

УДК 630*575.174.015.3:582.475.4

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ВНУТРИВИДОВОЙ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ЕЛИ СИБИРСКОЙ

© 2014 г. А. К. Экарт¹, С. А. Семерикова², В. Л. Семериков²,
А. Н. Кравченко¹, О. С. Дымшакова², А. Я. Ларионова¹

¹Институт леса им. В. Н. Сукачева СО РАН
660036, Красноярск, Академгородок, 50/28

²Институт экологии растений и животных УрО РАН
620144, Екатеринбург, ул. 8 Марта, 202

E-mail: ekart@pochta.ru, s.a.semerikova@ipae.uran.ru, semerikov@ipae.uran.ru,
krava@fromru.com, dymshakova@ramber.ru, alya-larion@yandex.ru

Поступила в редакцию 31.07.2014 г.

На основании анализа изменчивости изоферментных и микросателлитных локусов ядерной и хлоропластной ДНК получены данные о степени дифференциации ряда популяций ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.), включая изолированные популяции, расположенные на о-ве Ольхон, в заповеднике Богд-Уул (Монголия) и на юге Магаданской области. Показано, что совместное использование разных типов генетических маркеров дает возможность получить более полную и объективную информацию о генетическом разнообразии и внутривидовой дифференциации этого широко распространенного в Сибири вида.

Ключевые слова: ель сибирская, изоферменты, микросателлиты ядерной и хлоропластной ДНК, генетическое разнообразие, дифференциация.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение генетического разнообразия и внутривидовой дифференциации популяций лесобразующих видов хвойных является важнейшим направлением исследований в области популяционной генетики и ботаники. До недавнего времени для получения генетической информации о процессах, происходящих в популяциях хвойных, в качестве маркеров генов использовали преимущественно изоферменты. С их помощью изучено огромное число видов хвойных, в том числе распространенных на территории нашей страны (Гончаренко, Потенко, 1991; Политов и др., 1992; Семериков и др., 1993; Krutovskii, Bergmann, 1995; Шигапов и др., 1995; Янбаев и др., 1997; Semerikov et al., 1999; Ларионова, 2002; Потенко, 2004; Шигапов, 2005; Ларионова и др., 2007; Кравченко и др., 2009; Экарт, Ларионова, 2010). Однако в последние годы в связи с разработкой специфических праймеров значительно увеличилось число генетических исследований

хвойных, в которых в качестве ДНК-маркеров используются кодоминантно наследуемые ядерные микросателлитные локусы, обнаруживающие более высокий по сравнению с изоферментными локусами уровень изменчивости. Наиболее часто микросателлиты используются в популяционных и экологических исследованиях для изучения генного течения, эффективного размера популяций, миграционных процессов, внутривидового распределения генетической изменчивости, степени дифференциации популяций (Pfeifer et al., 1997; Hodgetts et al., 2001; Scotti et al., 2002; Fluch et al., 2011 и др.). Наряду с ядерными маркерами ДНК в генетических исследованиях хвойных широкое распространение получили методы, основанные на использовании маркеров митохондриальной ДНК, наследуемой по материнской линии, и хлоропластной ДНК, наследуемой по отцовской линии (Vendramin et al., 1996; Watano et al., 1996; Tollefsrud et al., 2009; Semerikova, Lascoux, Semerikov, 2012; Meloni, Perini, Binelli, 2007; Scotti et al., 2008; Семерикова,

Семериков, 2007; Семериков и др., 2014). Достоинством маркеров митохондриальной ДНК является то, что они не только дают возможность оценить уровень генетического разнообразия, структуру и степень дифференциации популяций, но и могут успешно использоваться для изучения эволюции, филогении, анализа гибридизации и интрогрессии. Наиболее эффективно применение этих маркеров для получения информации о расселении вида. Для исследования географического распределения генетической изменчивости хвойных чаще всего применяются микросателлитные локусы хлоропластной ДНК.

