

ОЦЕНКА ДЛИТЕЛЬНО КУЛЬТИВИРУЕМЫХ *IN VITRO* КОЛЛЕКЦИОННЫХ КЛОНОВ ИВЫ ПО ДАННЫМ ХРОМОСОМНОГО АНАЛИЗА

О. С. Машкина^{1,2}, Т. М. Табацкая²

¹ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

²ФГБУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лесной генетики, селекции и биотехнологии»

Поступила в редакцию 15.11.2022 г.

Аннотация. Создание коллекции ценных генотипов древесных растений и ее длительное поддержание в условиях *in vitro* является одним из современных подходов сохранения представителей ценного генофонда. Однако, в ходе длительного культивирования может накапливаться генетическая изменчивость клеток и тканей, приводящая к потере ценных признаков материнских растений. В связи с этим важным является оценка генетической (в том числе, цитогенетической) стабильности коллекционных клонов.

Целью работы было изучение особенностей кариотипа (числа, уровня ploидности и размера хромосом) клонов различных видов ивы (*S. dasyclados* Wimm., *S. viminalis* L., *S. purpurea* L., *S. caspica* Pall., х *S. palustris* Host.) в условиях длительного культивирования *in vitro*. Подобные исследования для ивы ранее не проводились. Тем не менее, имеются данные значительного влияния уровня ploидности на рост, продуктивность и состав древесины ивы.

Объектами исследования были растения 5-ти размноженных *in vitro* клонов ивы, перспективных для плантационного выращивания. Длительное (в течение 14 лет) поддержание растений осуществляли путем их редкого субкультивирования (один раз в 5 месяцев) на безгормональной питательной среде ½ WPM в стандартных условиях культивирования (25 ± 2°C, 16 ч день / 8 ч ночь, 2.0 клк).

На протяжении всего периода культивирования *in vitro* растения имели нормальный рост и развитие, высокую регенерационную активность, не проявляли видимых признаков соматической изменчивости. Ива относится к «трудным» объектам для изучения кариотипа. Авторами усовершенствована методика изготовления и анализа препаратов. Показано, что в ходе длительного культивирования клоны проявляли цитогенетическую стабильность, сохраняя ploидность (2n=2x=38 или 2n=4x=76) и миксоploидную природу исходных растений. Получены новые данные о размерах хромосом разноploидных клонов. Абсолютная длина хромосом у диплоидных клонов варьирует от 0.8 до 2.1 мкм, тетраploидных – от 0.9 до 2.5 мкм. Не выявлено статистически достоверных различий по средней длине хромосом между диплоидными и тетраploидными клонами. Все изученные клоны ивы сохраняют кариотип соответствующего им вида в процессе длительного (в течение 14 лет) культивирования *in vitro* с использованием питательных сред без гормонов.

Ключевые слова: виды ивы, коллекция *in vitro*, длительное культивирование, уровень ploидности, число и размеры хромосом.

Ива (род *Salix* L., семейство *Salicaceae* Mirb.) – одна из наиболее быстрорастущих древесных пород, характеризующаяся большим видовым (свыше 300 видов) и внутривидовым разнообразием с многочисленными подвидами, разновидностями, естественными и искусственными гибридами [1–3]. Большое значение в ее видообразовании имели гибридизация и полиploидия. Около 40% видов *Salix* являются полиploидными [4]. Отмечено зна-

чительное влияние уровня ploидности на рост, продуктивность и состав древесины ивы [5, 6].

Ивовые плантации создаются во многих странах мира с целью получения материала для производства плетеных изделий, сырья для выработки дубильных экстрактов, для фармацевтической и целлюлозно-бумажной промышленности, производства биотоплива, кормовых добавок, саженцев для декоративного озеленения и др. [2]. Из-за высокой урожайности биомассы в течение коротких циклов роста ива считается перспек-

тивной породой для создания биоэнергетических плантаций [3].

Одним из современных подходов сохранения (консервации *ex situ*) и воспроизводства представителей ценного генофонда древесных растений является создание коллекции наиболее выдающихся экземпляров и ее длительное поддержание (культивирование) в условиях *in vitro*. Коллекция клонов ценных генотипов лесных древесных растений была создана нами в ФГБУ ВНИИЛГИСбиотех и включает помимо образцов быстрорастущих биотипов разных видов ивы (*Salix spp.*), клоны продуктивных и устойчивых экземпляров других лиственных пород (URL: <https://ckp-rf.ru/usu/569228/>). Длительность хранения живых образцов (в виде микрорастений) взрослых деревьев составляет от года до 30 лет. Помимо сохранения и клонирования ценных генотипов (с целью получения однородного посадочного материала от ценных экземпляров), коллекция используется нами для проведения методических, прикладных и фундаментальных исследований, в том числе, в исследованиях по клеточной и тканевой селекции, изучения генетики морфогенеза.

