

## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНЫХ ГИБРИДОВ И РАЗМНОЖЕННЫХ *IN VITRO* КЛОНОВ ТОПОЛЯ И ОСИНЫ

О. С. Машкина<sup>1</sup>, Т. П. Федулова<sup>2</sup>, Т. М. Табацкая<sup>2</sup>, А. М. Кондратьева<sup>2</sup>, Е. А. Шабанова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет», Воронеж, Россия

<sup>2</sup>ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии», Воронеж, Россия

Поступила в редакцию 05.04.2016 г.

**Аннотация.** Представлены результаты микросателлитного анализа перспективных разноплоидных гибридов и размноженных *in vitro* клонов тополя и осины (культуры *in vitro* и *ex vitro*), для которых был предварительно проведен хромосомный анализ (установлена плоидность и уровень миксоплоидии соматической ткани). Отобрано 10 наиболее информативных полиморфных локусов (PMGC2060, PMGC2571, PMGS2679, WPMS12, WPMS14, WPMS20, PMGC433, PMGC2852, WPMS5, ORPM344) для идентификации и генотипирования внутривидовых (гибриды тополя белого) и межвидовых (тополь сереющий, т. белый × гибрид (белый × осина), т. дельтовидный × т. бальзамический) различий; генетической паспортизации индивидуальных генотипов и клонов; оценки внутриклоновой генетической однородности и идентичности размноженных *in vitro* клонов исходным экземплярам. Показана возможность использования микросателлитных маркеров для выделения аллотриплоидов тополя ( $2n=3x=57$ ).

**Ключевые слова:** тополь, осина, гибриды, размноженные *in vitro* клоны, SSR, микросателлиты, паспортизация, плоидность, миксоплоидия.

**Abstract.** The article presents the results of microsatellite analysis of perspective heteroploid hybrids and *in vitro* propagated poplar and aspen clones (cultures *in vitro* and *ex vitro*) which were previously subjected to chromosomal analysis (ploidy and mixoploidy level were established). We selected 10 most informative polymorphic loci (PMGC2060, PMGC2571, PMGC2679, WPMS12, WPMS14, WPMS20, PMGC433, PMGC2852, WPMS5, ORPM344) for identification and genotyping of intraspecific (hybrids of white poplar) and interspecific (grey poplar, white poplar × hybrid (white poplar × aspen), necklace poplar × balsam poplar) differences; genetic certification of individual genotypes and clones; assessment of intracloonal genetic homogeneity and identity of propagated *in vitro* clones and the original instances. The possibility of using of microsatellite markers to highlight poplar allotriploids ( $2n=3x=57$ ) was shown.

**Keywords:** poplar, aspen, hybrids, propagated *in vitro* clones, SSR, microsatellites, certification, ploidy, mixoploidy.

Согласно плану мероприятий («дорожной карте») «Развитие биотехнологий и геной инженерии» [1] к 2018 году в России должны появиться «плантации быстрорастущего леса», созданные с применением методов биотехнологии. Плантан-

тационное лесовыращивание, ориентированное на ускоренное производство древесины (повышение ее качества, сокращение сроков выращивания и увеличение выхода с единицы площади для обеспечения сырьем лесоперерабатывающую промышленность), предусматривает более высокий уровень ведения лесного хозяйства с использованием селекционного (генетически улучшенно-

© Машкина О. С., Федулова Т. П., Табацкая Т. М., Кондратьева А. М., Шабанова Е. А., 2016

го, сортового, элитного) посадочного материала, применением высокой агротехники, мелиорации, химизации и др. [2]. Повышение продуктивности и устойчивости плантационных культур (лесных культур целевого назначения) можно обеспечить применением современных технологий, в том числе, методов культуры *in vitro* и молекулярного маркирования [3,4].

Клональное микроразмножение позволяет повысить качество посадочного материала за счет селективного вегетативного размножения только ценных генотипов (форм, гибридов, полиплоидов, сортов), трудно размножаемых традиционными способами, и получить его в массовом количестве. В то же время, для выращивания посадочного материала с заданными целевыми свойствами необходимо использовать эффективные и надежные методы микроклонирования, гарантирующие сохранение хозяйственной и генетической ценности исходных материнских деревьев и относительную генетическую однородность клонированного материала. Известно, что способ клонального микроразмножения может повлиять на уровень генетической изменчивости, а, следовательно, и на качество посадочного материала, характер проявления хозяйственно-ценных признаков у клонов [5-8]. В связи с этим актуальным является разработка надежных методов его генетической оценки (генотипирования) (установления его происхождения, генетической паспортизации, определения внутриклоновой однородности, фитопатологического состояния и др.). На сегодняшний день для этих целей успешно применяют ДНК-маркеры [3,6,9-12] и хромосомный анализ (определение плоидности и уровня миксоплоидии, внутриклоновой цитогенетической стабильности) [5,7,8 и др.].

Использование микросателлитных (SSR) маркеров является одним из наиболее информативных методов, применяемых при исследовании внутри- и межвидовой изменчивости, генотипирования материала, размноженного в культуре *in vitro*. Микросателлиты – это tandemные повторы с коротким мотивом, низким числом повторов и высокой частотой встречаемости в геноме. SSR-маркеры в полной мере отвечают всем требованиям, предъявляемым к ДНК-маркерам. Они характеризуются широким полиморфизмом, распространённостью по всему геному, нейтральностью по отношению к условиям окружающей среды; кодоминантным наследованием; доступностью, невысокой стоимостью; надёжностью и

воспроизводимостью метода. SSR-анализ вошёл в практику генетических исследований с 1994 года и сейчас достаточно широко используется во многих лабораториях мира [11, 13, 14, 15 и др.]. В тоже время информативность метода во многом зависит от тщательности подбора SSR-локусов, выявляющих четко воспроизводимые полиморфные ДНК-фрагменты.