Каждый из рассматриваемых методов анализа генетического разнообразия хвойных имеет и преимущества, и недостатки. Поэтому лишь при совместном использовании разных типов генетических маркеров можно проанализировать большое число разных локусов и получить качественно новую и более объективную информацию о генетическом разнообразии и характере распределения генетической изменчивости в пределах ареала вида, структуре и степени дифференциации популяций.

Цель работы – изучение генетического разнообразия и степени дифференциации популяций ели сибирской на основе анализа изменчивости трех различных типов генетических маркеров (изоферментов, хлоропластных и ядерных микросателлитов).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование включены изолированные популяции ели, расположенные на о-ве Ольхон (оз. Байкал), в заповеднике Богд-Уул (Монголия) и на юге Магаданской области на территории Магаданского государственного природного заповедника (Ямской еловый остров), а также популяции ели с голубой (Выдрино, 2) и типичной для вида зеленой окраской хвои (Выдрино, 1) из района их совместного произрастания на южном побережье оз. Байкал. Кроме того, проанализировано несколько популяций ели из географически близких районов Иркутской области и Бурятии. Сбор экспериментального материала

осуществлялся в каждой популяции не менее чем с 30 отдельных деревьев.

Для изоферментного анализа в качестве материала для исследования использовали вегетативные почки. Экстракты почек разделяли методом горизонтального электрофореза в 13%-м крахмальном геле в трех буферных системах: морфолин-цитратной, pH 7.0 (Clayton, Tretiak, 1972), *трис*-цитратной, pH 8.5 / гидроокись лития-боратной, pH 8.1 (Ridgway et al., 1970) и *трис*-ЭДТА-боратной, pH 8.6 (Markert, Faulhaber, 1965). Гистохимическое окрашивание ферментов (6-PGD, MDH, SKDH, FDH, IDH, GDH, GOT, PGM, PGI, LAP, SOD) после электрофореза проводили по стандартным методикам (Vallejos, 1983; Manchenko, 1994 и др.), адаптированным к объекту изучения. Генетическую структуру и степень дифференциации популяций ели определяли на основе анализа изменчивости локусов, аллозимные варианты которых хорошо разделяются в указанных выше буферных системах.

Для исследования изменчивости микросателлитных локусов хлоропластной и ядерной ДНК использовали хвою, предварительно высушенную с помощью силикагеля. Выделение ДНК из хвои проводили по стандартному протоколу для растительных тканей (метод СТАВ) с применением цетилтриметиламмонийбромидом (Devey et al., 1996). Анализ микросателлитных локусов хлоропластной ДНК осуществлялся путем проведения ПЦР с пятью парами праймеров (локусы Pt36840, Pt30204, Pt71936, Pt26081 и Pt63718), разработанных на основе хлоропластного генома сосны Тунберга (Vendramin et al., 1996). ПЦР-амплификация выполнена в соответствии с процедурой, предложенной в работе (Vendramin et al., 1996). Затем продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в денатурирующем полиакриламидном геле и окрашивали с помощью нитрата серебра.

Для выбора микросателлитных локусов ядерной ДНК, пригодных для изучения изменчивости ели сибирской, протестировано 15 локусов, разработанных для *Picea abies* (L.) Karst. и *Picea glauca* Moench. (Pfeiffer et al., 1997; Hodgetts et al., 2001; Scotti et al.,

2002). Шесть из них (EATC2C06, SpAGG3, UAPgAG150A, UAPgAG150B, UAPgAG105, EATC1B02) обнаруживали высокую воспроизводимость амплификации и были включены в дальнейшие исследования. Электрофоретическое разделение полученных в результате амплификации фрагментов ДНК проводили в 6%-м полиакриламидном геле в *tris*-ЭДТА-боратном буфере, рН 8.3 (Падутов, Баранов, Воропаев, 2007). Для окрашивания использовали нитрат серебра.

