ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО

ПО ТЕХНИЧЕСКОМУ РЕГУЛИРОВАНИЮ И МЕТРОЛОГИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ГОСТ Р 72619— 2026

Биотехнология

ПАСПОРТИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЛЕСНЫХ НАСАЖДЕНИЙ, ОБЪЕКТОВ ЛЕСНОГО СЕМЕНОВОДСТВА, РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА ОСНОВНЫХ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Издание официальное

Москва
Российский институт стандартизации
2026

Предисловие

1 РАЗРАБОТАН Федеральным бюджетным учреждением «Российский центр защиты леса» (ФБУ «Рослесозащита»)

2 ВНЕСЕН Техническим комитетом по стандартизации ТК 326 «Биотехнологии»

3 УТВЕРЖДЕН И ВВЕДЕН В ДЕЙСТВИЕ Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 13 апреля 2026 г. № 356-ст

4 ВВЕДЕН ВПЕРВЫЕ

Правила применения настоящего стандарта установлены в статье 26 Федерального закона от 29 июня 2015 г. № 162-ФЗ «О стандартизации в Российской Федерации». Информация об изменениях к настоящему стандарту публикуется в ежегодном (по состоянию на 1 января текущего года) информационном указателе «Национальные стандарты», а официальный текст изменений и поправок — в ежемесячном информационном указателе «Национальные стандарты». В случае пересмотра (замены) или отмены настоящего стандарта соответствующее уведомление будет опубликовано в ближайшем выпуске ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты». Соответствующая информация, уведомление и тексты размещаются также в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет (www.rst.gov.ru)

© Оформление. ФГБУ «Институт стандартизации», 2026

Настоящий стандарт не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии

Содержание

1 Область применения 1
2 Нормативные ссылки 1
3 Термины, определения и сокращения 2
4 Общие требования, порядок проведения работ, условия выполнения измерений 7
4.6 Результаты паспортизации на примере ели европейской 8
4.7 Применение мономолекулярных методов полимеразной цепной реакции 8
4.8 Два метода стандартной паспортизации лесных пород 9
5 Отбор образцов для проведения паспортизации с использованием метода молекулярно-генетического анализа 10
5.1 Отбор образцов семенного биоматериала 10
5.2 Отбор образцов посадочного материала из лесных питомников и лесных культур 10
5.3 Отбор образцов биоматериала (хвоя, листья, древесина) с объектов лесного семеноводства 10
5.4 Отбор образцов хвои и листьев лесных растений в естественных насаждениях 11
5.5 Транспортировка и хранение образцов 12
6 Требования к условиям проведения ДНК-исследований 14
6.1 Требования к персоналу (квалификации сотрудников) 14
6.2 Требования к соблюдению безопасности и охраны окружающей среды 14
6.3 Требования к оснащенности помещений для проведения работ 14
6.4 Требования к соблюдению стерильности проведения молекулярно-генетических анализов 15
7 Методы проведения ДНК-исследований 17
7.1 Подготовка к проведению анализа: регистрация, стерилизация 17
7.2 Подготовка аналитических проб растительного материала 17
7.3 Выделение ДНК 18
7.4 Проведение полимеразной цепной реакции с микросателлитными, митохондриальными или хлоропластными праймерами с разделением и визуализацией полимеразной цепной реакции продукта на камерах вертикального/горизонтального электрофореза или на генетическом анализаторе 19
7.5 Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, полученных в результате полимеразной цепной реакции 21
7.6 Получение и оформление результатов исследований. Аналитическая обработка, внесение в базу генетических данных 29
Приложение А (справочное) Буферы, растворы 32
Приложение Б (справочное) Составы смесей полимеразных цепных реакций для проведения амплификации 34
Приложение В (справочное) Форма перечня праймеров для генетической паспортизации насаждений лесообразующих пород, объектов лесного семеноводства, репродуктивного материала лесных растений 35
Приложение Г (справочное) Режимы амплификации полимеразной цепной реакции для разных родов древесных пород 41
Приложение Д (справочное) Электрофорез в полиакриламидном и агарозном гелях 49
Приложение Е (справочное) Пример определения структуры ДНК с использованием генетических анализаторов, обработка и интерпретация полученных результатов в программе GeneMapper 51
Приложение Ж (рекомендуемое) Формы (бланки) генетических паспортов плюсовых деревьев лесных пород, объектов лесного семеноводства, партий репродуктивного материала, созданных на основе молекулярно-генетического анализа 57
Библиография 68

Введение

Наиболее эффективными и перспективными методами изучения генотипов (гаплотипов) являются методы, основанные на анализе молекул ДНК.

Выполнение установленных настоящим стандартом требований обеспечивается для реализации задач в рамках мониторинга санитарного и лесопатологического состояния лесных насаждений, а также мониторинга воспроизводства лесов.

Работы с использованием стандарта позволяют определять генетические особенности биоматериала основных лесообразующих древесных пород в лесных питомниках, объектах лесного семеноводства и лесных насаждениях.

Генетическая паспортизация насаждений основных лесообразующих пород осуществляется в целях:

- формирования массива генетических данных основных лесообразующих пород в естественных условиях среды, выявления уровня генетической изменчивости и их биологической устойчивости;
- обеспечения оценки состояния лесных генетических ресурсов при осуществлении государственного мониторинга воспроизводства лесов и государственного лесопатологического мониторинга на основе генетических данных основных лесообразующих пород;
- обеспечения контроля за выращиванием и оборотом репродуктивного материала лесных растений при воспроизводстве лесов;
- обеспечения федерального государственного надзора в сфере транспортирования, хранения древесины, производства продукции переработки древесины и учета сделок с ними;
- идентификации родов (пород)/видов древесных лесных растений — для паспортизации и подбора родительских пар для гибридизации;
- оценки генетического разнообразия, вариативности внутри и между популяциями, что необходимо для сохранения генетического биоразнообразия и программ селекции;
- поиска ассоциаций генотипов древесных растений с хозяйственно ценными признаками.

Определяемый показатель — аллельные варианты или фрагменты генетической последовательности биоматериала основных древесных лесообразующих пород из лесных насаждений, лесных питомников или плантаций, определенные путем выполнения ДНК-анализа, которые используется для составления генетической характеристики лесного насаждения или объекта лесного семеноводства, партий семян, сеянцев, саженцев, для составления паспортов объектов.

Цель анализа — создание генетического паспорта лесного древесного растения/лесного насаждения/лесосеменного объекта:

- для идентификации вида/подвида;
- установления/подтверждения происхождения древесины (географическая привязка);
- оценки легальности заготовки древесины основных лесообразующих пород;
- контроля за оборотом репродуктивного материала основных лесообразующих пород;
- сохранения генетического биоразнообразия основных лесообразующих пород.

Методика определения аллельных вариантов или фрагментов ДНК-последовательности биоматериала образцов древесных пород из древостоя в насаждениях и лесных питомниках методом ДНК-анализа является основой для формирования массива данных генетических характеристик основных лесообразующих пород для установления внутривидового разнообразия и границ ареалов ряда основных лесообразующих пород в Российской Федерации (в частности, сосны, ели, лиственницы, дуба), которые в настоящее время не подтверждены генетическими методами. При этом очевидно, что в XXI веке невозможно осуществлять работы по сохранению генетических ресурсов лесов с использованием систематики видов лесных растений, основанной исключительно на морфологических признаках (см. рисунок 1).

На основе полученных массивов генетических данных и частот аллелей локусов могут быть построены популяционные карты ареалов основных лесообразующих пород, с помощью которых с разной степенью вероятности можно определять и прогнозировать происхождение биологического материала и прогнозировать степень устойчивости популяций (см. [1], [2]).

Для решения поставленных задач, а также для установления границ лесосеменных районов указанных пород и их внутривидовой дифференциации (подвиды, экотипы, популяции) генетическими ме-

тодами принято использование данных анализа как ядерной ДНК (гетерозиготность), так и ДНК хлоропластов (хлДНК) или митохондрий (мтДНК), что позволит обеспечивать:

- создание массива данных (референсная база) генетических данных основных древесных лесообразующих пород;
- достижение повышения эффективности контроля происхождения биологического материала лесных растений (семян, сеянцев, саженцев, круглой древесины, пиломатериалов, изделий из них) для соблюдения легальности их оборота в рамках лесосеменного районирования (см. [3]—[9]).

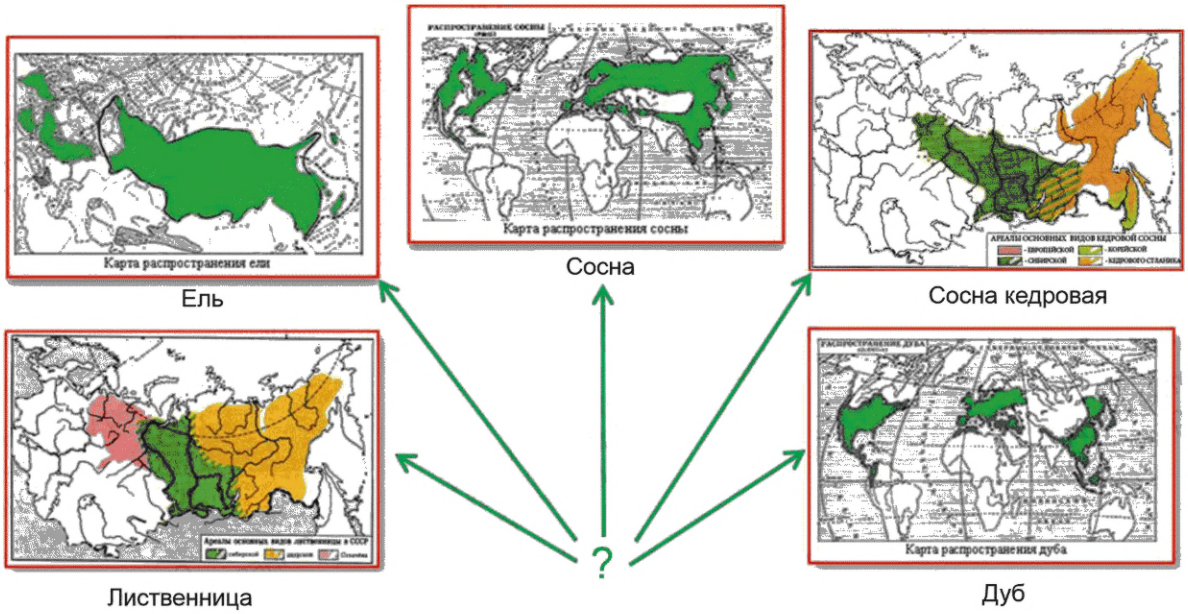


Рисунок 1 — Ареалы распространения основных лесообразующих пород (определены без применения генетических методов)

Создание массива генетических данных направлено на определение/подтверждение мест происхождения репродуктивного материала (семян, сеянцев и саженцев) растений лесных пород и образцов древесины и может быть использовано в лесном хозяйстве:

- для обеспечения контроля выполнения правил лесосеменного районирования;
- установления принадлежности партии семян селекционной категории (нормальные или улучшенные);
- сертификации на генном уровне лесных семян и посадочного материала по месту географического происхождения;
- идентификации и установления фактического размещения рамет клонов плюсовых деревьев в объектах лесного семеноводства для аттестации их сохранности;
- создания новых лесосеменных объектов под генетическим контролем;
- определения методом сравнительного анализа соответствующих выборок принадлежности лесоматериалов соответствующей лесосеке или принадлежности фрагментов древесины соответствующему дереву;
- установления видов и подвидов в систематике растений.

НАЦИОНАЛЬНЫЙ СТАНДАРТ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Биотехнология

ПАСПОРТИЗАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ЛЕСНЫХ НАСАЖДЕНИЙ, ОБЪЕКТОВ ЛЕСНОГО СЕМЕНОВОДСТВА, РЕПРОДУКТИВНОГО МАТЕРИАЛА ОСНОВНЫХ ЛЕСООБРАЗУЮЩИХ ДРЕВЕСНЫХ ПОРОД С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

Biotechnology.
Genetic certification of forest plantations, forest seed production facilities, and reproductive material of the main forest-forming tree species using the method of molecular genetic analysis

Дата введения — 2026—09—01

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает общие требования к проведению работ по генетическому исследованию, которое изучает структуру и функции молекул ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), а также варианты отдельных генов (ДНК-анализ) образцов биоматериала основных лесообразующих пород на основе полимеразной цепной реакции.

Настоящий стандарт применяют с использованием молекулярно-генетических методов анализов в целях:

- определения масс фрагментов генетической последовательности на биоматериале основных лесообразующих пород в лесных насаждениях, плантациях, в лесных питомниках и на семенном материале;
- определения распределений генотипов [анализ соотношения различных генотипов (комбинаций аллелей) в популяции];
- определения показателей внутрипопуляционной изменчивости насаждений или партий репродуктивного материала [при помощи расчетов — частот выявленных аллелей, наблюдаемой и ожидаемой гетерозиготности, среднего числа аллелей на локус, полиморфизма (процент полиморфных локусов) на основании наблюдаемых распределений генотипов];
- оценки внутривидовой изменчивости;
- расчета показателей межпопуляционной изменчивости коэффициента статистики Райта, генетического сходства, генетического расстояния;
- расчета показателей внутривидового генетического разнообразия — коэффициентов инбридинга особей, субпопуляции;
- сравнения генетического образца древесного материала неизвестного происхождения с референсной базой для определения сходства с локальными популяциями;
- определения принадлежности растения к популяции и пр.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте использованы нормативные ссылки на следующие стандарты:

ГОСТ 12.1.004 Система стандартов безопасности труда. Пожарная безопасность. Общие требования

ГОСТ 12.1.007 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности

Издание официальное

ГОСТ 12.1.019 Система стандартов безопасности труда. Электробезопасность. Общие требования и номенклатура видов защиты

ГОСТ 12.4.009 Система стандартов безопасности труда. Пожарная техника для защиты объектов. Основные виды. Размещение и обслуживание

ГОСТ 12.4.103 Система стандартов безопасности труда. Одежда специальная защитная, средства индивидуальной защиты ног и рук. Классификация

ГОСТ 12.4.253 (EN 166:2002) Ситема стандартов безопасности труда. Средства индивидуальной защиты глаз. Общие технические требования

ГОСТ 12430—2019 Карантин растений. Методы и нормы отбора образцов подкарантинной продукции при карантинном фитосанитарном досмотре и лабораторных исследованиях

ГОСТ 13056.1 Семена деревьев и кустарников. Отбор образцов

ГОСТ ISO/IEC 17025 Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий

ГОСТ Р 53214—2008 (ИСО 24276:2006) Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Общие требования и определения

ГОСТ Р ИСО 20395 Биотехнология. Требования к оценке эффективности методов количественного определения последовательностей нуклеиновых кислот-мишеней. Количественная ПЦР и цифровая ПЦР

ГОСТ Р ИСО 21571 Продукты пищевые. Методы анализа для обнаружения генетически модифицированных организмов и полученных из них продуктов. Экстракция нуклеиновых кислот

Примечание — При пользовании настоящим стандартом целесообразно проверить действие ссылочных стандартов в информационной системе общего пользования — на официальном сайте Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии в сети Интернет или по ежегодному информационному указателю «Национальные стандарты», который опубликован по состоянию на 1 января текущего года, и по выпускам ежемесячного информационного указателя «Национальные стандарты» за текущий год. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана недатированная ссылка, то рекомендуется использовать действующую версию этого стандарта с учетом всех внесенных в данную версию изменений. Если заменен ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, то рекомендуется использовать версию этого стандарта с указанным выше годом утверждения (принятия). Если после утверждения настоящего стандарта в ссылочный стандарт, на который дана датированная ссылка, внесено изменение, затрагивающее положение, на которое дана ссылка, то это положение рекомендуется применять без учета данного изменения. Если ссылочный стандарт отменен без замены, то положение, в котором дана ссылка на него, рекомендуется применять в части, не затрагивающей эту ссылку.

3 Термины, определения и сокращения

3.1 Термины и определения

В настоящем стандарте применены следующие термины с соответствующими определениями:

3.1.1 **акриламид (2-пропенамид):** Амид акриловой кислоты, мономер, применяемый для создания полимеров (полиакриламиды).

Примечание — Используется как гелевая среда в хроматографии и электрофорезе.

3.1.2

аллель: Одно из возможных альтернативных структурных состояний/форм гена или участка ДНК конкретной локализации.

Примечание — Аллели, как правило, отличаются последовательностями нуклеотидов.

[Адаптировано из ГОСТ 34833—2022, статья 1]

3.1.3

ампликон: Нуклеотидная последовательность ДНК, размноженная с помощью ПЦР.
[ГОСТ 34833—2022, статья 2]

Примечание — Используется взаимозаменяемо с общепринятыми лабораторными терминами, такими как «продукт ПЦР».

3.1.4

амплификация: Процесс накопления копий определенной нуклеотидной последовательности во время полимеразной цепной реакции.

[ГОСТ 34833—2022, статья 3]

Примечание — Под амплификацией также понимают увеличение числа копий фрагмента ДНК.

3.1.5 **биоматериалы:** Ткани частей растения — хвоя, листья, зеленые части побегов, древесина, проростки семян — или производимая ими субстанция.

3.1.6 **вертикальный электрофорез;** ВЭФ: Метод разделения заряженных макромолекул (белков, нуклеиновых кислот, их фрагментов) под действием электрического поля в полиакриламидном геле за счет различий заряда разделяемых молекул, отличий молекулярных масс, а также конфигураций молекул.

3.1.7

гаплотип: Комбинация связанных друг с другом аллелей на одной хромосоме индивидуума.

[ГОСТ 34833—2022, статья 10]

3.1.8 **гель:** Поддерживающая среда для электрофореза, обладающая свойствами молекулярного сита.

Примечание — Свое название гели получают в зависимости от главного компонента, используемого для его приготовления, например, агарозный или полиакриламидный.

3.1.9 **ген** (в генетике): Участок молекулы ДНК, который содержит информацию, необходимую для синтеза определенного белка или функциональной молекулы РНК.

3.1.10 **геном:** Совокупность наследственного материала, заключенного в клетке организма.

3.1.11 **генотип:** Совокупность всех генов (аллелей) отдельной особи, взаимодействующих между собой.

Примечание — Также под генотипом понимается генетическая структура организма по одному или нескольким изучаемым генным локусам.

3.1.12 **генотипирование (ДНК-типирование):** Определение особенностей генотипа организма путем анализа ДНК его генома.

Примечания

1 В качестве синонимов также применяются понятия «генетическое типирование» и «типирование ДНК».

2 В процессе ДНК-типирования определяют особенности первичной структуры ДНК исследуемого организма в конкретных генетических локусах. У каждого вида организмов имеется большое число внутривидовых различий в первичной структуре ДНК отдельных генетических локусов.

3.1.13 **Государственный лесопатологический мониторинг;** ГЛПМ: Система наблюдений за санитарным и лесопатологическим состоянием лесов, а также за происходящими в них процессами и явлениями.

3.1.14 **Государственный мониторинг воспроизводства лесов;** ГМВЛ: Система наблюдений за состоянием лесов, требующих воспроизводства, и лесов, в которых проводится их воспроизводство, а также анализа, оценки и прогноза изменения их состояния.

3.1.15 **географические лесные культуры:** Географические лесные культуры, опытные культуры лесных древесных растений, созданные с использованием семенного или посадочного материала разного географического происхождения в однородных условиях среды или одного происхождения в разных географических районах.

Примечание — Географические культуры служат для расширения генофонда главнейших лесообразующих пород. Прием географических культур особенно ценен для древесных пород (сосна обыкновенная, сосна кедровая сибирская, ель европейская, лиственница сибирская и др.), ареалы которых занимают обширные территории в разных лесорастительных зонах, обусловливая широту географической изменчивости для более обширного представления получаемой информации об успешности адаптации, энергии роста и развитии географических экотипов в новых климатических и эдафических условиях, установлении границ возможного перенесения семян.

3.1.16

гетерозиготность: Состояние, при котором на гомологичных хромосомах организма находятся разные аллели того или иного участка ДНК.
[ГОСТ Р 57343—2016, статья 18]

3.1.17

гомозиготность: Состояние, при котором на гомологичных хромосомах организма находятся одинаковые аллели того или иного участка ДНК.
[ГОСТ Р 57343—2016, статья 20]

3.1.18 **дезоксирибонуклеиновая кислота;** ДНК: Материальный носитель наследственности, являющийся биологическим полимером, молекула которого построена из двух спиральных полинуклеотидных цепей.

3.1.19

митохондриальная ДНК; мтДНК: Кольцевая двунитевая молекула ДНК, входящая в состав митохондрий.
[ГОСТ 34833—2022, статья 41]

Примечание — Генетический материал, находящийся в митохондриях, специализированных органеллах клеток эукариот. Митохондриальная ДНК содержится во всех клетках организма, поэтому для генетического анализа (экспертизы) подходит любой биологический материал, в котором сохранились хотя бы единичные ядерные клетки или остатки их цитоплазматического материала.

3.1.20 **хлоропластная ДНК;** хлДНК: ДНК, содержащаяся в хлоропластах, генетических элементах клетки растений.

Примечание — Представлена двуцепочечными кольцевыми молекулами, содержит около 140 генов, в т. ч. обеспечивающих синтез белка в органеллах и участвующих в процессе фотосинтеза.

3.1.21

ядерная ДНК: ДНК, содержащаяся в ядре эукариотических организмов.
[ГОСТ 34833—2022, статья 70]

3.1.22 **интеркаляторы:** Вещества, способные встраиваться (интеркалировать) между основаниями ДНК.

Примечание — Интеркаляторы могут встраиваться в двойную спираль ДНК, препятствовать репликации и транскрипции. Выступать в роли интеркаляторов могут некоторые красители [производные фенантридина (бромид этидия), акридина (9-аминоакридин, акридиновый оранжевый].

3.1.23 **интеркаляция:** Обратимое включение молекулы или группы между другими молекулами или группами.

3.1.24

лесные культуры: Лесные насаждения, созданные посевом или посадкой.
[ГОСТ 17559—82, статья 1]

3.1.25

лесной посадочный материал: Древесные растения или их части, предназначенные для посадки на лесокультурной площади, в лесном питомнике и (или) для озеленения.
[ГОСТ 17559—82, статья 11]

Примечание — Используется для проведения ДНК-анализа.

3.1.26 **локус:** Участок ДНК в хромосоме, где расположен ген или маркерная последовательность ДНК.

Примечание — Часто используется вместо термина «ген» или фрагмента ДНК с установленной локализацией.

3.1.27 **маркер молекулярной массы:** Набор фрагментов ДНК известной длины.

Примечание — Используется в качестве калибровочной шкалы для определения размера анализируемых в ходе электрофореза зон.

3.1.28 **нуклеотид:** Наименьшая структурная единица полимерных молекул рибонуклеиновой кислоты (РНК) и ДНК.

Примечание — Представляет собой сложное органическое соединение, в состав которого входят молекулы одного из азотистых оснований, пентозного сахара и остатков фосфорной кислоты.

3.1.29 **образец биоматериала растения:** Части растения, участвующие в фотосинтезе (хвоя, листья, зеленые части побегов), древесина, проростки семян.

3.1.30 **отжиг:** Процесс восстановления (ренатурация), называемый также гибридизацией, нуклеиновой кислоты, во время которого одноцепочечные полинуклеотиды образуют двуцепочечную молекулу с водородной связью между комплементарными нуклеотидами двух цепей.

3.1.31 **паспортизация насаждений (генетическая паспортизация насаждений древесных растений):** Процесс определения генетического состава (генотипа) растений и оформления этих данных в виде генетического паспорта.

Примечание — Паспортизация насаждений необходима для более точной идентификации видов/сортов/гибридов, особенно в условиях, когда визуальные отличия неопределимы.

3.1.32 **пара нуклеотидов;** п.н.: Элементарная единица полимерной двухцепочечной молекулы нуклеиновой кислоты, с помощью которой оценивается ее длина.

Примечание — В качестве синонима иногда используется термин «пара оснований (п.о.)».

3.1.33 **персональный компьютер;** ПК: Вычислительная техника универсального назначения для индивидуальной работы конечного пользователя.

3.1.34

полимеразная цепная реакция; ПЦР: Ферментативная реакция, позволяющая амплифицировать ДНК *in vitro*.

