

УДК 575.174.2:582.475.4

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ ДВУХ МУЛЬТИПЛЕКСОВ ЯДЕРНЫХ МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ ЛОКУСОВ ДЛЯ АНАЛИЗА ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ПОПУЛЯЦИЙ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ИЗ РАЗНЫХ ЧАСТЕЙ АРЕАЛА¹

© 2023 г. Н. В. Семериков*

Ботанический сад УрО РАН, ул. 8 Марта, д. 202а, Екатеринбург, 620144 Россия

*E-mail: semerikov2014@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2021 г.

После доработки 14.04.2022 г.

Принята к публикации 18.10.2022 г.

Мультиплексирование микросателлитных локусов (SSR) позволяет значительно уменьшить стоимость и продолжительность анализа. На основе опубликованных микросателлитов сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) нами разработано и опробовано на семи популяциях из разных частей ареала два мультиплекса из 14 локусов. Во всех популяциях выявлена генетическая изменчивость. Среднее число аллелей составило 5.78, средняя ожидаемая гетерозиготность – 0.641. Выявлена значимая межпопуляционная дифференциация на уровне 1.8%. У всех локусов средние частоты нуль-аллелей не превысили 7.1%. Результаты генетического анализа популяций подтверждают пригодность полученных мультиплексов для популяционно-генетических исследований сосны обыкновенной.

Ключевые слова: ядерные микросателлиты, мультиплексы, сосна обыкновенная, генетическая изменчивость.

DOI: 10.31857/S0024114823040095, **EDN:** XTRNLI

Ядерные микросателлиты (nSSR) являются важным инструментом исследования генетической изменчивости популяций различных организмов, в том числе видов древесных растений, благодаря возможности анализа большого числа локусов, высокой изменчивости (до нескольких десятков аллелей) и относительной дешевизны метода. Они широко применяются в исследованиях структуры популяций, генетического потока, гибридизации, а также для практических целей — контроля происхождения семян, посадочного материала, географических культур, искусственных насаждений и древесины. Кроме того, относительная простота анализа с возможностью дальнейшей автоматизации делают их практически идеальным инструментом для решения задач индивидуальной идентификации древесины для контроля ее оборота (Шуваев и др., 2020).

В то же время SSR-локусы обладают рядом свойств, которые необходимо учитывать. Отсутствие амплификации (нуль-аллели) и ошибки считывания являются существенными проблемами при использовании микросателлитного анализа (Ganea et al., 2015). Высокая скорость мутиро-

рования и, как следствие, высокая изменчивость и наличие большого числа редких аллелей может искажать характер популяционной дифференциации из-за случайной ошибки выборки. Кроме того, случайное изменение числа tandemных повторов (следствие мутационного процесса) обуславливает появление гомоплазий — независимо возникающих одинаковых аллелей, что снижает вероятность обнаружения специфичных генотипов (Robledo-Arnuncio et al., 2005). Однако два последних недостатка в значительной степени устраняются применением достаточно большого количества изменчивых микросателлитных локусов.

Для генотипирования большого объема материала по многим SSR-локусам на капиллярном автоматическом анализаторе (секвенаторе) целесообразно проведение совместной амплификации нескольких локусов в одной реакции (мультиплекс-ПЦР) и дальнейшего анализа смеси ампликонов. Данный метод позволяет значительно уменьшить стоимость и продолжительность анализа (Ganea et al., 2015).

Сосна обыкновенная — это ветроопыляемый хвойный вид с семенами, преимущественно распространяемыми ветром, и наиболее широко встречающийся среди сосен, с ареалом, прости-

¹ Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБУН Ботанический сад УрО РАН.