Вычисление показателей изменчивости, анализ иерархической структуры изменчивости AMOVA (Weir, Cockerham, 1984), расчет индексов фиксации G_{ST} (Nei, 1987) и R_{ST} (Goldstein et al., 1995) выполняли, используя программы GenAlex 6 (Peakall, Smouse, 2006) и Arlequin v.3.1 (Excoffier et al., 2006).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень дифференциации изученных популяций ели сибирской, определенный на основе анализа 21 изоферментного локуса, наглядно иллюстрирует взаиморасположение популяций на плоскости двух координат (рис. 1), полученное при многомерном шкалировании матрицы генетических расстояний М. Неи (Nei, 1972). На рисунке видно, что изолированная популяция ели сибирской из заповедника Богд-Уул, расположенная вблизи

южной границы распространения вида в Монголии и имеющая самые низкие среди исследованных популяций показатели генетической изменчивости, значительно дифференцирована как от реликтовой изолированной популяции с о-ва Ольхон, так и от различающихся по окраске хвои популяций ели (Выдрино, 1 и Выдрино, 2), расположенных на южном побережье оз. Байкал. Остальные изученные популяции ели отличаются от монгольской в меньшей степени. Ближе всех к ней по генетической структуре оказалась популяция, расположенная в Иркутской области (Косая Степь). Высокий уровень генетической дифференциации по изоферментным маркерам генов наблюдается также между популяцией Ольхон и популяциями из Бурятии: Красноярово и Выдрино, 2 (ель с голубой окраской хвои). Наиболее близко к ольхонской популяции ели располагается популяция Северобайкальск (Бурятия).

Исследования ели сибирской с помощью микросателлитных маркеров хлоропластной ДНК ранее не проводились. Поэтому для оценки степени генетической дифференциации включенных в анализ популяций ели сибирской по хлоропластным микросателлитным локусам (cpSSR) было проверено пять локусов: Pt36840, Pt30204, Pt71936 и Pt26081, Pt63718 (Vendramin et al., 1996). Четыре из них (Pt71936 и Pt26081, Pt63718, Pt36840)

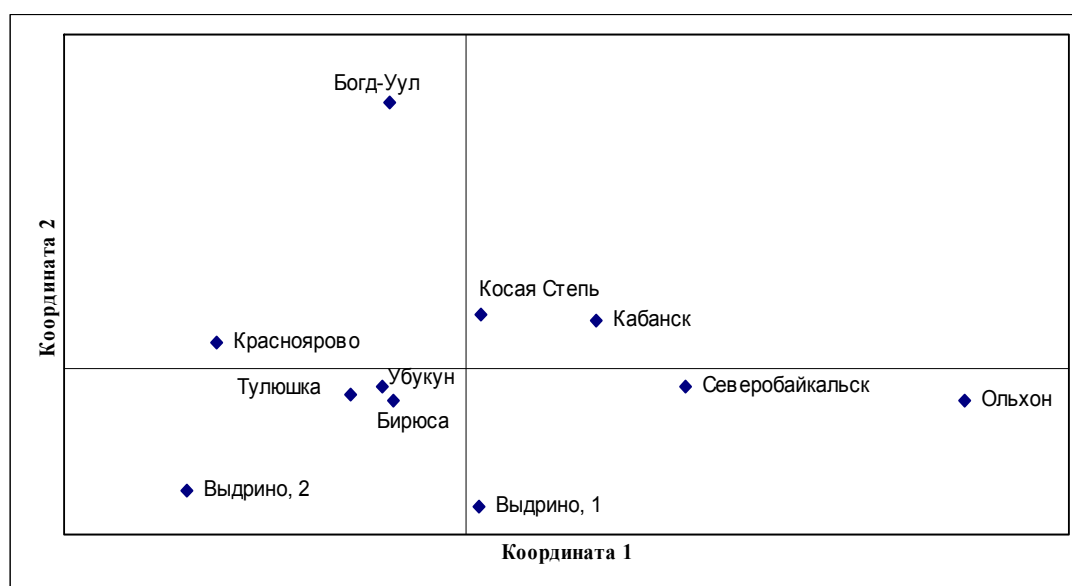


Рис. 1. Проекция изученных популяций ели сибирской на плоскости двух координат по данным PCA-анализа матрицы генетических расстояний, вычисленных на основе 21 изоферментного локуса (Nei, 1972).