В ФГБУ «ВНИИЛГиСБиотех» разработаны методы клонального микроразмножения хозяйственно-ценных форм, сортов, гибридов и полиплоидов березы, тополя и осины, трудно размножаемых обычным черенкованием. Из полученных микрорастений созданы опытные плантационные культуры указанных пород (возраст которых в настоящее время 15-24 года), а также коллекция ценных и уникальных генотипов для их сохранения (консервации) *in vitro* [16,17]. Коллекция пополняется новыми генотипами и длительно (от года до 24 лет) поддерживается в условиях *in vitro*.

Целью данной работы явилось проведение микросателлитного и хромосомного анализа исходного и клонированного *in vitro* материала тополя и осины для генетической паспортизации перспективных генотипов, определения их уровня плоидности, оценки внутриклоновой однородности микроразмноженных клонов, идентичности регенерантов и материнских деревьев.

## МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектами исследований служили: 1) перспективные для практического использования (быстрорастущие, продуктивные, с хорошим качеством древесины) разноплоидные гибриды тополя белого (*Populus alba* L.), сереющего (*P. canescens* Sm.) и дельтовидный × бальзамический (*P. deltoides* Marsh. × *P. balsamifera* L.) в возрасте 28-30 лет; 2) размноженные *in vitro* клоны тополя белого и сереющего и продуктивной гнилеустойчивой осины (*Populus tremula* L.), произрастающие в Семилукском лесопитомнике Воронежской области (*ex vitro*, возраст 14 и 17 лет) или находящиеся в пробирочной культуре в коллекции длительного (21 год - тополь белый, 7 лет – тополь сереющий) хранения *in vitro*. Перечень образцов, их происхождение и плоидность представлены в табл. 1.

Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев с использованием модифицированного ЦТАБ-метода, позволившего получать из растений тополя и осины образцы ДНК достаточно высокой степени чистоты, дающие ПЦР-продукты хорошего качества [23].

Таблица 1

*Характеристика исследованных образцов тополя и осины*

№ образца	Происхождение	Плоидность	Уровень миксоплоидии, %*
<i>Тополь белый (разноплоидные гибриды и их размноженные in vitro клоны)</i>			
136/82 184/82	Т. белый × т. белый	2n=38	0,0
143/82 65/81	Т. белый × т. белый. Получены О.С. Машкиной [18] с использованием в гибридизации искусственно синтезированной с помощью повышенной температуры диплоидной (2n) пыльцы.	2n=57	13,3 25,0
155/83	Т. белый × гибрид (белый × осина). В гибридизации использовалась 2n пыльца [18].	2n=57	32,1
Клон 155/83 в питомнике ( <i>ex vitro</i> ) Клон 155/83 <i>in vitro</i>	Получены путем клонального микроразмножения через меристемные культуры [16,17].	2n=57	35,4 23,5
<i>Аллоотриплоидный тополь сереющий и его размноженный in vitro клон</i>			
Хоперский 1	Автор сорта - А.И. Сиволапов [19].	2n=57	32,3
Клон А в питомнике ( <i>ex vitro</i> )	Получен через меристемные культуры [16,17].	2n=57	34,4
Приярский клон <i>in vitro</i>	Получен через меристемные культуры [16,17]. Автор сорта - А.И. Сиволапов [19].	2n=38	2,2
<i>Аллоотриплоидные межсекционные гибриды т. дельтовидный х т. бальзамический</i>			
3х-1 3х-2	Получены Е.М. Гуляевой, использовалась 2n пыльца, синтезированная с помощью колхицина [20].	2n=57	34,8 35,0
Эс-38	Получен М.М. Вересинным [21].		21,5
<i>Размноженные in vitro через меристемные культуры [16] клоны осины (произрастают в питомнике - (ex vitro)</i>			
15/01, № 5 то же, № 6 то же, № 8	Исходное дерево (X <sub>4</sub> ) отобрано В.П. Петрухновым в Ботаническом саду ВГУ [22].	2n=57	34,6 36,4 31,1
20/04, № 10 то же, № 11	Исходное дерево (клон №27) из Обоянского лесхоза Курской обл. [22].	2n=38	10,0 11,8
6/3, № 12 то же, № 13 то же, № 14	Исходное дерево (X <sub>6</sub> ) отобрано В.П. Петрухновым в Ботаническом саду ВГУ [22].	2n=38	20,0 25,0 30,0

\* уровень миксоплоидии - суммарное число клеток с отклоняющимся от модалного (триплоидного или диплоидного) набором хромосом.

Протестировано 12 специфических SSR-локусов, перспективных для идентификации сортов и клонов рода *Populus* [24-27] (табл. 2). Оптимизирован режим амплификации для тополя и осины: 3 минуты – предварительная денатурация при 94 °С; затем 35 циклов: 30 секунд – денатурация при 94 °С, 40 секунд – отжиг, 20 секунд – элонгация при 72 °С; 5 минут – завершающая элонгация при 72 °С.

