

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГЕНОТИПОВ БЕРЁЗЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА SSR-МАРКЕРОВ

доктор биологических наук **Т.П. Федулова**¹

доктор биологических наук **Ю.Н. Исаков**¹

кандидат биологических наук, доцент **О.М. Корчагин**^{1,2}

кандидат сельскохозяйственных наук, доцент **И.Ю. Исаков**²

кандидат биологических наук **А.М. Кондратьева**¹

младший научный сотрудник **С.Г. Ржевский**¹

1 – ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

2 – ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова»

В статье обсуждается использование микросателлитных (SSR) маркеров для оценки генетических ресурсов берёзы. Показано, что ДНК-анализ с помощью 12 микросателлитов наиболее подходит для внутривидовой дифференциации селекционно-ценных генотипов данной породы деревьев. Выявлен генетический полиморфизм у изученных генотипов берёзы по исследованным SSR локусам. Составлены мультилокусные генетические паспорта для 31 исследованного образца берёзы, позволившие на основе наличия (1) / отсутствия (0) 36 аллелей идентифицировать исследованные образцы.

Ключевые слова: берёза, *Betula*, генотипирование, микросателлиты, SSR, полиморфизм, ПЦР, паспортизация.

MOLECULAR-GENETIC DIFFERENTIATION OF GENOTYPES OF BIRCH ON THE BASIS OF SSR-MARKERS POLYMORPHISM

DSc (Biology) **T.P. Fedulova**¹,

DSc (Biology) **Y.N. Isakov**¹

PhD (Biology), Associate Professor **O.M. Korchagin**^{1,2}

PhD (Agriculture), Associate Professor **I. Y. Isakov**²

PhD (Biology) **A.M. Kondratyeva**¹

Junior Reseacher **S.G. Rzhavskiy**¹

1 – FSBI «All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology»

2 – FSBEI HE «Voronezh State University of Forestry and Technologies named after G.F. Morozov»

Abstract

The article discusses the use of microsatellite (SSR) markers for the estimation of genetic resources of birch. It is shown that DNA analysis using 12 microsatellites is most suitable for intraspecific differentiation of selectively valuable genotypes of this tree species. The genetic polymorphism in the studied birch genotypes was determined from the loci examined by SSR. Multilocus genetic passports were prepared for 31 samples of birch, which allowed (based on the presence (1) / absence (0) of 36 alleles) to identify the investigated samples.

Keywords: birch, *Betula*, genotyping, microsatellites, SSR, polymorphism, PCR, passportization.

Введение. В настоящее время методы молекулярной генетики всё шире применяются в лесном хозяйстве для оценки и мониторинга состояния лесных генетических ресурсов, управления процессами лесовосстановления, фитосанитарного мониторинга лесных насаждений и питомников, получения селекционного посадочного материала. Одной из основных задач лесного хозяйства является лесовосстановление и лесоразведение. Быстрое и качественное лесовосстановление возможно только при выполнении ряда условий, таких как использование на плантациях улучшенного посадочного материала и его надежная идентификация, в том числе и с применением молекулярно-генетических методов.

При изучении генетического популяционно-разнообразия всё чаще применяется микросателлитный метод (SSR) [1, 2], основанный на подборе эффективных маркеров, дающих большое число хорошо воспроизводимых ДНК-ампликонов. В настоящее время для исследования внутри- и межвидовой изменчивости данный метод считается наиболее информативным.

Целью исследования являлось выявление генетического полиморфизма и составление генетических паспортов селекционно-ценных образцов березы.

Обзор литературы. Микросателлитные маркеры широко применяются с целью изучения автополиплоидии и генетической структуры популяций различных видов берез [3–8]. Для вида *Betula pendula* разработана структура 23 пар праймеров, комплементарных микросателлитным локусам (L1.10, L2.2, L2.3, L2.7, L3.1, L3.3, L3.4, L4.4, L5.1, L5.4, L5.5, L7.1a, L7.3, L7.4, L7.8, L10.1, L11.1, L13.1, L021, L012, L022, L63, L52), с количеством аллелей на выходе ПЦР от 2 до 20 [9]. Из них 2 пары праймеров (для L5.4, L7.1a) были протестированы при амплификации у некоторых других видов березы (*B. pubescens* ssp. *pubescens*, *B. pubescens* ssp. *czerepanovii*, *B. nana*, *B. fruticosa*, *B. maximowicziana*, *B. alleghaniensis*) и ольхи серой (*Alnus incana*). При использовании разработанной пары праймеров для L5.4 амплификация прошла успешно у всех перечисленных видов березы и ольхи, а для L7.1a ПЦР-

продуктов не отметилось только у ольхи серой. Разработанные пары праймеров для локусов L1.10 и L3.1 опробованы на *B. pubescens* ssp. *pubescens*, *B. pubescens* ssp. *czerepanovii* и *B. nana*.

Для подвида березы пушистой *B. pubescens* ssp. *tortuosa* из трех популяционных линий разработаны и протестированы 9 пар праймеров, комплементарных микросателлитным высокополиморфным локусам (L2.3, L2.5, L3.1, L1.10, L5.4, L021, Bo.F394, Bo.F330, Bo.G182), дающим 14–42 аллеля [10].

