

ХРОМОСОМНЫЙ И МИКРОСАТЕЛЛИТНЫЙ АНАЛИЗ РЕГЕНЕРАНТОВ ТОПОЛЯ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЫЛЬНИКОВ *IN VITRO*

Т. М. Табацкая¹, О. С. Машкина^{1,2}, Е. А. Шабанова¹, Т. А. Гродецкая¹,
А. М. Кондратьева¹, Т. П. Федулова¹

¹ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

²ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 10.04.2021 г.

Аннотация. Культура изолированных пыльников *in vitro* – один из перспективных подходов современной биотехнологии для создания гаплоидов и дигаплоидов (удвоенных гаплоидов, гомозиготных диплоидов), которые являются аналогами «чистых» (инбредных) линий и имеют большое значение в селекции на гетерозис, особенно у многолетних лесных древесных растений с длительным репродуктивным циклом. Проблема заключается и в высокой гетерозиготности древесных растений, а также в проявлении у них значительной инбридинговой депрессии при получении «чистых» линий традиционным способом. Гомозиготные диплоиды представляют ценность для генетических и геномных исследований, значительно облегчают клеточную и мутационную селекцию *in vitro*.

В настоящей работе представлены результаты хромосомного и микросателлитного анализа пыльничкового каллуса и полученных в нем растений-регенерантов тополя (*Populus balsamifera* L., *P. deltoids* Marsh.) с целью выяснения их возможной природы.

Пыльники на стадии одноядерной пыльцы инкубировали для образования каллуса на среде Мура-сиге и Скуга (МС) с добавлением 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2-3 мг/л), β-индолилуксусной кислоты (0.5-1 мг/л) и 6-бензиламинопурина (БАП, 0.5 мг/л). В качестве индуктора морфогенеза использовали БАП в концентрации 0.5 мг/л, а для укоренения адвентивных побегов – среду 1/2 МС без гормонов. Выявлено, что значительную часть первичного каллуса составляли гаплоидные (n=19) и гипергаплоидные (с 20-28 хромосомами) клетки (до 90%), что подтверждает его гаметиическое происхождение. Показано, что в процессе пассирования каллуса и регенерации растений происходит постепенное спонтанное удвоение числа хромосом, что приводит к увеличению содержания диплоидных клеток (2n=38). Из 48 вегетирующих в почве однолетних регенерантов тополя бальзамического 14 растений (29%) были полностью диплоидные (2n=38). Среди них могут быть дигаплоиды. Остальные растения имели миксоплоидную природу с модальным (70-97%) диплоидным набором хромосом. Представлены результаты микросателлитного анализа 35-летних деревьев тополя по девяти SSR-локусам. Проанализировано 6 генотипов, из которых для пяти установлено наличие двух аллелей. Один образец характеризовался присутствием одного аллеля по исследованному локусу, что, по-видимому, свидетельствует о его гомозиготности. По результатам ПЦР-амплификации составлены молекулярно-генетические паспорта исследованных деревьев, позволившие провести их идентификацию.

Ключевые слова: тополь, пыльники, каллус, регенеранты, число хромосом, микросателлиты

Андрогенез (или андроклиния) – процесс возникновения растений в культуре пыльников *in vitro* из микроспоры или пыльцевого зерна через гаметиический эмбриогенез (прямой андрогенез), либо через каллусогенез. В ходе андрогенеза *in vitro* происходит переключение программы развития гаплоидных клеток пыльника (микроспор) с нормального гаметофитного пути на спорофит-

ный [1]. Это один из перспективных и востребованных подходов современной биотехнологии, имеющий значение для фундаментальных и прикладных исследований [1-3].

На основе культуры изолированных пыльников возможно ускоренное получение гаплоидов, а при удвоении у них числа хромосом – дигаплоидов (удвоенных гаплоидов, гомозиготных диплоидов), которые являются аналогами «чистых» (инбредных) линий и имеют большое значение в селекции на

© Табацкая Т. М., Машкина О. С., Шабанова Е. А., Гродецкая Т. А., Кондратьева А. М., Федулова Т. П., 2021

гетерозис, особенно у многолетних лесных древесных растений с длительным репродуктивным циклом (для «преодоления времени в лесоводстве»). По мнению Исакова и др. [4] на получение чистых линий традиционными методами (самоопылением или близкородственным скрещиванием в течение нескольких поколений) потребовалось бы как минимум 100 лет. Проблема заключается и в высокой гетерозиготности древесных растений, а также в проявлении у них значительной инбридинговой депрессии [3, 5]. На примере сельскохозяйственных растений показано, что применение технологии андрогенеза *in vitro* дает возможность одноступенчатого создания гомозиготных диплоидов из гетерозиготных растений, что существенно сокращает время (на 7-8 половых генераций) и затраты на создание новых сортов [1, 2, 6]. Причем создание дигаплоидных линий особенно важно для самонесовместимых видов, к которым относится большинство представителей древесных.

Использование дигаплоидов значительно облегчает клеточную и мутационную селекцию *in vitro*, поскольку все гены (доминантные и рецессивные) сразу проявляются фенотипически. Практическая значимость метода культуры пыльников *in vitro* связана и с возможностью выявления генетического разнообразия растений за счет наиболее полной реализации в условиях *in vitro* рекомбинационной и гаметоклональной изменчивости (генной, хромосомной, геномной) генеративных клеток (микроспор, пыльцы) и их каллусных культур [7].

Первые гаплоидные растения тополя были получены в Китае в 70-е годы XX века в культуре пыльников путем органогенеза из пыльцевого

каллуса [8]. В эти же годы подобные исследования на тополе (удобном модельном объекте для генетических и прикладных исследований) впервые были начаты нами в России [9, 10]. Полученные в культуре изолированных пыльников растения-регенеранты были высажены в Семилукский лесопитомник (Воронежская обл.). Их возраст в настоящее время – 35 лет (рис. 1).

