (1989) – нуклеотидные последовательности, характеризующие локус – SSCP (1989) – конформационный полиморфизм одноцепочечной ДНК	– RAPD (1990) – случайно амплифицированная полиморфная ДНК – ISSR (1994) – межмикросателлитный полиморфизм – AFLP (1995) – полиморфизм длины амплифицированных фрагментов

Окончание таблицы 1

Классификация	Монолокусные маркеры	Мультилокусные маркеры
Методы, основанные на ПЦР	– SCAR (1993) – нуклеотидная последовательность, характеризующая амплифицированную область – CAPS (1993) – расщепленные амплифицированные полиморфные последовательности	– SSAP (1997) – полиморфизм специфично амплифицированных последовательностей – IRAP (2006) – полиморфизм амплифицированных последовательностей между ретротранспозонами
Методы, основанные на применении ДНК-чипов	– SNP (1998) – однонуклеотидный полиморфизм	– DarT (2001) – ДНК-чиповая технология для изучения генетического разнообразия

Представленная выше классификация наглядно демонстрирует процесс развития ДНК-маркеров. В 1980-е годы широкое распространение получили ДНК-маркеры, исследуемые с помощью методов, основанных на блот-гибридизации. В следующее десятилетие главные позиции заполнили ПЦР-маркеры, к началу 2000-х годов распространение получили маркеры, исследуемые с помощью методов, основанных на применении ДНК-чипов. В последнее время зачастую исследователи для анализа полиморфизма ДНК применяют метод прямого секвенирования как всего генома, так и его отдельных участков [33].

Г.В. Калько полагает, что при изучении генетического полиморфизма хвойных пород на начальных этапах исследования наиболее пригодно использовать ядерные маркеры, главным образом микросателлитные. В доказательство автор приводит их несомненные преимущества: двуродительское наследование; в геномах хвойных микросателлиты многочисленны во всех его частях, кодоминантны; данный тип ДНК-маркеров дает возможность обнаружить наибольший уровень гетерозиготности [34].

2.1 Микросателлитные маркеры

Одной из разновидностей маркеров с повторяющимися последовательностями являются микросателлиты. Микросателлитные локусы

– чрезвычайно обширно применяющиеся в текущее время маркеры для генетической идентификации на различных уровнях, оценки генетической подразделенности и полиморфизма, идентификации потока генов, процессов близкородственного скрещивания и для определения остальных характеристик популяционно-генетической структуры.

«Сателлит» с английского языка переводится как спутник, это связано с тем, что при центрифугировании экстрагированной ДНК сателлитная выпадает в специальную фракцию. Причина кроется в составе данных последовательностей – микросателлиты отличаются от основной массы ДНК в геноме по доле гуанина и цитозина.

Микросателлитные маркеры можно считать первыми высокополиморфными маркерами, разработанными на основе ПЦР. Микросателлиты – это тандемно, непрерывно друг за другом, повторяющиеся последовательности. Мотив, или единица повтора, представляет собой ди-, три-, тетра-, пентануклеотидную последовательность, с размерами до 100 н.о. Название этих маркеров варьирует: микросателлиты, STMS (Sequence Tagged Microsatellite Site), STR (Short Tandem Repeat), SSR (Simple Sequence Repeat). Для разработки таких маркеров требуется много знаний об изначальной нуклеотидной последовательности для подбора праймеров к последовательностям ДНК, окружающим микросателлитный локус. Число повторов мотива может значительно изменяться, что приводит к появлению большого числа вариантов аллелей для данного локуса. Это имеет место быть, так как в последовательностях с тандемными повторами часто происходит мутагенез, также для них характерна высокая гетерозиготность. Микросателлиты очень часто встречаются в геномах животных и растительных организмов [3].

Высокая полиморфность микросателлитных локусов связана с ошибками систем репликации и репарации ДНК, происходящими на данных участках, так называемые эффекты проскальзывания ДНК. Так как повторы располагаются один за другим без промежутков, то две нити ДНК могут

принять неправильное комплементарное положение относительно друг друга, что приведет к увеличению числа повторов мотива в данном локусе или к его уменьшению.

Микросателлитные маркеры обладают рядом преимуществ к ним относятся: высокий уровень полиморфизма тандемных повторов, насыщенность эухроматиновой части геномов данным типом маркеров, что делает данные маркеры востребованными при проведении анализа наследуемых изменений ядерной ДНК в популяциях эукариотических организмов, как растений, так и животных.

Также, несмотря на широкую распространенность микросателлитов, они обладают некоторыми отрицательными чертами. Например, неодинаковые скорости мутирования разных микросателлитов, технические проблемы, связанные с появлением артефактов при проведении ПЦР (эффект «проскальзывания»). Также зачастую микросателлитов бывает недостаточно для более тонкого картирования отдельных областей геномов, поэтому основная область применения микросателлитных маркеров – это изучение полиморфизма путем выборки нескольких наиболее вариабельных локусов [2].

2.3 Микросателлитные маркеры для рода *Pinus* L.

Геномные исследования хвойных древесных растений с применением молекулярного маркирования с помощью изменчивых участков ДНК используются не только для изучения фундаментальных биологических проблем, но и дают ценные данные для усовершенствования лесного хозяйства и развития молекулярной биотехнологии. Решение задач изучения, сохранения и рационального использования генофондов требует применения большого числа молекулярно-генетических маркеров, особое место среди которых занимают высокополиморфные полиаллельные микросателлитные локусы, имеющие кодоминантное наследование.

Работы по разработке микросателлитных маркеров для различных хвойных пород активно осуществлялись в последние несколько лет, например,

разработаны SSR (Simple Sequence Repeat) маркёры для *Taxus contorta* [4], *Taxus cuspidata* [5], *Larix sibirica* [6], *Pinus sibirica* [7].