Для вида *B. alnoides* исследовано 19 микросателлитных маркеров серии BAG [11] с 3–12 аллелями. 17 из разработанных для них пар праймеров были успешно амплифицированы у *B. luminifera*, 13 – у *B. fujianensis*.

Проведен обзор данных обо всех имеющихся в GenBank последовательностях микросателлитных маркеров березы [12]. Исследована возможность использования 52 микросателлитных пар праймеров березы для гибридизации в других родах семейства Betulaceae, при этом эффективность амплификации составила 92,3 % для рода *Betula*, 50,6 % – *Alnus*, 41,2 % – *Corylus*, 36,5 % – *Carpinus*, 34,0 % – *Ostrya* и 34,6 % – *Ostryopsis* [12, 13]. Микросателлиты применяются также при изучении происхождения и эволюционной истории берез [14–16].

Развитие молекулярно-генетических методов открыло новые методические возможности для изучения особенностей динамики популяционно-генетической структуры различных видов растений, в том числе и таких, как береза повислая и пушистая. Получаемая таким образом информация необходима при разработке стратегии сохранения генофонда и рационального использования ресурсов. На основании изложенного выше применение SSR-маркеров при исследовании генетического разнообразия популяций березы и для выявления возможных генетически детерминированных причин сокращения ее численности и деградации генофонда является актуальным направлением исследований [5].

Материалы и методы исследований

Для генетической оценки доктором биол. наук Ю.Н. Исаковым и канд. с.-х. наук И.Ю. Исаковым

отобран 31 образец селекционного ценного материала берёз в возрасте 33 лет, произрастающих в Воронежском государственном биосферном заповеднике, квартал 298 (табл. 1). Материал представлен вторым поколением, полученным при свободном опылении деревьев первого поколения (гибридов местных берёз – пушистой *Betula pubescens* Ehrh. и повислой *Betula pendula* Roth., а также потомства от свободного опыления). Наличие в тканях вегетирующих растений ингибиторов ПЦР усложняет очистку нуклеиновых кислот. По этой причине экстракция ДНК осуществлялась из только что распустившихся листьев модифицированным нами ЦТАБ-методом. Используемый метод делает возможным получение нуклеиновых кислот доста-

точно высокой степени чистоты, что позволяет на выходе ПЦР дать ампликоны, хорошо визуализируемые на электрофорезе [17]. К тому же использованный метод ниже по себестоимости по сравнению с готовыми коммерческими наборами. Для разрушения мембран растительных клеток ткани растирались пестиком в ступке с подогретым 2 % ЦТАБ-буфером (2 % СТАВ, 1,5 М NaCl, 100 мМ Tris-base, 50 мМ EDTA; pH 8.0). Клеточный гомогенат инкубировался 30 минут при 65 °С в термостате, пробирки периодически встряхивали. Затем, охладив пробирки, добавляли равный объем смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) и перемешивали содержимое.

Таблица 1

Характеристика образцов березы, отобранных для молекулярно-генетического анализа

№ образца	Инв. №	№ бирки	Вид / гибрид
1	2 (прививка)	У041730	<i>B. pendula</i> × <i>B. pubescens</i>
2	6	У041726	<i>B. pendula</i> × <i>B. pubescens</i>
3	13/7	У041729	<i>B. pendula</i> × <i>B. pubescens</i>
4	13	К281816	<i>B. pendula</i>
5	33/28 (Б-12 с/о)	К281818	<i>B. pubescens</i>
6	34/5 (Б-12 св/о)	К281819	<i>B. pubescens</i>
7	38/22 (Б-18 с/о)	К181820	<i>B. pubescens</i>
8	37/24 (Б-11 с/о)	К281814	<i>B. pubescens</i>
9	С 5	К281828	<i>B. pendula</i> × <i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
10	р/л-4	У041716	<i>Betula</i>
11	шт-1	У041702	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
12	шт-2	К191424	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
13	шт-3	К191422	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
14	шт-4	У041703	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
15	б/п-2	У041704	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
16	б/п-1	У041707	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
17	карлик	У041713	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
18	3/13 (п/к)	У041720	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
19	3/22 (б/п)	У041712	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
20	б/п	У041721	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
21	п/к-2 р	У041714	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
22	кустов. №.310	К191417	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
23	п/к-3	К191430	<i>Betula pendula</i> var. <i>carelica</i>
24	кап-5	К191419	<i>B. pubescens</i> (свободное опыление)
25	8/31 (С-30 с/о)	К191428	<i>B. pendula</i>
26	8/21 (С-30 с/о)	К191427	<i>B. pendula</i>
27	8/1 (С-30 св/о)	К191420	<i>B. pendula</i>
28	8/2 (С-30 св/о)	К191425	<i>B. pendula</i>
29	3/33 (С-31 с/о)	К191426	<i>B. pendula</i>
30	3/4 (С-31 св/о)	К191429	<i>B. pendula</i>
31	34/10 (Б-12 св/о)	К191418	<i>B. pubescens</i>