Несмотря на строгое контролирование условий культивирования *in vitro*, состава питательной среды, в ходе клонального микроразмножения и долговременного культивирования *in vitro* может накапливаться генетическая изменчивость клеток и тканей (в том числе, соматическая), нестабильность генома, возникать мутации, приводящие к потере ценных признаков материнских растений [7, 8]. Известно, что соматическая изменчивость, возникающая при длительном и частом субкультивировании *in vitro*, продолжительном и регулярном использовании гормонов, присутствии стадии каллусообразования, может иметь генетическую и эпигенетическую природу, и проявляется в изменении морфологических признаков, хромосомных нарушениях (в том числе, изменении уровня ploидности) и др. [8, 9].

В связи с этим, важным является оценка генетической (в том числе, цитогенетической) стабильности коллекции в ходе ее долгосрочного культивирования *in vitro*. Целью настоящей работы было изучение особенностей кариотипа (числа, уровня ploидности и размера хромосом) клонов различных видов ивы в условиях длительного культивирования *in vitro*. Подобные исследования для ивы ранее не проводились.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали растения-регенеранты 5-ти размноженных *in vitro* клонов ивы. Среди них клоны кустарниковой ивы: шерстистопобеговая (*Salix dasyclados* Wimm. = *S. gmelinii* Pall.), корзиночная, или прутовидная (*S. viminalis* L.), пурпурная (*S. purpurea* L.) и каспийская (*S. caspica* Pall.), а также клон древовидной ивы болотной (*S. palustris*). Ива болотная является естественным гибридом между ивой белой (*S. alba* L.) и ивой ломкой (*S. fragilis* L.) [1, 2]. Продуктивные культуры ивы, перспективные для плантационного выращивания, были отобраны доцентом ВГЛУ, к.с.-х.н. А.И. Горобец.

Введение в культуру *in vitro* исходных биотипов, их клональное микроразмножение, а также поддержание клонов в составе коллекции *in vitro*, осуществляли по разработанным нами методикам [10, 11]. Регенерацию растений проводили путем прямого органогенеза из одноузловых эксплантов однолетних одревесневших побегов. Для индукции побегообразования использовали питательную среду WPM [12], содержащую цитокинин 6-бензиламинопурин (6-БАП) в концентрации 0.2-0.5 мг/л. Для укоренения индуцированных побегов применяли среду WPM с половинным содержанием макросолей (1/2 WPM), дополненную индолилмасляной кислотой (ИМК) в концентрации 0.01 мг/л. Для уменьшения вероятности возникновения соматической изменчивости поддержание клонов в течение 14 лет (с целью их изучения, воспроизводства, сохранения и использования в программах селекции *in vitro*) осуществляли путем редкого субкультивирования (один раз в 5 месяцев) растений на безгормональной питательной среде 1/2 нормы WPM. Растения выращивали в стандартных условиях культивирования: при температуре $25 \pm 2^\circ\text{C}$, фотопериоде 16 ч день / 8 ч ночь, освещенности 2.0 клк.

Для характеристики кариотипа изучали: соматическое число ($2n$) и размеры хромосом в клетках корневой меристемы. Учитывали абсолютную длину хромосом (мкм), средние размеры хромосом в наборе и суммарную длину хромосомного набора (мкм). Для идентификации пар хромосом использовали метод максимального подобия гомологов.

Корешки регенерантов размером 0.5-1.0 см или молодые листья растений из распускающихся почек фиксировали в спиртово-уксусной смеси (3:1) с предобработкой 0.002-молярным раствором 8-оксихинолина при температуре $10-14^\circ\text{C}$

в течение 3-х часов. Давленные препараты, окрашенные ацетогематоксином, изготавливали по методике [13] в нашей модификации. Для размягчения клеточной стенки проводили комбинированную мацерацию в фарфоровых бюксах: сначала материал помещали в 1N раствор HCl на 10 минут при комнатной температуре, затем в 18 % раствор HCl на 20 минут с подогревом до 60°C. Материал промывали в 3-4 сменах 45 % уксусной кислоты и помещали в свежую порцию на 20 минут с подогревом до 60°C. Окрашивание материала проводили раствором ацетогематоксилина в течение 1-3 часов при температуре 25-26°C, а его раздавливание - в капле жидкости Гойера под покровным стеклом.

Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе Микмед 6 (Ломо, Россия) при увеличении 40×1,5×10 и 100×1,5×10. Микрофотосъемку проводили с использованием видеоокуляра DCM500. Для каждого образца анализировали не менее 20-30 метафазных пластинок. Измерение хромосом осуществляли с помощью программы Axio Vision. Из-за большого количества мелких хромосом ивы, их подсчет осуществляли не под световым микроскопом (непосредственно на препарате), а на электронной микрофотографии с применением программы Adobe Photoshop. Метафазные пластинки разделяли на несколько секторов, в которых последовательно осуществляли подсчет числа хромосом. Полученные результаты суммировались. Критерием для отнесения образца к тому или иному уровню пloidности являлось преобладание (свыше 60 %) клеток с определенным набором хромосом.

Для изучаемых признаков определяли среднее значение (M), его ошибку (m), коэффициент вариации (Cv). Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ «Stadia» v.7.0. Для сравнения выборок использовали t-критерий Стьюдента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На протяжении всего периода культивирования *in vitro* (в течение 14 лет) с использованием питательных сред без гормонов растения изученных клонов имели «нормальный» морфотип, демонстрировали хороший рост и развитие побегов, высокую способность к спонтанному укоренению (до 100%), отсутствие видимых признаков соматической изменчивости (рис. 1). Укорененные растения имели выраженные междоузлия, высокий коэффициент мультипликации (в среднем 4.4

с варьированием от 3.0 до 7.5 в зависимости от генотипических особенностей), что благоприятно для их эффективного тиражирования *in vitro*.

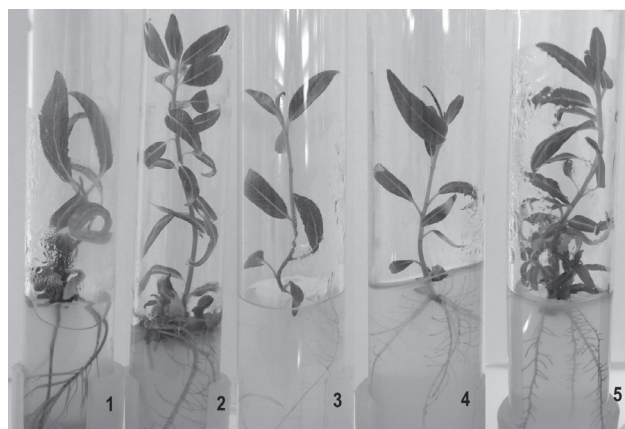


Рис. 1. Общий вид растений анализируемых клонов ивы (среда ½ WPM без гормонов) после 14 лет культивирования *in vitro*, где 1 – *S. palustris*; 2 – *S. viminalis*; 3 – *S. caspica*; 4 – *S. purpurea*; 5 – *S. dasyclados*

В различных справочниках и публикациях у видов рода *Salix* (ива) описан полиплоидный ряд ($2n$) с широким диапазоном уровней пloidности ($2x = 38$, $3x = 57$, $4x = 76$, $6x = 114$, $8x = 152$, $10x = 190$, $12x = 228$), в котором основное число хромосом равно 19 ($x = 19$) и преобладают диплоидные виды ($2n = 38$) [1, 14].

В процессе длительного культивирования все клоны сохраняли уровень пloidности, характерный для материнских растений и соответствующего им вида. Клоны № 3 (*S. caspica*), № 5 (*S. purpurea*) и № 7 (*S. viminalis*) являются диплоидами с $2n = 38$ с высоким (100 %) содержанием клеток с 38 хромосомами (табл. 1, рис. 2). Клон № 6 ивы болотной (*x S. palustris*) и его растение донор – тетраплоиды ($2n = 76$) с высоким (100%) содержанием клеток с 76 хромосомами.

В условиях длительного культивирования *in vitro* клон №1 (*S. dasyclados*) сохранил миксопloidную (тетраплоид / диплоид) природу, характерную для исходного растения донора. У клона преобладали тетраплоидные клетки с 76 хромосомами ($4x = 60$ %, $2x = 40$ %). Согласно литературным данным [4, 14] для ивы шерстистопобеговой (*S. dasyclados*) установлено несколько уровней пloidности – $2x$, $3x$, $4x$ и $6x$, но по имеющимся у нас данным случаи миксопloidии не были описаны. Миксопloidия клона № 1 и его материнского растения может быть обусловлена присутствием до 30% двуядерных клеток (наряду с одноядерными), у которых в ходе клеточного цикла (в митозе)

возможно объединение хромосомных наборов и образование тетраплоидных клеток (наряду с диплоидными).

