

УДК 581.143.6

ИССЛЕДОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ВАРИАБЕЛЬНОСТИ АДВЕНТИВНЫХ МИКРОПОБЕГОВ *Picea pungens* Engelm. С ПОМОЩЬЮ ДНК-МАРКЕРОВ И ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Т. В. Железниченко¹, Д. С. Мурасева¹, С. В. Асбаганов¹, М. С. Воронкова¹,
А. В. Заушинцена², Т. И. Новикова¹

¹Центральный сибирский ботанический сад СО РАН
630090, Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101

²Кемеровский государственный университет
650000, Кемерово, ул. Красная, 6

E-mail: zhelez05@mail.ru, dsmuraseva@csbg.nsc.ru, cryonus@mail.ru, bmc_87@mail.ru,
alexaz58@yandex.ru, tin27@mail.ru

Поступила в редакцию 13.03.2020 г.

Впервые исследовали генетическую вариабельность/стабильность микропобегов ели колючей *Picea pungens* Engelm., полученных в культуре *in vitro* путем прямой регенерации из зиготических зародышей под действием синтетического регулятора роста с цитокининовой активностью N-фенил-N'-1, 2, 3-тидiazурол-5-мочевины, или тидiazурона (ТДЗ), с помощью ISSR- и RAPD-анализов, а также методом проточной цитометрии. Побегообразование индуцировали на среде ½ LV, используя две концентрации ТДЗ (0.5 или 1 мкмоль) в течение 28 сут, затем растительный материал переносили на безгормональную питательную среду ½ LV на 35 сут. Сформировавшиеся микропобеги отделяли от тканей экспланта и культивировали на безгормональных средах того же состава еще один пассаж (35 сут), затем оценивали их генетическую стабильность. Для оценки влияния каждой концентрации регулятора роста на стабильность генома использовали микропобеги, образованные тремя разными генотипами растений-доноров. С помощью ISSR-анализа выявлен незначительный полиморфизм между микропобегами ели колючей, образованными у одного генотипа с помощью молекулярно-генетического анализа. Показано, что генетическая вариабельность регенерантов у отдельных генотипов составляла от 1.29 до 1.58 %, в то время как у других генотипов сохранялась 100 % генетическая стабильность микропобегов. В то же время RAPD-анализ не показал различий между анализируемыми образцами, все исследуемые праймеры инициировали мономорфные спектры. Методом проточной цитометрии установлено, что все исследованные образцы были диплоидными. Содержание ДНК (2С) в микропобегах варьировало от (38.86 ± 0.55) до (40.35 ± 0.30) пг, а размер генома (1С) (18 961.79 ± 256.91) – (19 933.27 ± 526.35) млн п. н. Полученные результаты свидетельствуют о низком уровне соматической изменчивости микропобегов ели колючей, образованных *in vitro* в результате прямой регенерации из зиготических зародышей под действием исследуемых концентраций ТДЗ.

Ключевые слова: культура *in vitro*, регенерация микропобегов, тидiazурон, ISSR- и RAPD-анализ, проточная цитометрия, ель колючая.

DOI: 10.15372/SJFS20200406

ВВЕДЕНИЕ

Ель колючая *Picea pungens* Engelm. – один из наиболее известных и ценных хвойных видов Северной Америки, широко культивируемый в странах Северного полушария в качестве декоративной культуры благодаря уникальной се-

ребристо-голубой окраске хвои и правильной пирамидальной форме кроны. Такая популярность этого древесного растения обусловлена не только высокой декоративностью, но и нетребовательностью к условиям произрастания, морозостойкостью и устойчивостью к воздушным загрязнениям по сравнению с другими видами

елей. Ель колючая декоративна в течение всего года. Спектр цвета хвои ели колючей варьирует от чисто зеленого и зелено-голубого до бело-серебристого и стального голубого. Окрас хвои обусловлен как генотипом отдельной особи, так и условиями произрастания (Afele, Saxena, 1995). Уникальный цвет хвои часто не передается потомкам, и даже при многолетнем контролируемом опылении лишь половина семян наследуют его (Cram, 1984).

В настоящее время ель колючую размножают либо черенками, либо прививкой отборных генотипов на другие виды елей (ель обыкновенную *P. abies* (L.) H. Karst., ель сизую *P. glauca* (Moench) Voss), но эти традиционные методы трудоемки и малоэффективны (Lyon, 1983; Kirdar et al., 2009). В связи с этим для массового размножения элитных форм и сортов ели колючей необходима разработка более эффективного способа регенерации. В этом случае культура клеток и тканей может служить альтернативой при клонировании ели колючей, поскольку позволяет размножать уникальные генотипы растений и сохранять ценные генетические ресурсы. Однако культивирование *in vitro* может приводить к значительным фенотипическим изменениям растений-регенерантов (Clarindo et al., 2008). Это явление связывают с соматической изменчивостью, которая часто является следствием изменения наследственного материала (Larkin, Scowcroft, 1981). При этом выделяют небольшие генетические изменения, такие как точечные мутации, делеции, изменения последовательности генов или их амплификацию, активацию ретротранспозонов, изменения динамики метилирования генов и активности промоторов, модификации гетерохроматина (Kaeppler et al., 2000; Saker et al., 2000). Наиболее предпочтительным инструментом для анализа подобных изменений у размноженных *in vitro* растений являются молекулярные маркеры, такие как анализ простых межмикросателлитных последовательностей (ISSR-маркеры) или случайно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD-маркеры). Более крупные цитогенетические перестройки, к которым относят хромосомные aberrации, полиплоидию, анеуплоидию (Ali et al., 2016) можно выявить при помощи методов проточной цитометрии.

Установлено, что на частоту соматической изменчивости влияют многие факторы, связанные с культивированием *in vitro*: тип экспланта, генотип растения-донора, состав питательной среды, комбинация регуляторов роста

растений, продолжительность культивирования и др. (Bhojwani, 1992; Nehra et al., 1992; Kumar, Mathur, 2004; Mishiba et al., 2006). В связи с этим при разработке протоколов микроразмножения ценных генотипов большое значение, особенно при коммерческом применении этой технологии, имеет выявление соматической изменчивости (Bhojwani, 1992).

