

УДК 343.983.7:575.174.015.3

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА МИКРОСАТЕЛЛИТНЫХ МАРКЕРОВ СОСНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ КРИМИНАЛИСТИЧЕСКОГО ДНК-АНАЛИЗА

**А. С. ПАРФЁНОВА¹⁾, С. А. ПОЛЕВОЙ¹⁾, Е. А. СПИВАК¹⁾,
А. Е. ГРЕБЕНЧУК¹⁾, А. Н. ХОХ¹⁾, С. А. КОТОВА¹⁾**

¹⁾Научно-практический центр Государственного комитета судебных экспертиз Республики Беларусь,
ул. Филимонова, 25, 220114, г. Минск, Беларусь

Микросателлиты, как высокополиморфные маркеры, являются ценным инструментом в идентификационных и популяционных исследованиях. В целях формирования подходов к судебно-экспертной ДНК-идентификации при расследовании дел о незаконных рубках протестированы 17 SSR-маркеров сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) с использованием ДНК растений, произрастающих в западной и восточной частях Республики Беларусь. Показана высокая информативность для шести микросателлитных маркеров. Установлена потенциальная возможность применения комплекса отобранных маркеров для ДНК-идентификации образцов древесины сосны обыкновенной в судебной экспертизе.

Ключевые слова: сосна обыкновенная; незаконные рубки; SSR-маркеры; ДНК-идентификация.

RESEARCH OF POLYMORPHISM OF MICROSATELLITE MARKERS OF SCOTS PINE FOR THE PURPOSES OF FORENSIC DNA ANALYSIS

**N. S. PARFIONAVA^a, S. A. PALIAVOI^a, A. A. SPIVAK^a,
A. E. HREBIANCHUK^a, A. N. HOH^a, S. A. KOTAVA^a**

^aScientific and Practical Center of the State Forensic Examination Committee
of the Republic of Belarus, 25 Filimonava Street, Minsk 220114, Belarus

Corresponding author: N. S. Parfionava (anastaciaparfionova@gmail.com)

Microsatellites as highly polymorphic markers are a valuable tool in identification and population studies. In order to form approaches to forensic DNA identification in the investigation of illegal logging cases, 17 SSR markers of Scots pine

Образец цитирования:

Парфёнова АС, Полевой СА, Спивак ЕА, Гребенчук АЕ, Хох АН, Котова СА. Исследование полиморфизма микросателлитных маркеров сосны обыкновенной для целей криминалистического ДНК-анализа. *Экспериментальная биология и биотехнология*. 2022;1:90–98.

For citation:

Parfionava NS, Paliavoi SA, Spivak AA, Hrebianchuk AE, Hoh AN, Kotava SA. Research of polymorphism of microsatellite markers of Scots pine for the purposes of forensic DNA analysis. *Experimental Biology and Biotechnology*. 2022;1:90–98. Russian.

(*Pinus sylvestris* L.) were tested using DNA from plants growing in the western and eastern parts of the Republic of Belarus. High information content was shown for six microsatellite markers. The potential possibility of using a complex of selected markers for the purpose of DNA identification of Scots pine wood samples in forensic examination has been established.

Keywords: Scots pine; illegal logging; SSR markers; DNA identification.

Введение

Лесная отрасль в Республике Беларусь находится под постоянным контролем государства, вместе с тем нередко случаи нарушения законодательства в сфере охраны окружающей среды, такие как незаконные рубки, незаконное уничтожение, изъятие или повреждение лесных насаждений, а также нарушения таможенного законодательства, главным образом связанные с недекларированием либо недостоверным декларированием лесо- и пиломатериалов, пилопродукции. Преимущественно объектом незаконных действий становится сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) как наиболее распространенный и хозяйственно ценный вид древесных растений Республики Беларусь. До настоящего времени экспертное сопровождение дел в сфере рационального природопользования, нелегального оборота древесины и лесопродукции хвойных пород базировалось главным образом на методах макродиагностики (дендрохронология) и микродиагностики (морфология строения). С развитием молекулярной генетики данная методология может быть успешно дополнена анализом полиморфизма ДНК, поскольку хвойные породы содержат в своем геноме до 75 % повторяющихся элементов [2]. Удобным инструментом при этом являются микросателлитные маркеры, к которым относятся короткие последовательные повторы (*simple sequence repeats*, SSR).

