

в 20-25 летнем возрасте (интенсивность изреживания 15-20 %) и в 40-50 лет (интенсивность изреживания не более 15 %). Рубки ухода должны носить, прежде всего, санитарный и селекционный характер.

Литература

1. Парниковый эффект, изменение климата и экосистемы: пер. с англ./ Болин Б., Десс Б.Р., Ягер Дж., Уоррик Р.// Л.: Гидрометеиздат, 1989. – 560 с.
2. Уткин А.И. Углеродный цикл и лесоводство// Лесоведение. – 1995, № 5. – С. 3-20.
3. Писаренко А.И. Глобальное управление бореальными лесами: целесообразность или неизбежность// Устойчивое развитие бореальных лесов. – М., 1997. – С. 3-16.
4. Brown S. Present and potential roles of forests in the global climate change debate// Unsylva. – 1996. – 47, № 185. – P. 3-10.
5. Кобак К.И., Кукуев Ю.А., Трейфельд Р.Ф. Роль лесов в изменении содержания углерода в атмосфере (на примере Ленинградской обл.). – Лесное хозяйство. – 1999, № 2. – С. 43-45.
6. David Brand The combined challenge of forestry and terrestrial carbon management// XXI IUFRO world congress, 2000. – Kuala-Lumpur. – P. 558-564.
7. Zasada M. The growth model for fir (*Abies alba* Mill.)// Folia forestalia polonica. – Series A – Forestry. – 1999, № 41. – P. 37-46.
8. Ермаков В.Е., Севастьянов В.Д. Моделирование хода роста чистого соснового древостоя// Лесоведение и лесное хозяйство. – Мн.: Высшая школа. – 1979, вып. 14. – С. 65-69.
9. Никитин А.Н. Имитационная модель накопления углерода древесными компонентами сосновых насаждений искусственного происхождения// Материалы междунауч. конф. "Мониторинг и оценка состояния растительного покрова". – Минск, 2003. – С. 78-80.
10. Фрей Т.Э.-А. Вопросы и ответы по сводным докладам// Моделирование и контроль производительности древостоев: Тез. Докл. – Каунас: ЛитСХА, 1983. – С. 130-131.
11. Усольцев В.А. Рост и структура фитомассы древостоев. – Новосибирск: Наука, 1988. – 254 с.

УДК 630*165.6

Доц. Р.Т. Гут¹, канд. біол. наук – УкрДЛТУ;
Ю. Новаковська², канд. наук – НДЛГ

ВИКОРИСТАННЯ ГЕН-СПЕЦИФІЧНИХ STS-МАРКЕРІВ ДЛЯ ДОСЛІДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНОГО ПОЛІМОРФІЗМУ ПОПУЛЯЦІЙ ХВОЙНИХ ВИДІВ РОСЛИН³

Ген-специфічні STS-маркери є новою і перспективною системою молекулярних маркерів, яка базується на використанні ПЛР. Ген-специфічні маркери мають ряд важливих властивостей, до яких належать кодомінантний характер успадкування, застосування простих методів виявлення поліморфізму та висока відтворюваність результатів дослідів, і тому можуть ефективно використовуватись для оцінки генетичних параметрів хвойних видів рослин. У цій роботі висвітлено переваги та недоліки використання ген-специфічних STS-маркерів порівняно з іншими системами молекулярних маркерів, а також описано принципи створення та застосування цих маркерів.