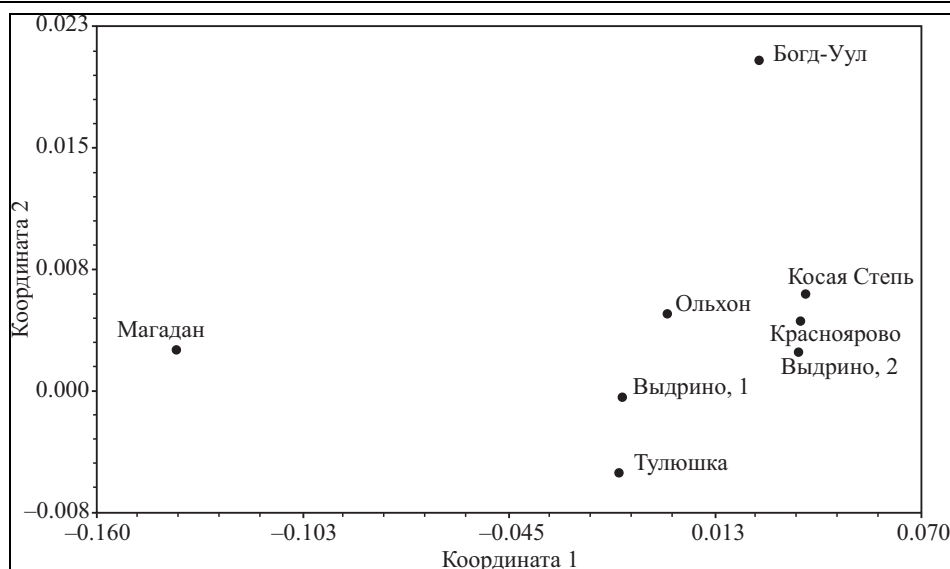


Рис. 2. Ординация популяций *Picea obovata* с помощью анализа главных координат, основанная на парных G_{ST} , вычисленных между популяциями исходя из частот сrSSR гаплотипов.

обнаруживали изменчивость у *Picea abies* (Bucci, Vendramin, 2000; Vendramin et al., 2000; Scotti et al., 2008). Однако, как было установлено при исследовании этих локусов в девяти популяциях ели сибирской, лишь 3 изменчивых локуса (Pt71936, Pt26081 и Pt63718) оказались пригодными для изучения популяционной структуры этого вида. В локусе Pt63718 обнаружено 7 аллелей, в локусе Pt26081 – 6. Локус Pt71936 представлен пятью аллелями.

Сочетание аллелей трех локусов рассматривалось как гаплотип. Всего по трем локусам генотипировано 257 индивидуумов ели и выявлено 33 гаплотипа. Наименьшее количество гаплотипов (6) обнаружено в изолированной популяции ели сибирской с юга Магаданской области. Невысокое, ниже среднего, число гаплотипов наблюдалось в популяциях Ольхон и Богд-Уул (8 и 9 соответственно). Самое большое разнообразие гаплотипов (16) выявлено в популяции Тулюшка из Иркутской области. Среднее число гаплотипов на популяцию 10.7. Показатель гаплотипического разнообразия H_e варьировал в изученных популяциях ели от 0.550 до 0.924, составляя в среднем 0.869. Наименьшие значения H_e оказались в изолированных популяциях Магадан и Богд-Уул.

Ординация популяций ели сибирской, основанная на парных значениях индексов фиксации G_{ST} , вычисленных между популяциями по частотам сrSSR гаплотипов, пока-

зала, что наиболее значительно дифференцированы друг от друга и от других включенных в исследование популяций изолированные популяции Магадан и Богд-Уул. Остальные популяции слабо различаются по этому типу ДНК-маркеров (рис. 2).