Растения-регенеранты в культуре пыльников могут образоваться как из гаметофитной (гаплоидные микроспоры, пыльцевые зерна), так и спорофитной (диплоидные клетки пыльника) ткани. Поэтому для подтверждения гаметного происхождения растений-регенерантов и их отбора целесообразно уже с начальных этапов культивирования проводить их цитогенетическую и молекулярно-генетическую оценку.

Целью настоящих исследований является хромосомный и микросателлитный анализ растений-регенерантов тополя, полученных в культуре изолированных пыльников, с целью выявления их возможной природы.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служили каллусная ткань и растения-регенеранты, полученные в культуре пыльников тополя бальзамического (*Populus balsamifera* L., 2 дерева) и тополя дельтовидного (*P. deltoids* Marsh., 1 дерево) (рис. 1).

Ветви с мужскими генеративными почками срезали с дерева (на стадии тетрад и образования молодой одноядерной пыльцы), ставили в банки с водой и подвергали холодной обработке ($4\pm 1^\circ\text{C}$) в течение 3 суток.

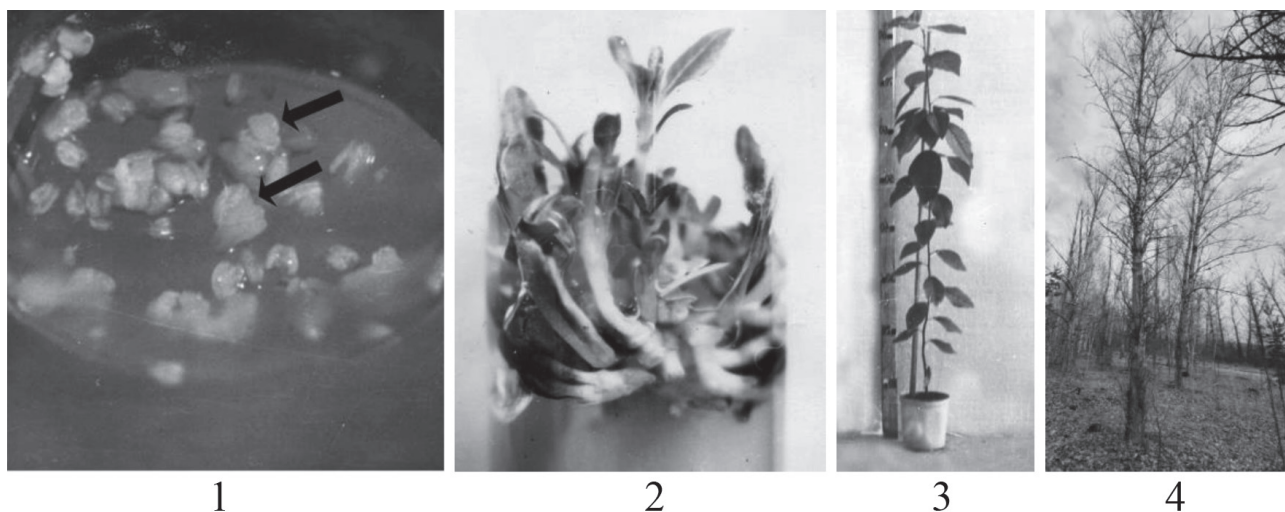


Рис. 1. Объекты для хромосомного и микросателлитного анализа, где 1 – культура пыльников с первичным каллусом (показан стрелками), 2 – адвентивные почки и побеги в пыльниковых каллусных культурах, 3-4 – растения-регенеранты тополя в возрасте одного года (3) и 35 лет (4)

Пыльники изолировали на стадии одноядерной пыльцы, стерилизовали в 2% растворе хлорамина (8-10 мин), трижды промывали стерильной водой и помещали на агаровую питательную среду Мурасиге и Скуга (МС) [11]. Для индукции каллуса в среду добавляли 2,4-дихлорфеноксиуксусную кислоту (2,4-Д, 2-3 мг/л) в сочетании с β -индолилуксусной кислотой (ИУК, 0.5-1 мг/л) и 6-бензиламинопурином (БАП, 0.5 мг/л). До образования каллуса пыльники инкубировали в темноте при температуре 26°C. Для индукции морфогенеза использовали каллус, образовавшийся на месте растрескивания пыльников (т.е. возникший непосредственно из молодых пыльцевых зерен), величиной не менее 0.3 см³. В качестве индуктора морфогенеза использовали БАП в концентрации 0.5 мг/л. Условия культивирования – температура 25±2°C, фотопериод 16 ч день / 8 ч ночь, освещенность 2.0 клк. Укоренение индуцированных побегов проводили на среде МС с половинным содержанием макроэлементов (1/2 МС) без гормонов [10]. Во всех случаях в питательную среду (МС или 1/2 МС) добавляли 0.7% агар, 2% сахарозу, 5 мг/л глицин, 10 мг/л глутамин, 100 мг/л мезо-инозит, 2 мг/л тиамин, 0.5 мг/л аскорбиновой кислоты, 0.5 мг/л никотиновой кислоты и 0.5 мг/л пиридоксина при pH 5.7. В каждом опыте использовали не менее 30 культур в 2-3 повторностях.

Хромосомный анализ (определение ploидности) проводили в динамике: сначала в клетках каллуса 0-го (первичного) и 1-го пассажей (пересадочного), в образовавшихся в каллусе морфоструктурах (адвентивных почках). Затем – в корневой меристеме 3-месячных и однолетних растений-регенерантов тополя бальзамического пыльничкового происхождения, высаженных в почвенный субстрат (*ex vitro*). Материал (каллусную ткань, кончики корешков, молодые листья из распускающихся почек) фиксировали в уксусном спирте (3:1) с предобработкой 0.002-молярным раствором 8-оксихинолина при температуре 10-14°C в течение 3 часов. Давленные препараты, окрашенные ацетогематоксилином, изготавливали по методике [12].

