



72. Farjon A., Filer D. An atlas of the world's conifers: An analysis of their distribution, biogeography, diversity and conservation status. Brill, Leiden-Boston, Netherlands, 2013, 512 p.
73. Hämet-Ahti L., Palmén A., Alanko P., Tigerstedt P.M.A. Suomen puu- ja pensaskasvio [The woody plant flora of Finland]. Helsinki, 1992, 373 p.
74. Holmberg O.R., Hartman C.J. Hartmans handbok i Skandinavians flora. PA Norstedt Söners, 1922, vol. 1, part 1. (In Swedish).
75. Hultén E. Atlas of the distribution of vascular plants in NW Europe. Stockholm, 1950, 1080 p.
76. Jalas J., Suominen J. Gymnospermae (*Pinaceae* to *Ephedraceae*): Atlas Florae Europaeae. Helsinki, 1973, vol. 2, 40 p.
77. Grahl-Nielsen O., Mjaavatten O., Ovstedal D.O. A chemometric comparison between *Picea abies* and *P. obovata* (Pinaceae) in Norway. *Nordic Journal of Botany*. 1991, vol. 11, no. 6, pp. 613–618.
78. Kreštov P.V., Nakamura Y. Phytosociological study of the *Picea jezoensis* forests of the Far East. *Folia Geobotanica*. 2002, vol. 37, pp. 441–473.
79. Krutovskii K.V., Bergmann F. Introgressive hybridization and phylogenetic relationships between Norway, *Picea abies* (L.) Karst., and Siberian, *P. obovata* Ledeb., spruce species studied by isozyme loci. *Heredity*. 1995, vol. 74, pp. 464–480.
80. Lindquist B. The main varieties of *Picea abies* (L.) Karst. in Europe. *Acta Horti Berg*. 1948, vol. 14, pp. 249–342.
81. Mela A.J., Cajander A.K. Suomen kasvio (Suomalaisen Kirjallisuuden Seuran toimituksia). Helsinki, 1906, 763 p.
82. Nakai T. A synoptical sketch of Korean flora. *Bulletin of the National Science Museum*. 1952, vol. 31, pp. 1–153.
83. Orlova L., Gussarova G., Glazkova E., Egorov A., Potokin A., Ivanov S. Systematics and distribution of spruce species in the North-West of Russia. *Dendrobiology*. 2020, vol. 84, pp. 12–29.
84. Parducci L., Tollefsrud M.M., Jørgensen T., Elverland E., Alm T., Fontana S.L., Bennett K.D., Haile J., Matetovici L., Suyama Y., Edwards M.E., Andersen K., Rasmussen M., Boessenkool S., Coissac E., Brochmann C., Taberlet P., Houmark-Nielsen M., Larsen N.K., Orlando L., Gilbert M.T.P., Kjær K.H., Alsos I.G., Willerslev E. Glacial survival of boreal trees in Northern Scandinavia. *Science*. 2012, vol. 335, pp. 1083–1086.
85. Potokina E.K., Orlova L.V., Vishnevskaya M.S., Alekseeva E.A., Potokin A.F., Egorov A.A. Genetic differentiation of spruce populations in northwest Russia revealed with microsatellite markers. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2013, vol. 3, pp. 352–360. <https://doi.org/10.1134/S2079059713050080>.
86. Potokina E.K., Kiseleva A.A., Nikolaeva M.A., Ivanov S.A., Ulianich P.S., Potokin A.F. Analysis of the Polymorphism of Organelle DNA to Elucidate the Phylogeography of Norway Spruce in the East European Plain. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2015, vol. 5, no. 4, pp. 430–439.
87. Regel E.L. *Pinus abies* L. var. *fennica*. *Gartenflora*. 1863, vol. 12, pp. 95–96.
88. Teplouchoff Th. Ein Beitrag zur Kenntniss der sibirischen Fichte – *Picea obovata* Ledeb. *Bulletin de la Société Impériale des Naturalistes de Moscou*. 1868, vol. 41, no. 3, p. 9.
89. Tollefsrud M.M., Latalowa M., van der Knaap W.O., Brochmann C., Sperisen C. Late quaternary history of North Eurasian Norway spruce (*Picea abies*) and Siberian spruce (*Picea obovata*) inferred from macrofossils, pollen and cytoplasmic DNA variation. *Journal of Biogeography*. 2015, vol. 42, no. 17, pp. 1431–1442. DOI: 10.1111/jbi.12518.
90. Tsukada M. Vegetation and climate during the last glacial maximum in Japan. *Quaternary Research*. 1983, vol. 19, no. 2, pp. 212–235.
91. Tsukada M. Map of vegetation during the last glacial maximum in Japan. *Quaternary Research*. 1985, vol. 23, no. 3, pp. 369–381.
92. Tsuda Y., Chen J., Stocks M., Källman Th., Sønstebo J.H., Parducci L., Semerikov V., Sperisen Ch., Politov D., Ronkainen T., Väiliranta M., Vendramin G.G., Tollefsrud M.M., Lascoux M. The extent and meaning of hybridization and introgression between Siberian spruce (*Picea obovata*) and Norway spruce (*Picea abies*): cryptic refugia as stepping stones to the west? *Molecular Ecology*. 2016, vol. 25, pp. 2773–2789.
93. Uyekei H. Tree and forest 7. *Chosen Sanrin-Kaiho*. 1942, vol. 206, pp. 3–13. (In Japanese with Latin description).