В качестве реакционной ПЦР-смеси использовали готовый набор «GenPak PCR Core» («Isogene», Россия). Детекцию продуктов ПЦР осуществляли при помощи электрофореза в 3 % агарозном геле. Для подтверждения воспроизводимости результатов все

этапы анализа были проведены в трехкратной повторности.

Для подсчета числа хромосом молодые листья из распускающихся вегетативных почек фиксировали в спиртово-уксусной смеси (3:1) с предобработкой 0,002М раствором 8-оксихинолина при температуре 10-14°С в течение 3-х часов. Микропрепараты, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по методике [28]. Для каждого образца просматривали по 5 микропрепаратов, подсчитывали 30-50 метафазных пластинок. Просмотр микропрепаратов осуществлялся на микроскопе Микмед 2 при увеличении 40×1,5×10 и 100×1,5×10. Микрофотосъемку проводили с использованием видеоокуляра DCM500 (USB 2.0; WEBBERS MYscope 500 M).

Характеристика микросателлитных локусов и температура отжига праймеров тестированных микросателлитных локусов тополя и осины

Локус	Последовательность праймеров (5' – 3')	Т отжига праймеров, °С
ORPM127	TCAATGAGGGGTGCCATAAT CTTCCACTTTTGGCCCTTT	60
ORPM344	GGAGATTGTCGGAGAATGGA TGGACGTTACGATAGGAGTGG	55
PMGC2060	CTCTCAAATGCTGATTTACCG TCTTCAGTTGCAGTATTCAAAG	56
PMGC2163	CAATCGAAGGTAAGTTAGTG CGTTGGACATAGATCACACG	56
PMGC2571	TCTCGCAGATTCATGTAACCC GACTGTATGTTGACCATGCCC	56
PMGC2679	GGAATCCGTTTAGGGATCTG CGTCTGGAGAACGTGATTAG	56
PMGC2852	ATAATCTCCCTAGCTTAATTC GAATAACATGGATAATGTGTTG	56
PMGC433	GCAGCATTGTAGAATAATAAAG AAGGGGTCTATTATCCACG	56
WPMS5	TTCTTTTTCAACTGCCTAACTT TGATCCAATAACAGACAGAACA	55
WPMS12	TTTTTCGTATTCTTATCTATCC CACTACTCTGACAAAACCATC	55
WPMS14	CAGCCGCAGCCACTGAGAAATC GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC	60
WPMS20	GTGCGCACATCTATGACTATCG ATCTTGTAATTCTCCGGGCATCT	58

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате полимеразной цепной реакции с 12-ю микросателлитными маркерами 21 образца исходного и клонированного *in vitro* материала тополя и осины получены спектры амплифицированных фрагментов, визуализированных на электрофореграммах, примеры которых представлены на рисунке 1.

По результатам микросателлитного анализа нами отобраны 10 наиболее информативных локусов: ORPM344, PMGC2060, PMGC2571, PMGC433, PMGC2679, PMGC2852, WPMS5, WPMS12, WPMS14 и WPMS20 благодаря их высокой распознавательной способности. У исследованных образцов всего выявлен 401 SSR-фрагмент, из которых 309 ампликонов – полиморфные.

Уровень полиморфизма составляет 77,1 %. Длина полученных ДНК-фрагментов колеблется от 90 до 320 п. н. По всем исследованным образцам среднее число ампликонов на локус – 33,4, максимальное – 45 (локусы WPMS5,

WPMS14), минимальное – 23 (локусы ORPM127, PMGC2163). Среднее число полиморфных ампликонов на локус – 25,8, максимальное – 45 (локусы WPMS5, WPMS14), минимальное – 7 (локус PMGC2060). На основании полученных данных (наличия и отсутствия 34 амплифицированных фрагментов в 10 отобранных локусах) были составлены многолокусные генетические паспорта 21 изученных образцов тополя и осины (табл. 3). Выявлено 8 генотипов тополя (из которых гибриды 3х-1, 3х-2 и эс-38 не проявили между собой различий, что может быть связано с их сходным происхождением), а также 3 генотипа (клона) осины.

Аллоотриплоидные гибриды тополя 3х-1, 3х-2 и эс-38 (Воронежский гигант) можно отличить от остальных исследованных генотипов тополя по уникальному набору аллелей локусов ORPM344, PMGC2679, PMGC2852 и WPMS14. Тополь Хопёрский 1 имеет свойственную только ему (среди исследованных генотипов) комбинацию аллелей локусов WPMS12 и PMGC2679.

Таблица 3

Генетические паспорта образцов осины и тополя, составленные по 10-ти микросателлитным локусам

Образец	Локус (п. н.)																																					
	ORPM344			PMGC433			PMGC2060			PMGC2571			PMGC2679			PMGC2852			WPMS5			WPMS12			WPMS14			WPMS20										
	220	230	240	190	200	210	140	150	105	110	120	90	95	100	110	90	100	110	120	290	300	310	320	140	170	190	220	230	240	250	270	220	230	240				
Тополь белый																																						
136/82	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0
184/82	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
143/82	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
65/81	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0
155/83	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	
155/83 (клон в питомнике)	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	
155/83 (клон <i>in vitro</i> )	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	
Тополь сереющий																																						
Хопёрский 1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0			
А (клон в питомнике)	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0			
Прирскский (клон <i>in vitro</i> )	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	
Аллотриплоидные гибриды т. дельтовидный х т. бальзамический																																						
3х-1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0		
3х-2	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0		
Эс-38	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0		
Осина (клоны в питомнике - <i>ex vitro</i> )																																						
15/01, № 5	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	
то же, № 6	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	
то же, № 8	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	
20/04, № 10	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0		
то же, № 11	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0		
6/3, № 12	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
то же, № 13	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0		
то же, № 14	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0		