В последнее время при клональном микроразмножении древесных растений широко используют синтетический регулятор роста – тидиазурон (ТДЗ) (Zaytseva et al., 2016; Zaytseva, Novikova, 2018; Железниченко и др., 2019). ТДЗ, или N-фенил-N'-1,2,3-тидiazурол-5-мочевину, в первую очередь рассматривают как синтетический цитокинин, но его уникальность заключается в способности одновременно проявлять как ауксиновую, так и цитокининовую активность, при этом по химическому строению он отличается от используемых ауксинов и цитокининов (Murthy et al., 1998). Считается, что ТДЗ обладает высокой эффективностью по сравнению с другими регуляторами роста с цитокининовой активностью, например с 6-бензиладенином (БАП) (Nieuwkirk et al., 1987). До сих пор нет информации о влиянии этого регулятора роста на проявление соматической изменчивости при клональном микроразмножении хвойных растений, в частности ели колючей.

В связи с этим цель исследования – оценка генетической вариабельности адвентивных микропобегов у разных генотипов ели колючей, полученных под действием ТДЗ с использованием ISSR- и RAPD-анализов и метода проточной цитометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал. Семена ели колючей, произрастающей в искусственных насаждениях Академгородка г. Новосибирска, собирали со свободноопыленных деревьев-доноров, имеющих выраженную голубую окраску хвои. Отбор образцов проводили в начале сентября 2018 г.

Индукция адвентивного побегообразования. Эксплантами для регенерации адвентивных микропобегов были зрелые зиготические зародыши. Перед введением материала в культуру *in vitro* проводили поверхностную стерилизацию согласно разработанным ранее протоколам (Железниченко, Новикова, 2017; Железниченко и др., 2019). Зародыши культивировали на питательной среде ½ LV (Litvay et al., 1985) с добав-

лением мезоинозита – 100 мг/л (Sigma-Aldrich®, США), глутаминовой кислоты – 500 мг/л (Sigma-Aldrich, США), гидролизата казеина – 500 мг/л (Fluca Analytical, США) и агара – 0.7 % (PanReac®, Испания). Питательные среды доводили до pH 5.8, затем автоклавировали (121 °C, 110 кПа, 20 мин). Индукцию адвентивного побегообразования стимулировали внесением в питательные среды ТДЗ (BioReagent, Sigma-Aldrich® США), предварительно растворенным в 95 % этиловом спирте, в концентрации 0.5 или 1 мкмоль. Культивирование проводили под люминесцентными лампами с интенсивностью освещения 2.24 клк при (23 ± 2) °C и 16-часовом фотопериоде. Длительность первого пассажа (на средах с регулятором роста) составляла 28 сут, затем материал культивировали на безгормональных питательных средах, при этом пассаж увеличивали до 35 сут (Железниченко и др., 2019). Образовавшиеся микроробеговы отделяли от тканей экспланта и культивировали на безгормональных средах в течение 35 сут, затем оценивали их генетическую стабильность. Микроробеговы сравнивали между собой в пределах одного генотипа. Контролем служила разросшаяся ткань эксплантов (Железниченко и др., 2019).

Анализ генетической стабильности молекулярно-генетическими методами. Геномную ДНК выделяли из живых тканей, разросшихся эксплантов и микроробегов согласно протоколу коммерческого комплекта Diamond DNA Plant Kit D (DiamondDNA, Россия). Выделенную ДНК растворяли в 100 мкл ТЕ-буфера (DiamondDNA, Россия). Концентрацию и качество выделенной ДНК оценивали с помощью спектрофотометра BioSpectrometer kinetic (Eppendorf, Германия) при $\lambda = 280$ нм, используя микрокувету μ Cuvette G1.0 (Eppendorf, Германия). Перед постановкой ПЦР все образцы ДНК разводили до 5 нг/мкл буфером для разведения ДНК (Евроген, Россия). Для первичного скрининга использовали 19 ISSR и 12 RAPD праймеров.

Реакцию ПЦР проводили в амплификаторе С-1000 (Bio-Rad, USA) в объеме 15 мкл. Стандартная реакция содержала однократный Taq-буфер (Евроген, Россия), смесь по 0.2 мМ каждого dNTP (Евроген, Россия), 2.5 мМ MgCl₂ (Евроген, Россия), 1 мкмоль ISSR или RAPD праймера (Евроген, Россия), 1.5 ед. HSTaq ДНК полимеразы (Евроген, Россия) и 10 нг геномной ДНК.

Амплификацию для ISSR-анализа проводили по следующей программе: первичная денатурация при 94 °C 4 мин, затем при 96 °C 1 мин.;

40 циклов: денатурация при 94 °C 10 с, отжиг праймеров при 56 °C 20 с, элонгация при 72 °C 2 мин; финальная элонгация при 72 °C 5 мин и хранение при 4 °C до дальнейшего использования.

RAPD-анализ проводили по следующей программе амплификации: первичная денатурация при 94 °C 3 мин, затем при 96 °C 1 мин; 40 циклов: денатурация при 94 °C 15 с, отжиг праймеров при 40 °C (OPA 02) или 41 °C (OPF 13, OPF 07, OPZ 07) 25 с, элонгация при 72 °C 2 мин; финальная элонгация при 72 °C 7 мин и хранение при 4 °C до дальнейшего использования.

Аликвоту ПЦР, содержащую исследуемый фрагмент, анализировали электрофорезом в 1.7 % агарозном геле в однократном ТАЕ-буфере при напряжении 4 V/cm в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I. Использовали маркер длин ДНК 100 + bp DNA Ladder (Евроген, Россия). Визуализировали в системе гель-документирования Gel Doc XR+ (BioRad, USA).