Просмотр микропрепаратов осуществляли на микроскопе МБИ-6 при увеличении 40×1.5×10 и 60×12.5. Микрофотосъемку проводили с использованием пленки Микрат-300. В каждом образце анализировали не менее 30-40 метафазных пластинок. Критерием для отнесения растения к тому или иному уровню ploидности являлось преобладание (свыше 60%) клеток с определенным числом хромосом.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета статистических программ «Stadia». Сравнение выборок осуществляли с использованием *t* – критерия Стьюдента.

Микросателлитный анализ проводили у 35-летних деревьев тополя, полученных в культуре изолированных пыльников. Экстракцию ДНК осуществляли из молодых листьев СТАВ-методом [13]. Исследование генетической структуры образцов проводили по девяти микросателлитным локусам (ORPM: 30 и 344; PMGC: 2060, 2163, 2571, 2679, 2852; WPMS: 5, 14) [14, 15]. Реакцию амплификации образцов ДНК исследуемых объектов осуществляли на приборе «С1000» (Bio-Rad, США) по протоколам, подобранным для каждой группы праймеров. Разделение амплификатов производилось в электрофорезной горизонтальной камере «Power Pac TM Universal» (Bio-Rad, США) в однократном ТАЕ буфере. Детекцию продуктов ПЦР осуществляли методом электрофореза в трёхпроцентном агарозном геле с использованием интеркалирующего красителя Sybr Green I (Lumiprobe, США) на трансиллюминаторе TFP (Vilber Lourmat, Франция). Определение длин амплифицированных фрагментов выполнялось по сравнению с ДНК-маркерами 100 bp Ladder DNA marker (100-3000 bp) (Axugen, США)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Предварительно проведенное нами изучение мейоза при микроспорогенезе у всех трех деревьев тополя бальзамического и дельтовидного показало, что этот процесс у них протекает в основном правильно. Отклонения от нормы незначительны и составили 2.2-8.7% [16]. Мейоз заканчивается формированием тетрад микроспор, а затем одноядерных гаплоидных пыльцевых зерен с 19 хромосомами (рис. 2). Это свидетельствует о цитогенетической однородности материала, используемого нами в экспериментах по культивированию пыльников.

Цитологический контроль пыльников перед введением в культуру *in vitro* показал преобладание в них одноядерных пыльцевых зерен (более 80%, остальные 20% – двуядерные), большая часть из которых характеризовалась достаточно высокой степенью вакуолизации цитоплазмы (рис. 2).

Многочисленными исследованиями показано, что успех получения гаплоидов зависит от стадии развития микроспор (пыльцевых зерен) в мо-

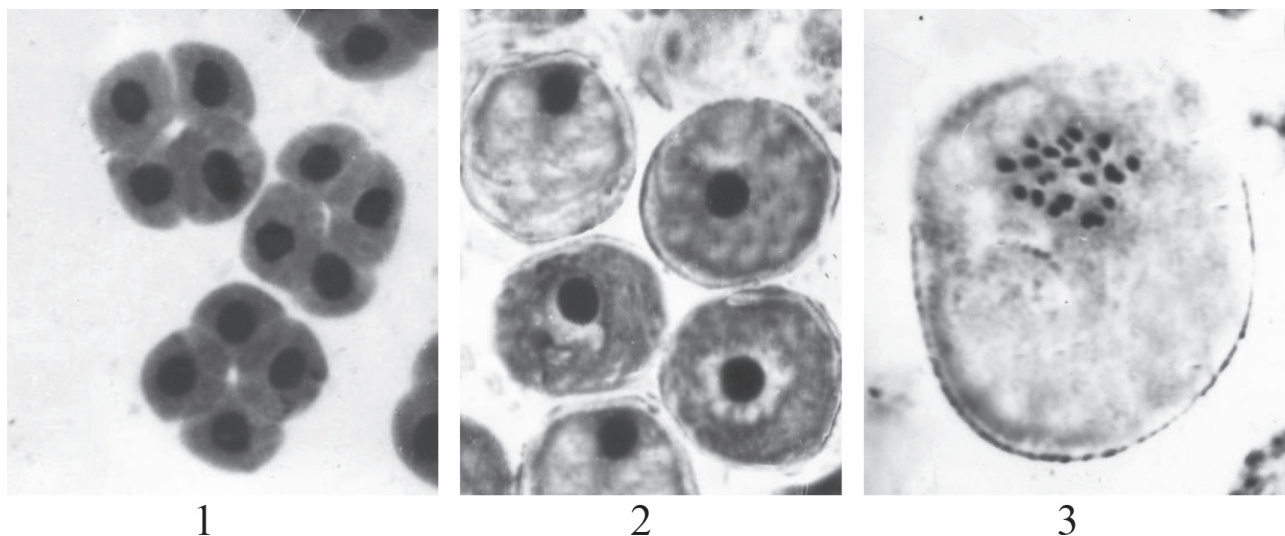


Рис. 2. Цитогенетические критерии, подтверждающие правильность микроспорогенеза и гаплоидную природу образовавшейся пыльцы у исходных деревьев тополя, где 1 – тетрады гаплоидных микроспор, 2 – одноядерные пыльцевые зерна, 3 – гаплоидное пыльцевое зерно (n=19) [16]. Увел.: 1,2 – об. 40, ок. 12.5; 3 – об. 60, ок. 12.5.

