

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ *QUERCUS ROBUR* L. НА ОСНОВАНИИ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR- И SSR-МАРКЕРОВ

А.Ф. Рябуха✉, П.А. Кузьмин

ФГБНУ «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук» (ФНЦ агроэкологии РАН), Россия, 400062, г. Волгоград, пр. Университетский, д. 97

ryabuha-af@vifanc.ru

Проведен молекулярно-генетический анализ двух популяций *Quercus robur* L. из Волгоградской области методами ISSR- и SSR-анализа (первая популяция из дендрологических насаждений ФНЦ агроэкологии РАН, г. Волгоград, вторая популяция из Нижневолжской опытной станции по селекции древесных пород, г. Камышин). Установлена наибольшая эффективность 9 из 18 протестированных ISSR-праймеров для анализа полиморфизма внутри популяций и между ними. Число локусов в спектре составило от 4 до 10 в зависимости от праймера. Наибольшее число локусов в спектре ($n = 10$) продуцировал праймер UBC835, наибольшая полиморфность (50...57 %) установлена с помощью праймеров UBC815, UBC834, UBC835, UBC836 и UBC840. Определены основные параметры генетического разнообразия популяций. Установлено, что все показатели были несколько выше у первой популяции ($n_a = 1,75 \pm 0,44$, $n_e = 1,44 \pm 0,38$, $H_E = 0,25 \pm 0,19$). В первой популяции полиморфизм был выше на 10 %, то есть вторая популяция содержит генетически более гомогенные деревья. В спектре на электрофореграмме, полученной с праймерами UBC811 и UBC834, выявлены уникальные фрагменты ДНК, характеризующие изменчивость внутри вида, которые могут быть использованы в дальнейшей селекционной работе. Показано, что для оценки полиморфизма данных популяций *Quercus robur* L. использование SSR-праймеров менее эффективно в сравнении с ISSR-праймерами. Однако исследованные микросателлитные праймеры видоспецифичны, что позволяет использовать их, например, при генетической паспортизации вида.

Ключевые слова: дуб черешчатый, полиморфизм ДНК, молекулярные маркеры

Ссылка для цитирования: Рябуха А.Ф., Кузьмин П.А. Молекулярно-генетический анализ популяций *Quercus robur* L. на основании полиморфизма ISSR- и SSR-маркеров // Лесной вестник / Forestry Bulletin, 2025. Т. 29. № 2. С. 42–54. DOI: 10.18698/2542-1468-2025-2-42-54

Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) относится к семейству *Fagaceae*. Род *Quercus* — наиболее многочисленный в семействе *Fagaceae*, представлен приблизительно 600 видами и разновидностями. Дуб черешчатый — одна из самых ценных древесных пород, имеющих очень важное хозяйственное и медицинское значение [1].

Дуб широко используется для создания защитных и противозерозионных лесных полос, в том числе в засушливых районах. В Волгоградской области накоплен многолетний опыт изучения различных видов и форм дуба по показателям засухоустойчивости, солеустойчивости, устойчивости к патогенам, что является основными направлениями его селекционного отбора для защитного лесоразведения [2, 3]. Наибольшее распространение в защитных лесополосах юго-востока европейской территории России получил дуб черешчатый и его

пирамидальная форма в связи с его высокой кислородной продуктивностью, засухоустойчивостью и солеустойчивостью [4, 5].

В условиях изменения климата, особенно в южных регионах России, наблюдается усыхание дубрав, что негативно может сказаться на генетической структуре его популяций. Первым этапом в работе по сохранению биологического и генетического разнообразия может стать оценка популяционной структуры и характера генетической изменчивости определенных экотипов дуба черешчатого в целях выявления наиболее продуктивных и устойчивых популяций. Далее для сохранения и воспроизводства видов, в том числе для отбора генотипов с ценными признаками помимо известных и давно применяющихся методов лесной селекции, возможно применение маркер-ассоциированной селекции (marker assisted selection, MAS) [6].

Фенотипические, биохимические, белковые (ферментные) маркеры давно используются при изучении различных аспектов, связанных

с жизнедеятельностью растений [10, 11]. Однако наиболее широко стали использовать молекулярно-генетический анализ с применением молекулярных маркеров, что позволяет идентифицировать генотипы, исследовать таксономию, филогенетику, осуществлять штрихкодирование [12–14]. Для оценки внутривидового полиморфизма в настоящее время наиболее широко используются межмикросателлитные (ISSR) и микросателлитные (SSR) праймеры [15–17].

С использованием 12 SSR-маркеров оценены генетическое разнообразие и генетическая структура семи популяций дуба черешчатого на Балканском полуострове. Установлено высокое генетическое разнообразие в изученных популяциях, более выраженное на внутривидовом уровне, чем между различными популяциями. Полученные данные позволяют идентифицировать экотопы, устойчивые к стресс-факторам и прогнозировать по ним генотипы на внутривидовом уровне, а также разрабатывать меры по сохранению дубов в условиях изменения климата [18].

В работе [19] с использованием 10 SSR-маркеров провели оценку генетического разнообразия популяций дуба черешчатого из 11 регионов России, произрастающих в различных географических условиях. Наибольшее генетическое расстояние рассчитано между образцами из Пензенской области и Республики Адыгея. При анализе дендрограммы сходства популяций установлено, что дуб черешчатый обладает высоким уровнем популяционного генетического разнообразия и низкой степенью дивергенции в пределах вида в изученной части ареала.

Группой ученых Южного Федерального университета с использованием ISSR-маркеров были проведены исследования связи экологических условий произрастания 13 популяций дуба черешчатого Ростовской области с их генетической структурой. По результатам исследований выявлено, что наименьшим средним уровнем ожидаемой гетерозиготности обладает байрачный экотоп, средним — аренный, наибольшим — пойменный, полиморфизм варьирует от 4,8 до 52,6 % [20].

Молекулярно-генетический анализ 12 природных популяций дуба черешчатого в Боснии и Герцеговине, находящихся на грани исчезновения, позволил установить большую генетическую изменчивость и дать рекомендации по сохранению популяции путем репродукции [21].

Молекулярно-генетический анализ, кроме того, позволяет проводить правильное районирование семян, изучение географических культур дуба. На основании изучения генетического полиморфизма дуба черешчатого даются реко-

мендации подразделения дубрав Южного Урала на два лесосеменных района и использования местного семенного материала для сохранения дубрав Белебеевской возвышенности [22]. В работе [23] методом анализа хлоропластной ДНК исследована геногеография дуба черешчатого на территории Белоруссии, в результате выделено три гаплотипа, даны рекомендации по использованию географических культур дуба для разработки лесосеменного районирования.

Проведение молекулярно-генетического анализа необходимо также для изучения генофонда долгоживущих деревьев и поиска генов, связанных с высокой продолжительностью жизни, перспективой использования таких деревьев в селекции и семеноводстве. В работе [24] представлен молекулярно-генетический анализ шести образцов дуба черешчатого, произрастающих на территории Украины, возрастом от 200 до около 1000 лет по семи SSR-маркерам, и расчет генетических показателей, определен уровень полиморфизма.

Пополнить ассортимент пород, используемых при создании защитных насаждений в условиях сухой степи, можно методом межвидовой гибридизации. Оценка гибридизации дуба черешчатого и дуба скального была изучена в работе [25] методом молекулярно-генетического анализа и сделан вывод о том, что образовавшиеся в результате гибриды могут обладать большей устойчивостью к абиотическим и биотическим стрессам.

Таким образом, актуальным представляется выявление и использование информативных ДНК-маркеров, характеризующих полиморфизм последовательностей нуклеиновых кислот и позволяющих изучать популяции в целях характеристики их генетического разнообразия и выявления наиболее ценных генотипов дуба черешчатого с перспективой применения их в защитном лесоразведении.

