

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ  
Заведующий кафедрой  
И. Е. Ямских  
« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20 \_\_\_\_ г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Генетический полиморфизм *Larix sibirica* Ledeb.  
в контрастных экотопах Республики Хакасия

06.04.01 — Биология

06.04.01.06 — Геномика и биоинформатика

Научный руководитель	_____	доц., к. б. н.	Орешкова Н.В.
Выпускник	_____		Стенина Я.В.
Рецензент	_____	в.н.с., д.б.н.	Седельникова Т.С.

Красноярск 2023

## РЕФЕРАТ

Магистерская диссертация на тему «Генетический полиморфизм *Larix sibirica* Ledeb. в контрастных экотопах Республики Хакасия» содержит 60 страниц текстового документа, 7 рисунков, 12 таблиц, 11 формул, 62 использованных источника, 2 приложения.

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОЛИМОРФИЗМ, ЛИСТВЕННИЦА СИБИРСКАЯ, ДНК-МАРКЕРЫ, МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЕ ЛОКУСЫ, ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ.

Целью работы является определение уровня генетического разнообразия, структуры и степени внутривидовой дифференциации лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на территории республики Хакасия.

Объектами исследования генетического полиморфизма лиственницы сибирской послужили выборки из пяти популяций различных районов Республики Хакасии.

В работе были использованы 10 SSR-локусов, разработанных для популяционно-генетических исследований *L. sibirica*. Была проведена оценка уровня генетического разнообразия, популяционной структуры и степени генетической подразделенности пяти ценопопуляций лиственницы сибирской.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
1 Характеристика вида <i>Larix sibirica</i> Ledeb. ....	7
1.1 Таксономическое положение лиственницы сибирской .....	7
1.2 Разновидности лиственницы сибирской .....	8
1.3 Морфология и распространение лиственницы сибирской .....	10
1.4 Экономическое значение и использование лиственницы сибирской .....	11
2 ДНК-маркеры и их применение в генетических исследованиях .....	13
2.1 Преимущества и основные классы ДНК-маркеров .....	13
2.2 Микросателлитные маркеры .....	16
2.3 Изучение полиморфизма рода <i>Larix</i> М. с помощью микросателлитов .....	18
3 Материалы и методы .....	23
3.1 Районы исследования популяций лиственницы сибирской .....	23
3.2 Описание точек сбора выборок <i>Larix sibirica</i> .....	24
3.3 Отбор полиморфных микросателлитных локусов .....	26
3.4 Отработка полиморфных микросателлитных локусов лиственницы .....	27
3.5 Оценка показателей генетического разнообразия .....	29
4 Результаты исследования .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
4.1 Оценка показателей генетического разнообразия исследованных популяций <i>Larix sibirica</i> .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
4.2 Индекс фиксации в популяциях <i>Larix sibirica</i> .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
4.3 <i>F</i> -статистики Райта для популяций <i>Larix sibirica</i> .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
4.4 Анализ AMOVA для популяций <i>Larix sibirica</i> .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
4.5 Оценка уровня генетической дифференциации между популяциями <i>Larix sibirica</i> .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
4.6 Филогенетическое дерево .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>
4.7 Оценка нахождения <i>нуль-аллелей</i> в микросателлитных локусах для популяций <i>Larix sibirica</i> .....	<b>Ошибка! Закладка не определена.</b>

5 Обсуждение полученных результатов для популяций *L. sibirica* ..... **Ошибка!  
Закладка не определена.**

5.1 Генетическая изменчивость ..... **Ошибка! Закладка не определена.**

5.2 Генетическая дифференциация ..... **Ошибка! Закладка не определена.**

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ..... 36

ПРИЛОЖЕНИЕ А Протокол выделения ДНК..... 44

ПРИЛОЖЕНИЕ Б Протокол проведения вертикального электрофореза в 6-  
полиакриламидном геле ..... 46

## ВВЕДЕНИЕ

Сохранение генетического разнообразия основных лесобразующих пород России является острой проблемой современности. Только предварительно изучив популяционно-генетическую структуру лесобразующего вида, можно успешно разрешить проблему сохранения его генетического разнообразия [1].

Одним из способов получения данных о генетической изменчивости являются ДНК-маркеры [2]. Их разновидностью являются высокополиморфные кодоминантные ядерные микросателлитные локусы, активно используемые для исследования полиморфизма основных лесобразующих хвойных пород [3].

Работы по разработке микросателлитных маркеров для различных хвойных пород активно осуществлялись в последние несколько лет, например, разработаны SSR (Simple Sequence Repeat) маркеры для *Taxus contorta* Griff. [4], *Taxus cuspidata* Siebold & Zucc. [5], *Pinus sibirica* Du Tour [6]. Высокополиморфные микросателлитные локусы, используемые для исследования полиморфизма, были разработаны в том числе и для *Larix sibirica* [7, 8].

Древесина лиственницы сибирской устойчива к гниению, используется для строительства гидротехнических сооружений, судостроения, для получения целлюлозы, спирта, на пиломатериалы. Лиственница сибирская используется для получения живицы, смолы для парфюмерной промышленности, камеди и дубильных веществ [9].

Экологические факторы оказывают непосредственное влияние на рост и развитие древесных растений. Изучена зависимость формирования годичного слоя ксилемы лиственницы сибирской от благоприятного сочетания температуры и влажности. *L. sibirica* обладает повышенной чувствительностью и часто выступает как тест-объект [10].

В ходе проведения настоящей научно-исследовательской работы планируется связать экологические особенности произрастания популяций лиственницы сибирской с данными по их генетическому полиморфизму.

Целью работы является определение уровня генетического разнообразия, структуры и степени внутривидовой дифференциации лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на территории республики Хакасия.

В задачи исследования входило:

- Отобрать наиболее перспективные полиморфные ядерные микросателлитные маркеры для лиственницы сибирской, протестировать их на представленных популяциях;
- Изучить генетическую структуру и определить параметры генетического разнообразия лиственницы сибирской;
- Оценить подразделенность и степень дифференциации выборок в зависимости от расположения.

Автор выражает благодарность научному руководителю Орешковой Н.В. за оказание ценной помощи и сопровождение на всех этапах проведения работы. Помимо этого, автор признателен сотрудникам Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН за предоставленный биологический материал – образцы хвои лиственницы сибирской, а также за помощь в обсуждении полученных результатов.

Магистерская диссертация выполнена в лаборатории лесной геномики (зав. лаб. к.б.н. Крутовский) на кафедре геномики и биоинформатики (зав. каф. д.б.н. И.Е. Ямских) ИФБиТ СФУ.

## **1 Характеристика вида *Larix sibirica* Ledeb.**

### **1.1 Таксономическое положение лиственницы сибирской**

Перед тем как перейти к таксономическому положению лиственницы сибирской, необходимо отметить место рода *Larix* Mill. среди голосеменных. Род лиственница *Larix* относится к отделу голосеменных *Pinophyta* Cronquist, Takht. & Zimmerm. ex Reveal, классу хвойных *Coniferae* Bartl. или *Pinopsida* Burnett. Класс делится на 2 подкласса кордаитовые *Cordaitanthidae* и хвойные *Pinidae* Cronquist, Takht. et Zimmerm., к которому и относится род лиственница. Род *Larix* относится к порядку сосновые *Pinales* Gorozh., семейству сосновые *Pinaceae* Lindl., это самое обширное семейство среди голосеменных, оно насчитывает 10 родов с 250 видами [11].

Семейство сосновые делится на 3 трибы: пихтовые (*Abieteeae*), лиственничные (*Lariceae*) и сосновые (*Pineae*), которые отличаются друг от друга по наличию или отсутствию укороченных побегов: имеются у *Lariceae*, *Pineae* и отсутствуют у *Abieteeae*. Триба лиственничных отличается от трибы сосновых наличием на длинных побегах обыкновенных листьев, у сосновых данные побеги несут чешуевидные, незеленые листья. Род *Larix* входит в состав трибы лиственничные (*Lariceae*) [11, 12].

Род *Larix* относится к подсемейству лиственничные *Laricoideae* (Rendle) Pilg. & Melch., которое включает 3 рода – лиственницу, псевдолиственницу и кедр. Род лиственница объединяет 15 видов, наиболее широким ареалом обладают 3 из них: лиственница сибирская *Larix sibirica* Ledeb., лиственница Гмелина *Larix gmelinii* (Rupr.) Kuzen., лиственница американская *Larix laricina* Du Roi [13].