Примечание: цветом выделены специфические (уникальные) локусы

Исследованные гибриды тополя белого отличаются от тополя сереющего и гибридов дельтовидного тополя и бальзамического наличием только одного аллеля (140 п. н.) в локусе PMGC2060. При этом среди них выделяется генотип 155/83 (уникальный набор аллелей в локусах PMGC2679 и WPMS14). Генотип тополя 65/81 можно отличить по уникальному аллелю 230 п. н. в локусе ORPM344, а генотип 136/82 – по наличию только одного аллеля 310 п. н. в локусе WPMS5. Генотипы

143/82 и 184/82 возможно отделить от остальных исследованных гибридов тополя только по совокупностям аллелей в локусах PMGC433 и WPMS12, свойственные только каждому из них (табл.3).

Таким образом, исследованные локусы можно применять для идентификации и диагностики как внутривидовых (гибриды тополя белого), так и межвидовых (тополь сереющий, гибрид 155/83, межсекционные гибриды 3х-1, 3х-2 и эс-38 - Воронежский гигант) различий.

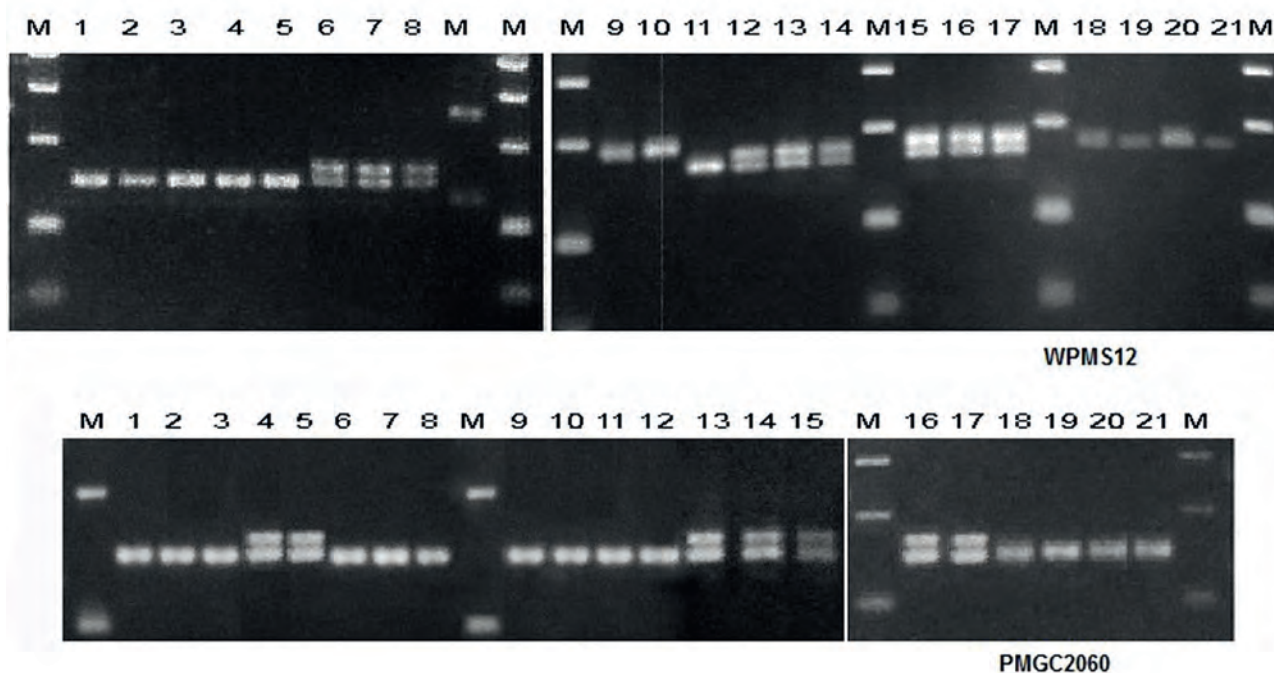


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов ПЦР локусов WPMS12 и PMGC2060: 1–21 – номера образцов осины и тополя, М – маркер молекулярных масс.

Размноженные *in vitro* клоны тополя белого и тополя сереющего не имеют изменений в ДНК спектрах по всем локусам в сравнении с их материнскими деревьями. Это свидетельствует об отсутствии генетических изменений (высокой генетической однородности клонов) в ходе клонального микроразмножения и длительного хранения *in vitro*. При этом генотипы тополя сереющего (Хопёрский 1) и гибрида тополя белого 155/83 между собой имеют различия только по 6-ти из исследованных микросателлитных локусов (PMGC2060, PMGC2571, PMGC2679, PMGC433, WPMS12 и WPMS14). Это может быть связано с тем, что оба генотипа являются межвидовыми гибридами и содержат геномы тополя белого и осины (табл. 3). Тополь сереющий считается спонтанным гибридогенным видом, возникшим от скрещивания тополя белого и осины [19], а гибрид 155/83 получен нами от опыления тополя белого синтезированной с помощью высокой температуры нередуцированной диплоидной пылью гибрида т. белый × осина [18].