Статья поступила в редакцию 5.05.2023

DOI 10.21178/2079-6080.2023.3.29  
УДК 630\*232.13

## Анализ сохранности генотипа *Quercus robur* L. с использованием SSR- и ISSR-маркеров при создании каллусных культур

© С.Г. Ржевский, А.М. Кондратьева, О.Ю. Гусева

### Analysis of the preservation of the *Quercus robur* L. genotype using SSR- and ISSR-markers in the creation of callus cultures

S.G. Rzhnevsky, A.M. Kondratyeva, O.Ju. Guseva (Federal State Budgetary Scientific Institution "All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology)

Pedunculate oak (*Quercus robur* L.) is a forest-forming species in the European part of Russia and has a high economic value. However, at the same time, reproduction and cultivation of oak plantations causes significant difficulties. At present, a technique for clonal micropropagation of this species using nodal segments has been developed, but its application to old-growth trees causes difficulties. Therefore, it is relevant to search for alternative biotechnological approaches for the reproduction of adult oak material, including the production of regenerated plants through callus culture by indirect organogenesis or somatic embryogenesis. However, such a method of reproduction can lead to an intense manifestation of somaclonal variability, so its use should be accompanied by the control of the preservation of the genotype. This paper presents the result of the analysis of the preservation of the *Q. robur* genotype during the creation of callus cultures *in vitro*. Parts of green and semi-lignified shoots of a 200-year-old tree obtained during the growing season served as primary explants for obtaining oak callus cultures. To identify variability, two sets of molecular markers were used: microsatellite (SSR) and intermicrosatellite (ISSR). PCR was performed with the selected markers, and the amplification products were detected by agarose gel electrophoresis. As a result, the involved markers showed the complete identity of the genotypes of the original trees and callus tissues grown in *in vitro* culture. Thus, it has been shown that the cultivation of pedunculate oak calli has prospects for the conservation and reproduction of valuable tree genotypes.

**Keywords:** oak, microsatellites, intermicrosatellite markers, *in vitro* culture, callus

**Анализ сохранности генотипа *Quercus robur* L. с использованием SSR- и ISSR-маркеров при создании каллусных культур****С.Г. Ржевский, А.М. Кондратьева, О.Ю. Гусева**

Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) является лесообразующей породой в европейской части России, обладает высокой хозяйственной ценностью. Но при этом существенные затруднения вызывает размножение и выращивание дубовых насаждений: данный вид укореняется при черенковании классическим способом только при отборе материала от молодых деревьев, в то время как для проявления хозяйственно ценных признаков необходимо больше времени. В настоящее время разработана методика клонального микро-размножения данного вида с использованием узловых сегментов, однако ее применение для старовозрастных деревьев вызывает затруднения. Поэтому актуальным является поиск альтернативных биотехнологических подходов для размножения взрослого материала дуба, в том числе получение растений-регенерантов через каллусную культуру путем непрямого органогенеза или соматического эмбриогенеза. Однако подобный способ размножения может привести к интенсивному проявлению соматической изменчивости, поэтому его применение следует сопровождать контролем сохранения генотипа. В данной работе представлен результат анализа сохранности генотипа дуба черешчатого при создании каллусных культур *in vitro*. Первичными эксплантами для получения каллусных культур служили части зеленых и полуодревесневших побегов 200-летнего дерева, полученных в период вегетации. Для выявления изменчивости использовались два набора молекулярных маркеров: микросателлитных (SSR) и межмикросателлитных (ISSR). С подобранными маркерами проводилась ПЦП, продукты амплификации детектировались при помощи электрофореза в агарозном геле. В результате задействованные маркеры продемонстрировали полную идентичность генотипов исходных деревьев и выращенных в культуре *in vitro* каллусных тканей. Таким образом показано, что культивация каллусов дуба черешчатого имеет перспективы для сохранения и размножения ценных генотипов деревьев.

**Ключевые слова:** дуб, микросателлиты, межмикросателлитные маркеры, культура *in vitro*, каллус

Ржевский Станислав Геннадьевич — младший научный сотрудник отдела лесной генетики и биотехнологии  
E-mail: slavaosin@yandex.ru

Кондратьева Анна Михайловна — старший научный сотрудник отдела лесной генетики и биотехнологии, кандидат биологических наук

Гусева Оксана Юрьевна — младший научный сотрудник отдела лесной генетики и биотехнологии

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»  
394000, г. Воронеж, ул. Ломоносова, 105  
E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru

**Введение**

Дуб черешчатый является лесообразующей породой в европейской части России, обладает незаменимой хозяйственной ценностью. Однако при этом его искусственное размножение и выращивание дубовых насаждений вызывают существенные затруднения. Данный вид плохо укореняется при черенковании классическим способом: эту процедуру можно применить для молодых деревьев (до 8–10 лет), в то время как для проявления хозяйственно ценных признаков того или иного генотипа необходимо ждать существенно дольше (около 20–40 лет). Естественное возобновление дубов также затруднено, вероятно, из-за затенения почвы взрослыми особями. Кроме того, сам рост дерева занимает довольно длительное время. При этом дубы, являющиеся древними представителями европейской флоры, несмотря на выработанные защитные механизмы, служат питательным субстратом для большого количества вредителей (как насекомых, так и грибов), адаптировавшихся к ним в ходе эволюции. Ввиду возникающих проблем актуальным является поиск методов ускоренного биотехнологического размножения данного вида.

В настоящее время для дуба черешчатого разработана методика клонального микро-размножения с использованием узловых сегментов. Но при реализации данной технологии возникают затруднения. В особенности это касается введения в культуру образцов наиболее старых деревьев (возрастом более 50 лет). В то же время определенный интерес представляет сохранение и воспроизводство генотипов исторических деревьев — памятников природы и культуры. Поэтому перспективным направлением является поиск нетривиальных методов размножения экземпляров рассматриваемого вида. К таковым относится создание каллусных культур и получение регенерантов растений путем непрямого органогенеза или соматического эмбриогенеза. Исследование каллусобразования проводилось и для других видов растений, в частности — кустарника олеандра обыкновенного (*Nerium oleander* L.) [5].

В ходе совершения данной биотехнологической операции высока вероятность возникновения мутаций исходного генотипа

(соматической изменчивости), что впоследствии может отразиться на хозяйственных качествах полученного посадочного материала. Так, в исследовании каллусо- и морфогенеза некоторых эфиромаслических растений было показано наличие большого числа морфологически измененных форм (до 33–56 %), которое зависело от сорта и типа экспланта, при этом число соматических клонов возрастало с увеличением количества пасажей. При этом у одного клона могли быть измененными сразу несколько признаков — например, форма и окраска листа и толщина стебля. Кроме того, была выявлена значительная вариабельность регенерантов по числу хромосом и основным хозяйственно ценным признакам [2].

Поэтому важным моментом в процессе биотехнологического размножения растений является контроль сохранности структуры генотипа. Для его осуществления разработан ряд процедур, в которых применяются молекулярные маркеры разного типа.

