

УДК 58.085:575.22:632.911.2:632.915

*Е.В. Луценко, В.А. Чохели, А.В. Верецагина, М.М. Середа***ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ КЛОНОВ *POPULUS TREMULA* L. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ISSR-МАРКЕРОВ, ПОЛУЧЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO***

Рассмотрено состояние вопроса в области селекции вида *Populus tremula* L. в Ростовской области. Изложены результаты эксперимента по получению здоровых эксплантов осины методом клонального микроразмножения. Отмечено, что лучше всего стерилизовать образцы в растворе 70 % этанола, затем в 0,1 %-ом растворе сулемы (5 мин.) и последующая отмывка в дистиллированной воде 3 раза по 15 мин. Описана модификация технологии культуры ткани *in vitro* применительно к древесным видам. Было отмечено, что оптимальной средой для прямой регенерации осины из листовой пластинки является среда WPM, содержащая 0,4 мг/л ТДЗ. Мультипликацию побегов производили на среде МС с добавлением 1 мг/л БАП. Укоренение побегов осуществлялось на среде Уайта. Исследована возможность применения ISSR-маркеров для оценки генетического родства клонов осины. Всего было детектировано 16 ISSR-фрагментов, из которых обнаружено 4 уникальных фрагмента, а 9 оказались полиморфными, что составляет 60,1 %.

Ключевые слова: *Populus tremula* L., культура *in vitro*, микроклональное размножение, экспланты, ISSR-маркеры, полиморфизм.

Осина – листопадное дерево первой величины с широкоцилиндрической или яйцевидной ажурной кроной и светло-зеленовато-серой корой, образующее чистые или смешанные с другими породами древостои [1; 2]. Является ценным лекарственным видом, используется в деревообрабатывающей промышленности и является декоративным растением [2; 3]. Ее можно использовать в озеленении городов. Декоративна красивой кроной, стройным светлым стволом. Особенно привлекательна ранней весной в период цветения и осенью желтым или карминовым расцвечиванием листвы. Декоративная долговечность 30–40 лет [4–6].

Материалы и методы исследования

В качестве первичного экспланта для введения в культуру *in vitro* *Populus tremula* был взят фрагмент листовой пластинки (рис. 1) маточного растения из коллекции ботанического сада ЮФУ. Перед стерилизацией листовые пластинки помещались в дистиллированную воду с несколькими каплями ТВИНа и встряхивались на шейкере 15 мин., после чего промывались дистиллированной водой. Затем экспланты обрабатывались 70 %-ым раствором этанола, после чего стерилизовались 0,1 %-ым раствором сулемы и промывались дистиллированной водой 3 раза по 15 мин.



Рис. 1. Первичный эксплант *Populus tremula*

Для культивирования использовались среды МС (Мурасиге-Скуга) [7; 8], WPM (Woody Plant Medium) и Уайта с добавлением таких фитогормонов, как БАП (6-бензиламинопурин), НУК (анафтилуксусная кислота) и ТДЗ (тидиазурон) [1; 9]. В качестве гелеобразующего средства применялся агар-агар (6 г/л).

Стерилизация и высадка всех эксплантов на среду осуществлялась в ламинар-боксе. Стерилизация сред проводилась в автоклаве при температуре 121 °С в течение 20 мин. РН среды доводился до значения 5,7 с помощью 1 М КОН. Культуры помещались в условия 16-часового фотопериода при температуре 25 °С.

Для получения микроклонов использовалась среда для прямой регенерации. Экспланты помещались на среду WPM с добавлением ТДЗ 0,2 мг/л – 0,6 мг/л [10]. Тидиазурон является синтетическим фитогормоном, имеющим мутагенный эффект. Данный фитогормон способствует увеличению частоты спонтанного мутагенеза на этой стадии микроклонального размножения.

Экстракция ДНК образцов материнского растения проводилась из листьев, а для образцов 3-х поколений *in vitro* проводилась из молодых неодревесневевших побегов (стебель и листья). Выделение ДНК проводилось сорбентным методом при помощи коммерческого набора «Сорб-ГМО-Б» (Синтол). Концентрацию ДНК определяли на флюориметре Qubit 3.0 (Invitrogen) по стандартной методике с нашей модификацией. Все образцы разбавлялись до нужной концентрации в 5 нг/мкл деионизированной водой.

