

УДК 575.174.015.3

## РАЗРАБОТКА ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИХ SSR-МАРКЕРОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЙ СОСНЫ КЕДРОВОЙ СИБИРСКОЙ (*PINUS SIBIRICA DU TOUR*)

© 2014 г. Е. А. Шилкина<sup>1</sup>, Н. В. Орешкова<sup>2,3</sup>, А. А. Ибе<sup>1,3</sup>,  
К. О. Дейч<sup>1,3</sup>, К. В. Крутовский<sup>3,4,5,6</sup>

<sup>1</sup> Филиал Российского центра защиты леса  
Центр защиты леса Красноярского края  
660036, Красноярск, Академгородок, 50а/2

<sup>2</sup> Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН  
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

<sup>3</sup> Сибирский федеральный университет  
Научно-образовательный центр геномных исследований  
660036, Красноярск, Академгородок, 50а/2

<sup>4</sup> Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН  
119991, ГСП-1, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>5</sup> Геттингенский университет  
Германия, 37077, Геттинген, ул. Бюсгенвег, 2

<sup>6</sup> Техасский агро-механический университет  
США, Техас, 77843, Колледж Стейшн

E-mail: helenbeauty74@mail.ru, oreshkova@ksc.krasn.ru, aaibis@mail.ru,  
kse-zhdanova@yandex.ru, kkrutovsky@gmail.com

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

Разработаны три хлоропластных и один митохондриальный ДНК-маркеры для генотипирования сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour). По результатам генотипирования 60 деревьев из двух популяций два хлоропластных локуса оказались мономорфными и один – полиморфным с двумя аллелями. Таким образом, всего для хлоропластных локусов выявлено два гаплотипа. Для митохондриального маркера также выявлено два аллеля, или гаплотипа (митотипа).

**Ключевые слова:** ПЦР, хлоропластные и митохондриальные маркеры, митотип, локус, аллель, гаплотип, сосна кедровая сибирская (*Pinus sibirica* Du Tour).

В настоящее время в лесной отрасли назрела необходимость использования современных молекулярно-генетических методов для выявления происхождения древесины при борьбе с нелегальными рубками, лесосеменного районирования и уточнения качества семенного материала при лесовосстановлении. Все более актуальными становятся методы на основе прямого генотипирования и секвенирования ДНК, активно используемые за рубежом в лесном хозяйстве.

Цель данного исследования – выявление изменчивых цитоплазматических микросателлитных локусов и разработка на их основе

маркеров (Simple Sequence Repeats, или SSR-маркеров) для сосны кедровой сибирской.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для работы использованы все доступные в базе Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) нуклеотидные сиквенсы хлоропластного и митохондриальных геномов и выборки по 30 деревьев в возрасте 40–70 лет из двух популяций сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica* Du Tour) Томской области (табл. 1). Образцы *P. sibirica* предоставлены сотрудником Института леса СО РАН А. В. Пименовым.

**Таблица 1.** Географическое расположение исследованных популяций сосны кедровой сибирской

Популяция	Район расположения	Возраст, лет
Кедр-3	Томская область, долина р. Жуковка, евтрофное болото (грубоподзолистое)	50–70
Кедр-4	Томская область, междуречье Иксы и Бакчара, олиготрофное болото	40–50

Для каждого дерева тотальная ДНК выделена из 100–200 мг высушенной хвои по стандартному протоколу для растительных тканей с применением цетилтриметиламмонийбромида (СТАВ-метод) (Devey et al., 1996). Выделенную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с пятью парами праймеров митохондриальной ДНК и девятнадцатью парами праймеров хлоропластной ДНК, которые разработаны для сосны кедровой сибирской. Для разработки праймеров использованы все доступные в базе Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) хлоропластные и митохондриальные нуклеотидные сиквенсы *Pinus sibirica*, включая почти полный сиквенс хлоропластного генома (gi|228016112|gb|FJ899558.1). С помощью программы SciRoKo (Kofler et al., 2007; <http://www.kofler.or.at/bioinformatics/SciRoKo/index.html>) выявлены микросателлитные районы и затем для них определены праймеры с помощью программы Primer3 (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Четыре микросателлитных локуса обнаружены в хлоропластном геноме и только один среди всех изученных митохондриальных генов – в интроне (*nad1*; gi|12002773|gb|AF160260.1).

Для ПЦР использовали набор реагентов GenePak PCR Core ООО «Лаборатория Изоген», содержащий *Taq*-ДНК полимеразу для «горячего старта», дезоксинуклеозидтрифосфаты и хлорид магния с конечными концентрациями 1U, 200  $\mu$ M и 2,5 mM соответственно, а также оптимизированную буферную систему.

ПЦР-амплификацию отобранных микросателлитных локусов проводили при следующем режиме: предварительная денатурация ДНК при 94 °C в течение 1 мин; далее 10 циклов, включающих 30 с плавления при 94 °C, отжиг 30 с при 63–53 °C (–1 °C на каждый цикл) и 1 мин элонгации при 72 °C; последующие 25 циклов состояли из 30 с плавления

при 94 °C, отжига 30 с при 53 °C и 1 мин элонгации при 72 °C. Завершающий цикл элонгации проходил при 72 °C в течение 10 мин (Isoda, Watanabe, 2006).