Наиболее распространены следующие разновидности маркеров: микросателлитные (SSR) и межмикросателлитные (ISSR). Наиболее специфичными являются SSR-маркеры, комплементарные последовательностям нуклеотидов, окаймляющих микросателлитные участки, они дают удобный для идентификации, хорошо повторяющийся результат [3]. Микросателлитные маркеры успешно применялись для оценки сохранности микроразмножаемых генотипов растений, в том числе — гибридов тополя [4].

ISSR-маркеры комплементарны последовательностям нуклеотидных повторов, они позволяют амплифицировать участки ДНК, располагающиеся между микросателлитными вставками. Во многом данный метод сходен с анализом при помощи случайных праймеров (RAPD), но ISSR-маркерам свойственна более высокая специфичность и меньшая зависимость от условий протекания ПЦП-реакции [3]. Межмикросателлитные маркеры также использовались для проверки сохранности генотипа размножаемых в культуре *in vitro* растений, в частности — стевии медовой (*Stevia rebaudiana* Bert.) [14].

Ранее авторами данной работы были проведены тестовые исследования, в которых для

определения сохранности генотипа культур дуба при культивации *in vitro* применялись три типа молекулярных маркеров: SSR, ISSR и RAPD. В результате показано, что все данные виды маркеров могут использоваться для выявления соматической изменчивости, дополняя друг друга. Причем ISSR-маркеры могут быть даже более чувствительным инструментом, так как образуют широкий спектр продуктов амплификации, увеличивая шансы на выявление полиморфизма. Случайные праймеры, хотя и применимы в подобных анализах, однако дают большую вероятность погрешностей [6].

Целью данного исследования являлась оценка сохранности генотипа старовозрастного дуба черешчатого при получении его каллусной культуры. Для ее достижения проводился ПЦР-анализ с использованием SSR и ISSR молекулярных маркеров.

#### Объекты и методы исследования

В исследовании были использованы ткани старовозрастного (около 200 лет) дуба черешчатого из Орловской области. Для молекулярно-генетического анализа отбира-

лись образцы листьев, проросших из веток кроны в лабораторных условиях, и каллусной ткани – из культуры *in vitro*.

Первичными эксплантами для получения каллусных культур дуба служили части зеленых и полуодревесневших побегов, полученных в период вегетации 2022 года. Для инициации каллусогенеза использовалась базовая питательная среда для дуба (BTM) [10] с добавлением 1 мг/л 6-бензиламинопурина и 2 мг/л 1-нафтилуксусной кислоты. Исследования проводили в стандартных условиях культивирования *in vitro* ( $25 \pm 2$  °C, фотопериод 16 ч день / 8 ч ночь, освещенность 2,0 клк) с интервалом субкультивирования 1 раз в месяц. Экстракция ДНК из листьев исходных и культуральных образцов осуществлялась модифицированным ЦТАБ-методом, с добавлением поливинилпирролидона [11].

В исследовании было задействовано 6 ISSR-маркеров (табл. 1), взятых из литературных данных. Праймеры M3, CR-215 ранее были использованы для анализа генотипов *Populus tremula* L. [1] и *Acer platanoides* [8], праймеры IS4, IS8, IS38, IS42 испытывались на тополе *Populus cathayana* Rehd. [15].

Таблица 1

Характеристика использованных ISSR-праймеров

Праймер	Последовательность нуклеотидов
IS4	(AG)8YT
IS8	(ACG)8
IS38	(AC)8CC
IS42	(AC)8AG
CR-215	(CA)6GT
M3	(AC)8CT

Оптимальная температура отжига для данных маркеров была ранее определена в проведенном авторами данной статьи предварительном исследовании на генетическом материале клена остролистного [7].

С данным типом маркеров ПЦР проводилась по следующему протоколу:

1) предварительная денатурация (95 °C, 3 мин);

2) денатурация (95 °C, 30 сек);

3) отжиг (55 °C, 30 сек);

4) элонгация (72 °C, 90 сек), стадии 2–4 повторялись 35 циклов;

5) финальная элонгация (5 мин, 72 °C).