рающимися от юга Испании до Восточной Сибири. В составе таксона описано несколько подвигов или разновидностей и выделяются большие географические группы популяций (Правдин, 1964; Санников и др., 2012). Разработка для сосны обыкновенной ядерных SSR-локусов позволила провести ряд исследований географической структуры ее генетической изменчивости в европейской части ареала (Belletti et al., 2012; Bernhardtsson et al., 2016; Wojkiewicz et al., 2016; Toth et al., 2019). Однако данные исследования включали ограниченные географические области и основывались на использовании небольшого числа локусов (8–13), набор которых сильно различался в разных исследованиях и не включал локусы, разработанные на основе полиморфизма сосны в восточной части ареала (Fang et al., 2014). При этом для различных приложений, таких как историческая демография, филогеография, анализ происхождения, предполагающих исследование популяций сосны обыкновенной в масштабах всего ареала, требуется использование большого количества микросателлитных локусов, стабильно амплифицируемых и изменчивых на всем ареале. В настоящее время наборы локусов (панели) SSR-маркеров все еще находятся в стадии апробирования и не являются готовыми инструментами для проведения широкомасштабных популяционных исследований сосны. Работа по оптимизации панелей микросателлитных маркеров, по определению состава и количества локусов, пригодных для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной, на настоящий момент остается актуальной (Калько, Котова, 2018).

Цель нашего исследования состояла в разработке мультиплексов из ранее опубликованных ядерных SSR-локусов для сосны обыкновенной, а также в их тестировании на семи природных популяциях из Сибири, Урала и Европы.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДИКА

На начальном этапе были проверены 33 пары праймеров ядерных микросателлитных локусов, предположительно изменчивых, у сосны обыкновенной. Для этого путем электрофореза в ПААГ были проанализированы 8 образцов сосны обыкновенной из разных выборок с помощью каждой пары праймеров. Был отобран 21 изменчивый locus с устойчивой амплификацией: SsrPt_ctg4363 (Chagne et al., 2004); SPAC12.5, SPAG7.14, SPAC11.4 (Soranzo et al., 1998); lw_isotig10603, lw_isotig03088, lw_isotig04195, lw_isotig27940, lw_isotig04306, lw_isotig17679, lw_isotig06440, lw_isotig00542 (Fang et al., 2014); PtTx4001, PtTx3013, PtTx4011, PtTx3025, PtTx3107 (Auckland et al., 2002); psyl42, psyl17, psyl16, psyl2 (Sebastiani et al., 2012). Из данных локусов с использованием Multiplex Manager 1.0 (Holleley, Geerts, 2009), а

также после проверки совместной амплификации путем электрофореза в ПААГ было составлено два набора (мультиплекса). Для распознавания продуктов амплификации при анализе на автоматическом генетическом анализаторе прямые праймеры были мечены флуоресцентными красителями (табл. 1). По результатам анализа мультиплексов по восьми образцам на генетическом анализаторе локусы SPAG7.14 и PtTx3013 были исключены из мультиплексов по причине слабой амплификации первого и отсутствия изменчивости во втором. Все остальные локусы были проверены на кодоминантное наследование аллелей путем анализа их распределения в хвое и в пяти гаплоидных мегагаметофитах семян у каждого из восьми деревьев сосны обыкновенной из одной выборки. Все локусы подтвердили кодоминантное наследование аллелей. При проведении дальнейшего анализа с использованием мультиплексов из них были исключены локусы lw_isotig17679 и PtTx3107 по причине отклонения частот генотипов от соотношения Харди-Вайнберга, а также большой частоты встречаемости нуль-аллелей почти во всех выборках для данных локусов. При амплификации с парой праймеров lw_isotig06440 выявлены два изменчивых участка, кодируемых независимо наследуемыми локусами, обозначенных как lw06440a и lw06440b. Для четырех использованных локусов (SPAC11.4, lw06440a, psyl17, PtTx4001) не удалось получить корректные результаты, поэтому в анализе они не представлены. Таким образом, в дальнейшие исследования включены 14 изменчивых локусов. Окончательный состав мультиплексов приведен в табл. 1.

ПЦР для мультиплексов проводили в 10 мкл, содержащих 10 X ПЦР буфер AS (ООО “СибЭнЗайм”, Россия) – 1 мкл, MgCl₂ (раствор 25 mM) – 1.6 мкл, DMSO – 0.1 мкл, смесь dNTP (раствор по 10 mM каждого) – 0.2 мкл, Taq-полимераза (5 U/мкл, СибЭнЗайм) – 0.1 мкл, праймеры (раствор 10 μM) – от 0.067 до 0.8 мкл, ДНК-образца – 1 мкл. Остальной объем составляет вода. Для обоих мультиплексов использована следующая программа ПЦР: предварительная денатурация 94°C – 5 мин, 35 циклов амплификации: 94°C – 30 с, 58°C – 3 мин., 72°C – 45 с, финальная элонгация 72°C – 30 мин.