Виды рода *Pinus* являются одними из важнейших лесообразующих хвойных пород России. Микросателлитные маркеры разработаны и уже использованы для изучения многих видов рода *Pinus*, таких как *P. sibirica* [7, 35], *P. cembra* [36], *P. pumila* [37], *P. strobus* [38], *P. tabuliformis* [39], *P. pinaster* [40], *P. taeda* [41], *P. densiflora* [42, 43, 44], *P. canariensis* [45], *P. lambertiana* [46]. Микросателлитные локусы, найденные для сосны обыкновенной *P. sylvestris* представлены в приложении А.

Генетическое разнообразие и генетическая структура природных популяций сосны обыкновенной в Карелии изучались А. А. Ильиновым, Б. В. Раевскиным с помощью полиморфизма ядерных микросателлитных локусов, разработанных как для *P. sylvestris*, так и для *P. taeda* [8, 47, 48].

Г. В. Калько провел тестирование уже существующих ядерных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной [49]. В отработке и отборе для дальнейших исследований участвовали как SSR-маркеры, разработанные специфично для данного вида, так и маркеры, изначально предназначенные для других видов рода *Pinus* – *P. taeda*, *P. pinaster* [18, 50, 51].

Соматические мутации были проанализированы в соснах (*P. sylvestris*), подвергшихся ионизирующему излучению на территории Чернобыльской АЭС и в контрольных деревьях, высаженных в местах с естественной радиацией, частота мутаций микросателлитов составила $2{,}8 \times 10^{-4}$–$7{,}1 \times 10^{-4}$ на локус для различных популяций облученных деревьев [52]. В исследовании были использованы микросателлитные маркеры, разработанные для *P. sylvestris* и маркеры, первоначально созданные для *P. taeda*, *P. pinaster* [53, 54].

Таким образом, проанализировав таблицу в приложении А и уже существующие исследования полиморфизма сосны обыкновенной, можно сделать вывод, что большинство использующихся микросателлитных маркеров для *P. sylvestris* являются локусами с динуклеотидными мотивами, многие SSR-маркеры первоначально были созданы для других видов рода

Pinus (*P. taeda*, *P. pinaster*).

Эффективное использование динуклеотидных маркеров является реальным только при использовании капиллярного электрофореза (с использованием секвенаторов ABI PRISM (Applied Biosystems)), так как генотипирование по электрофореграммам, полученным при проведении обычного гель-электрофореза, для фрагментов, различающихся на 1 повтор – 2 нуклеотида, может быть крайне затруднительно. Данная методика является дорогостоящей и требует специализированного оборудования, которым оснащена далеко не каждая генетическая лаборатория, проводящая анализ полиморфизма генов древесных пород.

Поэтому существует объективная необходимость в разработке видоспецифичных новых ядерных микросателлитных маркёров с три-, тетра и пентануклеотидными мотивами для сосны обыкновенной, которые можно легко использовать в любой лаборатории на простом оборудовании для проведения гель-электрофореза.

Изъято в связи с авторскими правами с 21 по 39 стр.

ВЫВОДЫ

- Разработаны 39 новых микросателлитных локусов для сосны обыкновенной с три-, тетра-, пентануклеотидными мотивами и размерами амплифицируемого продукта от 140 до 280 н.о.;
- В результате тестирования найденных микросателлитных маркеров было отобрано шесть пар праймеров, демонстрирующих наиболее стабильные интерпретируемые спектры, для проведения дальнейшего исследования;
- Произведена отработка выбранных маркеров на 30 образцах ценопопуляции Северо-Енисейская и 24 образцах ценопопуляции Кизирская сосны обыкновенной из Северо-Енисейского и Курагинского районов Красноярского края соответственно;
- Выявлено 34 аллельных вариантов при исследовании выборок сосны обыкновенной. В целом значения основных показателей генетической изменчивости выборок свидетельствуют о сравнительно невысоком уровне генетического разнообразия (N_A = 4,917; N_E =2,906; H_O=0,454, H_e=0,478) при сопоставлении с аналогичными показателями, приведенными для *P. sylvestris* другими авторами. Сравнение выборок из разных ценопопуляций показало, что выборка из более южного района находится ближе к равновесному состоянию (F= -0,018±0,053), чем выборка из более северного района, которая имеет 7,7%-ый дефицит гетерозигот (F= 0,077±0,045). Анализ популяционной структуры *P. sylvestris* показал, что в изученных выборках наблюдается 3%-ный дефицит гетерозиготных генотипов относительно популяциии (F_{IS}=0,030±0,023) и почти 5%-ный дефицит (F_{IT} = 0,049±0,026) относительно вида. Коэффициент инбридинга популяции относительно вида в целом (F_{ST}), отражающий степень подразделенности ценопопуляций составляет в среднем 0,020±0,005.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Седельникова, Т. С. Изменчивость размера генома хвойных в экстремальных условиях произрастания / Т.С. Седельникова // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. – №. 5. – С. 514-528.
2. Сулимова, Г. Е. ДНК-маркеры в генетических исследованиях: типы маркеров, их свойства и области применения / Г.Е. Сулимова // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124. – №. 3. – С. 260-271.
3. Орлов, М. А. Короткие тандемные повторы / М.А. Орлов // Природа. – 2019. – №. 12. – С. 25-31.
4. Majeed, A. Transcriptome characterization and development of functional polymorphic SSR marker resource for Himalayan endangered species, *Taxus contorta* (Griff) / Aasim Majeed, Amandeep Singh, Shruti Choudhary, Pankaj Bhardwaj // Industrial Crops and Products. – 2019. – Т. 140. – С. 111600.
5. Ueno, S. Development of EST-SSR markers for *Taxus cuspidata* from publicly available transcriptome sequences / Saneyoshi Ueno, Yafeng Wen, Yoshihiko Tsumura // Biochemical Systematics and Ecology. – 2015. – Т. 63. – С. 20-26.
6. Орешкова, Н. В. Разработка ядерных микросателлитных маркеров с длинными (трех-, четырех-, пяти-и шестинуклеотидными) мотивами для трех видов лиственницы на основе полногеномного de novo секвенирования лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) / Н.В. Орешкова, Е.И. Бондар, Ю.А. Путинцева, В.В. Шаров, Д.А. Кузьмин, К.В. Крутовский // Генетика. – 2019. – Т. 55. – №. 4. – С. 418-425.
7. 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, Т. А. Полякова, А. В. Шатохина, Ю. С. Белоконь, Н. В. Орешкова, Ю. А. Путинцева, В. В. Шаров, Д. А. Кузьмин, К. В. Крутовский // Генетика. – 2016. – Т. 52. – №. 12. – С. 1418-1427.

