

УДК 575.2:575.22:574.3
AGRIS F30

https://doi.org/10.33619/2414-2948/61/01

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПОПУЛЯЦИЙ
PINUS SYLVESTRIS L. И *LARIX SIBIRICA* LEDEB. В ПЕРМСКОМ КРАЕ
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ SNP-МАРКЕРОВ**

©**Чертов Н. В.**, ORCID: 0000-0003-0250-220X, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, super.gall@mail.ru

©**Пыстогова Н. А.**, ORCID: 0000-0003-4420-880X, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, n.pystogova9@gmail.com

©**Малышкина Е. Е.**, ORCID: 0000-0002-7251-7637, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, thelionofcintra@gmail.com

©**Нечаева Ю. И.**, ORCID: 0000-0003-0837-4149, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, ulia-2012@mail.ru

©**Боронникова С. В.**, ORCID: 0000-0002-5498-8160, д-р биол. наук, Пермский государственный национальный исследовательский университет, г. Пермь, Россия, SVBoronnikova@yandex.ru

©**Календарь Р. Н.**, ORCID: 0000-0003-3986-2460, канд. биол. наук, Республиканское государственное предприятие «Национальный центр биотехнологии», г. Нур-Султан, Казахстан, ruslan.kalendar@mail.ru

MOLECULAR GENETIC IDENTIFICATION OF POPULATIONS OF *PINUS SYLVESTRIS* L. AND *LARIX SIBIRICA* LEDEB. IN PERM KRAI USING SNP- MARKERS

©**Chertov N.**, ORCID: 0000-0003-0250-220X, Perm State University, Perm, Russia, super.gall@mail.ru

©**Pystogova N.**, ORCID: 0000-0003-4420-880X, Perm State University, Perm, Russia, n.pystogova9@gmail.com

©**Malyshkina E.**, ORCID: 0000-0002-7251-7637, Perm State University, Perm, Russia, thelionofcintra@gmail.com

©**Nechaeva Yu.**, ORCID: 0000-0003-0837-4149, Perm State University, Perm, Russia, ulia-2012@mail.ru

©**Boronnikova S.**, ORCID: 0000-0002-5498-8160, Dr. habil., Perm State University, Perm, Russia, SVBoronnikova@yandex.ru

©**Kalendar R.**, ORCID: 0000-0003-3986-2460, Ph.D., National Center for Biotechnology RSE, Nur-Sultan, Kazakhstan, ruslan.kalendar@mail.ru

Аннотация. Для отбора идентификационных SNP-маркеров и идентификации на популяционном уровне проведено изучение 5 популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L., Pinaceae) и 5 популяций западной расы лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb., Pinaceae) в Пермском крае. Для определения нуклеотидных последовательностей и отбора идентификационных SNP-маркеров в 10 популяциях двух древесных видов растений Пермского края были протестированы 13 пар праймеров к 10-ти ядерным и к 3-х хлоропластным локусам *P. sylvestris*, а также десять пар праймеров к 10 локусам потенциально адаптивно-значимых генов *L. sibirica*. Определены нуклеотидные

последовательности 3-х локусов ядерной и 3-х локусов хлоропластной ДНК *P. sylvestris*, а также 6 локусов ядерных адаптивно значимых генов *L. sibirica*. В секвенированных последовательностях двух видов растений детектировано 59 SNP-маркеров. Из этих маркеров выявлено 11 идентификационных SNP-маркеров, с достаточно высокой частотой встречаемости ($\geq 0,5$), пригодных для идентификации популяций двух хвойных видов растений.