Так как температура отжига не у всех праймеров, представленных в литературных источниках, была близка к 58°C, для некоторых локусов с помощью Primer3 (Untergasser et al., 2012) праймеры были разработаны заново для температуры отжига, близкой к оптимальной температурой отжига 58°C. В окончательный состав мультиплексов вошел один такой locus lw_isotig03088 (F: TGTTTTTCCTGCATGCTGTT, R: GCATCTTGAAGCGTTTCTT).

Анализ образцов ДНК с использованием мультиплексов проводился на автоматическом

Таблица 1. Характеристика использованных в мультиплексах микросателлитных локусов сосны обыкновенной

Локусы	Мульти-плекс	Флуоресцентный краситель	Концентрация праймеров (μM)	Количество аллелей	Диапазон длин аллелей (п. н.)
lw_isotig04306	1	6-FAM	0.067	7	183–204
SsrPt_ctg4363	1	TAMRA	0.40	10	95–111
lw_isotig00542	1	ROX	0.60	3	283–310
lw_isotig10603	1	R6G	0.067	6	193–207
lw_isotig27940	1	6-FAM	0.10	24	225–265
psyl2	1	ROX	0.60	8	204–216
PtTx3025	1	R6G	0.40	10	268–303
SPAC12.5	1	R6G	0.10	27	128–184
lw06440b	2	6-FAM	0.60	6	368–398
lw_isotig03088	2	R6G	0.10	2	198–206
lw_isotig04195	2	TAMRA	0.20	4	189–198
psyl16	2	6-FAM	0.60	13	197–212
psyl42	2	TAMRA	0.10	5	171–181
PtTx4011	2	ROX	0.60	7	260–282

Таблица 2. Географические координаты и параметры изменчивости семи исследованных популяций сосны обыкновенной по данным анализа 14 ядерных микросателлитных локусов

№	Популяции	Широта с. ш.	Долгота в. д.	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{is}	HW_d
1	Словакия	48°40′	19°42′	11	4.929	3.238	0.597	0.653	0.089	**
2	Таллин	59°23′	24°38′	37	7.429	3.960	0.613	0.673	0.107*	**
3	Кумарья	58°27′	63°19′	8	4.571	3.064	0.634	0.640	0.011	нз
4	Екатеринбург	56°47′	60°33′	24	6.500	3.862	0.661	0.660	0.017	*
5	Тюмень	57°06′	65°30′	25	6.286	3.467	0.619	0.624	0.015	*
6	Йошкар-Ола	56°36′	47°56′	21	6.071	3.751	0.618	0.660	0.090*	**
7	Якутия	62°03′	129°37′	24	4.643	2.946	0.551	0.577	0.046	нз
	Среднее (общее)			21.3	5.776	3.470	0.613	0.641	0.060*	**

Примечание. N – величина выборки, N_a – среднее число аллелей, N_e – эффективное среднее число аллелей, H_o – наблюдаемая гетерозиготность, H_e – ожидаемая несмешанная гетерозиготность, F_{is} – коэффициент инбридинга (*значимо при P (произвольное F_{is}) $\geq$ наблюдаемое F_{is}) < 0.05), HW_d – тест Харди-Вайнберга на дефицит гетерозигот (нз – не значимо; *значимо при $P < 0.05$, ** $P < 0.005$).