Анализ работ отечественных и зарубежных авторов в области изучения генетического разнообразия сосны обыкновенной позволяет сделать вывод, что наиболее перспективными для ДНК-идентификации являются следующие SSR-маркеры ядерной ДНК: Psyl17, Psyl42, Psyl19, PtTX4011, PtTX4001, Psyl44, Psyl18, Psyl16, Psyl36, Psyl25, Psyl2, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psyl57, LOP1, LOP3, PtTX3025. Исследование естественных популяций сосны в Российской Федерации (60 и 240 образцов), Литовской Республике (400 образцов), Республике Польша (384 образца), Чешской Республике (180 образцов), а также растений, отобранных на искусственной лесосеменной плантации в Республике Беларусь, показало, что вышеперечисленные маркеры являются полиморфными и имеют от 2 аллельных вариантов (Psyl25) до 21 аллельного варианта (PtTX4001) [3–9]. В Российской Федерации маркеры Psyl19, PtTX4011, PtTX4001, Spac11.4 успешно апробированы в генетической экспертизе незаконного оборота древесины сосны обыкновенной [10].

Цель данной работы – тестирование 17 микросателлитных локусов ядерной ДНК (Psyl17, Psyl42, Psyl19, PtTX4011, PtTX4001, Psyl44, Psyl18, Psyl16, Psyl36, Psyl25, Psyl2, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psyl57, LOP1, LOP3, PtTX3025) в качестве маркеров для изучения генетического разнообразия популяций сосны на территории Республики Беларусь и оценка их информативности при использовании в судебно-экспертной практике для ДНК-идентификации образцов древесины по делам о незаконных рубках, незаконном уничтожении, изъятии или повреждении лесных насаждений.

Материалы и методы исследования

Объектами исследования являлись растения сосны обыкновенной из двух естественных субпопуляций, произрастающие в западной (Гродненская область (46 образцов)) и восточной (Могилёвская область (42 образца)) частях Республики Беларусь. Материалом для исследования послужила ДНК сосны, полученная путем экстракции из радиальных кернов диаметром 4–5 мм, содержащих древесину от коры до сердцевины дерева. Выделение ДНК из древесины осуществляли модифицированным методом Танга¹. Для целевой амплификации SSR-маркеров были сформированы четыре мультилокусные тест-системы, включающие флуоресцентные праймеры со структурой, аналогичной структуре, описанной в литературных источниках [11–15]. Продукты амплификации ДНК с праймерами тест-системы анализировали методом капиллярного гель-электрофореза на автоматическом генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyser (*Thermo Fisher Scientific*, США), используя программное обеспечение *GeneMapper ID-X Software 1.4*. Доказательством аллельной принадлежности пиков в ПЦР-спектрах послужили воспроизводимые результаты амплификации (не менее трех повторов), ПЦР-продукты которых соответствовали аллельным диапазонам микросателлитных локусов, указанным в литературных источниках.

Основные показатели генетической изменчивости и криминалистические параметры рассчитывали с помощью программных средств *GenAlEx 6.5*, *Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT) 1.0*,

¹DNA extraction for sunflower PCR and RFLP analysis (small quantity) [Electronic resource]. URL: <http://www.zoology.ubc.ca/~riesenberg/RiesenbergResources/wp-content/uploads/2011/10/Knap-Burke-Lab-CTAB-DNA-Extraction-Protocol.pdf> (date of access: 20.12.2020).

Cervus 3.0.7 и *GenePop 4.7.0* [16–19]. Оценку частоты нуль-аллелей осуществляли посредством программных продуктов *Micro-Checker 2.2.3* [20], *Cervus 3.0.7*, *GenePop 4.7.0*. Проверку на сцепленность наследования маркеров проводили с использованием программ *GenePop 4.7.0* и *Arlequin 3.5.1.3* [21]. Анализ популяционной структуры выполняли с помощью программных средств *Structure 2.3.4* и *Structure Harvester*² [22].

Результаты и их обсуждение

Генотипированием 88 образцов ДНК белорусской популяции сосны обыкновенной установлено, что все 17 микросателлитных маркеров являются полиморфными. Наименьший уровень полиморфизма обнаружен у маркера Psyl25 (2 аллели), а наибольшее количество аллельных вариантов зарегистрировано для маркеров Spac11.4 (17), Psyl16 (14) и LOP1 (13). Показатели генетического разнообразия популяции сосны обыкновенной представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатели генетического разнообразия популяции
сосны обыкновенной по 17 микросателлитным маркерам

Table 1

Indicators of genetic diversity of the Scots pine
population by 17 microsatellite markers

Маркер	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>	<i>DF</i>	χ^2	<i>F</i>
Spac11.4	17	6,772	0,875	0,852	136	182,732	–0,027
SsrPt-ctg4363	10	3,209	0,648	0,688	45	42,570	0,059
LOP1	13	3,182	0,614	0,686	78	76,053	0,105
Psyl57	7	2,221	0,511	0,550	21	47,959	0,070
LOP3	5	1,221	0,193	0,181	10	1,006	–0,069
PtTX3025	9	3,060	0,455	0,673	36	197,572*	0,325
Psyl17	10	4,326	0,716	0,769	45	53,279	0,069
Psyl42	4	3,218	0,670	0,689	6	4,237	0,027
Psyl19	4	1,149	0,136	0,130	6	0,471	–0,051
PtTX4001	11	4,835	0,739	0,793	55	61,014	0,069
PtTX4011	7	2,518	0,466	0,603	21	51,105*	0,227
Psyl44	3	1,047	0,023	0,045	3	38,441*	0,491
Psyl18	4	1,084	0,057	0,077	6	38,494*	0,265
Psyl16	14	5,934	0,761	0,831	91	234,337*	0,084
Psyl36	3	1,299	0,216	0,230	3	0,825	0,061
Psyl25	2	1,011	0,011	0,011	1	0,003	–0,006
Psyl2	3	1,282	0,227	0,220	3	0,214	–0,033