Для анализа ДНК выделенных образцов использовали метод межмикросателлитного анализа (ISSR-метод). Олигонуклеотидные праймеры подбирались из набора University of British Columbia Biotechnology Laboratory (UCB, Vancouver, Canada) [11], хорошо зарекомендовавших себя в исследованиях на других древесных растениях, в частности на дубе черешчатом [12]. Характеристики маркеров представлены в табл. 2.

ПЦР-смесь готовили из расчёта на один образец: H₂O (DD) – 14,25 мкл, раствор 10x dNTP (Литех) – 2,5 мкл (25мМ), ПЦР буфер+MgCl₂ (Евроген) – 2,5 мкл, Taq-полимераза (Синтол) – 0,25 мкл (5 ед/мкл), ДНК матрица – 2 мкл и праймер 1 мкл (10 мкМ/мкл). Общий объём смеси 25 мкл.

Аmplification проводилась на термоциклере T 100 Thermal Cycler (производства BIO-RAD). Протокол амплификации: 1. 94 °C – 1:00; 2. 94 °C – 0:30; 3. 52/53 °C – 0:45; 4. 72 °C – 2:00; 5. 34 цикла, начиная со второго пункта; 6. 72 °C – 5:00; 7. хранение при 12 °C.

Разделение фрагментов проводили электрофорезом в 1,5 % агарозном геле с использованием 1xTBE-буфера (TRIS – Boric acid – EDTA), на мощности 70 В, 2 часа, источник питания Power Pac Basic (производства BIO-RAD).

Окрашивание ДНК производили интеркалирующим красителем SYBR Green I из соотношения 1 мкл красителя на 6 мкл ДНК. Съёмку производили в геледокументирующей системе GelDoc XR+ с программным обеспечением ImageLab версии 4.1.

Маркер длин ДНК фрагментов 100+bp (с дополнительной меткой на 1500 п.н.) и 1 kb (производства Евроген) смешивали с красителем SYBR Green I из соотношения 6 к 1, соответственно.

Компьютерную обработку полученных фореграмм проводили при помощи программы PyElph 1.4, с последующим представлением в виде матрицы бинарных данных. В ней наличие или отсутствие в спектре одинаковых по размеру фрагментов ДНК рассматривается как состояние 1 или 0, соответственно. При этом учитывали только воспроизводимые в повторных экспериментах фрагменты, изменчивость по интенсивности не учитывалась. Компьютерный анализ матриц проведен с помощью программы MSExcel. По матрице состояний с помощью компьютерной программы Winboot [13; 14] была составлена матрица сходства и генетической дистанции с использованием коэффициента Жаккарда.

Результаты и обсуждения

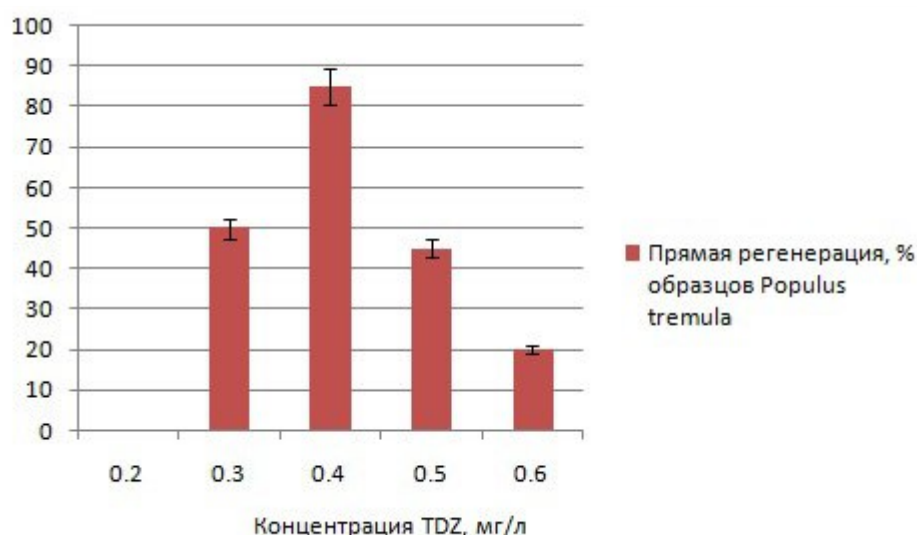
В работе было испробовано четыре режима стерилизации первичного экспланта *Populus tremula*, отличающихся по времени экспозиции, в 0,1 %-ом растворе сулемы. Для оценки эффективности поверхностной стерилизации помимо процента чистых культур (без гибкого или бактериального заражения) учитывался и процент выживших эксплантов. Из табл. 1 видно, что длительное время экспозиции (7 мин. и 10 мин.) делает эксплаты нежизнеспособными, а короткое – приводит к гибели от грибковых и бактериальных заражений. Наилучшая схема стерилизации следующая: 70 %-ый раствор этанола, 0,1 %-ый раствор сулемы (5 мин.) и дистиллированная вода 3 раза по 15 мин.