Дифференциация видов лиственницы очень неоднозначна. Во многом это объясняется слабой репродуктивной изоляцией, а также их легкой гибридизацией в естественных условиях. В настоящее время в России в природе

встречается восемь видов лиственницы: Сукачева (*Larix sukaczewii* Dylis (= *L. russica* (Endl.) Sabine ex Trautv.), лиственница сибирская (*L. sibirica*), лиственница Гмелина или даурская (*L. gmelinii*), лиственница Каяндера (*L. cajanderi* Mayr), лиственница охотская (*L. ochotensis* Kolesn.), лиственница ольгинская (*L. olgensis* A. Henry), лиственница курильская (*L. kitrilensis* Mayr), лиственница камчатская (*L. kamtschatica* (Rupr.) Carr). Многие из этих видов (*L. sukaczewii*, *L. cajanderi*, *L. ochotensis*, *L. kurilensis*, *L. kamtschatica*) не являются общепризнанными и являются предметом споров среди таксономистов.

Также были выявлены следующие гибридные комплексы: *L. sukaczewii* x *L. sibirica*, *L. sibirica* x *L. gmelinii* (= *L. czekanowskii* Szaf.), *L. gmelinii* x *L. kamtschatica* (= *L. maritima* Sukacz.), *L. gmelinii* x *L. maritima* x *L. olgensis* (= *L. amurensis* Kolesn.), *L. olgensis* x *L. principis rupprechtii* (= *L. lubarskii* Sukacz.), *L. lubarskii* x *L. olgensis* (= *L. komarovii* Kolesn.), *L. kamtschatica* x *L. maritima* (*L. middendorffii* Kolesn.). Некоторые гибридные комплексы также не являются общепризнанными.

Некоторые виды рода лиственница были интродуцированы в Россию, к ним относятся лиственница европейская (*L. decidua* Mill), лиственница польская (*L. x polonica* Racib.), лиственница японская (*L. leptolepis* (Siebold et Zucc.)) [14].

## 1.2 Разновидности лиственницы сибирской

В настоящее время описано несколько разновидностей (подвиды, экотипы) *Larix sibirica*:

1) *var. polaris* m. имеет крепкие, деревянистые семенные чешуйки, которые не широко раскрываются и на верхушке отчетливо загнуты внутрь. Чешуйки матовые и довольно густо опушены. Шишки прочные, при сдавливании твердые. Прицветники короткие и, несмотря на то, что в раскрытых шишках они отчетливо заметны, из-за семенных чешуек они не торчат. Широко распространена в приполярной и северной Сибири.

2) *var. altaica* m. имеет в основном мягкие семенные чешуйки, которые являются кожистыми и имеют прямой или слегка загнутый внутренний край. На



верхушке чешуйки часто сильно блестят. Шишки мягкие и быстро разрушаются, при сдавливании они легко сжимаются. Прицветники длинные и часто торчат из-за семенных чешуек на 1-3 мм. Растет на Алтае, в Монголии и Восточном Тянь-Шане.

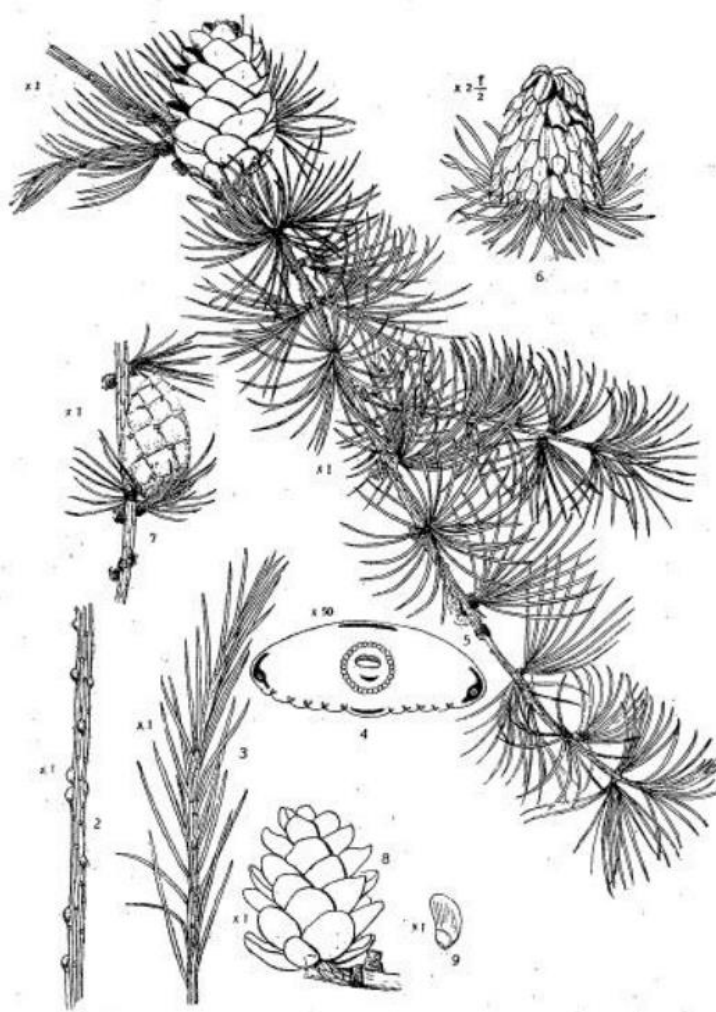
3) *var. sajanensis* m. семенные чешуйки выделяются кожистой или тонко-деревянистой текстурой и обладают большей прочностью и толщиной, чем у других разновидностей. Край чешуй выступает прямым или слегка загнутым вовнутрь, а сама чешуя имеет матовый оттенок. Шишки, по своей структуре очень прочные, но все же не настолько прочны, как у полярной разновидности. Прицветники обычно короткие, а порой и вовсе не заметны. Разновидность известна своими широкими ареалами обитания в Кузнецком Алатау, Саянах, Приангарье и по верхнему и среднему течению Енисея.

4.) *var lenensis* m. семенные чешуйки тонкие, кожистые и мягкие. Край этих чешуек, как правило, является прямым и часто неровно зазубренным. Опушенность слабая, чешуйки имеют сильный блеск. Шишки крупные, продолговатые или узко-яйцевидные, редко широко-яйцевидные. Они нешироко раскрываются и обычно легко сжимаются при сдавливании. Прицветники короткие и незаметны в шишках. Данную разновидность можно встретить в бассейне реки верхней Лены, а также на северо-западном побережье озера Байкал, на севере от Ольхонских ворот и острова Ольхона. В редких случаях может быть найдена в Приангарье, в частности, в Балаганской степи.

5) *var. baicalensis* m. Семенные чешуйки толстые, деревянные и очень твердые. Край чешуек прямые и плоские. Чешуйки круглые или яйцевидные, мелкие, но многочисленные, густо покрыты темно-коричневым опушением, всегда тупые. Шаровидные плоды в основном маленькие, 18-28 мм длиной, круглые или широкояйцевидные, широко открытые, но очень крепкие, совсем несморщенные, прицветники хорошо видны на всех шаровидных плодах. Растет на юго-западном побережье Байкала, к югу от пади Большие и Малые Коты [15].

### 1.3 Морфология и распространение лиственницы сибирской

Лиственница сибирская (*L. sibirica*) – древесное хвойное листопадное растение высотой до 35-40 метров, хорошо развиты боковые корни, стержневой корень уходит глубоко. Крона яйцевидно-коническая, у старых деревьев с тупой верхушкой. Кора у зрелых деревьев толстая, с глубокими бороздами. Хвоя имеет ярко-зелёный цвет с налётом, мягкая, по форме узколинейная, одиночно сидит на удлинённых побегах или пучками на укороченных. Женские шишки и мужские колоски расположены на укороченных побегах. Женские шишки имеют яйцевидную форму, до 4 см в длину, чешуи ложкообразные опушенные. Семена крылатые, в длину до 6 мм (рисунок 1) [16].