После центрифугирования в течение 15 минут (14 000 об/мин, комнатная температура) к отобранному супернатанту добавляли половину объема хлороформа, проводили центрифугирование ещё раз. Полученный супернатант отбирали в новые пробирки и для осаждения ДНК добавляли двойной объем 96 % этилового спирта. Пробирки инкубировали 30 минут в морозильной камере (-20 °С), после чего их центрифугировали 30 минут (14 000 об/мин при 4 °С). Отбирали жидкость, промывали осадок 70 % этанолом, подсушивали и растворяли в ТЕ-буфере (10 mM Tris, 1 mM EDTA; pH 8.0). Для визуализации полученного препарата ДНК и определения степени его деградации проводили электрофорез в 0,7 % агарозном геле с добавлением этидия бромидом. Полученный тотальный препарат ДНК хранили при -20 °С и использовали для проведения ПЦР. В процессе исследований нами подобрано и протестировано по 12 специфических микросателлитных локусов для видов рода *Betula* [9, 10] (табл. 2). Для праймеров каждого локуса

оптимизировали температуры отжига. Подобранные температуры отжига для микросателлитных праймеров для березы приведены в табл. 3, 4. Оптимизирован режим амплификации для берёзы: 3 минуты – предварительная денатурация при 94 °С; затем 35 циклов: 30 секунд – денатурация при 94 °С, 40 секунд – отжиг, 15–25 секунд – элонгация при 72 °С; 5 минут – окончательная элонгация при 72 °С. Также нами оптимизирован состав реакционной ПЦР-смеси (объем 20 мкл) следующего состава: 10 x ПЦР-буфер (2 мкл), смесь четырех dNTP, 2 mM (2 мкл), смесь двух праймеров, 2 μM (4 мкл), ДНК-матрица 1 мкл, Taq-полимераза 5 ед./мкл (0,3 мкл), вода 11 мкл.

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 3 % агарозном геле в горизонтальной камере Power Pac TM Universal («BIO-RAD», США) в течение 3 часов при напряжении электрического поля 60 В. Применялся однократный TBE-буфер (89mM Tris, 89mM H₃BO₃, 2mM EDTA; pH 8.0). Окрашивание осуществлялось бромидом этидия.

Таблица 2

Характеристика микросателлитных локусов березы

№ п/п	Локус	Инв. номер	Последовательность праймера (5' – 3')	Повтор	Т от- жига, °С	Число выявлен- ных аллелей	Размер ПЦР- продукта
1	L1.10	AF310856	ACGCTTTCTTGATGTCAGCCTCACCAAGTTC CTGGTGGAT	(AG) ₄ AA (AG) ₁₀	55	4	160–200
2	L2.3	AF310847	CAGTGTTTGGACGGTGAGAACGGGTGAAGT AGACGGAACT	(AG) ₁₆	55	3	190–220
3	L3.1	AF310851	CTCCTTAGCTGGCACGGACCCCTTCTTCATA AAACCCCTCAA	(CT) ₃ CC (CT) ₂ CC (CT) ₁₃ AT (CT) ₅	59	4	210–250
4	L3.4	AF310852	AACCCTCGTTTGGCTACTGAGAACAGTFACT AGTCAAACCTGAAAACC	(GTAT) ₃ (GT) ₅	55	2	250–270
5	L4.4	AF310858	TTGAGATAGACGATAGAGGTAAGCAAGGC ATTTCTCCAATTTCTT	(AG) ₁₇	55	3	250–280
6	L5.4	AF310862	AAGGGCACCTGCAGATTAGAAAAATTGCAA CAAAACGTGC	(TC) ₂₆	55	4	240–270
7	L7.1a	AF310854	GTTTTGGGTTTCCACTTCCAACCTGGTAATACC TTACCAAGCC	(CT) ₁₂ CCT T(CT) ₄	55	1	150
8	L7.3	AF310864	GGGGATCCAGTAAGCGGTATCACACGAGAG ATAGAGTAACGGAA	(GT) ₁₈ (GA) ₁₄	55	4	190–230
9	L7.4	AF310855	TGAAACGAACGGAAGAGTTGATACGCCAGA CTTTCATCCG	(GA) ₇	59	2	240–250
10	L13.1	AF310871	CACCACCACAACCACCATTAAACACCCTTTG CAACAATGA	(CA) ₃ (GA) ₁₄	55	4	80–120
11	L021	AF310877	GCCAAAAGCCAACGCTAGTAATCCTAGCCGA GAGAAGTTGC	(CT) ₁₃	59	1	190
12	Bo.F39 4	AY423608	AATGCAGCATCTCTTACCCACGCAATAATAT GGAAA	(TC) ₁₃	48	4	130–160

Визуализация полученных ампликонов проводилась на трансиллюминаторе TFP («Vilber Lourmat», Франция). Размер полученных фрагментов определялся по сравнению с ДНК-маркерами 100 bp Ladder DNA marker (100 bp – 3000 bp) («Ахуген», США) и М34 (100 bp + 50 bp) («СибЭнзим», Россия). Результаты анализа были воспроизведены на всех этапах в трёхкратной повторности.