[ГОСТ Р 52833—2007, пункт 3.4.1]

3.1.35 **классический метод ПЦР:** Метод, позволяющий однозначно определить, встречается ли данная ДНК-последовательность в образце.

3.1.36 **ТД-ПЦР:** ПЦР, при которой происходит постепенное понижение температуры до более допустимой температуры отжига в ходе циклирования для исключения неспецифики.

3.1.37 **ПЦР в реальном времени:** ПЦР-РВ: Количественная ПЦР, позволяющая определять присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце и измерять количество ее копий.

3.1.38 **мультиплексная ПЦР:** Метод, позволяющий выявить в одной пробе сразу несколько последовательностей.

3.1.39 **полиморфизм:** Одновременное присутствие в популяции двух или нескольких генотипически и фенотипически отличающихся форм признака.

3.1.40 **генетический полиморфизм:** Явление существования в популяции полиморфных локусов, когда генетические локусы, выполняющие одну и ту же функцию (содержащие один и тот же ген или несколько генов), имеют различия по первичной структуре ДНК, т. е. полиморфны.

3.1.41

праймер: Короткий фрагмент нуклеиновой кислоты, являющийся синтетическим олигонуклеотидом, который применяется в полимеразной цепной реакции и при секвенировании ДНК для начала синтеза и обозначения границ фрагмента ДНК, подлежащего амплификации.

[ГОСТ 34833—2022, статья 55]

3.1.42

привитой лесной посадочный материал: Лесной посадочный материал, выращенный в результате прививки почек или побегов одного растения на другое.

[ГОСТ 17559—82, статья 15]

3.1.43 **программное обеспечение;** ПО: Набор программ, которые позволяют устройству (компьютеру, смартфону, планшету, прибору) выполнять определенные задачи.

3.1.44 **рамета:** Особь фитопопуляции, организм одного генетически идентичного клона, полученного при вегетативном размножении организма-предшественника.

3.1.45

стандартный лесной посадочный материал: Лесной посадочный материал, отвечающий требованиям нормативно-технической документации по стандартизации.

[ГОСТ 17559—82, статья 12]

3.1.46 **секвенирование:** Определение последовательности оснований в ДНК/РНК или аминокислот в белке.

3.1.47 **супернатант:** Жидкая фаза, остающаяся после того, как нерастворимые вещества осаждаются в процессе центрифугирования или седиментации.

3.1.48 **SNP-анализ:** Метод однонуклеотидной замены, когда требуется высокая точность.

3.1.49 **SSR-анализ:** Метод генетического анализа, основанный на полиморфизме микросателлитных последовательностей генома.

Примечание — SSR (Simple Sequence Repeats) — это короткие последовательности длиной от двух до шести нуклеотидов, тандемно-повторяющиеся в геноме несколько раз.

3.1.50 **SSR-профиль:** SSR-последовательности с высоким уровнем полиморфизма, т. е. варьированием между индивидуумами и видами из-за различий в числе единиц повтора в конкретном локусе SSR.

Примечание — Уникальные генетические профили, служат «отпечатками» для отдельных организмов или видов.

3.1.51 **Taq-полимераза:** Термостабильная полимераза, полученная из бактерии Termus aquaticus или с помощью генной инженерии на основе Taq-полимеразы «дикого» типа.

3.1.52 **фенотип:** Внешнее проявление свойств организма, зависящих от его генотипа и факторов окружающей среды.

3.1.53 **фланкирующие гены:** Последовательности ДНК, расположенные рядом с основной последовательностью гена.

Примечания

1 Термин «фланкирующие» означает «расположенные рядом», «на фланге».

2 Различают 5'- и 3'-фланкирующие последовательности, которые прилегают к основной последовательности с 5'- и 3'-конца полинуклеотидной цепи.

3.1.54 **фрагментный анализ;** ФА: Метод, при котором к специфичным фрагментам ДНК в ходе ПЦР присоединяется флуоресцентный краситель, а затем продукты реакции разделяются по размеру с помощью капиллярного электрофореза и сравниваются со стандартом длин.

3.1.55

электрофорез: Техника разделения, очистки и детекции макромолекул, основанная на различии скоростей их движения под воздействием электрического поля за счет направленного перемещения заряженных частиц в дисперсионной среде. [Адаптировано из ГОСТ 34833—2022, статья 69]

3.1.56 **элонгация:** Удлинение нуклеотидной цепи при проведении ПЦР путем добавления новых нуклеотидов (ДНК- или РНК-синтез) или аминокислотной цепи путем присоединения аминокислот.

3.1.57 **этидиум бромид (бромистый этидий):** Флуоресцентный краситель, способный интеркалировать (встраиваться) между парами оснований двухнитчатой ДНК и РНК.

Примечание — Комплекс нуклеиновой кислоты с красителем флуоресцирует под ультрафиолетовым (УФ) светом. Применяют в молекулярной биологии для выявления нуклеиновых кислот в процессе электрофореза ДНК в агарозном геле.

3.1.58 **mQ- (mili-Q-) вода:** Вода, очищенная от органических веществ, токсинов микроорганизмов и неорганических ионов с помощью ионообменной смолы и мембранных фильтров с удельным сопротивлением не менее 18 МОм/см (25 °С).

3.1.59 **ddH_2O:** Вода, прошедшая двойную дистилляцию, т. е. очищенная от примесей путем двух циклов испарения и конденсации.

3.1.60 **дезоксирибонуклеозидтрифосфат;** дНТФ (dNTP): нуклеотид-дезоксирибоза и трехфосфатные группы — строительный блок ДНК.

Примечание — Набор нуклеотидов необходим для синтеза ДНК в клетках и при проведении ПЦР.

3.2 Сокращения

АК — архив клонов;
АКА — 30 %-ный раствор акриламида и метиленбисакриламида;
ЛСП — лесосеменная плантация;
ОЛС — объекты лесного семеноводства;
ПААГ — полиакриламидный гель;
ПСА (PSA) — персульфат аммония;
ЦТАБ (CTAB) — цетилтриметиламмонийбромид;
ТРИС (TRIS) — трис (гидрокси-метил) аминометан [Tris (hydroxymethyl) aminomethane];
ЭДТА (EDTA) — этилендиаминтетрауксусная кислота (тетрауксусная кислота);
ТАЕ — трис-ацетат-ЭДТА буфер (Tris-acetat-EDTA buffer);
ТВЕ — трис-борат-ЭДТА буфер (Tris-borate-EDTA buffer);
ТЕМЕД (TEMED) — тетраметилендиамин (N, N, N`, N`-tetramethylenediamine).

4 Общие требования, порядок проведения работ, условия выполнения измерений

Настоящий раздел содержит общие требования, порядок (этапы) проведения работ, молекулярно-генетического анализа образцов основных лесообразующих пород, условия выполнения измерений.

4.1 К отбору образцов предъявляются следующие требования:

- тип образца: семена, листья, хвоя, древесина (предпочтительно свежий материал);
- стерильность (контаминационная чистота по ДНК): использование чистых инструментов (скальпели, перчатки) для исключения контаминации (смешение образцов ДНК);
- регистрация образцов;
- фиксация: заморозка в жидком азоте, в холодильнике при температуре от минус 20 °С до минус 80 °С или хранение в сухом состоянии/этаноле (для ДНК-стабильности).

4.2 Экстракцию ДНК осуществляют следующим методом:

- CTAB-методом (для образцов с высоким содержанием полифенолов);
- методом с готовыми наборами для выделения ДНК;
- для контроля качества и количества препарата ДНК — методом спектрофотомерии (если А260/А280 ~ 1,8—2,0 — проверка чистоты от белков и органики, то А260/230 — вторичный показатель чистоты от других примесей, поглощаюших на длине волны 230 нм);
- для проверки на деградацию ДНК — методом электрофореза в агарозном геле по ГОСТ Р ИСО 20395.

4.3 ПЦР применяют для проведения паспортизации лесных растений молекулярно-генетическими методами:

- ядерных микросателлитных ДНК (SSR — для популяционных исследований);
- хлоропластных ДНК (для видовой идентификации биоматериала растений);
- SNP-анализом (методом однонуклеотидной замены, когда требуется высокая точность).

Примечание — Условия проведения ПЦР и температурный профиль подбираются под конкретные маркеры.

4.4 Для проведения электрофореза применяют следующие методы:

- метод электрофореза в акриламидном геле;
- фрагментный анализ;
- капиллярный электрофорез.

4.5 Анализ данных включает:

- генотипирование и программную обработку аллельного разнообразия: специальное ПО для ПК, в зависимости от приборов;
- популяционную генетику (анализ генетического разнообразия проводится с использованием специальных пакетов программ и макросов)[1)].

[1)] Могут применяться следующие пакеты программ и макросов: [10]—[27].

4.6 Результаты паспортизации на примере ели европейской

Результаты паспортизации на примере ели европейской приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Характеристики ДНК-анализа для составления документа о результатах генетической паспортизации древесного растения ель европейская (Picea abies L.)

Параметр	Результат
Вид	Ель европейская (Picea abies L.)
Гаплотип	nDNA — Pa_33, Pa_36, EATC1B02, UAPgAG105, UAPgAG150b, UAPgAG150a
SSR-профиль	QrSSR- A109/109_B196/196_C205/205_D159/159_E132/132_F150/150
Регион происхождения	Центральная Россия

4.7 Применение мономолекулярных методов полимеразной цепной реакции

Для осуществления паспортизации на основе амплификации нуклеиновых кислот в зависимости от поставленных задач применяются мономолекулярные методы ПЦР.

Мономолекулярные методы ПЦР включают классический метод, ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), метод обратной транскрипции-ПЦР (ОТ-ПЦР) и мультиплексную ПЦР. Эти методы позволяют решать разные задачи, например обнаруживать целевой фрагмент ДНК или РНК, измерять количество его копий, амплифицировать фрагмент РНК или одновременно амплифицировать несколько последовательностей.

Применение определенных методов постановки ПЦР-реакций требует соответственно различных видов праймеров и протоколов для их использования в соответствии с ГОСТ Р ИСО 20395.

4.7.1 Классический метод полимеразной цепной реакции

Классический метод ПЦР подходит, когда необходимо получить однозначный ответ — встречается ли данная ДНК-последовательность в образце. Процесс проходит в три этапа:

а) нагревают пробу — двойная спираль ДНК распадается на две нити (денатурация);

б) понижают температуру: к целевому участку присоединяются праймеры — короткие цепочки, которые «подсказывают», где копировать (отжиг);

в) включается фермент ДНК-полимераза, который достраивает новую цепочку ДНК (элонгация).

Цикл повторяется 30—40 раз, и каждая копия удваивается. Полученные в результате реакции продукты разделяют с помощью гель-электрофореза и визуализируют, чтобы определить наличие или отсутствие искомого участка.

4.7.2 Полимеразная цепная реакция в реальном времени

ПЦР-РВ позволяет определять не только присутствие целевой нуклеотидной последовательности в образце, но и измерять количество ее копий. Количество амплифицированной ДНК измеряется после каждого цикла амплификации с помощью флуоресцентных меток (зондов или интеркаляторов). Оценка может быть количественной (измерение количества копий матрицы) и относительной (измерение относительно внесенной ДНК или дополнительных калибровочных генов).

4.7.3 Обратная транскрипция полимеразной цепной реакции

ОТ-ПЦР позволяет амплифицировать выбранный фрагмент РНК путем синтеза комплементарной ему одноцепочечной ДНК с помощью фермента обратной транскриптазы. Затем, уже в ходе ПЦР, одноцепочечная ДНК достраивается до двуцепочечной.

ОТ-ПЦР используется для диагностики инфицирования РНК-содержащими вирусами, у которых генетический материал вместо ДНК представлен РНК (коронавирус, вирус гриппа, вирус иммунодефицита человека и др.).

4.7.4 Мультиплексная полимеразная цепная реакция

Мультиплексная ПЦР позволяет выявить в одной пробе сразу несколько последовательностей. В одну пробирку с ДНК-матрицей добавляют целый набор праймеров для одновременной амплификации нескольких интересующих фрагментов.

Мультиплексная ПЦР подходит для одновременного детектирования нескольких мутаций в заданных генах или определения породного состава выборки при проведении генетической паспортизации

насаждений лесообразующих пород, ОЛС, репродуктивного материала лесных растений методом молекулярно-генетического анализа.

4.8 Методы стандартной паспортизации лесных пород

В случае проведения стандартной паспортизации лесных пород принято использование двух методов:

а) способ паспортизации на основе амплификации с использованием микросателлитных, митохондриальных или хлоропластных праймеров;

б) способ паспортизации на основе амплификации с использованием нескольких пар праймеров для выявления значений аллелей двух — пяти локусов (см. таблицу 2).

Таблица 2 — Подходы к проведению паспортизации основных лесообразующих пород

	Способ паспортизации основных лесообразующих пород — ПЦР-диагностика ДНК лесных растений с использованием микросателлитных, митохондриальных или хлоропластных праймеров		Способ паспортизации основных лесообразующих пород — ПЦР-диагностика с использованием наборов праймеров (панелей)
1	Планирование, отбор, транспортирование и хранение нативных образцов (проб)	1	Отбор, транспортирование и хранение нативных образцов (проб)
2	Пробоподготовка и выделение ДНК из отобранных образцов (проб) биоматериала, определение чистоты и концентрации суммарной ДНК, доведение до нужной концентрации	2	Пробоподготовка и выделение ДНК из отобранных образцов биоматериала (проб), определение чистоты и концентрации суммарной ДНК, доведение ее раствора до нужной концентрации
3	Проведение ПЦР с микросателлитными, митохондриальными или хлоропластными праймерами: - вертикальный электрофорез с гельдокументированием в УФ-спектре; - фрагментный анализ	3	Проведение ПЦР с наборами выбранных праймеров — фрагментный анализ
4	Интерпретация результатов — визуальная оценка фореграмм для определения аллельных вариантов по каждому из 10 используемых локусов	4	Интерпретация результатов — идентификация фрагментированных последовательностей по каждому из 10 используемых локусов

4.8.1 Первый способ проведения паспортизации основных лесообразующих пород с помощью микросателлитных, митохондриальных или хлоропластных праймеров включает следующие этапы:

а) этап 1 — планирование, отбор, транспортирование и хранение биоматериала образцов (проб);

б) этап 2 — пробоподготовка и выделение ДНК из отобранных образцов биоматериала (проб), определение чистоты и концентрации суммарной ДНК;

в) этап 3 — проведение классической полимеразной цепной реакции с микросателлитными праймерами с последующей детекцией ПЦР-продуктов на акриламидном геле (электрофорез) и фотодокументированием в УФ-спектре либо с последующей детекцией ПЦР-продуктов в капиллярном электрофорезе и типированием/документированием результатов в виде пиков на хроматограмме;

г) этап 4 — анализ и интерпретация результатов — проводится генотипирование электрофореграмм путем визуальной оценки размеров аллельных вариантов в ПААГ или считывания значений размеров аллельных вариантов из программы обработки данных фрагментного анализа.

На этом этапе заканчивается идентификация генотипов ДНК образцов различных родов/видов лесных пород с использованием микросателлитных, митохондриальных или хлоропластных праймеров классическим методом ПЦР.

4.8.2 Паспортизация с использованием мультиплексной ПЦР проводится аналогичным образом в целях одновременного детектирования нескольких заданных генов или мутаций в них, а также образцов ДНК различных родов или видов растений.

5 Отбор образцов для проведения паспортизации с использованием метода молекулярно-генетического анализа

Для планирования и организации работ по отбору образцов биоматериала в естественных насаждениях и ОЛС, посевного и посадочного материала в лесных питомниках и искусственных насаждениях (лесных культурах) необходимо:

а) произвести осмотр всей площади обследуемого участка;

б) определить географические координаты места отбора образцов и осуществить привязку к административным субъектам Российской Федерации;

в) обеспечить наличие необходимых приспособлений для проведения отбора биоматериала для генетического исследования с обязательным исключением смешения ДНК-образцов;

г) обеспечить доставку образцов для проведения ДНК-анализа в максимально короткие сроки, поместив для транспортирования биоматериалы в соответствующие условия с учетом биологических характеристик образцов;

д) предусмотреть хранение образцов генетического материала в течение не более трех месяцев.

5.1 Отбор образцов семенного биоматериала

Отбор образцов семенного биоматериала для проведения ДНК-диагностики рекомендуется проводить в соответствии с ГОСТ 13056.1.

Для проведения генетического анализа формируется выборка семенного материала из партии семян в количестве не менее 30 штук. Семена должны быть собраны в однородных условиях произрастания, в насаждениях одного происхождения (естественного или искусственного), с одной ЛСП.

Образцы маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

5.2 Отбор образцов посадочного материала из лесных питомников и лесных культур

5.2.1 Для проведения паспортизации сеянцев/саженцев из лесных питомников с использованием молекулярно-генетического анализа сбор образцов проводят с учетом ГОСТ 12430—2019 (разделы 3—5, подраздел 6.6, разделы 10, 13, 20).

Для проведения генетического анализа по паспортизации посадочного материала из лесных питомников сбор образцов проводят с учетом ГОСТ 12430—2019 (разделы 3—5, 6.6, 10, 13, 20).

Отбор образцов сеянцев/саженцев проводят в количестве не менее 30 штук растений с продуцируемой площади питомника, на которой представлена обследуемая партия сеянцев/саженцев.

Для проведения генетического анализа сбор образцов проводят согласно схемам по шесть образцов, выбранных методом «конверта» или по диагонали (см. рисунок 2).

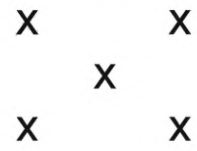


Рисунок 2 — Схемы отбора точечных образцов от партии методом «конверта»

Образцы маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

В каждый пакет с образцом вкладывают этикетку установленного образца (см. 5.5.1). До отправки на анализ хранить пакеты с образцами следует в сухом месте в картонных коробках. Порядок изготовления пакетов приведен в 5.5.2.

5.2.2 Для проведения паспортизации с использованием молекулярно-генетического анализа из лесных культур сбор образцов проводят аналогично сбору сеянцев/саженцев не менее 30 штук растений с обследуемой площади лесных культур, на которой представлена обследуемая партия деревьев с учетом ГОСТ 12430—2019 (разделы 3—5, подраздел 6.6, разделы 10, 13, 20).

5.3 Отбор образцов биоматериала (хвоя, листья, древесина) с объектов лесного семеноводства

5.3.1 Отбор образцов биоматериала (семена, хвоя, листья, древесина) с ОЛС (АК, ЛСП, плюсовые деревья, географические культуры и т. д.) проводят с использованием метода индивидуального

отбора с каждого дерева согласно схемам лесосеменных объектов, с указанием географических координат (см. [28], пункт 1.7).

5.3.2 Для проведения генетического анализа биоматериала растений древесных пород достаточно: для хвойных — 5—10 средних хвоинок, для лиственных — 3—5 средних листочков.

На деревьях, где хвоя/листья недоступны, используют инструмент:

- для заготовки ветвей (сучкорез, секатор, прунер);
- для высверливания опилок/стружки в стволе растущего дерева (дрель, шуруповерт, диаметр сверла — 8—10 мм, глубина — 1,0—1,5 см);
- для отбора радиальных кернов (бур Пресслера, диаметр 4—5 мм, длина 1—10 см), с дерева — по два керна с разных сторон окружности ствола.

Образцы древесины отбирают на высоте 0,5—1,3 м от поверхности земли. Необходимо исключить попадание коры в образец.

Заготовленную хвою, листья, древесину помещают в бумажные пакеты, которые раскладывают одним слоем в теплом, сухом, хорошо проветриваемом помещении до полного высыхания образца или высушивают в сушильном шкафу при 40 °С в течение трех суток.

Образец маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

В каждый пакет с образцом вкладывают этикетку установленного образца (см. 5.5.1). Порядок изготовления пакетов приведен в 5.5.2.

До отправки на анализ хранят пакеты с образцами в сухом месте в картонных коробках.

5.3.3 Сбор образцов биоматериала (хвоя, листья, древесина) с географических культур проводят согласно схемам лесосеменного объекта с учетом районов закладки по 30 образцов с каждого географического района.

Для проведения генетического анализа сбор образцов (хвоя, листья, древесина) проводят по одному с каждого из шести деревьев, отобранных в блоке по диагонали или методом «конверта» (см. рисунок 2).

Заготовленную хвою, листья, древесину помещают в бумажные пакеты, которые раскладывают одним слоем в теплом, сухом, хорошо проветриваемом помещении до полного высыхания образца или высушивают в сушильном шкафу при 40 °С в течение трех суток. До отправки на анализ пакеты с образцами хранят в сухом месте в картонных коробках.

Образец маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

В каждый пакет с образцом вкладывают этикетку установленного образца (см. 5.5.1). Порядок изготовления пакетов приведен в 5.5.2.

5.4 Отбор образцов хвои и листьев лесных растений в естественных насаждениях

Отбор образцов биоматериала хвои и листьев лесных растений в насаждениях проводится с указанием географических координат точки отбора с 30 деревьев. Расстояние между деревьями в насаждении, с которых отбираются образцы, должно быть не менее 10 м.

Для проведения генетического анализа растений хвойных пород достаточно 5—10 средних хвоинок, для лиственных — 3—5 средних листочка.

На деревьях, где хвоя или листья недоступны, используют инструменты для заготовки ветвей с деревьев или оборудование для высверливания в стволе растущего дерева опилок/стружки (диаметр сверла — 8—10 мм), кернов диаметром 5—7 мм на глубину 1,0—1,5 см. Необходимо исключить попадание коры в образец.

Для проведения генетического анализа достаточно 5 г древесных опилок. При взятии образцов древесины пользуются индивидуальным сверлом для каждого дерева. Обработку сверл необходимо проводить спиртом либо отжигать для исключения смешения образцов ДНК различных деревьев. Для отжига сверл можно использовать факел из ватного тампона, смоченного в 96 %-ном спирте. Отжигать сверла необходимо не менее 5 с, после чего факел следует тщательно затушить во избежание пожара. Целесообразно использовать несколько сверл и отжигать их вместе.

Отбор образца ветвей хвои и листьев возможен с растущего рядом подроста.

Для молекулярно-генетического анализа могут быть использованы любые части растения: хвоя, листья, ствол (стебель), корни.

Заготовленную хвою, листья помещают в бумажные пакеты, извлеченную из ствола древесину собирают на лист бумаги, а затем помещают в бумажные пакеты, которые раскладывают одним слоем

в теплом, сухом, хорошо проветриваемом помещении до полного высыхания образца или высушивают в сушильном шкафу при 40 °С в течение трех суток.

В каждый пакет с образцом древесины вкладывают этикетку установленного образца (см. 5.5.1), на пакете указывают место сбора, породу. Порядок изготовления пакетов приведен в 5.5.2.

Способы высушивания и хранения образцов древесины, хвои и листьев аналогичны.

До отправки на анализ хранить пакеты с образцами следует в сухом месте в картонных коробках.

Образец маркируют и направляют для проведения ДНК-исследований.

5.5 Транспортирование и хранение образцов

Условия транспортирования и хранения зависят от задач исследования.

Соответственно для транспортирования отобранные образцы хвои, листьев, древесины, семян необходимо либо заморозить при температуре минус 20 °С, либо (чаще) высушить в сушильном шкафу при температуре 40 °С в течение трех суток, вынув из бумажных (тканевых) пакетов, в которые они были изначально отобраны. Если высушивание образцов в сушильном шкафу невозможно, образцы следует высушить в сухом, хорошо проветриваемом месте, защищенном от прямых солнечных лучей. Затем зарегистрированные образцы следует системно хранить в специально отведенных сухих помещениях в бумажных (тканевых) пакетах.

Образцы отправляют на анализ только в замороженном или сухом виде, поскольку при пересылке нативных (свежих) образцов возможно их загнивание, в результате чего они будут непригодны для обследования.

Хранить образцы лучше при температуре от минус 20 °С до минус 80 °С в замороженном виде. Допустимо их хранение в сухом виде при комнатной температуре (18 °С — 25 °С).

После проведения анализа образцы хранят в течение трех месяцев.

5.5.1 Маркировка образцов

Образцы в бумажных пакетах с этикеткой сбора, отобранные по вышеуказанным правилам, помещают в сухую, чистую бумажную коробку. В каждый пакет с образцом вкладывают этикетку установленного образца (приведена ниже) и указывают на пакете место сбора, породу (см. таблицы 3—5).