После 2–3 недель культивирования эксплантов наблюдалась прямая регенерация. Прямая регенерация отмечена, начиная с 0,3 мг/л ТДЗ. Поскольку целью было размножение с помощью прямой регенерации, то оценивалась ее эффективность на средах с разным содержанием ТДЗ (рис. 2). Установлено, что наиболее оптимальной средой для прямой регенерации осины из листовой пластины является среда WPM, содержащая 0,4 мг/л ТДЗ (рис. 3).

Таблица 1

Эффективность поверхностной стерилизации *Populus tremula*

Экспозиция, мин.	Незараженные экспланты, %	Погибшие экспланты, %
3	0	100
5	80	30
7	90	80
10	97	100

Рис. 2. Эффективность прямой регенерации *Populus tremula* из листовой пластинкиРис. 3. Прямая регенерация *Populus tremula* на среде WPM + 0,4 ТДЗ

Полученные регенеранты пересаживали на среду МС с половинной концентрацией солей с добавлением 0,3 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК. После двух недель культивирования регенерантов их переносили на среду МС с добавлением 1 мг/л БАП (стадия мультипликации побегов). Для элонгации возникшие микропобеги пересаживались на среду МС с половинной концентрацией солей без добавления гормонов. Укоренение побегов осуществлялось на среде Уайта (укорененные растения-регенеранты 1-го поколения). После чего проводили повторный цикл микроразмножения, начиная со стадии регенерации из листовой пластинки.

Каждый ISSR-праймер был проанализирован индивидуально в ПЦР с геномной ДНК *P. tremula*. В результате этого анализа было выявлено 4 наиболее эффективных ISSR-праймера (табл. 2).

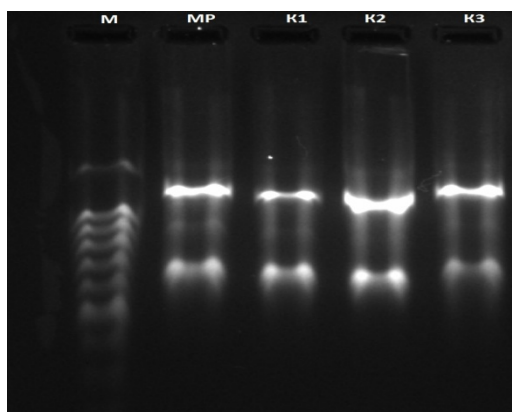
В основном все праймеры оказались с динуклеотидными повторами. Среднее число амплифицированных фрагментов на праймер равнялось 4, максимальное – 7 (праймер UBC 835), минимальное – 2 (праймер UBC 811) (рис. 4). Среднее число полиморфных фрагментов на праймер составило 2,25, максимальное – 4 (праймер UBC 835), минимальное – 1 (праймер UBC 857).