С выделенными и очищенными ДНК исследованных генотипов березы проводился ПЦР-анализ в соответствии с программами, оптимизированными для каждой пары использованных праймеров. Результат амплификации по каждому из микросателлитных локусов приводится в виде электрофореграмм. По результатам проведенного ПЦР-анализа генотипов березы пушистой и повислой и их гибридов по 12-и SSR-маркерам 100 %-м полиморфизмом и наибольшим числом выявленных аллелей характеризуются локусы L1.10, L3.1, L7.3, L13.1, L5.4, Во.F394.

Результаты исследований и обсуждение

В локусе L1.10 обнаружено 4 ДНК-ампликона, размах варьирования длин составляет от 160 п. н. до 200 п. н. (рис. 1). Аллель 160 п. н. отмечен только у четырех образцов (No.10, 13, 14, 27). *Обозначения номеров согласно табл. 2.* В локусе L3.1 насчитывается 4 ПЦР-продукта с варьированием длин от 210 п. н. до 250 п. н. (рис. 2). Аллель 250 п. н. присутствует только у образца No.14, а аллель 230 п. н. отсутствует только у образцов No.4 и No.8. Данный микросателлитный маркер показал возможность установления полиплоидности (наличие трех аллелей 210, 230, 240 п. н. у образцов No.3 и No.7). Микросателлитный маркер Во.F394 по результатам анализа характеризуется четырьмя ДНК-фрагментами (130–160 п. н.) (рис. 3). В локусе L7.3 (рис. 4) размер четырех наблюдаемых фрагментов изменяется в пределах от 190 п. н. до 230 п. н. Фрагмент размером 190 п. н. присутствует у образцов No.26, 29, фрагмент 220 п. н. – No.7–9. Аллель 200 п. н. отмечен у всех исследованных образцов, кроме No.4, 8, 9.



Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР образцов березы (1–31) по локусу L1.10 (M – маркер молекулярных масс)

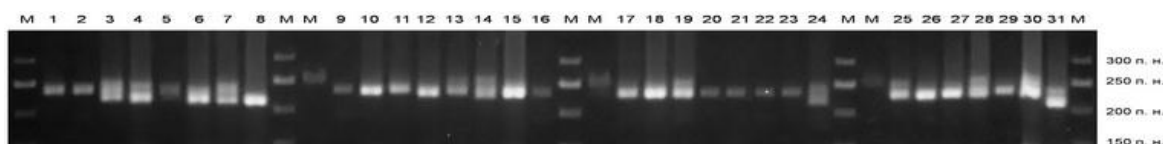


Рис. 2. Электрофореграмма продуктов ПЦР образцов березы (1–31) по локусу L3.1 (M – маркер молекулярных масс)

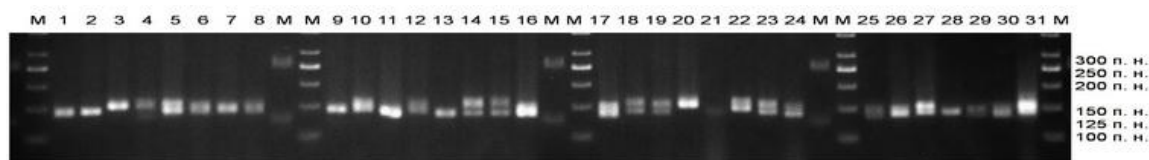


Рис. 3. Электрофореграмма продуктов ПЦР образцов березы (1–31) по локусу Во.F394 (M – маркер молекулярных масс)

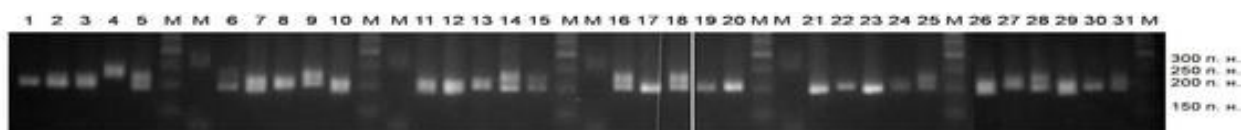


Рис. 4. Электрофореграмма продуктов ПЦР образцов березы (1–31) по локусу L7.3 (M – маркер молекулярных масс)

Локус L13.1 характеризуется четырьмя аллелями (80–120 п. н.) (рис. 5). Фрагмент 80 п. н. присутствует только у образцов No.4, 6, 8, 24, 31; 120 п. н. – только у No.1, 3, 12, 13, 15. Локус L5.4 характеризуется четырьмя аллелями (240–270 п. н.) (рис. 6). Фрагмент 240 п. н. отмечен почти у всех исследованных образцов, кроме No.1, 4, 14, 27. Аллель 260 п. н. присутствует только у образцов No.5, 6, 8, 9, 11; 270 п. н. – только у No.13, 28, 30. Перечисленные ядерные микросателлиты в наибольшей степени подходят для идентификации и паспортизации образцов березы.

Локус L2.3 характеризуется тремя аллелями (190–220 п. н.). Аллель 210 п. н. присутствует только у образцов No.1, 18–20, 23.