генетическом анализаторе НАНОФОР 05 (ИАП РАН, Россия) с применением размерного стандарта S550 (меченый DY-631) (ООО “ГОРДИЗ”, Россия). Генотипирование осуществлялось в программе GeneMapper™ v. 4.0 (Applied Biosystems, США). Переведенные в данной программе в числовую форму результаты в виде длин аллелей в п. н. были подвергнуты обработке в макросе для Microsoft Excel GenAlEx 6.502 (Peakall, Smouse, 2012) для получения основных генетических параметров и экспорта данных в другие программы. Коэффициенты инбридинга и общая генетическая дифференциация были подсчитаны в ARLEQUIN 3.5 (Excoffier, Lischer, 2010). Тесты Харди-Вайнберга на дефицит и избыток гетерозигот и на

отклонение от соотношения Харди-Вайнберга были произведены в Genepop 4.7.5. (Rousset, 2008) с помощью точного теста Фишера, используя цепи Маркова (Guo, Thompson, 1992) Частоты нуль-аллелей были оценены в программе FreeNA (Chapuis, Estoup, 2007).

Всего было проанализировано 150 индивидуумов сосны обыкновенной из 7 популяций Сибири, Урала и Европы (табл. 2).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Диапазон длин выявленных аллелей у локусов в основном соответствовал ранее полученным данным (Soranzo et al., 1998; Auckland et al., 2002;

Таблица 3. Общая характеристика изменчивости 14 ядерных микросателлитных локусов

Локус	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{st}	F_{is}	N_0	HW_d
lw_isotig04306	150	4.43	3.01	0.702	0.676	0.023	-0.018	0.002	нз
SsrPt_ctg4363	150	6.00	3.02	0.590	0.686	0.030	0.089	0.040	нз
lw_isotig00542	147	2.29	1.65	0.330	0.403	0.005	0.260*	0.071	*
lw_isotig10603	150	4.29	2.46	0.627	0.603	0.026	-0.032	0.005	нз
lw_isotig27940	150	13.57	8.56	0.896	0.901	0.040	0.006	0.015	нз
psyl2	148	4.43	1.85	0.518	0.470	0.017	-0.041	0.004	нз
PtTx3025	149	5.86	2.90	0.573	0.656	0.042	0.128*	0.063	**
SPAC12.5	149	13.57	9.02	0.803	0.906	0.051	0.149*	0.049	**
lw06440b	147	4.29	2.69	0.585	0.643	0.017	0.114*	0.042	*
lw_isotig03088	150	2.00	1.93	0.618	0.494	0.030	-0.211	0.010	нз
lw_isotig04195	150	3.71	1.97	0.476	0.484	0.048	0.006	0.029	нз
psyl16	149	7.14	3.84	0.649	0.746	0.067	0.143*	0.056	**
psyl42	149	3.86	2.64	0.604	0.628	0.080	0.018	0.004	нз
PtTx4011	149	5.43	3.03	0.614	0.678	0.059	0.154*	0.048	**

Примечание. N — суммарное число проанализированных деревьев по данному локусу, N_a — среднее число аллелей, N_e — эффективное среднее число аллелей, H_o — наблюдаемая гетерозиготность, H_e — ожидаемая несмещенная гетерозиготность, F_{st} — индекс генетической дифференциации, F_{is} — общий коэффициент инбридинга (*значимо при P (произвольное F_{is}) $\geq$ наблюдаемое F_{is}) < 0.05), N_0 — средняя частота нуль-аллелей, HW_d — тест Харди-Вайнберга на дефицит гетерозигот (нз — не значимо; * значимо при $P < 0.05$; ** $P < 0.005$).

Chagne et al., 2004; Sebastiani et al., 2012; Fang et al., 2014). Количество выявленных аллелей в локусах варьировало от 2 до 27 (табл. 1), что соответствует либо превышает ранее установленные для них значения (Soranzo et al., 1998; Sebastiani et al., 2012; Fang et al., 2014; Wojkiewicz et al., 2016; Шуваев и др., 2020).

Среднее число аллелей в популяциях составило 5.78. Среднее эффективное число аллелей составило 3.47. Ожидаемая несмещенная гетерозиготность (H_e) в популяциях варьировала от 0.577 до 0.673 со средним значением 0.641 (табл. 2), что близко к значениям, ранее выявленным у сосны обыкновенной по ядерным микросателлитам (Belletti et al., 2012; Bernhardsson et al., 2016; Wojkiewicz et al., 2016; Toth et al., 2019; Шуваев и др., 2020).