Таблица 3 — Этикетка для образцов хвои, листьев и древесины, репродуктивных органов, корней, заготовленных с деревьев в естественных насаждениях, ОЛС

Образец № 1	Выборка № 1
1 Область, край, республика	Архангельская область
2 Ближайший населенный пункт	Лешуконское
3 Расстояние до населенного пункта	10 км
4 Лесничество	Лешуконское
5 Участковое лесничество	Усть-Вашское
6 Лесной квартал/выдел	100/25
7 Древесная порода	Сосна обыкновенная
8 Вид насаждения (естественное, лесные культуры, отдельно стоящие деревья или иное, состав, возраст)	Естественное, 8С2Е, 100 лет
9 Географические координаты	N: 64.904910° E: 46.032715°
10 Дата взятия образца	20.05.2024
11 Кем отобран образец (Ф.И.О., должность, подпись)	Иванов Иван Иванович, инженер

Таблица 4 — Этикетка для образцов сеянцев и саженцев с площади лесного питомника

Образец № 1	Выборка № 1
1 Область, край, республика	Архангельская область
2 Ближайший населенный пункт	Лешуконское

Окончание таблицы 4

Образец № 1	Выборка № 1
3 Расстояние до населенного пункта	10 км
4 Лесничество	Лешуконское
5 Участковое лесничество	Усть-Вашское
6 Лесной квартал/выдел	100/25
7 Название питомника	ООО «Новый Лес»
8 Площадь питомника/обследованная площадь	10 га/2,5 га
9 Древесная порода	Сосна обыкновенная
10 Вид биоматериала (сеянцы или саженцы)	Сеянцы
11 Поля, год посева/посадки	Поле № 1, посев 2023 г.
12 Географические координаты	N: 64.904910° E: 46.032715°
13 Дата взятия образца	20.05.2024
14 Кем отобран образец (Ф.И.О., должность, подпись)	Иванов Иван Иванович, инженер

Таблица 5 — Этикетка для партии семян лесных растений

Партия семян №	
Номер паспорта на партию семян: 100	От (дата) 06.05.2023
Кем заготовлены семена	ООО «Дубровский»
Место заготовки семян	
1 Область, край, республика	Кировская область
2 Ближайший населенный пункт	г. Вятка
3 Расстояние до населенного пункта	20 км
4 Лесничество	Орловское
5 Участковое лесничество	Орловское
6 Лесной квартал/выдел	кв. 2, выд. 4; кв. 9, выд. 15
7 Кол-во семян	100 шт.
8 Древесная порода	Сосна обыкновенная
9 Географические координаты	N: 64.904910° E: 46.032715°
10 Дата отбора партии семян	20.05.2024
11 Кем отобрана партия (Ф.И.О., должность, подпись)	Иванов Иван Иванович, инженер

Примечание — Географические координаты указывают в десятичной системе до четвертого знака, через точку (например, N: 52.3700 E: 33.2800). Указывают одно значение координат для всей выборки в любой точке в границах лесного массива, где произведен отбор образцов.

5.5.2 Изготовление бумажных пакетов

Бумажные пакеты изготавливают следующим образом:

а) сворачивают лист формата А4 вдоль, оставив с одного края кромку 1 см;

б) дважды заворачивают кромку;

в) заворачивают нижний край пакета на угол так, чтобы кромка была наверху сгиба;

г) подворачивают второй угол нижнего края пакета, заправив его край под кромку;

д) после помещения в пакет образца таким же образом закрывают верхний край пакета.

Схема изготовления бумажных пакетов представлена на рисунке 3.

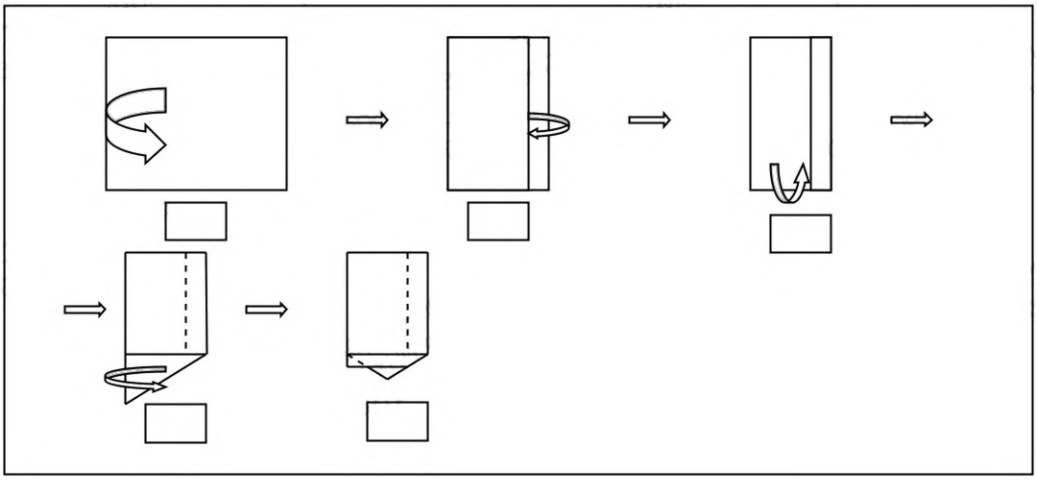


Рисунок 3 — Схема изготовления бумажных пакетов

6 Требования к условиям проведения ДНК-исследований

6.1 Требования к персоналу (квалификации сотрудников)

Исследования могут производить специалисты организаций, уполномоченных на проведение ГЛПМ и ГМВЛ, с высшим образованием, в соответствии с принятым ведомством порядком замещения должностей. Работы проводятся после прохождения специалистами испытательного срока.

Допуск персонала к работе должен осуществляться на основании инструктажа и контрольных испытаний в рамках отдельных этапов. Инструктажи по соблюдению требований безопасности должны проводиться не реже одного раза в полгода для проверки знаний персоналом требований безопасности.

6.2 Требования к соблюдению безопасности и охраны окружающей среды

При выполнении исследований следует соблюдать следующие требования безопасности:

- требования техники безопасности при работе с химическими реактивами по ГОСТ 12.4.103;
- требования электробезопасности при работе с электроустановками по ГОСТ 12.1.019;
- требования к организации обучения работающих по технике безопасности по [29];
- помещение лаборатории должно соответствовать требованиям пожарной безопасности по ГОСТ 12.1.004 и иметь средства пожаротушения по ГОСТ 12.4.009;
- все виды отходов (остатки химических веществ) собираются отдельно в специальные контейнеры и по мере накопления передаются специализированным компаниям для утилизации;
- требования безопасности при работе с вредными веществами — в зависимости от их класса по ГОСТ 12.1.007.

6.3 Требования к оснащенности помещений для проведения работ

Молекулярно-генетические анализы проводят в помещениях для ДНК-анализа, оснащенных необходимыми для проведения аналитических работ мебелью, вентиляцией, приборами, оборудованием, дополнительными приспособлениями, посудой и расходными материалами.

Организация помещений для генетического анализа должна соответствовать высоким требованиям чистоты, безопасности и функциональности, чтобы обеспечить точные и надежные результаты исследований. В помещениях должны быть предусмотрены зоны для подготовки образцов, проведения анализа, хранения реактивов и материалов, а также зоны для обработки данных и отчетности.

Требования к организации помещений для проведения работ по молекулярно-генетической диагностике приведены:

- в ГОСТ ISO/IEC 17025;
- [30].

6.4 Требования к соблюдению стерильности проведения молекулярно-генетических анализов

Молекулярно-генетические анализы проводят в подготовленных стерильных помещениях с вентиляцией нужной конструкции, оснащенных необходимыми для проведения аналитических работ мебелью, приборами, оборудованием, дополнительными приспособлениями, а также специализированной посудой, расходными материалами, реактивами для проведения молекулярно-генетической диагностики с учетом ГОСТ Р ИСО 21571, ГОСТ Р ИСО 20395.

Частицы аэрозоля воздуха лаборатории, содержащие ДНК-ампликоны, не задерживаются большинством использующихся в оборудовании фильтров (HEPA-фильтрами и т. п.) и могут вызывать постоянное загрязнение бокса ампликонами, а следовательно — и материала, находящегося в нем.

6.4.1 Мебель, необходимая для проведения молекулярно-генетической диагностики

Помещение для проведения ДНК-анализов должно быть оснащено следующей мебелью:

- шкафом для хранения посуды;
- шкафом для хранения реактивов;
- шкафом для хранения лабораторной одежды и СИЗ;
- лабораторными столами с термо- и химостойким полимерным покрытием;
- подкатными тумбами с ящиками;
- навесными шкафами;
- глубокой лабораторной мойкой;
- вращающимися стульями.

6.4.2 Оборудование, необходимое для проведения молекулярно-генетической диагностики

При выполнении генетической паспортизации методиками настоящего стандарта к применению необходимо нижеперечисленное основное, вспомогательное оборудование, средства измерений, специализированная посуда, расходные материалы, реактивы, растворы и наборы.

6.4.2.1 Применяют следующие средства измерения, испытательное, основное, вспомогательное оборудование:

- pH-метр;
- паровой автоклав (стерилизатор) или медицинский УФ-стерилизатор инструментов (для стерилизации инструментов);
- автоматические дозаторы — наборы одноканальных или многоканальных разных объемов дозирования (до 1000 мкл, до 200 мкл, от 0,5 до 10 мкл);
- электрический аквадистиллятор (для получения дистиллированной воды для всех видов аналитических работ);
- амплификатор (термоциклер) (для проведения ПЦР);
- бактерицидный УФ-рециркулятор воздуха (для обеспечения стерильной атмосферы помещения для анализов);
- бокс абактериальной воздушной среды (для выделения ДНК);
- вакуумный насос с колбой-ловушкой (для осушения препарата ДНК);
- аналитические электронные лабораторные весы (до 0,001 г) (для приготовления навесок);
- технические весы (до 1000 г) (для приготовления навесок);
- гомогенизатор (для измельчения проб биоматериала);
- генетический анализатор с необходимым ПО (для проведения ФА).

Примечание — При отсутствии возможности проведения ФА — отправка в оснащенную подобным оборудованием лабораторию;

- ИБП к секвенатору (для обеспечения бесперебойного электропитания на случай отключения/перепадов напряжения);
- источник тока для электрофорезных камер (для обеспечения стабильных электрических параметров);
- магнитная мешалка без подогрева (для приготовления растворов);
- магнитная мешалка с подогревом (для приготовления растворов);
- микроцентрифуга с охлаждением;
- миницентрифуга-мешалка вортекс;
- бытовая морозильная камера (минус 22 °С);
- низкотемпературная морозильная камера (минус 80 °С);

- нанофотометр (для контроля концентрации и качества препарата ДНК);
- ПК и ПО (для аналитической обработки молекулярно-генетической информации — биоинформатики): Geneious, MEGA, Python/R; ПК для подготовки выходной информации;
- микроволновая печь (для приготовления/расплавления агарозного геля);
- ротатор-миксер;
- система гель-документирования;
- система очистки воды типа 1;
- твердотельный термостат;
- термостатирующий шкаф;
- возвратно-поступательный термошейкер;
- холодильные камеры (бытовые);
- вытяжной шкаф (для обеспечения безопасности и защиты органов дыхания при приготовлении реактивов);
- ламинарный шкаф — бокс биологической безопасности (для контаминационно-безопасной работы по проведению ПЦР);
- сушильный шкаф;
- электрофорезные камеры (горизонтальные, вертикальные).

6.4.2.2 Дополнительно применяют следующие приспособления:
- очки для защиты от УФ-излучения по ГОСТ 12.4.253;
- перчатки латексные, нитриловые или с нитрильным покрытием;
- скальпели, ножницы, пинцеты;
- настенную сушилку;
- штативы для дозаторов, пробирок и наконечников.

6.4.3 Применяют следующую специализированную посуду, необходимую для проведения молекулярно-генетической диагностики:
- лабораторные воронки различных размеров;
- колбы (стеклянные или пластиковые);
- химические стаканы различных объемов;
- фарфоровые ступки с пестиками;
- темные бутыли для хранения растворов;
- мерные цилиндры различных объемов.

6.4.4 Перечень расходных материалов, реактивов, растворов и наборов, необходимых для проведения молекулярно-генетической диагностики, представлен в 6.4.4.1—6.4.4.5.

6.4.4.1 Применяют следующие расходные материалы:
- перманентные маркеры различной толщины (0,5, 1,0, 1,5—2,0 мм);
- капилляр(ы) для генетического анализатора;
- наконечники к дозаторам разных объемов (10, 200, 1000 мкл);
- планшеты объемом 0,2 мл;
- пробирки для гомогенизации;
- пробирки для ПЦР (0,2 мл);
- микроцентрифужные пробирки (1,5 и 2,0 мл);
- шарики для гомогенизации;
- фильтровальную бумагу, фильтры;
- флаконы для образцов.

6.4.4.2 Применяют следующие реактивы
- агарозу;
- акриламид;
- ацетат аммония;
- бис-акриламид,
- борную кислоту;
- бромфеноловый синий;
- дистиллированную воду;
- глицерин;
- ДНК-полимеразу;
- магния хлорид — хлористый магний;
- маркеры молекулярного веса;

- натрия хлорид;
- натрия гидроксид;
- персульфат амония;
- изоамиловый спирт;
- изопропиловый спирт — пропанол-2;
- этиловый спирт (96 %) — этанол;
- ТЕМЕД;
- уксусную кислоту (ледяная);
- формамид — амид муравьиной кислоты;
- хлороформ (ТХМ) — трихлорметан;
- этидиум бромид — бромистый этидий;
- ЦТАБ (CTAB);
- ЭДТА (EDTA);
- ТРИС (TRIS).

6.4.4.3 Применяют следующие наборы:

- набор DNTP;
- набор для калибровки генетического анализатора;
- набор для ПЦР-реакции — меченые праймеры;
- готовый набор для ПЦР — лиофилизированная готовая реакционная ПЦР-смесь;
- набор для ПЦР — готовая окрашенная реакционная (ПЦР×5 — 5-кратная смесь) ПЦР-смесь;
- полимер для генетического анализатора.

6.4.4.4 Применяют следующие растворы:

- загрузочный буфер (бромфеноловый синий и глицерин);
- раствор бромида цетилтриметиламмония (ЦТАБ-буфер, 3 %);
- раствор для очистки ДНК из ПЦР-смеси после ПЦР;
- раствор ПЦР-смеси;
- раствор TBE (1- и 10-кратный);
- раствор TAE (1- и 50-кратный);
- смесь хлороформа и изоамилового спирта.

6.4.4.5 Применяют следующие стандартные образцы:

- анодный/катодный буферы для генетического анализатора;
- pGEM — плазмида для положительного контроля при секвенировании;
- набор фиксаналов для pH-метрии.

7 Методы проведения ДНК-исследований

7.1 Подготовка к проведению анализа: регистрация, стерилизация

Образцы биоматериала лесных древесных растений (семена, хвоя, листья, древесина — в виде опилок), поступающие для анализа, регистрируют в лабораторном журнале с соблюдением установленных критериев учета в соответствии со спецификой требований к обследованиям биоматериала.

Боксы или ламинарный шкаф перед проведением любого ДНК-анализа стерилизуют УФ-светом длиной волны 220—260 нм в течение 10—15 мин. Необходимые приспособления: пробирки, дозаторы, наконечники и другую необходимую для выделения ДНК посуду — также стерилизуют в боксе в соответствии с ГОСТ Р 53214—2008 (пункт 5.3.2).

7.2 Подготовка аналитических проб растительного материала

Образцы хвои, листвы, проростков следует мелко измельчить ножницами. Ножницы протирают спиртом и обжигают на открытом огне во избежание контаминации. При работе с опилками отбирают самые мелкие из них без включений коры. Масса образца должна быть около 40 мг. Образцы помещают в пробирки типа «Eppendorf», объемом 1,5—2,0 мл с указанием индексов образцов.

Работы следует производить в боксе или ламинарном шкафу после его стерилизации. Образцы не должны подвергаться воздействию УФ-лучей, поскольку содержащаяся в них ДНК в этом случае будет разрушена.

Образцы раскладывают в пакеты в последовательности согласно журналу учета.

7.3 Выделение ДНК

7.3.1 Методические указания к протоколу выделения ДНК

Измельченную навеску растительной ткани массой 20—50 мг помещают в стерильную ступку для растирания, добавляют 1,0 (1,2) мл прогретого до 65 °С 3 %-ного ЦТАБ-буфера [ЦТАБ, 1,4 М NaCl, 20 мм ЭДТА, 100 мм Трис, дистиллированная вода (dH_2O)] и максимально гомогенизируют образец. Древесные образцы предпочтительнее растирать при помощи гомогенизатора. Приготовление всех необходимых растворов приведено в приложении А.

Перемещают гомогенат в заранее промаркированные и прогретые в термостате до 65 °С центрифужные пробирки типа «Eppendorf» на 1,5—2,0 мл. Инкубируют в термостате 2—3 мин, в случае с древесиной — 10 мин, при 65 °С.

После инкубации образцы следуют перемешать на вортексе и оставить остывать пробирки с гомогенатом до комнатной температуры. В каждую пробу вносят равный объем заранее приготовленной смеси хлороформа и изоамилового спирта для осаждения белков — 24:1 соответственно (работа под вытяжкой).

Тщательно перемешивают пробы круговыми движениями или движениями по вертикали в течение 2 мин вручную или при помощи ротатора-миксера (ротационного перемешивателя), чтобы добиться тщательного и полного смешения образцов с хлороформ-изоамиловым спиртом, затем центрифугируют пробы в течение 3 мин при комнатной температуре со скоростью 13 000 об/мин.

Следует заранее приготовить и промаркировать микроцентрифужные пробирки типа «Eppendorf» на 1,5—2,0 мл и после центрифугирования образцов перенести в них весь супернатант 250—700 мкл, не задевая среднюю и нижнюю фазы, которые в дальнейшей работе не используются. Пробирку с остатками растертого материала и использованные наконечники для дозаторов утилизируют.

В каждую пробу вносят охлажденный в морозилке изопропиловый спирт в количестве 0,7 части от объема отобранного супернатанта. Тщательно перемешивают пробы в течение 2 мин вручную или при помощи ротационного перемешивателя.

Центрифугируют пробы при комнатной температуре в течение 5 мин на максимальных оборотах.

Удаляют надосадочную жидкость с помощью колбы-ловушки или вручную (образовавшийся осадок, состоящий из ДНК и полисахаридов, должен остаться в пробирке). Затем оставляют пробы на несколько минут для испарения оставшейся жидкости под вытяжкой.

Осадок промывают от остатков буфера, изопропанола и хлороформа со встряхиванием на вортексе. Для этого добавляют в пробирки с пробами по 1 мл 96 %-ного этилового спирта и тщательно перемешивают на вортексе в течение 2 мин, затем центрифугируют в течение 3 мин при максимальных оборотах (при комнатной температуре).

Удаляют жидкость из проб вручную или при помощи колбы-ловушки (обязательно необходимо следить за осадком) и повторяют процедуру промывки этанолом. После этого полностью высушивают осадок, не закрывая пробирки, в термостате при температуре 55 °С.

Для растворения выделенной ДНК добавляют в пробы необходимое количество mQ-воды в зависимости от размера полученного осадка (для образцов хвои — 30—40 мкл, для древесины — 10—20 мкл). Помещают пробы на термошейкер и при температуре 40 °С и максимальных оборотах перемешивают их до полного растворения осадка.

Полученный раствор ДНК используют для дальнейшей работы, для чего помещают на хранение при температуре 2 °С—8 °С на срок до двух месяцев. Для последующих работ образцы следует хранить при температуре минус 20 °С, исключая их частое размораживание.

Длительное хранение (более года) всех образцов необходимо обеспечить в низкотемпературных морозильных камерах при минус 80 °С.

Выделение ДНК возможно также производить с использованием коммерческих наборов в соответсвии с прилагаемыми к ним инструкциями.

7.3.2 Качественный и количественный анализ ДНК

Поскольку концентрация и чистота препарата ДНК являются важными факторами, влияющими на ход дальнейшего анализа, необходимо установление значений этих показателей с помощью спектрофотометра. Для определения количества ДНК измеряют поглощение раствора в областях с длинами волн 230, 260 и 280 нм. Измерение при 260 нм позволяет рассчитать концентрацию нуклеиновой кислоты в пробе и выровнять до нужной концентрации все образцы выборки перед проведением ПЦР. Оптическая плотность D = 1А соответствует приблизительно 50 мкг/мл двуцепочечной ДНК. Соотношение экстинкции 260/280 нм позволяет судить о наличии загрязнителей нуклеиновой кислоты. Коэффициент

отношения волн 260/280 нм для чистых препаратов ДНК должен укладываться в переделы 1,7—2,0. Коэффициент отношения волн 230/260 нм должен быть в переделах 0,3—0,9. Выход за параметры этих значений будет свидетельствовать о чрезмерном загрязнении образцов примесями (белки, фенолы, соли и др.) или неэффективном выделении. Концентрацию проб образцов до оптимального (необходимого) значения следует довести путем разбавления деионизированной водой.

Определение концентрации ДНК и чистоты препарата выделенного образца проводят с помощью спектрофотометра и/или флуориметра.

Определение количества ДНК возможно также производить с использованием коммерческих наборов в соответсвии с прилагаемыми к ним инструкциями.

7.4 Проведение полимеразной цепной реакции с микросателлитными, митохондриальными или хлоропластными праймерами с разделением и визуализацией полимеразной цепной реакции продукта на камерах вертикального/горизонтального электрофореза или на генетическом анализаторе

Паспортизация основных лесообразующих пород в зависимости от предполагаемых направлений исследований проводится с праймерами различных типов: микросателлитными и/или митохондриальными, хлоропластными. Микросателлитные ядерные праймеры используют для изучения генетической изменчивости основных лесообразующих видов лесных древесных пород: сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris L.*), сосны кедровой сибирской (*Pinus sibirica*), сосны кедровой корейской (*Pinus koraiensis Siebold et Zucc.*), дуба черешчатого (*Quercus robur L.*), дуба монгольского (*Quercus mongolica Fisch. ex Ledeb.*), лиственницы сибирской (*Larix sibirica Ledeb.*), лиственницы даурской (*Lárix dahúrica*) [или лиственница Гмелина (*Larix gmelinii (Rupr.) Kuzen.*)], ели европейской (*Picea abies (L.) Karst.*), сибирской (*Picea obovata Ledeb.*), аянской (*Picea jezoensis Picea ajanensis (Lindl. et Gord.) Fisch. ex Carr.*). Максимальная эффективность устанавливается при комплексном подходе к оценке генетического разнообразия с применением разных типов маркеров: изоферментов, микросателлитов (SSR), ДНК-маркеров органелл, фрагментов ДНК, полученных в результате амплификации случайных сегментов геномной ДНК с использованием одного праймера произвольной нуклеотидной последовательности (RAPD-маркеров) и др. (см. приложение Б, В). Результаты сравнения генетической изменчивости на основе разных типов молекулярных маркеров могут быть неоднозначны, однако всегда дополняют генетическую изменчивость популяций, которая была недоступна ранее при использовании биохимических (изоферментных маркеров) методов.

7.4.1 Общие рекомендации к проведению полимеразной цепной реакции

Для проведения реакции амплификации применимы как отдельные компоненты для приготовления реакционной смеси, так и готовые наборы. При проведении ПЦР необходимо использовать положительный (+) и отрицательный (–) контроли. В качестве (+) контроля следует использовать образец с заведомо известными (определенными) размерами изучаемых аллелей. В качестве (–) контроля следует использовать бидистиллированную воду или тот растворитель, в котором растворена исследуемая ДНК. Отрицательный контроль используется при необходимости выравнивания чистоты реактивов.