¹ Український державний лісотехнічний університет, Львів (Ukrainian State University of Forestry and Wood Technology, Lviv)

² Науково-дослідний інститут лісового господарства, (Forest Research Institute, Warszawa)

³ Написання статті стало можливим під час перебування доцента Українського державного лісотехнічного університету Р. Гута в Науково-дослідному інституті лісового господарства (IBL, Warszawa) при сприянні Народного Фонду Охорони Середовища і Водного Господарства (Польща)

Doc. R.T. Gout¹ – USUFWT; dr. J. Nowakowska² – FRI

Application of gene-specific STS-markers for studies of population genetic polymorphisms in conifers

Gene-specific STS-markers represent new and prospective PCR-based system of molecular markers. Gene-specific STS-markers display a number of important advantages, including co-dominant mode of inheritance, usage of simple methods to reveal polymorphisms, and high reproducibility, and therefore, can be used effectively for evaluation of genetic parameters in conifer plant species. This review focuses on advantages and disadvantages gene-specific STS-markers usage compared to other systems, as well as describes the principles of design and utilization of these markers.

Вступ

На сьогодні особлива увага приділяється питанню охорони біологічного різноманіття, зокрема видового і внутрішньовидового складу деревних рослин лісових екосистем, що тісно пов'язано з генетико-селекційними роботами. Останні характеризуються певними методами досліджень і прийомами здійснення селекційного процесу.

Як відомо, різноманітні комбінації генів у межах кожного виду створюють великий набір ознак, таких, які забезпечують виживання і стійкість у певних умовах середовища. Ці комбінації генів успадковуються в наступних поколіннях, перехресному запиленні, формуються також нові генетичні комбінації, які забезпечують адаптацію видів до умов навколишнього середовища, що постійно змінюється. Тому основною метою лісководів на даному етапі має бути не тільки створення мінімальних умов для виживання деревних порід, але і збереження популяцій з генетичним різноманіттям, яке б забезпечило їх виживання в стресових умовах навколишнього середовища.

Висока генетична поліморфність деревних рослин, велика варіабельність впливів середовища на генотип зумовлюють значну внутрішньовидову мінливість за енергією росту та іншими ознаками, що зумовлює значні труднощі при оцінці материнських деревостанів. Основною причиною цього є відсутність простих і надійних методів отримання об'єктивної інформації про генетичну різноманітність популяцій.

Поряд з традиційним селекційним напрямком відбору дерев за фенотипом, на основі морфометричних показників, для вирішення генетико-селекційних проблем набувають широкого використання методи молекулярно-генетичних маркерів. Вони дають змогу швидше і надійніше ідентифікувати генотип і дають змогу ефективніше проводити генетичну оцінку популяцій та інших селекційних об'єктів.

Протягом останніх трьох десятиліть основним методом оцінки генетичного різноманіття деревних порід було дослідження поліморфізму ізоферментів [5]. Ізоферменти і надалі є порівняно простим і недорогим методом оцінки генетичного різноманіття, проте їх використання істотно обмежене кількістю доступних систем та низьким рівнем поліморфізму в окремих видів рослин [5]. Останнім часом створення нових систем молекулярних маркерів стало однією з найдинамічніших галузей прикладної молекулярної генетики. Нові підходи, які ґрунтуються переважно на розщепленні ДНК специфічними ен-

донуклеазами рестрикції або різних модифікаціях методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), дають змогу здійснювати безпосередню оцінку поліморфізмів ДНК [5].

Безперечно, усі існуючі на цей час системи молекулярних маркерів (табл. 1) мають як переваги, так і недоліки, які значною мірою визначаються їх застосуванням.

Табл. 1. Поширені системи молекулярних маркерів для оцінки генетичних параметрів популяцій