Примечание. *Na* – число аллелей на локус; *Ne* – эффективное число аллелей на локус; *Ho* и *He* – наблюдаемая и ожидаемая гетерозиготность соответственно; *DF* – число степеней свободы; *F* – индекс фиксации Райта; * – $p < 0,05$ (с поправкой Бонферрони).

Для локусов Psyl17, PtTX4001, PtTX4011, Psyl44, Psyl18, Psyl16, Psyl2, Spac11.4, SsrPt-ctg4363, Psyl57, LOP1, LOP3, PtTX3025, имеющих, согласно литературным данным, ди- и тринуклеотидные tandemные повторы, установлено наличие микровариантов, отличающихся от основной аллели на один нуклеотид.

Анализ полиморфизма и частот встречаемости аллелей тестируемых локусов показал унимодальный характер распределения аллелей для маркеров Psyl19, PtTX4011, Psyl44, Psyl18, Psyl36, Psyl2, Psyl25, Psyl57, LOP3, для которых выявлены мажорные аллельные варианты с частотами встречаемости от 0,591 (PtTX4011) до 0,994 (Psyl25) (см. рисунок). Схожий характер распределения аллельных вариантов для маркеров PtTX4001, PtTX4011, Psyl44, Psyl42, Psyl18, Psyl16, Psyl2, Spac11.4, Psyl57 был показан в работе [5], посвященной анализу генетического разнообразия литовской популяции сосны обыкновенной.

²Structure Harvester [Electronic resource]. URL: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/> (date of access: 20.12.2020).

С учетом низкого полиморфизма и крайне низкого эффективного числа аллелей на локус ДНК-маркеры LOP3, Psyl19, Psyl36, Psyl44, Psyl18, Psyl25, Psyl2 были исключены из дальнейшего исследования как малоинформативные для криминалистического ДНК-анализа.

Расчет значения критерия χ^2 выявил достоверное (с учетом поправки Бонферрони) несоответствие распределению Харди – Вайнберга для трех SSR-маркеров (PtTX3025, PtTX4011 и Psyl16) в совокупной выборке сосны обыкновенной. Анализ генотипов с использованием программных средств *MicroChecker 2.2.3*, *Cervus 3.0.7* и *GenePop 4.7.0* позволил сделать вывод, что избыток гомозигот для микросателлитных маркеров PtTX4011 и PtTX3025 может быть связан с присутствием нуль-аллелей с суммарными частотами 0,1153 и 0,1931 соответственно. На предположительное наличие нуль-аллелей для маркера PtTX4011 указывалось ранее при исследовании генетического разнообразия сосны обыкновенной, произрастающей в польской и чешской популяциях, а для маркера PtTX3025 – в польской популяции [7; 8]. По причине высокого уровня нуль-аллелей (более 10 %) в белорусской популяции сосны обыкновенной ДНК-маркеры PtTX4011 и PtTX3025 также были исключены из дальнейшего исследования.

Попарный анализ восьми оставшихся рассматриваемых локусов с использованием программных средств *GenePop 4.7.0* и *Arlequin 3.5.1.3* указал на возможное сцепленное наследование аллелей локусов SsrPt-ctg4363 и LOP1, Psyl17 и Psyl16, Psyl42 и Psyl16. Поскольку для выяснения статистической корректности расчета генетической сцепленности маркеров необходимо более расширенное исследование, маркеры Psyl16 и LOP1 также были исключены из дальнейшего анализа.

По итогу рассмотрения основных показателей генетической изменчивости, оценки частоты нуль-аллелей и сцепленности маркеров для криминалистического ДНК-анализа сосны обыкновенной были отобраны шесть микросателлитных маркеров ядерной ДНК: Psyl17, Psyl42, PtTX4001, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psyl57.

При оценке криминалистических параметров исследуемых маркеров значения совокупного исключаящего (CPE) и совокупного дискриминирующего (CPD) потенциалов составили 0,977230 и 0,9999982 соответственно. При этом наиболее информативными для генетической идентификации были маркеры Psyl17, PtTX4001, Spac11.4, значения информационного содержания полиморфизма которых превышали 0,7 (табл. 2). Вероятность случайного совпадения генотипов, рассчитанная по выявленным частотам аллелей, составила $1,781617 \cdot 10^{-6}$.