Кроме того, проведено изучение генетического разнообразия и степени межпопуляционной дифференциации ели сибирской на основе анализа изменчивости ядерных микросателлитных локусов. Из 15 протестированных микросателлитных локусов (Pfeiffer et al., 1997; Hodgetts et al., 2001; Scotti et al., 2002) выбрано 6 стабильно амплифицирующихся (табл. 1).

Из приведенных в табл. 1 данных видно, что все включенные в анализ ядерные микросателлитные локусы у ели сибирской обнаруживают изменчивость. Наибольшее аллельное разнообразие наблюдается в локусах

Таблица 1. Используемые для анализа ели сибирской ядерные микросателлитные локусы, число выявленных в них аллелей и размер фрагмента

Локус	Мотив	Число аллелей	Размер фрагмента, п. н. о.
EATC2C06	(CAT) ₇	5	130–163
SpAGG3	(GA) ₂₄	18	124–156
UAPgAG150A	(AG) ₁₉	15	142–174
UAPgAG150B	(AG) ₁₉	3	128–134
UAPgAG105	(AG) ₁₁	5	161–171
EATC1B02	(ATC) ₇ (AT) ₃	4	197–215

Таблица 2. Параметры генетической изменчивости популяций ели сибирской, исследованных с помощью ядерных микросателлитных локусов

Популяция	N_a	N_e	H_o	H_e	F
Убукун	5.167	3.362	0.417	0.474	0.063
Косая степь	5.833	3.399	0.473	0.497	0.053
Ванавара	6.000	3.041	0.441	0.471	0.042
Богд-Уул	5.000	3.225	0.568	0.524	-0.056
Выдрино, 2	5.833	3.334	0.509	0.469	-0.093
Ольхон	5.333	2.783	0.492	0.505	0.033
В среднем	5.528±0.713	3.191±0.465	0.483±0.049	0.490±0.047	0.007±0.029

Примечание. N_a – среднее число аллелей на локус, N_e – эффективное число аллелей на локус, H_o и H_e – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготности, F – индекс фиксации Райта.

SpAGG3 и UAPgAG150A. Всего при анализе шести популяций ели сибирской из Эвенкии (Ванавара), Иркутской области (Косая Степь, Ольхон), Бурятии (Убукун, Выдрино, 2) и Монголии (Богд-Уул) выявлено 50 аллелей, 24 % из которых оказались уникальными. Рассчитанные по результатам анализа ядерных микросателлитных локусов значения основных показателей генетического разнообразия в изученных популяциях ели сибирской приведены в табл. 2.

Наиболее высокие значения наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности по изученным микросателлитным локусам обнаружены в изолированной популяции Богд-Уул, хотя аллельное разнообразие здесь оказалось самым низким. В популяциях Богд-Уул и Выдрино, 2 выявлен избыток ($F = -0.056$ и $F = -0.093$ соответственно), в остальных популяциях – дефицит гетерозиготных генотипов (F варьирует от 0.033 до 0.063). Исследование популяционной структуры ели си-

бирской с помощью F -статистик Райта (Guries, Ledig, 1982) показало, что на межпопуляционную составляющую изменчивости приходится 5.4 %. Остальная изменчивость сосредоточена внутри популяций. Самый большой вклад (12 %) в межпопуляционную дифференциацию вносит локус EATC2C06, наименьший (1.7 %) – локус UAPgAG150B. Генетическое расстояние D (Nei, 1972) между популяциями варьирует от 0.015 до 0.103, составляя в среднем 0.061. Наиболее значительные различия в генетической структуре по этому типу ДНК-маркеров наблюдаются между популяцией ели из Бурятии (Убукун) и остальными включенными в исследование популяциями (D варьирует от 0.087 до 0.103). Максимально дифференцированы друг от друга популяция Убукун и популяция ели с голубой окраской хвои (Выдрино, 2). Существенно отличается от остальных и популяция ели из заповедника Богд-Уул. Выявленный уровень генетической дифференциации изу-



Рис. 3. Проекция изученных популяций ели сибирской на плоскости двух координат по данным PCA-анализа матрицы генетических расстояний (Nei, 1972), вычисленных на основе шести ядерных микросателлитных локусов.