По всем SSR-локусам показана высокая внутриклоновая генетическая однородность трех размноженных *in vitro* клонов осины (100 % для каждого клона) (табл.3). Тем не менее, установлены существенные межклоновые различия. Клоны 20/04 отличается аллельным составом локусов PMGC2060, PMGC2571, PMGC2679, PMGC2852,

PMGC433, WPMS5, WPMS14, клон 6/03 – ORPM344, PMGC2571, PMGC433, WPMS12, WPMS14. Клон 15/01 характеризуется уникальным набором аллелей в локусах PMGC2571, PMGC433, WPMS14 и WPMS20.

Внутриклоновая однородность осины подтверждается и на хромосомном уровне. Для всех трех произрастающих *ex vitro* клонов наблюдалась однородность рамет (растений одного клона) по плоидности и уровню миксоплоидии (табл. 1). Клоны являются миксоплоидами, но имеют разный модальный (преобладающий) набор хромосом (триплоид-диплоидного или диплоид-триплоидного типа). Так, в соматической ткани растений клона 15/01 преобладают (в среднем 60,7%) триплоидные клетки ( $2n=57$ ). Остальная часть приходится на долю диплоидных ( $2n=38$  - 34,0%) и анеуплоидных (5,3%) клеток (рис. 2).

Клоны 20/04 и 6/3 являются диплоидами с преобладанием клеток с 38 хромосомами (89,1% для клона 20/04 и 75,0% для клона 6/3). Остальная часть клеток у клона 20/4 приходится на долю анеуплоидных (10,9 %) с гипо- ( $2n=28$ ,  $2n=30$ ) и гипердиплоидным ( $2n=39$ ,  $2n=41$ ,  $2n=44$ ) числом хромосом (рис. 3).

У клона 6/3 выявлено незначительное количество (5%) триплоидных клеток, а среди анеуплоидных (20%) преобладают клетки с гипотриплоидным набором хромосом ( $2n = 48$ ,  $2n = 49$ ,  $2n =$

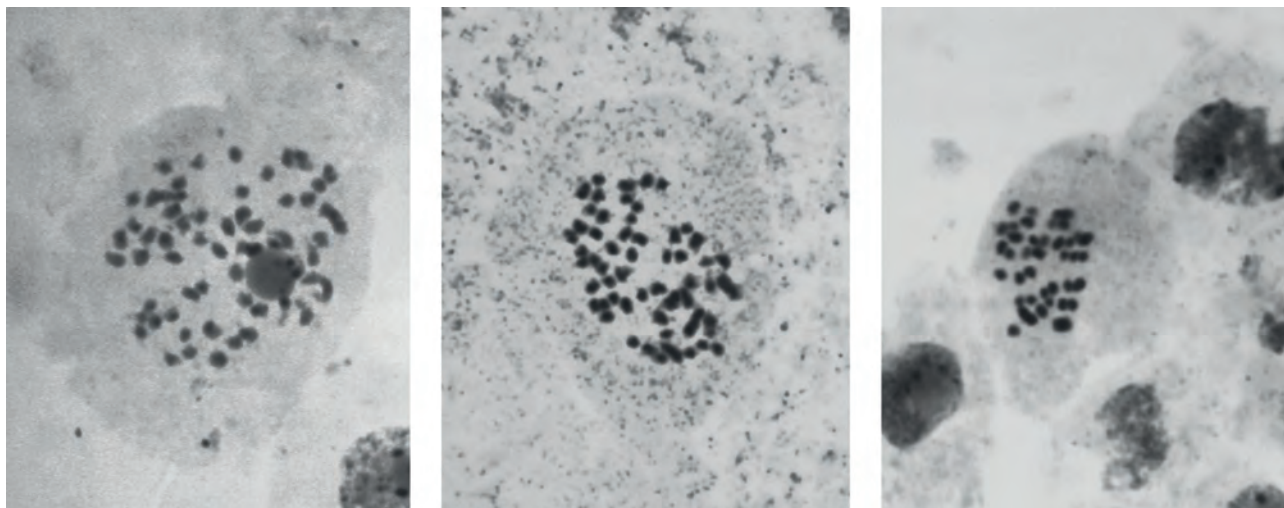


Рис. 2. Метафазные пластинки клеток листовой меристемы триплоидного клона осины 15/01: 1,2 -  $2n = 57$  (модальное), 3 -  $2n = 38$ . Увеличение  $10 \times 100 \times 1,5$