Abstract. For the selection of identification SNP markers and identification at the population level, 5 populations of Scots pine (*Pinus sylvestris* L., Pinaceae) and 5 populations of the western race of Siberian larch (*Larix sibirica* Ledeb., Pinaceae) in the Perm Krai were studied. To determine nucleotide sequences and select identification SNP markers in 10 populations of two woody plant species of the Perm Krai, 14 pairs of nuclear and 3 pairs of chloroplast loci of *P. sylvestris*, as well as ten pairs of primers to 10 loci of potentially adaptively significant genes of *L. sibirica* were tested. Sequencing of 3 nuclear loci and 3 loci of chloroplast DNA of *P. sylvestris*, as well as 6 loci of nuclear adaptively significant genes of *L. sibirica* were sequenced. In the sequenced sequences of two plant species, 59 SNP markers were detected. Of these, 11 identification SNP markers were established, with a sufficiently high frequency of occurrence (≥ 0.5), suitable for identifying populations of two coniferous plant species.

Ключевые слова: молекулярно-генетическая идентификация, SNP-маркеры, *Pinus sylvestris* L., *Larix sibirica* Ledeb., Пермский край.

Keywords: molecular genetic identification, SNP-markers, *Pinus sylvestris* L., *Larix sibirica* Ledeb., Perm krai.

Введение

В настоящее время применение ДНК-маркирования основных лесообразующих видов растений рассматривается как основной инструмент для генетического контроля происхождения древесины и формирования современной системы управления лесонасаждениями [1]. Одной из основных для лесного хозяйства является проблема незаконной заготовки древесины и экспертного доказательства ее происхождения [2]. Генетический тест — это единственно возможный точный способ контроля древесины на всех этапах ее переработки [3–4]. Для разработки генетических маркеров необходимо провести фундаментальные исследования и поиск эффективных стабильных полиморфизмов различных структурных элементов геномов [5]. В связи с этим разрабатываются методики, базирующиеся на использовании различных молекулярных маркеров [3, 6].

Для генетического анализа выбран вид из рода *Larix* Mill., в связи с тем, что он считается наиболее распространенным во всем мире, включая и Российскую Федерацию [7]. На Урале род *Larix* представлен западной расой лиственницы сибирской *Larix sibirica* Ledeb. [8]. Одним из наиболее широко распространенных, экономически важных лесообразующих видов растений, играющих исключительно важную роль в формировании структуры и функций лесных экосистем [9], является сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), поэтому ее популяции также исследованы в Пермском крае.

SNP (Single Nucleotide Polymorphism)-маркеры относятся к наиболее полиморфному типу маркеров, поэтому они подходят для идентификации как видов, так и отдельных популяций. Кроме этого, эти маркеры обладают высоким потенциалом для автоматизации

анализа [10]. Ранее на территории Пермского края изучение древесины сосны обыкновенной на популяционном уровне с использованием SNP-маркеров не проводились. У популяций лиственницы сибирской на Урале полиморфизм SNP-маркеров уже был изучен [11–12], но не проводилась молекулярно-генетическая идентификация древесины отдельных популяций с использованием SNP-маркеров.

Цель работы — определение нуклеотидных последовательностей и отбор идентификационных SNP-маркеров для молекулярно-генетической идентификации древесины *P. sylvestris* и *L. sibirica* на популяционном уровне в Пермском крае.

Материалы и методы исследований

Молекулярно-генетический анализ древесины проведен в популяциях двух видов хвойных растений, произрастающих в Пермском крае. У *L. sibirica* исследованы популяции из Добрянского (*Pol*, 58,2998 с. ш.), Чердынского (*Che*, 60,5147 с. ш.), Красновишерского (*Krv*, 60,3264 с. ш.), Гаинского (*Gai*, 60,1739 с. ш.) и Осинского (*Osa*, 57,3430 с. ш.) районов; а у *P. sylvestris* — из Большесосновского (*BS*, 57,5317 с. ш.), Гаинского (*GN*, 60,3149 с. ш.), Пермского (*UK*, 57,6816 с. ш.), Карагайского (*KR*, 58,3360 с. ш.) и Добрянского (*PL*, 58,2998 с. ш.) районов. Среди изученных популяций лиственницы сибирской на большем географическом расстоянии (326 км) находятся популяции *Osa* и *Gai*, а на наименьшем — *Krv* и *Che* (68 км). Географически более удалены (309 км) популяции *GN* и *BS* сосны обыкновенной, а популяции *BS* и *UK* этого вида расположены на расстоянии 64 км друг от друга.