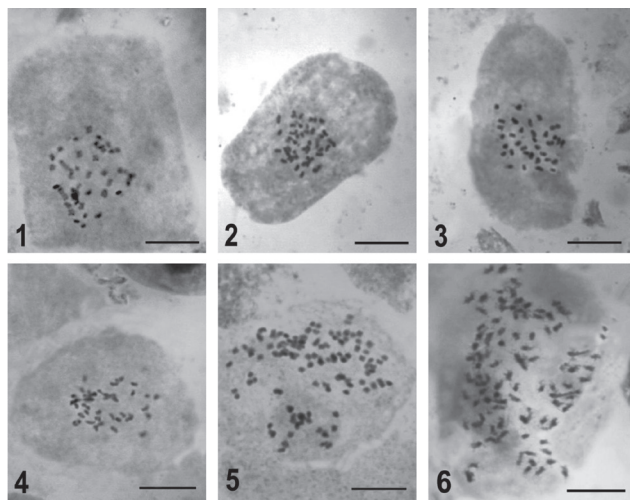


Рис. 2. Метафазные пластинки клонов ивы, где 1 – № 3 *S. caspica* ($2n = 38$); 2 – № 5 *S. purpurea* ($2n = 38$); 3 – № 7 *S. viminalis* ($2n = 38$); 4, 5 – № 1 *S. dasyclados* (4 – $2n = 38$, 5 – $2n = 76$); 6 – № 6 х *S. palustris* ($2n = 76$). Масштабная линейка – 10 μm

Одной из причин сохранения цитогенетической стабильности в течение столь длительного срока культивирования (14 лет), по-нашему мнению, является использование питательных сред без гормонов, что способствует уменьшению возможности возникновения генетической изменчивости. Применение гормональных питательных сред мы ограничивали этапами введения эксплантов в культуру *in vitro* и регенерации растений. Дальнейшее многолетнее поддержание коллекции и клональное микроразмножение коллекционных клонов проводили на безгормональной питательной среде $\frac{1}{2}$ WPM. Отметим, что большинство исследователей при длительном культивирова-

нии растений использует среды с гормонами [8, 15, 16 и др.]. Так, например, в работе Graner et al. [16] клоны персиковой пальмы культивировали в течение 8 лет с применением нафтилуксусной кислоты (НУК) и 6-бензиламинопурина (6-БАП). В результате клоны показали снижение морфогенетического потенциала, проявили признаки старения и апоптоза. В нашей работе [17] длительное пассирование каллусных культур диплоидного тополя ($2n=38$) на питательной среде с повышенным (3 мг/л, 5 месяцев) содержанием ауксина 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д) дало возможность получения тетраплоидных регенерантов ($2n=76$). Известно, что изменение гормонального баланса может вызвать отклонения от модального числа хромосом в клетках за счёт различного рода аномалий митоза, привести к изменению направленности отбора в клеточных популяциях [7].

На тополе белом нами было показано увеличение количества окислительных повреждений митохондриальной ДНК и хлоропластной ДНК (которые более склонны к возрастному накоплению повреждений по сравнению с ядерной ДНК) у клонов после 26 лет культивирования на средах без растительных гормонов по сравнению с 5-летними [18]. Несмотря на это, 26-летние клоны тополя сохраняли регенерационную активность, нормальный фенотип и рост, способность микроразмножения к укоренению, не проявляли изменений в уровне экспрессии генов *ogg1* и *xrcc1*, отвечающих за репарацию ДНК, что также может быть связано с оптимальными условиями длительного культивирования [18].

Следует отметить, что у ивы прямой подсчет хромосом (на препарате) с помощью светового микроскопа является весьма сложным из-за многочисленных мелких хромосом [19, 20]. Кроме того,

Таблица 1

Плоидность материнских растений ивы и их клонов в условиях длительного культивирования *in vitro*

Клон, вид	Образец	Доля клеток с числом хромосом, %		Плоидность по литературным данным [4, 14, 20]
		$2n = 2x = 38$	$2n = 4x = 76$	
1 – <i>S. dasyclados</i>	материнское дерево	35.0	65.0	2x, 3x, 4x, 6x
	клон <i>in vitro</i>	40.0	60.0	
3 – <i>S. caspica</i>	материнское дерево	100.0	–	2x
	клон <i>in vitro</i>	100.0	–	
5 – <i>S. purpurea</i>	материнское дерево	100.0	–	2x
	клон <i>in vitro</i>	100.0	–	
6 – х <i>S. palustris</i>	материнское дерево	–	100.0	4x
	клон <i>in vitro</i>	–	100.0	
7 – <i>S. viminalis</i>	материнское дерево	100.0	–	2x
	клон <i>in vitro</i>	100.0	–	

Примечание. Длительность культивирования *in vitro* – 14 лет. Для каждого образца анализировали по 20–30 метафазных пластинок

жесткая клеточная оболочка и ее низкая проницаемость для различных реагентов, наличие вторичных метаболитов [5] создают дополнительные трудности для окрашивания хромосом, препятствуют их хорошему разбросу и расположению в одной плоскости, что также затрудняет подсчет. Поэтому о пloidности вида (гибрида, биотипа) исследователи часто судили по косвенным признакам: размеру устьиц листьев, пыльцевых зерен и др. [5, 19], числу бивалентов в микроспороцитах в мейозе [21].