8. Ильинов, А. А. Состояние генофонда сосны обыкновенной *Pinus sylvestris* L. в Карелии / А. А. Ильинов, Б.В. Раевский //Сибирский лесной журнал. – 2016. – №. 5. – С. 45-54.
9. Соколов, С.Я. Деревья и кустарники СССР: науч. изд. / С.Я. Соколов, В.К. Шишкин, З.Г. Белосельская, Я.Я. Васильев, С.И. Ванин, Г.В. Воинов, И.А. Забелин, П.И. Лапин, В.П. Малеев, Л.Ф. Правдин, О.М. Полетико, С.Г. Сааков, С.Я. Соколов, В.В. Уханов, Т.С. Цырина, Н.В. Шипчинокий. – С.-Пб.: Изд-во Академии наук СССР. – 1949. – Т. 1. – С.254-259.
10. Yelkenova, B. Z. The influence of atmospheric pollution on the growth and development of pine in the conditions of the Irtysh Semipalatinsk region / B.Z. Yelkenova, R.R. Beisenova, N.Sh. Karipbayeva, V.V. Polevik // Биология. Медицина. География. – 2020. – №. 2(98). – С. 73-78.
11. Прожерина, Н. А. Реакция сосны обыкновенной на атмосферное загрязнение в районе Архангельской агломерации / Н. А. Прожерина, Е. Г. Валкама // Лесоведение. – 2008. – №. 2. – С. 27-32.
12. Горшков, А. Г. Накопление полициклических ароматических углеводородов в хвое сосны обыкновенной на территории Прибайкалья / А. Г. Горшков, Т. А. Михайлова, Н. С. Бережная, А. Л. Верещагин // Лесоведение. – 2008. – №. 2. – С. 21-26.
13. Чжан, С. А. Особенности накопления загрязняющих веществ в хвое сосны обыкновенной / С. А. Чжан, Е. М. Рунова, О. А. Пузанова // Лесной вестник/Forestry bulletin. – 2009. – №. 3.
14. Афанасьева, Л. В. Элементный состав хвои и морфометрические параметры сосны обыкновенной в условиях атмосферного промышленного загрязнения в Западном Забайкалье / Л.В. Афанасьева, В.К. Кашин, А.С. Плешанов, Т.А. Михайлова, Н.С. Бережная // Хвойные бореальной зоны. – 2004. – Т. 22. – №. 1-2.
15. Ковылина, О. П. Оценка жизненного состояния сосны обыкновенной в зоне техногенного загрязнения / О. П. Ковылина, И. А. Зарубина, А. Н. Ковылин // Хвойные бореальной зоны. – 2008. – Т. 25. – №. 3-4.

16. Горбачев, А. А. Реакция лесной растительности на промышленное загрязнение на примере сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) / А.А. Горбачев, И.Л. Прокофьев, Л.С. Жирина // Вестник Брянского государственного университета. – 2008. – №. 4.
17. Носкова Н. Е., Третьякова И. Н. Влияние стресса на репродуктивные способности сосны обыкновенной / Н.Е. Носкова, И.Н. Третьякова // Хвойные бореальной зоны. – 2006. – Т. 23. – №. 3.
18. Fang, P. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (*Pinaceae*) /Pan Fang, Shihui Niu, Huwei Yuan, Zhexin Li,Yuncheng Zhang, Lu Yuan, Wei Li //Applications in plant sciences. – 2014. – Т. 2. – №. 1. – С. 1300057.
19. Sebastiani, F. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L /F. Sebastiani, F. Pinzauti, S. T. Kujala, S. C. Gonzalez-Martınez, G. G. Vendramin //Conservation Genetics Resources. – 2012. – Т. 4. – №. 2. – С. 231-234.
20. Антипова, Е.М. Высшие растения. Голосеменные растения: учебное пособие в 4 частях / Е.М. Антипова, И.Н. Третьякова, Н.Н. Тупицына. – Саратов: Ай Пи Эр Медиа, 2018. – Ч.3. – С. 16-62.
21. Тахтаджян, А. Л. Жизнь растений: справочное пособие 6-ти томах/А.Л. Тахтаджян, А.С. Лазаренко, И.В. Грушвицкий, Н.Р. Мейер, Ф.С. Пилипенко, В.А. Самылина, А.А. Яценко-Хмелевский. –Москва: Рипол Классик, 1974. – Том 4. – С.317-374.
22. Еленевский, А.Г. Ботаника: Систематика высших, или наземных, растений: учебник / А.Г. Еленевский, М.П. Соловьева, В.Н. Тихомиров. – Москва: Академия,2001. – С.130-178.
23. Лаур, Н. В. Происхождение, распространение, систематика и некоторые подходы при селекции *Pinus sylvestris* L. / Н. В. Лаур, А. П. Царев // Лесной вестник/Forestry bulletin. – 2012. – №. 2 (85).
24. Правдин, Л.Ф. Сосна обыкновенная / Л.Ф. Правдин. – М.: Наука, 1964. – 190 с.