Таблица 2

Полиморфизм *P. tremula*, выявленный с использованием ISSR-маркеров

Название	Последовательность	T _a , °C	Диапазон размера фрагментов	T	M	%P	U
UBC 811	(GA) ₈ C	53	600–1350	2	0	100	0
UBC 835	(AG) ₈ YC	52	700–2500	7	1	57,1	2
UBC 841	(GA) ₈ YC	52	1200–3500	4	0	50	2
UBC 857	(AC) ₈ YG	52	900–3000	3	2	33,3	0

Примечание. Y – любой пиримидин, T – общее число фрагментов ДНК, M – число мономорфных фрагментов, %P – процент полиморфизма, U – количество уникальных фрагментов

Рис. 4. Фореграмма *Populus tremula* с ISSR-маркером UBC 811

Примечание: M – маркер размерности длин ДНК, MP – материнское растение, K1 – клон 1-го поколения, K2 – клон 2-го поколения, K3 – клон 3-го поколения

Всего было детектировано 16 ISSR-фрагментов, из которых 9 оказались полиморфными, что составляет 60,1 %. Обнаружено 4 уникальных фрагмента, то есть те, которые встречаются только в одном образце. Поскольку все экспланты стерильные, то можно исключить контаминацию.

Для оценки генетического сходства был использован коэффициент Джакарта. На основе полученных фореграмм была построена бинарная матрица. Генетическое сходство для пар образцов описано представлено в табл. 3.

Таблица 3

Генетическое различие исследуемых образцов

Параметры	MP	K1	K2	K3
MP	1.000000			
K1	0.705882	1.000000		
K2	0.789474	0.722222	1.000000	
K3	0.700000	0.375000	0.650000	1.000000

На основании полученных данных наиболее далекими можно считать образцы клона 2 и материнского растения, а наиболее близкими можно считать образцы клона 1 и клона 3.

Таким образом, нами подтверждена успешная применимость ISSR-метода в генетических исследованиях клонов *P. tremula*, прошедших несколько пассажей. Этот метод информативен и позволяет выявить уникальные идентификационные фрагменты, определить уровень генетического разнообразия.

Заключение

В работе было испробовано четыре режима стерилизации первичного экспланта *Populus tremula*, отличающихся по времени экспозиции, в 0,1 %-ом растворе сулемы. Установлена наилучшая схема стерилизации: 70 %-ый раствор этанола, 0,1 %-ый раствор сулемы (5 мин.) и дистиллированная вода 3 раза по 15 мин.

Наиболее оптимальной средой для прямой регенерации осины из листовой пластины является среда WPM, содержащая 0,4 мг/л ТДЗ. Полученные регенеранты пересаживали на среду МС с половинной концентрацией солей с добавлением 0,3 мг/л БАП и 0,05 мг/л НУК. На стадии мультипликации побеги переносили на среду МС с добавлением 1 мг/л БАП. Укоренение побегов осуществлялось на среде Уайта.

Всего было детектировано 16 ISSR-фрагментов, из которых 9 оказались полиморфными, что составляет 60,1 %. Обнаружено 4 уникальных фрагмента, то есть те, которые встречаются только в одном образце. Наиболее далекими можно считать образцы клона 2 и материнского растения, а наиболее близкими можно считать образцы клона 1 и клона 3.

Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке Федерального государственного бюджетного учреждения «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере». Использовано оборудование ЦКП «Биотехнология, биомедицина и экологический мониторинг», ЦКП «Высокие технологии», лаборатории клеточных и геномных технологий растений Ботанического сада Академии биологии и биотехнологии им. Д.И. Ивановского Южного федерального университета.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Козловский Б.Л., Огородникова Т.К., Куропятников М.В., Федоринова О.И. Ассортимент древесных растений для зеленого строительства в Ростовской области. Ростов-н/Д.: ЮФУ, 2009. 416 с.
2. Петрова Г.А. Получение здорового посадочного материала осины (*Populus tremula* L.) из каллусной ткани с целью оздоровления осинников Республики Татарстан // Учен. записки Казан. гос. акад. ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2011. №. 205. С. 169-173.
3. Плантариум / Открытый атлас сосудистых растений России и сопредельных стран. URL: <http://www.plantarium.ru/page/view/item/46458.html> (дата обращения: 23.03.2015).
4. Луценко Е.В. Разработка технологии получения засухоустойчивой формы осины методами клеточной инженерии // Неделя науки, 2015. Ростов-н/Д.: ЮФУ, 2015. С. 8-10.
5. Луценко Е.В., Середя М.М., Лысенко О.Г. Оптимизация микроклонального размножения осины (*Populus tremula* L.) // Биотехнология. Взгляд в будущее: Сб. тр. 4 Междунар. науч. интернет-конф. 2015. С. 88-92.
6. Михайлов Л.Е. Осина. М.: Агропромиздат, 1985. 72 с.
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures // Physiologia plantarum. 1962. Vol. 15, N 3. P. 473-497.
8. Peternel S. et al. In vitro propagation of European aspen (*Populus tremula* L.) from axillary buds via organogenesis // Scientia horticulturae. 2009. Vol. 121, N 1. P. 109-112.
9. Cavusoglu A. et al. Direct and indirect plant regeneration from various explants of eastern cottonwood clones (*Populus deltoides* Bartram ex Marsh.) with tissue culture // African Journal of Biotechnology. 2013. Vol. 10, N 16. P. 3216-3221.
10. Tullus Hardi, Tullus Arvo, Soo Tea, Vares Aivo Hybrid aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) complex study programme in hemiboreal Estonia // The 23rd Session of IPC. Estonian University of Life Sciences. 2008. P. 183.
11. Lopez-Aljorna A., Bueno M.A., Aguinalde I., Martrin J.P. Fingerprinting and genetic variability in cork oak (*Quercus suber* L.) elite trees using ISSR and SSR markers // Ann. For. Sci. 2007. Vol. 64. P. 773-779.
12. Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O., Bondarenko E. Preliminary Comparative Analysis of Phenological Varieties of *Quercus robur* by ISSR-Markers // J. of Botany. Vol. 2016. Article ID 7910451. 7 pages. 2016. doi:10.1155/2016/7910451.
13. Nei M., Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases // Proct. Natl Acad. Sci. USA. 1979. Vol. 76, N 10. P. 5269-5273.
14. Yap I.V., Nelson R.J. WinBoot A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms – International Rice Research Institute Philippines. 1996. 22 p.

Поступила в редакцию 03.07.17

E.V. Lutsenko, V.A. Chokheli, A.V. Vereschagina, M.M. Sereda

GENETIC DIFFERENTIATION OF CLONES OF *POPULUS TREMULA* L. USING ISSR MARKERS GROWN IN VITRO

The state-of-the-art in the field of plant breeding of the species *Populus tremula* L. in the Rostov region is discussed. The results of the experiment to obtain healthy explants of aspen by the method of clonal micropropagation are present-

ed. It is noted that it is best to sterilize samples in a solution of 70 % ethanol, then in 0.1 % solution of mercuric chloride (5 minutes) with subsequent washing in distilled water 3 times for 15 minutes. A modified technology of tissue culture *in vitro* in relation to woody species is described. It was observed that the optimal medium for direct regeneration of aspen from lamina is the medium WPM containing 0.4 mg/l TDZ. Multiplication of shoots was produced on MS medium supplemented with 1 mg/l BAP. Rooting of shoots was carried out on White's medium. The possibility of using ISSR markers for evaluation of genetic relatedness of aspen clones was investigated. 16 ISSR-fragments were detected in total, 4 of which were unique fragments, and 9 were polymorphic, accounting for 60.1 %.

Keywords: *Populus tremula* L., *in vitro* culture, micropropagation, explants, ISSR-markers, polymorphism.