Цель работы

Цель работы — молекулярно-генетический анализ популяций дуба черешчатого на южной границе его ареала на основании полиморфизма ISSR- и SSR-маркеров.

Материалы и методы

Были исследованы образцы дуба черешчатого из двух популяций, произрастающих в дендрологических насаждениях ФНЦ агроэкологии РАН (кад. № 34:34:000000:122),

г. Волгоград (популяция 1) и на Нижневолжской опытной станции по селекции древесных пород — филиала ФНЦ агроэкологии РАН (кад. № 34:36:000014:0178), г. Камышин (популяция 2). Популяции произрастают в сходных условиях: на каштановых почвах в засушливом климате. Все деревья были в хорошем жизненном состоянии. Исследования проводили по общепринятым методикам изучения лесных насаждений [26]. На исследуемых территориях были заложены регулярным способом пробные площади (ПП) не менее пяти в каждой популяции размером не менее 0,25 га [27, 28]. На каждой ПП был выполнен сплошной пересчет деревьев, определены диаметр ствола и высота всех деревьев [29]. Относительное жизненное состояние (ОЖС) древостоя было установлено по методике В.А. Алексеева [30].

При создании биоресурсных коллекций проводился отбор древесных видов по хозяйственно ценным признакам [31, 32], поэтому представлялось важным проведение идентификации ценных генотипов молекулярно-генетическими методами.

Геномную ДНК экстрагировали из образцов листьев массой 50 мг с помощью модифицированного метода, используя в качестве экстрагента бромид цетилтриметиламмоний (ЦТАБ) с 2 % β-меркаптоэтанолом с некоторыми модификациями [33–35]. Концентрацию выделенной ДНК и соотношения оптической плотности при разных длинах волн, характеризующих степень очистки образца от белков и полифенолов (A260/A280, A260/A230), определяли на спектрофотометре SpectrostarNano (BMG Labtech, Германия). Концентрацию ДНК доводили до 50 нг/мкл водой дистиллированной двойной очистки и хранили выделенный образец при температуре –20 °С для следующих экспериментов по амплификации. Далее был проведен молекулярно-генетический анализ образцов дуба черешчатого с ISSR- и SSR-праймерами, подобранными на основе литературных данных [36–38]. Основные параметры данных праймеров приведены в табл. 1, 2.

Амплификацию с использованием ISSR- и SSR-праймеров проводили с использованием набора qPCRMix-HS (кат. № PK145L) (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Для амплификации геномной ДНК с помощью ISSR- и SSR-маркеров использовали программу Applied Biosystems QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific, США) со следующими условиями амплификации: начальная денатурация при температуре 95 °С в течение 5 мин, затем 40 циклов, включающих в себя денатурацию при 95 °С за 30 с, отжиг — 30 с

Т а б л и ц а 1

Название ISSR-праймеров, их последовательность и температура отжига

Name of ISSR-primers, their sequence and annealing temperature

Название	Нуклеотидная последовательность '5–3'	Температура отжига праймера, T_m , °С
UBC807	(AG) ₈ T	50,0
UBC808	(AG) ₈ C	50,6
UBC811	(GA) ₈ C	54,2
UBC815	(CT) ₈ G	50,0
UBC818	(CA) ₈ G	53,0
UBC823	(TC) ₈ C	50,7
UBC826	(AC) ₈ C	54,7
UBC834	(AG) ₈ Y	51,5
UBC835	(AG) ₈ YC	54,0
UBC836	(AG) ₈ YA	51,5
UBC840	(GA) ₈ YT	51,5
UBC841	(GA) ₈ YC	54,0
UBC843	(CT) ₈ RA	51,5
UBC857	(AC) ₈ YG	54,0
UBC860	(TG) ₈ RA	51,5
UBC873	(GACA) ₄	50,0
UBC880	(GGAG) ₄	62,4
UBC890	VHV(GT) ₇	50,0

(температура отжига для различных праймеров — 55...62 °С), элонгация при температуре 72 °С в течение 30 с, финальная элонгация при температуре 72 °С в течение 10 мин.

Для разделения полученных ампликонов использовали электрофорез в 2%-м агарозном геле в трис-ацетатном буфере. Размер полос ДНК на геле рассчитывали с помощью ДНК-праймера Step50+ (Biolabmix, Россия). Визуализацию результатов электрофореза проводили в геледокументирующей системе (Invitrogen iBright, США) в проходящем ультрафиолетовом свете (УФ-свете) после связывания фрагментов ДНК с бромистым этидием.

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel (версия 2010), Statistica 12.0 (StatSoft Inc., USA). Данные полимеразной цепной реакции (ПЦР) были получены на основе трехкратной амплификации каждого выбранного праймера с согласованными полосами. Было оценено аллельное разнообразие двух популяций, при этом локусы ПЦР на основе ISSR оценивались как присутствующие 1 или отсутствующие 0, каждый из которых рассматривался как независимый. Полученные

Т а б л и ц а 2

**Название SSR-праймеров, их последовательность, температура отжига
и ожидаемый размер ампликона**

Name of SSR-primers, their sequence, annealing temperature and expected amplicon size

Название праймера	Нуклеотидная последовательность праймеров 5'-3'	Температура отжига праймера, T_m , °C	Ожидаемый размер ампликона, п. н.
QrZAG11	F:CCTTGAAGTCGAAGGTGTCCTT	62	238–267 [19]
	R:GTAGGTCAAAACCATTTGGTTGACT		
QrZAG96	F:CCCAGTCACATCCACTACTGTCC	61	137–179 [19]
	R:GGTTGGGAAAAGGAGATCAGA		
QrZAG110	GGAGGCTTCCTTCAACCTACT	59	206–262 [19]
	GATCTCTTGTGTGCTGTATTT		
QrZAG39	CACCGCTGGAATTTTAAGGGA	61	103–139 [19]
	GACCTAAGCCAAAGTGTGGGC		

бинарные матрицы использовались для расчета характеристик связывания праймеров в программе POPGENE версии 1.31. Были рассчитаны показатели генетического разнообразия двух популяций *Q. Robur*: ожидаемая гетерозиготность, абсолютное число аллелей на локус, эффективное число аллелей на локус, индекс Шеннона [39, 40].

Результаты и обсуждение

В дендрологических насаждениях ФНЦ агроэкологии РАН относительное жизненное состояние древостоя характеризуется как удовлетворительное (90 %). Возраст древостоя 25...30 лет. Здоровые деревья составляют 79 %, ослабленные — 18,5 %, сильно ослабленные и отмирающие — 2,5 % особей. В данном насаждении *Q. Robur* составляет 80 % общего числа деревьев. Плотность посадок 595 шт./га. Сомкнутость крон 0,75...0,85. Средние таксационные показатели: $D_{1,3} = 18$ см, $H = 9$ м, $D_{\text{кроны}} = 6,5$ м (рис. 1, а).

В насаждениях Нижневолжской опытной станции по селекции древесных пород относительное жизненное состояние древостоя было оценено как удовлетворительное (90 %). Возраст древостоя 35...40 лет. Здоровые деревья составляют 80 %, ослабленные — 14 %, сильно ослабленные и отмирающие — 6 % особей. В данном насаждении *Q. Robur* составляет 50 % общего числа деревьев. Плотность посадок 510 шт./га. Сомкнутость крон 0,70...0,75. Средние таксационные показатели: $D_{1,3} = 20$ см, $H = 9,5$ м, $D_{\text{кроны}} = 8$ м (рис. 1, б).

Т а б л и ц а 3

**Концентрации и спектральные
соотношения (A260/A280, A260/A230)
образцов ДНК дуба черешчатого
(из двух популяций)**

Concentrations and spectral ratios
(A260/A280, A260/A230) of pedunculate oak
DNA samples (from two populations)

Номер популяции	A260/A280	A260/A230	Концентрация, нг/мкл
1	1,94 ± 0,05	1,81 ± 0,28	76,9 ± 16,11
2	1,98 ± 0,05	1,99 ± 0,42	29,36 ± 9,98
Примечание. Представлены средние значения определений ($n = 10$) и их стандартные отклонения.			