25. Губанов, И. А. Иллюстрированный определитель растений средней России / И.А. Губанов, К.В. Киселева, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров. – М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований. – 2002. – Т. 1. – С. 120-121.
26. Положий, А. В. Флора Красноярского края: науч. изд. / А.В. Положий, Т.П. Березовская. – Томск: Издательство Том. ун-та, 1983. –Выпуск 1. – С.49-50
27. Комаров, В. Л. Флора СССР: науч. изд. / В.Л. Комаров, М.М. Ильин – С.Пб.: Изд-во АН СССР. – 1934. – Т. 1. – С. 159-170.
28. Журавлева, Л. Н. Древесная зелень сосны обыкновенной-перспективный источник биологически активных веществ / Л.Н. Журавлева, А.Н. Девятловская, Л.П. Рубчевская // Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2008. – №. 3.
29. Зайцева, М. И. Биотехнология производства L-аргинина из хвои сосны для использования в медицинской и ветеринарной практике / Зайцева М.И., Колесников Г.Н., Чернобровкина Н.П. // Успехи современной науки. – 2016. – Т. 4. – №. 9. – С. 123-125.
30. Торчик, В. Перспективы использования спонтанных соматических мутаций в селекции декоративных форм сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) / В. Торчик // Наука и инновации. – 2011. – Т. 8. – №. 102.
31. Соболева, С. В. Изучение биоиндикационной способности сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) в условиях светлохвойной тайги / С. В. Соболева, В. М. Воронин, И. С. Почекутов // Хвойные бореальной зоны. – 2018. – Т. 36. – №. 1.
32. Сухарева, А. С. ДНК-маркеры для генетического анализа сортов культурных растений / А.С. Сухарева, Б.Р. Кулуев // Биомика. – 2018. – Т. 10. – №. 1. – С. 069-084.
33. Хлесткина, Е. К. Молекулярные маркеры в генетических исследованиях и в селекции / Е. К. Хлесткина // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 17. – №. 4/2. – С. 1044-1054.

34. 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.
35. 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. – Т. 50. – №. 9. – С. 1059-1059.
36. Salzer, K. Isolation and characterization of polymorphic nuclear microsatellite loci in *Pinus cembra* L. / K. Salzer, F. Sebastiani, F. Gugerli, A. Buonamici, G. G. Vendramin //Molecular ecology resources. – 2009. – Т. 9. – №. 3. – С. 858-861.
37. 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. Горошкевич, Е. А. Петрова //Генетика. – 2017. – Т. 53. – №. 3. – С. 324-333.
38. Echt, C. S. Characterization of microsatellite markers in eastern white pine / C.S. Echt, P. May-Marquardt, M. Hseih, R. Zahorchak //Genome. – 1996. – Т. 39. – №. 6. – С. 1102-1108.
39. Liu, Z. L. High genetic differentiation in natural populations of *Pinus henryi* and *Pinus tabuliformis* as revealed by nuclear microsatellites /Zhan-Lin Liu, Cheng Cheng, Jianfang Li //Biochemical Systematics and Ecology. – 2012. – Т. 42. – С. 1-9.
40. Wahid, N. Genetic structure of *Pinus pinaster* Ait. populations in Morocco revealed by nuclear microsatellites / Nadya Wahid, Krassimir D. Naydenov, Salim Kamari, Abdelali Boulli, Francine Tremblay //Biochemical Systematics and Ecology. – 2010. – Т. 38. – №. 1. – С. 73-82.

41. Al-Rabab'ah, M. A. Population dynamics of *Pinus taeda* L. based on nuclear microsatellites /M.A. Al-Rabab'ah, C.G. Williams //Forest Ecology and Management. – 2002. – Т. 163. – №. 1-3. – С. 263-271.
42. Iwaizumi, M. G. Recent distribution changes affect geographic clines in genetic diversity and structure of *Pinus densiflora* natural populations in Japan /Masakazu G. Iwaizumi, Yoshiaki Tsuda, Masato Ohtani, Yoshihiko Tsumura, Makoto Takahashi //Forest ecology and management. – 2013. – Т. 304. – С. 407-416.
43. Watanabe, A. Isolation of microsatellite markers from *Pinus densiflora* Sieb. et Zucc. using a dual PCR technique /A. Watanabe, M. G. Iwaizumi, M. Ubukata, T. Kondo, C. Lian, T. Hogetsu //Molecular Ecology Notes. – 2006. – Т. 6. – №. 1. – С. 80-82.
44. Iwaizumi, M. G. Consecutive five-year analysis of paternal and maternal gene flow and contributions of gametic heterogeneities to overall genetic composition of dispersed seeds of *Pinus densiflora* (Pinaceae) /Masakazu G. Iwaizumi, Makoto Takahashi, Keiya Isoda, Frédéric Austerlitz //American journal of botany. – 2013. – Т. 100. – №. 9. – С. 1896-1904.
45. Navascués, M. Natural recovery of genetic diversity by gene flow in reforested areas of the endemic Canary Island pine, *Pinus canariensis* /Miguel Navascues, Brent C. Emerson//Forest ecology and management. – 2007. – Т. 244. – №. 1-3. – С. 122-128.
46. Lind, B. M. Effect of fire and thinning on fine-scale genetic structure and gene flow in fire-suppressed populations of sugar pine (*Pinus lambertiana* Dougl.) /Brandon M. Linda, Malcolm P. Northc, Patricia E. Maloneyd, Andrew J. Eckerte //Forest Ecology and Management. – 2019. – Т. 447. – С. 115-129.
47. Ильинов, А. А. Сравнительная оценка генетического разнообразия естественных популяций и клоновых плантаций сосны обыкновеннойи ели финской в Карелии / А. А. Ильинов, Б.В. Раевский//Экологическая генетика. – 2015. – Т. 13. – №. 4.