Среднее по популяциям число аллелей составило от 2.00 для локуса lw_isotig03088 до 13.57 для локусов lw_isotig27940 и SPAC12.5 (табл. 3). Ожидаемая гетерозиготность для отдельных локусов по всем популяциям была средней или высокой и составляла от 0.403 для локуса lw_isotig00542 до 0.906 для локуса SPAC12.5 (табл. 3). Наблюдаемый дефицит гетерозигот по шести локусам в целом для популяций (табл. 3), как и в большинстве популяций по совокупности локусов (табл. 2), обусловлен микродемовой структурой этих популяций, что также подтверждается высокими коэффициентами инбридинга в ряде популяций (табл. 2). В предыдущих исследованиях высокие коэффициенты инбридинга также наблюдались

как в большинстве популяций сосны обыкновенной, так и в целом у вида (Belletti et al., 2012; Bernhardsson et al., 2016; Wojkiewicz et al., 2016). При этом, по нашим данным, значимые коэффициенты инбридинга присутствуют только у локусов со значимым дефицитом гетерозигот (табл. 3). Следует отметить, что ни в одной популяции и в целом по всем популяциям не выявлено статистически значимого избытка гетерозигот. Из локусов значимый избыток гетерозигот по результатам теста Харди-Вайнберга в целом выявлен только в локусе lw_isotig03088 ($P = 0.008$).

Генетическая дифференциация (F_{st}) по разным локусам сильно варьировала и составляла от 0.005 для lw_isotig00542 до 0.080 для psyl42 (табл. 3). В целом выявлена невысокая, но значимая генетическая дифференциация ($F_{st} = 0.018$, $P = 0.015$), что согласуется с данными предыдущих исследований (Belletti et al., 2012; Bernhardsson et al., 2016; Wojkiewicz et al., 2016; Toth et al., 2019; Шуваев и др., 2020). Это говорит о высокой степени панмиксии популяций сосны обыкновенной в основной части ареала. Слабая генетическая дифференциация популяции, выявленная на основе данного набора локусов, а также близкие значения гетерозиготности в выборках позволяют использовать наши мультиплексы для целей идентификации генотипов сосны (в пределах популяции) в основной части ареала от Восточной Европы до Восточной Сибири.

Почти по всем локусам в большинстве популяций не выявлено отклонения частот генотипов от

Таблица 4. Генетические параметры 14 ядерных микросателлитных локусов в 7 популяциях сосны обыкновенной

Локусы	Популяции, №						
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
	N_0 ; F ; HW						
lw_isotig04306	—; —0.071	0.001; 0.012	—; —0.183	0.011; 0.072	<0.001; —0.051	—; —0.049	<0.001; —0.024
SsrPt_ctg4363	0.143; 0.398	0.021; 0.033	0.061; 0.309	<0.001; 0.136	—; —0.076	0.059; 0.155	—; —0.007
lw_isotig00542	0.070; 0.268	0.251; 0.837; **	0.103; 0.391	—; —0.314	—; —0.171	0.074; 0.358	<0.001; —0.040
lw_isotig10603	—; —0.176	0.031; 0.032	<0.001; 0.067	—; —0.324; *	0.007; 0.085	<0.001; 0.061	<0.001; 0.002
lw_isotig27940	0.061; 0.091	0.015; 0.020	<0.001; —0.032	0.033; 0.054	—; —0.018	—; —0.078	—; 0.006
psyl2	—; —0.148	0.031; 0.177	—; —0.143	<0.001; —0.116	—; —0.025	—; —0.209	<0.001; —0.076
PfTx3025	0.189; 0.500; *	<0.001; 0.038	0.030; —0.120; *	0.065; 0.152	0.092; 0.210; *	0.063; 0.110; *	<0.001; 0.015
SPAC12.5	—; —0.020	0.127; 0.273; **	<0.001; 0.075	0.062; 0.151	0.009; 0.049	0.104; 0.288; *	<0.001; 0.017
lw06440b	0.134; 0.338	0.028; 0.083	<0.001; 0.079	—; —0.010	<0.001; 0.160	0.052; 0.094	0.070; 0.185
lw_isotig03088	—; —0.273	—; —0.177	—; —0.750	—; —0.224	—; —0.546; *	0.071; 0.243	<0.001; —0.064
lw_isotig04195	0.118; 0.333	—; —0.033	—; —0.191	0.029; 0.030	—; —0.107	0.055; 0.120	—; —0.053
psyl16	0.004; 0.006	0.079; 0.191	0.072; 0.239	—; —0.026	0.096; 0.198	0.061; 0.141	0.078; 0.188
psyl42	—; 0.020	—; —0.143	0.026; 0.222	<0.001; 0.103	<0.001; 0.000	<0.001; 0.075	0.005; 0.097
PfTx4011	—; 0.000	0.099; 0.232	—; —0.063	0.038; 0.158	0.083; 0.218	—; —0.024	0.117; 0.325; *