Таблица 2

Криминалистические параметры шести наиболее перспективных микросателлитных маркеров сосны обыкновенной

Table 2

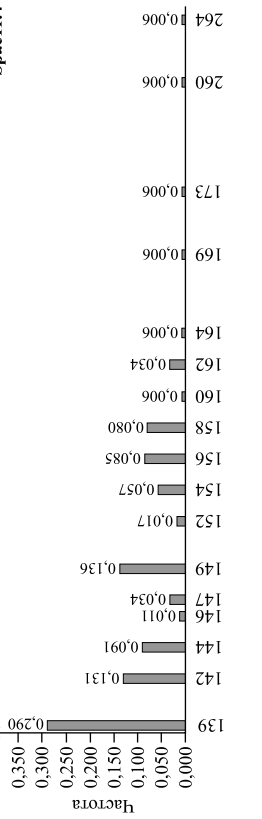
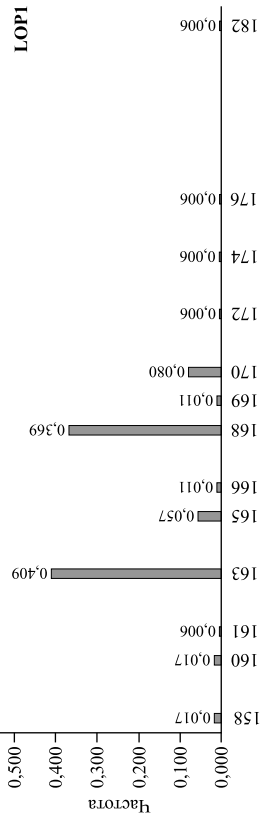
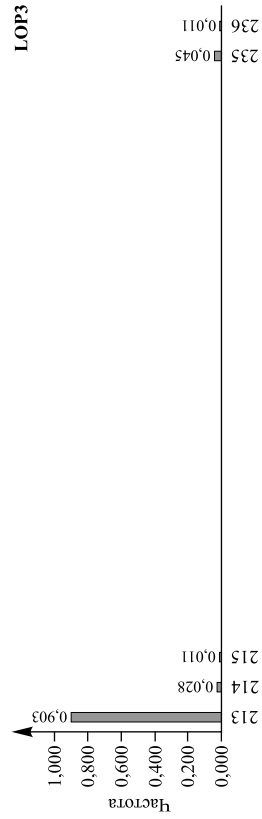
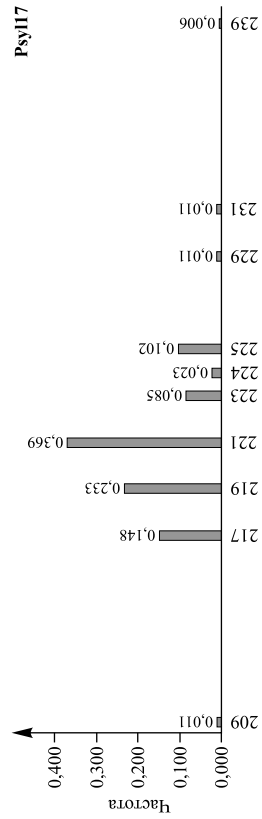
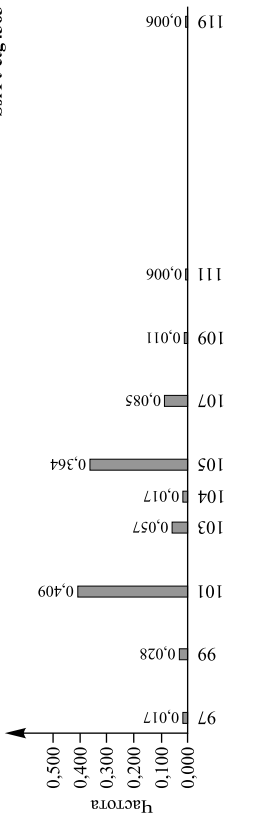
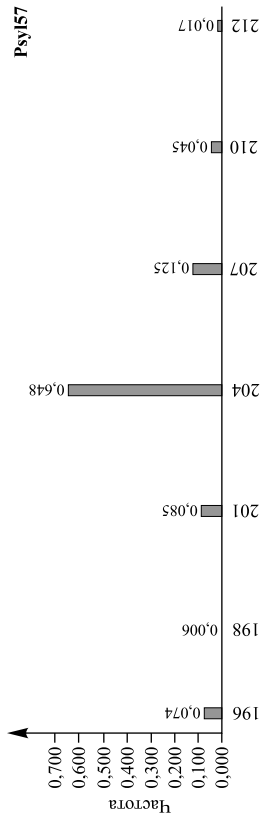
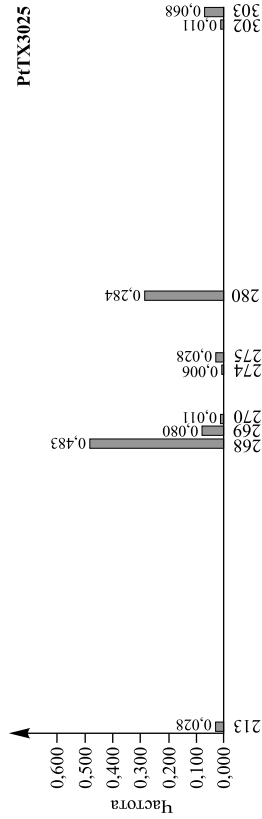
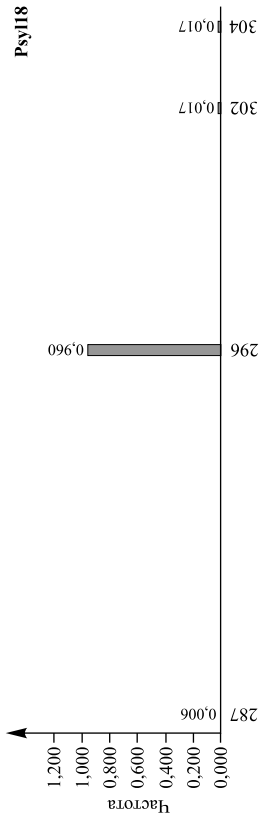
Criminalistic parameters of the six most promising Scots pine microsatellites markers