48. Ильинов, А. А. Использование микросателлитных локусов в изучении плюсового генофонда сосны обыкновенной Pinus sylvestris L. в Карелии /А. А. Ильинов, Б.В. Раевский //Труды Карельского научного центра Российской академии наук. – 2018. – №. 6.
49. Калько Г. В. Тестирование ядерных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной /Г.В. Калько //Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. – 2017. – №. 1. – С. 23-34.
50. Ganea, S. L. Multiplex nuclear SSR amplification in Scots pine (Pinus sylvestris L.) / S. L Ganea., G. M. R. Garcia // Bulletin UASVM Horticulture. – 2011. – Т. 68. – №. 1. – С. 47-53.
51. Auckland, L. Conifer Microsatellite Handbook / L. Auckland, T. Bui, Y. Zhou, M. Shepherd, C. Williams. – Texas: Texas A&M University. – 2002. – 57 с.
52. Kuchma, O. Mutation rates in Scots pine (Pinus sylvestris L.) from the Chernobyl exclusion zone evaluated with amplified fragment-length polymorphisms (AFLPs) and microsatellite markers /Oleksandra Kuchma, Barbara Vornam, Reiner Finkeldey //Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. – 2011. – Т. 725. – №. 1-2. – С. 29-35.
53. Chagné D. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines /D. Chagné, P. Chaumeil, A. Ramboer, C. Collada, A. Guevara, M. T. Cervera, G. G. Vendramin, V. Garcia, J-M Frigerio, C. Echt, T. Richardson, C. Plomion //Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Т. 109. – №. 6. – С. 1204-1214.
54. Liewlaksaneeyanawin, C. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs / Cherdsak Liewlaksaneeyanawin, Carol E. Ritland, Yousry A. El-Kassaby, Kermit Ritland // Theoretical and Applied Genetics. – 2004. – Т. 109. – №. 2. – С. 361-369.
55. Tóth, E. G. et al. Mid-Pleistocene and Holocene demographic fluctuation of Scots pine (Pinus sylvestris L.) in the Carpathian Mountains and the Pannonian Basin: Signs of historical expansions and contractions /Endre Gy. Toth, Akos

Bede-Fazekas, Giovanni G. Vendramin, Francesca Bagnoli, Maria Hohn //Quaternary International. – 2019. – Т. 504. – С. 202-213.

56. Xin, Z. Extraction of genomic DNA from plant tissues / Zhanguo Xin, Junping Chen // DNA Sequencing II: Optimizing Preparation and Cleanup. – 2006. – Т. 2. – С. 47.
57. Орешкова, Н.В. Методы молекулярно-генетических исследований [Электронный ресурс]: учебно-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/i930815313.pdf
58. Korbie, D. J. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification / D. J. Korbie, J. S. Mattick // Nature protocols. – 2008. – Т. 3. – №. 9. – С. 1452.
59. Wright, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating / S. Wright // Evolution. – 1965. – Т. 19. – №. 3. – С. 395-420.
60. Van Oosterhout, C. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data / Cock Van Oosterhout, William F. Hutchinson, Derek P. M. Wills, Peter Shipley // Molecular Ecology Notes. – 2004. – Т. 4. – №. 3. – С. 535-538.
61. Van Oosterhout, C. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations / C. Van Oosterhout, D. Weetman, W. F. Hutchinson // Molecular Ecology Notes. – 2006. – Т. 6. – №. 1. – С. 255-256.
62. Peakall R. O. D., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Molecular ecology notes. – 2006. – Т. 6. – №. 1. – С. 288-295.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Существующие микросателлитные локусы для *P. sylvestris*

Таблица А.1 – 99 микросателлитных локуса для сосны обыкновенной из литературных источников