У *P. sylvestris* собраны пробы древесины с 145 деревьев из 5 популяций, а у *L. sibirica* — с 148 деревьев из 5 популяций. Для молекулярно-генетической идентификации керны были собраны с каждого из 28–30 деревьев во всех изученных 10 популяциях. ДНК выделяли по методике для растительного материала [13] с модификациями для древесины хвойных растений [14]. Качество и характеристики ДНК определяли на приборе SpectrofotometrTMNanoDrop 2000 (Thermo scientific, USA).

Для определения нуклеотидных последовательностей и отбора идентификационных SNP-маркеров в популяциях двух древесных видов растений Пермского края были протестированы 13 пар праймеров к 10 ядерным и к 3 хлоропластным локусам *P. sylvestris*, а также 10 пар праймеров к 10 локусам потенциально адаптивно-значимых генов *L. sibirica*. Определены нуклеотидные последовательности 3-х локусов ядерной и 3-х локусов хлоропластной ДНК *P. sylvestris*, а также последовательности 6 локусов ядерных адаптивно значимых генов *L. sibirica*. Нуклеотидные последовательности трех локусов ДНК у каждого вида были секвенированы, в среднем, у восьми деревьев из каждой популяции, отобранных по результатам ранее проведенного ISSR-маркирования [14].

После тестирования 13 пар праймеров к 10 ядерным и к 3 хлоропластным локусам *P. sylvestris* для идентификации популяций были отобраны 3 локуса: *trnV*, *rpl20-rps18*, *psbA-trnH*. Отобранные пары праймеров были амплифицированы с ДНК *P. sylvestris*. После тестирования десяти пар праймеров к 10 локусам потенциально адаптивно-значимых генов *L. sibirica* для идентификации популяций были отобраны 3 локуса: *4CL1-363*, *sSPcDFD040B03103-274*, *ABA-WDS*. Для амплификации локусов *L. sibirica* *4CL1-363* и *sSPcDFD040B03103-274* использовали метод гнездовой ПЦР [11]. Далее продукты амплификации разделяли электрофорезом в 2% агарозном геле и экстрагировали с использованием коммерческого набора «Цитокин» (Санкт-Петербург, Россия) для использования в реакции секвенирования.

Ферментативную очистку продуктов ПЦР проводили смесью ферментов ExoI и FAST-AP (Fermentas, Литва) в отношении 0,5:1 из расчета 1,5 мкл ферментативной смеси на 5 мкл продуктов ПЦР. Реакцию ферментативной очистки проводили, так же как и для *P. sylvestris*, в амплификаторе GeneAmp PCRSystem 9700 (Applied Biosystems, USA) по программе: 37°C — 30 мин, 80°C — 15 мин, охлаждение до 4°C.

Для реакции секвенирования нуклеотидных последовательностей *P. sylvestris* и *L. sibirica* применяли набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, USA). В качестве праймера использованы сначала прямая, а затем обратная последовательности из пары праймеров, с которой была поставлена ПЦР. Очистку продуктов реакции секвенирования от не вступивших в реакцию меченых нуклеотидов осуществляли с помощью набора BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems, USA). В исследовании использовался метод автоматического ферментативного секвенирования. Капиллярный электрофорез синтезированных последовательностей проведен в ПЦР-лаборатории кафедры ботаники и генетики растений ПГНИУ (Россия) на 24-капиллярном генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3500×L (Applied Biosystems, США) в двух направлениях.

Выявление идентификационных маркеров и обозначение линий в штрихкоде проведены в соответствии с патентом на изобретение РФ «Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений» [15].