мент введения в культуру *in vitro*. Для большинства видов растений наибольшей способностью к андроклиной гаплоидии обладали сильновакуолизированные микроспоры [17], одноядерные микроспоры [18, 19]. Есть мнение [20], что оптимальным для индукции андрогенеза *in vitro* является диапазон начиная с фазы G1 микроспоры до фазы G1 двухклеточного пыльцевого зерна, который в свою очередь зависит от вида и генотипа донорного растения [6, 20]. Эффективным триггером для переключения развития микроспор с гаметофитного на спорофитный путь является холодное стрессовое воздействие [1, 6], что подтверждают и наши исследования.

Для установления происхождения пыльничкового каллуса (из мужского гаметофита или соматических клеток пыльника) определение пloidности мы начали проводить на ранних этапах его формирования (табл. 1, рис. 3). Выявлено, что значительную часть первичного каллуса (нулевой пассив) и пересадочного (первый пассив)

составляли гаплоидные (n=19) и гипергаплоидные (с 20-28 хромосомами) клетки – 90% и 67.8% соответственно. Этот факт подтверждает его происхождение непосредственно из гаплоидных пыльцевых зерен. Присутствие в каллусе незначительного количества диплоидных клеток с 38 хромосомами (10-23%) может быть связано со спонтанным удвоением числа хромосом гаплоидных клеток по мере пассирования каллусной ткани. Известно, что спонтанная диплоидизация является довольно частым событием при культивировании гаплоидов *in vitro* [21, 22]. В этом случае образовавшиеся диплоидные клетки можно считать гомозиготными (дигаплоидными). Нельзя исключать образование диплоидных каллусных клеток из соматических клеток стенок пыльников. Однако, преобладание в пыльничковом каллусе гаплоидных и гипергаплоидных клеток дает основание полагать, что образовавшийся каллус имеет пыльцевое (гаметическое) происхождение.

Таблица 1

Число хромосом в клетках пыльничкового каллуса, образовавшихся в нем морфоструктур и растениях-регенерантах тополя бальзамического

Объект исследования	Доля клеток с числом хромосом, %		
	n=19, 19 + (1-9)	2n=38	38 ± (1-9)
Каллус:			
0-го пассажа	90.0 ± 2.7	10.0 ± 1.7	0.0 ± 0.0
1-го пассажа	67.8 ± 5.2	23.3 ± 4.6	8.9 ± 1.8
Адвентивные почки (каллус)	53.4 ± 5.7	27.9 ± 4.8	18.7 ± 4.2
Растения-регенеранты (3 мес) n=24	7.5 ± 1.9*	68.6 ± 2.1***	23.9 ± 2.4***
Растения-регенеранты (1 год) n=48	2.6 ± 0.7	88.1 ± 1.8	9.3 ± 1.6

Примечание. Различия между 3-х месячными и однолетними растениями-регенерантами по доле клеток с соответствующим числом хромосом достоверны при *P<0.05, ***P<0.001; n – число исследованных растений