С использованием праймеров к локусу L4.4 ампликон 260 п. н. отмечен почти у всех исследованных образцов, кроме No.10, 19, 22, 24, 28. Аллель 250 п. н. присутствует только у образцов No.19, 20, 22–24, 28; 280 п. н. – только у No.7, 10, 31. Наименьшее количество аллелей (по 2 ДНК-фрагмента) установлено по L3.4, L7.4. В локусе L3.4 отмечено только два ампликона, 250 п. н. до 270 п. н. Уровень полиморфизма – 100 %. Микросателлит L7.4 характеризуется двумя аллелями 240 и 250 п. н. При этом аллель 240 п. н. отмечен у образцов No.4, 13, 17, а аллель 250 п. н. присутствует у всех образцов (уровень полиморфизма – 50 %). Не полиморфными и, следовательно, не информативными для исследуемых гибридов и форм берез оказались локусы L7.1a и L021, представленные одним ПЦР-продуктом (150 и 190 п. н. соответственно). Следовательно, данные праймеры не могут быть использованы для генетической дифференциации генотипов берёзы. Среди исследованных

генотипов берез всего детектировано 439 SSR-фрагментов, из которых 346 оказались полиморфными, что составляет 78,8 % ампликонов. Длина полученных продуктов варьируется от 80 до 280 п. н. Среднее число ДНК-фрагментов на локус – 36,6, максимальное – 47 (Во.F394), минимальное – 31 (L7.1a, L021). Среднее число полиморфных ампликонов на локус – 28,8, максимальное – 47 (Во.F394), минимальное – 3 (L7.4). По результатам проделанной работы выделен 31 уникальный генотип березы (из 31 исследованного образца). Для части проанализированных образцов установлены микросателлиты с уникальным аллельным составом: локус L3.1 – для образцов No.4, 8 и 14; Во.F394 – No.13, 16, 17, 20; L7.3 – No.4, 7, 8 и 9; L2.3 – No.19 и 23; L3.1 – No.15. Для генотипа No.10 выявлено сразу два маркера со специфичным набором аллелей (L1.10 и L4.4). Генотипы No.3 и No.7 существенно отличаются от других исследованных образцов наличием в локусе L3.1 трех аллелей, а между собой – по остальным локусам. Образцы No.11, 29, 30 выделяются по набору фрагментов L13.1, а между собой – по L5.4; No.22, 25, 26, 31 от других – по L5.4, между собой – по L1.10 и L13.1. Ряд исследованных генотипов возможно идентифицировать только по комбинации аллелей в двух микросателлитах: образцы No.2 и 24 – по локусам L1.10 и L2.3; No.21 – L1.10 и L4.4; No.27 – L1.10 и Во.F394; No.5 – L5.4 и L7.3; No.6 – L3.1 и L5.4; No.1 – L13.1 и L3.1; No.12 – L13.1 и Во.F394; No.18 – L2.3 и L7.3. Образец No.28 отличается от остальных только по комбинации сразу трех локусов (L4.4, L3.1, L5.4). Пример аллельного состава и шифры микросателлитных локусов исследованных генотипов берёзы представлены в табл. 3.

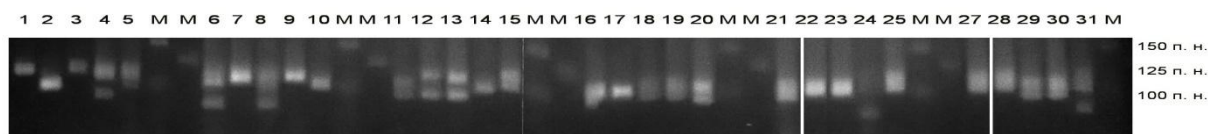


Рис. 5. Электрофореграмма продуктов ПЦР образцов березы (1–31) по локусу L13.1 (M – маркер молекулярных масс)



Рис. 6. Электрофореграмма продуктов ПЦР образцов березы (1–31) по локусу L5.4 (M – маркер молекулярных масс)

Аллельный состав микросателлитных локусов исследованных генотипов березы (п. н.)

Образец \ Локус	L1.10	L2.3	L3.1	L3.4	L4.4	L5.4	L7.1a	L7.3	L7.4	L13.1	L021	Bo.F394
1	190/190	210/210	230/230	250/270	260/260	250/250	150/150	200/200	250/250	120/120	190/190	140/140
2	170/190	190/220	230/230	270/270	260/260	240/240	150/150	200/200	250/250	100/100	190/190	140/140
3	190/190/ 190	190/220	210/230/ 240	270/270/ 270	260/260/ 260	240/240/ 240	150/150/ 150	200/200/ 200	250/250/ 250	120/120/ 120	190/190/ 190	150/150/ 150
4	190/190	190/220	210/240	250/250	260/260	250/250	150/150	230/230	240/250	80/110	190/190	150/150
5	190/190	190/190	230/230	250/250	260/260	240/260	150/150	200/230	250/250	110/110	190/190	140/150
6	190/190	190/220	210/230	250/250	260/260	240/260	150/150	200/200	250/250	80/110	190/190	140/150
7	200/200/ 200	190/190/ 190	210/230/ 240	250/250/ 250	260/280	250/250/ 250	150/150/ 150	200/220	250/250/ 250	110/110/ 110	190/190/ 190	140/140/ 140
8	170/170	190/190	210/210	250/270	260/260	240/260	150/150	220/220	250/250	80/110	190/190	140/140
9	170/190	190/190	230/230	250/270	260/260	240/260	150/150	220/230	250/250	110/110	190/190	140/140
10	160/160	190/220	230/230	270/270	280/280	240/240	150/150	200/200	250/250	100/100	190/190	140/160