REFERENCE

1. Kozlovskij B.L., Ogorodnikova T.K., Kuropjatnikov M.V. and Fedorinova O.I. *Assortiment drevesnyh rastenij dlja zelenogo stroitel'stva v Rostovskoj oblasti* [Assortment of woody plants for green building in the Rostov region], Rostov-na-Donu: JuFU, 2009, 416 p. (in Russ.).
2. Petrova G.A. [Obtaining a healthy planting material of aspen (*Populus tremula* L.) from callus tissue for the purpose of healing aspen in the Republic of Tatarstan], in *Uchenye zapiski Kazanskoy gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny im. N.E. Baubana*, 2011, no 205, pp. 169-173 (in Russ.).
3. *Plantarium / Otkrytyj atlas sosudistykh rastenij Rossii i sopredel'nykh stran* [Plantarium / An open atlas of vascular plants in Russia and neighboring countries], URL: <http://www.plantarium.ru/page/view/item/46458.html> (accessed: 23.03.2015) (in Russ.).
4. Lucenko E.V. [Development of technology for obtaining drought-resistant aspen shape by the methods of cellular engineering], in *Nedelja nauki – 2015*, Rostov-na-Donu: JuFU, 2015, pp. 8-10 (in Russ.).
5. Lucenko E.V., Sereda M.M. and Lysenko O.G. [Optimization of microclonal propagation of aspen (*Populus tremula* L.)], in *Sb. tr. 4 Mezhdunar. nauchn. Internet konf. "Biotehnologija. Vzglyad v budushee"*, 2015, pp. 88-92 (in Russ.).
6. Mihajlov L.E. *Osina* [Aspen], M.: Agropromizdat, 1985, 72 p. (in Russ.).
7. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, in *Physiologia plantarum*, 1962, vol. 15, no 3, pp. 473-497.
8. Peternel Š. et al. In vitro propagation of European aspen (*Populus tremula* L.) from axillary buds via organogenesis, in *Scientia horticulturae*, 2009, vol. 121, no 1, pp. 109-112.
9. Cavusoglu A. et al. Direct and indirect plant regeneration from various explants of eastern cottonwood clones (*Populus deltoides* Bartram ex Marsh.) with tissue culture, in *African Journal of Biotechnology*, 2013, vol. 10, no 16, pp. 3216-3221.
10. Tullus Hardi, Tullus Arvo, Soo Tea and Vares Aivo. Hybrid aspen (*Populus tremula* L. × *P. tremuloides* Michx.) complex study programme in hemiboreal Estonia, in *The 23rd Session of IPC. Estonian University of Life Sciences*, Beijing, October 26–30, 2008, pp. 183.
11. Lopez-Aljorna A., Bueno M.A., Aguinalde I. and Martrin J.P. Fingerprinting and genetic variability in cork oak (*Quercus suber* L.) elite trees using ISSR and SSR markers, in *Ann. For. Sci.*, 2007, vol. 64, pp. 773-779.
12. Chokheli V., Kozlovsky B., Sereda M., Lysenko V., Fesenko I., Varduny T., Kapralova O. and Bondarenko E. Preliminary Comparative Analysis of Phenological Varieties of *Quercus robur* by ISSR-Markers, in *Journal of Botany*, vol. 2016, Article ID 7910451, 7 pages, 2016, doi:10.1155/2016/7910451.
13. Nei M. and Li W.-H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases, in *Proct. Natl Acad. Sci. USA*, 1979, vol. 76, no 10, pp. 5269-5273.
14. Yap I.V. and Nelson R.J. WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendrograms – International Rice Research Institute Philippines, 1996, 22 p.

Луценко Елена Витальевна, бакалавр
E-mail: lev-1311@yandex.ru

Чохели Василий Александрович,
аспирант, младший научный сотрудник
E-mail: vachokheli@sfedu.ru

Верещагина Алена Вадимовна, бакалавр
E-mail: knh2009alyonka@yandex.ru

Середа Михаил Михайлович,
кандидат биологических наук, доцент, заведующий
кафедрой ботаники
E-mail: seredam@yandex.ru

ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет»
344041, Россия, г. Ростов-на-Дону,
пер. Ботанический спуск, 7

Lutsenko E.V., Bachelor
E-mail: lev-1311@yandex.ru

Chokheli V.A.,
postgraduate, junior researcher
E-mail: vachokheli@sfedu.ru

Vereshchagina A.V., Bachelor
E-mail: knh2009alyonka@yandex.ru

Sereda M.M.
Candidate of Biology, Associate Professor,
Head of the Department of Botany
E-mail: seredam@yandex.ru

Southern Federal University
344041, Russia, Rostov-on-Don, per. Botanical descent, 7