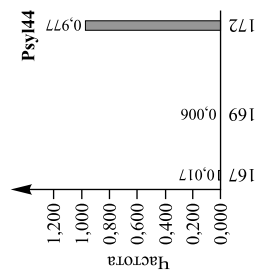
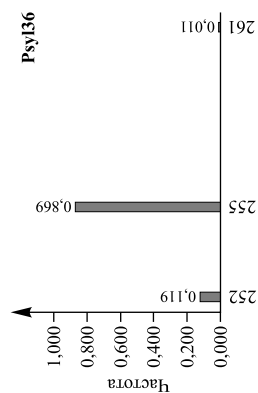
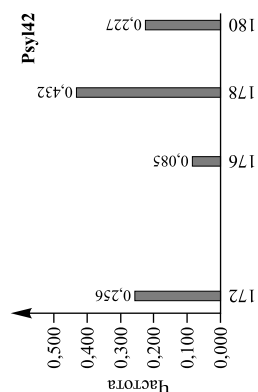
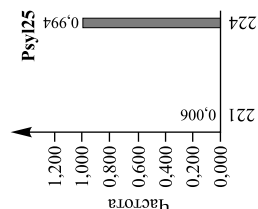
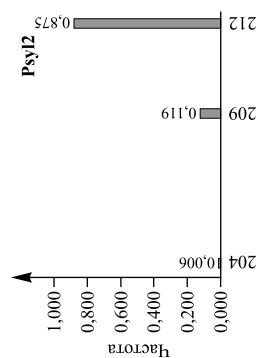
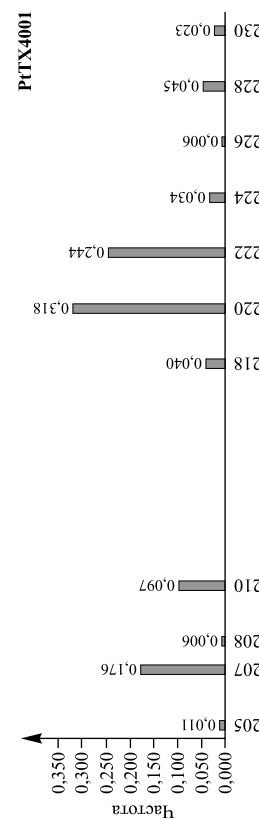
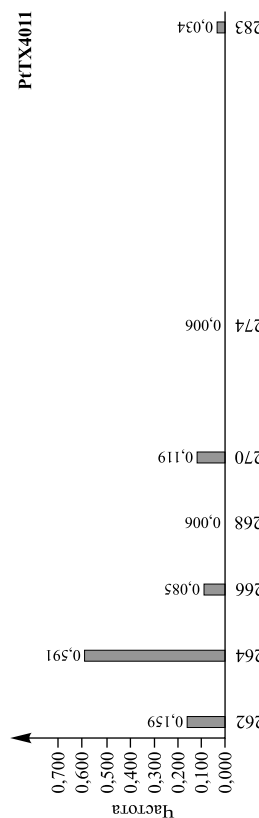
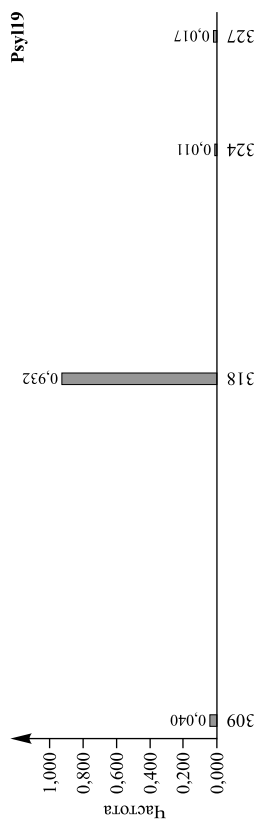
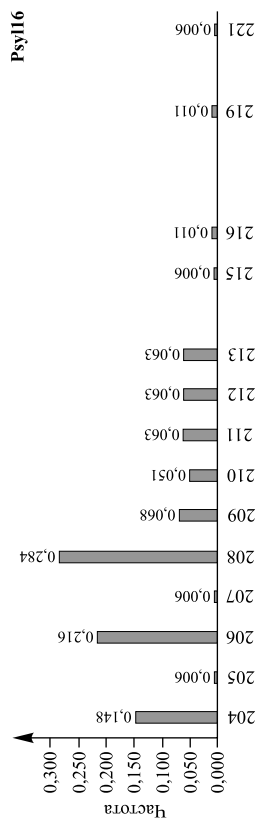
Маркер	PIC	PE	PD
Psyl17	0,7376	0,4533	0,9093
Psyl42	0,6344	0,3841	0,8468
PtTX4001	0,7653	0,4905	0,9228
SsrPt-ctg4363	0,6368	0,3521	0,8520
Spac11.4	0,8384	0,7447	0,9527
Psyl57	0,5233	0,1976	0,7624

