

compared to the results obtained in the following year. This phenomenon may be associated with abnormally hot weather in the Voronezh region during harvest of samples for further research in the summer of 2021.

Key words: *Quercus robur* L., asepsis, *in vitro*, nodal segments, explants.

УДК 577.21

doi: 10.31360/2225-3068-2022-80-90-95

**МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ
ОБРАЗЦОВ ОДНОЛЕТНИХ КУЛЬТУР *IN VITRO* И ИСХОДНЫХ
ДЛЯ КЛОНАЛЬНОГО МИКРОРАЗМНОЖЕНИЯ ДЕРЕВЬЕВ
QUERCUS ROBUR L.**

Ржевский С.Г., Гусева О.Ю.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт
лесной генетики, селекции и биотехнологии»,
г. Воронеж, Россия, e-mail: slavaosin@yandex.ru*

В данной работе представлен результат микросателлитного анализа образцов 40-летних деревьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), являющихся селекционным объектом Семилукского лесопитомника Воронежской области. В работе использовался материал 40-летних деревьев, а также полученных из них микроклонов в культуре *in vitro*. Анализ проводился по шести SSR-локусам, ранее хорошо зарекомендовавших себя для генетической паспортизации дуба. В результате проведённого исследования выявлена идентичность генетической структуры микросателлитных локусов исходных образцов дуба и произведённых от них микроклонов, в пределах разрешающей способности метода. Эти данные свидетельствуют в пользу устойчивости структур генотипов в ходе их культивирования *in vitro*, что является важным для сохранения хозяйственно-ценных признаков растений.

Ключевые слова: дуб, микросателлиты, SSR, культура *in vitro*, генетическая паспортизация.

Распространённые в настоящее время молекулярно-генетические методы позволяют описывать специфические профили для каждого исследуемого генотипа. В их основе лежит применение различных молекулярных маркеров, одним из их видов являются микросателлитные маркеры (SSR, от англ. Simple Sequence Repeats).

Микросателлитные сайты генома относятся к некодирующей части ДНК, они представляют собой короткие повторяющиеся последовательности нуклеотидов, случайно рассредоточенные на хромосомах. Данные участки подвержены мутациям, заключающимся в изменении количества нуклеотидных повторов [2].

Для выполнения подобных исследований проводят ПЦР (полимеразную цепную реакцию) с праймерами, специфичными к фланкирующим последовательностям микросателлитных фрагментов генома. При наличии в геноме заданной последовательности будет амплифицироваться продукт ПЦР, который идентифицируется при помощи гель-электрофореза.

На сегодняшний день микросателлитные маркеры описаны для многих видов древесных растений [4, 5], они также могут обладать межвидовой специфичностью. В то же время, набор из достаточного количества маркеров способен выявить различия микросателлитных профилей для близких сортов одного вида.

Одной из сфер применения микросателлитного анализа является определение сохранности структур генома растений после их введения в культуру *in vitro*, так как известно, что клональное размножение может сопровождаться проявлением соматоклональной изменчивости [6].

Целью данного исследования являлось сравнение структуры микросателлитных локусов исходных для введения в культуру *in vitro* генотипов дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) и производных от них микроклонов, с целью установления степени сохранности данных участков генома, имеющих высокую склонность к мутации.

Объекты и методы исследования. Для работы использовали материал от двух деревьев дуба черешчатого 40-летнего возраста, произрастающих на лесосеменной плантации в Семилукском лесопитомнике. Для молекулярно-генетического анализа отбирали образцы с листьев кроны, взятые непосредственно с дерева в период вегетации, а также микроклоны соответствующего генотипа, поддерживаемые в культуре *in vitro* в течение 1 года.

Экстракцию ДНК осуществляли из листьев модифицированным ЦТАБ-методом. Для разрушения мембран растительных клеток ткани растирали пестиком в ступке с 2%-ным ЦТАБ-буфером, с добавлением 3%-ного ПВП [1, 3].

Для визуализации полученного препарата ДНК и определения степени его дегградации проводили электрофорез в 3%-ном агарозном геле с добавлением интеркалирующего красителя SYBR Green (использовался источник питания «Power Pac Universal», Bio-Rad, США). Полученный препарат ДНК хранили при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и использовали в дальнейшем для проведения ПЦР.

В процессе исследования было задействовано 6 праймеров для рода *Quercus* [4, 5], изначально апробированные, подобранные для видов *Q. robur* и *Q. petraea* (Mattuschka) Lieblein (табл. 1). Для проведения ПЦР-реакции использовали следующий режим амплификации:

- 1) 5 мин, 96 °С – предварительная денатурация;
- 2) 1 мин, 94 °С – денатурация;
- 3) 1 мин – отжиг при специфической для праймеров температуре 50 °С,
- 4) 1 мин, 94 °С;
- 5) 30 сек, 72 °С – элонгация (стадии 2–4) повторялись 28–35 циклов;
- 6) 8–10 мин, 72 °С – финальная элонгация.