Применение различных ПЦР-смесей для паспортизации древесных пород:

а) алгоритм действий при использовании ПЦР-смеси со стандартным смешиванием отдельных компонентов:

1) перед приготовлением реакционной смеси для проведения ПЦР размораживают все необходимые реагенты, праймеры, ДНК, выделенную из исследуемых образцов, встряхивают на вортексе и осаждают для удаления жидкости с крышек пробирок;

2) определяют количество реакций исходя из количества исследуемых проб;

3) смешивают все компоненты в одной пробирке в соответствии с прописью;

4) распределяют ПЦР-смесь в равных долях;

5) в соответствующие пробирки, содержащие перемешанные компоненты реакции, вносят по 1 мкл пробы ДНК исследуемых объектов с концентрацией не менее 100 нг/мкл;

6) перемешивают, осаждают и помещают в амплификатор, запустив соответствующий протокол;

7) после завершения программы амплификации 5—10 мкл ПЦР-продукта используют для дальнейшего анализа;

б) алгоритм действий при использовании готового лиофилизированного ПЦР-набора (постановку полимеразной цепной реакции готового лиофилизированного ПЦР-набора проводят согласно инструкции производителя):

1) перед приготовлением реакционной смеси подготавливают ДНК, встряхивают на вортексе и осаждают для удаления жидкости с крышек пробирок;

2) определяют количество реакций исходя из количества исследуемых проб;

3) смешивают все компоненты в одной пробирке в соответствии с прописью;

4) добавляют во все пробирки из набора с лиофилизированными компонентами по 15 мкл ПЦР-смеси;

5) добавляют в соответствующие пробирки по 5 мкл исследуемой ДНК и тщательно перемешивают. Суммарный объем добавляемых компонентов — 20 мкл. Закрывают крышки и осаждают капли кратковременным центрифугированием;

6) переносят пробирки в амплификатор и запускают необходимый режим амплификации;

7) после завершения программы амплификации 5—10 мкл ПЦР-продукта используют для электрофореза без дополнительного разбавления буфером для нанесения;

в) алгоритм действий при использовании готовой 2- или 5-кратной окрашенной ПЦР-смеси (постановку полимеразной цепной реакции с использованием готовой 2- или 5-кратной окрашенной ПЦР-смеси проводят согласно инструкции производителя):

1) перед приготовлением реакционной смеси подготавливают ДНК, встряхивают на вортексе и осаждают для удаления жидкости с крышек пробирок;

2) определяют количество реакций исходя из количества исследуемых проб;

3) смешивают все компоненты в одной пробирке в соответствии с прописью;

4) разливают (распределяют) ПЦР-смесь в равных долях;

5) в соответствующие пробирки, содержащие перемешанные компоненты реакции, вносят по 2—3 мкл пробы ДНК исследуемых объектов с концентрацией не менее 100 нг/мкл;

6) переносят пробирки в амплификатор и запускают необходимый режим амплификации;

7) после завершения программы амплификации 5—10 мкл ПЦР-продукта используют для электрофореза без дополнительного разбавления буфером для нанесения.

Составы ПЦР-смесей и режимы амплификации для разных родов древесных пород приведены в приложениях Б, В, Г.

Проведение полимеразной цепной реакции возможно с использованием различных коммерческих наборов в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

7.4.2 Методы проведения полимеразной цепной реакции с микросателлитными праймерами

Выделяют следующие методы проведения ПЦР с микросателлитными праймерами:

а) проведение генетической паспортизации лесных растений с использованием ПЦР с микросателлитными праймерами путем ВЭФ.

Для проведения ПЦР используется амплификатор (или термоциклер).

Для паспортизации биоматериала образцов лесных пород в качестве праймеров используют ядерные микросателлитные локусы ДНК растений. Наименования локусов (праймеров), их нуклеотидные структуры и размеры ампликонов обследуемых пород приведены в приложении В;

б) проведение генетической паспортизации лесных растений с использованием ПЦР с микросателлитными праймерами путем ФА.

Достаточно информативными праймерами для ФА основных лесообразующих пород являются праймеры (рекомендуемые в использовании) по таблице 6.

Таблица 6 — Мультилокусные панели для фрагментного анализа

Порода		Панели	
1	Сосна*	I	psyl_17, psyl_42, lw_isotig04195, PtTX4001
		II	lw_isotig07383, PtTX2123, PtTX2146, PtTX3107
		III	psyl_44, lw_isotig04306
3	Сосна кедровая сибирская*	I	Ps_80612, Ps_364418, Ps_718958, Ps_1375177, Ps_1915155
		II	Ps_1502048, Ps_25981, Ps_31489, Ps_39709, Ps_25463

Окончание таблицы 6

Порода		Панели	
5	Лиственница*	I	bcLK056, bcLK066, bcLK228, bcLK260
		II	bcLK224, bcLK232, bcLK253
		III	bcLK189, bcLK225, bcLK235
2	Ель**	I	Pa_28, Pa_33, UAPgAG150, EATC1B02
		II	Pa_36, Pa_59, UAPgAG105, EATC1E03
		III	Pa_41, Pa_56
4	Дуб черешчатый**	I	QrZAG11, QrZAG39, QrZAG96, QrZAG110, QrZAG112
		II	QrZAG5b, QrZAG7, QrZAG20, QrZAG65, QrZAG87
* Апробация и отработка праймеров — Филиал «ФБУ Рослесозащита» — «ЦЗЛ Красноярского края». ** Апробация и отработка праймеров — «ФБУ Рослесозащита — Центральный аппарат».			

Режимы амплификации при проведении ФА с образцами ДНК разных родов древесных пород приведены в приложении Г.

7.4.3 Метод проведения полимеразной цепной реакции с хлоропластными праймерами путем вертикального электрофореза

Кроме ядерных микросателлитных локусов для паспортизации биоматериала образцов лесных пород в качестве праймеров возможен анализ хлоропластной ДНК растений (соответствующих локусов) и использование хлоропластных праймеров. Наименования локусов (праймеров), их нуклеотидные структуры, протоколы проведения ПЦР и размеры ампликонов обследуемых пород для каждой породы подбираются индивидуально. Постановка ПЦР для образцов ДНК древесных пород с хлоропластными праймерами с последующим вертикальным электрофорезом проводится аналогично процедурам постановки ПЦР с ядерными микросателлитными праймерами с визуализацией на камерах ВЭФ.

7.4.4 Метод проведения полимеразной цепной реакции с митохондриальными праймерами путем горизонтального электрофореза

Кроме ядерных микросателлитных локусов для паспортизации биоматериала образцов лесных пород в качестве праймеров возможен анализ митохондриальной ДНК растений (соответствующих локусов) и использование митохондриальных праймеров. Наименования локусов (праймеров), их нуклеотидные структуры, протоколы проведения ПЦР и размеры ампликонов обследуемых пород для каждой породы подбираются индивидуально. Протоколы проведения ПЦР подбираются отдельно для каждого из выбранных праймеров.

7.5 Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК, полученных в результате полимеразной цепной реакции

Электрофоретическое разделение фрагментов ДНК в ПААГ или агарозном геле — аналитический метод, применяемый для разделения фрагментов ДНК по молекулярной массе (длине). Метод основан на разной скорости движения фрагментов разной массы (длины) при движении в геле под действием внешнего электрического поля.

Визуализация результатов ПЦР производится с помощью проведения ВЭФ в ПААГ и ГЭФ в агарозном 1,5 % — 2 % геле с ТАЕ- или ТВЕ-буфером. Подробное описание приведено в приложении Д.

7.5.1 Проведение вертикального и горизонтального электрофорезов в полиакриламидном и агарозном гелях

Одним из способов визуализации результатов ПЦР при определении генетических характеристик образцов биоматериала растений из насаждения (в том числе степени гетерозиготности, показателей внутрипопуляционной и межпопуляционной изменчивости и т. д.) является проведение ВЭФ и ГЭФ в ПААГ и агарозном геле соответственно с последующей окраской фрагментов ДНК бромистым этидием. Электрофоретическое разделение позволяет определить длины изучаемых фрагментов ДНК.

При использовании анализа фрагментов ДНК для составления паспортов используется ПААГ. Электрофорез в ПААГ позволяет разделять фрагменты с точностью до двух-трех нуклеотидов.

7.5.1.1 Проведение вертикального электрофореза

Электрофоретическое разделение амплифицированных микросателлитных фрагментов ДНК в ПААГ проводят в камерах для ВЭФ в комплекте с источниками питания. Приготовление ПААГ для проведения электрофореза в вертикальных камерах приведено в таблице 8.

Для определения длин фрагментов исследуемой ДНК в качестве эталона используется маркер длин с шагом в 20—50 bp (для коммерческих маркеров) или ДНК плазмиды *E. coli*, обработанной эндонуклеазой рестрикции *Hpa II* с переменным шагом.

Спектры рестрикционных фрагментов ДНК плазмиды *E. Coli pBR322*, обработанной эндонуклеазами рестрикции *Hpa II* и *Hae III*, используемых в качестве маркеров длин (см. [31]), приведены в таблице 7.

Таблица 7 — Спектры рестрикционных фрагментов ДНК плазмиды *E. coli* pBR322, обработанной эндонуклеазами рестрикции *Hpa II* и *Hae III*

Hpa II	*Hae III*
622	587
527	540
404	504
309	458
242	434
238	267
217	234
201	213
190	192
180	184
160	124
147	123
146	104
122	89
110	80
90	64
76	57
67	51
43	21
26	18
15	11
9	7

Таблица 8 — Приготовление ПААГ для проведения электрофореза в вертикальных камерах

Компоненты	На один гель	На два геля — одну камеру	На три-четыре геля
Приготовление основного геля			
ТВЕ × 10 (10-кратный)	5 мл	10 мл	15 мл
30 %-ный раствор акриламида и метиленбисакриламида (АКА)	10 мл	20 мл	30 мл
Доводят H_2O до	до 50 мл	до 100 мл	до 150 мл
Добавляют ТЕМЕД	50 мкл	100 мкл	150 мкл
Приготовление пробки			
Смеси основного геля	10 мл	20 мл	30 мл
Добавляют ТЕМЕД	25 мкл	50 мкл	75 мкл
Добавляют ПСА 10 %	125 мкл	250 мкл	375 мкл

Окончание таблицы 8

Компоненты	На один гель	На два геля — одну камеру	На три-четыре геля
Загрузка основного геля			
После застывания пробки заливают основной гель, для чего в оставшуюся смесь добавляют			
ПСА 10 %	335 мкл	670 мкл	1005 мкл
Примечание — приготовление TBE- или TAE-буфера, геля, загрузочного буфера и раствора бромистого этидия приведено в приложении А.			

Сбор камер, подготовку гелей, нанесение образцов в ПААГ, электрофоретическое разделение, снятие и окрашивание гелей проводят в соответствии с общепринятыми в биотехнологии методиками. Подробное описание процесса проведения электрофореза в вертикальных камерах приведено в приложении Д.

7.5.1.2 Проведение горизонтального электрофореза в агарозном геле

Агарозный гель используется при анализе крупных фрагментов ДНК. Электрофоретическое разделение проводится в камерах для ГЭФ. Для определения длин фрагментов исследуемой ДНК в качестве эталона используется маркер длин с шагом в 50—100 bp (для коммерческих маркеров). Сбор камер, подготовку гелей, нанесение образцов в агарозный гель, электрофоретическое разделение, снятие и окрашивание гелей проводят в соответствии с общепринятыми в биотехнологии методиками. Подробное описание процесса проведения электрофореза в горизонтальных камерах приведено в приложении Д.

7.5.1.3 Визуализация результатов вертикального и горизонтального электрофорезов

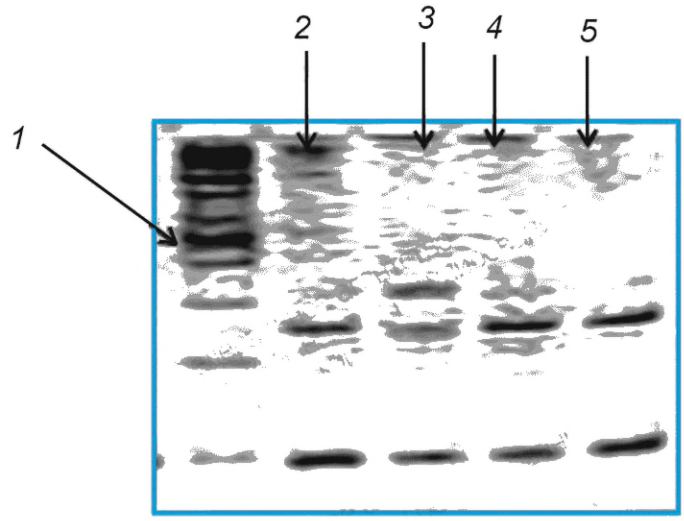
Визуализацию и документирование продуктов электрофоретического разделения производят в УФ-свете, с соблюдением правил технической безопасности, с помощью трансиллюминатора/системы гель-документирования с цифровой фотокамерой, ПК с соответствующим ПО.

После электрофоретического фракционирования гель помещают на 10—15 мин в раствор бромистого этидия (см. приложение А), просматривают под УФ-светом, проводят фотодокументирование для сохранения результатов и их последующей интерпретации.

ДНК видна в виде светящихся полос на черном фоне.

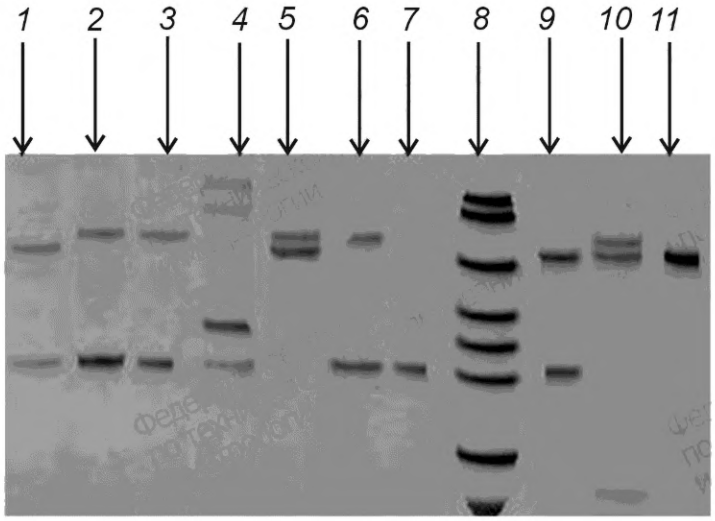
На этапе сохранения снимка (электрофореграммы), в случае проведения анализа на вертикальном и горизонтальном электрофорезах, лабораторные исследования заканчиваются.

На рисунках 4, 5 представлены результаты ГЭФ и ВЭФ: гомозигота проявляется в виде одной полосы, гетерозигота — в виде двух.



1 — маркер молекулярного веса; *2—5* — образцы

Рисунок 4 — Образцы ели европейской. Электрофореграмма аллелей локуса *Nad 1 intron 2* при ГЭФ



1—7; *9—11* — образцы; *8* — маркер молекулярного веса

Рисунок 5 — Образцы сосны обыкновенной. Электрофореграмма аллелей локуса *PtTX2146* при ВЭФ

Вычисление размера амплифицированного фрагмента ДНК производится путем сравнения его с маркером молекулярного веса, представляющим из себя набор молекул известной длины и используемым в качестве эталона при проведении электрофореза. Молекулярный вес обратно пропорционален скорости миграции молекулы через гелевую матрицу, поэтому, сравнивая подвижность исследуемых молекул с подвижностью маркеров, можно определить их размер.

Маркер может представлять собой смесь однотипных или различающихся по размерам молекул ДНК. При этом для каждой фракции маркера известен размер молекул ДНК, которые их составляют. В качестве маркера могут быть использованы рестрикционные фрагменты бактериофагов, искусственно синтезированные цепочки ДНК, ПЦР-продукты с известным размером и др.

Анализ и расчет размера фрагментов проводится с помощью специального ПО, позволяющего автоматически определить длину фрагмента в парах нуклеотидных оснований (молекулярный вес), сопоставив ее с известными длинами маркерных фрагментов. Окно ПО, используемого для вычисления размеров фрагментов ДНК электрофоретических зон, приведено на рисунке 6.

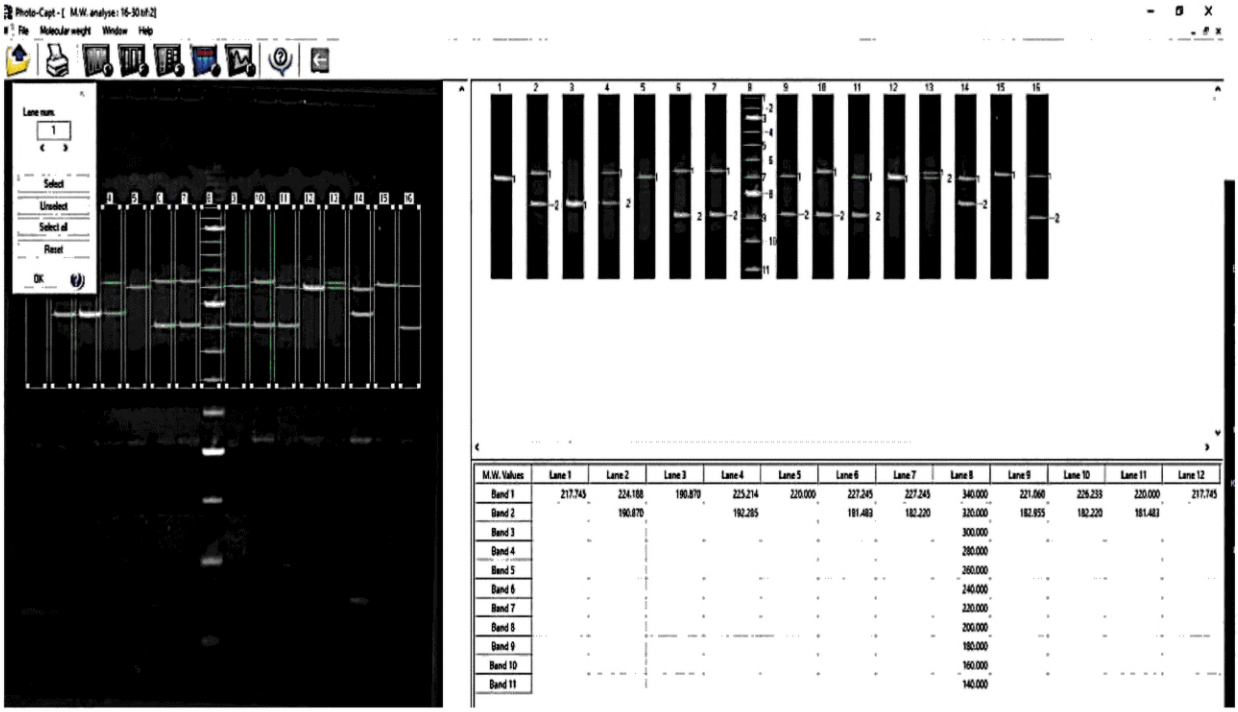


Рисунок 6 — Окно программного обеспечения PhotoCapt, используемого для вычисления размеров фрагментов ДНК электрофоретических зон

Результаты электрофореза считываются и заносятся в протоколы в виде длин фрагментов в парах нуклеотидов. Результатами типирования могут быть гаплотипы, генотипы. Система записи результатов типирования выглядит следующим образом: запись гаплотипа (митотипа или хлоротипа) в определенной ячейке системы производится в виде десятичного числа и выглядит как, например, «721» или в виде буквы латинского алфавита, если такой гаплотип уже известен науке и назван определенным образом. Запись генотипа в системе состоит из сочетания двух одинаковых или разных десятичных чисел, например, «146/154».

Типы исследования и типы анализов могут добавляться в базу генетических данных по мере расширения спектра проводимых работ.

Для контроля вводимых результатов генетического анализа необходимо предусмотреть диапазоны размеров ампликонов и повторов для анализируемых локусов согласно таблице 9.

Таблица 9 — Рекомендуемые маркеры (локусы), распределенные по типам анализа для исследований

Порода/вид	Тип анализа					
	Микросателлитный		Митотипирование		Хлоротипирование	
	Локус	Размер ампликона, повтора	Локус	Размер ампликона	Локус	Размер ампликона
Сосна обыкновенная	Psyl 17	-215-, 2	Nad7 intron1	1175, 1170, 1143	Pt71936	146-148, 1
	Psyl 42	-171-, 2	Cox I	1061	Pt15169	120-128, 1
	Psyl 44	-166-, 3	Syn 31	данные не опубликованы	Pt26081	109-112, 1
	lw 04195	-189-, 3	—	—	—	—
	lw 04306	-196-, 3	—	—	—	—
	lw 07383	-191-, 3		—	—	—
	PtTX 2146	-177-, 3	ftpA	—	—	—
	PtTX 2123	-192-, 3	—	—	—	—
	PtTX 3107	-144-, 3	—	—	—	—
	PtTX 4001	-197-, 2	—	—	—	—
Сосна кедровая сибирская	Ps_25463	-107-, 3	—	—	—	—
	Ps_25981	-170-, 4	—	—	—	—
	Ps_39709	-202-, 4	—	—	—	—
	Ps_80612	-162-, 3	—	—	—	—
	Ps_364418	-163-, 3	—	—	—	—
	Ps_1375177	-203-, 3	—	—	—	—
	Ps_1915155	-162-, 3	—	—	—	—
	Ps_31489	-186-, 3	—	—	—	—
	Ps_718958	-195-, 3	—	—	—	—
	Ps_1502048	-183-, 3	—	—	—	—
Ель европейская, сибирская, аянская	Pa_28	-148-, 3	Nad 1 intron 2	778, 1002	—	—
	Pa_33	-106-, 3	—	—	—	—
	Pa_36	-178-, 3	—	—	—	—
	Pa_41	-176-, 3	—	—	—	—
	Pa_56	-113-, 5	—	—	—	—
	Pa_59	-90-, 5	—	—	—	—
	EATC1B02	-199-; 3, 2	—	—	—	—
	EATC1E03	-133-, 3	—	—	—	—
	UAPgAG105	-167-, 2	—	—	—	—
	UAPgAG150A	-150-, 2	—	—	—	—
	UAPgAG150B	-130-, 2	—	—	—	—

Окончание таблицы 9

Порода/вид	Тип анализа					
	Микросателлитный		Митотипирование		Хлоротипирование	
	Локус	Размер ампликона, повтора	Локус	Размер ампликона	Локус	Размер ампликона
Лиственница	bcLK 056	-142-, 2	Nad 5 (1-2r)	инсерция 4 bp	—	—
	bcLK 066	-143-, 2	Nad 4 (3c-4r)	200, 215, 500	—	—
	bcLK 189	-162-, 2	UBC 460	2300, 2788	—	—
	bcLK 224	-128-, 2	—	—	—	—
	bcLK 225	-160-, 2	—	—	—	—
	bcLK 228	-191-, 2	—	—	—	—
	bcLK 232	-132-, 2	—	—	—	—
	bcLK 235	-173-, 2	—	—	—	—
	bcLK 253	-199-, 2	—	—	—	—
	bcLK 260	-94-, 2	—	—	—	—
Дуб	QrZAG5b	-217-, 2	—	—	—	—
	QrZAG7	-109-, 2	—	—	—	—
	QrZAG11	-238-, 2	—	—	—	—
	QrZAG20	-155-, 2	—	—	—	—
	QrZAG39	-103-, 2	—	—	—	—
	QrZAG65	-249-, 2	—	—	—	—
	QrZAG87	-101-, 2	—	—	—	—
	QrZAG96	-137-, 2	—	—	—	—
	QrZAG110	-193-, 2	—	—	—	—
	QrZAG112	-72-, 2	—	—	—	—

7.5.2 Фрагментный анализ на генетическом анализаторе

Еще одним способом визуализации результатов ПЦР при определении генетических характеристик образцов биоматериала растений из насаждения является автоматизированная разновидность электрофореза — электрофорез в капиллярном геле — фрагментный анализ.

Фрагментный анализ не предполагает определения последовательности ДНК. Этот метод заключается в разделении меченых флуоресцентными красителями ампликонов по размеру путем капиллярного электрофореза и сравнении их со стандартами длин.