Анализ генетической стабильности методом проточной цитометрии. Содержание ядерной ДНК растений определяли методом проточной цитометрии с окраской изолированных ядер йодидом пропидия (PI). Анализ проводили на приборе CyFlow Space (Sysmex Partec, Германия) с лазерным источником излучения 532 нм (Doležel et al., 2007). Измерения проводились на ядрах, извлеченных из живых тканей молодых почек у трех разных генотипов (Γ_1 – Γ_3) деревьев ели колючей, вступивших в фазу семеношения и произрастающих в парковой зоне Академгородка г. Новосибирска. Также анализировали микроробеговы, полученные от разных генотипов деревьев-доноров (Γ_4 – Γ_9) в культуре *in vitro* под действием ТДЗ (0.5 и 1 мкмоль).

Для получения суспензии ядер одновременно измельчали анализируемый материал и внутренний стандарт в 500 мкл охлажденного коммерческого буфера (Nuclei extraction buffer, Partec, Германия) с добавлением поливинилпирролидона, затем инкубировали при комнатной температуре 2 мин.

В качестве внутреннего стандарта использовали свежие листья петрушки кудрявой *Petroselinum crispum* (Mull.) Fuss (2С = 4.5 пг), предложенного в качестве альтернативного стандарта (Obermayer et al., 2002; Скапцов и др., 2016). Выделение, окрашивание ядер и анализ образцов и стандарта происходили одновременно (Doležel, 1991).

Образцы фильтровали через фильтр CellTrics (нейлоновую мембрану) с размером пор 50 мкм (Sysmex Partec, Германия) для отделения клеток и смешивали с 2 мл раствора для окрашивания, состоящего из буфера (Staining Buffer) (Sysmex Partec, Германия) (50 мкг/мл) и RNase A (50 мкг/мл). Для получения достоверных результатов проводили анализ 3–8 образцов на генотип.

Содержание ДНК 2С рассчитано исходя из линейной зависимости между флуоресцентными сигналами от окрашенных ядер исследованных образцов и внутренним стандартом (Doležal et al., 2007).

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft Inc.) и штатного программного обеспечения проточного цитометра CyFlow® Space.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке системы регенерации ели колючей в культуре *in vitro* в качестве эксплантов использовали зрелые зиготические зародыши, поскольку у хвойных сложно индуцировать процессы морфогенеза из других типов эксплантов (Tang, Newton, 2005; Jerico et al., 2012). С помощью гистологического анализа установили, что при культивировании зародышей ели колючей на среде с ТДЗ в концентрациях 0.5 или 1 мкмоль в течение 28 сут происходит разрастание тканей первичных эксплантов без образования промежуточного каллуса, что указывает на прямой путь морфогенеза (Железниченко и др., 2019). Считается, что при прямом пути регенерации в культуре *in vitro* соматоклональные изменения у растений-регенерантов по сравнению с материнским растением минимальны, что подтверж-

дается рядом авторов (Takagi et al., 2011; Эрст и др., 2015; Erst et al., 2015; Novikova et al., 2020). Однако в наших исследованиях (Железниченко и др., 2019) отмечено, что при культивировании зародышей ели колючей под действием ТДЗ в концентрациях 0.5 и 1 мкмоль наблюдали формирование разнообразных морфогенных структур, а именно: адвентивных почек, микропобегов, а также отдельных хвоинок из разросшихся тканей первичных эксплантов. Увеличение концентрации регулятора роста в питательной среде стимулировало возникновение аномальных структур (хвоинок, микропобегов аномальной морфологии). Следовательно, необходимо исследование генетической вариабельности сформированных адвентивных микропобегов под действием указанных концентраций ТДЗ. Кроме того, в настоящее время в литературе нет данных о влиянии ТДЗ на соматоклональную изменчивость исследуемого вида *in vitro*.

Поскольку хвойные являются анемофильными растениями и их семена имеют очень большое разнообразие даже в пределах одной шишки (Losada, Leslie, 2018), то сравнить генетическую идентичность микропобегов с материнским растением не представлялось возможным. В связи с этим проводили сравнение сформированных микропобегов между собой, используя в качестве контроля разросшиеся ткани эксплантов (зиготических зародышей).

В настоящем исследовании анализировали микропобеги ели колючей, полученные по разработанному ранее протоколу (Железниченко и др., 2019) методами молекулярно-генетической диагностики и проточной цитометрии (рис. 1).

Возможные соматоклональные изменения микропобегов, индуцируемых ТДЗ в концентрации 0.5 и 1 мкмоль, изучали, используя

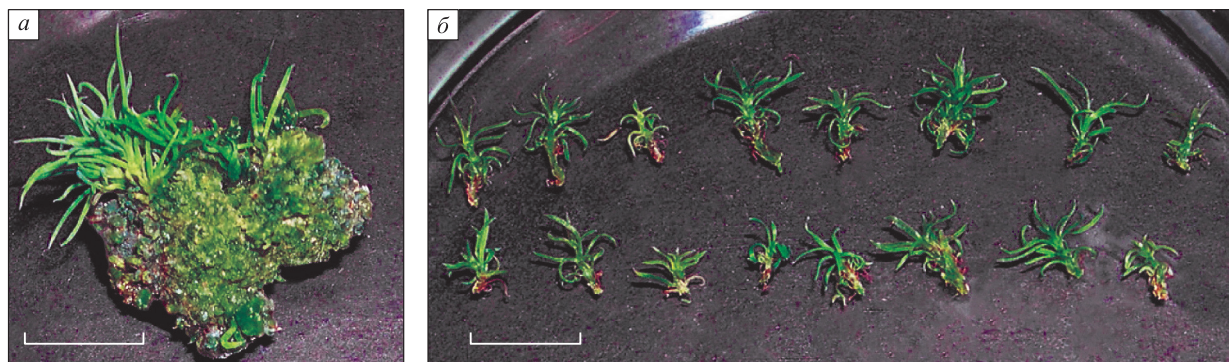


Рис. 1. Микропобеги ели колючей, сформированные после культивирования эксплантов на питательной среде $\frac{1}{2}$ LV, дополненной 0.5 мкмоль ТДЗ (первый пассаж) в течение 28 сут с последующим переносом на безгормональную среду $\frac{1}{2}$ LV (второй пассаж – 35 сут): а – на экспланте; б – изолированные из тканей экспланта. Масштаб 1 см.