Измеренные концентрации и спектральные соотношения образцов ДНК (примеры из двух популяций) приведены в табл. 3.

В целях определения внутривидового генетического разнообразия *Q. Robur* было протестировано 18 ISSR-праймеров в каждой группе особей.

В результате проведенного тестирования было отобрано 9 ISSR-праймеров, отличающиеся высокой эффективностью амплификации большего количества фрагментов геномной ДНК (табл. 4).

Все использованные праймеры показали наличие полиморфизма у исследованных генотипов дуба. На основании анализа полученных электрофореграмм установлено, что число ISSR-фрагментов на общую проанализированную выборку варьировало от 4 (праймер UBC840) до 10 (праймер UBC835).



Рис. 1. Образцы *Q. Robur*, из двух популяций, произрастающих в насаждениях ФНЦ агроэкологии РАН: *a* — образец популяции 1 из дендрологических насаждений (Волгоград), координаты 48°37'55.550"N, 44°24'58.844"E; *б* — образец популяции 2 из Нижневолжской опытной станции по селекции древесных пород (Камышин), координаты 50°4'34.787"N, 45°22'23.022"E

Fig. 1. Samples of *Q. Robur*, from two populations growing in plantings of the Federal Research Center of Agroecology of the Russian Academy of Sciences: *a* — population sample 1 from the arboretum (Volgograd), positions 48°37'55.550"N, 44°24'58.844"E; *б* — population sample 2 from the Nizhnevolzhsky Experimental Station for Tree Breeding (Kamyshin), positions 50°4'34.787"N, 45°22'23.022"E

Длина фрагментов укладывалась в диапазон от 225 п. н. (праймер UBC834) до 1000 п. н. (праймеры UBC807, UBC835, UBC836).

Для большей детализации эффективности примененных ISSR-праймеров была проведена оценка частоты встречаемости по каждому локусу у двух популяций, полученных с помощью электрофореза ампликонов (табл. 5).

Каждый анализируемый локус ISSR-маркера формировал специфичный спектр продуктов амплификации у каждой особи *Q. Robur* в популяции (рис. 2). Для некоторых особей на электрофореграммах отмечены уникальные

фрагменты ДНК. Как видно из рис. 2, *б*, спектр продуктов амплификации с праймером UBC811 специфичен для особи 5, наблюдается уникальный фрагмент ДНК размером 700 п. н. Также для некоторых особей с праймером — UBC834 (рис. 2, *г*) выделяется фрагмент 650 п. н. (на соответствующих рисунках отмечены стрелками).

На основе полученных спектров ампликонов (см. рис. 2) были составлены бинарные матрицы для дальнейшей математической обработки в POPGENE в целях оценки генетического разнообразия в двух популяциях *Q. Robur*, произрастающих на разных территориях. Для изученных

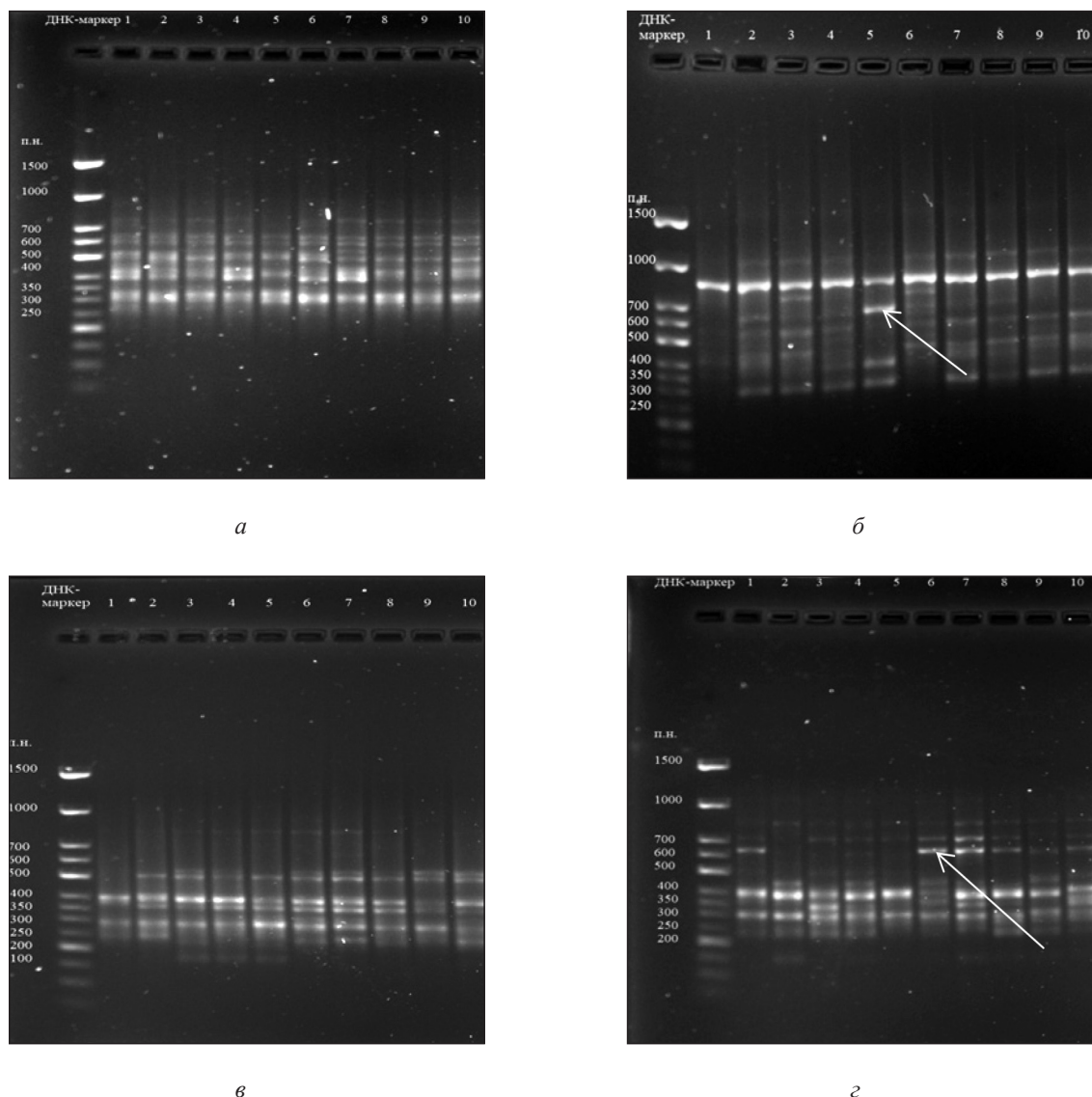


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации *Q. Robur*, с ISSR-праймером: а — UBC807; б — UBC811; в — UBC841; г — UBC834; ДНК-маркер — Step50+ (Biolabmix); лунки 1–10 — образцы первой популяции

Fig. 2. Electropherograms of *Q. Robur* amplification products, with ISSR-primer: а — UBC807; б — UBC811; в — UBC841; г — UBC834; DNA marker — Step50+ (Biolabmix); wells 1–10 are samples of the first population

популяций *Q. robur* были рассчитаны основные показатели генетической изменчивости (табл. 6).

Основные показатели генетического разнообразия *Q. Robur* несколько выше в первой популяции, в том числе значение полиморфизма выше на 10 %.

Далее был проведен молекулярный анализ образцов ДНК дуба черешчатого с SSR-праймерами (рис. 3). Как видно из рис. 3, для двух популяций дуба черешчатого каждый из представленных локусов является полиморфным.