7.5.2.1 Определение структуры ДНК с использованием генетического анализатора

Полная схема проведения ФА включает следующие этапы:

- выделение ДНК/очистка ДНК;
- ПЦР с флуоресцентно меченым праймером (отдельно для одного локуса) (несколькими праймерами, если используется микс для нескольких локусов). Один праймер из каждой пары является меченым;
- амплификация;
- подготовка образца перед капиллярным электрофорезом: очистка спиртом;
- приготовление денатурирующего раствора: очищенный продукт амплификации смешивается с формамидом и размерным стандартом (набором фрагментов ДНК известной длины, меченых краси-

телем, который не использовали для метки продуктов. Размерный стандарт служит для картирования исследуемых фрагментов ДНК и определения их длин;

- денатурация на амплификаторе;
- резкое охлаждение;
- проведение спектральной калибровки;
- проведение фрагментного анализа на генетическом анализаторе;
- анализ результатов в специальных программах (определение размера фрагментов, определение генотипов на основании соотношения различных аллелей анализируемых маркеров) — обработка результатов.

Таким образом, проведение ФА включает два этапа:

- очистка спиртом и денатурация продукта ПЦР;
- электрофоретическое фракционирование полученных меченых фрагментов различной длины, с последующей лазерной детекцией.

Проведение ФА возможно с использованием различных коммерческих наборов в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями.

Определение структуры ДНК путем электрофоретического анализа и детекции меченых продуктов в режиме капиллярного электрофореза проводится с использованием генетического анализатора любого производителя в соответствии с прилагаемыми инструкциями.

Результаты выявленных аллелей получаются в виде пиков на хроматограммах, которые при наведении на них показывают размеры их длин (молекулярных масс).

Последовательности выполнения операций для ФА на генетических анализаторах приведены в приложении Е.

Преимущество метода ФА перед форезом в вертикальных камерах заключается в скорости, стандартизованности процесса электрофореза, автоматическом определении числовых результатов измерений молекулярных масс фрагментов ДНК/размеров фрагментов в парах нуклеотидов, а также в более точном разделении этих фрагментов даже в случае комплексного определения сразу нескольких участков (фрагментов) ДНК-последовательностей.

На рисунке 7 представлен результат микросателлитного спектра гетерозиготного образца, полученного методом ФА: гетерозигота проявляется в виде двух пиков. В случае присутствия гомозиготы на хроматограмме виден один пик, показывающий молекулярный вес определенной аллели.

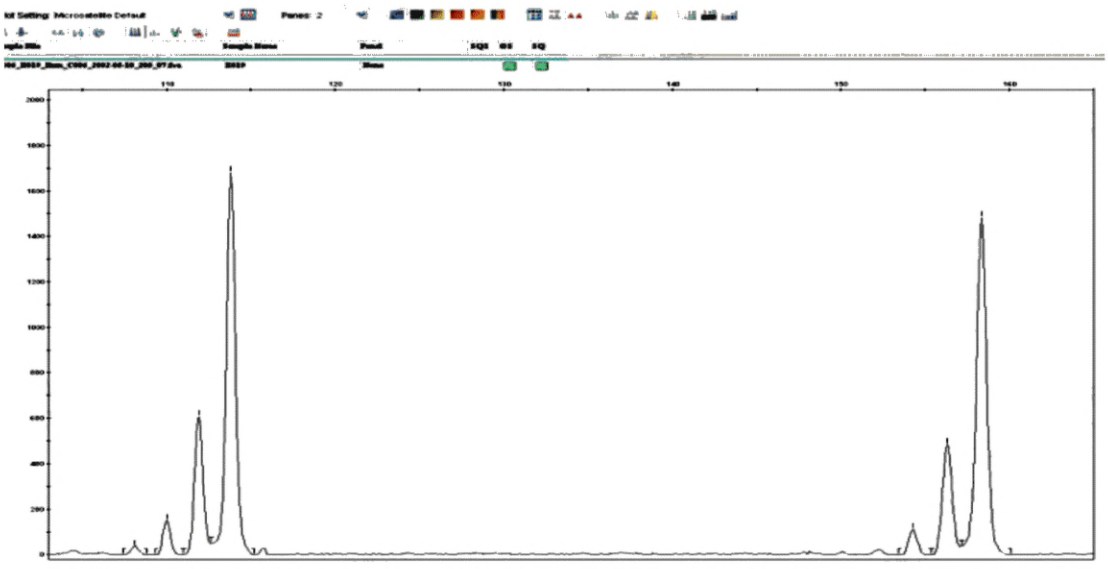


Рисунок 7 — Микросателлитный спектр гетерозиготного образца, капиллярный электрофорез (хроматограмма)

7.5.2.2 Пробоподготовка ПЦР-продуктов для фракционирования в условиях генетического анализатора. Очистка спиртом

а) подготавливают необходимое количество микроцентрифужных пробирок на 1,5—2,0 мл;

б) в каждую пробирку объемом 1,5—2,0 мл помещают по 40 мкл этанола (95 %) и по 20 мкл амплифицированной ДНК;

в) содержимое перемешивают на вихревом смесителе и инкубируют 3 мин в штативе (18 °С — 25 °С);

г) производят центрифугирование при 13 000 об/мин в течение 8—10 мин;

д) после центрифугирования к полученному осадку ДНК меченых продуктов добавляют 300 мкл этанола (95 %);

е) после добавления этанола выливают надосадочную жидкость. Промокнув оставшиеся капли спирта, подсушивают пробирки на фильтровальной бумаге;

ж) переносят пробирки с открытыми крышками в термостат, высушить осадок ДНК меченых продуктов в течение 7—15 мин (60 °С) до полного испарения жидкости;

и) высушенный осадок растворяют в 15—30 мкл дистиллированной воды dH_2O (если пики на ФА получатся сильно высокие, то разбавляют осадок сильнее — 35—50 мкл ddH_2O) и перемешивают на вортексе (в течение 2 с);

к) ставят пробу в термошейкер на 10—20 мин при 50 °С — 60 °С.

7.5.2.3 Приготовление загрузочного буфера

После очистки ПЦР спиртом перед началом ФА и проведения денатурации необходимо приготовление денатурирующего раствора (формамид + размерный стандарт). Размораживают формамид, достают из холодильника размерный стандарт. Все тщательно перемешивают на вортексе.

Приготавливают смесь из размерного стандарта и формамида, перемешивают на вортексе в течение 2 мин.

На один образец приходится:

- 10 мкл формамида;
- 0,15—0,3 мкл размерного стандарта.

7.5.2.4 Денатурация

Перед началом ФА для проведения денатурации полученный объем смеси распределяют по стрипам — по 10 мкл в микропробирку, после чего добавляют по 1 мкл очищенного образца. Закрывают стрипы крышками, удаляют пузыри, переносят в амплификатор и денатурируют в течение 3 мин при 95 °С.

За несколько секунд до окончания программы, не дожидаясь окончания, извлекают стрипы с образцами и помещают в изотермический штатив для охлаждения образцов на 3—15 мин (см. таблицу 10).

Таблица 10 — Протокол проведения денатурации ДНК перед постановкой ФА

Стадия	Количество циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Денатурация	1	95	3 мин
Охлаждение	1	4	∞

В зависимости от используемого генетического анализатора подготавливают планшету или микроцентрифужные пробирки на 0,2 мл и вносят по 10 мкл охлажденных образцов.

7.6 Получение и оформление результатов исследований. Аналитическая обработка, внесение в базу генетических данных

Проведение ФА в генетическом анализаторе и интерпретация результатов приведены в приложении Е.

Обработку полученных результатов проводят на основании использования соответствующего программного пакета (см., например, MS Excel — GenAlex).

Результаты паспортизации по локусам ДНК, полученные в виде значений и частот аллелей по каждому обследованному локусу определенных выборок образцов каждой обследуемой породы, по указанным характеристикам ДНК относят к тому или иному определенному виду/роду/популяции лесных растений и полученные таким образом значения заносят в базу генетических данных.

Результаты исследований оформляют записями в рабочем журнале и заключительным отчетом.

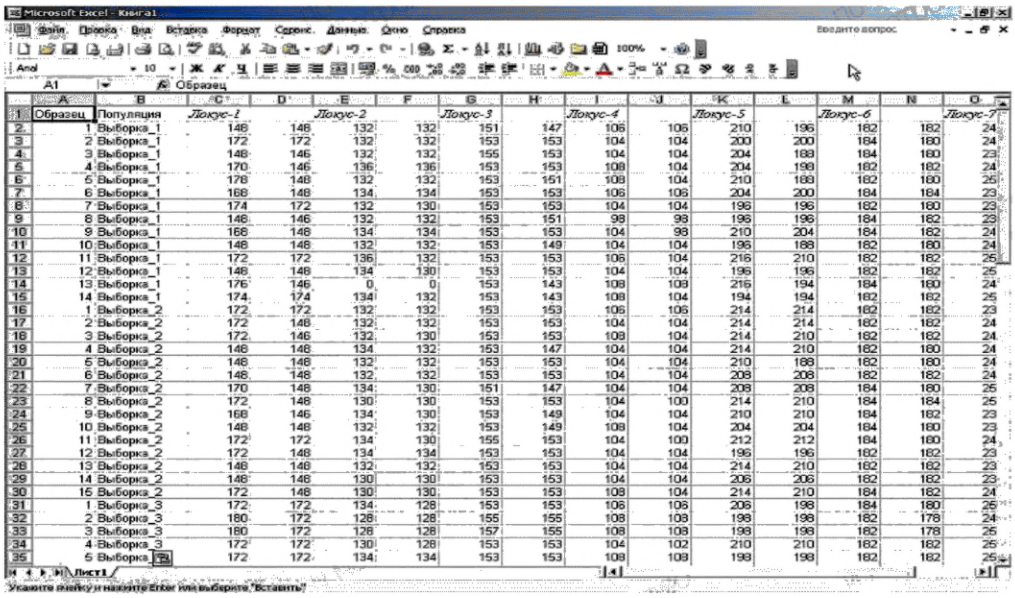
7.6.1 Методические указания к анализу результатов паспортизации. Получение результатов — генотипирование

Заключительным этапом электрофоретического анализа является описание выявленных спектров — определение количества зон и их обозначение. Для типирования каждой фракции используется числовая величина размера (в парах нуклеотидов (п.н. или п.о.) фрагментов ДНК, находящихся в данной электрофоретической фракции.

Интерпретация результатов (генотипирование) сводится к анализу размеров выявленных ампликонов. Как отмечалось выше, величина размера каждой амплифицированной зоны вычисляется относительно электрофоретической подвижности маркеров с известной длиной фрагмента при помощи специального ПО. Обозначение аллельных вариантов производится по названию локуса, выявляемого в ходе полимеразной цепной реакции, и размера зоны (п.н.).

В результате генотипирования получают таблицы индивидуальных многолокусных генотипов.

Пример таблицы приведен на рисунке 8.



Образец	Популяция	Локус-1		Локус-2		Локус-3		Локус-4		Локус-5		Локус-6		Локус-7	
1	Выборка_1	148	148	132	132	151	147	106	106	210	196	182	182	24	
2	Выборка_1	172	172	132	132	153	153	104	104	200	200	184	180	24	
3	Выборка_1	148	146	132	132	155	153	104	104	204	188	184	180	23	
4	Выборка_1	170	146	136	136	153	153	108	104	204	196	182	182	24	
5	Выборка_1	178	148	132	132	153	151	108	104	210	188	182	180	25	
6	Выборка_1	168	148	134	134	153	153	106	106	204	200	184	184	23	
7	Выборка_1	174	172	132	130	153	153	104	104	196	196	182	180	23	
8	Выборка_1	148	146	132	132	153	151	98	98	196	196	184	182	23	
9	Выборка_1	168	148	134	134	153	153	104	98	210	204	184	182	24	
10	Выборка_1	148	148	132	132	153	149	104	104	196	188	182	180	24	
11	Выборка_1	172	172	136	132	153	153	106	104	216	210	182	182	25	
12	Выборка_1	148	148	134	130	153	153	104	104	196	196	182	182	25	
13	Выборка_1	176	146	0	0	153	143	108	108	216	194	184	180	24	
14	Выборка_1	174	174	134	132	153	143	108	104	194	194	182	182	25	
1	Выборка_2	172	172	132	132	153	153	106	106	214	214	182	182	23	
2	Выборка_2	172	148	132	132	153	153	104	104	214	214	182	182	24	
3	Выборка_2	172	146	132	130	153	153	108	104	214	210	182	182	24	
4	Выборка_2	148	148	134	132	153	147	104	104	214	210	182	180	24	
6	Выборка_2	148	148	132	132	153	153	104	104	210	188	182	180	24	
6	Выборка_2	148	148	132	132	153	153	104	104	208	208	182	182	24	
7	Выборка_2	170	148	134	130	151	147	104	104	208	208	184	180	25	
8	Выборка_2	172	148	130	130	153	153	104	100	214	210	184	184	25	
9	Выборка_2	168	146	134	130	153	149	104	104	210	210	184	182	23	
10	Выборка_2	148	148	132	132	153	149	108	104	204	204	184	180	23	
11	Выборка_2	172	172	134	130	155	153	104	100	212	212	184	180	24	
12	Выборка_2	172	148	134	134	153	153	104	104	196	196	182	182	23	
13	Выборка_2	148	148	132	132	153	153	104	104	214	210	182	182	23	
14	Выборка_2	148	148	130	130	153	153	104	104	206	206	182	182	23	
16	Выборка_2	172	148	130	130	153	153	108	104	214	210	184	182	24	
1	Выборка_3	172	172	134	128	153	153	106	106	206	198	184	180	25	
2	Выборка_3	180	172	128	128	155	155	108	108	198	198	182	178	24	
3	Выборка_3	180	172	128	128	157	155	108	108	198	198	182	178	25	
4	Выборка_3	172	172	130	128	153	153	104	102	210	210	182	182	25	
5	Выборка_3	172	172	134	134	153	153	108	108	198	198	182	182	25	

Рисунок 8 — Пример таблицы индивидуальных многолокусных генотипов

7.6.2 Статистическая обработка полученных результатов

Для статистической обработки результатов (аллельных вариантов), полученных в ходе проведения работ по генетической паспортизации, применяется ряд компьютерных программ.

Для получения основных показателей внутрипопуляционной изменчивости используется соответствующая надстройка (например, GenAlex для MS Excel).

Для работы с программами необходимо подготовить файлы данных, представляющие собой таблицы многолокусных генотипов особей с дополнительными параметрами. Табличные данные генотипов создаются в формате .xlsx (MS Excel) и экспортируются в текстовые и иные форматы при необходимости анализа популяционной структуры.

Анализ популяционно-генетических данных позволяет получать следующие показатели:

- внутрипопуляционная изменчивость;
- межпопуляционная изменчивость;
- распределение генотипов;
- принадлежность особи к популяции;
- вероятность сходства.

Результаты ФА считываются и заносятся в протоколы в виде длин фрагментов в парах нуклеотидов.

По итогам проведенного статистического анализа частот аллелей полученные показатели подлежат группировке:

- для репродуктивного материала на три категории в соответствии со значениями степеней сходства в процентном выражении: низкая степень сходства — менее 84 %, средняя — от 85 % до 94 %, высокая — от 95 % до 100 %;
- для естественных насаждений — на две категории в соответствии со значениями степеней сходства в процентном выражении: низкая степень генетического сходства — менее 90 %, высокая — от 90 % до 100 %;
- для ОЛС: АК, ЛСП, плюсовых древьев и для сравнительного анализа принадлежности фрагмента конкретного дерева предполагаемому фрагменту дерева из насаждений степень сходства в процентном выражении должна составлять 99 % — 100 %.

Отбор образцов, создание объединенной пробы, выделение суммарной ДНК из растительного материала, проведение ПЦР и очистка ПЦР-продуктов, а также интерпретация результатов осуществляются в соответствии с методиками [32] и [33].

7.6.3 Создание генетических паспортов лесных пород, объектов лесного семеноводства, партий репродуктивного материала

Формы (бланки) созданных на основе молекулярно-генетического анализа генетических паспортов плюсовых деревьев лесных пород, ОЛС, партий репродуктивного материала и примеры их заполнения приведены в приложении Ж.

7.6.4 Создание референсной базы генетических данных лесных пород

Всю информацию о поступающих с территории Российской Федерации образцах генетического материала обследуемых основных лесообразующих пород и полученных результатах генетических анализов (генетических показателях) вносят в единую референсную базу генетических данных основных лесообразующих пород, которая содержит информацию:

- о количестве отобранных и находящихся в работе и на хранении образцов;
- количестве проанализированных выборок;
- координатах точек отбора образцов (узлов сетки 100 × 100 км, питомников, ОЛС), наименованиях лесничеств, участковых лесничеств, номерах кварталов, выделов;
- типах анализа, последовательностях используемых праймеров, локусах и значениях аллелей, полученных в ходе обследования.

Приложение А
(справочное)

Буферы, растворы

А.1 Выделение ДНК

В таблице А.1 приведено приготовление ЦТАБ-буфера 3 % для выделения ДНК.

Таблица А.1 — ЦТАБ-буфер 3 % (100 мл)

Наименование реагента	Количество	Ед. изм.
Цетилтриметиламмоний бромид	3,0	г
Натрий хлорид	8,19	г
ЭДТА, динатриевая соль, дигидрат	0,744	г
Трис	1,212	г
Дистиллированная вода	Доводят до необходимого объема (100)	мл

Примечание — mQ-(mili-Q-) вода — вода, очищенная от органических веществ, токсинов микроорганизмов и неорганических ионов с помощью ионообменной смолы и мембранных фильтров. Удельное сопротивление (чистота определяется по электропроводности/сопротивлению) — не менее 18 МОм/см (при 25 °С), содержанием общего органического углерода ≤50 мкг/л. ее. Обычно добиваются значения больше 18,2 МОм/см (при 25 °С). В конце очистки вода фильтруется от микроорганизмов.

Используют смесь хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1 соответственно. Работу проводят под вытяжкой.

А.2 Проведение электрофореза

В таблицах А.2—А.6 представлено приготовление рабочих растворов для проведения электрофоретического разделения фрагментов.

Таблица А.2 — 10-кратный TBE (1 л)

Наименование реагента	Количество	Ед. изм.
Борная кислота	55	г
ЭДТА, динатриевая соль, дигидрат	7,4	г
Трис	108	г
Дистиллированная вода	Доводят до необходимого объема (1000)	мл

Таблица А.3 — 50-кратный TAE (1 л)

Наименование реагента	Количество	Ед. изм.
Ледяная уксусная кислота	57	мл
0,5 М ЭДТА, pH 8,0	100	мл
Трис	242	г
Дистиллированная вода	Доводят до необходимого объема (1000)	мл

Таблица А.4 — Раствор бромистого этидия (1 л)

Наименование реагента	Количество	Ед. изм.
Исходный раствор 10 мг/мл	1	мл
Дистиллированная вода	Доводят до необходимого объема (1000)	мл

После приготовления раствора его необходимо процедить через бумажные фильтры.

Таблица А.5 — Загрузочный буфер для внесения ампликона образца в карман агарозного геля

Наименование реагента	Количество	Ед. изм.
Бромфеноловый синий	50	мкг
Глицерин	90	мл
Дистиллированная вода	60	мл

Таблица А.6 — Приготовление маркера молекулярного веса для микросателлитного анализа

Реактивы	мкл
Дистиллированная вода	65
Плазмида pBR322 (250 мкг)	25
Буфер (идет в комплекте с рестриктазой)	10
Рестриктаза HpaII (2500 е.а.)	2

Смешивают раствор и инкубируют при 37 °С в термостате 1,5—2 ч. Затем в общую смесь добавляют краситель (идет в комплекте с любым коммерческим маркером молекулярного веса).

Приложение Б
(справочное)

Составы смесей полимеразных цепных реакций для проведения амплификации

В таблицах Б.1—Б.3 приведены составы необходимых растворов для ПЦР-смесей. Перед проведением ПЦР выделенную ДНК разводят до концентрации ≈ 100 нг/мкл.

Таблица Б.1 — Состав ПЦР-смеси с использованием $MgCl_2$.

ПЦР-смесь (мастер-микс)	На один образец, мкл
dH_2O	6,8
PCR buffer (10x)	1,5
$MgCl_2$(25 mM)	1,5
dNTP (2,5 mM)	1
Primer F (5 mM)	1
Primer R (5 mM)	1
Taq полимераза HS (5 ед,/мкл)	0,2
ПЦР-микс	13
Образец ДНК	1
Общий объем	14

Таблица Б.2 — ПЦР-смесь с готовой окрашенной пятикратной реакционной смесью (необходимо следовать инструкции производителя)

ПЦР-смесь (мастер-микс)	На один образец, мкл
dH_2O	13 (или 12)
Готовая окрашенная ПЦР-смесь	5
Primer-Mix (F, R): 2 (10) мкл F, 2 (10) мкл R (100 мкМ) + 396 (380) мкл mQ	5
DNA	2 (или 3)
Общий объем	25

Таблица Б.3 — ПЦР-смесь с лиофилизированной готовой реакционной смесью (необходимо следовать инструкции производителя)

ПЦР-смесь (мастер-микс)	На один образец, мкл
Buffer (из набора)	10
Primer-Mix (F, R): 2 (или 10) мкл F, 2 (или 10) мкл R (100 мкМ) + 396 (или 380) мкл mQ	5
DNA	5
Общий объем	20

Приложение В
(справочное)

Форма перечня праймеров для генетической паспортизации насаждений лесообразующих пород, объектов лесного семеноводства, репродуктивного материала лесных растений

Таблица В.1 — Микросателлитные праймеры для использования в работе по генетической паспортизации основных лесообразующих пород

№ п/п	Локус	Последовательности праймеров		Мотив	Ожидаемые размеры ампликона, п.н.	Температура отжига T_a, °С	Флуоресцентный краситель	Число ожидаемых аллелей (у разных видов) — какие аллели встречаются (по литературным источникам)	Литературный источник
		Прямой (F)	Обратный (R)						
Сосна обыкновенная									
1	psyl_17	tgg tct gca aat caa tcg aa	ggg tag gaa tgc aag tta ggc	$(ta)_7$	219—251	57	ROX	6 221, 223, 225, 227, 229, 253	Sebastiani ea, 2012
2	psyl_42	caa ctt cag cct tgc aac aa	cga ctt cat ttg gaa cac ca	$(tc)_9$	171—179	57	TAMRA	5 173, 177, 179, 181, 183	Sebastiani ea, 2012
3	psyl_44	tcc aag ttc ggt tcc ttg tc	gac acg atg gat tcc ctg at	$(cgg)_5$	166—175	55	FAM	3 172, 178, 181	Sebastiani ea, 2012
4	lw_isotig04195	gag atc acc gaa aca aca aaa	tac aag tcc cag caa aac aat	$(gag)_5$	189	58	HEX или R6G	4 189, 192, 195, 198	Fang ea, 2014
5	lw_isotig04306	gcc att ttt ttc ttc tct cct	ggt cgg ttt ctg aat ttc taa	$(tcc)_7$	196	55	HEX или R6G	6 181, 184, 187, 190, 193, 196	Fang ea, 2014
6	lw_isotig07383	caa aca aaa aac agt ctg ca	atc gtc atc atc atc gtc ac	$(gat)_7$	191	58	FAM	5 182, 185, 188, 191, 194	Fang ea, 2014
7	PtTX2123	gaa gaa ccc aca aac aca ag	ggg caa gaa ttc aat gat aa	$(agc)_8$	192—210	55—45↓1,0	HEX или R6G	3 195, 198, 204	Liewlaksaneey anawin ea, 2004
8	PtTX2146	cct ggg gat ttg gat tgg gta ttt g	aca gac ctt ccc cgt tcc ttt tat a	$(gct)_4gcc(gct)_7gcc(gct)_8$	183 3 зоны акт-сти	60—50↓1,0	TAMRA	10 186, 192, 198, 201, 204, 207, 213, 219, 222, 234	Liewlaksaneey anawin ea, 2004