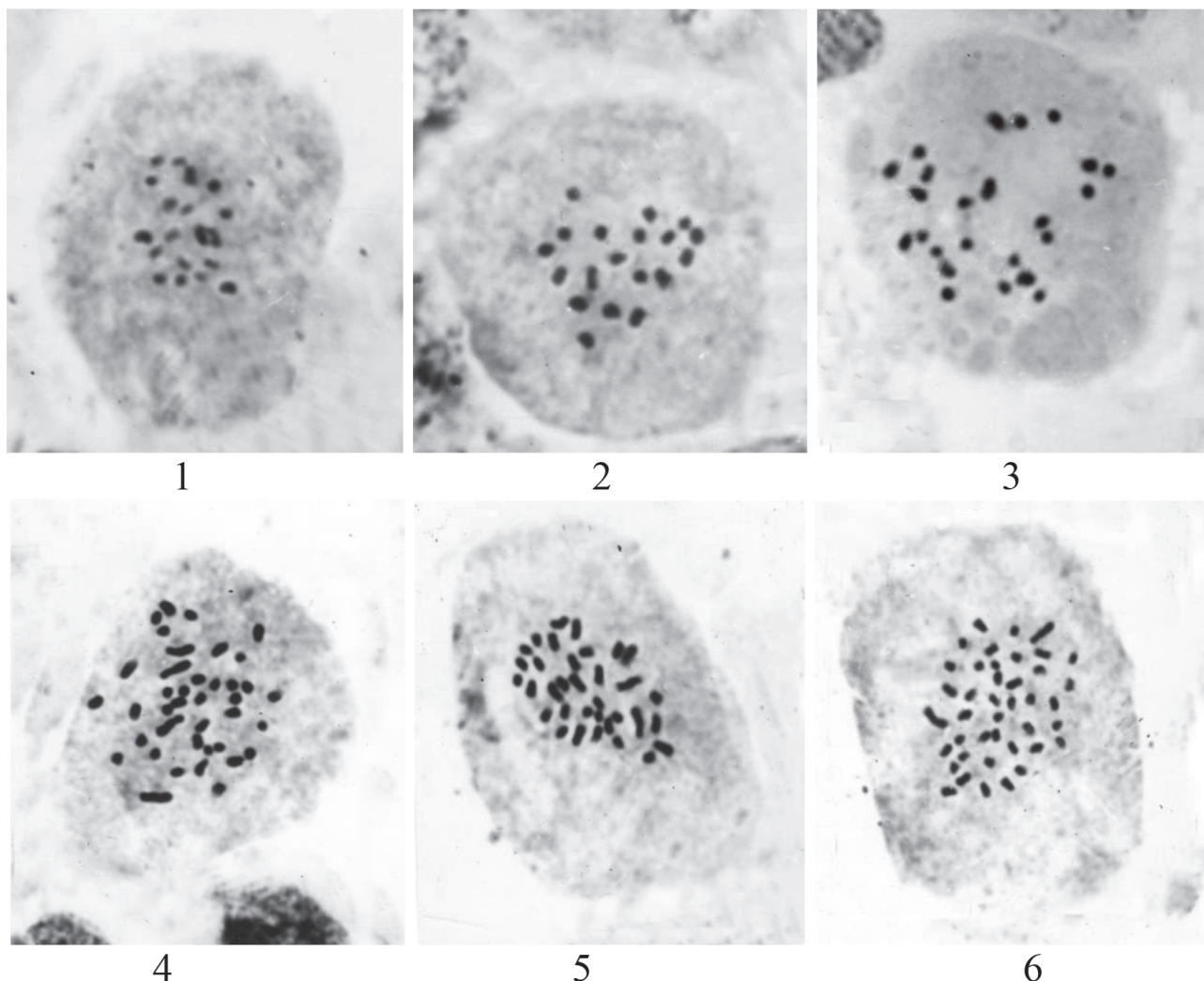


Рис. 3. Метафазные пластинки с различным числом хромосом, встречающиеся в пыльниковом каллусе, индуцированных адвентивных почках и растениях-регенерантах тополя бальзамического, где 1-2 – $n=19$, 3 – 24 (19+5), 4 – $2n=38$, 5 – 34 (38-4), 6 – 42 (38+4). Увел.: об. 60, ок. 12.5.

В каллусных культурах начальных пассажей (0 и 1), подвергнутых одно- или двукратному морфогенному воздействию, были индуцированы адвентивные почки и побеги, среди которых, согласно хромосомному анализу, свыше 50% клеток приходилось на долю гаплоидных и гипергаплоидных клеток (табл. 1, рис. 3).

У вегетирующих в почве (*ex vitro*) 3-х месячных и 1-летних растений-регенерантов пыльничкового происхождения отмечено постепенное снижение содержания гаплоидных (и гипергаплоидных) клеток и увеличение – диплоидных (до 88%). Это может быть связано с продолжающимся у регенерантов процессом спонтанной диплоидизации гаплоидных клеток. Полученные нами данные согласуются с литературными. Так, в работе китайских ученых [22] сообщается об изменении в процессе онтогенеза соотношения гаплоидных и диплоидных клеток у первоначально

гаплоидных растений тополя (*Populus simonii*, *P. nigra* и *P. berolinensis* Dippel) пыльничкового происхождения, которые к возрасту 7-8 лет становились полностью диплоидными. В условиях нашего эксперимента, из 48 проанализированных однолетних регенерантов тополя пыльничкового происхождения – 14 растений (29%) были диплоидными ($2n=38$).

Таким образом, проведенные нами цитогенетические исследования выявили, что среди полученных регенерантов тополя пыльничкового происхождения могут быть дигаплоиды.

Остальные однолетние растения имели миксоплоидную природу и характеризовались различным сочетанием и соотношением гаплоидных (0-2.5%), диплоидных (70-97%) и анеуплоидных (2.5-29%) клеток. Следует отметить, что миксоплоидия (одновременное присутствие в ткани клеток разного уровня ploidy) – довольно

распространенное явление у растений (в том числе у тополя). Она отмечена нами на всех этапах культивирования *in vitro*, у регенерантов разного возраста.

Причиной образования анеуплоидных клеток с гипергаплоидным (20-28 хромосом), гиподиплоидным (29-37 хромосом) и гипердиплоидным (40-47 хромосом) числом хромосом, по-видимому, являются нарушения митоза в ходе деления клеток каллуса. Известно, что характерная особенность каллусной ткани – ее генетическая гетерогенность: появление в процессе пассирования анеуплоидных и полиплоидных клеток, хромосомных aberrаций и генных мутаций [23]. Это является недостатком при получении удвоенных гаплоидов *in vitro* через каллусные культуры. В результате гамето- и соматоклональной изменчивости часть сформировавшихся диплоидных регенерантов далеко не всегда будет иметь гомозиготную природу. По-видимому, для увеличения выхода гаплоидов и гомозиготных диплоидов их индукцию следует проводить путем гаметиического эмбриогенеза (прямого андрогенеза). Так, в опытах с *Populus maximowiczii* посредством эмбриогенеза через культуру пыльников получено 34 растений, из которых 22 (более 60%) были гаплоидными [24]. В другой работе [25] сообщается о регенерации растений посредством эмбриогенеза у двух гибридов *Populus nigra* L. Анализ микросателлитных маркеров показал гаплоидную природу большинства регенерантов. Однако, в обоих случаях не сообщается о судьбе гаплоидных растений после высадки их в почву и были ли на их основе получены гомозиготные диплоиды.

С другой стороны, генетическое разнообразие каллусных клеток открывает возможности для клеточной селекции растений (на устойчивость к неблагоприятным факторам среды, получение разноплоидных клонов и др.). Так, среди регене-

рировавших из пыльничкового каллуса двухмесячных растений тополя (*Populus × beijingensis*) были выявлены гаплоиды (10,3%), диплоиды (88,7%) и триплоиды (1%) [3], а среди укорененных регенерантов *P. nigra* и *P. deltoides* – гаплоидные (3,8%), диплоидные (86%), тетраплоидные (2%) и анеуплоидные (8,2%) растения [26].

Для выявления генетической структуры 35-летних регенерантов тополя пыльничкового происхождения, нами был проведен микросателлитный анализ шести деревьев. Известно, что точность оценок при помощи кодоминантных маркеров (какими являются SSR-маркеры) выше, так как их гетерозиготное состояние отличается от гомозиготного, в отличие от доминантных маркеров [27].