№	Локус	Мотив	Последова-тельность праймеров	Длина фрагмента	Источник
1	Spac11,8	F:AGGGAGATCAATAGATCATGG R:CAGCCAAGACATCAAAAATG	$(TG)_{16}$	130–154	[8, 47, 48, 52]
2	Spac12,5	F:CTTCTTCACTAGTTTCCTTTGG R:TTGGTTATAGGCATAGATTGC	$(GT)_{20}(GA)_{10}$	127–199	[8, 47, 48, 49, 50, 52]
3	Spac11.4	F:TCACAAAACACGTGATTCACA R:GAAAATAGCCCTGTGTGAGACA	$(AT)5(GT)_{19}$	112–168	[52, 55]
4	Spac7.14	F:TTCGTAGGACTAAAAATGTGTG R:CAAAGTGGATTTTGACCG	$(TG)17(AG)_{21}$	173–246	[52, 55]
5	PtTX2123	F:GAAGAACCCACAAACACAAG R:GGGCAAGAATTCAATGATAA	$(AGC)_8$	192–201	[8, 47, 48]
6	PtTX2146	F:CCTGGGGATTTGGATTGGGTATTTG R:CCTGGGGATTTGGATTGGGTATTTG	$(GAG)_5$ …$(CAG)_8$ $CGG(CAG)_7$ $CGG(CAG)_4$	168–249	[8, 47, 48, 49, 51, 52]
7	PtTx2146	F:CCTGGGGATTTGGATTGGGTATTTG R:ACAGACCTTCCCCGTTCCTTTTATA	$(TGC)_5CGC$ $(TGC)_7CGC$ $(TGC)_7$	446	[51, 52, 54]
8	PtTx3013	F:GCTTCTCCATTAACTAATTCTA R:TCAAAATTGTTCGTAAAACCTC	$(GTT)_{10}$	235	[49, 50, 51]
9	PtTx2093	F:AATTTGACGGGTTTTAC R:GTGGCACATGGATTTCT	$(CAA)_3$…$(CAA)_9TAA(CAA)_5$	544	[49, 50, 51]
10	PtTx3016	F:CCATGCCTCCAAACTCC R:TCTCTTCCTCCACTCCTCTC	$(CAA)_{13}$	646	[49, 50, 51]
11	PtTx3020	F:GTCGGGGAAGTGAAAGTA R:CTAGGTGCAAGAAAAGAGTAT	$A_{16}(CAA)_9$	385	[49, 50, 51]
12	PtTx4011	F:GGTAACATTGGGAAAACACTCA R:TTAACCATCTATGCCAATCACTT	$(CA)_{20}$	536	[49, 50, 51]
13	PtTx3049	F:GAAGTGATAATGGCATAGCAAAAT R:CAGACCCGTGAAAGTAATAAACAT	$(TG)_{16}$	413	[49, 50, 51]
14	PtTx3025	F:CACGCTGTATAATAACAATCTA R:TTCTATATTCGCTTTTAGTTTC	$(CAA)_{10}$	306	[49, 50, 51]
15	PtTx3107	F:AAACAAGCCCACATCGTCAATC R:TCCCCTGGATCTGAGGA	$(CAT)_{14}$	397	[49, 50, 51, 52]
16	PtTx4001	F:CTATTTGAGTTAAGAAGGGAGTC R:CTGTGGGTAGCATCATC	$(GT)_{15}$	245	[49, 50, 51]
17	lw_isotig00542	F:AACAGGAGCATATCAATCAA R:GTGGCATTCTACAAGCAATT	$(T)_{40}$	257	[18, 49]
18	lw_isotig04204	F:CTCCGTTTGGGTTGTGTTTG R:ATCCTTGCCGCCAGATTTGT	$(CGGCT)_5$	230	[18, 49]
19	lw_isotig04600	F:TCAGGGAAAATGTAGGAAAATG R:AATCTGTTGTTGTGGGACTTGA	$(CAG)_{10}$	305	[18, 49]
20	lw_isotig06440	F:GGGACAAGGGACATCG R:TGGAGACTTCGGGTGC	$(AGGTTG)_5$ $(AGGCTG)_6$	298	[18, 49]

Продолжение таблицы А.1

№	Локус	Мотив	Последова-тельность праймеров	Длина фрагмента	Источник
21	lw_isotig07383	F:CAAACAAAAAACAGTCTGCA R:ATCGTCATCATCATCGTCAC	(GAT) $_{8}$	191	[18, 49]
22	lw_isotig10603	F:CAAAATCGTCTACTTCTCCCCC R:CAAAGCAAAAGAACTCCAACGA	(CAG) $_{7}$	196	[18, 49]
23	lw_isotig17679	F:TTGTTTGCCACATTGTTGCC R:CAAACCACCGCTGCTTCTAA	(TTAA) $_{5}$	277	[18, 49]
24	lw_isotig21953	F:ATGGTGTGTTTGAAGCGGAA R:ATTGCAGCCACTGGTGTCTT	(ATGGG) $_{7}$	208	[18, 49]
25	lw_isotig26230	F:GGGCATTACATAAACACGGG R:TGCCCTTGAGCATTTGATTA	(TA) $_{10}$	260	[18, 49]
26	lw_isotig27940	F:GCAGGCAACAACAAAAGTGACA R:AGCAATCGAGTGGCAAATCTTC	(TGGA) $_{5}$	231	[18, 49]
27	lw_isotig00080	F:CGGGCAAAATGACCGAAG R:TGGAGGAGGTAGAGGGGG	(CCG) $_{6}$	177	[18, 49]
28	lw_isotig00081	F:TGCGGAAGGCGTGAGTAG R:TGGAGGAGGTAGAGGGGG	(CCG) $_{6}$	290	[18, 49]
29	lw_isotig01420	F:TCCGTGACCCTATTACGT R:CGATTAGTTGCTTGCCTT	(CTG) $_{5}$	174	[18, 49]
30	lw_isotig02138	F:ATGCATCTTGTCCTCTCT R:TTCCTGATTCACACTCCC	(AG) $_{6}$	124	[18, 49]
31	lw_isotig02347	F:CTCGTCCTTCTTGTCCGC R:GCTATTGCTCCACTTGCC	(TG) $_{7}$	198	[18, 49]
32	lw_isotig03088	F:CATTTGGTTGACTTTGTT R:TTGTAGTGAGATCTGTGC	(GA) $_{6}$	235	[18, 49]
33	lw_isotig04931	F:TAGACCTCATCACAAACT R:ACAAAAACGAATACAAAT	(AC) $_{6}$	132	[18, 49]
34	lw_isotig02842	F:GTGATGGTGTGGTGGCTGTA R:TCCTTTGTGGGAGATTGGTG	(AGA) $_{5}$	229	[18, 49]
35	lw_isotig04195	F:GAGATCACCGAAACAACAAAA R:TACAAGTCCCAGCAAAACAAT	(GAG) $_{5}$	189	[18, 49]
36	lw_isotig04306	F:GCCATTTTTTTCTTCTCTCCT R:GGTCGGTTTCTGAATTTCTAA	(TCC) $_{7}$	196	[18, 49]
37	lw_isotig05123	F:TGTGCGTATAGGAGGTGGAG R:ATGAAAGGTGACAAAGCGGT	(GAG) $_{6}$	166	[18, 49]
38	lw_isotig06215	F:TCAGGTGCTTACCCCTTTTC R:TGGCAGCTATTCCAGTCTTT	(CAA) $_{5}$	275	[18, 49]
39	lw_isotig11166	F:ACACACACTGAGCTCCAATTT R:AGTCCCACCTCTGCTGATACA	(TA) $_{7}$	137	[18, 49]
40	lw_isotig12667	F:CCAAGGTGAAAAGGAAATGA R:TTCTGACAGGGAGCGACTGA	(CA) $_{6}$	199	[18, 49]
41	lw_isotig20215	F:AGAGGTGATCGCAGTCAAAGA R:TTCAAAAAGACCAAACCGTAG	(TA) $_{7}$	186	[18, 49]
42	psyl2	F:TTGCTTTTGCAGAACATTCG R:GTCCTGCAGGCAATCAAAAT	(GCT)$_{5}$	199–211	[19]
43	psyl16	F:GCTCTGCCCATGCTATCACT R:TGATGCTACCCAATGAGGTG	(AT)$_{7}$	202–210	[19, 55]
44	psyl17	F:TGGTCTGCAAATCAATCGAA R: GGGTAGGAATGCAAGTTAGGC	(TA)$_{7}$	219–251	[19, 55]
45	psyl18	F:ACTACCTGGCATTCGTCCTG R:GGATCTGGTCCATTTCGTGT	(GCA)$_{7}$	297–306	[19]