Результаты и их обсуждение

При секвенировании нуклеотидных последовательностей двух видов хвойных растений проведено 360 прочтений и получено 240 нуклеотидных последовательностей. Общая длина секвенированной последовательности составила 114600 нуклеотидов для лиственницы сибирской и 71200 нуклеотидов для сосны обыкновенной. Длина выравнивания последовательностей варьировала от 360 у локуса *ABA-WDS* до 1395 нуклеотидов у локуса *sSPcDFD040B03103-274*. Суммарная длина проанализированной последовательности по трем локусам у каждого дерева составила 2865 нуклеотидов для *L. sibirica* и 1780 для *P. sylvestris*. Нуклеотидная последовательность локуса *4CL1-363* включала частичный сиквенс двух экзонов и полную последовательность одного интрона. Общая длина экзонов локуса *4CL1-363* составила 92,6% от всей анализируемой последовательности. В локусе *sSPcDFD040B03103-274* идентифицирована полная последовательность одного экзона, который составил 14% от всей секвенированной последовательности локуса. Локус *ABA-WDS* включал частичный сиквенс только одного экзона. Основная часть анализируемой последовательности трех локусов приходилась на экзоны (55,2%), а меньшая — на интроны и некодирующие элементы. Локус *trnV* представляет собой частичную последовательность, кодирующую транспортную РНК аминокислоты Val. В локусе *rpl20-rps18* частично расположены две кодирующие области рибосомальных белков L20 и S18, разделенные не кодирующим межгенным участком. Локус *psbA-trnH* содержит часть гена *D1 (psbA)*, кодирующего белок фотосистемы II, а также межгенный спейсер, включающий в себя ген транспортной РНК аминокислоты His (*tRNA-His*). В результате межвидового выравнивания в on-line системе BLASTN 2.2.26 было выявлено более 100 высоко гомологичных последовательностей в базе данных GenBank NCBI.

Секвенированные нуклеотидные последовательности были выровнены с аналогичными последовательностями других видов, а также между собой внутри вида. Всего было обнаружено 59 полиморфных позиций в последовательностях трех локусов. Самым

консервативным по результатам множественного выравнивания является локус *ABA-WDS*, в последовательности которого обнаружено 4 полиморфные позиции. Наибольшее число полиморфных сайтов выявлено в локусе *sSPcDFD040B03103-274* — 34 замены и одна делеция (Рисунок).

В четырех из изученных популяций *L. sibirica* обнаружены уникальные SNPs, то есть встречающиеся только в одной популяции. В трех популяциях (*Krv*, *Che*, *Pol*) выявлено по одному уникальному SNP-маркеру, а в популяции *Gai*, помимо одного SNP-маркера, выявлена делеция трех нуклеотидов, пригодная для идентификации. Частота SNPs в популяции составляла в среднем 0,300.