Продолжение таблицы В.1

№ п/п	Локус	Последовательности праймеров		Мотив	Ожидаемые размеры ампликона, п.н.	Температура отжига T_a, °С	Флуоресцентный краситель	Число ожидаемых аллелей (у разных видов) — какие аллели встречаются (по литературным источникам)	Литературный источник
		Прямой (F)	Обратный (R)						
Сосна обыкновенная									
9	PtTX3107	aaa caa gcc cac atc gtc aat c	tcc cct gga tct gag ga	$(cat)_{14}$	150–177	55–45↓1,0	HEX или R6G	8 153, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177	Liewlaksaneey anawin ea, 2004
10	PtTX4001	cta ttt gag tta aga agg gag tc	ctg tgg gta gca tca tc	$(ca)_{15}$	201—219	57	FAM	8 201, 203, 207, 213, 215, 217, 219, 221	Gonzalez-Martinez ea, 2004
Ель европейская, сибирская, аянская									
1	Pa_28	ggc cga aag tgc tac tgc ta	tgc tcc aga aga aca ctc aca	$(tcg)_n$	148—162 (178)	60—50↓1,0	HEX или R6G	6 157, 160, 163, 166, 169, 172	Fluch ea, 2011
2	Pa_33	ggt cga gga gga gga ggt ag	cac cgc tag tgc agt ctc tg	$(cgg)_n$	91—104	60—50↓1,0	TAMRA	9	Fluch ea, 2011
3	Pa_36	cgg cag gaa cat cac tgt ta	acc gta acc tcc cct acc ac	$(cgg)_n$	178—200	60—50↓1,0	HEX или R6G	5	Fluch ea, 2011
4	Pa_41	cga aga aga aag cga gga tg	cag gct gcg aga atc ctc ta	$(ctg)_n$	176—182 (188)	60—50↓1,0	ROX	4 176, 182, 185, 188	Fluch ea, 2011
5	Pa_56	atc gtc tgc att gca ttc ac	ctt cgt tcc ttc ctg atc ca	$(aggtg)_n$	113—128	60—50↓1,0	HEX или R6G	4 113, 118, 123, 128	Fluch ea, 2011
6	Pa_59	tag acc acg ttg tgc tga aa	gcg acc ttt cgc aat taa ac	$(ctctg)_n$	90—112 (125)	60—50↓1,0	HEX или R6G	7 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125	Fluch ea, 2011
7	EATC1B02	tgg cat gag att tat gtg gtt	gtg tgc cac tca acc tca c	$(atc)_7\ (at)_3$	199	57	FAM	5 196, 199, 202, 205, 211	Scotti ea, 2002
8	EATC1E03	ccc ctt att cct aac gtc aaa	tac cag tgg tga caa cga tg	$(cat)_4\ cgt(cat)_8$	175	57	FAM	6 115, 127, 133, 136, 139, 142, 145	Scotti ea, 2002

Продолжение таблицы В.1

№ п/п	Локус	Последовательности праймеров		Мотив	Ожидаемые размеры ампликона, п.н.	Температура отжига T_a, °С	Флуоресцентный краситель	Число ожидаемых аллелей (у разных видов) — какие аллели встречаются (по литературным источникам)	Литературный источник
		Прямой (F)	Обратный (R)						
9	UAPgAG105	caa cta cct tga gcc aat ca	gtc cgg cat tat tga tca tt	$(ag)_{11}$	167—175	53	HEX или R6G	2-6-9	Hodgetts ea, 2000
Ель европейская, сибирская, аянская									
10	UAPgAG150	acc aat gct ttt acc aaa cg	ttg att gca agt gat ggt tg	$(ag)_{19}$	2 зоны акт-сти a: 150—164; b: 124—132	54	TAMRA	a: 2-5; b: 2-4	Hodgetts ea, 2000
Лиственница сибирская и близкие ей таксоны									
1	bcLK_056	atg ggc taa ggt atg ttt tac g	ttg cca aca tct ata cca agt ct	$(ag)_{20}$	174—200	63—53	ROX	16 142, 146, 148, 158, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, 188, 190, 192, 194	K. Isoda, 2006
2	bcLK_066	gca acc gac aat gat tac ata g	cct aaa act gaa ctt tgc tca at	$(tg)_{12}$	155—172	63—53	HEX или R6G	5 155, 157, 159, 161, 163	K. Isoda, 2006
3	bcLK_189	acc ata cgc ata ccc aat aga	agt ttt cct ttc cca cac aat	$(ag)_{17}at(ag)_6$	152—188	63—53	TAMRA	5 152, 156, 158, 162, 166	K. Isoda, 2006
4	bcLK_224	gga gag gcc act act att att ac	atg cgt tcc ttc att cct ct	$(ag)_{17}$	152—168	63—53	FAM	6 128, 130, 132, 142, 136, 138	K. Isoda, 2006
5	bcLK_225	tgg cag cta aag gat taa aga a	tgg cag cta aag gat taa aga a	$(ga)_{20}$	176—220	63—53	FAM	5 206, 210, 212, 216, 218	K. Isoda, 2006
6	bcLK_228	ccc taa ccc tag aat cca ata a	gag gaa ggc gac aag tca tt	$(ag)_{18}$	183—215	63—53	HEX или R6G	3 183, 185, 187	K. Isoda, 2006
7	bcLK_232	tgt tgc tgg gtt gtt gtt aga	ggg taa tag ttc cag tct ttg	$(ag)_{19}$	142—178	63—53	TAMRA	8 130, 134, 138, 140, 144, 146, 152, 158	K. Isoda, 2006

Продолжение таблицы В.1

№ п/п	Локус	Последовательности праймеров		Мотив	Ожидаемые размеры ампликона, п.н.	Температура отжига T_a, °С	Флуоресцентный краситель	Число ожидаемых аллелей (у разных видов) — какие аллели встречаются (по литературным источникам)	Литературный источник
		Прямой (F)	Обратный (R)						
8	bcLK_235	ttc act tgt gat cct aga gtt aga	aac ccc taa cca tat aat atc ca	$(tc)_9(ac)_2ag(ac)_{14}$	177—220	58	HEX или R6G	3 115, 117, 119	K. Isoda, 2006
9	bcLK_253	aac acc ata gtg caa tgt gc	tcc tct tgt tga tgc cac tt	$(ag)_{17}$	219—242	63—53	TAMRA	2 199, 201	K. Isoda, 2006
10	bcLK_260	ctc cat aag ggg cat cac at	tgg gct caa gtt tgg aca tta	$(tg)_{14}(ag)_9$	115—126	63—53	FAM	3 115, 117, 119	K. Isoda, 2006
Сосна кедровая сибирская и близкие ей таксоны									
1	Ps_25463	act act ccc gaa ggc gta aac	ttt tga gat gtg tgg aga gga c	$(ggt)_7$	107—116	60—50↓1,0	FAM	3 107, 110, 113	М.М. Белоконь и др., 2016
2	Ps_25981	ttg agt ggg atg gac ata gag	ttg ccc caa gtc tac aag at	$(tatt)_5$	170—178	60—50↓1,0	HEX или R6G	3 170, 174, 178	М.М. Белоконь и др., 2016
3	Ps_31489	cac cca aac aag aca aac ctc t	ttc ttc ctc ctt ccc ctt att c	$(aga)_6$	186—189	60—50↓1,0	TAMRA	2 186, 189	М.М. Белоконь и др., 2016
4	Ps_39709	gtt ctc tta acc tcg aac ttg tga t	ctg aaa acc ctg tca aac aac a	$(atgt)_5$	202—226	60—50↓1,0	ROX	4 198, 202, 214, 226	М.М. Белоконь и др., 2016
5	Ps_80612	ctt cta agt ggg tca tct tgg c	ctg tct agg ctt ttg gcc ttt a	$(aag)_{10}$	162—180	60—50↓1,0	FAM	7 162, 165, 168, 171, 177, 180, 183	М.М. Белоконь и др., 2016
6	Ps_364418	tcg gac cta aag aaa aga ggt g	aag att cgt ctg agt gga cgt t	$(tga)_{10}$	163—178	60—50↓1,0	HEX или R6G	8 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 184	М.М. Белоконь и др., 2016
7	Ps_718958	cta tgt atg ggt caa tgg tgt cc	gat gca aca aat gca cat gac t	$(tat)_{10}$	195—07	60—50↓1,0	TAMRA	2 195, 207	М.М. Белоконь и др., 2016

Продолжение таблицы В.1

№ п/п	Локус	Последовательности праймеров		Мотив	Ожидаемые размеры ампликона, п.н.	Температура отжига T_a, °С	Флуоресцентный краситель	Число ожидаемых аллелей (у разных видов) — какие аллели встречаются (по литературным источникам)	Литературный источник
		Прямой (F)	Обратный (R)						
8	Ps_1375177	atg ggc tag atg gta gca gtt c	ggt ggt ttg gct ctc tta aat g	$(cat)_{10}$	203—236	60—50↓1,0	ROX	3 203, 206, 236	М.М. Белоконь и др., 2016
9	Ps_1 502048	aga tcc atc cca atc aca gtt c	agg gac cta gca ctt tca tcc t	$(aat)_{11}$	183—201	60—50↓1,0	FAM	3 183, 186, 192, 195, 198, 201	М.М. Белоконь и др., 2016
10	Ps_1915155	ttg ttg gat tgg ctc atg g	tct cca gta cac acc tcg att g	$(tat)_{11}$	162—183	60—50↓1,0	ROX	5 171, 174, 177, 180, 183	М.М. Белоконь и др., 2016
Дуб черешчатый, монгольский									
1	QrZAG5b	tga aga gta aga cca ttc aca tca	gta tgt gag tgt ttg tgg ttt gg	—	217—263	50	HEX или R6G	3 217, 219, 221	O. Lepais, 2006
2	QrZAG7	caa ctt ggt gtt cgg atc aa	gtg cat ttc ttt tat agc att cac	—	109—152	50	FAM	3 109, 111, 113	O. Lepais, 2006
3	QrZAG11	cct tga act cga agg tgt cct t	gta ggt caa aac cat tgg ttg act	—	242—286	50	HEX или R6G	3 242, 244, 246	O. Lepais, 2006
4	QrZAG20	cca tta aaa gaa gca gta ttt tgt	gca aca ctc agc cta tat cta gaa	—	155—195	50	HEX или R6G	3 155, 157, 159	O. Lepais, 2006
5	QrZAG39	cac cgc tgg aat ttt aag gga	gac cta agc caa agt gtg ggc	—	103—139	50	ROX или NED	3 103, 105, 107	O. Lepais, 2006
6	QrZAG65	cag tgg tgt caa ctc ctc cca g	gtc agg tga cca ttc aaa cct aga a	—	249—306	50	FAM	3 249, 251, 253	O. Lepais, 2006
7	QrZAG87	tcc cac cac ttt ggt ctc tca	gtt gtc agc agt ggg atg ggt a	—	101—141	50	ROX	3 101, 103, 105	O. Lepais, 2006

Окончание таблицы В.1

№ п/п	Локус	Последовательности праймеров		Мотив	Ожидаемые размеры ампликона, п.н.	Температура отжига T_a, °С	Флуоресцентный краситель	Число ожидаемых аллелей (у разных видов) — какие аллели встречаются (по литературным источникам)	Литературный источник
		Прямой (F)	Обратный (R)						
8	QrZAG96	ccc agt cac atc cac tac tgt cc	ggt tgg gaa aag gag atc aga	—	137—179	50	HEX или R6G	3 137, 139, 141	O. Lepais, 2006
9	QrZAG110	gga ggc ttc ctt caa cct act	gat ctc ttg tgt gct gta ttt	—	193—235	50	FAM	3 193, 195, 197	O. Lepais, 2006
10	QrZAG112	ttc ttg ctt tgg tgc gcg	gtg gtc aga gac tcg gta agt att c	—	72—106	50	FAM	3 72, 74, 76	O. Lepais, 2006

Приложение Г
(справочное)

Режимы амплификации полимеразной цепной реакции для разных родов древесных пород

Г.1 В таблице Г.1 приведен стандартный режим амплификации.

Таблица Г.1 — Стандартный режим амплификации

Стадия	Количество циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	15 мин
Денатурация	35—40	95	15 с
Отжиг		55—65	20 с
Элонгация		72	40 с
Заключительная элонгация	1	72	4 мин
Охлаждение	1	4	∞
Примечание — Это стандартный режим амплификации для праймеров с длиной цепи около 20 пар нуклеотидов. Для каждой пары праймеров необходимо вносить изменения температуры отжига. В оптимальном случае температура отжига должна быть на 2 °С — 3 °С ниже температуры плавления праймера. В зависимости от поставленной задачи возможны варианты режимов амплификации.			

Г.2 Режимы амплификации полимеразной цепной реакции с последующим фрагментным анализом

В таблицах Г.2—Г.6 приведены режимы амплификации для основных лесообразующих пород с последующим фрагментным анализом.

Таблица Г.2 — Режим амплификации при проведении ФА с образцами ДНК сосны обыкновенной

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	3 мин
Денатурация	30	95	15 с
Отжиг		60	20 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	5 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.3 — Режим амплификации при проведении ФА с образцами ДНК ели

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	3 мин
Денатурация	30	95	15 с
Отжиг		60	20 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	5 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.4 — Режим амплификации при проведении ФА с образцами ДНК сосны кедровой

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	3 мин
Денатурация	30	94	30 с
Отжиг		58	30 с
Элонгация		72	60 с
Заключительная элонгация	1	72	10 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.5 — Режим амплификации при проведении ФА с образцами ДНК дуба черешчатого

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	3 мин
Денатурация	30	94	30 с
Отжиг		50	30 с
Элонгация		65	90 с
Заключительная элонгация	1	65	15 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.6 — Режим амплификации при проведении ФА с образцами ДНК лиственницы

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	15 мин
Денатурация	30	94	30 с
Отжиг		56	90 с
Элонгация		72	60 с
Заключительная элонгация	1	60	30 мин
Охлаждение	1	4	∞

Г.3 Режимы амплификации полимеразной цепной реакции с последующим вертикальным форезом

Г.3.1 Сосна обыкновенная

В таблицах Г.7—Г.12 приведены режимы амплификации для сосны обыкновенной с последующим вертикальным электрофорезом.

Таблица Г.7 — Для праймеров Psyl_42, PtTx4001 — с готовой окрашенной реакционной смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	15 мин
Денатурация	30	94	30 с
Отжиг		57	1 мин 30 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	60	20 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.8 — Для праймеров Lw_isotig04195(58 °С), Lw_isotig04306(55 °С) — с готовой окрашенной реакционной смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	5 мин
Денатурация	32	95	30 с
Отжиг	32	55, 58	45 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	10 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.9 — Для Lw_isotig07383 — с готовой окрашенной реакционной смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	5 мин
Денатурация	32	95	30 с
Отжиг		58	30 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	7 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.10 — Для PtTx3107 (ТД-ПЦР 55—45) — с готовой окрашенной реакционной смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	3 мин
Денатурация	10	94	30 с
Отжиг		55—45↓1,0	30 с
Элонгация		72	30 с
Денатурация	25	94	30 с
Отжиг		50	30 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	10 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.11 — Для праймера PtTx2146 (ТД-ПЦР 60—50) — с готовой окрашенной реакционной смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	3 мин
Денатурация	10	94	30 с
Отжиг		60↓10	30 с
Элонгация		72	30 с
Денатурация	25	94	30 с
Отжиг		50	30 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	10 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.12 — Для праймеров PtTx2123(48 °С), Psyl_44(55 °С) — с готовой окрашенной реакционной смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	3 мин
Денатурация	35	95	20 с
Отжиг		48,55	20 с
Элонгация		72	20 с
Заключительная элонгация	1	72	7 мин
Охлаждение	1	4	∞

Г.3.2 Ель европейская, сибирская, аянская

В таблицах Г.13—Г.17 приведены режимы амплификации для ели европейской, сибирской, аянской с последующим вертикальным электрофорезом.

Таблица Г.13 — Для праймеров группы Pa_ (ТД-ПЦР 60—50) — с готовой окрашенной реакционной смесью для ПЦР×5 (в 5-кратной смеси) или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	15 мин
Денатурация	10	94	1 мин
Отжиг		60—50↓10	1 мин
Элонгация		72	1 мин
Денатурация	25	94	1 мин
Отжиг		50	1 мин
Элонгация		72	1 мин
Заключительная элонгация	1	72	20 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.14 — Для праймера UAPgAG150 — с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	5 мин
Денатурация	35	94	30 с
Отжиг		54	30 с
Элонгация		72	50 с
Заключительная элонгация	1	72	10 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.15 — Для праймера UAPgAG105 — с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	5 мин
Денатурация	25	94	30 с
Отжиг		56	30 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	5 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.16 — Для праймера EATC1E03 — с готовой окрашенной реакционной смесью для ПЦР×5 (в 5-кратной смеси) или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	5 мин
Денатурация	35	94	45 с
Отжиг		56	45 с
Элонгация		72	72 с
Заключительная элонгация	1	72	10 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.17 — Для праймера EATC1B02 — с готовой окрашенной реакционной смесью для ПЦР×5 (в 5-кратной смеси) или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	4 мин
Денатурация	7	95	30 с
Отжиг		64	30 с
Элонгация		72	30 с
Денатурация	30	94	45 с
Отжиг		57	45с
Элонгация		72	4 с
Заключительная элонгация	1	72	10 мин
Охлаждение	1	4	∞

Г.3.3 Лиственница сибирская

В таблице Г.18 приведены режимы амплификации для лиственницы сибирской с последующим вертикальным электрофорезом.

Таблица Г.18 — Для праймеров bcLK (ТД-ПЦР 63—53) — с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	1 мин
Денатурация	9	94	30 с
Отжиг		63—53↓10	30 с
Элонгация		72	1 мин
Денатурация	24	94	30 с
Отжиг		53	30 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	10 мин
Охлаждение	1	4	∞

Г.3.4 Сосна кедровая сибирская, корейская

В таблице Г.19 приведены режимы амплификации для сосны кедровой сибирской, корейской с последующим вертикальным электрофорезом.

Таблица Г.19 — Для праймеров группы Ps (ТД-ПЦР 60—50) — с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	15 мин
Денатурация	10	94	1 мин
Отжиг		60—50↓10	1 мин
Элонгация		72	1 мин
Денатурация	25	94	1 мин
Отжиг		53	1 мин
Элонгация		72	1 мин
Заключительная элонгация	1	72	20 мин
Охлаждение	1	4	∞

Г.3.5 Дуб черешчатый, скальный, пушистый, монгольский

В таблицах Г.20—Г.25 приведены режимы амплификации для дуба черешчатого, скального, пушистого, монгольского с последующим вертикальным электрофорезом.

Таблица Г.20 — Для праймеров QrZAG5b, QrZAG65, QrZAG87, QrZAG112 — со стандартной ПЦР-смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	94	3 мин
Денатурация	30	94	30 с
Отжиг		50	30 с
Элонгация		65	1 мин 30 с
Заключительная элонгация	1	65	15 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.21 — Для праймеров QrZAG7, QrZAG11 — со стандартной ПЦР-смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	3 мин
Денатурация	35	95	15 с
Отжиг		63	20 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	5 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.22 — Для праймера QrZAG96 — со стандартной ПЦР-смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	3 мин
Денатурация	30	95	15 с
Отжиг		63	20 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	5 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.23 — Для праймера QrZAG110 — со стандартной ПЦР-смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	3 мин
Денатурация	35	95	15 с
Отжиг		60	20 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	5 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.24 — Для праймера QrZAG39 — со стандартной ПЦР-смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	3 мин
Денатурация	30	95	15 с
Отжиг		66	20 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	5 мин
Охлаждение	1	4	∞

Таблица Г.25 — Для праймера QrZAG20 — со стандартной ПЦР-смесью или с лиофилизированной готовой реакционной смесью

Стадия	Кол-во циклов	Температура *t*, °С	Время инкубации
Предварительная денатурация	1	95	3 мин
Денатурация	30	95	15 с
Отжиг		60	20 с
Элонгация		72	30 с
Заключительная элонгация	1	72	5 мин
Охлаждение	1	4	∞

Приложение Д
(справочное)

Электрофорез в полиакриламидном и агарозном гелях

Д.1 Электрофорез в полиакриламидном геле

Д.1.1 Приготовление растворов для полиакриламидного геля:

а) Состав 30 %-ного раствора акриламида и метиленбисакриламида (АКА 30 %) на объем 1000 мл:
- N, N — метиленбисакриламид — 15 г;
- акриламид 2К — 285 г;
- доводят до объема dH_2O;

б) Состав смеси ПСА 10 % на объем 10 мл:
- персульфат аммония — 1 г;
- доводят до объема dH_2O.

Примечание — Раствор ПСА обязательно должен быть свежеприготовленным.

Д.1.2 Подготовка полиакриламидного геля

а) стекла для заливки гелей складывают попарно (стекло покровное с выемкой должно находиться сверху предметного), проложив по бокам спейсеры, а снизу — полоску фильтровальной бумаги, сложенной вдоль в два раза. Закрепляют стекла с боков специальными зажимами (по три с каждой стороны). Вставляют собранные стекла в пластиковую кювету, которая идет в наборе с камерой;

б) приготавливают смесь для заливки геля: в мерный цилиндр наливают 10 мл раствора × 10 ТВЕ, 20 мл раствора АКА 30 %. Доводят объем дистиллированной водой до 100 мл, переливают в стаканчик. Переносят стакан на магнитную мешалку, во время перемешивания добавляют 100 мкл ТЕМЕД;

в) отмеряют цилиндром 20 мл смеси, переливают в другой стакан, переносят его на магнитную мешалку, затем добавляют в раствор 50 мкл ТЕМЕД и 250 мкл заранее приготовленного раствора ПСА 10 %. Выдерживают 5 с, затем заливают гелевую пробку между стекол на высоту 1,5—2,5 см от нижнего края. При заливке возможно образование небольших участков геля в середине стекла или по бокам, их необходимо удалить, протолкнув гель в пробку свободным спейсером;

г) после полимеризации пробки (5 мин) в основную оставшуюся смесь добавляют 670 мкл раствора ПСА 10 %. Перемешивают на магнитной мешалке и заливают раствор между стеклами. Также при заливке геля возможно образование пузырей, которые необходимо убрать спейсером («вывести» их наверх). Помещают между стеклами гребенки для формирования лунок. Оставляют гель на 20—25 мин для застывания.

Примечание — Заранее нарезают фильтровальную бумагу на полоски (длиной 18,2 см, шириной 3,5 см). Перед началом работы необходимо подготовить мерный цилиндр и два стаканчика с магнитами.

Следует обратить внимание, что гель пробки застывает быстро, поэтому важно успеть залить стекла до полимеризации геля.

Д.1.3 Сбор камер:

а) подготавливают рамку с электродами, извлекают стекла с гелем из кювет, удаляют зажимы. Поочередно укладывают стекла на рамку внутрь покровным стеклом с гребенками. С обеих сторон закрепляют зажимами (идут в комплекте с камерами);

б) устанавливают камеру в поддон, который был использован при заливке гелей. Заполняют раствором ×0,5 ТВЕ (разведенным дистиллированной водой из исходного ×10 ТВЕ) сначала между стеклами, затем поддон ориентировочно на 1,5—2,0 см высотой. Буфер допускается использовать до трех месяцев и необходимо хранить в холодильнике;

в) аккуратно извлекают гребенки и, используя шприц, промывают электродным буфером образовавшиеся лунки от пузырьков воздуха и кусочков геля, если необходимо.

Д.1.4 Нанесение образцов в полиакриламидный гель

Образцы вносят по 1,5—2,5 мкл в каждую лунку, а маркер молекулярного веса — 2,5 мкл. Допускается промывать наконечник буфером и использовать повторно.

Д.1.5 Электрофоретическое разделение

Накрывают камеру крышкой с электродами, присоединяют их к источнику питания и включают. Электрофоретическое разделение продуктов амплификации следует проводить в течение 2,5—3,0 ч, в зависимости от длин исследуемых фрагментов. Напряжение — 250 В, сила тока — не более 110 мА на одну камеру.

Д.1.6 Снятие и окрашивание геля:

а) отключают питание, снимают крышку, сливают буфер в колбы для повторного использования;

б) рамку со стеклами кладут горизонтально, снимают зажимы. Затем аккуратно, чтобы не повредить гель, отделяют покровное стекло, после чего от нижнего края геля отрезают бумажную пробку;

в) подготавливают одну кювету для отделения геля от предметного стекла, налив в нее примерно 300 мл дистиллированной воды. Помещают стекло с гелем в кювету и промывают, затем переносят гель во вторую кювету, где предварительно подготавливают раствор бромистого этидия, и окрашивают 1—5 мин (каждые 3 мес рекомендуется обновлять раствор). После окрашивания перемещают гель обратно в первую кювету и промывают в дистиллированной воде.

Примечание — Важно! Если раствор бромистого этидия свежеприготовленный, окрашивают не более одной минуты.