Сис-тема	Використовувані методи	Переваги і недоліки	Поси-лання
Ізо-фер-менти	Електрофоретичне розділення та або гістохімічне забарвлення клітинних ферментів	Кодомінантні. Однозначні результати визначення частоти алелей. Необхідні свіжі, і часто специфічні тканини	[5]
RFLP	Розщеплення геномної ДНК ендонуклеазами рестрикції з наступним Са-узерн-блот аналізом з використанням специфічних зондів	Кодомінантні. Однакові методи та зонди придатні для використання у різних таксонах. Часто потребує застосування радіоактивно мічених зондів. Вимагає значних кількостей ДНК.	[1, 3]
RAPD	ПЛР ампліфікація випадкових локусів геному за допомогою коротких (як правило, 10 основних) праймерів з випадковими послідовностями	Домінантні. Випадковий аналіз одночасно кодуєчих та некодуєчих послідовностей усіх трьох геномів рослинних організмів. Часто низька відтворюваність.	[2, 3, 5]
AFLP	Розщеплення геномної ДНК двома ендонуклеазами рестрикції з наступним приєднанням адаптерних послідовностей на кінцях та наступним ПЛР	Домінантні. Більша відтворюваність результатів порівняно з RAPD. Можлива автоматична оцінка результатів. Дорожчі порівняно з RAPD.	[3]
STS	ПЛР ампліфікація окремих локусів геномної ДНК з використанням специфічних праймерів	Кодомінантні. Аналіз специфічних локусів геномів рослин. Порівняно дорогий та трудомісткий процес підбору праймерів.	[4, 8-11, 15, 16]

Найширшого розповсюдження у генетичних дослідженнях рослинних видів набули RELP-маркери (restriction fragment length polymorphisms – поліморфізми довжини рестрикційних фрагментів), RAPD (randomly amplified polymorphic DNAs – довільно ампліфіковані поліморфні ДНК) [3] та AFLP-маркери (amplified fragment length polymorphisms – поліморфізми довжини ампліфікованих фрагментів). Серед цих трьох систем маркерів найшвидшою і найдешевшою є RAPD, оскільки методика створення цих маркерів є порівняно простою і не потребує інформації стосовно нуклеотидної послідовності ДНК [3]. Проте, при застосуванні диплоїдного матеріалу, їх домінантна природа може призводити до неточних оцінок генетичних параметрів популяцій [3]. Крім цього, RAPD часто не виявляють менделівського характеру успадкування [2]. Натомість, RELP виявляють кодомінантний характер успадкування (найпридатніший для оцінки генетичних параметрів популяцій), проте

вимагають застосування тривалих та трудомістких методів, а також великих кількостей ДНК [1]. AFLP, що поєднує у собі методики RELP та RAPD дає змогу уникнути недоліків, а також сумує переваги цих двох систем маркерів. Загалом, порівняно з RAPD, AFLP є більш відтворюваними, проте водночас дорожчими у застосуванні [5].

Описані у цьому огляді ген-специфічні STS-маркери на основі кДНК (EST клонів) на цей час вважають одними з перспективних методів оцінки генетичних параметрів популяцій різних (і зокрема хвойних) видів рослин [9-11, 15, 16].

STS-маркери – порівняльна характеристика

STS (sequence tagged sites) являють собою унікальні однокопійні короткі ділянки геному з відомою нуклеотидною послідовністю, які можна специфічно ампліфікувати з використанням ПЛР [6]. Якщо такі STS є поліморфними за довжиною, вони стають цінними генетичними маркерами, зокрема для картування геномів та оцінки генетичних параметрів популяцій рослин.

Існує кілька типів STS-маркерів (табл. 2). Найпоширеніші серед них – SSR (simple sequence repeats – повтори простих послідовностей) [12]. До інших типів STS-маркерів належать SCAR (sequence characterized amplified regions – ампліфіковані ділянки з описаною послідовністю) [13], CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences – розщеплені ампліфіковані поліморфні послідовності) [5], а також ген-специфічні маркери на основі EST (expressed sequence tags – експресовані мітки послідовностей) [9].