В качестве альтернативы в последние десятилетия применяют различные молекулярные маркеры, метод проточной ДНК-цитометрии, которые, помимо явных преимуществ (возможность скрининга большого числа образцов, анализа неделящихся клеток и др.) имеют свои ограничения [20, 21, 22]. Так, результаты, полученные разными методами (SSR-генотипированием и проточной цитометрией), совпадали не во всех случаях [22]. Согласно [23] уровень пloidности можно с наибольшей точностью определить SSR-генотипированием только в том случае, если аллели в одном локусе гетерозиготны. В более ранних наших исследованиях [24] использованные микросателлитные локусы подтвердили триплоидную природу ($2n = 3x = 57$) межвидовых гибридов тополя, но не показали различий по пloidности и уровню миксопloidии (выявленных с помощью прямого подсчета хромосом) у клонов осины и внутривидовых гибридов тополя белого.

Из-за трудности проведения хромосомного анализа у ивы, недостаточно данных и о размерах ее хромосомного набора, причем ранние работы

основывались в основном на измерении хромосом по рисункам, выполненным через рисовальный аппарат микроскопа [25]. В настоящих исследованиях мы усовершенствовали методику изготовления и анализа препаратов, что позволило с высокой точностью провести изучение кариотипа образцов пяти видов ивы из коллекции *in vitro*.

Согласно литературным данным хромосомы ивы мелкие (от 0.5 до 1.7 мкм), округлой или овальной формы [25 и др.]. Результаты наших исследований по измерению метафазных хромосом в целом согласуются с литературными данными. Показано, что как у диплоидных, так и у тетраплоидных клонов ивы хромосомы мелкие и относительно однородные по размеру. Абсолютная длина хромосом у диплоидных клонов (*S. caspica*, *S. purpurea* и *S. viminalis*) варьировала от 0.8 до 2.1 мкм, у тетраплоидных (*S. dasyclados*, х *S. palustris*) – от 0.9 до 2.5 мкм. Самые мелкие хромосомы (XIX пара) у диплоидных клонов (*S. caspica*, *S. purpurea* и *S. viminalis*) в среднем имели 0.95–1.04 мкм, а самые крупные (I пара) – 1.91–2.0 мкм (табл. 2). Отмечено постепенное и незначительное уменьшение длины хромосом набора (от I до XIX пары). Низкие (от 2.3 % до 10 %) и реже средние (до 15.4 %) значения коэффициента вариации свидетельствуют об относительно низком уровне изменчивости анализируемого признака.

Не выявлено статистически достоверных различий между диплоидными и тетраплоидными клонами ивы по средней длине хромосом (табл. 3). Длина хромосом диплоидного набора в среднем составила

Таблица 2

Абсолютная длина хромосом у клонов диплоидных видов ивы

Пары хромосом	Клон № 3 (<i>S. caspica</i>)		Клон № 5 (<i>S. purpurea</i>)		Клон № 7 (<i>S. viminalis</i>)	
	M ± m, мкм	Cv, %	M ± m, мкм	Cv, %	M ± m, мкм	Cv, %
I	2.00 ± 0.02	4.2	1.91 ± 0.03	5.3	1.96 ± 0.03	5.0
II	1.85 ± 0.02	6.0	1.75 ± 0.03	5.4	1.72 ± 0.01	2.3
III	1.78 ± 0.02	6.4	1.66 ± 0.02	5.6	1.68 ± 0.02	4.7
IV	1.71 ± 0.02	5.8	1.63 ± 0.03	6.8	1.63 ± 0.03	5.0
V	1.65 ± 0.02	5.4	1.55 ± 0.02	5.2	1.62 ± 0.02	4.6
VI	1.61 ± 0.02	6.2	1.49 ± 0.03	8.1	1.58 ± 0.04	7.0
VII	1.57 ± 0.02	6.4	1.44 ± 0.03	8.3	1.53 ± 0.05	10.2
VIII	1.52 ± 0.02	5.3	1.42 ± 0.04	8.8	1.52 ± 0.05	10.5
XI	1.50 ± 0.02	6.0	1.40 ± 0.03	8.5	1.51 ± 0.05	10.7
X	1.46 ± 0.02	7.6	1.39 ± 0.03	8.5	1.50 ± 0.05	10.3
XI	1.43 ± 0.02	7.5	1.35 ± 0.04	9.9	1.46 ± 0.06	12.0
XII	1.39 ± 0.03	9.6	1.33 ± 0.04	10.1	1.45 ± 0.06	12.3
XIII	1.35 ± 0.03	8.9	1.29 ± 0.03	9.8	1.39 ± 0.05	11.9
XIV	1.31 ± 0.02	6.6	1.26 ± 0.04	11.1	1.37 ± 0.06	12.8
XV	1.29 ± 0.02	6.8	1.24 ± 0.04	11.7	1.33 ± 0.05	12.8
XVI	1.24 ± 0.02	5.8	1.20 ± 0.04	12.3	1.31 ± 0.06	13.1
XVII	1.17 ± 0.01	4.5	1.10 ± 0.04	13.1	1.23 ± 0.06	15.4
XVIII	1.14 ± 0.01	4.1	1.06 ± 0.04	13.3	1.18 ± 0.06	15.4
XIX	1.03 ± 0.01	5.9	0.95 ± 0.03	12.8	1.04 ± 0.03	9.8