Примечание. N_0 — частота нуль-аллелей, HW — отклонение от соотношения Харди-Вайнберга (указано только при значимости отклонения: * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$), F — коэффициент инбридинга.

соотношения Харди-Вайнберга. Только по локусу PtTx3025 отклонение наблюдалось в четырех популяциях из семи (табл. 4). В целом для популяций у всех локусов нуль-аллели встречались с низкой частотой (табл. 3). Значительные их частоты (>10%) обнаружены у половины локусов лишь в одной-двух популяциях (табл. 4). В предыдущих исследованиях по данным локусам также выявлены сходные частоты нуль-аллелей (Sebastiani et al., 2012; Bernhardsson et al., 2016; Wojkiewicz et al., 2016; Шуваев и др., 2020).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предлагаемые нами два мультиплекса из 14 ядерных микросателлитных локусов подтвердили свою пригодность для исследования генетической изменчивости и дифференциации популяций сосны обыкновенной на всем ареале. Анализ протестированных фрагментов не выявил существенных ошибок генотипирования и выпадения аллелей при совместной амплификации в мультиплексах, подтвердил их высокую изменчивость и наличие слабой дифференциации между популяциями сосны обыкновенной по данным генетическим маркерам. Количество пригодных для анализа локусов в наших мультиплексах превышает таковое в ранее разработанных мультиплексах для сосны обыкновенной (Ganea et al., 2015; Wojkiewicz et al., 2016) и позволяет проводить детальные исследования, такие как историческая демография и филогеография, а также может слу-

жить целям лесосеменного контроля, контроля посадочного материала и легальности происхождения древесины. Анализ nSSR-локусов в виде мультиплексов позволяет существенно сократить стоимость и время проведения исследования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражается благодарность директору ботанического сада УрО РАН, зав. лабораторией ПБДРиДЛ д. б. н. И.В. Петровой и зав. лабораторией молекулярной экологии растений ИЭРиЖ УрО РАН д. б. н. В.Л. Семерикову за помощь в лабораторной работе, а также анонимному рецензенту за исправления и конструктивные замечания, позволившие существенно улучшить данную статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Калько Г.В., Котова Т.М. Микросателлитные маркеры для оценки генетического разнообразия сосны обыкновенной // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства. 2018. № 3—4. С. 17—30.
- Правдин Л.Ф. Сосна обыкновенная. М.: Наука, 1964. 190 с.
- Санников С.Н., Санникова Н.С., Петрова И.В. Очерки по теории лесной популяционной биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2012. 271 с.
- Шуваев Д., Ибе А., Шерба Ю., Сухих Т., Шилкина Е., Усова Е., Лисотова Е., Репях М., Ступакова О. Разработка панели микросателлитных локусов для оценки легальности происхождения древесины сосны