Применялась реакционная ПЦР-смесь ScreenMix-HS («Eurogen»), смесь двух праймеров (4 мкл), ДНК-матрица 1 мкл, Таq-полимераза 5 ед./мкл (0,3 мкл), вода до 25 мкл. ПЦР проводили на аппаратах «Bio-Rad C1000» и «Bio-Rad CFX96» (Bio-Rad, США).

Таблица 1

Характеристика микросателлитных локусов дуба, использованных в исследовании

№	Локус	Последовательность (прямая и обратная)	Температура отжига °С
1	QrZAG_7	F: CAACTTGGTGTTCGGATC R: GTGCATTTCTTTTATAGCATTCAC	50
2	QrZAG_20	F: CCAATAAAAGAAGCAGTATTTTGT R: GCAACACTCAGCCTATATCTAGAA	50
3	QrZAG_4	F: CGTCTATAAGTTCTTGGGTGA R: GTAACSTATGATGTGATTCTTACTTCA	50
4	QpZAG_9	F: GCAATTACAGGCTAGGCTGG R: GTCTGGACCTAGCCCTCATG	50
5	QpZAG_36	F: GATCAAAATTTGGAATATTAAGAGAG R: ACTGTGGTGGTGAGTCTAACATGTAG	50
6	QrZAG_31	F: CTTAGTTTGGTTGGGAAGAT R: GCAACCAAACAATGAAAT	50

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 2%-ом агарозном геле в горизонтальной камере («Power Pac Universal», Bio-Rad, США) в течение 60 мин при напряжении 80 В. Применяли 1-кратный ТАЕ-буфер. Окрашивание осуществляли красителем SYBR Green либо бромистым этидием. Визуализация полученных ампликонов проводилась на трансиллюминаторе («TFP», Vilber Lourmat, Франция).

Размер полученных фрагментов определялся по сравнению с ДНК-маркерами 100 bp Ladder DNA marker («Ахуген», США).

Распознавание размера продуктов амплификации на цифровых снимках осуществляли при помощи программного обеспечения «Labimage».

Результаты и их обсуждение. Все задействованные в данном исследовании локусы дали продукты амплификации, было определено их количество (1–2) и приблизительный размер (преимущественно от 100 и до 200 п.н.). Помимо основных ПЦР-продуктов, наблюдались слабо выраженные артефакты амплификации, которые не брались в расчёт. Результат сопоставления микросателлитных локусов исходных образцов дуба и полученных от них микроклонов представлен на рисунке 1.

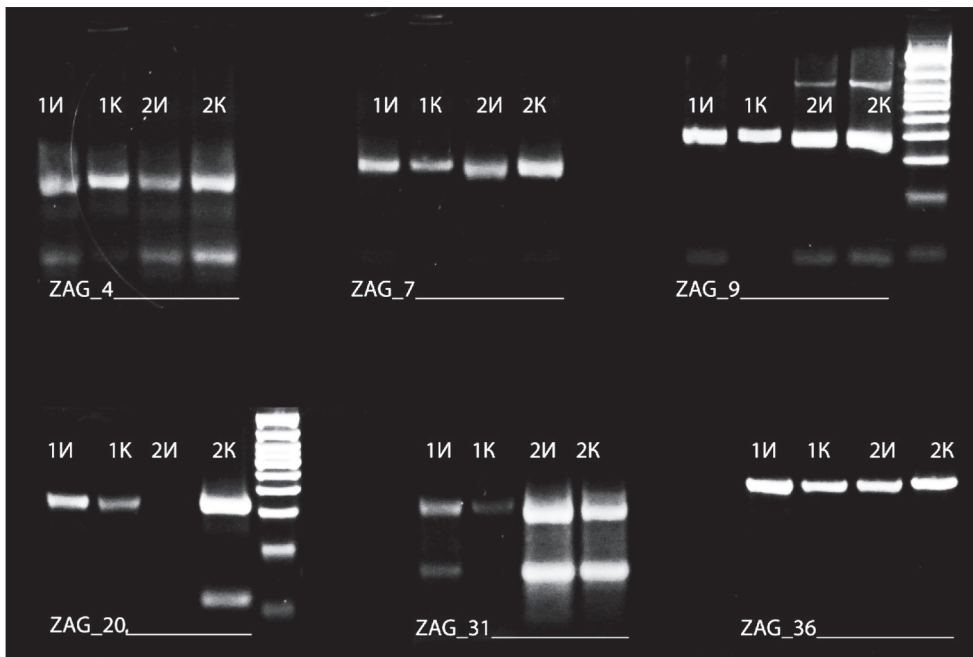


Рис. 1. Продукты амплификации микросателлитных локусов исследуемых образцов дуба: И – исходный, К – культуральный

В результате проведённого исследования выявлена тенденция к сохранению идентичности содержимого микросателлитных локусов исходных для введения в культуру *in vitro* образцов и производных от них микроклонов. Некоторые расхождения в наблюдаемом размере продуктов, очевидно, могут быть вызваны особенностями метода, применяемого для детекции продуктов ПЦР. На основании полученных результатов можно сделать предварительный вывод о сохранении целостности генетических структур микросателлитных участков у однолетних культур дуба *in vitro*.