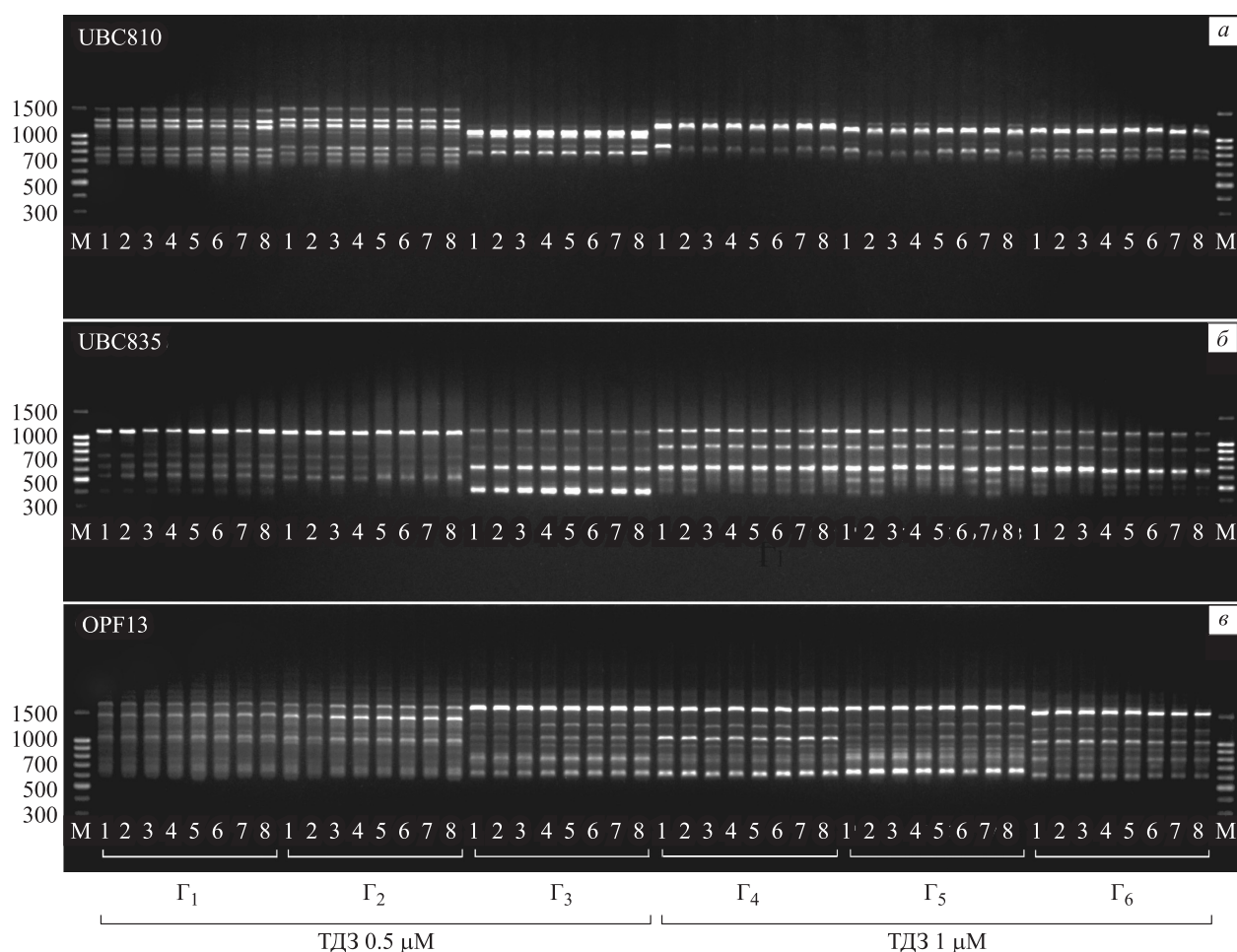


Рис. 2. Электрофореграммы продуктов амплификации ДНК материнского растения и микроробегов ели колючей разных генотипов (Γ_1 – Γ_6), индуцированных *in vitro* при воздействии разных концентраций (0.5 и 1 мкмоль) ТДЗ: а, б – ISSR-маркеры (UBC 810, UBC 835); в – RAPD-маркеры (OPF 13); 1 – ткань разросшегося экспланта (контроль); 2–8 – микроробегов; Γ_1 , Γ_2 , Γ_3 – генотипы, культивируемые при 0.5 мкмоль ТДЗ; Γ_4 , Γ_5 , Γ_6 – генотипы, культивируемые при 1 мкмоль ТДЗ; М – маркер молекулярной массы 100 п. н.

ISSR- и RAPD-маркеры. Первичный скрининг 19 ISSR- и 12 RAPD-праймеров позволил отобрать 13 ISSR- и 4 RAPD-маркеров. Суммарно исследовали 17 маркеров (ISSR и RAPD).

Всего проанализировали шесть генотипов (Γ_1 – Γ_6) – по три на каждую концентрацию регулятора роста. В пределах каждого генотипа анализировали по восемь образцов: 1 – разросшиеся ткани экспланта (контроль) и 2–8 – микроробегов, образованные у одного генотипа. Выявили от одного до двенадцати амплифицируемых фрагментов, размер которых варьировал от 300 до 2500 п. н., при этом количество и длина бэндов отличались в зависимости от генотипа растения-донора (рис. 2, табл. 1).

Из 13 исследуемых ISSR-маркеров 10 оказались мономорфными у всех исследуемых генотипов независимо от концентрации ТДЗ и только 3 ISSR-паттерна показали полиморфизм.