По 12 исследованным SSR-маркерам составлены мультилокусные паспорта генотипов березы (табл. 3), позволяющие на основе наличия (1) / отсутствия (0) 36 аллелей идентифицировать исследованные образцы. По результатам проведенного молекулярного анализа установлено, что образцы березы повислой (*Betula pendula* Roth.) отличаются от березы пушистой (*Betula pubescens* Ehrh.) по локусам L. 3.1, L.7.3, L.1.10, L.4.4, L.5.4, L13.1 наличием или отсутствием выявленных ДНК-ампlicoнов. От березы карельской (*Betula pendula* var. *carelica*) береза повислая и пушистая различаются по локусам L.2.3, L.7.3, L.1.10, L.4.4, L.5.4.

Заключение. Таким образом, в результате проведенной работы показана возможность диагностирования индивидуальных генотипов березы на основе полиморфизма микросателлитных маркеров. Составлены мультилокусные генетические паспорта для 31 исследованного образца березы, которые позволяют проводить идентификацию и паспортизацию генотипов данного объекта. Из

анализа полученных данных следует, что для проведения молекулярно-генетической паспортизации и идентификации ценных для селекции генотипов березы предлагается применять микросателлитные локусы: L1.10, L2.3, L3.1, L3.4, L4.4, L5.4, L7.3, L7.4, L13.1 и Bo.F394 (уровень полиморфизма локусов составляет 50–100 %).

На первых этапах для анализа генетического разнообразия берез необходимо использовать ядерные микросателлитные маркеры. Они имеют двуродительское наследование, в геномах березы многочисленны, кодоминантны, вариабельны и распространены во всех частях генома. Также микросателлитные маркеры позволяют выявлять самый высокий уровень гетерозиготности.

Примечание авторов: полные мультилокусные генетические паспорта всех исследованных генотипов березы, полные шифры локусов и электрофореграммы могут быть предоставлены авторами по запросу.

Мультилокусные генетические паспорта исследованных генотипов березы (пример)

Образец Локус (п. н.)	L1.10				L2.3			L3.1				L3.4		L4.4			L5.4			
	160	170	190	200	190	210	220	210	230	240	250	250	270	250	260	280	240	250	260	270
1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
2	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
3	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
4	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
5	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
6	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0
7	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0
8	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
9	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0
10	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0

Цветом обозначены уникальные генотипы берёзы.

Библиографический список

1. Zienkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [Text] / E. Zienkiewicz, A. Rafalski, B. Labuda // Genomics. – № 20. – P. 176-183.
2. Microsatellite sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics [Text] / F. Lefort, C. Echt, R. Streiff, G. G. Vendramin // Forest Genetics. – 1999. – № 6 (1). – P. 15-20.
3. Järvinen P. Nucleotide variation of birch (*Betula* L.) species: population structure and phylogenetic relationships [Text] : PhD diss. / P. Järvinen. – Joensuu, 2004. – 138 p.
4. Изучение генетической структуры популяций карельской березы в Республике Карелии с помощью микросателлитного анализа [Текст] / Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, Н. Л. Рендаков // Проблемы объектов лесной науки: современное состояние и перспективы. – Воронеж, 2014. – С. 10–12.
5. Оценка генетического разнообразия популяций карельской березы в Карелии с помощью микросателлитных маркеров [Текст] / Л. В. Ветчинникова, А. Ф. Титов, Л. В. Топчиева, Н. Л. Рендаков // Экологическая генетика. – 2012. – Т. 10. – № 1. – С. 34–37.
6. Исаков И. Ю. Генотипирование селекционных форм лиственных древесных растений с использованием баз данных сиквенса ДНК [Текст] / И. Ю. Исаков // Проблемы объектов лесной науки: современное состояние и перспективы. – Воронеж, 2014. – С. 42–43.
7. Population history, genetic variation and conservation status of the endangered birch species *Betula nana* L. in Poland [Text] / K. A. Jadwiszczak, D. Drzymulska, A. Banaszek, P. Jadwiszczak // Silva Fennica. – 2012. – № 46 (4). – P. 465–477.
8. Genetic diversity and genetic structure of adult and buried seed populations of *Betula maximowicziana* in mixed and post-fire stands [Text] / K. Uchiyama, S. Goto, Y. Tsuda, Y. Takahashi, Y. Ide // Forest Ecology and Management. – 2006. – № 237. – P. 119–126.