1-многолетний удлинённый побег с укороченными побегам и хвоей, 2-побег без хвои, 3-однолетний побег, 4-поперечный разрез хвои, 5-мужские колоски, 6- женский колосок, 7-несозревшая шишка, 8-старые шишки, 9-семя с крылом

## Рисунок 1 - *Larix sibirica* [16]

*L. sibirica* не очень требовательна к климатическим условиям, выдерживает высокую сухость почвы, предпочитает известняки и гипсы, пренебрегая песчаными почвами, в области Сибири может произрастать и на заболоченных почвах. Лиственница сибирская является широко распространенным видом в лесной и горно-таежных областях, поднимается в высокогорьях до 1800 метров.

Лиственница сибирская – это преимущественно азиатский вид, за пределами России произрастает в Монголии и в северном Китае. В пределах России она произрастает в Сибири и северо-восточной Европе, на севере лиственница сибирская доходит до тундр, в горных областях до верхнего предела лесного пояса [17].

### **1.4 Экономическое значение и использование лиственницы сибирской**

Лиственница сибирская обладает быстрым ростом и высокой продуктивностью, поэтому она способна существенно повысить продуктивность лесов, из-за чего широко используется в лесных культурах. Лиственница хорошо переносит смытые почвы на склонах и по берегам оврагов, что позволяет широко ее применять при облесении оврагов и в борьбе с эрозией почв. Исследования в различных географических и почвенных условиях показали, что лиственница сибирская благоприятно влияет на лесорастительные свойства и плодородие почв. Под лиственницей увеличиваются запасы фосфора, содержание гумуса и обменных оснований в почве.

Древесина лиственницы с большим красноватым ядром и узкой светлой заболонью, твёрдая высокопрочная, устойчива к гниению, но легко растрескивается и коробится при высыхании. Из-за своей тяжести непригодна для сплава, что ограничивает её заготовку. Лиственница используется для строительства гидротехнических сооружений, судостроения, для получения целлюлозы, спирта, на пиломатериалы.

Большой интерес представляет прижизненное использование лиственницы. Лиственница сибирская используется для получения живицы и смолы для парфюмерной промышленности. Кора лиственницы является ценным сырьем для получения дубильных веществ. Древесина *Larix sibirica* содержит камедь. Хвоя лиственницы содержит эфирные масла, витамин С и минеральные элементы, которые обогащают почву при ежегодном сбрасывании хвои [9].

По сравнению с другими сосновыми породами, лиственница лучше адаптируется к неблагоприятным экологическим условиям, в том числе к загрязнению атмосферного воздуха, и поэтому широко применяется в озеленении, а также в защитном лесоразведении [18].

## **2 ДНК-маркеры и их применение в генетических 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 этим выделяют соответственно 2 тест-системы [2].

Биохимическими называются маркеры, которые основаны на обнаружении генного продукта или продукта его активности с использованием биохимического анализа. К данному классу маркеров относят как различные белки (запасные белки семян растений, алло- и изоферменты), так и метаболиты (углеводы, вторичные метаболиты). Метаболиты как маркеры не получили широкого распространения, так как их выявление является дорогостоящим. Анализ белков позволяет изучать полиморфизм только белок-кодирующих участков у экспрессирующихся генов, при этом большая часть генома остается недоступной для исследования [19].

Применение же 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 не кодирующие 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 [20]. 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 [21].

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 [21].

Таблица 1 – Классификация основных ДНК-маркеров

<b>Классификация</b>	<b>Монолокусные маркеры</b>	<b>Мультилокусные маркеры</b>
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
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 [21].

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 [22].

## **2.2 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 Изучение полиморфизма рода *Larix* М. с помощью микросателлитов**

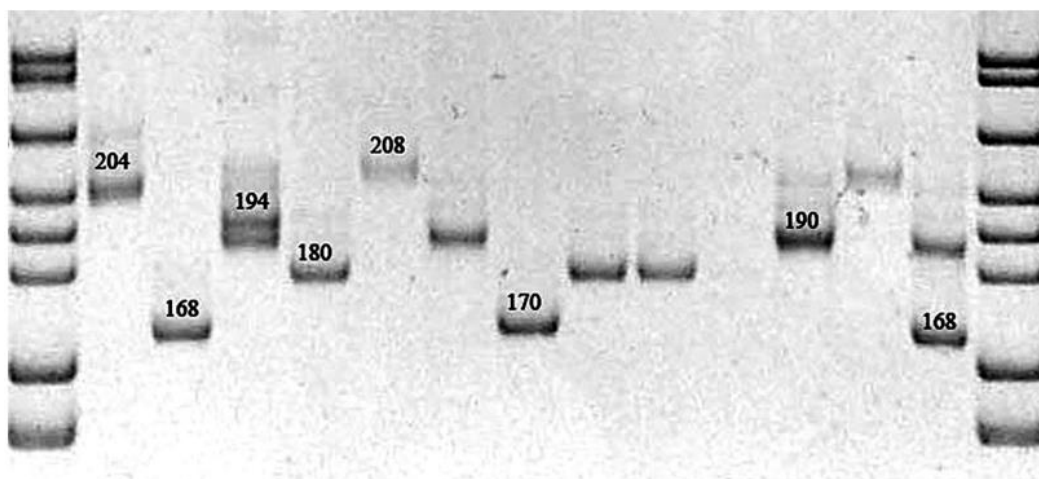
Проведено много исследований по изучению полиморфизма хвойных деревьев рода *Larix* с использованием микросателлитных ДНК-маркеров.

Первые микросателлитные маркеры были разработаны для таких представителей рода *Larix*, как лиственница японская *Larix kaempferi* (Lamb.) Carriere, [23], лиственница Лайэля *Larix lyallii* Parl. [24] и лиственница западная *Larix occidentalis* Nutt. [24, 25]. Большинство из разработанных ранее микросателлитных маркеров для рода лиственница являлись динуклеотидными, именно с их применением производились исследования генетического полиморфизма *Larix sibirica* до разработки SSR-маркеров для данного вида.

В лаборатории лесной геномики СФУ в рамках проекта по изучению генома лиственницы сибирской были разработаны три-, тетра-, пента- и гексануклеотидные микросателлитные маркеры для вида *Larix sibirica*. Данные микросателлитные маркеры пригодны как для проведения анализа в обычных лабораторных условиях на камерах для вертикального электрофореза, так и предложены мультиплексные панели для фрагментного анализа с использованием капиллярного электрофореза [7, 8].

Генетическая изменчивость и уровень дифференциации лиственницы сибирской были исследованы с использованием методики ядерных микросателлитных маркеров в работах Н.В. Орешковой с соавторами [26, 27]. Исследование проводилось на популяциях, произрастающих на территории Таймырского муниципального района Красноярского края и в Республиках Алтай и Тыва. Проведенная работа показала отсутствие тесной взаимосвязи между географическим положением выборок и степенью их генетической дифференциации, что было объяснено тем, что лиственница сибирская произрастает в различных географических зонах и влияние экологических

факторов оказывается сильнее влияния генетической дифференциации. Исследованные локусы показали высокий уровень разнообразия аллелей у исследованных популяций, у четырёх из локусов число аллельных вариантов колебалось от 12 до 20. Пример электрофореграммы одного из таких высокополиморфных диагностических локусов приведен на рисунке 2 [27].



168, 170, 180, 190, 194, 204, 208 – обозначение аллелей по длине амплифицируемого фрагмента ДНК

Рисунок 2 – Электрофореграмма микросателлитного локуса *bcLK225* у лиственницы сибирской [27]

Оценка генетического разнообразия популяций лиственницы сибирской с помощью микросателлитных маркеров также проведены для популяций Урала из трех районов: Северного, Среднего и Южного. В целом изученные выборки характеризовались высоким уровнем генетического разнообразия. Наиболее специфичным генофондом обладала популяция Южного Урала, а наиболее типичным генофондом – Северного. Установлено, что в 5 из 15 исследованных популяций наблюдаются признаки обеднения генофонда [28].

Также было проведено исследование с использованием ядерных микросателлитных маркеров 4 популяций лиственницы сибирской, произрастающих на Северном Урале и различающихся высотой произрастания: две популяции расположены в горах, а две другие – на равнинном плато. У исследованных популяций лиственницы сибирской, произрастающих в

различных экологических условиях, уровень генетического разнообразия был довольно высоким ( $N_E = 3,813$ ,  $H_e = 0,646$ ), но большая его часть приходилась на внутривидовую компоненту (95%) [29].