По результатам ПЦР-анализа с девятью SSR-локусами установлено наличие полиморфизма среди изученных образцов. Все шесть деревьев являются разными генотипами. У исследованных образцов выявлен 61 SSR-фрагмент, из которых 43 ампликона – полиморфные. Уровень полиморфизма составляет 70,5%. Размер полученных ДНК-фрагментов варьируется от 90 до 310 пар нуклеотидов. На основании анализа полученных спектров ДНК-ампликонов были составлены генетические паспорта (табл. 2).

Генотип дерева №4 имеет уникальный набор аллелей в локусах ORPM 30, ORPM 344 и PMGC 2571, генотипы деревьев №5 и №84 – в локусах ORPM 344 и PMGC 2571, а дерево №80 – в локусах PMGC 2163, ORPM 30 и WPMS 14. Образцы деревьев №1 и №90 можно идентифицировать среди остальных исследованных генотипов только по комбинации аллелей в локусах WPMS 5, ORPM 344, PMGC 2571 и PMGC 2852. Наибольшим числом выявленных аллелей отличается локус ORPM30 (молекулярная масса 165, 190 и 220 п. н.), в то же время, по локусу PMGC2060 (аллель

Таблица 2

Генетические паспорта образцов 35-летних деревьев тополя, полученных в культуре изолированных пыльников

№ дерева	Лocus (п. н.)																	
	WPMS 5		PMGC 2163		ORPM 30			PMGC 2060	WPMS 14		PMGC 2679		ORPM 344		PMGC 2571		PMGC 2852	
	300	310	200	240	165	190	220	140	200	240	90	110	220	240	100	110	90	110
1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1
4	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1
5	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
80	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1
84	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
90	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0

с молекулярной массой 140 п. н.) не установлено различий между исследованными образцами.

Установлено наличие двух аллелей в локусе ORPM30 у деревьев №1, №5, №84, №90 (молекулярная масса 190 и 220 п. н.) и №80 (165 и 190 п. н.). Двумя аллельными состояниями характеризуется локус WPMS5 у деревьев №1 и №5 (300 и 310 п. н.). Это обусловлено высокой полиморфностью данных локусов и может свидетельствовать о гетерозиготности этих генотипов. У дерева №4 во всех девяти проанализированных SSR-локусах отмечено по одному аллелю, что, вероятно, свидетельствует о его гомозиготности (рис. 4). Наши результаты согласуются с выводами краснодарских ученых, отмечающих, что микросателлитные маркеры можно использовать для контроля гаметного происхождения регенерантов капусты белокочанной в культуре пыльников [28, 29].

Для более точного подтверждения гомозиготности данного генотипа в дальнейшем мы планируем расширение спектра исследуемых SSR-локусов и проведение фрагментного анализа на секвенаторе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе хромосомного и микросателлитного анализа регенерантов тополя бальзамического и дельтовидного, полученных в культуре пыльников через каллусогенез, показано, что среди них могут быть дигаплоиды. Выявлено, что значительную часть первичного пыльниковоего каллуса составляли гаплоидные ($n=19$) и гипергаплоидные клетки (до 90%), что подтверждает его гаметическое происхождение. В процессе пассирования каллуса и регенерации растений происходит постепенная спонтанная диплоидизация гаплоидной ткани. Микросателлитный анализ 35-летних деревьев тополя выявил у пяти (из шести изученных) наличие двух аллелей, что свидетельствует о возможной их гетерозиготности. Один генотип предположительно является гомозиготным. Гомозиготные диплоиды (удвоенные гаплоиды) тополя представляют значительный интерес в селекции на гетерозис, для точной и мутационной селекции *in vitro*.

Работа выполнена в рамках темы государственного задания № АААА-А20-120012890092-6 Федерального агентства лесного хозяйства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Круглова Н.Н., Сельдимирова О.А., Зина-туллина А.Е. // Научный результат. Физиология. 2017. Т. 3. № 1. С. 3-7.

2. Germana M.A. // Plant Cell Rep. 2011. Vol. 30. P. 839-857.

3. Li Y., Li H., Chen Z., Ji L., Ye M., Wang J., Wang L., An X. // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2013. Vol. 114. P. 39-48.

4. Исаков Ю.Н., Буторина А.К., Мурая Л.С. // Генетика. 1981. Т. XVII. № 4. С. 701-707.

5. Manual A. Doubled Haploid Production in Crop Plants. Springer, Dordrecht. 2003. 367 p.

6. Дьячук Т.И., Хомякова О.В., Акинина В.Н., Кибкало И.А. // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2019. Т. 23. № 1. С. 86-94.

7. Илюшко М.В., Ромашова М.В. // Российская сельскохозяйственная наука. 2019. № 2. С. 11-14.

8. Wang C, Chu Z, Sun C. // Acta Bot. Sin. 1975. Vol. 17. P. 56-62.

9. Бутова Г.П., Табацкая Т.М. // Физиология растений. 1981. Т. 28. № 1. С. 215-217.

10. Бутова Г.П., Табацкая Т.М. // Проблемы устойчивости садовых растений в Сибири. Новосибирск : СО ВАСХНИЛ. 1982. С. 30-34.

11. Murashige T., Skoog F. // Phisiol Plant. 1962. Vol. 15(13). P. 473-497.

12. Топильская Л.А., Лучникова С.А., Чувашина Н.П. // Бюл. науч. информ. Центр. генет. лаб. им. И.В. Мичурина. 1975. № 22. С. 58-61.

13. Doyle J. J., Doyle J. L. // Phytochem Bull. 1987. N 19. P. 11-15.

14. Smulders M. J. M., Van Der Schoot J., Arens P., Vosman B. // Molecular Ecology Notes. 2001. N 1. P. 188-190.

15. Машкина О.С., Федулова Т.П., Табацкая Т.М., Кондратьева А.М., Шабанова Е.А. // Вестник ВГУ: Химия. Биология. Фармация. 2016. № 2. С. 60-69.