Для праймера QR-Zag11 наблюдается один аллель на локус для образцов № 1 и № 5 пер-

вой популяции, размер ампликона составляет 300 п. н., для образца № 4 первой популяции — 250 п. н., для образцов № 2 и № 3 второй популяции — 250 п. н., для всех остальных образцов наблюдали два аллеля размерами 250 и 300 п. н. Для праймера QR-Zag39 наблюдается один аллель размером 140 п. н., для образцов № 2 и № 4 первой популяции и образцов № 1, № 2, № 4 второй популяции и два аллеля размерами 140 и 170 п. н. для остальных образцов. Для праймера QR-Zag110 наблюдается один аллель, но разной длины размером 220...270 п. н. для разных образцов.

Т а б л и ц а 4

Анализ ISSR-спектров изученных популяций *Q. Robur*

Analysis of ISSR spectra of the studied populations of *Q. Robur*

Прай-мер	Но-мер попу-ляции	Грани-ца длин локусов спектра, п.н.	Число локусов в спектре	Число поли-морфных локусов	Поли-морфность, %
UBC807	1 2	300...1000	9	3	33,3
UBC811	1 2	275...850	8	3	37,5
UBC815	1 2	300...800	8	4	50,0
UBC826	1 2	300...900	7	2	28,5
UBC834	1 2	225...700	7	4	57,1
UBC835	1 2	250...1000	10	5	50,0
UBC836	1 2	350...1000	8	4	50,0
UBC840	1 2	250...550	4	2	50,0
UBC841	1 2	300...520	6	2	33,3

Т а б л и ц а 5

Частота ISSR-маркеров двух изученных популяций *Q. Robur*

Frequency of ISSR markers of the two studied populations of *Q. Robur*

Название праймера	Длина фрагментов (п. н.)	Частота встречаемости фрагмента в популяциях	
		Популяция 1	Популяция 2
UBC807	300	1,00	0,11
	400	0,50	0,22
	425	0,67	0
	500	0,22	0,22
	550	0,22	0
	600	1,00	0
	625	1,00	0
	900	0	0,11
	1000	0	0,22
UBC811	275	0	0,44
	400	0,89	0,44
	450	1,00	0,56
	500	0,89	0,56
	550	1,00	0
	600	0,22	0,44
	700	0,11	0,33
	850	0,11	1,00

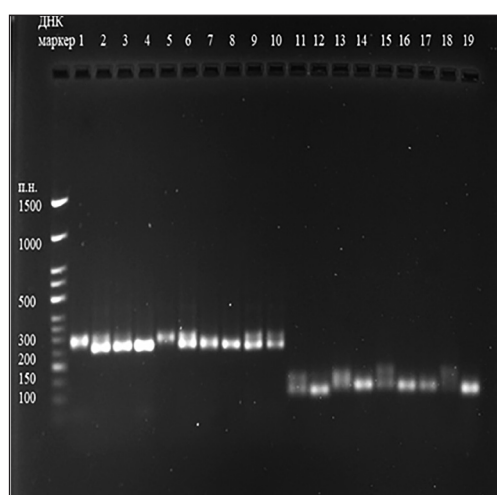
Окончание табл. 5

Название праймера	Длина фрагментов (п. н.)	Частота встречаемости фрагмента в популяциях	
		Популяция 1	Популяция 2
UBC815	300	0,11	0
	350	0,33	0,22
	400	0,11	0,11
	425	0,33	0,56
	475	0,22	0
	600	0,89	0,33
	700	0,67	0,33
	800	0,78	0
UBC826	300	0,78	0,33
	400	0,11	0
	450	0,67	0,56
	500	0,67	0,56
	600	0,11	0,44
	800	0,22	0,44
	900	1,00	0,56
UBC834	225	0,44	0
	300	1,00	0,56
	325	0,22	0
	400	0,89	0,56
	450	0,22	0
	650	0,44	0
	700	0,22	0,11
UBC835	250	0,33	0,11
	300	0,67	0,78
	350	0,89	0,11
	400	0,44	0
	450	0	0,78
	500	0,33	0,22
	520	0,56	0
	800	0,22	0
	950	0,67	0
	1000	0	0,22
UBC836	350	1,00	0,67
	400	0,22	0,67
	450	0,78	0,11
	480	0,33	0
	550	0,22	0
	600	0,11	0
	700	0	0,33
	1000	0,89	0,44
UBC840	250	1,00	0,78
	350	0,78	0,33
	500	0,78	0,44
	550	0,78	0,44
UBC841	250	0,44	0,56
	280	1,00	0,56
	350	0,89	0,33
	400	0,89	0,33
	500	0,78	0,56
	520	0,44	0

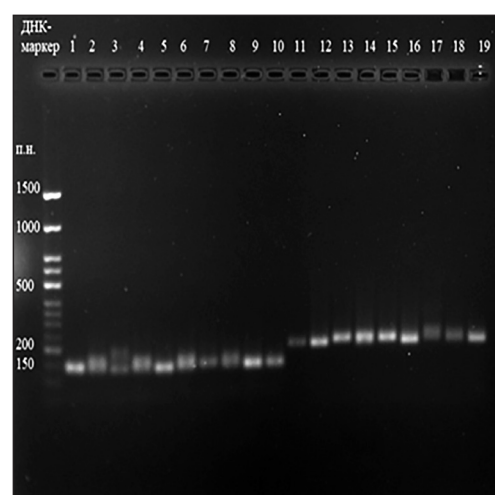
Т а б л и ц а 6

Показатели генетического разнообразия двух популяций *Q. Robur*Indicators of the genetic diversity of two populations of *Q. Robur*

Номер популяции	Абсолютное число аллелей на локус, n_a	Эффективное число аллелей на локус, n_e	Ожидаемая гетерозиготность, H_E	Индекс Шеннона, I	Полиморфизм, %
1	$1,75 \pm 0,44$	$1,44 \pm 0,38$	$0,25 \pm 0,19$	$0,38 \pm 0,27$	74,63
2	$1,67 \pm 0,47$	$1,36 \pm 0,35$	$0,22 \pm 0,19$	$0,34 \pm 0,27$	67,16



а



б

Рис. 3. Электрофореграммы продуктов амплификации *Q. Robur* с SSR-праймерами: а — QR-Zag11 (1–10 лунки), QR-Zag39 (11–19 лунки); б — QR-Zag96 (1–10 лунки), QR-Zag110 (11–19 лунки); ДНК-маркер — Step50+ (Biolabmix); 1–5, 11–15 лунки — образцы 1–5 первой популяции; 6–10 лунки — образцы 1–5 второй популяции, 16–19 лунки — образцы 1–4 второй популяции

Fig. 3. Electrophorograms of *Q. Robur* amplification products with SSR-primers: а — QR-Zag11 (1–10 wells), QR-Zag39 (11–19 wells); б — QR-Zag96 (1–10 wells), QR-Zag110 (11–19 wells); DNA marker — Step50+ (Biolabmix); holes 1–5, 11–15 are samples 1–5 of the first population; holes 6–10 are samples 1–5 of the second population, holes 16–19 are samples 1–4 of the second population

Для праймера QR-Zag96 наблюдается от одного до двух аллелей на локус. Один аллель размером 150 п. н. для образцов № 1 и № 5 первой популяции и для образцов № 2, № 4, № 5 второй популяции, два аллеля размерами 150 и 170 п. н. для образцов № 2 и № 4 первой популяции и для образцов № 1, № 3 второй популяции. Два аллеля размером 150 и 200 п. н. отмечено для образца № 3 первой популяции (см. рис. 3).

Спектр продуктов амплификации свидетельствует о том, что для оценки полиморфизма данных популяций SSR-праймеры показали меньшую эффективность, чем ISSR-праймеры.