ченных популяций ели сибирской наглядно иллюстрирует их расположение на плоскости двух координат, полученное при многомерном шкалировании матрицы генетических расстояний М. Неи (Nei, 1972). На рис. 3 видно, что популяции из Бурятии, Иркутской области и Эвенкии (Выдрино, 2, Косая Степь, Ванавара соответственно), имеющие сходную генетическую структуру по изученным микросателлитным локусам ядерной ДНК, располагаются в непосредственной близости друг от друга. На некотором удалении от них находится популяция с о-ва Ольхон. Более значительно разобщены пространственно как друг от друга, так и от остальных популяций популяции Богд-Уул и Убукун.

Из представленных данных видно, что изолированная популяция ели сибирской из заповедника Богд-Уул значительно дифференцируется от остальных включенных в исследование популяций этого вида, в том числе от изолированной реликтовой популяции с о-ва Ольхон, как по изоферментным, так и по микросателлитным локусам ядерной и хлоропластной ДНК. Следует, однако, отметить, что не всегда степень дифференциации популяций по трем изученным маркерам совпадает. Например, популяция с о-ва Ольхон по изоферментным локусам обнаруживает достаточно высокий уровень дифференциации с популяциями из Бурятии: Выдрино, 2 и Краснояроро (см. рис. 1), а по микросателлитным локусам хлоропластной ДНК (см. рис. 2) оказывается близкой к ним, примыкая к группе популяций, слабо различающихся по этому типу генетических маркеров. Существенные различия в степени дифференциации по трем генетическим маркерам наблюдаются и для некоторых других сравниваемых пар популяций. Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что для получения более полной и объективной информации о генетическом разнообразии и степени внутривидовой дифференциации популяций ели сибирской целесообразно использовать разные по типу наследования и уровню изменчивости генетические маркеры.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 13-04-00777).

Авторы выражают благодарность сотрудникам Института биологических проблем Севера ДВО РАН О. А. Мочаловой и Е. А. Андриановой за предоставленные для анализа образцы хвои ели сибирской из изолированной популяции, расположенной на юге Магаданской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гончаренко Г. Г., Потенко В. В. Параметры генетической изменчивости и дифференциации в популяциях ели европейской (*Picea abies* (L.) Karst.) и ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) // Генетика. 1991. Т. 27. № 10. С. 1759–1772.
- Кравченко А. Н., Ларионова А. Я., Милютин Л. И. Генетический полиморфизм ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) в Средней Сибири // Генетика. 2009. Т. 44. № 1. С. 45–53.
- Ларионова А. Я. Генетическая изменчивость сосны обыкновенной в юго-восточной части ареала // Генетика. 2002. Т. 38. № 12. С. 1641–1647.
- Ларионова А. Я., Кравченко А. Н., Экарт А. К., Орешкова Н. В. Генетическое разнообразие и дифференциация популяций лесобразующих видов хвойных в Средней Сибири // Хвойные бореальной зоны. 2007. Т. 24. № 2–3. С. 235–242.
- Падутов В. Е., Баранов О. Ю., Воронаев Е. В. Методы молекулярно-генетического анализа. Минск: Юнипол, 2007. 176 с.
- Политов Д. В., Крутовский К. В., Алтухов Ю. П. Характеристика генофондов популяций кедровых сосен по совокупности изоферментных локусов // Генетика. 1992. Т. 28. № 1. С. 93–114.
- Потенко В. В. Полиморфизм изоферментов и филогенетические взаимоотношения хвойных видов Дальнего Востока России: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.05, 03.00.15. Владивосток: Биолого-почвенный институт ДВО РАН, 2004. 38 с.
- Семериков В. Л., Подогаз А. В., Шурхал А. В. Структура изменчивости аллозимных ло-