Для проведения SSR-анализа использовались маркеры следующих локусов: QrZAG 7, QrZAG 20, QrZAG 4, QpZAG 9, QpZAG 36, QrZAG 31 (SSR) [12, 13]. (табл. 2).

Таблица 2

Характеристика микросателлитных локусов дуба, использованных в исследовании

Локус	Последовательности нуклеотидов праймеров (прямая и обратная)	Температура отжига праймеров, °C
QrZAG_7	F: CAACTTGGTGTTCGGATC R: GTGCATTTCTTTATAGCATTCAC	50
QrZAG_20	F: CCATTAAGAAGCAGTATTTGT R: GCAACACTCAGCCTATATCTAGAA	50
QrZAG_4	F: CGTCTATAAGTCTTGGGTGA R: GTAACATGATGTGATCTTACTTCA	50
QpZAG_9	F: GCAATTACAGGCTAGGCTGG R: GTCTGGACCTAGCCCTCATG	50
QpZAG_36	F: GATCAAAATTTGGAATTAAGAGAG R: ACTGTGGTGGTGGTCTAACATGTAG	50
QrZAG_31	F: CTTAGTTGGTTGGGAAGAT R: GCAACCAACAATGAAAT	50

Для проведения ПЦР-реакции использовался следующий режим амплификации:

- 1) предварительная денатурация (94 °C, 5 мин);
- 2) денатурация (94 °C, 1 мин);
- 3) отжиг (50 °C, 1 мин);
- 4) элонгация (72 °C, 1 мин), стадии 2–4 повторялись 28–35 циклов;
- 5) финальная элонгация (72 °C, 10 мин).

Использовалась реакционная ПЦР-смесь (объем 25 мкл) следующего состава: из коммерческих наборов ScreenMix-Hs (Евроген). ПЦР проводилось на аппарате «Bio-Rad CFX96» (Bio-Rad).

Продукты ПЦР разделяли методом электрофореза в 2,5 % агарозном геле в горизонтальной камере Power Pac TM Universal («BioRad», США) в течение 120 минут при напряжении электрического поля 80 В. Применялся однократный TBE-буфер.

Окрашивание осуществлялось интеркалирующим красителем SYBRsafe (Invitrogen). Визуализация полученных ампликонов проводилась на трансиллюминаторе TFP (Vilber Lourmat).

#### Результаты и их обсуждение

Через 3–4 недели на первичных эксплантах стали появляться первые очаги каллусной ткани зеленого, светло-желтого или бежевого цвета. Спустя 2 месяца от начала культивирования формировался каллус плотного типа с диаметром 15–20 мм, который в последующем отделяли от первичного экспланта, разрезали на 2–3 части и пересаживали на среду того же состава с целью увеличения биомассы. Полученные каллусы (их фотографии приведены на рисунке) могут быть использованы в дальнейшем для регенерации растений.

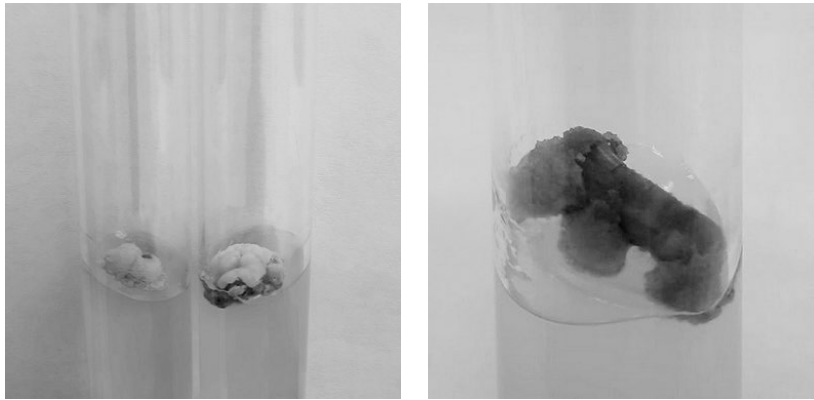


Рис. Каллусные культуры дуба черешчатого

Амплификация ДНК исследуемых образцов с микросателлитными маркерами дала продукты в диапазоне 150–250 п.н., большинство локусов – одиночный продукт, локус ZAG\_7 – двойной. Амплификация с межмикросателлитными маркерами дала спектры ампликонов в диапазоне 300–1000 п.н., количество мажорных продуктов варьировало от 1 до 3 (у IS4). Двойные продукты дали праймеры к локусам QrZAG\_7, IS8, IS42 и M3. Праймер CR-215 не дал ампликонов ни с одним из образцов и был исключен из анализа.