Выводы

Установлена эффективность для анализа полиморфизма ДНК *Q. Robur* девяти из 18 про-

тестированных ISSR-праймеров. На основании анализа полученных электрофореграмм установлено, что число ISSR-фрагментов на общую проанализированную выборку варьировало от 4 (праймер UBC840) до 10 (праймер UBC835). Длина фрагментов укладывалась в диапазон от 225 п. н. (праймер UBC834) до 1000 п. н. (праймеры UBC807, UBC835, UBC836), наибольшая полиморфность (50...57 %) установлена с помощью праймеров UBC815, UBC834, UBC835, UBC836 и UBC840.

По выборкам дуба черешчатого из Волгоградской области показана изменчивость показателей «число аллелей на локус» и «ожидаемая гетерозиготность», а также уникальные локусы, характеризующие изменчивость внутри вида на границе ареала, что может быть использовано в дальнейшей селекционной работе.

Установлено, что все показатели генетического разнообразия были несколько выше у первой популяции ($n_a = 1,75 \pm 0,44$, $n_e = 1,44 \pm 0,38$, $H_E = 0,25 \pm 0,19$). В первой популяции полиморфизм был выше на 10 %, т. е. вторая популяция содержит генетически более гомогенные деревья.

Видоспецифичность микросателлитных праймеров позволяет использовать их, например, при генетической паспортизации вида. Межмикросателлитные праймеры характеризуют полиморфизм внутри популяций и между ними.

Выявление популяций дуба черешчатого, обладающих высоким полиморфизмом межмикросателлитных локусов, является крайне важным направлением исследовательских работ в целях увеличения количества популяций дуба для его сохранения и воспроизводства, отбора ценных генотипов, устойчивых к различным типам стресса.

Работа выполнена по теме Государственного задания «Поиск селекционно-ценного генетического материала для создания новых генотипов древесно-кустарниковых пород методами молекулярной селекции» (№ FNFE-2022-0009).

Список литературы

- [1] Рябов Н.А., Рыжов В.М., Куркин В.А., Колпакова С.Д., Жестков А.В., Лямин А.В. Антимикробная активность водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) // Фармация и фармакология, 2021. Т. 9. № 2 С. 104–113. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-104-113
- [2] Морозова Е.В., Иозус А.П. Основные результаты селекции пирамидальных форм дуба черешчатого в условиях сухой степи Нижнего Поволжья // Современные проблемы науки и образования, 2015. № 2–2. С. 816–821.
- [3] Скуратов И.В., Крюкова Е.А. Оценка устойчивости видов, гибридов и форм рода *Quercus* к эколого-патологическим факторам для защитного лесоразведения // Современные проблемы науки и образования, 2013. № 1. С. 418–425.
- [4] Крючков С.Н., Маттис Г.Я. Лесоразведение в засушливых условиях. Волгоград: Изд-во ВНИАЛМИ, 2014. 300 с.
- [5] Тараканов В.В., Паленова М.М., Паркина О.В., Роговцев Р.В., Третьякова Р.А. Лесная селекция в России: достижения, проблемы, приоритеты (обзор) // Лесохозяйственная информация, 2021. № 1. С. 100–143.
- [6] Чесноков Ю.В., Косолапов В.М. Генетические ресурсы растений и ускорение селекционного процесса. М.: Угрешская типография, 2016. 172 с.
- [7] Молекулярно-генетические и биохимические методы в современной биологии растений / под ред. В.В. Кузнецова, В.В. Кузнецова, Г.А. Романова. М.: БИНОМ, 2012. 487 с.
- [8] Карпеченко К.А., Карпеченко И.Ю., Землянухина О.А., Вепринцев В.Н., Кондратьева А.М., Карпеченко Н.А., Калаев В.Н. Изучение метаболизма плюсовых деревьев дуба черешчатого (*Quercus Robur* L.) // Фундаментальные исследования, 2013. № 1. С. 287–291.
- [9] Чеботарев П.А., Чеботарева В.В., Стороженко В.Г. Формовое разнообразие желудей дуба в дубравах лесостепи // Вестник БГАУ, 2020. № 4. С. 67–72.
- [10] Younis A., Ramzan F., Ramzan Y., Zulfikar F., Ahsan M., Lim K.B. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review // Plants, 2020, no. 9(10), pp. 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants9101374>
- [11] Nadeem M.A., Nawaz M.A., Shahid M.Q., Doğan Y., Comertpay G., Yıldız M., Hatipoğlu R., Ahmad F., Alsaleh A., Labhane N., Özkan H., Chung G., Baloch F.S. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing // Biotechnology, Biotechnological Equipment, 2018, v. 32, pp. 261–285. DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401
- [12] Боронникова С.В. Молекулярно-генетический анализ и оценка состояния генофондов ресурсных видов растений Пермского края. Пермь: Изд-во ПГНИУ, 2013. 223 с.
- [13] Семерикова С.А., Исаков И.Ю., Семериков В.Л. Изменчивость хлоропластной ДНК и филогеография дуба черешчатого *Quercus robur* L. в восточной части ареала // Генетика, 2021. 57(1). С. 56–71. DOI: 10.31857/S0016675821010136
- [14] Deguilloux M.-F., Dumolin-Lapegue S., Gielly L., Grivet D., Petit R.J. A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus* // Molecular Ecology Notes, 2003 no. 3, pp. 24–27. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2003.00339.x
- [15] Пришнинская Я.В., Красильников В.П., Боронникова С.В. Молекулярно-генетическая идентификация популяций *Pinus Sylvestris* L. на востоке русской равнины на основании полиморфизма ISSR-маркеров // Вестник Пермского университета, 2016. Вып. 2. С. 171–175.
- [16] Камнев А.М., Антонова О.Ю., Дунаева С.Е., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Молекулярные маркеры в исследованиях генетического разнообразия представителей рода *Rubus* L. и перспективы их применения в селекции // Вавиловский журнал генетики и селекции, 2020. Т. 24. № 1. С. 20–30. DOI 10.18699/VJ20.591.
- [17] Kloch M., Hawliczek-Strulak A.A., Swrecka-Belniak A.A. Molecular markers in forest management and tree breeding: a review // Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW Forestry and Wood Technology, 2015, no. 92, pp. 193–199.
- [18] Kesic L., Cseke K., Orlovic S., Stojanović D.B., Kostić S., Benke A., Borovics A., Stojnić S., Avramidou E.V. Genetic Diversity and Differentiation of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.). Population at the Southern Margin of its Distribution Range – Implications for Conservation // Diversity, 2021, v. 13, pp. 371–385. <https://doi.org/10.3390/d13080371>
- [19] Кулаков Е.Е., Воробьева Е.А., Сиволапов В.А., Карпеченко Н.А. Оценка полиморфизма дуба черешчатого (*Quercus robur*) с помощью SSR-анализа // Лесной вестник / Forestry Bulletin, 2021. Т. 25. № 4. С. 44–51. DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-44-51