Аналогичные исследования популяций лиственницы Гмелина из Монголии и лиственницы из Камчатского края с помощью SSR-маркеров показало, что генетический полиморфизм лиственницы Гмелина несколько выше, чем у лиственницы с Камчатки. В популяциях обоих видов наблюдается низкий уровень гетерозиготных генотипов, что является следствием высокого уровня инбридинга [30, 31].

Кроме этого, анализ генетического разнообразия с применением SSR-маркеров в популяциях трех видов лиственниц из республик Алтай и Тыва, Таймырского района Красноярского края, Монголии и Камчатки выявил достоверную корреляцию географических расстояний с генетическими дистанциями между популяциями. Доля межвидовой генетической изменчивости трех изученных видов рода *Larix* была выше более чем в 2 раза, по сравнению с выявленной межпопуляционной изменчивостью внутри видов [31].

Микросателлитные ДНК-маркеры также были использованы в более детальном исследовании популяций лиственницы Каяндера в Магаданской области и на полуострове Камчатка, в результате которых был выявлен более высокий уровень генетического разнообразия в популяциях из Магаданской области, что согласуется с данными полученными с применением фенотипических маркеров (с использованием геометрической морфометрии шишек) [32, 33, 34].

Генетическая дифференциация исследованных двух групп популяций из Магаданской области и Камчатки соответствовала их географической удаленности друг от друга. Построенная дендрограмма на основе матрицы генетических дистанций М. Нея (рисунок 3) наглядно показывает деление популяций лиственницы сибирской на два кластера в зависимости от места произрастания: Камчатский край или Магаданская область [32].

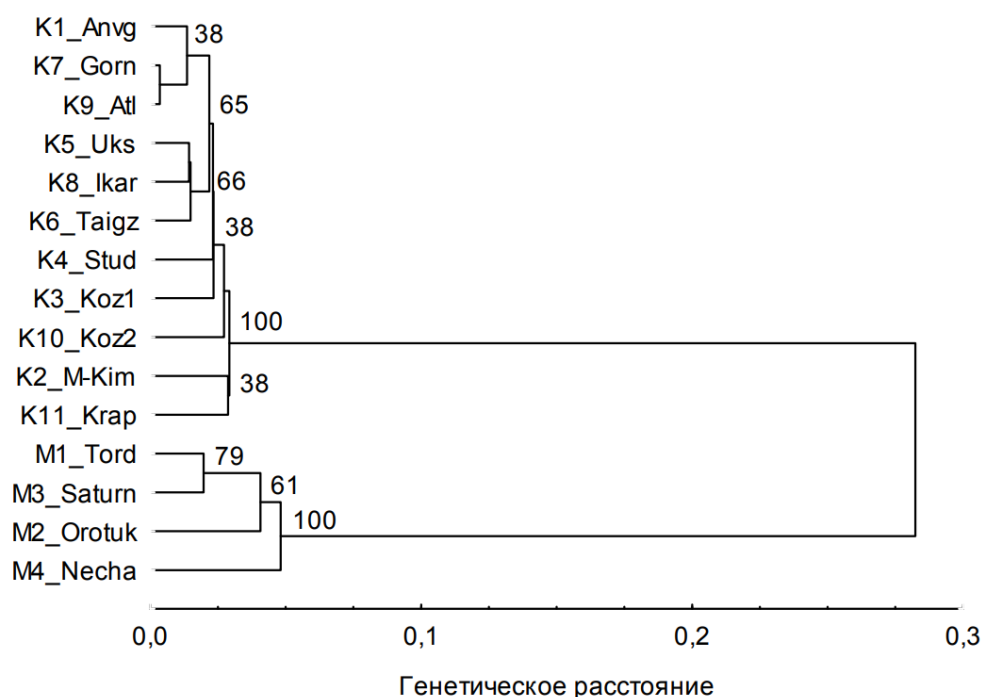


Рисунок 3 – UPGMA-дендрограмма генетических расстояний между изученными популяциями лиственниц [32]

Путём использования ядерных микросателлитных маркеров были исследованы популяции лиственницы Сукачева (*L. sukaczewii*) в Свердловской области. Был установлен дефицит гетерозиготности и низкий уровень генетического разнообразия. Выявлены полиморфные локусы, которые в дальнейшем могут быть использованы для молекулярно-генетической идентификации растений [35].

Помимо исследования внутри- и межпопуляционной изменчивости рода *Larix* ядерные микросателлитные маркеры также используются для проведения видовой идентификации. Было осуществлено исследование по подбору микросателлитных маркеров, которые возможно использовать для идентификации лиственницы даурской (Гмелина) и лиственницы сибирской. Для исследования использовалась хвоя популяций лиственницы даурской из Хабаровского края и Еврейской автономной области, а также контрольные образцы семян лиственницы даурской (партия из Хабаровского края) и лиственницы сибирской (партия из республики Хакасия). В результате

исследования были отобраны 5 локусов, с помощью которых возможно найти различия между лиственницей даурской и лиственницей сибирской. Для отобранных локусов были выявлены значения длин фрагментов ДНК, отмечены характерные показатели полиморфизма [36].

### 3 Материалы и методы

#### 3.1 Районы исследования популяций лиственницы сибирской

Объектами исследования генетического полиморфизма лиственницы сибирской послужили выборки из пяти популяций различных районов Республики Хакасия, собранные и предоставленные сотрудниками Института леса им. В.Н. Сукачева СО РАН – обособленного подразделения ФИЦ КНЦ СО РАН. Сбор образцов хвои проводился 23-24 июля 2020 г. Информация о местоположении точек сбора материала пяти популяций, особенностей фитоценозов и морфологии образцов представлена в таблице 2, их расположение на карте показано на рисунке 4.

Таблица 2 - Местоположение точек сбора выборок лиственницы сибирской

Номер популяции	Район республики Хакасия	Код выборки	Координаты точки сбора	Высота над уровнем моря
1	Ширинский район Республики Хакасия. Долина реки Тунгжуль (правый приток р. Белый Июс)	TNZh	с.ш. 54°16' в.д. 89°38'	600 – 640 м
2	Ширинский район Республики Хакасия. Долина реки Карыш (бассейн оз. Итколь)	KR	с.ш. 54°24' в.д. 89°59'	500 – 520 м
3	Орджоникидзевский район Республики Хакасия. Редкостойный лиственничник (40-60 экз./га) на южных суходольных склонах в долине оз. Агаскыр – место впадения ручья Луковый в р. Печище (левый приток р. Черный Июс)	AG-s	с.ш. 54°58' в.д. 89°15'	540 – 550 м
4	Орджоникидзевский район Республики Хакасия. Болотный лиственничник с елью эутрофного ряда водно-минерального питания в долине оз. Агаскыр – место впадения ручья Луковый в р. Печище (левый приток р. Черный Июс)	AG-b	с.ш. 54°58' в.д. 89°16'	540 м
5	Ширинский район Республики Хакасия. Лиственничное редколесье паркового типа (8-9 экз./га) на остепненных лугах южной оконечности долины оз. Фыркал	FRK	с.ш. 54°30' в.д. 89°46'	540 м



Голубым цветом обозначены точка сбора выборки 1-ой популяции (долина реки Тунгузуль), красным цветом – 2-ой популяции (долина реки Карыш), жёлтым цветом – 3-ей популяции (долина озера Агаскыр, суходольные склоны), синим цветом – 4-ой популяции (долина озера Агаскыр, болотный лиственничник), фиолетовым цветом – 5-ой популяции (долина озера Фыркал)

Рисунок 4 - Карта расположения выборок *L. sibirica*

### 3.2 Описание точек сбора выборок *Larix sibirica*

Популяция 1 «Тунгузуль» (TNZh). Ширинский район Республики Хакасия. Долина реки Тунгузуль (правый приток р. Белый Июс). Координаты участка: 54°16'СШ 89°38'ВД (600-640 м над ур. моря). Представлена тремя ценопопуляционными выборками: 1) лиственничное редколесье (13-15 экз./га) с разнотравными лугами на пологих склонах долины (возраст деревьев – 180-360 лет, высота – 18-34 м, диаметр – 58-92 см); 2) прирусловый болотный ельник с примесью лиственницы зеленомошно-гипново-кочкарный (глубина торфяной залежи 1.2-1.4 м, возраст деревьев – 30-70 лет, высота – 4-6 м, диаметр – 8-12 см.); 3) лиственничное редколесье травяно-кустарниковое на скально-щебнистом гребне, обрамляющем речную долину (возраст деревьев – 130-160 лет, высота – 15-18 м, диаметр – 26-32 см).