Табл. 2. Системи STS-маркерів для оцінки генетичних параметрів популяцій

Система	Використовувані методи	Переваги і недоліки	Посилання
SSR	ПЛР ампліфікація мікросателітних послідовностей з використанням специфічних праймерів	Розповсюджені, високополіморфні багатоалельні маркери. Порівняно легкий процес створення праймерів. Потребують складних методів розділення та виявлення продуктів ампліфікації.	[9, 12]
SCAR	Секвенування фрагментів RFLP або продуктів ампліфікації RAPD з наступним підбором специфічних праймерів та ПЛР ампліфікацією	Легке створення на основі RAPD та RFLP. Часто виявляються недостатньо поліморфними.	[7, 13]
Ген-специфічні STS	ПЛР ампліфікація послідовностей окремих генів з використанням специфічних праймерів, підібраних до послідовностей відповідних кДНК	Висока відтворюваність результатів. Можливе використання для близькородінних видів рослин. Застосування простих методів розділення та виявлення продуктів ампліфікації. Порівняно складний процес створення праймерів.	[9, 10, 15, 16]
CAPS	ПЛР ампліфікація послідовностей STS (як правило, окремих генів) з використанням специфічних праймерів з наступним розщепленням продуктів ендонуклеазами рестрикції	Те ж саме, що й для генспецифічних STS-маркерів. Більш трудомісткий і дорожчий процес створення.	[4]

У випадку SSR-маркерів мішенню для ПЛР ампліфікації є тандемні мультикопійні повтори ди-, три- та тетрануклеотидних послідовностей (відомі також як мікросателіти) [12]. Мікросателіти вважаються розповсюдженими, чисельними та високо поліморфними маркерами, швидко оцінюються за допомогою ПЛР, що робить привабливим їх застосування для картування, а також оцінки генетичних параметрів популяцій дерев. Оскільки нуклеотидні послідовності, які оточують мікросателіти, є консервативними, SSR-специфічні праймери можна легко створювати. Крім цього, SSR-маркери потенційно є багатопотенційними і тому більш інформативними. Системи SSR-маркерів створені для значної кількості видів дерев, зокрема для кількох видів сосни [14], модрини [12] та багатьох інших видів хвойних. Проте, оцінка алельного різноманіття SSR-маркерів часто вимагає застосування трудомістких методів з високою роздільною здатністю, таких як електрофорез продуктів ампліфікації у поліакриламідному гелі з наступним забарвленням сріблом [9].

STS-маркери можуть бути створені також шляхом секвенування фрагментів RFLP або продуктів ампліфікації RAPD. В останньому випадку секвенувані нуклеотидні послідовності RAPD, названі ампліфікованими ділянками з описаною послідовністю або SCAR, використовуються для підбору специфічних праймерів [7]. Цей метод дає змогу швидко і легко створювати нові STS-маркери на основі продуктів ампліфікації RAPD, і водночас уникнути проблем, пов'язаних з відтворюваністю RAPD аналізів. Проте, створені таким методом SCAR-маркери можуть виявитись недостатньо поліморфними [13].

Ген-специфічні STS-маркери на основі кДНК отримують шляхом підбору праймерів для специфічної ампліфікації окремих генів, використовуючи для цього нуклеотидні послідовності відповідних їм кДНК (EST клонів) [11]. Створені таким чином кДНК містять переважно кодуючі ділянки генів, тому ген-специфічні STS-маркери є найпридатнішими для генетичного картування та оцінки генетичних параметрів популяцій [15]. До переваг ген-специфічних STS-маркерів належать висока відтворюваність результатів, кодомінантний характер успадкування, а також можливість виявлення алельного різноманіття за допомогою простого методу електрофорезу ДНК в агарозному гелі і без додаткових маніпуляцій з продуктами ампліфікації [11]. Крім цього, рівень різноманіття, що вдається виявити з використанням ген-специфічних STS-маркерів є щонайменше таким же, як при використанні ізоферментного аналізу [11]. Водночас перевагою ген-специфічних STS-маркерів, порівняно з ізоферментами, є відсутність тканинспецифічності та відмінностей на різних стадіях розвитку рослин, а також практично необмежена кількість [11]. Як і у випадку будь-яких систем маркерів, в яких застосовується ПЛР ампліфікація специфічних послідовностей, створення праймерів є порівняно трудомістким та дорогим [10]. Крім цього, ген-специфічні STS-маркери, розроблені для одного виду рослин, часто виявляються придатними для оцінки генетичних параметрів в інших близьких видів (переважно приналежних до одного роду), що дає істотну економію часу та ресурсів під час проведення досліджень з цими видами [9-11].