16. Машкина О.С. // Известия РАН. Серия биологическая. 1992. №1. С. 66-78.

17. Круглова Н.Н. // Экобиотех. 2019. Т. 2. № 2. С. 100-115.

18. Telmer C.A., Simmonds D.H., Newcomb W. // Phisiol. Plant. 1992. Vol. 84. P. 417-424.

19. Babbar S.B., Kumari N., Mishra J.K. // In: Shrivastava P.S., Narula A., Shrivastava Sh. (Eds.). Plant Biotechnology and Molecular Markers. New Dehli, India: Anamya Publishers. 2004. P. 1-17.

20. Touraev A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E. // Planta. 1996. Vol. 200. P. 144-152.

21. Sunderland N., Dunwell J.M. // Plant Tissue and Cell Culture (Ed. Street, H.E.) Blackwell, Oxford. 1977. P. 223-265

22. Lu, Z., Liu Y., Zhang P. // Scientia Silvae Sini-cae. 1985. Vol. 21(3). P. 227-233.

23. Кунах В.А. // Молекулярная и прикладная генетика. 2011. № 12. С. 7-14.

24. Stoehr M.U., Zsuffa L. // Plant Cell Tiss. Org. Cult. 1990. Vol. 23. P. 49-58.

25. Deutsch F., Kumlehn J., Ziegenhagen B., Fladung M. // Physiol. Plant. 2004. Vol. 120(4). P. 613-622.

26. Kiss J., Kondrak M., Törjek O., Kiss E., Gyulai G., M'azik-Tökei K., Heszkyet L.E. // Euphytica. 2001. Vol. 118. P. 213-221.

27. Сухарева А.А., Кулуев Б.Р.//Биомика. 2018. Т.10. №1. С. 69-84.

28. Гаркуша С.В., Мухина Ж.М., Савенко Е.Г., Епифанович Н.В., Глазырина В.А., Шундрин

Л.А., Дубина Е.В., Есаулова Л.В., Епифанович Ю.В. // «Научное обеспечение производства сельскохозяйственных культур в современных условиях», сборник трудов Международной конференции, 9 сентября 2016 г., Краснодар, 2016, с. 45-48.

29. Савенко Е.Г, Мухина Ж.М., Глазырина В.А., Шундрин Л.А. // «Современное состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки», сборник трудов V Международной конференции, 5-9 октября 2020 г., Симферополь, 2020, с. 185-187.

ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики и биотехнологии»

Табацкая Т. М., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии

E-mail: tatyana.tabacky@gmail.com

Шабанова Е. А., научный сотрудник лаборатории биотехнологии

E-mail: katy-green2009@yandex.ru

Гродецкая Т. А., младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии

E-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru

Кондратьева А. М., к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории биохимии, молекулярной генетики и физиологии

E-mail: kondratyeva_anya@mail.ru

Федулова Т. П., д. б. н., ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Воронежский государственный университет

*Машкина О. С., к. б. н., доцент кафедры генетики, цитологии и биоинженерии, Зав. лабораторией биотехнологии, ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики и биотехнологии»,

E-mail: mashkinaos@mail.ru

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

Tabatskaya T. M., Senior Researcher of the Laboratory of Biotechnology

E-mail: tatyana.tabacky@gmail.com

Shabanova E. A., researcher of the Laboratory of Biotechnology

E-mail: katy-green2009@yandex.ru

Grodetskaia T. A., Junior Researcher of the Laboratory of Biotechnology

E-mail: tatyana.pokusina@yandex.ru

Kondratyeva A. M., PhD., Senior Researcher of the Biochemistry, Molecular Genetics and Physiology Laboratory

E-mail: kondratyeva_anya@mail.ru

Fedulova T. P., PhD., DSci., Leading researcher of the Laboratory of Biotechnology

E-mail: biotechnologiya@mail.ru

Voronezh State University

Mashkina O. S. , PhD., Associate Professor, Dept. of genetics, cytology and bioengineering, Head of the Laboratory of Biotechnology, All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology,

E-mail: mashkinaos@mail.ru

CHROMOSOMAL AND MICROSATELLITE ANALYSIS OF POPLAR REGENERANTS OBTAINED IN THE CULTURE OF ISOLATED ANTHERS *IN VITRO*

T. M. Tabatskaya¹, O. S. Mashkina^{1,2}, E. A. Shabanova¹, T. A. Grodetzkaya¹,
A. M. Kondratieva¹, T. P. Fedulova¹

¹All-Russian Research Institute of Forest Genetics, Breeding and Biotechnology

²Voronezh State University

Abstract. Culture of isolated anthers *in vitro* is one of the promising approaches of modern biotechnology for the creation of haploids and dihaploids (doubled haploids, homozygous diploids), which are analogs of pure (inbred) lines and are of great importance in breeding for heterosis, especially in perennial forest woody plants with a long reproductive cycle. The problem also lies in the high heterozygosity of woody plants, as well as in the manifestation of significant inbreeding depression in them when obtaining pure lines in the traditional way. Homozygous diploids are valuable for genetic and genomic research, greatly facilitating cellular and mutational selection *in vitro*. This paper presents the results of chromosomal and microsatellite analysis of anther callus and poplar regenerants (*Populus balsamifera* L., *P. deltoides* Marsh.) to clarify their possible origin. Anthers at the mononuclear pollen stage were incubated for callus formation on Murashige and Skoog medium (MS) with the addition of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2-3 mg/l), β -indolylacetic acid (0.5-1 mg/l) and 6-benzylaminopurine (BAP, 0.5 mg/l). BAP at a concentration of 0.5 mg/l was used as an inducer of morphogenesis, hormone-free 1/2 MS medium was used for adventitious shoots rooting. It was revealed that a significant part of the primary callus consisted of haploid ($n=19$) and hyperhaploid (with 20-28 chromosomes) cells (up to 90%), which confirms its gamete origin. It is shown that in the process of callus passaging and plant regeneration, a gradual spontaneous doubling of the number of chromosomes occurs, that leads to an increase in the content of diploid cells ($2n=38$). Of the 48 annual regenerants of balsamic poplar growing in the soil, 14 plants (29%) were completely diploid ($2n=38$). Some of them may be digaploids. The remaining plants are mixoploids with a modal (70-97%) diploid set of chromosomes. The results of microsatellite analysis of 35-year-old poplar trees by nine SSR loci are presented. 6 genotypes were analyzed, five were found to have two alleles on investigated loci. One sample was characterized by the presence of a single allele on investigated loci, which seems to indicate its homozygosity. Based on the results of PCR amplification, molecular genetic passports of the studied trees were compiled, which made it possible to identify them.

