

УДК 630\*81:630\*165

Л.В. Можаровская, доц., канд. биол. наук, ст. науч. сотр.;

П.С. Кирьянов, науч. сотр.;

А.П. Сачек, науч. сотр.

(Институт леса НАН Беларуси, г. Гомель)

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОСВЯЗИ ЭКСПРЕССИИ  
И СТРУКТУРНОГО ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ,  
АССОЦИИРОВАННЫХ С КСИЛОГЕНЕЗОМ,  
И РАДИАЛЬНОГО ПРИРОСТА РАННЕЙ ДРЕВЕСИНЫ  
PINUS SYLVESTRIS L.**

Для установления молекулярно-генетических механизмов формирования древесины в настоящее время широко применяются методы, основанные на количественной оценке дифференциально экспрессируемых генов, а также изучении взаимосвязи полиморфизма генов и процессов ксилогенеза [1, 2].

Целью настоящей работы являлось исследование влияния экспрессии генов (*TUA* и *TUB*) и структурного полиморфизма генов (*MYB4*, *TUA*, *TUB*) на проявление характеристик радиального прироста ранней древесины *Pinus sylvestris*. Объектом исследования являлись плюсовые насаждения *P. sylvestris* (n=15), возраст насаждения – 120 лет, произрастающие в Ченковском лесничестве ГЛХУ «Кореневская экспериментальная лесная база ИЛ НАН Беларуси».

На первом этапе исследования, в первой декаде мая, из тканей камбиальных зон стволов деревьев получали препараты мРНК. Для этого на высоте 1,3 м от комля дерева на стволе вырезали окошки 4 × 8 см и с обнаженной поверхности бритвенным лезвием соскабливали слой тканей камбиальной зоны (камбий и делящиеся клетки ксилемы).

Отобранный материал сразу замораживали в жидком азоте. Выделение суммарной РНК проводили набором Gene JET Plant RNA Purification Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, США) по методике фирмы-производителя, реакцию обратной транскрипции с синтезом кДНК – с применением ArtMMLV ревертазы и праймерами Олиго (дТ)12-25 (АртБиоТех, Беларусь).

Для проведения количественного анализа в качестве локуса-референса использовали ДНК-локус *act*, для постановки ПЦР применялись ранее разработанные нами праймеры [3, 4]. Количественную ПЦР проводили на основании использования коммерческого набора Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific, США). На основе анализа ОТ-ПЦР-РВ, с расчетом относительной экспрессионной активности генов (методом  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), установили, что уровни экс-

прессии генов тубулинов *TUA* и *TUB* были близкими, с превалированием *TUA*.

Второй этап проводился в ноябре того же года и заключался в исследовании радиального прироста ранней древесины. Для этого отбирались керны древесины исследуемых деревьев и в лабораторных условиях изучались характеристики радиального прироста ранней древесины: количество клеточных элементов, ширина прироста, плотность клеточных элементов. Выявление корреляции между экспрессией генов и характеристиками радиального прироста ранней древесины *P. sylvestris* выполняли на основе вычисления коэффициента корреляции Пирсона.

Наибольшие значения корреляции установлены для взаимосвязи: экспрессионной активности генов *TUA* и количества клеточных элементов в ранней древесине ( $r = 0,4$  при  $p < 0,05$ ); экспрессионной активности гена *TUA* и шириной прироста ранней древесины ( $r = 0,4$  при  $p < 0,05$ ).

Для установления полиморфизма ДНК-локусов методом ПЦР-анализа использовали препараты ДНК, полученные СТАВ-методом из фрагментов тканей камбиальных зон стволов деревьев [5]. После проведения ПЦР-амплификации ДНК-локусов *MYB4*, *TUA* и *TUB* проводился групповой анализ их нуклеотидной структуры, для этого готовилась смесь ПЦР-ампликонов 15 генотипов с последующим секвенированием. По результатам анализа исследуемые последовательности характеризовались полиморфизмом.

Одним из методов, позволяющим выявлять различия в нуклеотидном составе сравниваемых образцов ДНК, является рестрикционный анализ (RFLP-анализ). С использованием программного обеспечения NEBCutter 2.0, были смоделированы рестрикционные спектры ДНК-маркеров и подобраны эндонуклеазы рестрикции – ферменты, катализирующие гидролиз двухцепочечной ДНК внутри специфического сайта рестрикции.

В качестве ферментов рестрикции были выбраны: *AluI* (сайт рестрикции: 5'...AG↓CT...3', 3'...TC↓GA...5') и *BsuR1* (*HaeIII*) (сайт рестрикции: 5'...GG↓CC...3', 3'...CC↓GG...5'). RFLP-анализ ДНК-маркеров *MYB4*, *TUA* и *TUB* исследуемых индивидуальных 15 генотипов показал наличие нескольких аллельных вариантов или паралогов данных локусов, поскольку сумма длин фрагментов рестрикции превышала ожидаемые размеры ДНК-маркеров.

Для каждого анализируемого ДНК-маркера среди исследуемых генотипов наблюдались генотипы с отличными длинами фрагментов рестрикции. Так, для ДНК-маркера *MYB4* исследуемые генотипы бы-

ли однородны, за исключением пяти. ДНК-маркеры *TUA* и *TUB*, также характеризовались наличием генотипов с иными полиморфными регионами: три генотипа – для *TUA*, два – для *TUB*.

Наибольшие значения корреляции установлены для взаимосвязи между полиморфизмом генов *MYB4* и *TUB*, и количеством клеточных элементов в ранней древесине ( $r = 0,33$  и  $r = 0,42$  при  $p < 0,05$ , соответственно), экспрессионной активности *TUA* и количеством клеточных элементов в ранней древесине, а также шириной прироста ранней древесины ( $r = 0,43$  и  $r = 0,44$  при  $p < 0,05$ , соответственно).

Следует отметить, что полученные результаты значений корреляции исследуемых величин определены слабой положительной зависимостью, что может быть связано с полигенной природой влияния на фенотипическое проявление признака (характеристики радиального прироста древесины).

В целом, полученные результаты относительно положительной корреляции между полиморфизмом, а также экспрессией генов *MYB4*, *TUA* и *TUB*, и характеристиками радиального прироста ранней древесины *P. sylvestris*, согласуются с известными исследованиями, направленными на изучение молекулярно-генетической основы формирования древесины у хвойных видов [2], и будут использованы в дальнейшей работе по изучению молекулярно-генетических механизмов формирования ранней и поздней древесины *P. sylvestris*.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Relationship between development of compression wood and gene expression / S. Yamashita, M. Yoshida, H. Yamamoto // Plant Science – 2009. – Vol. 176. – № 6. – P. 729-735.
2. Association genetics of wood physical traits in the conifer white spruce and relationships with gene expression / J. Beaulieu [et al.] // Genetics – 2011. – Vol. 188. – № 1. – P. 197-214.
3. Анализ полиморфизма ДНК-локусов *MYB4* и *TUA* *Pinus sylvestris* L. / Можаровская Л.В., Кирьянов П.С., Падутов А.В. // Лесное хозяйство: материалы 87-й науч.-техн. конференции – Минск: БГТУ, 2023. – С. 229-231.
4. Молекулярно-генетическая идентификация транскриптов генов, ассоциированных с анатомическими признаками древесины сосны обыкновенной (*Pinus sylvestris* L.) / Л.В. Можаровская, А.П. Сачек, П.С. Кирьянов // Проблемы лесоведения и лесоводства: Сб. науч. трудов – Вып. 83. – Гомель: ИЛ НАН Беларуси, 2023. – С. 108-115.
5. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.