CAPS-маркери, відомі також під назвою PCR-RFLP, отримують шляхом специфічної ампліфікації фрагментів ДНК (найчастіше кДНК) з наступним розщепленням продуктів ампліфікації ендонуклеазами рестрикції [4]. В останньому випадку CAPS можна вважати модифікацією методу ген-специфічних STS-маркерів, який дає змогу крім поліморфізму довжини ампліфікованих фрагментів виявляти поліморфізм довжини продуктів рестрикції цих фрагментів. Порівняно з іншими системами молекулярних маркерів CAPS на основі кДНК, оскільки і ген-специфічні STS-маркери, мають ряд переваг, до яких зокрема належить кодомінантний характер успадкування і висока відтворюваність результатів [4].

Дотепер створено кілька систем ген-специфічних STS-маркерів та CAPS-маркерів для дослідження генетичного поліморфізму у хвойних видів (табл. 3).

Методика створення ген-специфічних STS-маркерів

Отримання ген-специфічних STS-маркерів потребує специфічної ПЛР ампліфікації кДНК, тому для створення праймерів необхідно мати інформацію стосовно послідовностей цих кДНК (EST-клонів). Таку інформацію, як правило, отримують шляхом секвенування окремих випадково вибраних клонів з бібліотеки кДНК відповідного виду рослини [9, 15]. Проте для окремих видів рослин, ця інформація може бути отримана також із баз даних нуклеотидних послідовностей, доступних в інтернеті (наприклад GenBank), що дає змогу зберегти час і ресурси та істотно спростити створення маркерів.

Після секвенування кДНК, до отриманих нуклеотидних послідовностей підбираються специфічні праймери. Працездатність підібраних пар праймерів перевіряють за допомогою ПЛР ампліфікації відповідної кДНК, а також геномної ДНК, виділеної з рослини того самого генотипу, з якого була отримана бібліотека кДНК [9]. Аналіз та порівняння продуктів ампліфікації проводять шляхом електрофоретичного розділення в 1-2 %-ному агарозному гелі з наступним забарвленням бромистим етидієм [9, 15].

Потім пари праймерів, які успішно пройшли перевірку на працездатність, використовують для подальшої оцінки. Для цього, з використанням цих пар праймерів, проводять ПЛР ампліфікацію зразків геномної ДНК 15-45 дерев, що мають різне походження в межах ареалу виду [8-10, 15]. Аналіз отриманих продуктів ампліфікації, як і у попередньому випадку, проводять шляхом розділення в агарозному гелі. Загалом, оцінку проводять за кількома параметрами, найважливішими з яких є наявність та ступінь поліморфізму продуктів ампліфікації, а також характер успадкування маркеру. Для подальшого використання відбирають, як правило, маркери із значним рівнем поліморфізму та кодомінантним характером успадкування [9, 15].

Для оцінки поліморфізму, крім зразків диплоїдної геномної ДНК, виділеної з гілок, можуть бути використані додатково зразки гаплоїдної геномної ДНК, виділені з мегагаметофітів відповідних рослин [9]. Використання гаплоїдних зразків дає змогу полегшити визначення характеру успадкування маркерів (як домінантного, так і кодомінантного) шляхом порівняння розподілу алелей серед гаплоїдних мегагаметофітів гетерозиготних дерев [10], а також провести аналіз наявності зчеплення маркерів шляхом їх попарного порівняння і вилучити з подальшого використання одну з пар зчеплених маркерів [9].