При этом наблюдали различия в зависимости от генотипа материнского растения, а также от концентрации регулятора роста в питательной среде. Так, при культивировании на средах с более низким содержанием (0.5 мкмоль) ТДЗ только у одного генотипа (Γ_2) наблюдали полиморфизм по одному маркеру (UBC 818). Увеличение концентрации (1 мкмоль) ТДЗ индуцировало увеличение полиморфизма микроробегов у двух (Γ_4 , Γ_6) из трех исследуемых генотипов. Это детектировалось праймерами UBC 808 и UBC 841. Установлено, что отдельные генотипы ели колючей не подвержены влиянию ТДЗ в концентрации 0.5 и 1 мкмоль, в то время как у других возникает соматоклональная изменчивость (1.58 %) и наблюдаются незначительные различия как между микроробегов, так и по сравнению с материнским растением. В то же время RAPD-анализ не выявил различий меж-

Таблица 1. Список ISSR- и RAPD-маркеров и число амплифицированных фрагментов в образцах ДНК, выделенных из тканей материнского растения и микропобегов разных генотипов ($\Gamma_1, \Gamma_2, \Gamma_3, \Gamma_4, \Gamma_5, \Gamma_6$) ели колючей, сформированных в результате культивирования *in vitro* при разных концентрациях (0.5 и 1 мкмоль) ТДЗ

Маркер	ТДЗ 0.5 мкмоль									ТДЗ 1 мкмоль								
	Γ_1			Γ_2			Γ_3			Γ_4			Γ_5			Γ_6		
	О. ч. б. ¹	М. б. ²	П. б. ³	О. ч. б. ¹	М. б. ²	П. б. ³	О. ч. б. ¹	М. б. ²	П. б. ³	О. ч. б. ¹	М. б. ²	П. б. ³	О. ч. б. ¹	М. б. ²	П. б. ³	О. ч. б. ¹	М. б. ²	П. б. ³
<i>Межмикросателлитные последовательности (ISSR-маркеры)</i>																		
UBC808	9	9	0	6	6	0	5	5	0	5	5	0	6	6	0	10	9	1
UBC817	5	5	0	5	5	0	5	5	0	6	6	0	7	7	0	6	6	0
UBC856	6	6	0	4	4	0	5	5	0	3	3	0	4	4	0	4	4	0
UBC873	4	4	0	5	5	0	5	5	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0
UBC835	5	5	0	6	6	0	5	5	0	5	5	0	5	5	0	6	6	0
UBC830	5	5	0	6	6	0	5	5	0	6	6	0	5	5	0	6	6	0
UBC842	5	5	0	5	5	0	5	5	0	5	5	0	5	5	0	5	5	0
UBC811	6	6	0	7	7	0	7	7	0	6	6	0	5	5	0	6	6	0
UBC810	9	9	0	9	9	0	5	5	0	6	6	0	5	5	0	4	4	0
UBC818	3	3	0	11	10	1	7	7	0	2	2	0	2	2	0	2	2	0
UBC823	3	3	0	1	1	0	1	1	0	3	3	0	3	3	0	3	3	0
UBC826	7	7	0	6	6	0	6	6	0	7	7	0	6	6	0	8	8	0
UBC841	9	9	0	6	6	0	6	6	0	7	6	1	5	5	0	8	7	1
Мономорфизм, %	100			98.7			100			98.41			100			98.5		
Полиморфизм, %	0			1.29			0			1.58			0			1.42		
<i>Случайно амплифицированная полиморфная ДНК (RAPD-маркеры)</i>																		
OPA02	4	4	0	4	4	0	5	5	0	4	4	0	4	4	0	4	4	0
OPF13	9	9	0	10	10	0	12	12	0	8	8	0	9	9	0	9	9	0
OPF07	6	6	0	6	6	0	5	5	0	5	5	0	6	6	0	5	5	0
OPZ07	7	7	0	5	5	0	5	5	0	9	9	0	7	7	0	7	7	0
Мономорфизм, %	100			100			100			100			100			100		
Полиморфизм, %	0			0			0			0			0			0		

Примечание. Рассмотрено число бэндов в пределах каждого генотипа: ¹ – общее число бэндов на генотип; ² – мономорфные бэнды; ³ – полиморфные бэнды.

ду анализируемыми образцами, все исследуемые праймеры инициировали мономорфные спектры (см. рис. 2, табл. 1).

Наши данные согласуются с работами других авторов по исследованию регенерации древесных растений под действием ТДЗ. Например, при прямой регенерации рододендрона остроколючего *Rhododendron mucronulatum* Turcz. с использованием концентрации ТДЗ 0.1–2.5 мкмоль генетическая стабильность микропобегов сохранялась в пределах 98–99 % (Novikova et al., 2020). Растения-регенеранты моринги иноземной *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori, полученные в культуре *in vitro* под действием ТДЗ, сохраняли сходство с материнским растением на 98 % (Purayil et al., 2018), а саксаула белого *Haloxylon persicum* Bunge ex Boiss. & Buhse – на 100 % (Kurup et al., 2018). Из используемых нами

генетических маркеров ISSR-маркеры являются наиболее предпочтительными, поскольку обладают высоким полиморфизмом и имеют большую воспроизводимость по сравнению с RAPD (Ray et al., 2006), а также сниженное появление различных артефактов (Bornet, Branchard, 2001).