Продолжение таблицы А.1

№	Локус	Мотив	Последова-тельность праймеров	Длина фрагмента	Источник
46	psyl19	F:GGCTGTAATTGGCACAGGTT R:CGAGGTGGTACACAGCAACA	$(GCT)_7$	315–324	[19, 55]
47	psyl25	F:CAGCACGCGTTCTTTGTATC R:ACCGTTGCTCGTTGTCTTCT	$(GCA)_5$	214–244	[19]
48	psyl36	F:TATCATCGAGAGCCCCAAAA R:GAAAGGCGAAAGCAAAAGTG	$(GTC)_7$	245–257	[19, 55]
49	psyl42	F:CAACTTCAGCCTTGCAACAA R:CGACTTCATTTGGAACACCA	$(TC)_9$	171–179	[19, 55]
50	psyl44	F:TCCAAGTTCGGTTCCTTGTC R:GACACGATGGATTCCCTGAT	$(CGG)_5$	166–175	[19]
51	psyl57	F:CCCCACATCTCTACAGTCCAA R:TGCTCTTGGATTTGTTGCTG	$(ACC)_7$	187–202	[19, 55]
52	LOP1	F:GGCTAATGGCCGGCCAGTGCT R:GCGATTACAGGGTTGCAGCCT	$(TA)_{10}$	151–186	[52, 54]
53	LOP3	F:GTCTCCAGCCAGTTCACCTGC R:CAGTGGATCTGTCACCTCCTC	$(TA)_9$	206–232	[52, 54]
54	LOP5	F:AGCCGTAAAAGCTATCTTGTG R:GGCATACTTACATTTTAATAA	$(TA)_{33}$	140–220	[52, 54]
55	LOP8	F:TATCCACCAGAAGGGCATC R:CGGGAGCTTTAATGATCTTGA	$(CCT)_6$	367	[54]
56	LOP9	F:GGATTCTCGTTGTGGCTGG R:TTGCCTTTGCACATAATATCT	$(GGC)_6$	135	[54]
57	LOP11	F:CCAGAAGGCTATAGTACAC R:CAACAATACAAGTAGCAATAC	$(TA)_2T(TA)_{12}$	235	[54]
58	LOP12	F:AGGACAGTCCTTACTGCCCAA R:CATGTTTTCCCATGGTTTTCC	$(TA)_{26}$	156, 160	[54]
59	SsPp_cn524	F:CGATTGTTTTTGCCTTTTAAGC R:AAATATGGCGGGGTGTGC	$(AG)_{14}$	156	[53]
60	SsrPt_AW010960	F:ATCGACTAGGCATCAGGTGG R:TCCTCGTAGCCCAGCTTTTA	$(AT)_9$	225	[53]
61	SsrPt_AW225917	F:TGCATTGAAAAATACAGCGG R:ATTATGTACGAGGCCCCACA	$(AT)_9$	198	[53]
62	SsrPt_AW981772	F:GATCCTGTTCCTCCTCCTCC R:CCTGGACAGAAACAGCAACA	$(CCT)_4$	266	[53]
63	SsrPt_BF049767	F:TTTTGGGTCGTAGGAACCTG R:TAAAACGGGTGTCTCTTCGG	$(AG)_{22}$	227	[53]
64	SsrPt_ctg1376	F:CGATATTATGGATTTTGCTTGTGA R:AAATGCATGCCAAACTTAAATAC	$(AT)_{20}$	145	[49, 50, 53]
65	SsrPt_ctg1525	F:TTGAAACCATATAAGCAATGCC R:AGGACCTGGGTAAGGAGGC	$(AGG)_7$	173	[53]
66	SsrPt_ctg17601	F:CGCCATTAATATGCCTACCG R:ATCTCTGCGCTGCTTGAAGT	$(AAG)_9$	225	[53]
67	SsrPt_ctg18103	F:CCTGGATTCATTTGTGGCTAA R:CATGCCAACTTCTTGCATTG	$(AT)_{10}$	184	[53]
68	SsrPt_ctg2300	F:CACTTTGCGAGAGACTGCAC R:ACGCTGAAGGAAATCGAGAA	$(CCG)_6$	173	[53]
69	SsrPt_ctg275	F:ACGGAGATATATTGCTGGCG R:AAAGAATAACGTGAAACAAACCC	$(AT)_{16}$	137	[53]
70	SsrPt_ctg3021	F:CTCAGATTCCTCCAAATGCG R:CATGCAACATATGCAAACCG	$(AGC)_{14}$	234	[53]
71	SsrPt_ctg3089	F:CTTTCTTCACGTTGGACTTCTT R:TTAGCCATGGAGAGTGCAGA	$(AT)_{17}$	482	[53]