Примечание. PIC – информационное содержание полиморфизма; PE – исключаящий потенциал; PD – дискриминирующий потенциал.

Исследование уровня генетической подразделенности популяций сосны обыкновенной методом молекулярной дисперсии (AMOVA) на основе генотипов в формате шести локусов показало, что большая часть общей генетической вариативности обусловлена изменчивостью внутри популяции, достигающей 99,0 %, межпопуляционная изменчивость при этом составляет 1,0 % (при $p < 0,05$).

В целях оценки применимости тестируемых маркеров для установления в экспертной практике места произрастания отдельных растений проведен кластерный анализ белорусской популяции сосны с использованием программного средства *Structure 2.3.4* и последующей обработкой результатов в программе *Structure Harvester*. Установлено, что исследованные выборки сосны образуют единый кластер. Скорее всего, это является следствием недостаточности полиморфизма генотипов из шести локусов для выявления генетической вариативности регионального характера.





Распределение частот встречаемости аллелей
17 микросателлитных маркеров сосны обыкновенной
Allele frequency distribution by 17 microsatellite markers

Заключение

В результате анализа генетического разнообразия сосны обыкновенной, произрастающей на территории Республики Беларусь, показана принципиальная возможность использования системы из шести микросателлитных маркеров (Psl17, Psl42, PtTX4001, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psl157) для ДНК-идентификации растений в судебно-экспертной практике при сопровождении дел о незаконных рубках, незаконном уничтожении, изъятии или повреждении лесных насаждений. Отобранные в ходе исследования маркеры являются высокоинформативными для криминалистического ДНК-анализа сосны обыкновенной и имеют значения информационного содержания полиморфизма выше 0,52. Для большинства из указанных ДНК-маркеров в белорусской популяции сосны зарегистрированы микроварианты, которые могут рассматриваться как потенциальный источник повышения дискриминирующей силы SSR-маркеров. Использование комплекса из шести микросателлитных локусов ядерной ДНК позволяет достигнуть значения совокупного дискриминирующего потенциала 0,999 998 2. В то же время рассчитанная вероятность случайного совпадения $1,781\,617 \cdot 10^{-6}$, соответствующая вероятности случайного совпадения генотипов для 1 из 561 288 растений, является недостаточной для однозначной идентификации растений, учитывая общий размер популяции сосны обыкновенной в Республике Беларусь. В связи с этим вопрос о формировании системы маркеров, информативных для экспертного сопровождения дел в сфере рационального природопользования, нелегального оборота древесины и лесопroduкции хвойных пород, остается открытым и требует дальнейшей работы по поиску перспективных SSR-маркеров в дополнение к комплексу из отобранных шести локусов (Psl17, Psl42, PtTX4001, SsrPt-ctg4363, Spac11.4, Psl157).