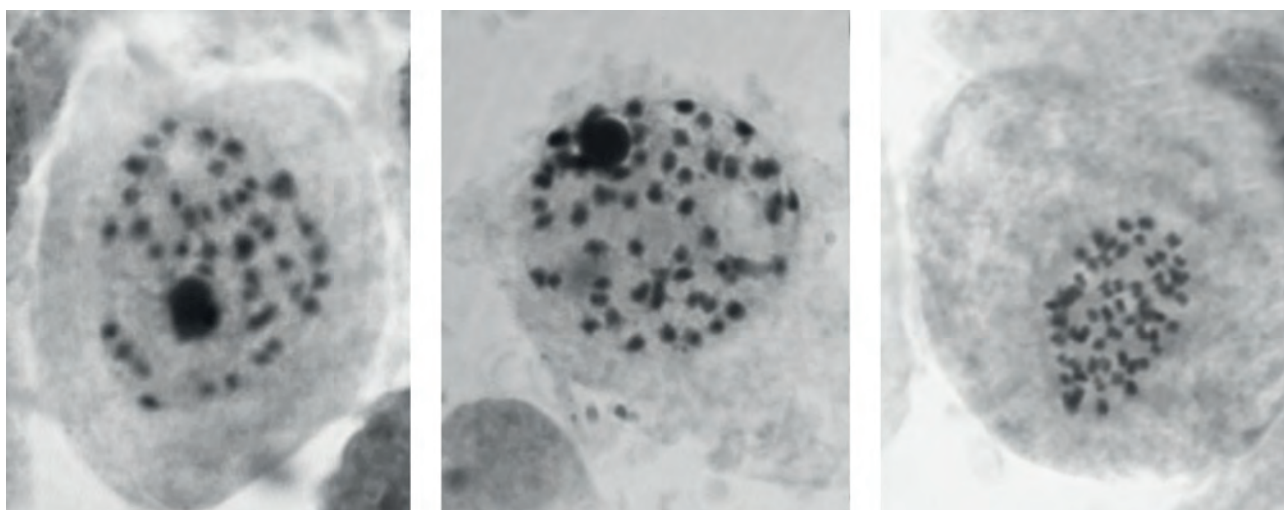


Рис. 3. Метафазные пластинки клеток листовой меристемы диплоидного клона осины 6/3: 1 -  $2n = 38$  (модальное); 2 – анеуплоидная  $2n = 50$ ; 3 -  $2n = 57$ . Увеличение  $10 \times 100 \times 1,5$

50). Это может быть связано с деплоиплоидизацией соматической ткани (переходом на диплоидный уровень) исходного миксоплоидного дерева (содержащего в соматической ткани клетки с диплоидным и триплоидным набором хромосом) в процессе онтогенеза, а также клеточной селекции *in vitro* в ходе клонального микроразмножения.

Подсчет числа хромосом с помощью световой микроскопии – классический метод анализа плоидности. Для оценки плоидности также применяют метод проточной ДНК-цитометрии, который позволяет с высокой точностью измерить количество хромосомной ДНК в ядрах клеток. Однако, нам не известны примеры применения данного подхода для оценки уровня и природы миксоплоидии. Использование SSR-маркеров и фрагментного анализа ДНК позволило авторам

[12] проанализировать плоидность осины и березы, выявить образцы с явно выраженной миксоплоидией. Однако, в работе не приведены данные о природе выявленных миксоплоидов.

Как видно из табл. 1, все проанализированные нами образцы (как исходные деревья, так и их размноженные *in vitro* клоны) являются миксоплоидами, у которых наряду с модальным (триплоидным или диплоидным) набором хромосом в соматической ткани присутствуют в различном соотношении клетки с иным уровнем плоидности (гаплоидные, диплоидные, полиплоидные, анеуплоидные).

Триплоиды ( $2n=3x=57$ ) нередко проявляют соматический гетерозис по устойчивости, росту и качеству древесины. Миксоплоидия – распространенное явление среди листовенных древесных

растений. Практическая ценность миксоплоидов заключается в довольно частом сочетании у них высокой продуктивности с адаптивностью к разным экологическим условиям (в том числе экстремальным). Это важно, в частности, для создания полезащитных полос и использования в озеленительных посадках в промышленных городах, особенно испытывающих антропогенную нагрузку. Однако, уровень миксоплоидии может изменяться в процессе онтогенеза дерева, при выращивании миксоплоидов в различных экологических условиях, а также в процессе их клонального микроразмножения [8, 19], что может повлиять на проявление их хозяйственно-ценных признаков. Поэтому важным является поиск информативных методов не только для выявления перспективных триплоидов и миксоплоидов, но и для оценки их цитогенетической стабильности при разных способах вегетативного размножения, в разных условиях выращивания.

В наших исследованиях микросателлитные локусы не показали различий по плоидности и уровню миксоплоидии (выявленного с помощью прямого подсчета хромосом) у клонов осины, а также внутривидовых гибридов тополя белого.

Вместе с тем, использованные ядерные микросателлиты подтвердили триплоидную природу межсекционных гибридов тополей 3х-1, 3х-2 и эс-38 (Воронежский гигант), предварительно выявленную нами цитогенетическим методом (табл. 1). Об этом свидетельствует наличие у каждого генотипа трёх аллелей (PMGC433 190/200/210), табл.3.

Триплоидная природа была подтверждена с помощью микросателлитных локусов для исходного дерева тополя сереющего Хоперский 1 и его размноженного *in vitro* клона А (PMGC433 190/200/210), а также для гибрида 155/83 (имеющего как и тополь сереющий в своем составе геном т. белого и осины) и его микроразмноженного клона (WPMS14 230/240/250), табл. 3. К примеру, у тополя сереющего Приярского выявлена диплоидная природа как с помощью цитогенетического (табл. 1), так и микросателлитного (WPMS20 230/240) анализа, табл. 3. Это подтверждает возможность использования микросателлитного анализа для диагностики плоидности (диплоидный или триплоидный) у межвидовых гибридов тополя (дельтовидный × бальзамический, белый × осина, тополя сереющего).

Однако, как указывалось выше, все триплоидные клоны имеют миксоплоидную природу, что

было определено только с помощью хромосомного анализа. По-видимому, прямой подсчет числа хромосом в соматической ткани остается наиболее надежным методом для идентификации миксоплоидной природы образцов.