- обыкновенной в Красноярском крае // Хвойные бореальной зоны. 2020. Т. 38. № 5–6. С. 297–304.
- Auckland L., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C. Conifer microsatellite handbook. Raleigh: Corporate Press, 2002. 61 p.
- Belletti P., Ferrazzini D., Piotti A., Monteleone I., Ducci F. Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy // European J. Forest Research. 2012. V. 131. № 4. P. 1127–1138.
- Bernhardsson C., Floran V., Ganea S., Garcia-Gil M. Present genetic structure is congruent with the common origin of distant Scots pine populations in its Romanian distribution // Forest Ecology and Management. 2016. V. 361. P. 131–143.
- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M., Vendramin G., Garcia V., Frigerio J.-M., Echt C. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines // Theoretical and Applied Genetics. 2004. V. 109. № 6. P. 1204–1214.
- Chapuis M.P., Estoup A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation // Molecular Biology and Evolution. 2007. V. 24. № 3. P. 621–631.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows // Molecular Ecology Resources. 2010. V. 10. № 3. P. 564–567.
- Fang P., Niu S., Yuan H., Li Z., Zhang Y., Yuan L., Li W. Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (Pinaceae) // Applications in Plant Sciences. 2014. V. 2. № 1. P. 1300057.
- Ganea S., Ranade S.S., Hall D., Abrahamsson S., García-Gil M.R. Development and transferability of two multiplexes nSSR in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) // J. Forestry Research. 2015. V. 26. № 2. P. 361–368.
- Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles // Biometrics. 1992. V. 48. P. 361–372.
- Holleley C.E., Geerts P.G. Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR // BioTechniques. 2009. V. 46. № 7. P. 511–517.
- Peakall R., Smouse P.E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update // Bioinformatics (Oxford, England). 2012. V. 28. № 19. P. 2537–2539.
- Robledo-Arnuncio J.J., Collada C., Alia R., Gil L. Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* in a Mediterranean refugial area // J. Biogeography. 2005. V. 32. № 4. P. 595–605.
- Rousset F. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux // Molecular Ecology Resources. 2008. V. 8. № 1. P. 103–106.
- Sebastiani F., Pinzauti F., Kujala S.T., González-Martínez S.C., Vendramin G.G. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. // Conservation Genetics Resources. 2012. V. 4. № 2. P. 231–234.
- Soranzo N., Provan J., Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. // Molecular Ecology. 1998. V. 7. № 9. P. 1260–1261.
- Tóth E.G., Bede-Fazekas Á., Vendramin G.G., Bagnoli F., Höhn M. 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 // Quaternary International. 2019. V. 504. P. 202–213.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. Primer3 – new capabilities and interfaces // Nucleic Acids Research. 2012. V. 40. № 15. P. e115.
- Wójcikiewicz B., Litkowiec M., Wachowiak W. Contrasting patterns of genetic variation in core and peripheral populations of highly outcrossing and wind pollinated forest tree species // AoB Plants. 2016. V. 8.

Development and Application of Two Multiplexes of Nuclear Microsatellite Loci for the Analysis of Genetic Variability of Scots Pine Populations in Different Parts of the Range

N. V. Semerikov*

Botanical Garden, Ural Branch of the RAS, 8-Marta st., 202a, Yekaterinburg, 620144 Russia

*E-mail: semerikov2014@mail.ru

Multiplexing of microsatellite loci (SSR) can significantly reduce the cost and duration of the analysis. Based on the published microsatellites of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), we developed and tested two multiplexes of 14 loci on seven populations from different parts of the range. Genetic variability was revealed in all populations. The average number of alleles was 5.78, the average expected heterozygosity was 0.641. Significant interpopulation differentiation at the level of 1.8% was revealed. In all loci, the mean frequencies of null alleles did not exceed 7.1%. The results of the genetic analysis of populations confirm the suitability of the resulting multiplexes for population genetic studies of Scots pine.

Keywords: nuclear microsatellites, multiplexes, scots pine, genetic variability.

Acknowledgements: The study has been carried out within the framework of the state contract with the Botanical Garden of the Ural Branch of the RAS.