Для исследования крупных цитологических перестроек, касающихся изменений на уровне хромосом (поли- и анеуплоидия), применяли методы проточной цитометрии. Хвойные растения обладают большим (6500–37 000 Mb) и сложно организованным геномом (Седельникова, 2015). Для достоверного определения размера генома вида необходимо проведение анализа нескольких генотипов растений минимум в трех повторностях, что позволяет выявить вариации в процедуре и оценить различия между растениями. В наших исследованиях проанализировано по три

Таблица 2. Относительное содержание ДНК и размер генома разных генотипов (Γ_1 – Γ_3) деревьев, вступивших в фазу семеношения (*in vivo*), а также микропобегов разных генотипов (Γ_4 – Γ_9) ели колючей, сформированных в результате культивирования *in vitro* при разных концентрациях (0.5 и 1 мкмоль) ТДЗ

Образец	Генотип	Количество обр. ¹	2С, пг	Размер генома (1С, млн п. н. ²)	Коэффициент вариации, %
Вегетативные почки*	Γ_1	3	40.34 ± 0.17	19 344.84 ± 332.08	0.43
	Γ_2	5	39.24 ± 1.70	18 956.9 ± 590.09	4.35
	Γ_3	8	39.10 ± 0.60	19 967.5 ± 610.31	1.54
Микропобеги**	Γ_4	4	39.37 ± 0.48	19 287.79 ± 231.91	1.24
	Γ_5	6	39.01 ± 0.62	18 961.79 ± 256.91	1.61
	Γ_6	7	39.95 ± 0.51	19 664.32 ± 316.35	1.30
Микропобеги***	Γ_7	5	40.35 ± 0.30	19 455.68 ± 395.46	0.75
	Γ_8	7	38.86 ± 0.55	19 097.08 ± 479.22	1.43
	Γ_9	6	40.15 ± 1.20	19 933.27 ± 526.35	2.99

Примечание. ¹ – количество проанализированных образцов; ² – 1 пг ДНК = 978 Мбп (Doležel et al., 2003); 2С – содержание диплоидной ДНК, пг; *вегетативные почки, собранные с деревьев ели колючей, произрастающих в парковой зоне Академгородка г. Новосибирска; **микропобеги, сформированные *in vitro* в результате прямого органогенеза под действием 0.5 мкмоль ТДЗ; ***микропобеги, сформированные *in vitro* в результате прямого органогенеза под действием 1 мкмоль ТДЗ.

генотипа (деревья *in vivo*, микропобеги, сформированные *in vitro* при разной концентрации ТДЗ) и по 3–8 образцов на генотип. При исследовании количества ДНК ели колючей в образцах, полученных *in vitro*, анализировали только микропобеги, полученные под действием разных концентраций ТДЗ. Ткани разросшихся эксплантов не использовали для анализа, поскольку в них имелись некротические участки, которые могли повлиять на адекватность полученных результатов.

Установлено, что все исследуемые образцы были с одинаковым уровнем ploидности (диплоидны). Известно, что растения ели колючей являются диплоидами с числом хромосом $2n = 24$ (Ohri, Khoshoo, 1986; Hizume, 1988). Содержание ДНК у деревьев, вступивших в фазу семеношения, варьировало от 39.1 до 40.34 пг, т. е. количество ДНК различалось между образцами примерно на 2-3 % (табл. 2). В микропобегах, сформированных под действием низкой концентрации ТДЗ (0.5 мкмоль), количество ДНК не отличалось как в пределах одного генотипа, так и между исследованными генотипами и составляло 39.01–39.95 пг, тогда как в микропобегах, сформированных на средах с 1 мкмоль ТДЗ, выявлены различия в содержании ДНК (2С = 38.86–40.35 пг) между исследуемыми генотипами, но в пределах генотипа содержание ДНК почти не различалось.

Наши данные по содержанию ДНК согласуются с более ранними исследованиями, в которых количество ДНК у ели колючей составляло 2С ((40.03 ± 1.39) пг) (Ohri, Khoshoo, 1986). Раз-

мер генома исследуемых нами деревьев варьировал в пределах 18 956.9–19 967.5 млн п. н. и имел сходные значения с исследуемыми микропобегами (18 961.79–19 933.27 млн п. н.). Геном микропобегов, сформированных под действием ТДЗ, не отличался по размеру как в пределах генотипа, так и между генотипами и не зависел от концентрации регулятора роста в среде.

По мнению некоторых исследователей, варьирование размера генома может быть связано с изменением числа хромосом, содержанием ядерной ДНК, а также различных повторяющихся последовательностей (Хемлебен и др., 2003; Гамалей, Шереметьев, 2012). Стоит отметить, что в классе хвойные наблюдается наибольшее число различных хромосомных нарушений и аномалий по сравнению с другими классами, в том числе формирование добавочных хромосом (В-хромосом), которые наиболее часто встречаются у представителей рода ели (Муратова, 2000). Например, у североамериканского вида ели сизой число добавочных хромосом может достигать 6 ($2n = 24 + 1-6 В$) (Rees et al., 1977; Teoh, Rees, 1977), тогда как кариотип ели колючей – $2n = 24 + 0-1 В$ (Владимирова и др., 2007; Богданова, 2009; Седельникова и др., 2010). Установлено, что у особей ели сизой наличие одной В-хромосомы увеличивает количество ДНК на 2.7 % (Teoh, Rees, 1977). Вероятно, в наших исследованиях вариативность содержания ДНК трех генотипов (Γ_1 – Γ_3) деревьев связана с наличием добавочных хромосом, что требует дальнейшего исследования.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, впервые проведено исследование генетической вариабельности микропобегов ели колючей, индуцированных путем прямой регенерации в культуре *in vitro* под действием ТДЗ и культивирующихся в течение трех пассажей с использованием ISSR- и RAPD-анализов, а также метода проточной цитометрии. Молекулярно-генетический анализ выявил, что ТДЗ в концентрации 0.5 и 1 мкмоль приводит к незначительному полиморфизму (1.29–1.58 %) регенерантов ели колючей у одних генотипов, в то время как у других отмечена 100 % генетическая стабильность микропобегов как между собой, так и по отношению к материнскому растению. С помощью метода проточной цитометрии установлено, что крупные цитологические перестройки у микропобегов в пределах одного генотипа отсутствуют. ТДЗ в концентрации 0.5 и 1 мкмоль не влияет на стабильность уровня пloidности, содержания ДНК и размера генома микропобегов ели колючей в пределах одного генотипа.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 18-34-00434 мол_а). В статье рассматривается материал коллекции *in vitro* лаборатории биотехнологии ЦСБС СО РАН, представляющий УНУ «Коллекция живых растений в открытом и закрытом грунте», USU_440534.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ (REFERENCES)