Табл. 3. Праймери для STS-маркерів у деяких хвойних видів рослин

Маркер	Локус	Праймер	Розмір, пн	Посилання
Pinus sylvestris (ген-специфічні STS-маркери до мітохондріально- го інтрону nad 1)	nad1 F-R	GCATTACGATCTGCAGCTCA	2530	[17]
		GGAGCTCGATTAGTTTCTGC		
	nad1 C-D	TCCAGGTGCGAATAACCC	1897	
		GTTGTGTTGCTCTATCTCGGC		
	nad1 E-G	TATTTTCATAGCAGCAGTCTGG	1065	
		GGAGCTGCTCCTATCCTGG		
Picea mariana (ген-специфічні STS-маркери)	nad1 H-I	TAAATCAAAAGGTCCGGAG	248	[9]
		TGAAGTGAATCGCACTACTG		
	SB01	GCGTTCCAGAAATCCTACTAC	1090-2075	
		CCAAATGCACCATAAATACAG		
	SB06	TAAGGCAATTCTTCGGCTCAC	539-609	
		ACTAAGACAACCATTCTCTCC		
	SB07	AACAATGGGTGAGATCGTC	645-648	
		CGCTTGACAGGTCTTGGAAC		
	SB08	TTCGATGCTAGGTCTTGAGTC	634-653	
		CAGAAATTGGAAGTAAGAAGC		
	SB11	GTATTACCCAGCTCAAGTTCC	691-695	
		AACATCCCACTCCTGTC		
	SB21	CAGATCAGGCACGCATTGTTG	471-474	
		GTCCATCAGGGCTCATGTTTG		
	SB24	CAGTATGTGGGTTCATGTTAG	738-771	
		TTTGATAGCAGAGACCACTTC		
	SB29	AGCGGCATTGAACAGAGTAAC	553-580	
		AATGGAAATGAAGGCAGACTC		
	SB31	TTGGCATCTCTCAGCACATTC	439-449	
		TAGGTTTCTGGTCACGTCTAC		
Cryptomeria japonica (ген-специфічні CAPS-маркери)	SB62	GTATTACCCAGCTCAAGTTCC	681-706	[16]
		ACAGTACGCCGCAGACAAATG		
	SB70	AAATGGCGGTGTCATCTCTTC	404-417	
		AAAATGAGTCCCTGCCAATC		
	SB72	GCTCAGGAATCACTATCATTG	515-523	
		CAAAGATACCAACCGATTAAG		
	CD657	TCCTGATACTGTGGGCAACT	800	
		CCCCGATATGCTCTTCAACT		
	CD1237	GGAATCGGATGGGTATCTG	1300	
		AGAATCCGGGACCAAACTA		
	CD526	TCTTGCACTGACTTGGTTGCT	1000	
		GGGGATTGAGATTTTCAG		
	CD1309	AGCAAAACCTTGGGATTCCT	1400	
		TAGAGCCGCACTATTCAGAT		
	CD1894	ACCCTTTCCTCG CTTACATT	800	
		GCCGACTGAGTAAACAACC		
	CD1216	GCCAAGAACCTGAGCAAATC	800	
		CCTGTGCGAAAGCCAATCAA		
	CD1706	ATAGGCGACGCAGGTCAAAA	400	
		TCTGGGGCTGTAGTTCCAGT		
	CD1067	TTTAGGGTTTTGGGTTTTAG	1000	
		AACATACCCTGTCCTCTT		
	CD1091	GCCCTCCCTGGTTTTCTTCA	700	
		GAAACCCTGGACTGGCATAG		
	CD41	GAATCCAAAACCACTTGCTA	1900	
		ACATTCACGACCCTCCGTAT		
	CD1232	TTTGTTGGACATTGGGTTCT	1500	
		GCAGAGCCTAAGTGATTTGC		
	CD1675	AAGATGGGGCTCAATAAGTT	2300	
		GGCGGTCTCAGGATTCTTAG		
	CD1195	TCCCACTGAATCTCCTGTGA	2800	
		ATTGGCAATGGCGTTATTCT		

Створені і відібрані таким чином ген-специфічні STS-маркери можуть в подальшому використовуватись для картування та оцінки генетичних параметрів популяцій дерев даного виду, а також, частково, інших видів дерев даного роду. Необхідно зауважити, що за результатами досліджень у двох різ-

них видів хвойних, для відбору 13-15 поліморфних маркерів з кодомінантним характером успадкування необхідно проаналізувати 80-100 кДНК [9, 16].