- [20] Чохели В.А., Каган Д.И., Вардуни Т.В., Козловский Б.Л., Середя М.М., Капралова О.А., Дмитриев П.А., Падутов В.Е. Эколого-генетическая дифференциация ценопопуляций *Quercus robur* L. на территории Ростовской области с применением ISSR-маркеров // Turczaninowia, 2018, 21 (4). С. 161–167. DOI: 10.14258/turczaninowia.21.4.16
- [21] Ballian D, Belletti P, Ferrazzini D, Bogunic F, Kajba D. Genetic variability of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.) in Bosnia and Herzegovina // Periodicum Biologotum, 2010, v. 112, pp. 353–362.
- [22] Янбаев Р.Ю., Габитова А.А., Султанова Р.Р., Боронникова С.В., Янбаев Ю.А. ISSR-анализ полиморфизма ДНК дуба черешчатого: аргументы в пользу использования для лесовосстановления семян местных насаждений // Известия Оренбургского государственного аграрного университета, 2017. № 1 (63). С. 220–222.
- [23] Ковалевич О.А., Каган Д.И. Геногеография дуба черешчатого на основе молекулярного анализа хлоропластной ДНК // Труды БГТУ. Серия I. Лесное хозяйство, 2010. Вып. XVIII. С. 281–283.
- [24] Bilous S., Prysiazniuk L., Chernii S., Melnyk S., Marchuk Y., Likhanov A. Genetic characterisation of centuries-old oak and linden trees using SSR markers // Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry, 2022, v. 64 (1), pp. 58–68. DOI: 10.2478/ffp-2022-0006
- [25] Падутов В.Е. Процессы гибридизации дуба черешчатого и дуба скального по результатам молекулярно-генетического анализа // Труды БГТУ, 2021. № 1(2). С. 93–102. DOI: <https://doi.org/10.52065/2519-402X-2021-246-12-93-102>
- [26] Баранов Н.И., Курбатский Н.П. Таксация лесосек. М.; Л.: Гослесбуиздат, 1951. 120 с.
- [27] Смирнова О.В., Заугольнова Л.Б., Ханина Л.Г., Бобровский М.В., Торопова Н.А. Популяционные и фитоценоотические методы анализа биоразнообразия растительного покрова // Сохранение и восстановление биоразнообразия. М.: Изд-во НУМЦ, 2002. С. 145–194.
- [28] Артаев О.Н., Башмаков Д.И., Безина О.В. Методы полевых экологических исследований: учеб. пособие / под ред. А.Б. Ручина. Саранск: Изд-во Мордовского ун-та, 2014. 412 с.
- [29] Мартынов А.Н., Мельников Е.С., Ковязин В.Ф., Аникин А.С. Основы лесного хозяйства и таксация леса. СПб.: Лань, 2022. 432 с.
- [30] Алексеев В.А., Чертов О.Г., Сергейчик С.А. Лесные экосистемы и атмосферное загрязнение / под ред. В.А. Алексеева. Л.: Наука, 1990. 200 с.
- [31] Семенютина А.В., Хужахметова А.Ш., Долгих А.А., Семенютина В.А., Цой М.В. Анализ биоресурсных коллекций по климатическим ритмам и фенологическим процессам // Успехи современного естествознания, 2011. № 2. С. 39–45.
- [32] Семенютина А.В. Дендрофлора лесомелиоративных комплексов / под ред. И.П. Свинцова. Волгоград: Изд-во ВНИАЛМИ, 2013. 266 с.
- [33] Попова А.А., Гродецкая Т.А., Молчанов В.В., Евлаков Р.М. Подбор и оптимизация методов экстракции ДНК из различного растительного материала // Вестник Поволжского государственного технологического университета, 2022. № 1(53). С. 69–76.
- [34] Кулаков Е.Е., Сиволапов В.А., Воробьева Е.А., Сиволапов А.И. Генетическая изменчивость лиственницы Сукачева (*Larix sukaczewii* Djil.) в географических культурах под Воронежем // Лесотехнический журнал, 2018. № 1 (29). С. 35–42. DOI: 10.12737/article_5ab0dfbc03a703.71494463
- [35] Рябуха А.Ф., Кузьмин П.А. Подбор и оптимизация методов экстракции ДНК из листьев гледичии трехколючковой (*Gleditsia triacanthos* L.) // Аграрный вестник Урала, 2024. Т. 24. № 02. С. 207–217.
- [36] Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O., Bondarenko E. Preliminary comparative analysis of phonological varieties of *Quercus robur* by ISSR-markers // J. of Botany, 2016, t. 2016, p. 7910451. DOI:10.1155/2016/7910451
- [37] Lepais O., Leger V., Gerber S. High throughput microsatellite genotyping in oak species // Silvae Genetica, 2006, v. 55, pp. 238–240.
- [38] Ржевский С.Г., Кондратьева А.М. Использование ISSR и SSR-маркеров для генотипирования некоторых видов клена (*Acer*) // Труды Санкт-Петербургского научно-исследовательского института лесного хозяйства, 2022. № 3. С. 16–24.
- [39] Nei M. Genetic distance between populations // American Naturalist, 1972, v. 106, pp. 283–292.
- [40] Leberg P.L. Estimating Allelic Richness: Effects of Sample Size and Bottlenecks // Molecular Ecology, 2002, v. 11, pp. 2445–2449. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01612.x>

Сведения об авторах

Рябуха Анна Федоровна  — канд. фарм. наук, вед. науч. сотр. лаборатории молекулярной селекции, ФГБНУ «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук» (ФНЦ агроэкологии РАН), ryabuha-af@vfanc.ru

Кузьмин Петр Анатольевич — канд. с.-х. наук, вед. науч. сотр., и. о. зав. лаб. молекулярной селекции, ФГБНУ «Федеральный научный центр агроэкологии, комплексных мелиораций и защитного лесоразведения Российской академии наук» (ФНЦ агроэкологии РАН), kuzmin-p@vfanc.ru

Поступила в редакцию 12.03.2024.

Одобрено после рецензирования 02.07.2024.

Принята к публикации 04.02.2025.

MOLECULAR GENETIC ANALYSIS OF *QUERCUS ROBUR* L POPULATIONS BASED ON POLYMORPHISM OF ISSR- AND SSR-MARKERS

A.F. Ryabukha✉, P.A. Kuz'min

Federal Scientific Center for Agroecology, Integrated Land Reclamation and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences, 97, Universitetskii av., 400062, Volgograd, Russia

ryabuha-af@vfanc.ru

A molecular genetic analysis of two populations of *Quercus robur* L from the Volgograd region was carried out using ISSR and SSR analysis methods (the first population from the arboretum plantations of the Federal Research Center for Agroecology of the Russian Academy of Sciences, Volgograd, the second population from the Nizhnevolsky Experimental Station for tree breeding; Kamyshev). Nine of the 18 ISSR primers tested were found to be most effective for analyzing polymorphism within and between populations. The number of loci in the spectrum ranged from 4 to 10, depending on the primer. The UBC835 primer produced the largest number of loci in the spectrum ($n = 10$), and the greatest polymorphism (50...57 %) was found using UBC815, UBC834, UBC835, UBC836, and UBC840 primers. The main parameters of the genetic diversity of populations have been determined. It was found that all indicators were slightly higher in the first population ($n_a = 1,75 \pm 0,44$, $n_e = 1,44 \pm 0,38$, $H_E = 0,25 \pm 0,19$). In the first population, polymorphism was higher by 10 %, meaning that the second population contains genetically more homogeneous trees. The electrophoregram obtained with UBC811 and UBC834 primers revealed unique DNA fragments characterizing variability within the species, which can be used in further breeding work. It has been shown that the use of SSR primers is less effective in assessing the polymorphism of these populations of *Quercus robur* L in comparison with ISSR primers. However, the microsatellite primers studied are species-specific, which makes it possible to use them, for example, in the genetic certification of a species.