REFERENCES

- Auckland L., Bui T., Zhou Y., Shepherd M., Williams C., Conifer microsatellite handbook, Raleigh: Corporate Press, 2002, 61 p.
- Belletti P., Ferrazzini D., Piotti A., Monteleone I., Ducci F., Genetic variation and divergence in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) within its natural range in Italy, *European J. Forest Research*, 2012, Vol. 131, No. 4, pp. 1127–1138.
- Bernhardsson C., Floran V., Ganea S., Garcia-Gil M., Present genetic structure is congruent with the common origin of distant Scots pine populations in its Romanian distribution, *Forest Ecology and Management*, 2016, Vol. 361, pp. 131–143.
- Chagné D., Chaumeil P., Ramboer A., Collada C., Guevara A., Cervera M., Vendramin G., Garcia V., Frigerio J.-M., Echt C., Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines, *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, Vol. 109, No. 6, pp. 1204–1214.
- Chapuis M.P., Estoup A., Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation, *Molecular Biology and Evolution*, 2007, Vol. 24, No. 3, pp. 621–631.
- Excoffier L., Lischer H.E.L., Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows, *Molecular Ecology Resources*, 2010, Vol. 10, No. 3, pp. 564–567.
- Fang P., Niu S., Yuan H., Li Z., Zhang Y., Yuan L., Li W., Development and characterization of 25 EST-SSR markers in *Pinus sylvestris* var. *mongolica* (Pinaceae), *Applications in Plant Sciences*, 2014, Vol. 2, No. 1, p. 1300057.
- Ganea S., Ranade S.S., Hall D., Abrahamsson S., García-Gil M.R.I., Development and transferability of two multiplexes nSSR in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.), *J. Forestry Research*, 2015, Vol. 26, No. 2, pp. 361–368.
- Guo S.W., Thompson E.A., Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles, *Biometrics*, 1992, Vol. 48, pp. 361–372.
- Holteley C.E., Geerts P.G., Multiplex Manager 1.0: a cross-platform computer program that plans and optimizes multiplex PCR, *BioTechniques*, 2009, Vol. 46, No. 7, pp. 511–517.
- Kal'ko G.V., Kotova T.M., Mikrosatellitnye markery dlya otsenki geneticheskogo raznoobraziya sosny obyknovЕННОЙ (The microsatellite markers for estimation of genetic diversity of Scots pine), *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyaistva*, 2018, No. 3–4, pp. 17–30.
- Peakall R., Smouse P.E., GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update, *Bioinformatics* (Oxford, England), 2012, Vol. 28, No. 19, pp. 2537–2539.
- Pravdin L.F., *Sosna obyknovennaya* (Scots pine), Moscow: Nauka, 1964, 191 p.
- Robledo-Arnuncio J.J., Collada C., Alia R., Gil L., Genetic structure of montane isolates of *Pinus sylvestris* in a Mediterranean refugial area, *J. Biogeography*, 2005, Vol. 32, No. 4, pp. 595–605.
- Rousset F., Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux, *Molecular Ecology Resources*, 2008, Vol. 8, No. 1, pp. 103–106.
- Sannikov S.N., Sannikova N.S., Petrova I.V., *Ocherki po teorii lesnoi populyatsionnoi biologii* (Outlines of theory of forest populational biology), Yekaterinburg: Izd-vo BS UrO RAN, 2012, 272 p.
- Sebastiani F., Pinzauti F., Kujala S. T., González-Martínez S.C., Vendramin G.G., Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L., *Conservation Genetics Resources*, 2012, Vol. 4, No. 2, pp. 231–234.
- Shuvaev D.N., Ibe A.A., Shcherba Y.E., T.V. S., Shilkina E.A., Usova E.A., Lisotova E.V., Repyakh M.V., Stupakova O.M., Razrabotka paneli yadernykh mikrosatellitnykh lokusov dlya otsenki legal'nosti proiskhozhdeniya drevesiny sosny obyknovЕННОЙ v Krasnoyarskom krae (A panel of nuclear microsatellite markers for the identification of Scots pine illegal logs on the Krasnoyarsk territory), *Khvoynye boreal'noi zony*, 2020, Vol. 38, No. 5–6, pp. 298–305.
- Soranzo N., Provan J., Powell W., Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L., *Molecular Ecology*, 1998, Vol. 7, No. 9, pp. 1260–1261.
- Tóth E.G., Bede-Fazekas Á., Vendramin G.G., Bagnoli F., Höhn M., 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, *Quaternary International*, 2019, Vol. 504, pp. 202–213.
- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G., Primer3 – new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, No. 15, P. e115.
- Wójcikiewicz B., Litkowiec M., Wachowiak W., Contrasting patterns of genetic variation in core and peripheral populations of highly outcrossing and wind pollinated forest tree species, *AoB Plants*, 2016, Vol. 8.