Підбір праймерів та умови ПЛР

Від правильного підбору праймерів під час створення ген-специфічних STS-маркерів залежить не тільки ефективність ПЛР, але й ефективність виявлення поліморфізму. В одному з підходів, застосованому Перрі та Боскетом [9] під час створення ген-специфічних STS-маркерів для *Picea mariana*, було підібрано обернений праймер у 3'-UTR (3'-нетрансльованій ділянці) секвенованої кДНК, а прямий праймер – у кодуючій ділянці на 350-600 пар основ вище. Більше цього, в окремих випадках, на основі аналізу виявлених за допомогою BLASTX геномних послідовностей подібних до секвенованих кДНК, дослідники виявляли імовірне розташування інтронів, і підбирали прямий праймер таким чином, щоб продукт ампліфікації містив один-два інтрони [9]. Оскільки відомо, що поліморфізми загалом, і поліморфізми довжини зокрема, найчастіше трапляються у некодуючих ділянках ДНК (в тому числі у інтронах та 3'-UTR), застосування такого підходу до підбору праймерів, при якому продукти ампліфікації міститимуть інтрони та 3'-UTR, дає змогу підвищити ефективність створення ген-специфічних STS-маркерів. Крім цього, застосування такого підходу дає змогу збільшити специфічність праймерів за відношенням до генів однієї родини, оскільки навіть дуже подібні гени однієї родини часто виявляють істотні відмінності у 3'-UTR [9]. Це значною мірою стосується хвойних, у яких великі родини генів трапляються порівняно часто.

Зауважимо, що застосований раніше Тсумурою та ін. [15] підхід створення ген-специфічних STS-маркерів для хвойної рослини *Cryptomeria japonica*, при якому обидва праймери підбиралися до кодуючих ділянок кДНК, через низький безпосередньо спостережуваний поліморфізм довжини ампліфікованих фрагментів потребував додаткового розщеплення продуктів ампліфікації ендонуклеазами рестрикції (тобто CAPS).

Типовими праймерами для ампліфікації ген-специфічних STS-маркерів є 20-21-основні олігонуклеотиди з вмістом G + C наближеним до 50 %, мінімальною вторинною структурою та відсутньою міжпраймерною комплементарністю [9, 15]. Під час створення та використання ген-специфічних STS-маркерів ПЛР, як правило, проводять у 15-20 мкл стандартних реакційних сумішей з 0.1-0.2 мкМ кожного праймера та 5-50 нг ДНК-мішені (геномної ДНК), з попереднім 5-хвилинним прогріванням сумішей при 94 °C, наступними 30-45 циклами ампліфікації (40-60 с при 94 °C, 40-120 с при 50-65 °C та 60-180 с при 72 °C) та завершальною 5-10-хвилинною інкубацією при 72 °C [4, 9-11, 15, 16].

Висновки

Сучасні дослідження показують, що ген-специфічні STS-маркери можуть стати зручною системою для оцінки генетичних параметрів популяцій хвойних видів рослин. Незважаючи на те, що створення праймерів для цієї системи є порівняно дорогим та трудомістким процесом, разом з кодомінантним характером успадкування та високою відтворюваністю результатів, ген-специ-

фічні STS-маркери мають рядом інших переваг, зокрема теоретично необмежену кількість, можливість виявлення алельного різноманіття за допомогою простого електрофоретичного розділення продуктів ампліфікації в агарозному гелі, а також придатність для проведення досліджень з близькими видами. Водночас, для подальшого з'ясування придатності цих маркерів для оцінки генетичних параметрів популяцій інших видів хвойних необхідні наступні дослідження. Подальше вдосконалення системи ген-специфічних STS-маркерів, а також вдосконалення вже існуючих та створення нових модифікацій цього методу може істотно спростити та поширити застосування цих маркерів і зробити їх використання доступним для невеликих лабораторій, а також для прикладного застосування у лісівництві, на розсадниках та станціях розведення деревних рослин.