Keywords: oak petiolate, DNA polymorphism, molecular markers

Suggested citation: Ryabukha A.F., Kuz'min P.A. *Molekulyarno-geneticheskiy analiz populyatsiy Quercus robur L. na osnovanii polimorfizma ISSR- i SSR-markerov* [Molecular genetic analysis of *Quercus robur* L populations based on polymorphism of ISSR- and SSR-markers]. *Lesnoy vestnik / Forestry Bulletin*, 2025, vol. 29, no. 2, pp. 42–54. DOI: 10.18698/2542-1468-2025-2-42-54

References

- [1] Ryabov N.A., Ryzhov V.M., Kurkin V.A., Kolpakova S.D., Zhestkov A.V., Lyamin A.V. *Antimikrobnaya aktivnost' vodno-spirtovykh izvlecheniy list'ev i pochetk duba chereschatogo (Quercus robur L.)* [Antimicrobial activity of water-alcohol extracts of leaves and buds of oak petiolate (*Quercus robur* L.)]. *Farmatsiya i farmakologiya* [Pharmacy and Pharmacology], 2021. v. 9, no. 2 pp. 104–113. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-104-113.
- [2] Morozova E.V., Iozus A.P. *Osnovnye rezul'taty seleksii piramidal'nykh form duba chereschatogo v usloviyakh sukhoy stepi Nizhnego Povolzh'ya* [The main results of the selection of pyramidal forms of pedunculate oak in the conditions of the dry steppe of the Lower Volga region]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2015, no. 2–2, pp. 816–821.
- [3] Skuratov I.V., Kryukova E.A. *Otsenka ustoychivosti vidov, gibridov i form roda Quercus k ekologo-patologicheskim faktoram dlya zashchitnogo lesorazvedeniya* [Assessment of the resistance of species, hybrids and forms of the genus *Quercus* to ecological and pathological factors for protective afforestation]. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya* [Modern problems of science and education], 2013, no. 1, pp. 418–425.
- [4] Kryuchkov S.N., Mattis G.Ya. *Lesorazvedenie v zasushlivykh usloviyakh* [Afforestation in arid conditions]. Volgograd: VNIALMI, 2014, 300 p.
- [5] Tarakanov V.V., Palenova M.M., Parkina O.V., Rogovtsev R.V., Tret'yakova R.A. *Lesnaya selektsiya v Rossii: dos-tizheniya, problemy, priority (obzor)* [Forest breeding in Russia: achievements, problems, priorities (overview)]. *Lesokhozyaystvennaya informatsiya* [Forestry information], 2021, no. 1, pp. 100–143.
- [6] Chesnokov Yu.V., Kosolapov V.M. *Geneticheskie resursy rasteniy i uskorenie selektsionnogo protsessa* [Genetic resources of plants and acceleration of the breeding process]. Moscow: Ugreshskaya tipografiya, 2016, 172 p.
- [7] *Molekulyarno-geneticheskie i biokhimicheskie metody v sovremennoy biologii rasteniy* [Molekulyarno-geneticheskie i biokhimicheskie metody v sovremennoy biologii rasteniy]. Eds. V.V. Kuznetsov, V.V. Kuznetsov, G.A. Romanov. Moscow: BINOM, 2012, 487 p.
- [8] Karpechenko K.A., Karpechenko I.Yu., Zemlyanukhina O.A., Veprintsev V.N., Kondrat'eva A.M., Karpechenko N.A., Kalaev V.N. *Izucheniye metabolizma plusovykh derev'ev duba chereschatogo (Quercus Robur L.)* [Studying the metabolism of plus-sized oak trees (*Quercus Robur* L.)]. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental research], 2013, no. 1, pp. 287–291.
- [9] Chebotarev P.A., Chebotareva V.V., Storozhenko V.G. *Formovoe raznoobrazie zheludey duba v dubravakh lesostepi* [The form diversity of oak acorns in the oak forests of the forest-steppe]. *Vestnik BGAU* [Bulletin of the BGAU], 2020, no. 4, pp. 67–72.

- [10] Younis A., Ramzan F., Ramzan Y., Zulfiqar F., Ahsan M., Lim K.B. Molecular Markers Improve Abiotic Stress Tolerance in Crops: A Review. *Plants*, 2020, no. 9(10), pp. 1–16. <https://doi.org/10.3390/plants9101374>
- [11] Nadeem M.A., Nawaz M.A., Shahid M.Q., Doğan Y., Comertpay G., Yıldız M., Hatipoğlu R., Ahmad F., Alsaleh A., Labhane N., Özkan H., Chung G., Baloch F.S. DNA molecular markers in plant breeding: current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology, Biotechnological Equipment*, 2018, v. 32, pp. 261–285. DOI: 10.1080/13102818.2017.1400401
- [12] Boronnikova S.V. *Molekulyarno-geneticheskiy analiz i otsenka sostoyaniya genofondov resursnykh vidov rasteniy Permskogo kraya* [Molecular genetic analysis and assessment of the state of gene pools of resource plant species of the Perm region]. Perm': Perm State National Research University, 2013, 223 p.
- [13] Semerikova S.A., Isakov I.Yu., Semerikov V.L. *Izmenchivost' khloroplastnoy DNK i filogeografiya duba chereschatogo Quercus robur L. v vostochnoy chasti areala* [Variability of chloroplast DNA and phylogeography of the pedunculate oak *Quercus robur* L. in the eastern part of the range]. *Genetika* [Genetics], 2021, v. 57(1), pp. 56–71. DOI: 10.31857/S0016675821010136
- [14] Deguilloux M.-F., Dumolin-Lapegue S., Gielly L., Grivet D., Petit R.J. A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes*, 2003 no. 3, pp. 24–27. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2003.00339.x
- [15] Prishnivskaya Ya.V., Krasil'nikov V.P., Boronnikova S.V. *Molekulyarno-geneticheskaya identifikatsiya populyatsiy Pinus Sylvestris L. na vostoке russkoy ravniny na osnovanii polimorfizma ISSR-markero*v [Molecular genetic identification of *Pinus Sylvestris* L. populations in the east of the Russian plain on the basis of polymorphism of ISSR markers]. *Vestnik Permskogo universiteta* [Bulletin of the Perm University], 2016, v. 2, pp. 171–175.
- [16] Kamnev A.M., Antonova O.Yu., Dunaeva S.E., Gavrilenko T.A., Chukhina I.G. *Molekulyarnye markery v issledovaniyakh geneticheskogo raznoobraziya predstaviteley roda Rubus L. i perspektivy ikh primeneniya v selektsii* [Molecular markers in studies of the genetic diversity of representatives of the genus *Rubus* L. and prospects for their application in breeding]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i selektsii* [Vavilov J. of Genetics and Breeding], 2020, v. 24, no. 1, pp. 20–30. DOI 10.18699/VJ20.591.
- [17] Kloch M., Hawliczek-Strulak A.A., Swrecka-Belniak A.A. Molecular markers in forest management and tree breeding: a review. *Annals of Warsaw University of Life Sciences-SGGW Forestry and Wood Technology*, 2015, no. 92, pp. 193–199.
- [18] Kesic L., Cseke K., Orlovic S., Stojanović D.B., Kostić S., Benke A., Borovics A., Stojnić S., Avramidou E.V. Genetic Diversity and Differentiation of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.). Population at the Southern Margin of its Distribution Range –Implications for Conservation. *Diversity*, 2021, v. 13, pp. 371–385. <https://doi.org/10.3390/d13080371>
- [19] Kulakov E.E., Vorobyeva E.A., Sivolapov V.A., Karpechenko N.A. *Otsenka polimorfizma duba chereschatogo (Quercus robur) s pomoshch'yu SSR-analiza* [Petiolate Oak (*Quercus robur*) polymorphism evaluation by SSR-analyzing]. *Lesnoy vestnik / Forestry Bulletin*, 2021, vol. 25, no. 4, pp. 44–51. DOI: 10.18698/2542-1468-2021-4-44-51
- [20] Chokheli V.A., Kagan D.I., Varduni T.V., Kozlovskiy B.L., Sereda M.M., Kapralova O.A., Dmitriev P.A., Padutov V.E. *Ekologo-geneticheskaya differentsiatsiya tsenopopulyatsiy Quercus robur L. na territorii Rostovskoy oblasti s primeneniem ISSR-markero*v [Ecological and genetic differentiation of coenopopulations of *Quercus robur* L. on the territory of the Rostov region using ISSR markers]. *Turczaninowia* [Turczaninowia], 2018, v. 21, no. 4, pp. 161–167. DOI: 10.14258/turczaninowia.21.4.16
- [21] Ballian D., Belleti P., Ferrazzini D., Bogunic F., Kajba D. Genetic variability of Pedunculate Oak (*Quercus robur* L.) in Bosnia and Herzegovina. *Periodicum Biologotum*, 2010, v. 112, pp. 353–362.
- [22] Yanbaev R.Yu., Gabitova A.A., Sultanova R.R., Boronnikova S.V., Yanbaev Yu.A. *ISSR-analiz polimorfizma DNK duba chereschatogo: argumenty v pol'zu ispol'zovaniya dlya lesovosstanovleniya semyan mestnykh nasazhdeniy* [ISSR-analysis of DNA polymorphism of oak petiolate: arguments in favor of using seeds of local plantings for reforestation]. *Izvestiya Orenburgskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Proceedings of the Orenburg State Agrarian University], 2017, no. 1 (63), pp. 220–222.
- [23] Kovalevich O.A., Kagan D.I. *Genogeografiya duba chereschatogo na osnove molekulyarnogo analiza khloroplastnoy DNK* [Genogeography of English oak based on molecular analysis of chloroplast DNA]. *Trudy BGTU. Seriya I, Lesnoe khozyaystvo* [The works of BSTU. Series I, Forestry], 2010, v. XVIII, pp. 281–283.
- [24] Bilous S., Prysiazhniuk L., Chernii S., Melnyk S., Marchuk Y., Likhanov A. Genetic characterisation of centuries-old oak and linden trees using SSr markers. *Folia Forestalia Polonica, Series A – Forestry*, 2022, v. 64 (1), pp. 58–68. DOI: 10.2478/ffp-2022-0006
- [25] Padutov V.E. *Protsessy gibrizatsii duba chereschatogo i duba skal'nogo po rezul'tatam molekulyarno-geneticheskogo analiza* [The processes of hybridization of pedunculate oak and rocky oak according to the results of molecular genetic analysis]. *Trudy BGTU* [The works of BSTU], 2021, v. 1(2), pp. 93–102. DOI: <https://doi.org/10.52065/2519-402X-2021-246-12-93-102>
- [26] Baranov N.I., Kurbatskiy N.P. *Taksatsiya lese*sek [Taxation of cutting areas]. Moscow, Leningrad: Goslesbumizdat, 1951, 120 p.
- [27] Smirnova O.V., Zaugol'nova L.B., Khanina L.G., Bobrovskiy M.V., Toropova N.A. *Populyatsionnye i fitotsenoticheskie metody analiza bioraznoobraziya rastitel'nogo pokrova* [Population and phytocenotic methods of analyzing the biodiversity of vegetation cover]. *Sokhranenie i vosstanovlenie bioraznoobraziya* [Conservation and restoration of biodiversity], 2002, pp. 145–194.
- [28] Artaev O.N., Bashmakov D.I., Bezina O.V. *Metody polevykh ekologicheskikh issledovaniy* [Methods of field environmental research]. Ed. A.B. Ruchin. Saransk: Izd-vo Mordovskogo un-ta, 2014, 412 p.