Библиографические ссылки

1. Nowakowska JA. Application of DNA markers against illegal logging as a new tool for the Forest Guard Service. *Folia Forestalia Polonica. Series A: Forestry*. 2011;53(2):142–149. DOI: 10.5281/zenodo.30813.
2. Eriksson G, Ekberg I. *An introduction to forest genetics*. Uppsala: SLU; 2001. 166 p.
3. Гладков ЮФ, Шейкина ОВ. Генетический полиморфизм деревьев сосны обыкновенной из смежных болотной и сухо-дольной ценопопуляций по ядерным микросателлитным локусам. *Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: Лес. Экология. Природопользование*. 2019;4:70–79. DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.70.
4. Торбик ДН, Бедрицкая ТВ, Власова ММ, Синельников ИГ. Генетическое разнообразие естественных популяций *Pinus sylvestris*. В: Демидова НА, редактор. *Наука – лесному хозяйству Севера*. Архангельск: [б. и.]; 2019. с. 91–99.
5. Danusevičius D, Kavaliauskas D, Fussi B. Optimum sample size for SSR-based estimation of representative allele frequencies and genetic diversity in Scots pine populations. *Baltic Forestry*. 2016;22(2):194–202.
6. Hebda A, Wójkiewicz B, Wachowiak W. Genetic characteristics of Scots pine in Poland and reference populations based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Silva Fennica*. 2017;51(2):1721. DOI: 10.14214/sf.1721.
7. Nowakowska JA, Zachara T, Konecka A. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. *Leśne Prace Badawcze*. 2014;75(1):47–54. DOI: 10.2478/frp-2014-0005.
8. Máchová P, Cvrčková H, Poláková L, Trčková O. Genetická variabilita vybraných populací Borovice Lesní v České Republice. *Zprávy Lesnického Výzkumu*. 2016;61(3):223–229.
9. Падутов АВ. Изучение генетической структуры полусибирского потомства клонов сосны обыкновенной на лесосеменных плантациях II порядка (краткое сообщение). В: Кильчевский АВ, Хотылёва ЛВ, Вильчук КУ, Гриб СИ, Давыденко ОГ, Евтушенков АН и др., редакторы. *Молекулярная и прикладная генетика. Том 25*. Минск: Институт генетики и цитологии НАН Беларуси; 2018. с. 92–98.
10. Шилкина ЕА, Ибе АА, Шеллер МА, Сухих ТВ. Использование методов ДНК-анализа в экспертизе незаконного оборота древесины. *Сибирский лесной журнал*. 2019;3:64–70. DOI: 10.15372/SJFS20190308.
11. Sebastiani F, Pinzauti F, Kujala ST, González-Martínez SC, Vendramin GG. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(2):231–234. DOI: 10.1007/s12686-011-9513-5.
12. Auckland LD, Bui T, Zhou Y, Shepherd M, Williams CG. *Conifer microsatellite handbook*. Raleigh: Corporate Press; 2002. 57 p.
13. Soranzo N, Provan J, Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*. 1998;7(9):1260–1261.
14. Chagné D, Chaumeil P, Ramboer A, Collada C, Guevara A, Cervera MT, et al. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(6):1204–1214. DOI: 10.1007/s00122-004-1683-z.
15. Liewlaksaneeyanawin C, Ritland CE, El-Kassaby YA, Ritland K. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(2):361–369. DOI: 10.1007/s00122-004-1635-7.
16. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
17. Ristow PG, D’Amato ME. Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT): a streamlined workflow for forensic statistics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017;6:e52–e54. DOI: 10.1016/j.fsigs.2017.09.006.
18. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
19. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995;86(3):248–249. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.

20. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
21. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. 2005;1:47–50. DOI: 10.1177/117693430500100003.
22. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.