Все задействованные маркеры показали идентичность продуктов амплификации ДНК исходного дерева и четырех образцов каллусной ткани. Следует учесть, что результат данного анализа не полностью исключает проявление мутаций в ходе биотехнологических процедур, так как избирательно анализируются только отдельные фрагменты генома.

Однако микросателлитные участки наиболее подвержены мутациям: в ходе репликации ДНК коротких повторяющихся участков зачастую совершаются «ошибки», приводящие к появлению дополнительных повторов, удлинению микросателлитного участка, увеличению массы его ампликонов. Поэтому микросателлитные маркеры являются репрезентативным инструментом, позволяющим

оценить подверженность генотипа изменениям. Что же касается межмикросателлитных маркеров, то число образуемых ими продуктов амплификации соответствует количеству микросателлитных локусов определенного типа, встречающихся в геноме. Исчезновение отдельных ампликонов в ISSR спектре может быть объяснено мутациями сайтов связывания данных праймеров.

#### Заключение

Проведенные исследования показали соответствие продуктов амплификации ДНК исходного генотипа дерева и полученных от него каллусных культур по задействованным 6 микросателлитным и 5 межмикросателлитным маркерам, что свидетельствует о высокой вероятности хорошей сохранности генотипа дуба черешчатого при получении каллусных культур.

Анализ полученных данных позволяет сделать оптимистические выводы относительно использованной методики, однако его результаты еще не дают исчерпывающей гарантии сохранности генотипов дуба в процессе получения и культивации каллусных культур. Так, в исследовании культур клеток и тканей девясила британского (*Inula britannica* L.) методами проточной цитометрии и фрагментного анализа (RAF – Randomly Amplified

DNA Fingerprint) выявлено, что на ранних стадиях (6 месяцев) изменения в размере генома достоверно не фиксируются, тогда как на более поздних стадиях (12 месяцев) соматоклональная изменчивость фиксируется методом проточной цитометрии и проявляется фенотипически [9]. В ходе продолжения опытов по получению культур дуба из каллусных тканей необходимо проводить дальнейший

контроль сохранности генотипа с использованием разносторонних методов.

*Источник финансирования исследования:* Государственное задание по теме «Разработка технологии выращивания посадочного материала лиственных древесных растений с улучшенными наследственными свойствами для создания лесных культур целевого назначения» (№ 123040400004-8).

#### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Бобошина, И.В. Генетическая дифференциация популяций *Populus tremula* L. в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров / И.В. Бобошина, Ю.С. Нечаева, С.В. Боронникова // Аграрный вестник Урала. – 2012. – № 3 (95). – С. 11–13.
2. Егорова, Н.А. Культура каллусных тканей и соматоклональная изменчивость у эфиромасличных растений / Н.А. Егорова, И.В. Ставцева, А.Г. Инюткина, Л.Н. Чуб, А.А. Лолойко // Биология растений и садоводство: теория, инновации. – 2009. – № 131. – С. 63–67.
3. Календарь, Р.Н. Типы молекулярно-генетических маркеров и их применение / Р.Н. Календарь, В.И. Глазко // Физиология и биохимия культурных растений. – 2002. – Т. 34, № 4. – С. 279–296.
4. Машкина, О.С. Молекулярно-генетическая и цитогенетическая оценка перспективных гибридов и размноженных *in vitro* клонов тополя и осины / О.С. Машкина, Т.П. Федулова, Т.М. Табацкая, А.М. Кондратьева, Е.А. Шабанов // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2016. – № 2. – С. 60–69.
5. Ованесян, Н.А. Клональное микроразмножение и индукция каллусообразования олеандра (*Nerium oleander* L.) *in vitro* / Н.А. Ованесян // Вестник биотехнологии. – 2007. – Т. 3, № 3. – С. 10–17.
6. Ржевский, С.Г. Использование SSR, ISSR и RAPD маркеров для выявления изменчивости генотипов *Quercus robur* L. при культивировании *in vitro* / С.Г. Ржевский, А.М. Кондратьева: сборник научных трудов под общей ред. Е.А. Памфилова // Актуальные проблемы лесного комплекса. – Брянск, 2022. – Вып. 62. – С. 197–200.
7. Ржевский, С.Г. Оптимизация режима амплификации ISSR-маркеров для генотипирования *Acer platanoides* L. / С.Г. Ржевский, А.М. Кондратьева // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов, Воронеж: Центрально-Черноземное книжное изд-во. – 2022. – Вып. 24. – С. 228–233.
8. Скапцов, М.В. Соматоклональная изменчивость девясила британского – *Inula britannica* L. в культуре *in vitro* / М.В. Скапцов, Д.Л. Белкин, С.В. Смирнов, М.Г. Куцев // Turczaninowia. – 2015. – Т. 18, № 4. – С. 41–48.
9. Янбаев, Ю.А. Информативность ISSR-маркеров для выявления генетического разнообразия клена остролистного на Южном Урале / Ю.А. Янбаев, С.В. Боронникова, А.Р. Ахметов, Ю.С. Нечаева, Я.В. Пришнинская // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2014. – № 6 (167). – С. 94–97.
10. Chalupa, V. In vitro propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.) // Biologia plantarum. – 1984. – Vol. 26. – N 5. – P. 374–377.
11. Doyle, J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle, J.L. Doyle // Phytochemistry Bulletin. – 1987. – N 9. – P. 11–15.
12. Dzialuk, A. PCR multiplexing of nuclear microsatellite loci in *Quercus* species / A. Dzialuk, I. Chybicki, J. Burczyk // Plant Molecular Biology Reporter. – 2005. – Vol. 23, N 2. – P. 121–128.
13. Kampf, S. Brief report characterization of (GA) n microsatellite loci from *Quercus robur* / S. Kampf, C. Lexer, J. Glossl, H. Steinkellner // Hereditas. – 1998. – Vol. 129, N 183. – P. 1–86.
14. Lata, H. Molecular analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Stevia rebaudiana* Bert. using ISSR marker / H. Lata, S. Chandra, N. Techen, Y.H. Wang, I.A. Khan // American Journal of Plant Sciences – 2013. – Vol. 4, N 5. – p. 8. – DOI: 10.4236/ajps.2013.45119.
15. Lu, Z. Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd. populations in southwestern China revealed by ISSR markers / Z. Lu, Y. Wang, Y. Peng, H. Korpelainen, C. Li // Plant Science. – 2006. – N 170. – P. 407–412. – DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.09.009.



16. Żabicki, P. 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) / P. Żabicki, E. Sliwinska, J. Mitka, A. Sutkowska, M. Tuleja, G. Migdalek, E. Kuta // Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). – 2019. – Vol. 136, N 2, – P. 339–352. – DOI: 10.1007/s11240-018-1519-1.