- [29] Martynov A.N., Mel'nikov E.S., Kovyazin V.F., Anikin A.S. *Osnovy lesnogo khozyaystva i taksatsiya lesa* [Fundamentals of forestry and forest taxation]. St. Petersburg: Lan', 2022, 432 p.
- [30] Alekseev V.A., Chertov O.G., Sergeychik S.A. *Lesnye ekosistemy i atmosferno-zagryaznenie* [Forest ecosystems and atmospheric pollution]. Ed. V.A. Alekseev. Leningrad: Nauka, 1990, 200 p.
- [31] Semenyutina A.V., Khuzhakhmetova A.Sh., Dolgikh A.A., Semenyutina V.A., Tsoy M.V. *Analiz bioresursnykh kollektsey po klimaticheskim ritmam i fenologicheskim protsessam* [Analysis of bioresource collections on climatic rhythms and phenological processes.]. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* [Successes of modern natural science], 2021, no. 2, pp. 39–45.
- [32] Semenyutina A.V. *Dendroflora lesomeliorativnykh kompleksov* [Dendroflora of forest reclamation complexes]. Ed. I.P. Svincov. Volgograd: VNIALMI, 2013, 266 p.
- [33] Popova A.S., Starukhina A.O., Zaytsev V.G. *Sravnitel'nyy analiz metodov uskorennoy vydeleniya DNK iz rastitel'nogo materiala* [Selection and optimization of DNA extraction methods from various plant materials]. *Vestnik PGU* [Bulletin of the State Technical University], 2022, no. 53, pp. 69–76.
- [34] Kulakov E.E., Sivolapov V.A., Vorob'eva E.A., Sivolapov A.I. *Geneticheskaya izmenchivost' listvenitsy Sukacheva (Larix sukaczewii Dyl.) v geograficheskikh kul'turakh pod Voronezhem* [Genetic variability of Sukachev's larch (*Larix sukaczewii* Dyl.) in geographical cultures near Voronezh]. *Lesotekhnicheskii zhurnal* [Forest engineering magazine], 2018, no. 1 (29), pp. 35–42. DOI: 10.12737/article_5ab0dfbc03a703.71494463
- [35] Ryabukha A.F., Kuz'min P.A. *Podbor i optimizatsiya metodov ekstraktsii DNK iz list'ev gleditsii trekhkolyuchkovoy (Gleditsia triacanthos L.)* [Selection and optimization of DNA extraction methods from the leaves of *Gleditsia triacanthos* L.]. *Agrarnyy vestnik Urala* [Agrarian Bulletin of the Urals], 2024, v. 24, no. 02, pp. 207–217.
- [36] Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O., Bondarenko E. Preliminary comparative analysis of phonological varieties of *Quercus robur* by ISSR-markers. *J. of Botany*, 2016, t. 2016, p. 7910451. DOI:10.1155/2016/7910451
- [37] Lepais O., Leger V., Gerber S. High throughput microsatellite genotyping in oak species. *Silvae Genetica*, 2006, v. 55, pp. 238–240.
- [38] Rzhavskiy S.G., Kondpat'eva A.M. *Ispol'zovanie ISSR- i SSR-markerov dlya genotipirovaniya nekotorykh vidov klenu (Acer)* [The use of ISSR- and SSR markers for genotyping some maple species (*Acer*)]. *Trudy Sankt-Peterburgskogo nauchno-issledovatel'skogo instituta lesnogo khozyaystva* [Proceedings of the St. Petersburg Scientific Research Institute of Forestry], 2022, no. 3, pp. 16–24.
- [39] Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 1972, v. 106, pp. 283–292.
- [40] Leberg P.L. Estimating Allelic Richness: Effects of Sample Size and Bottlenecks. *Molecular Ecology*, 2002, v. 11, pp. 2445–2449. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01612.x>

The work was carried out under the State task 'Search for selection-valuable genetic material for creation of new genotypes of tree and shrub species by molecular breeding methods' (№FNFE-2022-0009).

Authors' information

Ryabukha Anna Fedorovna✉ — Cand. Sci. (Pharmaceutical), Leading Researcher at the Laboratory of Molecular breeding, Federal Research Center of Agroecology, Integrated Land Reclamation and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences, ryabuha-af@vfanc.ru

Kuz'min Petr Anatol'evich — Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Acting Head of Laboratory of Molecular breeding, Federal Research Center of Agroecology, Integrated Land Reclamation and Protective Afforestation of the Russian Academy of Sciences, kuzmin-p@vfanc.ru

Received 12.03.2024.

Approved after review 02.07.2024.

Accepted for publication 04.02.2025.

Вклад авторов: все авторы в равной доле участвовали в написании статьи

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Authors' Contribution: All authors contributed equally to the writing of the article

The authors declare that there is no conflict of interest