Д.1.7 Визуализация результатов электрофореза

Поверхность трансиллюминатора предварительно смачивают. Извлекают гель из первой кюветы и помещают его в трансиллюминатор для получения изображения. Разглаживают все складки, убирают пузыри между поверхностью трансиллюминатора и гелем. Делают снимок, затем подписывают файл с указанием даты анализа.

Д.2 Электрофорез в агарозном геле

Д.2.1 Приготовление раствора для агарозного геля

Состав 1,5 % — 2 % агарозного геля на один заливочный столик:

- агароза — от 1,5 до 2,0 г,
- ТАЕ или ТВЕ 50-кратный — 2 мл,
- дистиллированная вода — доводят до 100 мл.

Д.2.2 Проведение горизонтального электрофореза

Расплавленный 1,5 % — 2,0 % и немного остывший агарозный гель заливают в заливочный столик, помещают гребенки и оставляют при комнатной температуре до полного застывания. Погружают заливочный столик с застывшим гелем в камеру для горизонтального электрофореза, заливают камеру 1-кратным ТВЕ или ТАЕ, удаляют гребенки и вносят в образовавшиеся карманы смесь ПЦР-продукта и загрузочного буфера (на 25 мкл ПЦР-продукта — 5 мкл загрузочного буфера). Если ПЦР проводилась при помощи коммерческих готовых наборов, загрузочный буфер не добавляют. Затем закрывают камеру и подключают ее к источнику питания на мощность 10 Вт. Электрофорез проводят 1,5—2,5 ч. После окончания электрофореза гель помещают в раствор бромистого этидия для окрашивания на 5—10 мин. После окраски гель тщательно промывают проточной водой от остатков красителя.

Примечание — Приготовление ТАЕ или ТВЕ, агарозного геля, загрузочного буфера и раствора бромистого этидия приведено в приложении А.

Приложение Е
(справочное)

Пример определения структуры ДНК с использованием генетических анализаторов, обработка и интерпретация полученных результатов в программе GeneMapper

Е.1 Определение структуры ДНК с использованием одноканальных генетических анализаторов. Запуск фрагментного анализа

Электрофоретический анализ и детекцию на одноканальном генетическом анализаторе (секвенаторе) проводят в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией. Для исследования использовать денатурирующий гель POP-4™.

Выполняют следующую последовательность действий:

а) подготовка генетического анализатора к работе:

1) установка ячейки — «полимерного/гелевого блока».

Открывают двери прибора. В промытую dH_20 и высушенную ячейку вкручивают три чистые ферулы (верхняя, нижняя, капиллярная). Вставляют ячейку в прибор по направляющим металлическим штырям;

2) установка шприца.

В чистый сухой шприц медленно набирают полимер (max 0,8 мл). Протирают шприц. Лапку привода шприца на приборе отвернуть влево. Вкручивают шприц в ячейку (правая верхняя);

3) установка капилляра.

Открывают дверцу камеры детекции. Помещают конец капилляра в перекрестье каналов ячейки и закрепить боковой ферулой. Второй конец капилляра пропускают в отверстие шайбы крепления электрода и закрепляют так, чтобы конец капилляра выступал на полмиллиметра.

Расположить просвет капилляра напротив окна детектора, совместив метки, и закрыть крышку. Окончательно закрепить капилляр термо-скотчем и закрыть дверцу камеры детекции. Поместить свободный конец капилляра в буфер;

б) запуск генетического анализатора:

1) включают прибор и заполняют ячейки;

2) включают прибор. Включают ПК. Запускают ПО — Data collection;

Закрывают клапан буферной ячейки: Window>> Manual control>> Function>> Buffer valve close>> Execute.

3) закручивают верхнюю ферулу и откручивают нижнюю;

4) продавливают полимер до выхода из отверстия нижней ферулы: Data collection>> Window>> Manual control>> Function>> Syringe down>> указывают Value (для более короткого шага используют shift down)>> Execute;

5) закручивают нижнюю и откручивают верхнюю ферулы;

6) продавливают полимер до выхода из отверстия верхней ферулы;

7) закручивают верхнюю ферулу и открывают клапан: Window>> Manual control>> Function>> Buffer valve open>> Execute;

8) продавливают полимер до выхода из отверстия клапана. Закрывают клапан.

в) калибровка — калибровка автосэмплера:

Data collection>> Window>> Manual control>> Autosampler calibration>> Tray>> Снять адаптер>> Фиксируют капилляр на точке в соответствии с изображением на экране>> Start>> Page up поднимают автосэмплер вверх (shift up — более мелкие шаги), когда заканчивается позиционирование, нажимают set (необходимо обратить внимание на текст, который отображается в диалоговом окне)>> Resume;

г) диагностика детектора:

Date collection>> File>> New Injection list>> SeQuensing test sens, sss>> Modute>> Test CCD 4-colour>> Run;

д) установка проб:

1) закрепляют пробы на мягких септах. Нажимают Tray;

2) собирают сэндвич и устанавливают его в автосэмплер. Нажимают Tray. Закрывают дверцы прибора;

3) включение камеры детекции: Data collection>> Window>> Manual control>> Temperature set>> Value 50>> Execute>> Window>> Status;

е) запуск фрагментного анализа:

Data collection>> File>> New>> GeneScan Smpl sheet 96 Tube>> Sample name (образцы называют, согласно занимаемому месту в штативе)>> Save as>> Закрывают все диалоговые окна для обновления полученной информации>> File>> New>> GeneScan Injection list>> Выбирают созданный sample sheet (в дальнейшем будет пониматься, как матрикс)>> Выбрать module>> Задают условия электрофореза>> Run;

ж) завершение работы.

Открывают дверцы прибора. Убирают образцы: Tray>> Разбирают и промывают сэндвич>> Tray. Закрывают и выключают прибор;

з) визуализация результатов фрагментного анализа.

Для обработки полученных результатов используют программный пакет Gene Mapper 5.0 (Thermo Scientific). Шаги использования программы приведены на рисунках Е.1—Е.10.

Примечания

1 Промывание ячейки. Отсоединить чашу с буфером и капилляр от ячейки, извлечь ее из прибора. Последовательно промыть каналы ячейки dH_2O через все ферулы пластиковым шприцем. Продуть каналы ячейки воздухом из шприца и дать высохнуть при комнатной температуре.

2 Промывание шприца. Отвернуть лапку привода шприца на приборе влево. Data collection>> Window>> Manual control>> Function>> Syring home>> Execute. Открутить шприц, избавить от остатка полимера и несколько раз промыть dH_2O. При необходимости перед промывкой разобрать шприц. Оставить высохнуть при комнатной температуре.

3 Капилляр вне упаковки и прибора хранить погруженным концами в деионизированную воду.

Е.2 Определение структуры ДНК с использованием восьмиканального генетического анализатора. Запуск фрагментного анализа

Электрофоретический анализ и детекцию проводят на восьмиканальном генетическом анализаторе (секвенаторе) проводят в соответствии с прилагаемой к прибору инструкцией. Для исследования используют денатурирующий гель POP-6™ или POP-7™.

Выполняют следующую последовательность действий:

а) запуск генетического анализатора:

1) включают компьютер, затем генетический анализатор. Запускают ПО — 3500 Series Data collection Software;

2) включение камеры детекции: В окне «Pre-Heat the oven» выставляют температуру 60 °С и нажимают «Start Pre-Heat»;

3) в верхней части рабочей панели выбирают Create new plate>> Name_ввести наименование плашки>> Plate Type_Sequencing>> Capillary Length_50 или 36 cm>> Polymer_POP-6 TM или POP-7 TM>> Assign Plate Contents; заполняют наименованиями образцов поле виртуальной плашки;

4) выбирают в нижней части рабочей панели окно Assays>> Add from library>> выбирают протокол, соответствующий необходимым параметрам (тип анализа, длина капилляра, тип полимера)>> Add to plate;

5) выбирают окно File name conventions>> Add from library>> Sample Name_Well Position_Capillary Number>> Add to plate;

6) выбирают окно Results Groups>> Create new results group>> Name_вносят наименование плашки>> снимают галочки с «Include an Instrument Run Name folder» и «Include an injection folder»>> Save to Library;

7) выделяют все образцы и в каждом из трех нижних окон с протоколами проставляют галочки>> Link Plate for Run>> Start Run.

Для обработки полученных результатов используют программный пакет Gene Mapper 5.0 (Thermo Scientific). Шаги использования программы приведены на рисунках Е.1—Е.10.

Е.3 Обработка и интерпретация полученных результатов в программе GeneMapper

На рисунке Е.1 представлено окно ввода имени и пароля пользователя при открытии программы GeneMapper и началом работы.

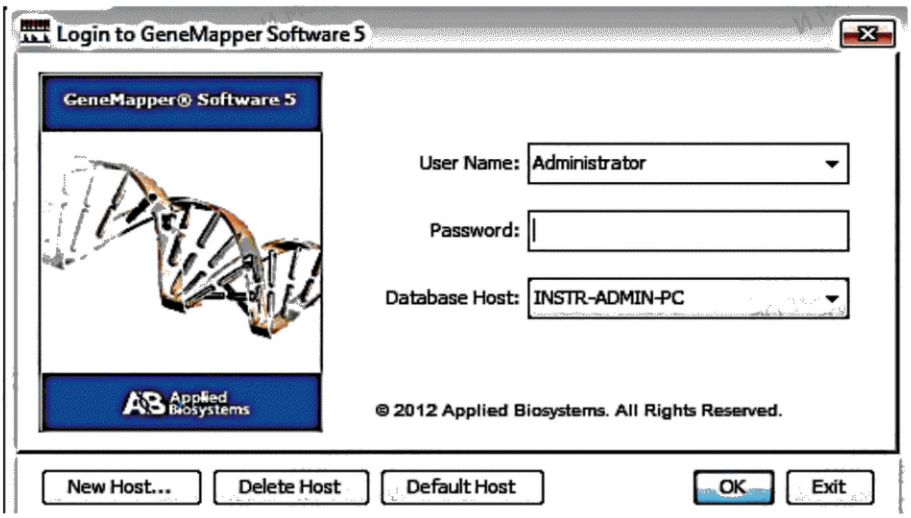


Рисунок Е.1 — Окно входа в программу GeneMapper

На рисунках Е.2 и Е.3 представлены окна добавления образцов для анализа. Для этого необходимо следовать пошаговой инструкции: file →Add Samples to Project →disk D → Applied Biosystems →3500 (или 310) → Data → папка с образцами → Add to List → Add.

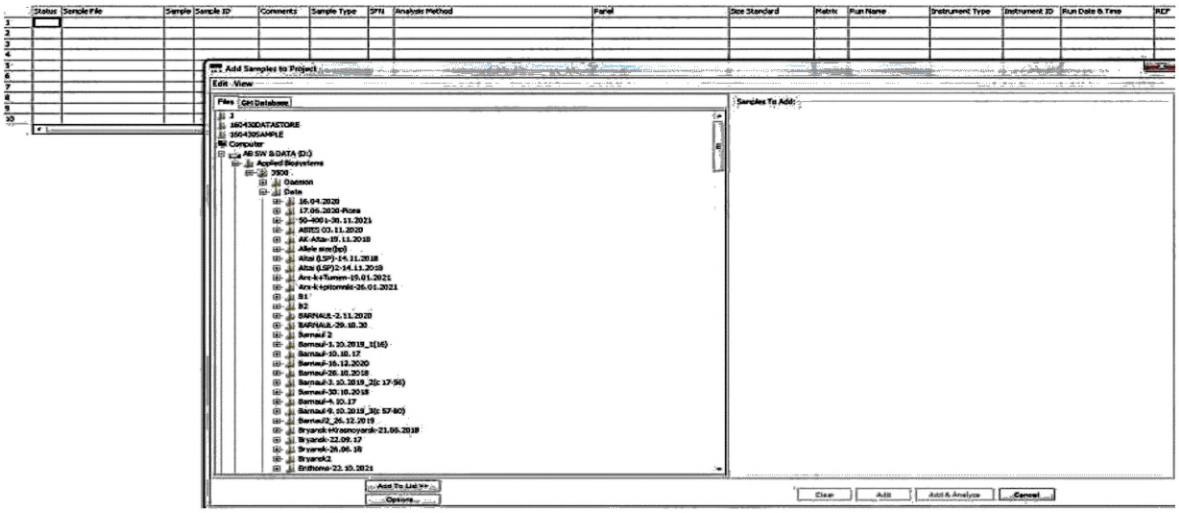


Рисунок Е.2 — Окно добавления образцов для анализа 1

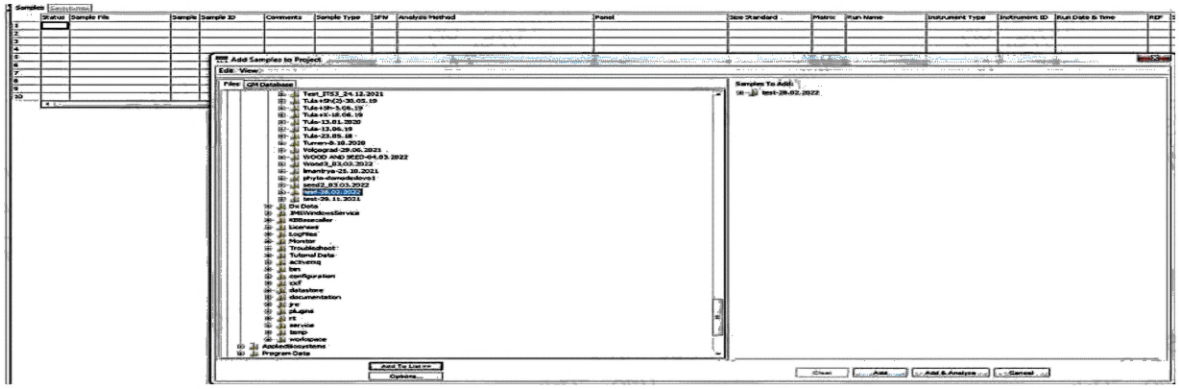


Рисунок Е.3 — Окно добавления образцов для анализа 2

Затем необходимо для каждого образца выбрать «Microsatellite Default» из выпадающего списка меню «Analysis Method» (см. рисунок Е.4), после чего выбрать стандарт «Liz500» (или его аналог) из выпадающего списка меню «Size Standard» (см. рисунок Е.5).

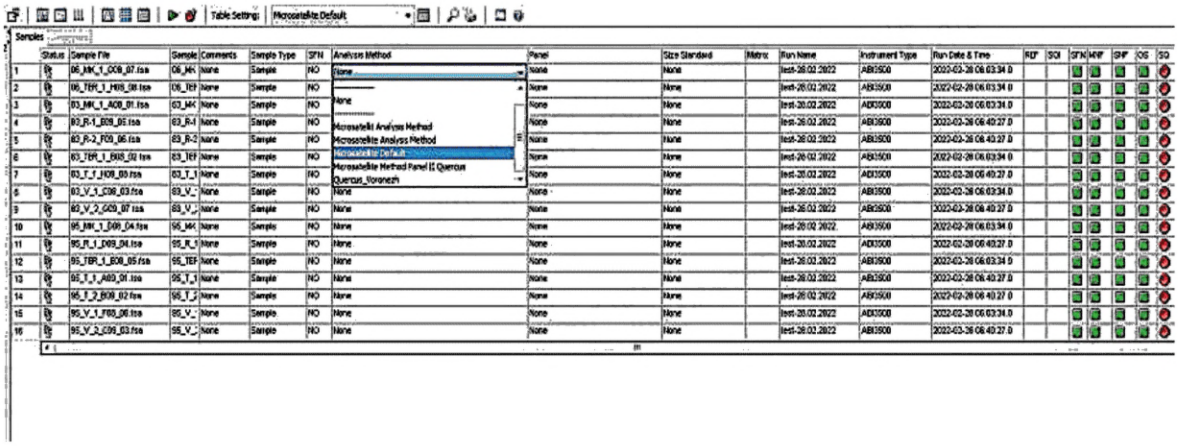


Рисунок Е.4 — Добавление параметра «Microsatellite Default» для анализа образцов

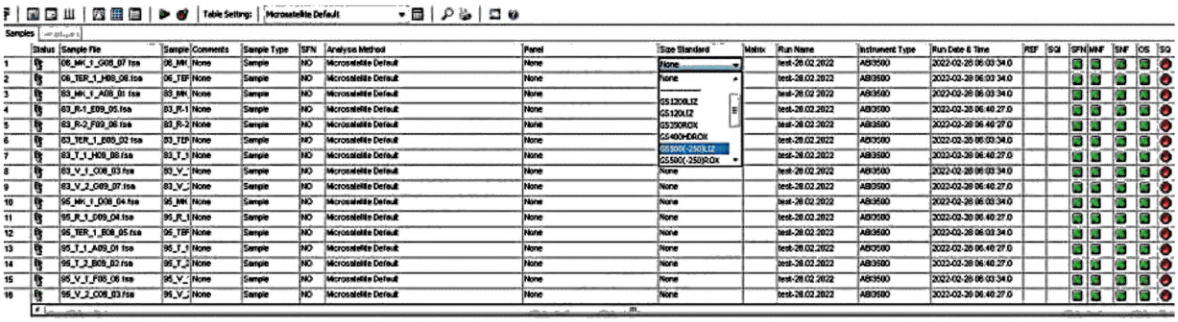


Рисунок Е.5 — Добавление параметра «Liz500» для анализа образцов

После установления всех параметров необходимо кликнуть курсором мыши на «Analyze» (см. рисунок Е.6), после чего программа предложит ввести название создаваемого проекта (см. рисунок Е.7), затем необходимо ввести название и нажать «ОК».

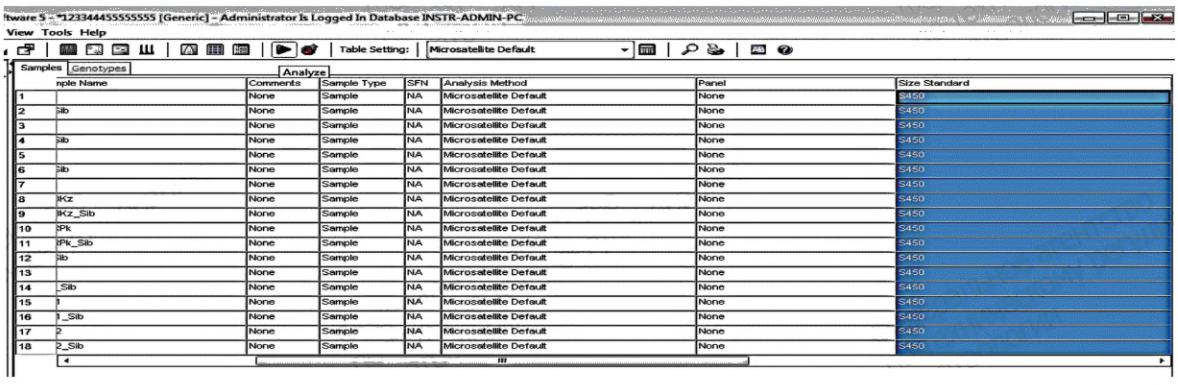


Рисунок Е.6 — Начало обработки результатов

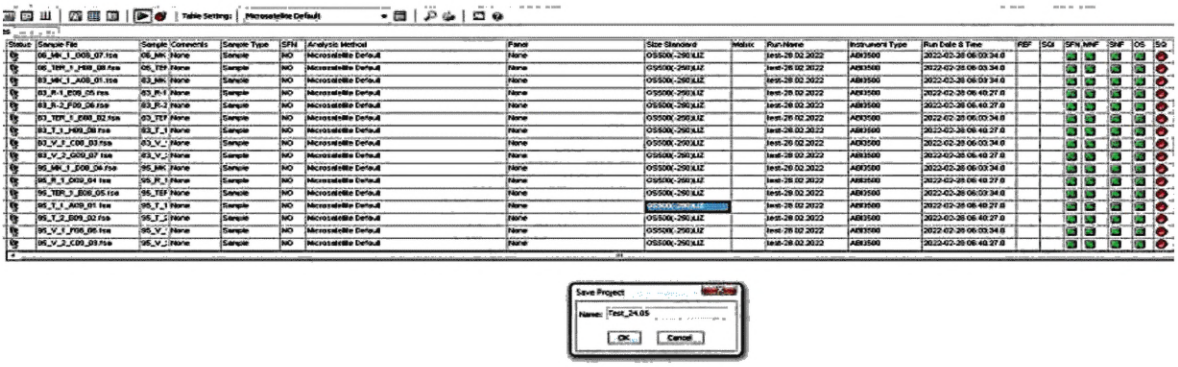


Рисунок Е.7 — Ввод наименования создаваемого проекта

В случае появления в окнах «SFN-SQ» красных сигналов в каком-либо из столбцов (см. рисунок Е.8) необходимо нажать на «Size match editor» и вручную расставить шкалу молекулярного стандарта (см. рисунок Е.9). Второй вариант — нажать «Override SQ» и «ОК» (см. рисунок Е.10), после чего красный сигнал должен измениться на зеленый, затем нажать «Analyze» еще раз.