References

1. Nowakowska JA. Application of DNA markers against illegal logging as a new tool for the Forest Guard Service. *Folia Forestalia Polonica. Series A: Forestry*. 2011;53(2):142–149. DOI: 10.5281/zenodo.30813.
2. Eriksson G, Ekberg I. *An introduction to forest genetics*. Uppsala: SLU; 2001. 166 p.
3. Gladkov YuF, Sheikina OV. Genetic polymorphism of the *Pinus sylvestris* trees from bog land and upland cenopopulations on nuclear SSR loci. *Vestnik of Volga State University of Technology. Series: Forest. Ecology. Nature Management*. 2019;4:70–79. Russian. DOI: 10.25686/2306-2827.2019.4.70.
4. Torbik DN, Bedrickaya TV, Vlasova MM, Sinelnikov IG. Genetic diversity of natural populations of *Pinus sylvestris*. In: Demidova NA, editor. *Nauka – lesnomu khozyaystvu Severa* [Science – forestry of the North]. Arkhangelsk: [s. n.]; 2019. p. 91–99. Russian.
5. Danusevičius D, Kavaliauskas D, Fussi B. Optimum sample size for SSR-based estimation of representative allele frequencies and genetic diversity in Scots pine populations. *Baltic Forestry*. 2016;22(2):194–202.
6. Hebda A, Wójcikiewicz B, Wachowiak W. Genetic characteristics of Scots pine in Poland and reference populations based on nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Silva Fennica*. 2017;51(2):1721. DOI: 10.14214/sf.1721.
7. Nowakowska JA, Zachara T, Konecka A. Genetic variability of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) and Norway spruce (*Picea abies* L. Karst.) natural regeneration compared with their maternal stands. *Leśne Prace Badawcze*. 2014;75(1):47–54. DOI: 10.2478/frp-2014-0005.
8. Máchová P, Cvrčková H, Poláková L, Trčková O. Genetická variabilita vybraných populací Borovice Lesní v České Republice. *Zprávy Lesnického Výzkumu*. 2016;61(3):223–229.
9. Padutov AV. Study of the genetic half-sib progeny structure of Scots pine clones on forest-seed order II orchards (short report). In: Kil'chevskii AV, Khotyleva LV, Vil'chuk KU, Grib SI, Davydenko OG, Evtushenkov AN, et al., editors. *Molekulyarnaya i prikladnaya genetika. Tom 25* [Molecular and applied genetics. Volume 25]. Minsk: Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus; 2018. p. 92–98. Russian.
10. Shilkina EA, Ibe AA, Sheller MA, Sukhikh TV. Using methods of DNA-analysis in the examination of the illegal timber trade. *Sibirskii lesnoi zhurnal*. 2019;3:64–70. Russian. DOI: 10.15372/SJFS20190308.
11. Sebastiani F, Pinzauti F, Kujala ST, González-Martínez SC, Vendramin GG. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. *Conservation Genetics Resources*. 2012;4(2):231–234. DOI: 10.1007/s12686-011-9513-5.
12. Auckland LD, Bui T, Zhou Y, Shepherd M, Williams CG. *Conifer microsatellite handbook*. Raleigh: Corporate Press; 2002. 57 p.
13. Soranzo N, Provan J, Powell W. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. *Molecular Ecology*. 1998;7(9):1260–1261.
14. Chagné D, Chaumeil P, Ramboer A, Collada C, Guevara A, Cervera MT, et al. Cross-species transferability and mapping of genomic and cDNA SSRs in pines. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(6):1204–1214. DOI: 10.1007/s00122-004-1683-z.
15. Liewlaksaneeyanawin C, Ritland CE, El-Kassaby YA, Ritland K. Single-copy, species-transferable microsatellite markers developed from loblolly pine ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*. 2004;109(2):361–369. DOI: 10.1007/s00122-004-1635-7.
16. Peakall R, Smouse PE. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537–2539. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts460.
17. Ristow PG, D'Amato ME. Forensic statistics analysis toolbox (FORSTAT): a streamlined workflow for forensic statistics. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*. 2017;6:e52–e54. DOI: 10.1016/j.fsigss.2017.09.006.
18. Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*. 1998;7(5):639–655. DOI: 10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x.
19. Raymond M, Rousset F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*. 1995;86(3):248–249. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a111573.
20. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535–538. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x.
21. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*. 2005;1:47–50. DOI: 10.1177/117693430500100003.
22. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155(2):945–959. DOI: 10.1093/genetics/155.2.945.

Получена 20.09.2021 / исправлена 20.01.2022 / принята 03.02.2022.
Received 20.09.2021 / revised 20.01.2022 / accepted 03.02.2022.

Авторы:

Анастасия Сергеевна Парфёнова – стажер младшего научного сотрудника сектора криминалистической идентификации биологических объектов научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Authors:

Nastassia S. Parfionava, probationer of junior researcher at the sector forensic identification of biological objects, laboratory of molecular biological research.
anastaciaparfionova@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3573-3039>

Сергей Александрович Полевой – стажер младшего научного сотрудника сектора криминалистической идентификации биологических объектов научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Елена Александровна Спивак – младший научный сотрудник лаборатории психолого-лингвистических исследований научного отдела речеведческих и экономических исследований.

Александра Евгеньевна Гребенчук – младший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории молекулярно-биологических исследований.

Анна Николаевна Хох – заведующий лабораторией исследования материалов, веществ и изделий научного отдела технических, криминалистических и специальных исследований.

Светлана Александровна Котова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории технических и криминалистических исследований научного отдела технических, криминалистических и специальных исследований.

Siarhei A. Paliavoi, probationer of junior researcher at the sector forensic identification of biological objects, laboratory of molecular biological research.

ultrabook@tut.by

<https://orcid.org/0000-0002-0647-152X>

Alena A. Spivak, junior researcher at the laboratory of psychological and linguistic research, scientific department of speech and economic research.

spivak_e@inbox.ru

<https://orcid.org/0000-0003-0062-7340>

Aliaksandra E. Hrebianchuk, junior researcher at the laboratory of molecular biological research.

iamsanya94@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1224-3275>

Anna N. Hoh, head of the laboratory research of materials, substances and products, scientific department of technical, forensic and special research.

Iann1hoh@gmail.com

<https://orcid.org/0000-0003-4633-0163>

Sviatlana A. Kotava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of technical and forensic research, scientific department of technical, forensic and special research.

svetlkotova@mail.ru

<https://orcid.org/0000-0002-6521-7732>