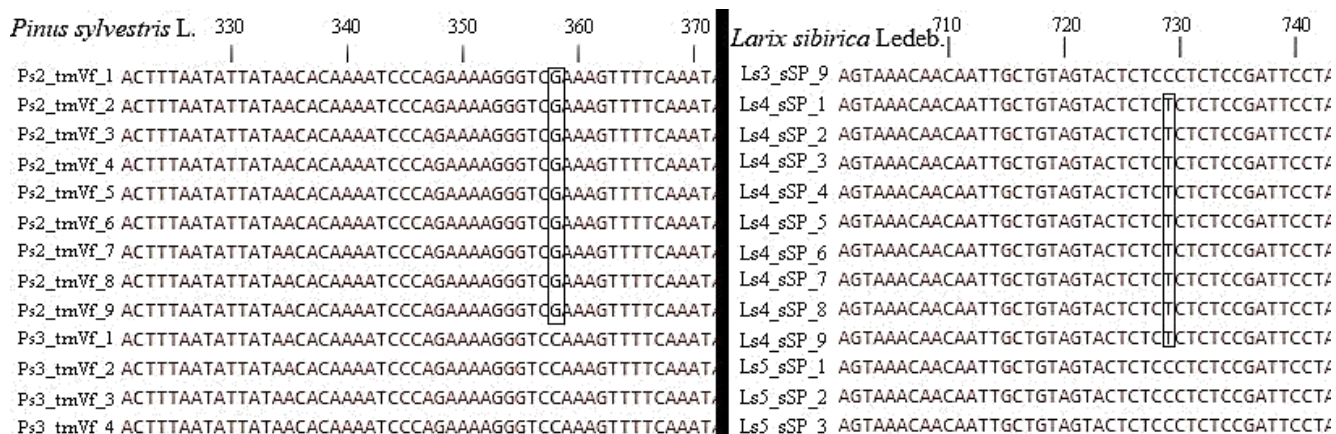


Рисунок. SNPs, выявленные при множественном выравнивании секвенированных последовательностей для сосны обыкновенной (справа) и лиственницы сибирской (слева).

Нуклеотидные последовательности *L. sibirica* общей длиной 114600 нуклеотидов внесены в мировую базу генетических данных GenBank NCBI под номерами: KT364889-KT365131 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

В секвенированных последовательностях двух видов растений детектировано 59 SNP-маркеров, из них 11 пригодны для идентификации популяций двух видов хвойных растений. В секвенированных нуклеотидных последовательностях установлены уникальные идентификационные SNP-маркеры, с достаточно высокой частотой встречаемости ($\geq 0,5$) для популяций лиственницы сибирской и популяций сосны обыкновенной (Таблица 1).

Таблица 1.
 ХАРАКТЕРИСТИКА ИДЕНТИФИКАЦИОННЫХ ПОПУЛЯЦИОННЫХ SNP-МАРКЕРОВ
 ДВУХ ВИДОВ ХВОЙНЫХ РАСТЕНИЙ ПЕРМСКОГО КРАЯ

| Локус | SNP-маркеры |
|------------------------------|---|
| <i>Larix sibirica</i> Ledeb. | |
| 4CL1-363 | <i>Krv</i> -4CL SNP1088T/A; <i>Gai</i> -4CL SNP 722A/T |
| sSPcDFD040B03103-274 | <i>Pol</i> -sSP SNP52T/A; <i>Gai</i> -sSP Del269-271TCT; <i>Gai</i> -sSP SNP729C/T; Chr-sSP SNP1185G/T |
| <i>Pinus sylvestris</i> L. | |
| trnV | BS-trnV SNP358C/G; KR-trnV SNP207A/T |
| rpl20-rps18 | BS-rps18 SNP129A/T |
| psbA-trnH | KR-trnH SNP402G/C; BS-trnH SNP289T/A |

Примечание: SNP — Single Nucleotide Polymorphism; Del — делеция.

С помощью выявленных при молекулярно-генетическом анализе идентификационных ISSR-PCR и SNP-маркеров были составлены молекулярно-генетические формулы популяций сосны обыкновенной и лиственницы сибирской. Например, популяция *L. sibirica* (Gai) может быть идентифицирована с помощью детекции однонуклеотидной замены А на Т в 722 положении гена *4CL*, при этом в записи молекулярно-генетической формулы указывается: Gai-4CL_{SNP 722A/T}. Также для идентификации этой популяции пригодна делеция трех нуклеотидов ТСТ в гене *sSP* с 269 по 271 позицию. При этом в записи молекулярно-генетической формулы указывается: Gai-sSP_{Del269-271TCT} (Таблица 2).