- кусов в популяциях сосны обыкновенной // Экология. 1993. № 1. С. 18–25.
- Семериков В. Л., Семерикова С. А., Дымышкова О. С. и др. Полиморфизм микросателлитных локусов хлоропластной ДНК сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) в Азии и Восточной Европе // Генетика. 2014. Т. 50. № 6. С. 660–669.
- Семерикова С. А., Семериков В. Л. Изменчивость хлоропластных микросателлитных локусов у пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) и двух дальневосточных видов пихт *A. nephrolepis* (Trautv.) Maxim. и *A. sachalinensis* Fr. Schmidt // Генетика. 2007. Т. 43. № 12. С. 1637–1646.
- Шуганов З. Х. Внутривидовая изменчивость и дифференциация видов семейства Pinaceae на Урале: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.05. Пермь: Пермский гос. ун-т, 2005. 46 с.
- Шуганов З. Х., Бахтиярова Р. М., Янбаев Ю. А. Генетическая изменчивость и дифференциация природных популяций сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) // Генетика. 1995. Т. 31. № 10. С. 1386–1393.
- Экарт А. К., Ларионова А. Я. Аллозимный полиморфизм в природных популяциях пихты сибирской (*Abies sibirica* Ledeb.) // Вестник СВНЦ ДВО РАН. 2010. № 2. С. 78–85.
- Янбаев Ю. А., Шуганов З. Х., Путенихин В. П., Бахтиярова Р. М. Дифференциация популяций ели сибирской (*Picea obovata* Ledeb.) на Южном Урале // Генетика. 1997. Т. 33. № 9. С. 1244–1249.
- Vucci G., Vendramin G. G. Delineation of genetic zones in the European Norway spruce natural range: preliminary evidence // Molecular Ecology. 2000. V. 9. P. 923–934.
- Clayton J. W., Tretiak D. N. J. Amino-citrate buffer for pH control in starch gel electrophoresis // Fisheries Research Board Canada. 1972. V. 29. P. 1169–1172.
- Devey M. E., Bell J. C., Smith D. N. et al. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD and microsatellite markers // Theor. Appl. Genet. 1996. V. 92. P. 673–679.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. ARLEQUIN ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. Computational and Molecular Population Genetics Lab (CMPG). Institute Zoology, Univ. Bern, Bern, Switzerland, 2006.
- Fluch S., Burg A., Kopecky D., Homolka A. et al. Characterization of variable EST SSR markers for Norway spruce (*Picea abies* L.) // BMC Res. Not. 2011. V. 4. P. 401.
- Goldstein D. B., Ruiz Linares A., Cavalli-Sforza L. L., Feldman M. W. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci // Genetics. 1995. V. 139. P. 463–471.
- Guries R. P., Ledig F. T. Genetic diversity and population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.) // Evolution. 1982. V. 36. P. 387–402.
- Hodgetts R. B., Aleksasuk M. A., Brown A. et al. Development of microsatellite markers for white spruce (*Picea glauca* Moench) and related species // Theor. Appl. Genet. 2001. N. 101. P. 1252–1258.
- Krutovskii K. V., Bergmann F. Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci // Heredity. 1995. V. 74. P. 464–480.
- Manchenko G. P. Handbook of detection of enzymes on electrophoretic gels. G.P CRC Press, Inc., 1994. 574 p.
- Markert C. L., Faulhaber I. Lactate dehydrogenase isozyme patterns in fish // J. Exp. Zool. 1965. V. 159. N. 2. P. 319–332.
- Meloni M., Perini D., Binelli G. The distribution of genetic variation in Norway spruce (*Picea abies* Karst.) populations in the western Alps. // J. of Biogeography. 2007. V. 34. P. 929–938.
- Nei M. Genetic distance between populations // Amer. Naturalist. 1972. V. 106. P. 283–292.
- Nei M. Molecular Evolutionary Genetics. N.Y.: Columbia Univ. Press, 1987. 512 p.
- Peakall R., Smouse P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research // Mol. Ecol. Not. 2006. N. 6. P. 288–295.
- Pfeiffer A., Oliveri A. M., Morgante M. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst) // Genome. 1997. V. 40. P. 411–419.
- Ridgway G. J., Sherburne S. W., Lewis R. D. Polymorphism in the esterases of atlantic herring // Trans. Am. Fish. Soc. 1970. V. 99. P. 147–151.