Популяция 2 «Карыш» (KR). Ширинский район Республики Хакасия. Долина реки Карыш (бассейн оз. Итколь). Координаты участка: 54°24'СШ 89°59'ВД (500-520 м над ур. моря). Представлена двумя ценопопуляционными выборками: 1) разновозрастный пойменно-болотный лиственничник с березой мохово-осоковый на мерзлотном горизонте (возраст деревьев – 32-188 лет, высота – 4-19 м, диаметр – 7-38 см); 2) лиственничное редколесье разнотравное на скальных обнажениях остепненного обрамления речной поймы (возраст деревьев – 90-140 лет, высота – 5-8 м, диаметр – 13-16 см).

Популяция 3 «Агаскыр\_суходол» (AG-s). Орджоникидзевский район Республики Хакасия. Редкостойный лиственничник (40-60 экз./га) на южных суходольных склонах в долине оз. Агаскыр – место впадения ручья Луковый в р. Печище (левый приток р. Черный Июс). Координаты участка: 54°58'СШ 89°15'ВД (540-550 м над ур. моря). Диапазон изменчивости таксационных показателей составляет: возраст деревьев – 130-185 лет, высота – 19-23 м, диаметр – 44-56 см.

Популяция 4 «Агаскыр\_болото» (AG-b). Орджоникидзевский район Республики Хакасия. Болотный лиственничник с елью эутрофного ряда водно-минерального питания в долине оз. Агаскыр – место впадения ручья Луковый в р. Печище (левый приток р. Черный Июс). Координаты участка: 54°58'СШ 89°16'ВД (540 м над ур. моря). Диапазон изменчивости таксационных показателей составляет: возраст деревьев – 50-70 лет, высота – 4-6 м, диаметр – 8-11 см.

Популяция 5 «Фыркал» (FRK). Ширинский район Республики Хакасия. Лиственничное редколесье паркового типа (8-9 экз./га) на остепненных лугах южной оконечности долины оз. Фыркал. Координаты участка: 54°30'СШ 89°46'ВД (540 м над ур. моря). Диапазон изменчивости таксационных показателей составляет: возраст деревьев – 160-200 лет, высота – 12-14 м, диаметр – 50-60 см.

До сих пор ведутся дискуссии насчет определения термина «популяция», в этой работе мы придерживаемся эколого-систематического подхода. Это

означает, что мы понимаем популяцию, как ценопопуляцию по А. А. Корчагину, или местную популяцию (выборку) по К. М. Завадскому [37, 38]. Данный подход часто использовался и в настоящее время применяется при проведении работ по изучению лесообразующих древесных видов [39, 40, 41, 42].

### **3.3 Отбор полиморфных микросателлитных локусов**

Для проведения генетического анализа в выборках лиственницы сибирской были использованы микросателлитные локусы, разработанные ранее сотрудниками лаборатории лесной геномики СФУ для *Larix sibirica*, а также исследователями Isoda К. и Watanabe А. для *Larix kaempferi* [8, 23].

Отбор праймеров осуществляли путем подбора и оптимизации условий амплификации программы ПЦР. После оптимизации условий амплификации каждый разработанный локус тестировался на 4 образцах из одной выборки лиственницы сибирской с целью отбора для дальнейших исследований. По результатам данного тестирования были отобраны полиморфные локусы, демонстрирующие хорошо интерпретируемые электрофореграммы. Отобранные полиморфные микросателлитные локусы для дальнейшего исследования выборок из популяций *Larix sibirica* представлены в таблице 3.

Среди отобранных полиморфных микросателлитных маркеров 3 имеют динуклеотидный мотив, 3 других маркера – тринуклеотидный мотив, ещё три маркера – тетрануклеотидный мотив и 1 маркер – гексануклеотидный мотив.

Отобранные последовательности праймеров для микросателлитных маркеров *Larix sibirica* синтезировали в ЗАО «Евроген».

Таблица 3 – Отобранные микросателлитные локусы для *Larix sibirica*

Локус	Мотив	Последовательности праймеров	Длина фрагмента	Источник литературы
<i>bcLK232</i>	(AG) <sub>19</sub>	F: TGTTGCTGGGTTGTTGTTAGA R: GGGTAATAGTTCCAGTCTTTG	142 – 178	[23]
<i>bcLK224</i>	(AG) <sub>17</sub>	F: GGAGAGGCCACTACTATTATTAC R: ATGCGTTCCTTCATTCCTCT	152 – 168	[23]
<i>bcLK066</i>	(TG) <sub>12</sub>	F: GCAACCGACAATGATTACATAG R: CCTAAAAGTGAACCTTTGCTCAAT	155-172	[23]
<i>Ls_954234</i>	(ATT) <sub>15</sub>	F: TGGCGTTTGGCTAAGTTGTAA R: GGTTGATTTATGTGTGTGTATGTGG	171–204	[8]
<i>Ls_752897</i>	(AAG) <sub>15</sub>	F: GCAGATGTTGATACAGTGGAGG R: CAGCTTCATTTTCGTGGCTAAT	216–264	[8]
<i>Ls_417667</i>	(AAT) <sub>16</sub>	F: CAGAGGATCTCATTCTGTTGA R: CTCGAAGGCCAATTAGGATAAA	207–243	[8]
<i>Ls_2672894</i>	(TTTG) <sub>11</sub>	F: CAAAGGATGGAATGTGTCTCAA R: GTTGGTATGGTTTCCCAGAGTG	152–164	[8]
<i>Ls_2552367</i>	(CTAT) <sub>10</sub>	F: AAAGGTGCAATCACGTAAAGAC R: ATCGAAGCGGAAAATGTGTA	184–196	[8]
<i>Ls_1008427</i>	(ATAG) <sub>13</sub>	F: CACCCCTATCCCACAAATCTTA R: ATTTATCTTTGGCCCTCATGC	152–174	[8]
<i>Ls_305132</i>	(GTCGGA) <sub>7</sub>	F: GCAGAGCCGTTATTCGATCTAT R: CCCTCGTTTCCTCTTCTGACTA	210–240	[8]

### 3.4 Обработка полиморфных микросателлитных локусов лиственницы

Препараты тотальной ДНК были выделены модифицированным методом с применением цетилтриметиламмонийбромид (СТАВ) из образцов тканей хвои, высушенной при помощи силикагеля [43]. Протокол выделения ДНК представлен в приложении А.

Для проведения ПЦР использовали готовые реакционные смеси для амплификации ДНК «GenePak PCR Core» производства ООО «Лаборатория Изоген», содержащие ингибированную для «горячего старта» Taq-ДНК-полимеразу, дезоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния. В готовые

реакционные смеси добавлялись прямой и обратный олигонуклеотидные праймеры и образец ДНК *L. sibirica*. Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 6%-ом полиакриламидном геле с использованием трис-EDTA-обратного 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 HpaII. Протокол проведения вертикального электрофореза представлен в приложении Б. Молекулярный вес фрагментов определяли путем сопоставления со стандартным маркером в программе Image Lab software (Bio-Rad, version 6.0.1). Методики, используемые в работе, были взяты из учебно-методического пособия к лабораторным занятиям, составленного Н.В. Орешковой и И.Е. Ямских (рисунок 5) [44].



Рисунок 5 –Камера для проведения вертикального электрофореза [44]

Амплификацию ядерных микросателлитных локусов лиственницы сибирской проводили при режиме ПЦР с «touchdown» – последовательным снижением температуры в циклах, что уменьшает уровень неспецифической амплификации (таблица 4) [45].

Отобранные SSR-маркеры в дальнейшем использовались для исследования полиморфизма выборок из пяти популяций лиственницы сибирской. Для них были рассчитаны основные параметры для оценки уровня

генетического разнообразия, популяционной структуры и степени генетической подразделенности популяций.