В целом, на наш взгляд, необходимо использовать комплексный подход для оценки плоидности перспективных гибридов и размноженных *in vitro* клонов тополя и осины. На первом этапе применять микросателлитный анализ (как более быстрый, простой, но точный и информативный метод выявления триплоидных межвидовых гибридов), а на втором этапе (при необходимости выявления миксоплоидов и установления их природы: количественного соотношения клеток с разным набором хромосом) - хромосомный анализ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показана возможность ДНК-генотипирования и генетической паспортизации перспективных гибридов тополя и осины и размноженных *in vitro* клонов с использованием микросателлитных (SSR) маркеров. Отобрано 10 наиболее информативных полиморфных локусов (PMGC2060, PMGC2571, PMGS2679, WPMS12, WPMS14, WPMS20, PMGC433, PMGC2852, WPMS5, ORPM344), перспективных для идентификации и диагностики внутривидовых (гибриды тополя белого) и межвидовых (тополь сереющий, т. белый × гибрид (белый × осина), т. дельтовидный × т. бальзамический) различий, генетической паспортизации индивидуальных генотипов и клонов.

Это позволит проводить генетическую инвентаризацию биотехнологической коллекции *in vitro* (предназначенной для хранения ценных генотипов), а также созданных на ее основе опытных плантационных культур, выбраковать ошибочно находящиеся там растения иного генотипа; оценить внутрикловую генетическую однородность и идентичность размноженных *in vitro* клонов (представленных десятками или сотнями рамет) материнским деревьям.

Выявлена возможность использования микросателлитного анализа (локусов PMGC433 и WPMS14) для выделения аллотриплоидов тополя ( $2n=3x=57$ ), имеющих в своем составе геномы тополя белого и осины, тополя дельтовидного и тополя бальзамического.

Для отбора в природе перспективных межвидовых триплоидных гибридов тополя (аллотриплоидов), имеющих миксоплоидную природу, необходимо использовать комплексный подход.



Предварительно отобранные путем лесоводственно-селекционного и микросателлитного анализа хозяйственно-ценные триплоидные гибриды, затем анализируются с помощью хромосомного анализа для выделения среди них миксоплоидов. При клональном микроразмножении миксоплоидов проводится повторная выборочная оценка микроклонов на их внутрикловую генетическую и морфометрическую однородность (отсутствие соматклональной изменчивости). Такая оценка, на наш взгляд, будет гарантией получения качественного посадочного материала с целевыми признаками для создания плантаций быстрорастущего леса.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. План мероприятий («дорожная карта») «Развитие биотехнологий и генной инженерии», 2013. Утвержден распоряжением Правительства РФ №1247-р от 18 июля 2013 г. [http://cdnimg.rg.ru/pril/83/76/16/1247\\_plan.pdf](http://cdnimg.rg.ru/pril/83/76/16/1247_plan.pdf)
2. Русин Н.С. Повышение продуктивности лесов путем создания плантационных культур быстрорастущих пород / Н.С. Русин // Лесохозяйственная информация. — 2008. — № 3–4. — С. 27–28.
3. Жигунов А.В. Применение биотехнологий в лесном хозяйстве России / А.В. Жигунов // Лесной журнал. — 2013. — № 2. — С. 27–35.
4. Шестибратов, К.А. Лесная биотехнология: методы, технологии, перспективы / К.А. Шестибратов, В.Г. Лебедев, А.И. Мирошников // Биотехнология. — 2008. — № 5. — С. 3–22.
5. Hao Yu-Jin. Occurrence of chromosomal variation and plant regeneration from long-term-cultured citrus callus / Yu-Jin Hao, Xiu-Xin Deng // In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant. — 2002. — Vol. 38. — P. 472–476.
6. Rodríguez López C.M. Progressive erosion of genetic and epigenetic variation in callus-derived cocoa (*Theobroma cacao*) plants / C.M. Rodríguez López, M.J. Wilkinson, A.C. Wetten // New Phytologist. — 2010. — Vol. 186, № 4. — P. 856–868.
7. Машкина О.С. Карельская береза (*Betula pendula* Roth var. *carelica* Mercl.) как модель для изучения генетической и эпигенетической изменчивости при формировании узорчатой древесины / О.С. Машкина, А.К. Буторина, Т.М. Табацкая Т.М. // Генетика. — 2011. — Т. 47. № 8. — С. 1073–1080.
8. Проявление соматклональной изменчивости у микроразмноженных и трансгенных растений / Лебедев В.Г. [и др.] // Известия ТСХА. — 2012. — Вып. 1. — С. 153–163.
9. Политов Д.В. Применение молекулярных маркеров в лесном хозяйстве для идентификации, инвентаризации и оценки генетического разнообразия лесных ресурсов / Д.В. Политов // Лесохозяйственная информация. — 2008. — №3-4. — С. 24–27.
10. Популяционно-генетический анализ осины как основа отбора растительного материала с целью плантационного выращивания для целлюлозно-бумажной промышленности / Янбаев Ю.А. [и др.] // Вестник Башкирского государственного аграрного университета. — 2013. — № 2 (26). — С. 128–130.
11. Применение молекулярно-генетических методов в лесном хозяйстве Беларуси / В.Е. Падутов [и др.] // Сибирский лесной журнал. — 2014. — №4. — С. 16–20.
12. Баранов О.Ю. Использование молекулярно-генетических маркеров для анализа плоидности осины и березы / О.Ю. Баранов, В. Балюцкас В. // Проблемы лесоведения и лесоводства. — Гомель : ИЛ НАН Беларуси, 2009. — Вып. 69. — С. 689–696.
13. Microsatellite sequences: a new generation of molecular markers for forest genetics / F. Lefort [et al.] // Forest Genetics. — 1999. — N 6 (1). — P. 15–20.
14. Zienkiewicz E. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification / E. Zienkiewicz, A. Rafalski, B. Labuda // Genomics. — 1994. — N 20. — P. 176–183.
15. Оценка генетического разнообразия популяций карельской березы в Карелии с помощью микросателлитных маркеров / Л.В. Ветчинникова [и др.] // Экологическая генетика. — 2012. — Т. X, № 1. — С. 34–37.
16. Машкина О.С. Опытные плантационные культуры лиственных древесных растений, созданные на основе клонального микроразмножения / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая // Размножение лесных растений в культуре in vitro как основа плантационного лесовыращивания. — Йошкар-Ола: Поволжский государственный технологический университет, 2014. — С. 87–93.
17. Машкина О.С. Рекомендации по сохранению и воспроизводству методами биотехнологии ценных генотипов карельской березы, осины, тополя белого и сереющего / О.С. Машкина, Т.М. Табацкая. — Воронеж : ВГУ, 2005. — 29 с.
18. Машкина О.С. Формирование диплоидной пыльцы у тополя под действием повышен-