Ранее аналогичные исследования показали, что при размножении дуба путём соматического эмбриогенеза (на этапе образования

эмбриоидов) может возникать изменчивость в микросателлитных локусах. Так, в работе Wilhelm C. et al (2007) SSR-маркеры (в том числе – QpZAG9, QpZAG36) использовали для тестирования генетической стабильности трёх линий соматически-эмбриогенных культур *Quercus robur* и полученных из них регенерантов. Наиболее полиморфным и полезным микросателлитным локусом для обнаружения генетической изменчивости оказался QpZAG9 [7].

Показанное в нашем исследовании сохранение генетической стабильности может быть обусловлено особенностями методики введения в культуру *in vitro* (в данном случае имело место использование узловых сегментов с пазушной почкой в качестве первичных эксплантов, а не соматический эмбриогенез), а также небольшим сроком хранения и узкой выборкой использованных в исследовании микросателлитов. Для более надёжного обоснования выводов о сохранении генетической стабильности, необходимо продолжать исследования в данном направлении, используя другие генетические маркеры. В дальнейшем для оценки сохранности генотипов при искусственном культивировании предполагается провести сравнение внутри серий клонов, полученных от каждого генотипа.

Заключение. Полученные данные предварительно свидетельствуют в пользу устойчивости структур генотипов в ходе их однолетнего культивирования *in vitro*, что является важным для сохранения хозяйственно-ценных признаков растений.

Библиографический список

1. Гусева О.Ю., Ржевский С.Г. Оптимизация методики выделения ДНК из листьев дуба // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2021. – Т. 39. – С. 24. – ISSN 0208-0613.
2. Календарь Р.Н., Глазко В.И. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – № 34(4). – С. 279-296. – ISSN 0522-9310.
3. Doyle J.J. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue // Phytochemistry Bull. – 1987. – No. 19. – P. 11-15.
4. Dzialuk A., Chybicki I., Burczyk J. PCR multiplexing of nuclear microsatellite loci in *Quercus* species // Plant Molecular Biology Reporter. – 2005. – Vol. 23. – No. 2. – P. 121-128.
5. Kampfer S., Lexer C., Glossl J., Steinkellner H. Brief report characterization of (GA) n microsatellite loci from *Quercus robur* // Hereditas. – 1998. – Vol. 129. – No. 183. – P. 1-86.
6. Żabicki P., Sliwinska E., Mitka J., Sutkowska A., Tuleja M., Migdałek G., Żabicka J., Słomka A., Kwiatkowska M., Kuta E. Does somaclonal variation play advantageous role in conservation practice of endangered species? Comprehensive genetic studies of *in vitro* propagated plantlets of *Viola stagnina* Kit. (Violaceae) // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2019. – Vol. 136. – No 2. – P. 339-352. – <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1519-1>.

7. Wilhelm E., Hristoforoglu K., Fluch S., Burg K. Detection of microsatellite instability during somatic embryogenesis of oak (*Quercus robur* L.) // Plant Cell Reports. – 2005. – Vol. 23. – No 12. – P. 790-795. – <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0891-y>.

**MICROSATELLITE ANALYSIS
OF ANNUAL CROP SAMPLES *IN VITRO* AND INITIAL TREES
FOR CLONAL MICROPROPAGATION
OF *QUERCUS ROBUR* L. TREES**

Rzhevsky S.G., Guseva O.Yu.

*Federal State Budgetary Scientific Institution
“Russian Research Institute of Forest Genetics,
Breeding and Biotechnology”,
Voronezh, Russia, e-mail: slavaosin@yandex.ru*

This paper presents the result of microsatellite analysis of 40-year-old oak tree samples (*Quercus robur* L.), which are a breeding object of the Semiluksky nursery (Voronezh region). The work used the material of 40-year-old trees, as well as microclones obtained from them *in vitro*. The analysis was carried out on six SSR loci, which had previously proven themselves well for the genetic certification of oak. As a result of the study, the identity of the genetic structure of microsatellite loci of the original oak samples and microclones produced from them, within the resolution of the method, was revealed. These data support the resistance of genotype structures during their *in vitro* cultivation, which is important in preserving economically valuable plant traits.

Key words: oak, microsatellites, SSR, *in vitro* culture, genetic certification.