Таблица 4 – Программа ПЦР амплификации для *L. sibirica*

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

### 3.5 Оценка показателей генетического разнообразия

Для оценки уровня генетического разнообразия были рассчитаны следующие параметры: среднее число аллелей на локус ( $N_A$ ), средняя наблюдаемая ( $H_o$ ) и ожидаемая гетерозиготности ( $H_e$ ), 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 [46]. Коэффициент инбридинга особей в субпопуляциях ( $F_{IS}$ ) был рассчитан по формуле:

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

где  $H_o$  – наблюдаемая гетерозиготность;

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

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

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_{\bar{e}}}{H_T}, \text{ в которой } H_T = 1 - \sum \bar{p}_i^2, \quad (4)$$

где  $H_{\bar{e}}$  – то же, что и в формуле (3);

$H_T$  – общая ожидаемая гетерозиготность в подразделённой популяции как в целом при случайном спаривании особей;

$\bar{p}_i$  – средняя частота  $i$ -го аллеля.

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

$$F_{IT} = F_{IS} + (1 - F_{IS})F_{ST}, \quad (5)$$

где  $F_{IS}$  – то же, что и в формуле (3);

$F_{ST}$  – то же, что и в формуле (4).

Для оценки генетической дифференциации популяций были также рассчитаны коэффициенты межпопуляционной дифференциации – стандартизированный М. Неем ( $G'_{ST}N$ ), стандартизированный Ф. Хедриком ( $G'_{ST}H$  и  $G''_{ST}$ ) и установленный Л. Джостом ( $Dest$ ) [47, 48, 49, 50]. Коэффициент межпопуляционной дифференциации, стандартизированный М. Неем ( $G'_{ST}N$ ), был рассчитан по формуле:

$$G'_{ST}N = \frac{k(cH_T - cH_{\bar{e}})}{kcH_T - cH_{\bar{e}}} \quad (6)$$

где  $cH_{\bar{e}}$  – скорректированное  $H_{\bar{e}}$  то же, что и в формуле (3);

$cH_T$  – скорректированное  $H_T$  то же, что и в формуле (4);

$k$  – число выборок.

Расчёт коэффициентов межпопуляционной дифференциации, стандартизированные  $\Phi$ . Хедриком ( $G'_{ST}H$  и  $G''_{ST}$ ), производился по формулам:

$$G'_{ST}H = \frac{Gst(k-1+cH_{\bar{e}})}{(k-1)(1-cH_{\bar{e}})}, \text{ в которой } G_{ST} = 1 - cH_{\bar{e}} / cH_T \quad (7)$$

где  $G_{ST}$  – коэффициент межпопуляционной дифференциации

$cH_{\bar{e}}$  – скорректированное  $H_{\bar{e}}$  то же, что и в формуле (3);

$cH_T$  – скорректированное  $H_T$  то же, что и в формуле (4);

$k$  – число выборок.

$$G''_{ST} = \frac{G'_{ST}N}{(1-cH_{\bar{e}})} \quad (8)$$

где  $G'_{ST}N$  – то же, что и в формуле (6);

$cH_{\bar{e}}$  – скорректированное  $H_{\bar{e}}$  то же, что и в формуле (3).

Коэффициент межпопуляционной дифференциации, установленный Л. Джостом ( $Dest$ ), рассчитывался по формуле:

$$Dest = \left( \frac{k}{k-1} \right) \left( \frac{cH_T - cH_{\bar{e}}}{1 - cH_{\bar{e}}} \right) \quad (9)$$

где  $cH_{\bar{e}}$  – скорректированное  $H_{\bar{e}}$  то же, что и в формуле (3);

$cH_T$  – скорректированное  $H_T$  то же, что и в формуле (4);

$k$  – число выборок.

Значения данных параметров, рассчитанные для каждого локуса отдельно и для каждой популяции отдельно, далее усреднялись по всем локусам и популяциям соответственно.

Количественная оценка уровня дивергенции между исследованными популяциями была определена с использованием стандартного генетического расстояния М. Нея [51] по формуле:

$$D = -\ln I_N, \text{ в которой } I_N = \frac{\sum \sum_{jk} x_{jk} y_{jk}}{\sqrt{(\sum \sum x_{jk}^2)(\sum \sum y_{jk}^2)}}, \quad (10)$$

где  $I$  — показатель генетического сходства;

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

Для наглядного представления матрицы стандартного генетического расстояния М. Нея был использован «анализ главных координат» (Principal Coordinate Analysis, PCoA) [52].

Для анализа связи между географическими и генетическими расстояниями использовали тест Мантела [53].

Расчет основных показателей для выборок пяти популяций лиственницы сибирской был проведен при помощи программы GenAlEx 6.51b2 [54].

Анализ молекулярной дисперсии (Analysis of Molecular Variance, AMOVA) также проводили с помощью программного обеспечения GenAlEx 6.51b2. Для расчёта использовали опцию Codom-Allelic, которая производит генерацию матрицы парных дистанций между аллелями размером  $2N \times 2N$  с последующим расчётом  $F_{ST(W\&C)}$  – статистики ( $F_{ST}$  по методу Weir & Cockerham) [55, 56]:

$$F_{ST(W\&C)} = \frac{\sigma_{AP}^2}{\sigma_{AP}^2 + \sigma_{AI}^2 + \sigma_{WI}^2} \quad (11)$$

где  $\sigma^2$  – варианса (дисперсия); субиндексы:

$AP$  – между субпопуляциями,

$AI$  – между индивидами,

$WI$  – внутри индивидов.

Ошибки генотипирования, возникшие из-за неамплифицированных *null-аллелей* были идентифицированы и скорректированы с помощью программы MICRO-CHECKER [57]. Данное программное обеспечение может различать отклонения от равновесия Харди-Вайнберга, вызванные *null-аллелями* от тех, что обусловлены инбридингом. Расчет для оценки частот нулевых аллелей проводился по коррекционному алгоритму, предложенному исследователем Кок Ван Остерхаут [58].

Для построения филогенетического дерева использовались пакеты *adegenet* и *poppr* в R, построение производилось методом невзвешенных парногрупповых средних (UPGMA) [59]. Филогенетическое дерево было сгенерировано на основе стандартного генетического расстояния М. Нея [51] и



5000 итераций бутстрепа. Визуализация дерева осуществлялась с помощью онлайн инструмента iTOL, версия 6 [60].

**Изъято в связи с авторскими правами с 34 по 47 стр.**

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для популяционно-генетического исследования лиственницы сибирской нами были отобраны 10 полиморфных ядерных микросателлитных локусов. Всего было выявлено 45 аллельных вариантов. Число редких аллелей в выборках варьировало от 3 до 9.

Наиболее высокие внутрипопуляционные показатели генетического разнообразия выявлены в наиболее возрастной популяции из суходольных склонов в районе озера Агаскыр ( $N_A = 3,9$ ;  $N_E = 2,302$ ;  $H_O = 0,487$ ;  $H_E = 0,492$ ). Анализ генетического полиморфизма популяций лиственницы сибирской из Республики Хакасия показал, что в целом значения основных показателей генетической изменчивости свидетельствуют о сравнительно невысоком уровне генетического разнообразия ( $N_A = 3,7$ ;  $N_E = 2,09$ ;  $H_O = 0,461$ ,  $H_E = 0,463$ ). Кроме этого, в трех популяциях выявлен дефицит гетерозиготных генотипов. Антропогенно наименее нарушенная популяция из долины реки Карыш находится ближе всего к равновесному состоянию ( $F_{IS} = -0,008$ ).

Анализ популяционной структуры *Larix sibirica* показал, что в изучаемых выборках наблюдается 0,8%-ный избыток гетерозиготных генотипов относительно популяции ( $F_{IS} = -0,008 \pm 0,031$ ) и 3,4%-ный дефицит гетерозиготных генотипов ( $F_{IT} = 0,034 \pm 0,034$ ) относительно вида.

Только 4% генетического разнообразия приходится на межпопуляционную составляющую, что свидетельствует о невысокой подразделённости изученных популяций. Это подтверждается низкими значениями стандартного генетического расстояния ( $D_N$ ) Нея между популяциями (от 0,036 до 0,077). Наибольшее генетическое расстояние (0,077) было выявлено между экотопически наиболее контрастными насаждениями из заболоченной долины озера Агаскыр (болотный лиственничник) и степного ландшафта долины озера Фыркал (лиственничник саванного типа).