- Scotti I., Magni F., Paglia G. P., Morgante M. Trinucleotide microsatellite in Norway spruce (*Picea abies*): their features and the development of molecular markers // Theor. Appl. Genet. 2002. V. 106. P. 40–50.
- Scotti I., Gugerli F., Pastorelli R. et al. Maternally and paternally inherited molecular markers elucidate population patterns and inferred dispersal processes on a small scale within a subalpine stand of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) // For. Ecol. Manag. 2008. V. 255. P. 3806–3812.
- Semerikov V. L., Semerikov L. F., Lascoux M. Intra- and interspecific allozyme variability in Eurasian *Larix* Mill. Species // Heredity. 1999. V. 82. P. 193–204.
- Semerikova S. A., Lascoux M., Semerikov V. L. Nuclear and cytoplasmic genetic diversity reveals long-term population decline in *Abies semenovii*, an endemic fir of central Asia // Can. J. For. Res. 2012. V. 42. P. 2142–2152.
- Tollefsrud M. M., Sonstebo J. H., Brochmann C. et al. Combined analysis of nuclear and mitochondrial markers provide new insight into the genetic structure of North European *Picea abies* // Heredity. 2009. V. 102. P. 549–562.
- Vallejos C. E. Enzyme activity staining // Isozymes in plant genetics and breeding / Ed. by S. D. Tanksley, T. J. Orton. Amsterdam: Elsevier Sci. Publ., 1983. P. 469–516.
- Vendramin G. G., Lelli L., Rossi P., Morgante M. A set of primers for the amplification of 20 chloroplast microsatellites in Pinaceae // Mol. Ecol. 1996. V. 5. P. 111–114.
- Vendramin G. G., Anzidei M., Madaghiele A. et al. Chloroplast microsatellite analysis reveals the presence of population subdivision in Norway spruce (*Picea abies* K.) // Genome. 2000. V. 43. P. 68–78.
- Watanabe Y., Imazu M., Shimizu T. Spatial distribution of cpDNA and mtDNA haplotypes in a hybrid zone between *Pinus pumila* and *P. parviflora* var. *pentaphylla* (Pinaceae) // J. Plant Res. 1996. V. 109. P. 403–408.
- Weir B. S., Cockerham C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure // Evolution. 1984. V. 38. P. 1358–1370.

The Use of Genetic Markers of Various Types for Evaluation of Intraspecific Differentiation Level of the Siberian Spruce

A. K. Ekart¹, S. A. Semerikova², V. L. Semerikov²,

A. N. Kravchenko¹, O. S. Dymshakova², A. Ya. Larionova¹

¹ V. N. Sukachev Institute of Forest, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Akademgorodok, 50/28, Krasnoyarsk, 660036 Russian Federation

² Institute of Plant and Animal Ecology, Russian Academy of Sciences, Ural Branch
8 Marta str., 202, Yekaterinburg, 620144 Russian Federation

E-mail: ekart@pochta.ru, s.a.semerikova@ipae.uran.ru, semerikov@ipae.uran.ru,
krava@fromru.com, dymshakova@ramber.ru, alya-larion@yandex.ru

On the basis of the analysis of variability of isoenzyme loci and microsatellite loci of nuclear and chloroplast DNA the data were obtained about the degree of differentiation of a number populations of Siberian spruce (*Picea obovata* Ledeb.), including isolated populations located on the island of Olkhon, in the reserve Bogd-Uul (Mongolia) and on the south of the Magadan region. It was shown that the combined use of various types of genetic markers gives an opportunity to get more complete and objective information about a genetic diversity and intraspecific differentiation of this widespread in Siberia species.

Keywords: *Siberian spruce (Picea obovata Ledeb.), isoenzymes, nuclear and chloroplast microsatellites, genetic diversity, differentiation.*