- Богданова Е. В. Кариологическое изучение *Picea pungens* Engelm. в условиях интродукции // Бюл. Бот. сада Саратов. гос. ун-та. 2009. № 8. С. 219–223 [Bogdanova E. V. Kariologicheskoe izuchenie *Picea pungens* Engelm. v usloviyakh introduktsii (Karyological study of *Picea pungens* Engelm. under conditions of introduction) // Byul. Bot. sada Saratov. gos. un-ta (Bull. Bot. garden Saratov St. Univ.). 2009. N. 8. P. 219–223 (in Russian)].
- Владимирова О. С., Муратова Е. Н., Карпук Т. В. Числа хромосом некоторых видов *Picea* и *Larix* // Ботан. журн. 2007. Т. 92. № 5. С. 781–782 [Vladimirova O. S., Muratova E. N., Karpyuk T. V. Chisla khromosom nekotorykh vidov *Picea* i *Larix* (Chromosome numbers of some *Picea* and *Larix* species) // Botan. zhurn. (Bot. J.). 2007. V. 92. N. 5. P. 781–782 (in Russian with English abstract)].
- Гамалей Ю. В., Шереметьев С. Н. Направления эволюции генома наземных и вторично-водных трав // Цитология. 2012. Т. 54. № 6. С. 449–458 [Gamaley Yu. V., Sheremet'ev S. N. Napravleniya evolyutsii genoma nazemnykh i vtorichno-vodnykh trav (Trends of genome evolution in land and secondary-water herbs) // Tsitologiya (Cytology). 2012. V. 54. N. 6. P. 449–458 (in Russian with English abstract)].
- Железниченко Т. В., Новикова Т. И. Влияние аскорбиновой кислоты и глутатиона на индукцию соматического эмбриогенеза *Picea pungens* Engelm. // Turczaninowia. 2017. Т. 20. № 3. С. 27–35 [Zheleznichenko T. V., Novikova T. I. Vliyanie askorbinovoy kisloty i glutationa na induktsiyu somaticheskogo embriogenezа *Picea pungens* Engelm. (Effect of ascorbic acid and glutathione on somatic embryogenesis induction in *Picea pungens* Engelm.) // Turczaninowia. 2017. V. 20. N. 3. P. 27–35 (in Russian with English abstract)].
- Железниченко Т. В., Мурасева Д. С., Стасова В. В., Новикова Т. И. Морфогенез *Picea pungens* Engelm. в культуре *in vitro* под действием тидиазурана // Сиб. лесн. журн. 2019. № 1. С. 57–64 [Zheleznichenko T. V., Muraseva D. S., Stasova V. V., Novikova T. I. Morfogenez *Picea pungens* Engelm. v kulture *in vitro* pod deystviem tidiazurona (Morphogenesis of *Picea pungens* Engelm. *in vitro* under the influence of thidiazuron) // Sib. lesn. zhurn. (Sib. J. For. Sci.). 2019. N. 1. P. 57–64 (in Russian with English abstract)].
- Муратова Е. Н. В-хромосомы голосеменных // Усп. совр. биол. 2000. Т. 120. № 5. С. 452–465 [Muratova E. N. V-khromosomy golosemennykh (B chromosomes of gymnosperms) // Usp. sovr. biol. (Success. contemp. biol.). 2000. V. 120. N. 5. P. 452–465 (in Russian with English abstract)].
- Седельникова Т. С. Изменчивость размера генома хвойных в экстремальных условиях произрастания // Усп. совр. биол. 2015. Т. 135. № 5. С. 514–528 [Sedel'nikova T. S. Izmenchivost' razmera genoma khvoynnykh v ekstremalnykh usloviyakh proizrastaniya (Variability of genome size in conifers under extreme environmental conditions) // Usp. sovr. biol. (Success. contemp. biol.). 2015. V. 135. N. 5. P. 514–528 (in Russian with English abstract)].
- Седельникова Т. С., Муратова Е. Н., Пименов А. В. Изменчивость хромосомных чисел голосеменных растений // Усп. совр. биол. 2010. Т. 130. № 6. С. 557–568 [Sedel'nikova T. S., Muratova E. N., Pimenov A. V. Izmenchivost' khromosomnykh chisel golosemennykh rasteniy (Variability of chromosome numbers in gymnosperms) // Usp. sovr. biol. (Success. contemp. biol.). 2010. V. 130. N. 6. P. 557–568 (in Russian with English abstract)].
- Скапцов М. В., Смирнов С. В., Куцев М. Г., Шмаков А. И. Проблемы стандартизации в проточной цитометрии растений // Turczaninowia. 2016. Т. 19. № 3. С. 120–122 [Skaptsov M. V., Smirnov S. V., Kutsev M. G., Shmakov A. I. Problemy standartizatsii v protochnoy tsitometrii rasteniy (Problems of a standardization in plant flow cytometry) // Turczaninowia. 2016. V. 19. N. 3. P. 120–122 (in Russian with English abstract)].
- Хемлебен В., Беридзе Т. Г., Бахман Л., Коварик Я., Торрес Р. Сателлитные ДНК // Усп. биол. хим. 2003. Т. 43. С. 267–306 [Khemleben V., Beridze T. G., Bakhman L., Kovarik Ya., Torres R. Satellitnye DNK (Satellite DNA) // Usp. biol. khim. (Adv. biol. chem.). 2003. V. 43. P. 267–306 (in Russian)].