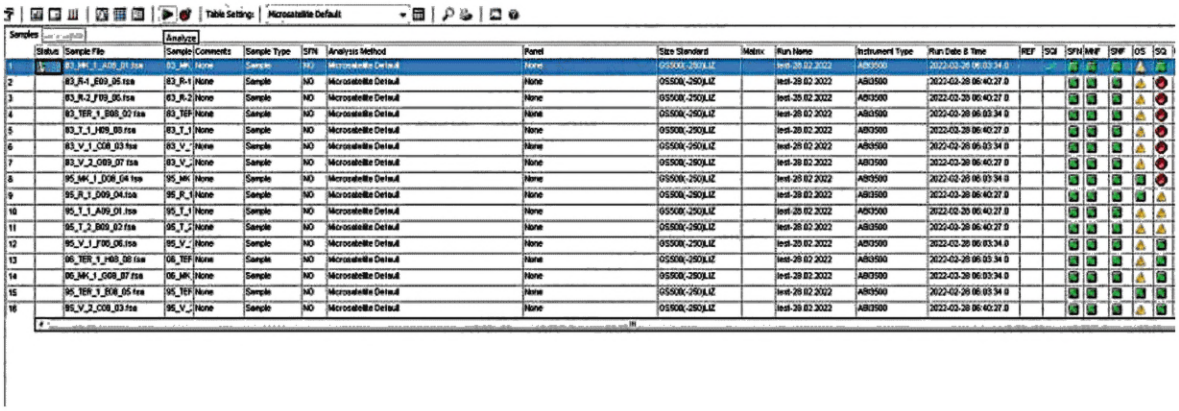


Рисунок Е.8 — Пример обработки образцов с различными видами цветовых сигналов

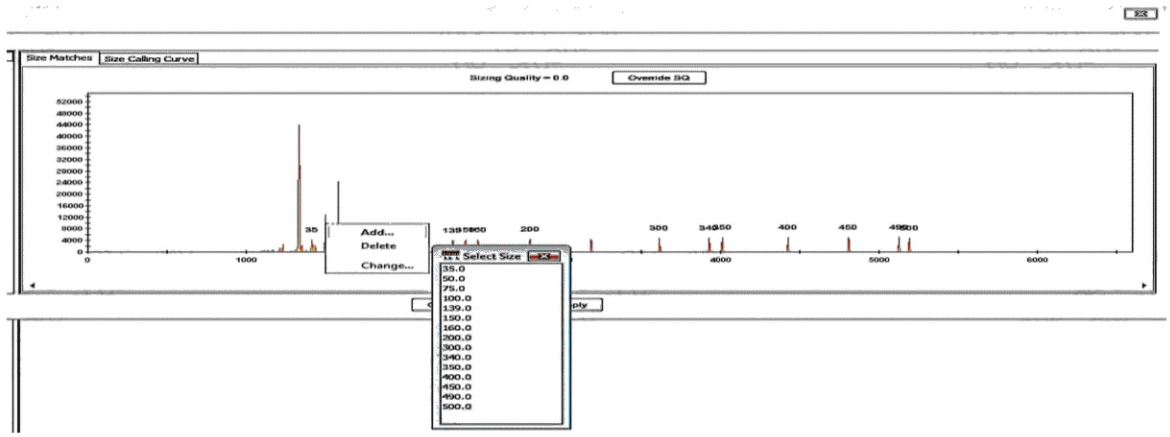


Рисунок Е.9 — Визуализация введенной шкалы молекулярного стандарта вручную

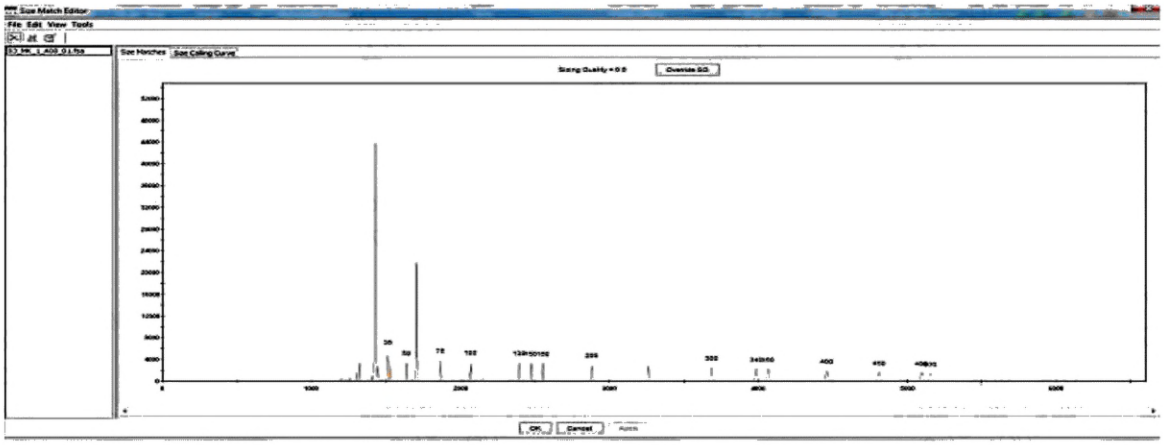


Рисунок Е.10 — Визуализация шкалы молекулярного стандарта с последующим нажатием на «Override SQ»

Приложение Ж
(рекомендуемое)

Формы (бланки) генетических паспортов плюсовых деревьев лесных пород, объектов лесного семеноводства, партий репродуктивного материала, созданных на основе молекулярно-генетического анализа

ФОРМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПАСПОРТА
на плюсовое дерево

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ № _____
НА ПЛЮСОВОЕ ДЕРЕВО № _____ (по госреестру)

I Местоположение дерева
Лесничество
_____
Участковое лесничество
_____
Подлесничество
_____
Квартал
_____
Выдел
_____
Географические координаты _____ с.ш.
_____ в.д.
Номер плюсового дерева по предприятию
_____
Расположение дерева в выделе (прилагается схема и фотография)
_____
Как отмечено дерево в натуре
_____

II Таксационная характеристика насаждения выдела (по ярусу, где выделено плюсовое дерево)

Состав	Класс возраста/Лет	Среднее		Бонитет	Полнота	Запас на 1 га/м^3	Селекционная характеристика насаждения	Господствующая морфологическая или фенологическая форма
		Высота, м	Диаметр, см					

1 Происхождение (естественное — семенное, порослевое, культуры) _____
2 Тип леса _____
3 Тип условий произрастания _____
4 Подрост _____
5 Подлесок _____
6 Напочвенный покров _____
7 Почва _____
8 Рельеф _____
9 Крутизна, экспозиция склона _____
10 Санитарное состояние насаждения _____

III Характеристика плюсового дерева

1 Происхождение _____
2 Морфологическая форма _____
3 Возраст, лет _____
4 Высота, м _____
5 Диаметр на высоте 1,3 м _____

6 Объем ствола, $м^3$ _____

7 Класс роста и развития (по глазомерной оценке) _____

8 Средний диаметр кроны, м _____

9 Форма кроны (конусовидная, овально-цилиндрическая и др.), ее симметричность _____

10 Протяженность кроны _____ м, в % от высоты ствола _____

11 Густота кроны (густое, среднее, редкое) _____

12 Толщина скелетных ветвей (толстые, средние, тонкие) _____

13 Протяженность бессучковой зоны ствола _____ м, и _____ % от высоты ствола

14 Зарастание отмерших сучьев (хорошее, среднее) _____

15 Форма ствола _____

16 Прирост в высоту, по глазомерной оценке, (хороший, средний) _____

17 Характеристика коры (окраска, трещиноватость и др.) _____

18 Санитарное состояние дерева и сведения о цветении и плодоношении _____

19 Показатели плюсового дерева по сравнению со средними показателями насаждения: по высоте _____; по диаметру _____

20 Краткая характеристика окружающих деревьев в радиусе 10 м (порода, селекционная категория деревьев, качество деревьев и др.) _____

21 Дерево отобрано и зачислено в категорию плюсовых деревьев комиссией в составе: _____

IV Уходы за плюсовым деревом

№№ по порядку	Дата	Наименование проведенных мероприятий	Запись произвел ФИО, подпись

V Состав выявленных аллелей изученных локусов

Локус A —		Локус B —		Локус C —		Локус D —		Локус E —		Локус F—		Локус G —		Локус H —		Локус I —	
Значения в выявленных аллелей в отдельных локусах генома п.н.																	
Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2

Генетический паспорт ПД № _____ по ГР:
A168/248_B184/187/190_C153/153_D122/137_E209/215_F225/225_G175/175_H178/178_I141/151

Генетический паспорт выдан _____
(полное наименование учреждения — для юридического лица)

адрес учреждения в пределах места нахождения: _____
(для юридического лица)

Дата составления «_____» _____ _____ г.

Ответственный за составление генетического паспорта

_____	_____	
должность	фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии)	подпись

Руководитель учреждения

_____	_____	
должность	фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии)	подпись М.П.

ФОРМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПАСПОРТА
на партию семян лесных растений

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ № ____
НА ПАРТИЮ СЕМЯН ЛЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

Составлен «_____» _____ 20 _____ г.

Партия семян _____
полное наименование вида лесного растения на русском и латинском языках

массой _____
цифрами (прописью) единицы измерения

1 Кем заготовлена партия семян _____
наименование юридического или ФИО физического лица, заготовившего данную партию

2 Юридический и почтовый адрес заготовителя: _____

3 Телефон/факс: _____

4 Время сбора семян: _____
месяц, год

5 Характеристика насаждения: _____
ЛСП, ПЛСУ и др. ОЛС

6 Группа возраста: _____
молодняки, средневозрастные, приспевающие, спелые

7 Категория заготовленных семян: _____
нормальные, улучшенные, сортовые

8 Место сбора семян:

_____
земли, прилегающие к лесному фонду, выдел, лесосека, насаждение, ЛСП, ПЛСУ, плюсовое насаждение и др.

9 GPS координаты места сбора семян:

с.ш. _____, в.д. _____

Для горных условий указать:

а) высоту над уровнем моря _____;

б) склон (восточный, западный, северный, южный) _____

10 Место хранения семян: _____
склад, специально приспособленное помещение, траншея, погреб и др.

11 Назначение семян: _____
для реализации, для собственных нужд заготовителя, реализации за пределы субъекта РФ, поставки

12 Тип материала образца _____
(семена, проростки семян.):

13 Молекулярно-генетическая формула (генотипы партии семян):

1	A219/219 B249/249 C182/182 D165/174 E180/183 F193/207 G156/156 H144/144*
2	A221/219 B249/249 C182/182 D165/165 E183/183 F193/207 G156/156 H144/144*
3	A221/221 B249/249 C182/182 D165/165 E180/180 F202/207 G156/156 H144/144*
	……..
	……..
	……..
29	A219/219 B249/249 C182/182 D174/174 E183/180 F193/202 G156/156 H144/144*
30	A219/219 B249/249 C182/182 D165/174 E180/183 F193/207 G156/156 H144/144*

для рода сосна:

A — psyl_17,
B — psyl_42,
C — psyl_44,
D — lw_isotig04195,
E — lw_isotig04306,
F — lw_isotig07383,
G — PtTX2123,
H — PtTX2146,
I — PtTX3107,
J — PtTX4001

*Примечание — *A — psyl_17, B — psyl_42, C — psyl_44, D — lw_isotig04195, E — lw_isotig04306, F — lw_isotig07383, G — PtTX2123, H — PtTX2146, I — PtTX3107, J — PtTX4001, K — psyl_57, L — Spag 7.14, M — PtTX3116, N — lw_isotig21953, O — lw_isotig27940;*

или
для рода сосна кедровая (сибирская):

A — Ps_25463,
B — Ps_25981,
C — Ps_31489,
D — Ps_39709,
E — Ps_80612,
F — Ps_ 364418,
G — Ps_ 718958,
H — Ps_1375177,
I — Ps_1502048,
J — Ps_1915155

*Примечание — *A — Ps_25463; B — Ps_25981; C — Ps_31489; D — Ps_39709, E - Ps_80612; F — Ps_364418, G — Ps_718958, H — Ps_1375177, I — Ps_1915155;*

для рода сосна кедровая (корейская):

A — *Pc_7,*
B — Pc_18,
C — Pc_22,
D — Pc_23,
E — Pc_29,
F — Pc_35,
G — Pc_52,
H — Pc_79,
I — …,
J — ...

*Примечание — *A — Pc_7, B — Pc_18, C — Pc_22, D — Pc_23, E — Pc_35, F — Pc_29, G—Pc_52, H — Pc_79;*

или
для рода ель (европейская, сибирская, аянская):

A — EATC1B02,
B — EATC1E03,
C — Pa_28,
D — Pa_33,
E — Pa_36,
F — Pa_41,
G — Pa_56,
H — UAPgAG 150,
I — UAPgAG105,
J — Pa 59

*Примечание — *A — EATC1B02,_B — EATC1E03, C — Pa_28, D — Pa_33, E — Pa_36, F — Pa_41, G — Pa_56, H — UAPgAG 150, I — UAPgAG105, G — Pa_59…;*

или
для рода лиственница (сибирская, даурская):

A — bcLK056,
B — bcLK066,
C — bcLK189,
D — bcLK224,
E — bcLK225,
F — bcLK228,
G — bcLK232,
H — bcLK235,
I — bcLK253,
J — bcLK260

*Примечание — *A — bcLK056, B — bcLK066; C — bcLK189, D — bcLK224, E — bcLK225, F — bcLK228, G — bcLK232 H — bcLK235, I — bcLK253, J — bcLK260;*

или
для рода дуб:

A — QrZAG5b,
B — QrZAG7,
C — QrZAG11,
D — QrZAG20,
E — QrZAG39
F — QrZAG65,
G — QrZAG87,
H — QrZAG87,
I — QrZAG110,
J — QrZAG112

*Примечание — *A — QrZAG5b,_B — QrZAG7, C — QrZAG11, D — QrZAG20, E — QrZAG39, F — QrZAG65, E — PtTX2146; F — PtTX3107, …;*

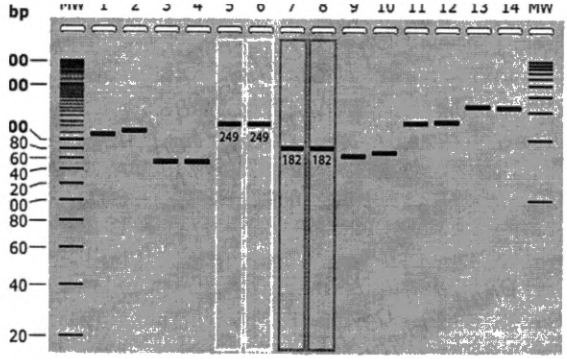
14 ДНК-идентификационные SSR-маркеры

							…

ITS1 …….. *ITS2* ……..

ITS3 …….. *ITS4* ……..

15 ДНК-профиль по результатам электрофореза (фото)



MW MW — маркер молекулярной массы;

5, 6, 7, 8 — 9, 10 ,11, 12, 13, 14 — ДНК-фрагменты

Генетический паспорт выдан _____

(полное наименование учреждения — для юридического лица)

адрес учреждения в пределах места нахождения: _____

(для юридического лица)

Дата составления «_____» _____ _____ г.

Ответственный за составление генетического паспорта

_____	_____	_____
должность	фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии)	подпись

Руководитель учреждения

_____	_____	_____
должность	фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии)	подпись М.П.

ФОРМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПАСПОРТА
на партию лесных растений

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ № ____
НА ПАРТИЮ (ПОПУЛЯЦИЮ) ЛЕСНЫХ РАСТЕНИЙ

Паспорт составлен «_____» _____ 20 _____ г.

на выборку/партию/популяцию образцов _____
(полное наименование вида лесного растения на русском и латинском языках)

1 Выборка образцов заготовлена _____
(наименование юридического или ФИО физического лица, заготовившего данную партию)

2 Группа возраста _____
(молодняки, средневозрастные, приспевающие, спелые)

3 Место сбора образцов растительного материала: _____

Координаты: с.ш. _____, в.д. _____

Для горных условий указать:

а) высоту над уровнем моря _____

б) склон _____
(восточный, западный, северный, южный)

4 Тип отобранного генетического материала образца: _____
(растительная ткань — хвоя, древесина, лист, почка, семена и т. п.)

5 Количество материала: _____
(штук семян, образцов растительного материала для выделения ДНК)

6 Генетические профили партии (популяции):

Состав аллелей в отдельных локусах генома	**Номер образца (семени, дерева)/локус**																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
psyl 17																														
psyl 42																														
psyl 44																														

Состав аллелей в отдельных локусах генома	Номер образца (семени, дерева)/локус																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
lw isotig04195																														
lw isotig04306																														
lw isotig07383																														
PtTX2123																														
PtTX2146																														
PtTX3107																														
PtTX4001																														

7 Частота аллельных вариантов

Локус	Аллель	Частота		Локус	Аллель	Частота
psyl 17				lw_isotig07383		
psyl 42				PtTx 2123		
psyl 44				PtTx 2146		
lw_isotig04195				PtTx 3107		
lw_isotig04306				PtTX4001		

8 Популяционные характеристики

	Na	Ne	I	Ho	He	F
Общее значение						
Ошибка среднего						

Na — среднее число аллелей на локус,
Ne — эффективное число аллелей на локус,
I — индекс Шенона,
Ho — наблюдаемая гетерозиготность,
He — ожидаемая гетерозиготность,
F — индекс фиксации.

9 Зона сбора и зона распространения генотипов: ФО

Генетический паспорт выдан _____
(полное наименование учреждения — для юридического лица)

адрес учреждения в пределах места нахождения: _____
(для юридического лица)

Дата составления «_____» _____ _____ г.

Ответственный за составление генетического паспорта

_____	_____	_____
должность	фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии)	подпись

Руководитель учреждения

_____	_____	_____
должность	фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии)	подпись М.П.

ФОРМА ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПАСПОРТА
на лесосеменную плантацию

ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПАСПОРТ № ____
НА ЛЕСОСЕМЕННУЮ ПЛАНТАЦИЮ ЛЕСНЫХ РАСТЕНИЙ _____
порода

Область _____

Лесничество _____

Участковое лесничество _____

Древесная порода _____

Год закладки _____

Площадь _____ га

I Местоположение плантации:

Лесничество _____

Участковое лесничество _____

Квартал _____

Выдел _____

Расположение плантации в квартале (схема на последней странице формы)

II Описание участка, занятого плантацией:

Категория участка _____

Рельеф, экспозиция склона _____

Тип условий произрастания _____

Почва _____

Напочвенный покров и степень задернения _____

_____

Расстояние до ближайшего насаждения той же породы _____ км

Расстояние до минусового насаждения той же породы _____ км

Краткая характеристика окружающих насаждений _____

_____

III Способ создания плантации: прививкой существующих культур; специально созданных культур или молодняков естественного происхождения; посадкой сеянцев, выращенных из семян плюсовых деревьев; саженцев, привитых в питомниках

Агротехника подготовки почвы _____

Схема размещения растений на участке (расстояние в ряду и между рядами, число площадок на 1 га, размеры и размещение площадок на участке и т. д.) _____

_____

Возраст подвоев _____

Время и место заготовления семян и черенков _____

Время и способ прививки, обвязочный материал и т. п. _____

Схема семей (клонов) прилагается к паспорту _____

IV Приживаемость и сохранность привитых (семенных) деревьев на плантации:

Дата учета	Первоначальное количество саженцев (сеянцев, клонов)	Количество прижившихся саженцев (сеянцев, клонов)	Процент приживаемости (сохранности), %

Лесосеменная плантация обследована и зачислена в постоянную лесосеменную базу комиссией в составе:

_____

ФИО и должность специалиста, руководившего работами по закладке лесосеменной плантации

_____

V Значения выявленных аллелей изученных локусов

Рамета клона	Локус 1		Локус 2		Локус 3		Локус 4		Локус 5		Локус 6		Локус 7		Локус 8	
	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2	Аллель 1	Аллель 2

Генетический паспорт выдан _____

(полное наименование учреждения — для юридического лица)

адрес учреждения в пределах места нахождения: _____

(для юридического лица)

Дата составления «_____» _____ _____ г.

Ответственный за составление генетического паспорта

_____	_____	_____
должность	фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии)	подпись

Руководитель учреждения

_____	_____	_____
должность	фамилия, имя, отчество (последнее — при наличии)	подпись М.П.

Библиография

[1] Программа и методика выполнения работ по пункту 59 Плана мероприятий («дорожной карты») «Развитие биотехнологий и генной инженерии», утвержденного распоряжением Правительства Российской Федерации от 18 июля 2013 г. № 1247-р ФБУ «Рослесозащита». — г. Пушкино, МО, 2014—205 с.

[2] Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Матниязов Р.Т., Баймиев Ал.Х., Баймиев Ан.Х., Бикбулатова С.М., Гималов Ф.Р., Вахитов В.А. «Некоторое технологическое прошлое, настоящее, а также будущее современной биологии к 2030 году (часть вторая)»/ФГБУ науки Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук Россия, Республика Башкортостан. — e-mail: chemeris@anrb.ru

[3] Царев А.П., Погиба С.П., Лаур Н.В. Генетика лесных древесных растений. — М.: ГОУ ВПО МГУЛ, 2010. — 381 с.

[4] Ford-Lloyd, B. Measuring genetic variation using molecular markers/B. Ford-Lloyd, K. Painting. — Rome: International Plant Genetic Resources Institute, 1996. — 72 p.

[5] Haslbrunner E., Tuppy H., Schatz G. Deoxyribonucleic Acid Associated with Yeast Mitochondria (1964 at the Institut for Biochemistry at the Medical Faculty of the University of Vienna in Vienna, Austria): Biochem. Biophys. Res. Commun. 15, P. 127—132

[6] Wiesner R.J., Ruegg J.C., Morano I. Counting target molecules by exponential polymerase chain reaction, copy number of mitochondrial DNA in rat tissues». BiochimBiophysActa. — (1992) 183: P. 553—559. PMID 1550563

[7] (July 2004) «Mitochondrial DNA and aging». Clinical Science 107 (4): P. 355—364. DOI:10.1042/CS20040148. PMID 15279618

[8] Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа/В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. — Мн.: Юнипол, 2007. — 176 с.

[9] Падутов, В.Е. Молекулярно-генетические методы идентификации организмов/В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, А.Е. Силин, А.Е. Падутов //Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. науч. тр. Вып. 64. — Гомель: ИЛ НАНБ, 2005. — С. 189—196 с.

[10] GenAlEx V6.4 (Genetic Analysis in Excel) — с 21.

[11] POPGENE [Электронный ресурс]. — URL: /http://www.ualberta.ca/~fyeh/. (дата обращения 10.11.2024)

[12] FSTAT [Электронный ресурс]. — URL: /http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm. (дата обращения: 11.11.2024)

[13] PCAGEN [Электронный ресурс]. — URL: /http://www2.unil.ch/popgen/softwares/pcagen.htm. (дата обращения: 25.10.2024)

[14] GENEPOP v4 [Электронный ресурс]. — URL: /ftp://ftp.cefe.cnrs-mop.fr/PC/MSDOS/GENEPOP/. (дата обращения: 05.12.2024)

[15] ARLEQUIN [Электронный ресурс]. — URL: /http://anthropologie.unige.ch/arlequin. (дата обращения: 25.10.2024)

[16] MSA (Microsatellite Analyzer) [Электронный ресурс]. — URL: /http://i122server.vu-wien.ac.at/MSA/MSA_download.htm (дата обращения: 03.09.2024)

[17] PHYLIP (Phylogeny Inference Package) [Электронный ресурс]. — URL: /http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html. (дата обращения: 10.10.2024)

[18] PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) [Электронный ресурс]. — URL: /http://paup.csit.fsu.edu/. (дата обращения: 11.09.2024)

[19] MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) [Электронный ресурс]. — URL: /http://www.megasoftware.net/. (дата обращени: 10.04.2024)

[20] MLTR (Multilocus Mating System Program) [Электронный ресурс]. — URL: /http://genetics.forestry.ubc.ca/ritland/programs.html. (дата обращения: 23.05.2024)

[21] STRUCTURE (Population structure investigation) [Электронный ресурс]. — URL: /http://pritch.bsd.uchicago.edu/ (дата обращения: 05.12.2024)

[22] GeneClass (Assignment and Migrants Detection) [Электронный ресурс]. — URL: /http://www1.montpellier.inra.fr/URLB/index.html (дата обращения: 01.11.2024)

[23] GERUD2 (Parentage analysis) [Электронный ресурс]. — URL: http://www.bio.tamu.edu/USERS/ajones/JonesLab.htm (дата обращения: 23.10.2024)

[24] The PHYLIP /https /Бесплатный пакет программ для филогении в виде исходного кода, файлов документации и различных исполняемых файлов. Джо Фельзенштейн. Кафедра геномных наук и биологического факультета Вашингтонского университета. [Электронный ресурс]. — URL: //phylipweb.github.io/phylip/.] (дата обращения: 10.10.2024)

[25] The LAMARC [Электронный ресурс]. — URL: /https://lamarcweb.github.io/lamarcweb/ (дата обращения: 15.10.2024)

[26] Joe Felsenstein's Джо Фельзенштейна /https://felsenst.github.io/кафедра геномных наук, кафедра биологии Вашингтонский университет

[27] Указания по лесному семеноводству в Российской Федерации от 11 января 2000 г.

[28] Постановление Правительства Российской Федерации от 24 декабря 2021 г. № 2464 «О порядке обучения по охране труда и проверки знания требований охраны труда»

[29] FAO/IUFRO Second Symposium on Forest Diseases and Insects Get access Bulletin of the Entomological Society of America, Vol. 20, Issue 3, 16 September 1974. P. 220, [Электронный ресурс]. — URL: https://doi.org/10.1093/besa/20.3.220, Published: 16 September 1974 (дата обращения: 15.09.2024)

[30] Методическое пособие «Молекулярно-генетические методы в зоологической практике на Звенигородской биостанции МГУ»/М.М. Белоконь [и др.]. — М., 2014. — 69 с.

[31] Отчет о проведении обучающего курса по договору №01/11/015 от 26 октября 2021 г. с ФБУ «Рослесозащита» «Методика молекулярно-генетической верификации принадлежности посадочного материала к исследуемой партии семян»//О.Ю. Баранов, С.В. Пантелеев. — Гомель, 2021

[32] Отчет о проведении обучающего курса по договору № 01/11/015 от 26 октября 2021 г. с ФБУ «Рослесозащита» «Методика молекулярно-генетической идентификации породной принадлежности образцов древесины»// О.Ю. Баранов, С.В. Пантелеев. — Гомель, 2021

УДК 630:006.354

ОКС 65.020.20
65.020.99

Ключевые слова: биотехнологии, генетический паспорт, посадочный материал и насаждения лесных древесных пород, ДНК-исследование, методы оценки

Редактор *М.В. Митрофанова*
Технический редактор *И.Е. Черепкова*
Корректор *И.А. Королева*
Компьютерная верстка *М.В. Малеевой*

Сдано в набор 16.04.2026. Подписано в печать 04.05.2026. Формат 60×84⅛. Гарнитура Ариал.
Усл. печ. л. 8,84. Уч.-изд. л. 7,34.

Подготовлено на основе электронной версии, предоставленной разработчиком стандарта

Создано в единичном исполнении в ФГБУ «Институт стандартизации»
для комплектования Федерального информационного фонда стандартов,
117418 Москва, Нахимовский пр-т, д. 31, к. 2.
www.gostinfo.ru info@gostinfo.ru