Таблица 3

Средняя и суммарная длина хромосом диплоидных и тетраплоидных клонов ивы

Клон	Плоидность	Средняя длина хромосом, мкм		Суммарная длина хромосом, мкм	
		M ± m, мкм	Cv, %	M ± m, мкм	Cv, %
3	2n=2x=38	1.47 ± 0.02	5.9	56.1 ± 0.8	5,9
5		1.39 ± 0.04	8.7	52.8 ± 1.4	8,7
7		1.42 ± 0.05	10.7	54.0 ± 1.8	10,7
среднее		1,44 ± 0,02	8.4	54.5 ± 0.8	8.4
1	2n=4x=76	1.53 ± 0.09	24.8	111.7 ± 5.6	19,6
6		1.50 ± 0.07	18.4	113.7 ± 5.4	18,4
среднее		1,51 ± 0,06	21.6	112.7 ± 3.8***	18.7

Примечание. 1 – *S. dasyclados*; 3 – *S. caspica*; 5 – *S. purpurea*; 6 – *S. palustris*; 7 – *S. viminalis* (приведены данные для тетраплоидных клеток). ***различия между диплоидными и тетраплоидными клонами по суммарной длине хромосом достоверны при P < 0.001

1.44 ± 0.02 мкм, тетраплоидного – 1.51 ± 0.06 мкм. Тем не менее, уровень изменчивости показателя у тетраплоидных клонов выше, о чем свидетельствует более высокое значение коэффициента вариации (в 2.5 раза) по сравнению с диплоидными клонами (21.6 и 8.4 % соответственно). Суммарная длина хромосом диплоидного набора составила 54.5 мкм и варьировала от 48.5 до 60.0 мкм, а тетраплоидного – 112.7 мкм (т.е. в 2 раза больше) и варьировала от 94.2 до 141.4 мкм. Коэффициент вариации составил соответственно 8.4 и 18.7 %.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе хромосомного анализа 5-ти изученных клонов ивы (*S. caspica*, *S. purpurea*, *S. viminalis*, *S. dasyclados* и *S. x palustris*) показано сохранение кариотипа материнских растений и соответствующего им вида в процессе длительного (в течение 14 лет) культивирования *in vitro*. Клоны проявляли цитогенетическую стабильность: сохраняли статус плоидности (2x=38 или 4x=76) и миксоплоидную природу исходных растений. Правильно подобранные условия длительного культивирования (с применением питательных сред без гормонов) обеспечивают нормальный фенотип, рост и развитие растений ивы, высокую регенерационную способность, что важно для их долговременного хранения в составе коллекции *in vitro* и использования для прикладных и фундаментальных исследований.

Исследование выполнено в рамках тем государственных заданий № 114040740046, № АААА-А17-117041810337-8 и № АААА-А20-120012890092-6 Федерального агентства лесного хозяйства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скворцов А.К. Ивы СССР: Систематический и географический обзор. М., Наука. 1968. 262 с.
2. Анциферов Г.И. Ива. М., Лесная промышленность. 1984. 101 с.

3. Kuzovkina Y.A., Vietto L. // Skvortsovia. 2014. Vol. 1. No 2. P. 133-148.

4. Ngantcha A.C. DNA fingerprinting and genetic relationships among willow (*Salix* spp.). Saskatoon (Canada), University of Saskatchewan. 2010. 102 p.

5. Ochatt S.J., Patat-Ochatt E.M., Moessner A. // Plant Cell Tiss Organ Cult. 2011. Vol. 104. P. 329-341.

6. Serapiglia M.J., Gouker F.E., Hart J.F., Unda F., Mansfield S.D., Stipanovic A.J., Smart L.B. // Bio-Energy Research. 2015. Vol. 8. P. 259-269.