Продукты ПЦР-амплификации разделяли путем электрофореза в 6%-м полиакриламидном геле с использованием *tris*-ЭДТА-боратного электродного буфера в стандартных вертикальных камерах VE-20 (ООО «Хеликон») при напряжении 300V в течение 2,5 ч. Гели окрашивали в растворе бромистого этидия и визуализировали под УФ-светом. Относительную молекулярную массу фрагментов определяли путем сопоставления со стандартными маркерами длин, в качестве которых использовали ДНК плазмиды pBR322, обработанную рестриктазой *HpaII*.

Для амплификации обнаруженного митохондриального микросателлитного локуса синтезированы и протестированы четыре пары ПЦР праймеров.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате анализа с использованием ДНК деревьев из двух природных популяций сосны кедровой сибирской отобрана пара с наилучшей амплификацией и для этого локуса выявлено два митотипа (табл. 2). Из исследованных популяций одна оказалась фиксированной по одному митотипу.

В результате тестирования праймеров для амплификации четырех хлоропластных локусов из-за сложности амплифицированного спектра от одного локуса пришлось отказаться. Два локуса оказались мономорфными в обеих популяциях, а третий – полиморфным с двумя аллелями (табл. 3). Таким образом, всего по трем хлоропластным локусам выявлено два гаплотипа в двух популяциях сосны кедровой сибирской.

В результате проведенного исследования протестированы 24 пары ПЦР праймеров для амплификации и генотипирования одного

**Таблица 2.** Характеристика отобранного митохондриального маркера для сосны кедровой сибирской

Маркер	Количество аллельных вариантов	Размер ПЦР фрагментов	Сиквенсы форвард и реверс праймеров (5'→3')
P_sib_mt_SSR_CTAT_intron_nad1	2	236 240	AGGGGCTGTAGGTGATGATG GGCCTTGAAGGACCTTTTTC

**Таблица 3.** Характеристика отобранных хлоропластных маркеров для сосны кедровой сибирской

Маркер	Количество аллельных вариантов	Размер ПЦР фрагмента	Сиквенсы форвард и реверс праймеров (5'→3')
P_sib_chl_SSR_TTCCC_noncoding_intraspace_psbA-tRNA <sup>Lys</sup>	1	113	TCCCAGGTTTTTGGATAAGGA TCCTACTTCGGTCGGAAAGA
P_sib_chl_SSR_GTGATG_noncoding_intraspace_ycf1-rps15	1	120	TCTGATTTGATGAGGGCTGA TTCCCAAATCAAGGGTCA
P_sib_chl_SSR_AT_noncoding_intraspace_tRNA <sup>Val</sup> -rps4	2	141 143	TACGGTTCGAGCCCCTATAG CCATCGATCTCGATAAGGACA

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

митохондриального и трех хлоропластных цитоплазматических локусов специально для сосны кедровой сибирской. При увеличении числа популяций в исследовании возможно изменение количества аллелей локусов. Поэтому для дальнейшего более точного генотипирования их аллелей необходима амплификация этих цитоплазматических локусов с помощью праймеров с флуоресцентной меткой и разделение продуктов ПЦР на генетическом анализаторе (секвенаторе) на основе капиллярного электрофореза. Авторами планируется дальнейший поиск и более детальное изучение цитоплазматических маркеров для сосны кедровой сибирской и других лесобразующих пород Сибири.

- Devey M. E., Bell J. C., Smith D. N.* A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers // *Theor. Appl. Genet.* 1996. V. 92. N. 6. P. 673–679.
- Isoda K., Watanabe A.* Isolation and characterization of microsatellite loci from *Larix kaempferi* // *Mol. Ecol.* 2006. V. 6. P. 664–666.
- Kofler R., Schlötterer C., Lelley T.* SciRoKo: a new tool for whole genome microsatellite search and investigation // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. N. 13. P. 1683–1685. <http://www.kofler.or.at/bioinformatics/SciRoKo/index.html>  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>  
<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>

## Development of Cytoplasmatic SSR-Markers for Population Genetic Studies of the Siberian Stone Pine (*Pinus Sibirica Du Tour*)

E. A. Shilkina<sup>1</sup>, N. V. Oreshkova<sup>2,3</sup>, A. A. Ibe<sup>1,3</sup>, K. O. Deych<sup>1,3</sup>, K. V. Krutovsky<sup>3,4,5,6</sup>

<sup>1</sup> Branch of the Russian Centre for Forest Protection

Centre for Forest Protection of Krasnoyarsk Territory

Akademgorodok, 50a/2, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

<sup>2</sup> V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch

Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

<sup>3</sup> Siberian Federal University

Genome Research and Education Centre

Akademgorodok, 50a/2, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

<sup>4</sup> N. I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences

Gubkin str., 3, Moscow, 119333 Russian Federation

<sup>5</sup> University of Göttingen

Büsgenweg, 2, Göttingen, D-37077 Germany

<sup>6</sup> Texas A&M University

HFSB 305, 2138 TAMU, College Station, Texas, 77843 USA

E-mail: helenbeauty74@mail.ru, oreshkova@ksc.krasn.ru, aaibis@mail.ru,

kse-zhdanova@yandex.ru, kkrutovsky@gmail.com

Three chloroplast and one mitochondrial DNA markers were developed and used for genotyping of 60 trees in two populations of the Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour). Two chloroplast loci were monomorphic in both populations, and one polymorphic with two alleles. Therefore, four chloroplast haplotypes were revealed totally. A mitochondrial DNA marker had two alleles or haplotypes (mitotypes).

**Keywords:** DNA markers, PCR, chloroplast and mitochondrial markers, mitotype, locus, allele, haplotype, Siberian stone pine (*Pinus sibirica* Du Tour).