Література

1. Devey ME, Bell JC, Smith DN, Neale DB, Moran GF. A genetic linkage map for *Pinus radiata* based on RFLP, RAPD, and microsatellite markers// *Theor Appl Genet.* – 1996. – 92. – P. 673-679.
2. Echt CS, Erdahl LA, McCoy TJ. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa// *Genome.* – 1992. – 35. – 1. – P. 84-7.
3. Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J. Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1995. – 92. – 14. – P. 6369-73.
4. Iwata H, Ujino-Ihara T, Yoshimura K, Nagasaka K, Mukai Y, Tsumura Y. Cleaved amplified polymorphic sequence markers in sugi, *Cryptomeria japonica* D. Don, and their locations on a linkage map// *Theor Appl Genet.* – 2001. – 103. – P. 881-895.
5. Newton AC, Allnutt TR, Gillies AC, Lowe AJ, Ennos RA. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species// *Trends Ecol Evol.* – 1999. – 14. – 4. – P. 140-145.
6. Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D. A common language for physical mapping of the human genome// *Science.* – 1989. – 245. – 4925. – P. 1434-5.
7. Paran, I. and Michelmore, R.W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce// *Theor. Appl. Genet.* – 1993. – 85. – P. 985-993.
8. Perron M, Perry DJ, Andalo C, Bousquet J. Evidence from sequence-tagged-site markers of a recent progenitor-derivative species pair in conifers// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – 97. – 21. – P. 11331-6.
9. Perry DJ, Bousquet J. Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: development, characterization and analysis of linkage in black spruce// *Genetics.* – 1998 a. – 149. – 2. – P. 1089-98.
10. Perry DJ, Bousquet J. Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: the utility of black spruce-derived STS primers in other conifers// *Theor Appl Genet.* – 1998 b. – 97. – P. 735-743.
11. Perry DJ, Isabel N, Bousquet J. Sequence-tagged-site (STS) markers of arbitrary genes: the amount and nature of variation revealed in Norway spruce// *Heredity.* – 1999. – 83. – 3. – P. 239-48.
12. Rungis D, Bérubé J, Zhang J, Ralph S, Ritland CE, Ellis B, Douglas K, Bohlmann J, Ritland K. Robust simple sequence repeat markers for spruce (*Picea* spp.) from expressed sequence tags// *Theor Appl Genet.* – 2004. – у друці.
13. Scotti I, Vendramin GG, Matteotti LS, Scarponi C, Sari-Gorla M, Binelli G. Postglacial recolonization routes for *Picea abies* K. in Italy as suggested by the analysis of sequence-characterized amplified region (SCAR) markers// *Mol Ecol.* – 2000. – 9. – 6. – P. 699-708.
14. Smith D, Devey ME. Occurrence and inheritance of microsatellites in *Pinus radiata*// *Genome.* – 1994. – 37. – 6. – P. 977-83.
15. Tsumura Y, Suyama Y, Yoshimura K, Shirato N, Mukai Y. Sequence-tagged-sites (STSs) of cDNA clones in *Cryptomeria japonica* and their evaluation as molecular markers in conifers// *Theor Appl Genet.* – 1997. – 94. – P. 764-772.
16. Tsumura Y, Tomaru N. Genetic diversity of *Cryptomeria japonica* using co-dominant DNA markers based on sequenced-tagged sites// *Theor Appl Genet.* – 1999. – 98. – P. 396-404.
17. Soranzo N, Alia R, Provan J, Powell W. Patterns of variation at a mitochondrial sequence-tagged-site locus provides new insights into the postglacial history of European *Pinus sylvestris* populations// *Mol Ecol.* – 2000. – 9. – P. 1205-1211.