7. Кунах В.А. // Молекулярная и прикладная генетика. 2011. Т. 12. С. 7-14.

8. Smykal P., Valledor L., Rodríguez R., Griga M. // Plant Cell Reports. 2007. Vol. 26. No 11. P. 1985-1998.

9. Лебедев В.Г., Азарова А.Б., Шестибратов К.А., Деменко В.И. // Известия ТСХА. 2012. №1. С. 153-163.

10. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Gorobets A.I., Shestibratov K.A. // Applied Biochemistry and Microbiology. 2010. Vol. 46. No 8. P. 769-775.

11. Табацкая Т.М., Машкина О.С. // Лесоведение. 2020. № 2. С. 147-161.

12. Lloyd G., McCown D. // Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society. 1980. Vol. 30. P. 421-427.

13. Буторина А.К. // Генетика. 1985. Т. XXI. № 7. С. 1192-1198.

14. Тахтаджян А.Л. Числа хромосом цветковых растений флоры СССР. СПб., Наука. 1993. 428 с.

15. Graner E.M., Calderan-Meneghetti E., Leone G.F., de Almeida C.V., de Almeida M. // Plant Cell Tissue Organ Cult. 2019. Vol. 137. No 3. P. 511-524.

16. Концевая И.И. // Лесоведение. 2009. № 5. С. 50-56.

17. Машкина О.С., Исаков Ю.Н. // Лесоведение, 2002. № 3. С. 68-73.

18. Gureev A.P., Mashkina O.S., Shabanova E.A., Vitkalova I.Yu., Sitnikov V.V., Popov V.N. // Plant Molecular Biology. 2021. Vol. 106. No 6. P. 479-489.

19. Афонин А.А. // Лесной журнал. 2006. № 5. С. 26-35.
20. Guo W., Hou J., Yin T., Chen Y. // Scientific Repores. 2016. No 6 : 37702.
21. Khalili Z., Mirzaie-Nodoushan H., Ghahremaninejad F., Maassoumi A.A. // Caryologia. 2012. Vol. 65. No 4. P. 258–262.
22. Wu Q., Liang X., Dai X., Chen Y., Yin T. // Tree Genetics & Genomes. 2018. Vol. 14. No 65. 12 pp.
23. Yagi M., Kimura T., Yamamoto T., Onozaki T. // J Japan Soc Hort Sci. 2009. Vol. 78. P. 335-343.
24. Машикина О.С., Федулова Т.П., Табацкая Т.М., Кондратьева А.М., Шабанова Е.А. // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация, 2016. № 2. С. 60-69.
25. Кричфалуший В.В., Голішкин Л.В. Хромосомні числа представників в роду *Salix* // Укр. бот. журн. 1985. No 2. С. 33-34.

Воронежский государственный университет

*Машикина 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

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

Табацкая Т. М., старший научный сотрудник лаборатории биотехнологии

E-mail: tatyana.tabacky@gmail.com

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

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

ASSESSMENT OF LONG-TERM CULTIVATED *IN VITRO* WILLOW CLONES ACCORDING TO CHROMOSOMAL ANALYSIS

O. S. Mashkina^{1,2}, T. M. Tabatskaya¹

1-Voronezh State University

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

Abstract. Creation and long-term *in vitro* maintenance of valuable genotype collection is one of the modern approach to conservation of valuable gene pool of woody plants. However, with prolonged cultivation genetic variability of cells and tissues may accumulate and lead to the loss of valuable characteristics of maternal plants. It is therefore important to assess the genetic (including cytogenetic) stability of collection clones.

The purpose of this work was to study the karyotype features (number, ploidy level and chromosome size) of various willow clones (*S. dasyclados* Wimm., *S. viminalis* L., *S. purpurea* L., *S. caspica* Pall., x *S. palustris* Host.) under conditions of long-term *in vitro* storage. No such research has been conducted on willow so far. Nevertheless, there is evidence of significant influence of ploidy level on growth, productivity and composition of wood for willow plants.

Our study was based on the plants of 5 micropropagated willow clones, rated as promising for plantation forestry. The plants used in the study were maintained *in vitro* for a long period (14 years) by rare subculturing (once in 5 months) on a hormone-free ½ WPM nutrient medium under standard cultivation conditions (25±2°C, 16 h of light / 8 h of darkness, 2.0 klx).