9. Kulju K. K. M. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) [Text] / K. K. M. Kulju, M. Pekkinen, S. Varvio // *Molecular Ecology Notes*. – 2004. – № 4. – P. 471–473.
10. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* [Text] / C. Truong, A. E. Palmé, F. Felber, Y. Naciri-Graven // *Molecular Ecology Notes*. – 2005. – № 5. – P. 96–98.
11. Isolation and characterization of 19 microsatellite markers in a tropical and warm subtropical birch, *Betula alnoides* Buch.–Ham. ex D. Don [Text] / J. J. Guo, J. Zeng, S. L. Zhou, Z. G. Zhao // *Molecular Ecology Resources*. – 2008. – № 8 (4). – P. 895–897.
12. Gürcan K. Transferability of microsatellite markers in the Betulaceae [Text] / K. Gürcan, Sh. A. Mehlenbacher // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 2010. – № 135 (2). – P. 159–173.
13. Cross-species amplification of *Betula pendula* Roth simple sequence repeat markers in *Alnus* species [Text] / A. Zhuk, I. Veinberga, M. Daugavietis, D. Ruņģis // *Baltic Forestry*. – 2008. – № 14 (2). – P. 116–121.
14. Исаков Ю. Н. Интеграционно-эпигенетическое происхождение карельской берёзы: гипотеза и факты [Текст] / Ю. Н. Исаков, Н. М. Соустова, И. Ю. Исаков // Структурные и функциональные отклонения от нормального роста и развития растений под воздействием факторов среды. – Петрозаводск, 2011. – С. 98–103.
15. Palmé A. Evolution history and chloroplast DNA variation in three plant genera: *Betula*, *Corylus* and *Salix*. The impact of post-glacial colonisation and hybridization [Text] : Comprehensive summaries of dokt. diss. / A. Palmé. – Uppsala, 2003. – 59 p.
16. Linkage map of birch, *Betula pendula* Roth, based on microsatellites and amplified fragment length polymorphisms [Text] / M. Pekkinen, S. Varvio, K. K. M. Kulju, H. Kärkkäinen, S. Smolander, A. Viherä-Aarnio, V. Koski, M. J. Sillanpää // *Genome*. – 2005. – № 48. – P. 619–625.
17. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [Text] / J. J. Doyle, J. L. Doyle // *Phytochem Bull.* – 1987. – № 19. – P. 11–15.

References

1. Zienkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zienkiewicz, A. Rafalski, B. Labuda // *Genomics*. – № 20. – P. 176–183.
2. Microsatellite sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics / F. Lefort, C. Echt, R. Streiff, G. G. Vendramin // *Forest Genetics*. – 1999. – № 6 (1). – P. 15–20.
3. Järvinen P. Nucleotide variation of birch (*Betula* L.) species: population structure and phylogenetic relationships: PhD diss. / P. Järvinen. – Joensuu, 2004. – 138 p.
4. Изучение генетической структуры популяций карельской берёзы в Республике Карелии с помощью микросателлитного анализа / L. V. Vetchinnikova, A. F. Titov, L. V. Topchiyeva, N. L. Rendakov // *Problemy obyektov lesnoy nauki: sovremennoe sostoyanie i perspektivy*. – Voronezh, 2014. – С. 10–12.
5. Otsenka geneticheskogo raznoobraziya populyatsiy karelskoy berezy v Karelii s pomoshchyu mikrosatellitnykh markerov / L. V. Vetchinnikova, A. F. Titov, L. V. Topchiyeva, N. L. Rendakov // *Ekologicheskaya genetika*. – 2012. – Т. 10. – № 1. – С. 34–37.
6. Isakov I. Yu. *Genotipirovanie selektsionnykh form listvennykh drevesnykh rasteniy s ispolzovaniem baz dannykh sikvensov DNK* / I. Yu. Isakov // *Problemy obyektov lesnoy nauki: sovremennoe sostoyanie i perspektivy*. – Voronezh, 2014. – С. 42–43.
7. Population history, genetic variation and conservation status of the endangered birch species *Betula nana* L. in Poland / K. A. Jadwiszczak, D. Drzymulska, A. Banaszek, P. Jadwiszczak // *Silva Fennica*. – 2012. – № 46 (4). – P. 465–477.
8. Genetic diversity and genetic structure of adult and buried seed populations of *Betula maximowicziana* in mixed and post-fire stands / K. Uchiyama, S. Goto, Y. Tsuda, Y. Takahashi, Y. Ide // *Forest Ecology and Management*. – 2006. – № 237. – P. 119–126.