Keywords: poplar, anthers, callus, regenerants, chromosome number, microsatellites

REFERENCES

1. Kruglova N.N., Seldimirova O.A., Zinatullina A.E., Research Result. Physiology, 2017, Vol. 3, No 1, pp. 3-7.
2. Germana M.A., Plant Cell Rep, 2011, Vol. 30, P. 839-857.
3. Li Y., Li H., Chen Z., Ji L., Ye M., Wang J., Wang L., An X., Plant Cell Tiss Organ Cult., 2013, Vol. 114, pp. 39-48.
4. Isakov Yu.N., Butorina A.K., Muraya L.S., Russian Journal of Genetics. 1981., Vol. XVII, pp. 701-707.
5. Manual A. Doubled Haploid Production in Crop Plants. Springer, Dordrecht, 2003, 367 p.
6. Dyachuk T.I., Xomyakova O.V., Akinina V.N., Kibkalo I.A., Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2019, Vol. 23, No 1, pp. 86-94.
7. Ilyushko M.V., Romashova M.V., Russian Agricultural Sciences, 2019, No 2, pp. 11-14.
8. Wang C, Chu Z, Sun C., Acta Bot. Sin, 1975, Vol. 17, pp. 56-62.
9. Butova G.P., Tabatskaya T.M., Russian Journal of Plant Physiology, 1981, Vol. 28, No 1, pp. 215-217.
10. Butova G.P., Tabatskaya T.M., Problems of stability of garden plants in Siberia, Novosibirsk : VASKhNIL, 1982, pp. 30-34.
11. Murashige T., Skoog F., Phisiol Plant. 1962, Vol. 15(13), pp. 473-497.
12. Topilskaya L.A., Luchnikova S.A., Chuvashina N.P., Bulletin for Scientific Information of the Michur in Central Genetic Laboratory, 1975, No 22, pp. 58-61.
13. Doyle J.J., Doyle J.L., Phytochem Bull, 1987. No 19, pp. 11-15.
14. Smulders M.J.M., Van Der Schoot J., Arens P., Vosman B., Molecular Ecology Notes, 2001, No 1, pp. 188-190.
15. Mashkina O.S., Fedulova T.P., Tabatskaya T.M., Kondratieva A.M., Shabanova E.A., Proceedings of

Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2016, No 2, pp. 60-69.

16. Mashkina O.S., Biology Bulletin, 1992, No 1, pp. 66-78.

17. Kruglova N.N., Ecobiotech, 2019, Vol. 2, No 2, pp. 100-115.

18. Telmer C.A., Simmonds D.H., Newcomb W., Physiol. Plant, 1992, Vol. 84, pp. 417-424.

19. Babbar S.B., Kumari N., Mishra J.K., In: Shrivastava P.S., Narula A., Shrivastava Sh. (Eds.). Plant Biotechnology and Molecular Markers. New Dehli, India: Anamya Publishers, 2004, pp. 1-17.

20. Touraev A., Pfosser M., Vicente O., Heberle-Bors E., Planta, 1996, Vol. 200, pp. 144-152.

21. Sunderland N., Dunwell J.M., Plant Tissue and Cell Culture (Ed. Street, H.E.) Blackwell, Oxford, 1977, pp. 223-265

22. Lu, Z., Liu Y., Zhang P., Scientia Silvae Sini- cae, 1985, Vol. 21(3), pp. 227-233.

23. Kunakh V.A., Molecular and applied genetics, 2011, No 12, pp. 7-14.

24. Stoehr M.U., Zsuffa L., Plant Cell Tiss. Org. Cult, 1990, Vol, 23, pp. 49-58.

25. Deutsch F., Kumlehn J., Ziegenhagen B., Fladung M., Physiol. Plant. 2004, Vol. 120(4), pp. 613-622.

26. Kiss J., Kondrak M., Törjek O., Kiss E., Gyulai G., M'azik-Tökei K., Heszkyet L.E., Euphytica, 2001, Vol. 118, pp. 213-221.

27. Suxareva A.A., Kuluev B.R., Biomics, 2018, Vol. 10. No 1, pp. 69-84.

28. Garkusha S.V., Muxina Zh.M., Savenko E.G., Epifanovich N.V., Glazy`rina V.A., Shundrina L.A., Dubina E.V., Esaulova L.V., Epifanovich Yu.V., "Scientific support of agricultural crop production in modern conditions", Proceedings of the International Conference, September 9, 2016, Krasnodar, 2016, pp. 45-48.

29. Savenko E.G., Muxina Zh.M., Glazy`rina V.A., Shundrina L.A., "Current state, problems and prospects of agricultural science development", Proceedings of the V International Conference, October 5-9, 2020, Simferopol, 2020, pp. 185-187.