Throughout the entire *in vitro* cultivation period the plants showed proper growth and development, high regeneration activity and no visible signs of somaclonal variation. Willow is one of the rather difficult objects for karyotype analysis. The authors improved the method of preparation and analysis of speci-

mens. During the long-term cultivation, the clones showed cytogenetic stability, maintaining the ploidy ($2n=2x=38$ or $2n=4x=76$) and the mixoploid nature of the original plants. Data obtained gives an update on the sizes of chromosomes of clones with different ploidy. The absolute chromosome length for diploid clones varies from 0.8 to 2.1 μm , tetraploid – from 0.9 to 2.5 μm . There were no statistically significant differences in the average chromosome length between diploid and tetraploid clones. All studied willow clones during long-term (for 14 years) *in vitro* cultivation on a hormone-free nutrient media retain the karyotype of the respective species.

Keywords: *Salix* species, *in vitro* collection, long-term cultivation, ploidy level, number and size of chromosomes

REFERENCES

1. Skvortsov A.K. Willows of the USSR: Systematic and geographical review. Moscow, Nauka, 1968, 262 p.
2. Antsiferov G.I. Willow. Moscow, Forest industry, 1984, 101 p.
3. Kuzovkina Y.A., Vietto L., Skvortsova, 2014, Vol. 1, No 2, pp. 133-148.
4. Ngantcha A.C. DNA fingerprinting and genetic relationships among willow (*Salix* spp.). Saskatoon (Canada), University of Saskatchewan. 2010. 102 pp.
5. Ochatt S.J., Patat-Ochatt E.M., Moessner A., Plant Cell Tiss Organ Cult, 2011, Vol. 104, pp. 329-341.
6. Serapiglia M.J., Gouker F.E., Hart J.F., Unda F., Mansfield S.D., Stipanovic A.J., Smart L.B., BioEnergy Research, 2015, Vol. 8, pp. 259-269.
7. Kunakh V.A., Molecular and Applied Genetics, Minsk, 2011, Vol. 12, pp. 7-14.
8. Smykal P., Valledor L., Rodríguez R., Griga M., Plant Cell Reports, 2007, Vol. 26, No 11, pp. 1985-1998.
9. Lebedev V.G., Azarova A.B., Shestibratov K.A., Demenko V.I., Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy, 2012, No 1, pp. 153-163.
10. Mashkina O.S., Tabatskaya T.M., Gorobets A.I., Shestibratov K.A., Applied Biochemistry and Microbiology, 2010, Vol. 46, No 8, pp. 769-775.
11. Tabatskaya T.M., Mashkina O.S., Russian Journal of Forest Science (Lesovedenie), 2020, No 2, pp. 147-161.
12. Lloyd G., McCown D., Combined Proceedings, International Plant Propagators' Society, 1980, Vol. 30, pp. 421-427.
13. Butorina A.K., Soviet genetics, 1985, Vol. 21, No 7, pp. 1192-1198.
14. Takhtadzhyan A.L. Chromosome numbers of flowering plants of the flora of the USSR. St. Petersburg, Nauka, 1993, 428 p.
15. Graner E.M., Calderan-Meneghetti E., Leone G.F., de Almeida C.V., de Almeida M., Plant Cell Tissue Organ Cult, 2019, Vol. 137, No 3, pp. 511-524.
16. Kontsevaya I.I., Russian Journal of Forest Science (Lesovedenie), No. 5, pp. 50-56.
17. Mashkina O.S., Isakov Yu.N., Russian Journal of Forest Science (Lesovedenie), 2002, No. 3, pp. 68-73.
18. Gureev A.P., Mashkina O.S., Shabanova E.A., Vitkalova I.Yu., Sitnikov V.V., Popov V.N., Plant Molecular Biology, 2021, Vol. 106, No 6, pp. 479-489.
19. Afonin A.A., Russian Forestry Journal, 2006, No 5, pp. 26-35.
20. Guo W., Hou J., Yin T., Chen Y., Scientific Repores, 2016, No 6: 37702.
21. Khalili Z., Mirzaie-Nodoushan H., Ghahremaninejad F., Maassoumi A.A., Caryologia, 2012, Vol. 65, No 4, pp. 258-262.
22. Wu Q., Liang X., Dai X., Chen Y., Yin T., Tree Genetics & Genomes, 2018, Vol. 14, No 65, 12 pp.
23. Yagi M., Kimura T., Yamamoto T., Onozaki T., J Japan Soc Hort Sci., 2009, Vol. 78, pp. 335-343.
24. Mashkina O.S., Fedulova T.P., Tabatskaya T.M., Kondratyeva A.M., Shabanova E.A., Proceedings of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy, 2016, No 2, pp. 60-69.
25. Krichfalushy V.V., Golyshkin L.V., Ukrainian Botanical Journal, 1985, No 2, pp. 33-34.