## REFERENCES

- Boboshina I.V., Nechaeva Yu.S., Boronnikova S.V. Geneticheskaya differenciatsiya populacij *Populus tremula* L. v Permskom krae na osnovanii polimorfizma ISSR-markerov [Genetic differentiation of populations of *Populus tremula* L. in the Perm region based on polymorphism of ISSR markers]. *Agrarnyj vestnik Urala*, 2012, no. 3 (95), pp. 11–13. (In Russian).
- Egorova N.A., Stavceva I.V., Inyutkina A.G., Chub L.N., Lolojko A.A.. Kul'tura kallusnyh tkanej i somaklonal'naya izmenchivost' u efriomaslichnyh rastenij. *Biologiya rastenij i sadovodstvo: teoriya, innovacii*, 2009, no. 131, pp. 63–67. (In Russian).
- Kalendar R.N., Glazko V.I. Tipy molekularno-geneticheskikh Markerov i ih primenenie [Types of molecular-genetic markers and their application]. *Physiologiya i biokhimiya kulturnykh rastenij*, 2002, vol. 34, no. 4, pp. 279–296. (In Russian).
- Mashkina O.S., Fedulova T.P., Tabackaya T.M., Kondrat'eva A.M., Shabanova E.A. Molekulyarno-geneticheskaya i citogeneticheskaya ocenka perspektivnyh gibridov i razmnozhennyh in vitro klonov topolya i osiny [Molecular genetic and cytogenetic evaluation of perspective hybrids and propagated *in vitro* clones of poplar and aspen], *Vestnik Voronezhskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Himiya. Biologiya. Farmaciya*. 2016, no. 2, pp. 60–69. (In Russian).
- Ovanesyan N.A. Klonal'noe mikrorazmnozhenie i indukciya kallusoobrazovaniya oleandra (*Nerium oleander*) in vitro [Clonal micropropagation and an induction of the callus formation in oleander (*Nerium oleander* L.) in vitro]. *Vestnik biotekhnologii*, 2007, vol. 3, no. 3, pp. 10–17. (In Russian).
- Rzhevskij S.G., Kondrat'eva A.M. Ispol'zovanie SSR, ISSR i RAPD markerov dlya vyyavleniya izmenchivosti genotipov *Quercus robur* L. pri kul'tivirovanii in vitro [Use of SSR, ISSR and RAPD markers to detect the variability of *Quercus robur* L. in vitro cultivated genotypes. *Aktual'nye problemy lesnogo kompleksa*. (Ed. E.A. Pamfilov), Bryansk, 2022, vol. 62, pp. 197–200. (In Russian).
- Rzhevskij S.G., Kondrat'eva A.M. Optimizatsiya rezhima amplifikacii ISSR-markerov dlya genotipirovaniya *Acer platanoides* L. [Optimization of the mode of amplification of ISSR markers for genotyping *Acer platanoides* L.]. *Organizatsiya i regulyatsiya fiziologo-biohimicheskikh processov*, Voronezh, Central'no-Chernozemnoe knizhnoe izd-vo, 2022, vol. 24, pp. 228–233. (In Russian).
- Skapcov M.V., Belkin D.L., Smirnov S.V., Kucev M.G. Somaklonal'naya izmenchivost' devyasila britanskogo – *Inula britannica* L. v kul'ture in vitro [Somaclonal variation of Elecampene, *Inula britannica* L. in culture in vitro]. *Turczaninowia*, 2015, vol. 18, no. 4, pp. 41–48. (In Russian).
- Yanbaev Yu.A., Boronnikova S.V., Ahmetov A.R., Nechaeva Yu.S., Prishnivskaya Ya.V. Informativnost' ISSR-markerov dlya vyyavleniya geneticheskogo raznoobraziya klena ostrolistnogo na Yuzhnom Urale [Informative value of ISSR markers for identifying the genetic diversity of Norway maple in the Southern Urals]. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta*, 2014, vol. 6, no. 167, pp. 94–97. (In Russian).
- Chalupa V. In vitro propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia cordata* Mill.). *Biologia plantarum*, 1984, vol. 26, no. 5, pp. 374–377.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulliten*, 1987, no. 19, pp. 11–15.
- Dzialuk A., Chybicki I., Burczyk J. PCR multiplexing of nuclear microsatellite loci in *Quercus* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, vol. 23, no. 2, pp. 121–128.
- Kampfer S., Lexer C., Glössl J., Steinkellner H. Brief report characterization of (GA) in microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas*, 1998, vol. 129, no. 183, pp. 1–86.
- Lata H., Chandra S., Techen N., Wang Y.H., Khan I.A. Molecular analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Stevia rebaudiana* Bert. using ISSR marker. *American Journal of Plant Sciences*, 2013, vol. 4, no. 5, p. 8. DOI:10.4236/ajps.2013.45119.

- Lu Z., Wang Y., Peng Y., Korpelainen H., Li C. Genetic diversity of *Populus cathayana* Rehd. populations in southwestern China revealed by ISSR markers. *Plant Science*, 2006, no. 170, pp. 407–412. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.09.009.
- Żabicki P., Sliwinska E., Mitka J., Sutkowska A., Tuleja M., Migdalek G., 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, pp. 339–352. DOI: 10.1007/s11240-018-1519-1.

Статья поступила в редакцию 18.11.2022