ной температуры / О.С. Машкина // Известия АН СССР. — 1992. — №1. — С.66–78.

19. Сиволапов А.И. Тополь сереющий. Генетика, селекция, размножение / А.И. Сиволапов. — Воронеж : ВГУ, 2005. — 157 с.

20. Индуцированные мутации древесных растений и их селекционно-семеноводческое значение / Е.М. Гуляева [и др.] // Селекция, генетика и семеноводство древесных пород как основа создания высокопродуктивных лесов. — М., 1980. — Часть II. — С. 308–310.

21. Вересин М.М. Аллотриплоидный тополь «Воронежский гигант» и его хозяйственное значение / М.М. Вересин, А.П. Царев // Отдаленная гибридизация и полиплоидия в селекции растений. — Воронеж: изд-во ВГУ, 1989. — С. 41–51.

22. Русина Л.М. Перспективные клоны и гибриды осины для создания плантационных насаждений / Л.М. Русина, Н.С. Русин, С.Ю. Горевалова // Достижения и проблемы лесной генетики и селекции. — Воронеж : Истоки, 2010. — С. 225–228.

23. Doyle J.J. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue / J.J. Doyle,

J.L. Doyle // Phytochem Bull. — 1987. — N 19. — P. 11–15.

24. Cole C.T. Allelic and population variation of microsatellite loci in aspen (*Populus tremuloides*) / C.T. Cole // New Phytologist. — 2005. — № 167. — P. 155–164.

25. Application of SSR markers for parentage analysis of *Populus* clones / D.P. Khasa [et al.] // Forest Genetics. — 2003. — № 10 (4). — P. 273–281.

26. Caracterización, mediante microsatélites nucleares, de *Populus × canescens* (Aiton) Sm. en la Cuenca del Duero (Castilla y León) / L. Santos-del-Blanco [et al.] // 5 Congreso Forestal Español. Montes y sociedad: saber qué hacer. — 2009. — P. 2–9.

27. Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.) / J. Schoot [et al.] // Theor. Appl. Genet. — 2000. — № 101. — P. 317–322.

28. Топильская Л.А. Изучение соматических и мейотических хромосом смородины на ацетогематоксилиновых давленных препаратах / Л.А.Топильская, С.А.Лучникова, Н.П.Чувашина // Бюл. науч. информ. Центр. генет. лаб. им. И.В.Мичурина, 1975. — Вып. 22. — С. 58-61.

*Воронежский государственный университет*

*Voronezh State University*

*Машкина О. С., к. б. н., доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии*  
*E-mail: olga\_mashkina@yahoo.com*  
*Тел.: (473) 220-88-76*

*Mashkina O. S., Ph. D (Biology), Associate Professor, Dept. of genetics, cytology and bioengineering*  
*E-mail: olga\_mashkina@yahoo.com*  
*Ph.: (473) 253-94-36*

*Шабанова Е. А., аспирант кафедры генетики, цитологии и биоинженерии*  
*E-mail: katy-green2009@yandex.ru*

*Shabanova E. A., Post-graduate student, Dept. of genetics, cytology and bioengineering*  
*E-mail: katy-green2009@yandex.ru*

*ВНИИ лесной генетики, селекции и биотехнологии*

*All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology*

*Федулова Т. П., д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии*  
*E-mail: labmolgen@mail.ru*  
*Тел.: (473) 253-94-36*

*Fedulova T. P., Sc.D., Leading Researcher of the Biotechnology Laboratory*  
*E-mail: labmolgen@mail.ru*  
*Ph.: (473) 253-94-36*

*Табацкая Т. М., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии*  
*E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru*

*Tabatskaya T. M., Senior Researcher of the Biotechnology Laboratory*  
*E-mail: ilgis@lesgen.vrn.ru*

*Кондратьева А. М., к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии, молекулярной генетики и физиологии*  
*E-mail: kondratyeva\_anya@mail.ru*

*Kondratyeva A. M., Ph. D, Senior Researcher of the Biochemistry, Molecular Genetics and Physiology Laboratory*  
*E-mail: kondratyeva\_anya@mail.ru*