Продолжение таблицы А.1

№	Локус	Мотив	Последова-тельность праймеров	Длина фрагмента	Источник
72	SsrPt_ctg3754	F:TCTTTGGGTTTCTGGAGTGG R:GCTGTTGCTGTTGTTCTTGG	$(AGC)_6$	421	[53]
73	SsrPt_ctg4363	F:TAATAATTCAAGCCACCCCG R:AGCAGGCTAATAACAACACGC	$(AT)_{10}$	100	[49, 50, 53]
74	SsrPt_ctg4487a	F:TCTGCTGTGTGGACAAACCT R:TTCTTGGCTCAAAATCTCGG	$(CCG)_5$	155	[53]
75	SsrPt_ctg4487b	F:ATGACGCATTATCAGGGGAA R:TTGCACAGAAAGCAGGTTTG	$(CCG)_{10}$	254	[53]
76	SsrPt_ctg4698	F:CGAAAAGGTGGTTCTGATGG R:TTTTCCGCTGGATTTACCAC	$(ATC)_{10}$	246	[53]
77	SsrPt_ctg5167	F:TGCAGAGAGATTCGATGGG R:ATTTTGGTTTGTTTGCTGGC	$(AAC)_7$	293	[53]
78	SsrPt_ctg5333	F:GAAGGAGTCGGCGATAACAG R:GGGAATTCGACCTGTGAAGA	$(AGC)_7$	163	[53]
79	SsrPt_ctg64	F:GGAAGCTGTTACAAGTGCGG R:ATCGAGAAGAGAGGAAGGGC	$(CCG)_7$	284	[53]
80	SsrPt_ctg7024	F:GGGAATTCTGAAAGACAAGGG R:AACTTACCCATCGAGAGCCCC	$(AAG)_7$	277	[53]
81	SsrPt_ctg7081	F:GTCATCCACGTTCATTGGC R:TCACAACTGACCAAACTGCC	$(AAG)_7$	442	[53]
82	SsrPt_ctg7141	F:GAATGACGCATTATCAGGGG R:TCACCTTTCTCACCTCTGCC	$(CCG)_8$	381	[53]
83	SsrPt_ctg7170	F:GGTTTTTCGATTTCTGAGGC R:AACAGGTGTGCAAATAGCCC	$(AGC)_5$	385	[53]
84	SsrPt_ctg7425	F:AATAAGACCCCAGAGGAGCC R:GACGTCTTTCACCAAATCGC	$(AAG)_6$	384	[53]
85	SsrPt_ctg7444	F:TCTTCACCATCGGTTTCTCC R:TGGATCTGTCACCTCCTCATC	$(AT)_{10}$	285	[53]
86	SsrPt_ctg7731	F:AGTGGTGAAGGGTCCATCTG R:GCATAACACAAAAGCCAGCA	$(AT)_{12}$	217	[53]
87	SsrPt_ctg7824	F:TGACCTGTCTTGTGAGACGC R:TTTTGAAACAGATTGCAGCC	$(AT)_{12}$	501	[53]
88	SsrPt_ctg7867	F:GGTCGTGGAGGAGGTAGGG R:ACTGATAACAGCTGCCCCC	$(CCG)_6$	154	[53]
89	SsrPt_ctg8064	F:GAACGTGGTTATGGCGGTAG R:TCGTGGCAACTATCTCCTCC	$(ACC)_6$	147	[53]
90	SsrPt_ctg865	F:TTTCAGAAGCTCCCGATTTG R:CTTGTGGACATGGTTAATGAAG	$(AT)_{15}$	232	[53]
91	SsrPt_ctg9249	F:CTGCTCCCTCAGCTCTTCC R:AGACGTCACTGCCATTACCC	$(AAG)_7$	156	[53]
92	RPtest1	F:GATCGTTATTCCTCCTGCCA R:TTCGATATCCTCCCTGCTTG	$(AAT)_7$	125	[53]
93	RPtest5	F:ACAACAATAATAACGGGGGC R:ACGCTTTAGATCCTCCTGCA	$(AAC)_6$	197	[53]
94	RPtest6	F:AGGATTCCAACAGCATCACC R:CTGAACATGAAGCGCAGTGT	$(TGC)_5$	147	[53]
95	RPtest9	F:CCAGACAACCCAAATGAAGG R:GCCTGCTATCGAATCCAGAA	$(AGG)_{10}$	289	[53]
96	RPtest11	F:AGGATGCCTATGATATGCGC R:AACCATAACAAAAGCGGTCG	$(ATC)_7$	213	[53]
97	RPt11est13	F:GATTTTTCAGGAAGACCCCC R:TGTAAGGCACAAGCCCTCTT	$(CTG)_5$	277	[53]

Окончание таблицы А.1

№	Локус	Мотив	Последова-тельность праймеров	Длина фрагмента	Источник
98	RPtest15	F:GAACGTGGTTATGGCGGTAG R:CCAGGGACAGTTACCAGCAT	$(ACC)_6$	246	[53]
99	RPtest16	F:CAGAAATGGCGTCCAAATTC R:ACCCCACTTATATCCCCAGC	$(AGT)_5$	132	[53]

Изъято в связи с авторскими правами с 54 по 55 стр.

Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра водных и наземных экосистем

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ _____
подпись инициалы, фамилия
«____»_____20 __ г

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Разработка микросателлитных маркеров сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) на основе полногеномного *de novo* секвенирования

Руководитель _____ 28.06.2021 доцент, к.б.н. Орешкова Н. В.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

_____ 28.06.2021 профессор, д.б.н. Ямских И. Е.
подпись, дата должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ 28.06.2021 Стенина Я. В.
подпись, дата инициалы, фамилия

Красноярск, 2021