9. Kulju K. K. M. Twenty-three microsatellite primer pairs for *Betula pendula* (Betulaceae) / K. K. M. Kulju, M. Pekkinen, S. Varvio // *Molecular Ecology Notes*. – 2004. – № 4. – P. 471–473.
10. Isolation and characterization of microsatellite markers in the tetraploid birch, *Betula pubescens* ssp. *tortuosa* / C. Truong, A. E. Palmé, F. Felber, Y. Naciri-Graven // *Molecular Ecology Notes*. – 2005. – № 5. – P. 96–98.
11. Isolation and characterization of 19 microsatellite markers in a tropical and warm subtropical birch, *Betula alnoides* Buch.–Ham. ex D. Don / J. J. Guo, J. Zeng, S. L. Zhou, Z. G. Zhao // *Molecular Ecology Resources*. – 2008. – № 8 (4). – P. 895–897.
12. Gürcan K. Transferability of microsatellite markers in the Betulaceae / K. Gürcan, Sh. A. Mehlenbacher // *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* – 2010. – № 135 (2). – P. 159–173.
13. Cross-species amplification of *Betula pendula* Roth simple sequence repeat markers in *Alnus* species / A. Zhuk, I. Veinberga, M. Daugavietis, D. Ruņģis // *Baltic Forestry*. – 2008. – № 14 (2). – P. 116–121.
14. Isakov Yu. N. Integratsionno-epigeneticheskoye proiskhozhdeniye karelskoy berozy: gipoteza i fakty / Yu. N. Isakov, N. M. Soustova, I. Yu. Isakov // *Strukturnye i funktsionalnye otkloneniya ot normalnogo rosta i razvitiya rasteniy pod vozdeystviyem faktorov sredy*. – Petrozavodsk, 2011. – S. 98–103.
15. Palmé A. Evolution history and chloroplast DNA variation in three plant genera: *Betula*, *Corylus* and *Salix*. The impact of post-glacial colonisation and hybridisation: Comprehensive summaries of dokt. diss. / A. Palmé. – Uppsala, 2003. – 59 p.
16. Linkage map of birch, *Betula pendula* Roth, based on microsatellites and amplified fragment length polymorphisms / M. Pekkinen, S. Varvio, K. K. M. Kulju, H. Kärkkäinen, S. Smolander, A. Viherä-Aarnio, V. Koski, M. J. Sillanpää // *Genome*. – 2005. – № 48. – P. 619–625.
17. Doyle J. J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J. J. Doyle, J. L. Doyle // *Phytochem Bull.* – 1987. – № 19. – P. 11–15.

Сведения об авторах

Федулова Татьяна Петровна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», 394043, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105, т.: +7 (473) 253-71-89, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

Исаков Юрий Николаевич – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории экологической генетики ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», 394043, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105, т.: +7 (473) 253-71-89

Корчагин Олег Михайлович – директор ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105; кандидат биологических наук, доцент кафедры ботаники и физиологии растений ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова», г. Воронеж, ул. Тимирязева, 8

Исаков Игорь Юрьевич – кандидат сельскохозяйственных наук, доцент кафедры лесных культур, селекции и лесомелиорации ФГБОУ ВО «Воронежский государственный лесотехнический университет имени Г.Ф. Морозова», г. Воронеж, ул. Тимирязева, 8, e-mail: isakov@vmail.ru

Кондратьева Анна Михайловна – кандидат биологических наук, научный сотрудник ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», 394043, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105, т.: +7 (473) 253-71-89, e-mail: kondratyeva_anya@mail.ru

Ржевский Станислав Геннадьевич – младший научный сотрудник ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», 394043, г. Воронеж, ул. Ломоносова, д. 105, т.: +7 (473) 253-71-89, e-mail: molecularbiotech@mail.ru

Information about authors

Fedulova Tatiana Petrovna – Doctor of biological Sciences, leading researcher of laboratory of biotechnology, FSBI "All-Russian research Institute of forest genetics, breeding and biotechnology", 394043, Voronezh, Lomonosov street, d. 105, t: +7 (473) 253-71-89, e-mail: biotechnologiya@mail.ru

Isakov Yuri Nikolaevich – Doctor of biological Sciences, leading researcher of laboratory of ecological genetics, FSBI "All-Russian research Institute of forest genetics, breeding and biotechnology", 394043, Voronezh, Lomonosov street, d. 105, t: +7 (473) 253-71-89

Korchagin Oleg Mikhailovich – Director of FSBI "All-Russian research Institute of forest genetics, breeding and biotechnology", Voronezh, Lomonosov street, d. 105, t: +7 (473) 253-71-89; Candidate of biological Sciences, Associate Professor of the Department of botany and plant physiology, "Voronezh State Forestry Engineering University named after G. F. Morozov", Voronezh, Timiryazev str., 8

Isakov Igor Yurievich – Candidate of agricultural Sciences, Associate Professor of forest crops, selection and forest reclamation, "Voronezh State Forestry Engineering University named after G. F. Morozov", Voronezh, Timiryazev str., 8 e-mail:isakov@vmail.ru

Kondratieva Anna Mikhailovna – Candidate of biological Sciences, Researcher of the FSBI "All-Russian research Institute of forest genetics, breeding and biotechnology", 394043, Voronezh, Lomonosov street, d. 105, t: +7 (473) 253-71-89, e-mail: kondratyeva_anya@mail.ru

Rzhevskiy Stanislav Gennadyevich – Junior researcher of the FSBI "All-Russian research Institute of forest genetics, breeding and biotechnology", 394043, Voronezh, Lomonosov street, d. 105, t: +7 (473) 253-71-89, e-mail: molecularbiotech@mail.ru