Таблица 2.
 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ФОРМУЛА ГАИНСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ *L. sibirica*

| Обозначение популяции | Тип фрагментов | Молекулярно-генетическая формула |
|-----------------------|----------------|--|
| Gai | vid | LS _v 420 _{CR-215} ; LS _v 290 _{CR-215} ; LS _v 255 _{CR-215} ; LS _v 190 _{CR-215} ; LS _v 550 _{ISSR-8} ; LS _v 340 _{ISSR-8} ; LS _v 600 _{M3} ; LS _v 500 _{M3} ; LS _v 370 _{X10} ; LS _v 280 _{X11} ; LS _v 220 _{X11} |
| | polimorph | GAI _u 1240 _{X11} ; GAI _u 940 _{X10} ; GAI _u 790 _{X10} |
| | SNP | Gai-sSP _{Del269-271TCT} ; Gai-sSP _{SNP729C/T} ; Gai-4CL _{SNP 722A/T} |

Примечание: LS_v — видовые маркеры, характерные для изученных популяций *L. sibirica*; GAI_u, — полиморфные ISSR-PCR маркеры или их сочетания, характерные для отдельных выборок лиственницы сибирской; vid — тип фрагмента, характерный для вида; polimorph — полиморфный тип фрагмента; SNP — Single Nucleotide Polymorphism и его обозначение — Gai-4CL_{SNP 722A/T}

С использованием SNP-маркеров наряду с ISSR-PCR маркерами составлены не только молекулярно-генетические формулы, но и штрихкоды и генетические паспорта 10 популяций двух видов хвойных растений (*P. sylvestris* и *L. sibirica*) Пермского края.

Заключение

Были протестированы 13 пар праймеров к 10 ядерным и к 3 хлоропластным локусам *P. sylvestris*, а также десять пар праймеров к 10 локусам потенциально адаптивно-значимых генов *L. sibirica*. Определены последовательности 3-х локусов ядерной и 3-х локусов хлоропластной ДНК *P. sylvestris*, а также последовательности 6 локусов ядерных адаптивно значимых генов *L. sibirica*. Проведено 360 прочтений и получено 240 нуклеотидных последовательностей. Общая длина секвенированной последовательности составила 114600 нуклеотидов для лиственницы сибирской и 71200 нуклеотидов — для сосны обыкновенной.

Для молекулярно-генетической идентификации древесины в 10 популяциях двух видов хвойных растений были отобраны три локуса потенциально адаптивно-значимых генов *L. sibirica* и три локуса хлоропластной ДНК *P. sylvestris*. Проведено секвенирование последовательностей этих локусов и выявлены 59 SNP-маркеров, из которых 11 использованы для идентификации популяций древесины двух видов хвойных растений в Пермском крае.

С использованием ISSR- и SNP-маркеров составлены молекулярно-генетические формулы, штрихкоды и генетические паспорта 10 популяций двух видов хвойных растений (*P. sylvestris* и *L. sibirica*) Пермского края.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Правительства Пермского края в рамках научного проекта №С-26/174.3 от 31.01.2019.

Список литературы:

1. Комплексная программа развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г. ВП-П8-2322. Утв. Правительством РФ 24.04.2012 г. №1853п-П8 <https://clck.ru/S9ftM>
2. Новиков П. С., Шейкина О. В. ISSR-анализ деревьев сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris*) различных селекционных категорий // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. 2012. №82. С. 1-13.
3. Degen B., Höltken A., Rogge M. Use of DNA-fingerprints to control the origin of forest reproductive material // *Silvae Genetica*. 2010. V. 59. №1-6. P. 268-273. <https://doi.org/10.1515/sg-2010-0038>
4. Vlam M., de Groot G. A., Boom A., Copini P., Laros I., Veldhuijzen K., ... Zuidema P. A. Developing forensic tools for an African timber: Regional origin is revealed by genetic characteristics, but not by isotopic signature // *Biological Conservation*. 2018. V. 220. P. 262-271. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.01.031>
5. Voronova A., Rendón-Anaya M., Ingvarsson P., Kalendar R., Ruņģis D. Comparative study of pine reference genomes reveals transposable element interconnected gene networks // *Genes*. 2020. V. 11. №10. P. 1216. <https://doi.org/10.3390/genes11101216>
6. Шилкина Е. А., Ибе А. А., Шеллер М. А., Сухих Т. В. Использование методов ДНК-анализа в экспертизе незаконного оборота древесины // *Сибирский лесной журнал*. 2019. №3. С. 64-70. <https://doi.org/10.15372/SJFS20190308>
7. Путенихин В. П., Фарукшина Г. Г., Шигапов З. Х. Лиственница Сукачева на Урале. Изменчивость и популяционно-генетическая структура. М.: Наука, 2004. 276 с.
8. Семериков В. Л., Ирошников А. И., Ласко М. Структура изменчивости митохондриальной ДНК и послеледниковая история лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.) // *Экология*. 2007. №3. С. 163-171. <https://doi.org/10.1134/S1067413607030010>
9. Тараканов В. В. Структура изменчивости, селекция и семеноводство сосны обыкновенной в Сибири: автореф. дисс. ... д-ра с.-х. наук. Новосибирск, 2003. 44 с.
10. Khlestkina E. K., Salina E. A. SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat // *Russian Journal of Genetics*. 2006. V. 42. №6. P. 585-594. <https://doi.org/10.1134/S1022795406060019>
11. Семериков В. Л., Семерикова С. А., Полежаева М. А. Нуклеотидное разнообразие и неравновесие по сцеплению потенциально адаптивно-значимых генов *Larix sibirica* // *Генетика*. 2013. Т.49, №9. С. 1055-1064. <https://doi.org/10.7868/S0016675813090075>
12. Vasilyeva Yu. S., Zhulanov A. A., Boronnikova S. V., Yanbaev Yu. A. Genetic structure of Ural populations of *Larix sibirica* Ledeb. on the base of analysis of nucleotide polymorphism // *Silvae Genetica*. 2020. V. 69. P. 20-28. <https://doi.org/10.2478/sg-2020-0004>
13. Cota-Sánchez J. H., Remarchuk K., Ubayasena K. Ready-to-use DNA extracted with a СТАВ method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue // *Plant Molecular Biology Reporter*. 2006. V. 24. №2. P. 161-167. <https://doi.org/10.1007/BF02914055>
14. Сбоева Я. В., Васильева Ю. С., Чертов Н. В., Пыстогова Н. А и др. Молекулярно-генетическая идентификация популяций сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров // *Сибирский лесной журнал*. 2020. № 4. С. 35-44. <https://doi.org/10.15372/SJFS20200405>

15. Боронникова С. В., Бобошина И. В. Способ молекулярно-генетической идентификации популяций древесных видов растений. Патент на изобретение РФ №2505956. Бюл. изобр., 2014. №4. 10 с.

References:

1. Kompleksnaya programma razvitiya biotekhnologii v Rossiiskoi Federatsii na period do 2020 g. VP-P8-2322. Utv. Pravitel'stvom RF 24.04.2012 g. no. 1853p-P8 <https://clck.ru/S9ftM>
2. Novikov, P. S., & Sheikina, O. V. (2012). ISSR Analysis of *Pinus sylvestris* Trees Appurtenant to Different Selection Categories. *Polythematic online scientific journal of Kuban State Agrarian University*, (82), 1-13. (in Russian).
3. Degen, B., Höltkén, A., & Rogge, M. (2010). Use of DNA-fingerprints to control the origin of forest reproductive material. *Silvae Genetica*, 59(1-6), 268-273. <https://doi.org/10.1515/sg-2010-0038>
4. Vlam, M., de Groot, G. A., Boom, A., Copini, P., Laros, I., Veldhuijzen, K., ... & Zuidema, P. A. (2018). Developing forensic tools for an African timber: Regional origin is revealed by genetic characteristics, but not by isotopic signature. *Biological Conservation*, 220, 262-271. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.01.031>
5. Voronova, A., Rendón-Anaya, M., Ingvarsson, P., Kalendar, R., & Ruņģis, D. (2020). Comparative study of pine reference genomes reveals transposable element interconnected gene networks. *Genes*, 11(10), 1216. <https://doi.org/10.3390/genes11101216>
6. Shilkina, E. A., Ibe, A. A., Sheller, M. A., & Sukhikh, T. V. (2019). Using methods of DNA-analysis in the examination of the illegal timber trade. *Sibirskiy Lesnoj Zurnal (Sib. J. For. Sci.)*, (3), 64-70. (in Russian). <https://doi.org/10.15372/SJFS20190308>
7. Putenikhin, V. P., Farukshina, G. G., & Shigapov, Z. Kh. (2004). Listvennitsa Sukacheva na Urale. Izmenchivost' i populyatsionno-geneticheskaya struktura. Moscow. (in Russian).
8. Semerikov, V. L., Iroshnikov, A. I., & Lascoux, M. (2007). Mitochondrial DNA Variation Pattern and Postglacial History of the Siberian Larch (*Larix sibirica* Ledeb.). *Russian Journal of Ecology*, 38(3), 147-154. <https://doi.org/10.1134/S1067413607030010>
9. Tarakanov, V. V. (2003). Struktura izmenchivosti, selektsiya i semenovodstvo sosny obyknovennoi v Sibiri: autoref. Dr. diss. Novosibirsk. (in Russian).
10. Khlestkina, E. K., & Salina, E. A. (2006). SNP markers: methods of analysis, ways of development, and comparison on an example of common wheat. *Russian Journal of Genetics*, 42(6), 585-594. <https://doi.org/10.1134/S1022795406060019>
11. Semerikov, V. L., Semerikova, S. A., & Polezhaeva, M. A. (2013). Nucleotide Diversity and Linkage Disequilibrium of Adaptive Significant Genes in *Larix* (Pinaceae). *Russian Journal of Genetics*, 49(9), 915-923. (in Russian). <https://doi.org/10.7868/S0016675813090075>
12. Vasilyeva, Y. S., Zhulanov, A. A., Boronnikova, S. V., & Yanbaev, Y. A. (2020). Genetic structure of Ural populations of *Larix sibirica* Ledeb. on the base of analysis of nucleotide polymorphism. *Silvae Genetica*, 69(1), 20-28. <https://doi.org/10.2478/sg-2020-0004>
13. Cota-Sánchez, J. H., Remarchuk, K., & Ubayasena, K. (2006). Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24(2), 161-167. <https://doi.org/10.1007/BF02914055>
14. Sboeva Ya. V., Vasileva Yu. S., Chertov N. V., Pystogova N. A., Boronnikova S. V., Kalendar R. N., Martynenko N. A. (2020). Molecular genetic identification of Scots pine and Siberian larch populations in Perm Krai based on polymorphism of ISSR-PCR markers. *Sibirskiy Lesnoj Zurnal (Sib. J. For. Sci.)*, (4), 35-44. (in Russian). <https://doi.org/10.15372/SJFS20200405>

15. Boronnikova, S. V., & Boboshina, I. V. (2014). Sposob molekulyarno-geneticheskoi identifikatsii populyatsii drevesnykh vidov rastenii. Patent na izobrenie RF no. 2505956. *Byul. izobr.*, (4), 10. (in Russian).

Работа поступила
в редакцию 07.11.2020 г.

Принята к публикации
12.11.2020 г.

Ссылка для цитирования:

Чертов Н. В., Пыстогова Н. А., Малышкина Е. Е., Нечаева Ю. И., Боронникова С. В., Календарь Р. Н. Молекулярно-генетическая идентификация популяций *Pinus sylvestris* L. и *Larix sibirica* Ledeb. в Пермском крае с использованием SNP-маркеров // Бюллетень науки и практики. 2020. Т. 6. №12. С. 14-22. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/61/01>

Cite as (APA):

Chertov, N., Pystogova, N., -Malyshkina, E., Nechaeva, Yu., Boronnikova, S., & Kalendar, R. (2020). Molecular Genetic Identification of Populations of *Pinus sylvestris* L. and *Larix sibirica* Ledeb. in Perm Krai Using SNP-markers. *Bulletin of Science and Practice*, 6(12), 14-22. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/61/01>