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

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. 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.
7. Орешкова, Н.В. Разработка микросателлитных маркеров лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) на основе полногеномного *de novo* секвенирования / Н.В. Орешкова, Ю.А. Путинцева, В.В. Шаров, Д.А. Кузьмин, К.В. Крутовский // Генетика. - 2017. - Т. 53, № 11. - С. 1278–1284.
8. Орешкова, Н.В. Разработка ядерных микросателлитных маркеров с длинными (трех-, четырех-, пяти- и шестинуклеотидными) мотивами для трёх 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.
9. Положий, А. В. Флора Красноярского края: науч. изд. / А.В. Положий, Т.П. Березовская. – Томск: Издательство Том. ун-та, 1983. –Выпуск 1. – С.48-50.
- 10.Велисевич, С. Н. Влияние климатических факторов на радиальный рост кедра и лиственницы в экотопах с различной влажностью почвы на юге Западной Сибири / С. Н. Велисевич, О. В. Хуторной //Журнал Сибирского федерального университета. Биология. – 2009. – Т. 2. – №. 1. – С. 117-132.
- 11.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.
- 12.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.
- 13.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.
- 14.Милютин, Л. И. Биоразнообразие лиственниц России / Л. И. Милютин //Хвойные бореальной зоны. – 2003. – Т. 21. – №. 1. – С. 6-9.
- 15.Дылис, Н. В. Сибирская лиственница. Материалы к систематике, географии и истории / Н. В. Дылис. – М.: МОИП, 1947. – с.75-82.
- 16.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.128-135.
- 17.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. 116-118.
- 18.Афанасьева, Л. В. Физиолого-биохимическая адаптация лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb. к условиям городской среды / Л. В. Афанасьева //Сибирский лесной журнал. – 2018. – №. 3. – С. 21-29.
- 19.Чесноков, Ю. В. Биохимические маркеры в генетических исследованиях культурных растений: применимость и ограничения/ Ю. В. Чесноков //Сельскохозяйственная биология. – 2019. – т. 54. – №. 5. – с. 863-874.
- 20.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.
- 21.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.
- 22.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.
- 23.Isoda, K. Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* / K. Isoda, A. Watanabe //Molecular Ecology Notes. – 2006. – Т. 6. – №. 3. – С. 664-666.
- 24.Khasa, P. D. Isolation, characterizatон, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch / P.D. Khasa, C.H. Newton, M.H. Rahman, B. Jaquish, B.P. Dancik //Genome. – 2000. – Т. 43. – №. 3. – С. 439-448.
- 25.Chen, C. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occidentalis* Nutt.) / C. Chen, C. Liewlaksaneeyanawin, T. Funda, A. Kenawy, C. H. Newton, Y. A. El-Kassaby //Molecular Ecology Resources. – 2009. – Т. 9. – №. 3. – С. 843-845.
- 26.Орешкова, Н. В.Генетическая дифференциация популяций лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) по микросателлитных локусам / Н.В.

- Орешкова, М.М. Белоконь //Вестник Красноярского государственного аграрного университета. – 2012. – №. 2. – С. 111-116.
27. Орешкова, Н. В. Оценка генетической изменчивости лиственницы сибирской с использованием микросателлитного анализа / Н.В. Орешкова, М.М. Белоконь // Лесной вестник/Forestry bulletin. – 2012. – №. 1 (84).
28. Васильева, Ю. С. Оценка состояния генофонда западной расы лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) Урала на основании полиморфизма микросателлитных маркеров / Ю.С. Васильева, Я.В. Сбоева, Н.В. Чертов, А.А. Жуланов // Бюллетень науки и практики. – 2019. – Т. 5. – №. 12.
29. Нечаева, Ю. С. Анализ генетического разнообразия и структуры некоторых популяций *Larix sibirica* Ledeb. На Урале с помощью SSR-маркеров / Ю. С. Нечаева, Е. В. Чумак, М. Ю. Андриянова // Симбиоз-Россия 2014. — Екатеринбург. – 2014. – С. 293-295.
30. Орешкова, Н. В. Изменчивость ядерных микросателлитных локусов у лиственниц Гмелина (*Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr.) и камчатской (*Larix kamtchatica* (Rupr.) Carr) / Н.В. Орешкова, М.М. Белоконь, С. Жамьянсурен // Хвойные бореальной зоны. – 2012. – Т. 29. – №. 1-2.
31. Орешкова, Н.В. Генетическое разнообразие, популяционная структура и дифференциация лиственниц сибирской, Гмелина и Каяндера по данным SSR-маркеров / Н.В. Орешкова, М.М. Белоконь, С. Жамьянсурен // Генетика. - 2013. - Т. 49, № 2. - С. 204-213.
32. Орешкова, Н. В. Внутривидовая генетическая дифференциация лиственницы Каяндера на северо-востоке Азии / Н. В. Орешкова // Сибирский лесной журнал. – 2014. – №. 4. – С. 92-98.
33. Орешкова, Н.В. Генетическая и фенотипическая изменчивость лиственницы Каяндера (*Larix cajanderi* Mayr.) на севере Российского Дальнего Востока / Н.В. Орешкова, В.П. Ветрова, Н.В. Синельникова // Сибирский экологический журнал. - 2015. – Т. 8, № 1. - С. 13-27.

34. Ветрова, В.П. Дифференциация популяций *Larix cajanderi* (*Pinaceae*) на востоке ареала по морфологии семенных чешуй шишек и ДНК-маркерам / В.П. Ветрова, Н.В. Орешкова, Н.В. Синельникова // Ботанический журнал. - 2016. - Т. 101, №9. - С.993-1007.
35. Кулаков, Е. Е. Генетическая изменчивость лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Džil.) в географических культурах под Воронежем / Е. Е. Кулаков, В. А. Сиволапов, Е. А. Воробьев, А. И. Сиволапов // Лесотехнический журнал. – 2018. – Т. 8. – №. 1 (29)
36. Амяга, Е. Н. Подбор ядерных микросателлитных локусов для видовой идентификации лиственницы даурской (Гмелина) и лиственницы сибирской, а также сравнение их генетических профилей для решения задач лесного хозяйства / Е. Н. Амяга, С. В. Нифонтов, А. Н. Гриднев, Н. М. Макрушин // Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада. – 2019. – №. 132. – С. 72-79.
37. Корчагин, А. А. Внутривидовой (популяционный) состав растительных сообществ и методы его изучения/ А. А. Корчагин// Полевая геоботаника. – Т.3. – М.-Л.: Наука, 1966. -С.63-131.
38. Завадский, К. М. Вид и видообразование / К. М. Завадский – Л.: Наука, 1968. – 404 с.
39. Абаимов, А.П. Лиственницы Гмелина и Каяндера/ А.П. Абаимов, И.Ю. Коропачинский. – Новосибирск, 1984. – 121 с.
40. Муратова, Е. Н. Хромосомный полиморфизм в природных популяциях лиственницы Гмелина *Larix gmelinii* (Rupr.) Rupr / Е. Н. Муратова // Цитология и генетика. – 1994. – Т. 28. – №. 4. – С. 14-22.
41. Муратова Е. Н. Кариосистематика семейства *Pinaceae* Lindl. Сибири и Дальнего Востока: специальность 03.00.05 «Ботаника»: автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук/ Муратова Елена Николаевна; Институт леса им. В.Н. Сукачева СО РАН. – Новосибирск, 1995. – 32с.



- 42.Абаимов, А.П. Современные представления о лиственницах Сибири и проблемы их изучения / А.П. Абаимов, Л.И. Милютин // Проблемы дендрологии. – Новосибирск, 1995. – С. 41–60.
- 43.Doyle, J. J. Isolation of plant DNA from fresh tissue / J. J. Doyle, J. L. Doyle // Focus. – 1990. – Т. 12, № 13. – С. 39–40.
- 44.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>
- 45.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.
- 46.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.
- 47.Nei, M. Estimation of fixation indices and gene diversities / M. Nei, R. K. Chesser //Annals of human genetics. – 1983. – Т. 47. – №. 3. – С. 253-259.
- 48.Nei, M. Definition and estimation of fixation indices / M. Nei //Evolution. – 1986. – Т. 40. – №. 3. – С. 643-645.
- 49.Hedrick, P. W. A standardized genetic differentiation measure / P. W. Hedrick //Evolution. – 2005. – Т. 59. – №. 8. – С. 1633-1638.
- 50.Jost, L. O. U. GST and its relatives do not measure differentiation / L. O. U. Jost //Molecular ecology. – 2008. – Т. 17. – №. 18. – С. 4015-4026.
- 51.Nei, M. Genetic Distance between Populations / M. Nei // Am. Nat. — 1972. — V. 106. — P. 283–291.
- 52.Кузнецов, В. М. Сравнение методов оценки генетической дифференциации популяций по микросателлитным маркерам / В. М. Кузнецов //Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2020. – Т. 21. – №. 2. – С. 169-182.

53. Mantel, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach / N. Mantel // *Cancer research*. – 1967. – Т. 27, № 2. – С. 209–220.
54. Peakall, R. O. D. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research / R. O. D. Peakall, P. E. Smouse // *Molecular ecology notes*. – 2006. – Т. 6. – №. 1. – С. 288-295.
55. Кузнецов, В. М. Оценка генетической дифференциации популяций молекулярным дисперсионным анализом (аналитический обзор) / В. М. Кузнецов // *Аграрная наука евро-северо-востока*. – 2021. – Т. 22. – №. 2. – С. 167-187.
56. Weir, B. S. Cockerham C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure / B. S. Weir, C. C. Cockerham // *evolution*. – 1984. – С. 1358-1370.
57. 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.
58. 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.
59. Sokal, R. R. A statistical method for evaluating systematic relationships / R. R. Sokal, C.D. Michener // *Univ Kans sci bull*. – 1958. – Т. 38. – С. 1409-1438.
60. Letunic, I. Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation / I. Letunic, P. Bork // *Bioinformatics*. – 2007. – Т. 23. – №. 1. – С. 127-128.
61. Greenbaum, G. Allelic richness following population founding events—a stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift / G. Greenbaum, A. R. Templeton, Y. Zarmi, S. Bar-David // *PloS one*. – 2014. – Т. 9. – №. 12. – С. e115203.

62. Caballero, A. Allelic diversity and its implications for the rate of adaptation / A. Caballero, A. García-Dorado // *Genetics*. – 2013. – T. 195. – №. 4. – C. 1373-1384.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

### Протокол выделения ДНК

Приготовление СТАВ – буфера (рН 8,0 – 8,1) для выделения ДНК: СТАВ (10 г) + трис (6,06 г) + хлорид натрия (40,9 г) + ЭДТА (3,72 г) + дистиллированная вода (довести объем до 500 мл).

1. Образцы хвои перетираются в фарфоровой ступке пестиком, далее помещаются в стерильные пробирки Эппендорф 1,5 мл.
2. Далее к образцам добавляют 600 мкл СТАВ и инкубируют соответственно 3 часа и 30 минут при температуре 65°C, предварительно перемешав компоненты смеси на Вортексе.
3. После этого полученную смесь экстракта СТАВ центрифугируют при 10,000g в течение 20 минут и при температуре 20°C, чтобы осадить клеточный мусор. Отбирают 700 мкл супернатанта и добавляют равный объем хлороформа (700 мкл). Центрифугируют полученную смесь в течение 20 минут при 10,000g и температуре 20°C, предварительно перемешав компоненты на Вортексе. Повторяют предыдущий шаг, отбирая уже 600 мкл жидкости из верхней фракции и приливая соответственно 600 мкл хлороформа, условия центрифугирования аналогичные.
4. Отбирают 500 мкл жидкости из верхней фракции, содержащей ДНК и приливают 500 мкл изопропанола для её осаждения, далее медленно переворачивают пробирки несколько раз и оставляют смесь на 1 час при температуре -20°C, затем откручивают на центрифуге при 4°C и 10,000g 20 минут и сливают супернатант, сохраняя осадок.
5. Промывают осажденную ДНК с помощью 70-% этилового спирта в 3 этапа: добавляют к осадку 700 мкл этилового спирта, смешивают компоненты на Вортексе и центрифугируют в течение 15 минут при температуре 20°C и 10,000g, после этого жидкость аккуратно сливают, оставляя осадок, затем повторяют предыдущий шаг дважды, используя уже 500 мкл этилового спирта.

6. Далее пробирки с осадком оставляют на несколько часов для полного испарения спирта. При исчезновении запаха спирта из пробирки и отсутствии капель влаги на стенках пробирки, считают образец сухим и растворяют его в 50 мкл деионизированной воды при 40 °С 40 мин на шейкере при 1 000 об./мин при периодическом встряхивании на Вортексе (2–3 раза).
7. В завершении выделения ДНК анализируют её целостность и наличие высокомолекулярной фракции с помощью горизонтального электрофореза в 2% -ном агарозном геле. Образцы ДНК хранят в морозильной камере при – 20 °С.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

### Протокол проведения вертикального электрофореза в 6-% полиакриламидном геле

При проведении вертикального электрофореза в 6-% полиакриламидном геле используются следующие растворы для приготовления полиакриламидного геля (ПААГ), электродного буфера и окраски для выявления ДНК:

#### **АКА 30 % (1 000 мл)**

NN-метиленабисакриламид (1,5 г) + акриламид 2К (28,5 г) + дистиллированная вода (довести объем до 1 000 мл). Компоненты необходимо растворять на водяной бане. Хранить при комнатной температуре.

#### **ПСА 10 % (10 мл)**

Персульфат аммония (1 г) + дистиллированная вода (довести объем до 10 мл). Хранить в холодильнике в плотно закрытой таре не более 3-х дней.

#### **Бромистый этидий (1 000 мл)**

Исходный раствор бромистого этидия 1% (1 мл) + дистиллированная вода (довести объем до 1000 мл).

#### **10X ТБЕ (1 000 мл)**

Трис (108 г) + EDTA (7,4 г) + борная кислота (55 г) + дистиллированная вода (довести объем до 1000 мл).

1. Стекла для заливки сложить попарно, проложив с боков спейсерами, а снизу – узкой полоской фильтровальной бумаги, сложенной в несколько раз. Скрепить получившийся «сэндвич» зажимами с боков.
2. Приготовить смесь для заливки геля на 4 стекла: в мерный цилиндр на 150 мл налить 15 мл раствора ТБЕ × 10, 30 мл АКА 30 % и довести объем до 100 мл дистиллированной водой. Затем добавить 150 мкл ТЕМЕДа.
3. В маленький стакан отлить 25 мл основной смеси и добавить туда еще 50 мкл ТЕМЕДа. Тщательно перемешать. Добавить 250 мкл ПСА 10 %. Быстро перемешать и залить гелевую пробку на высоту 2 см от нижнего края, разделив смесь в стаканчике на 4 камеры.

4. После полимеризации пробки (3–5 мин) в основную смесь добавить 1000 мкл раствора ПСА 10 %. Перемешать. Заполнить оставшийся объем камер. Поместить в камеры гребенки для формирования лунок. Полимеризовать гель следует не менее 30 мин при комнатной температуре на свету.
5. После полимеризации геля необходимо собрать камеры и установить их в поддоны. Залить камеры буфером TBE  $\times 1$  и вынуть гребенки из геля.
6. Внести ампликоны в лунки по 2 мкл. Отступив от начала 2 лунки, внести 8 образцов, затем внести маркерную ленту (2 мкл) и следом еще 8 образцов без пропусков. При внесении каждого следующего образца необходимо промывать наконечник путем пипетирования в буфере, для внесения маркерной ленты необходимо использовать другой наконечник.
7. Накрыть камеру крышкой, присоединить электроды к камере и источнику постоянного тока. Включить источник питания в сеть. Настроить параметры для 4 стекол: напряжение – 200 В, сила тока 220 мА. Время проведения электрофореза 2,5 часа.
8. Слить электродный буфер и разобрать камеру. Отделить гель от стекол и поместить его в окрашивающий раствор 1%-ного бромистого этидия на 5 минут. Затем промыть гель водой.
9. Визуализацию продуктов амплификации проводить в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора. Сфотографировать полученные электрофореграммы.

Министерство науки и высшего образования РФ  
Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»  
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии  
Кафедра геномики и биоинформатики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 И. Е. Ямских

« 23 » июня 20 23 г.

## МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Генетический полиморфизм лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.)  
в контрастных экотопах Республики Хакасия

06.04.01 — Биология

06.04.01.06 — Геномика и биоинформатика

Научный руководитель



доц., к. б. н.

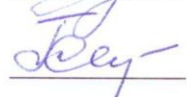
Орешкова Н.В.

Выпускник



Стенина Я.В.

Рецензент



в.н.с., д.б.н.

Седельникова Т.С.