- Эрст А. А., Звягина Н. С., Новикова Т. И., Дорогина О. В. Клональное микроразмножение редкого вида *Hedysarum theinum* Красноб. (Fabaceae) и оценка генетической стабильности регенерируемых растений с помощью ISSR-маркеров // Генетика. 2015. Т. 51. № 2. С. 188–193 [Erst A. A., Zvyagina N. S., Novikova T. I., Dorogina O. V. Klonal'noe mikrorazmnozhenie redkogo vida *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) i otsenka geneticheskoy stabil'nosti regeneriruyemykh rasteniy s pomoshchyu ISSR-markerov (Clonal micropropagation of a rare species *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) and assessment of the genetic stability of regenerated plants using ISSR markers) // Genetika (Genetics). 2015. V. 51. N. 2. P. 188–193 (in Russian with English abstract)].
- Afele J. C., Saxena P. K. Somatic embryogenesis in blue spruce (*Picea pungens* Engelm.) // Somatic embryogenesis in woody plants. For. Sci. Springer Sci. + Business Media Dordrecht, 1995. V. 44–46. P. 99–109.
- Ali M., Mujib A., Tonk D., Zafar N. Plant regeneration through somatic embryogenesis and genome size analysis of *Coriandrum sativum* L. // Protoplasma. 2016. V. 254. N. 1. P. 343–352.
- Bhojwani S. S. Plant tissue culture and its relevance to mulberry breeding // Brainstorming meeting on genetics and biotechnology of silkworm and mulberry. India: CSRTI, Mysore, 1992. P. 1–11.
- Bornet B., Branchard M. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting // Plant Mol. Biol. Rep. 2001. V. 19. N. 3. P. 209–215.
- Clarindo W. R., Carvalho C. R., Araujo F. S., Abreu I. S., Otoni W. C. Recovering polyploid papaya *in vitro* regenerants as screened by flow cytometry // Plant Cell Tiss. Organ. Cult. 2008. V. 92. P. 207–214.
- Cram W. H. Needle color and vigor of inbred progenies of *Picea pungens* // Hort. Sci. 1984. V. 19. N. 1. P. 125–126.
- Doležel J. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants // Phytochem. Analysis. 1991. V. 2. Iss. 4. P. 143–154.
- Doležel J., Bartoš J., Voglmayr H., Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human // Cytometry. Pt. A. 2003. V. 51. Iss. 2. P. 127–128.
- Doležel J., Greilhuber J., Suda J. Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry // Nature Protocols. 2007. V. 2. N. 9. P. 2233–2244.
- Erst A. A., Zvyagina N. S., Novikova T. I., Dorogina O. V. Clonal micropropagation of a rare species *Hedysarum theinum* Krasnob. (Fabaceae) and assessment of the genetic stability of regenerated plants using ISSR markers // Rus. J. Gen. 2015. V. 51. N. 2. P. 158–162 (Original Rus. text © A. A. Erst, N. S. Zvyagina, T. I. Novikova, O. V. Dorogina, 2015, publ. in Genetika. 2015. V. 51. N. 2. P. 188–193).
- Hizume M. Karyomorphological studies in the family Pinaceae // Mem. Fac. Educ. Ehime Univ. Ser. 3. Nat. Sci. 1988. V. 8. P. 1–108.
- Jerico B. B., Lourdes I.-A., Lazaro S.-V., Jose C.-M., Nancy S.-B. *In vitro* regeneration of *Pinus brutia* Ten. var. *eldarica* (Medw.) through organogenesis // Afr. J. Biotechnol. 2012. V. 11. N. 93. P. 15 982–15 987.
- Kaeppeler S. M., Kaeppeler H. F., Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants // Plant Mol. Biol. 2000. V. 43. P. 179–188.
- Kirdar E., Ertekin M., Gökyer E., Çorbacı Ö. L. Mavi ladinin (*Picea pungens* Engelm.) Aşı ile Üretimi Üzerine Araştırmalar (Investigations on propagation by grafting of blue spruce (*Picea pungens* Engelm.)) // Kastamonu Üni. Orman Fakültesi Dergisi (Kastamonu Univ. J. For. Fac.). 2009. V. 9. N. 1. P. 35–41 (in Turkish with English summary).
- Kumar P. S., Mathur V. L. Chromosomal instability in callus culture of *Pisum sativum* // Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 2004. V. 78. P. 267–271.
- Kurup S. S., Purayil F. T., Alkhaili M. M., Tawfik N. H., Cheruth A. J., Kabshawi M., Subramaniam S. Thidiazuron (TDZ) induced organogenesis and clonal fidelity studies in *Haloxylon persicum* (Bunge ex Boiss & Buhse): an endangered desert tree species // Physiol. Mol. Biol. Plants. 2018. V. 24. P. 683–692.
- Larkin P. J., Scowcroft W. R. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement // Theor. Appl. Genet. 1981. V. 60. P. 197–214.
- Litvay J. D., Verma D. C., Jonson M. A. Influence of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). Culture medium and its components on growth and somatic embryogenesis of the wild carrot (*Daucus carota* L.) // Plant Cell Rep. 1985. V. 4. N. 6. P. 325–328.
- Losada J. M., Leslie A. B. Why are the seed cones of conifers so diverse at pollination? // Annals Bot. 2018. V. 121. Iss. 7. P. 1319–1331.
- Lyon L. Winter grafting of cedar, spruce, and ornamental cherry // Int. Plant Propagators' Soc. Proc. 1983. V. 33. P. 54–55.
- Mishiba K.-I., Tawada K.-I., Mii M. Ploidy distribution in the explant tissue and the calluses induced during the initial stage of internode segment culture of *Asparagus officinalis* L. // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2006. V. 42. N. 1. P. 83–88.
- Murthy B. N., Murch S. J., Saxena P. K. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 1998. V. 34. N. 4. P. 267–275.
- Nehra N. S., Kartha K. K., Stushnott C., Giles K. L. The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry // Plant Cell, Tiss. Org. Cult. 1992. V. 29. N. 3. P. 257–268.
- Nieuw Kirk J. P van, Zimmerman R. H., Fordham I. Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro* // Hort. Sci. 1987. V. 21. N. 3. P. 516–518.
- Novikova T. I., Asbaganov S. V., Ambros E. V., Zaytseva Y. G. TDZ-induced axillary shoot proliferation of *Rhododendron mucronulatum* Turcz and assessment of clonal fidelity using DNA-based markers and flow cytometry // In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 2020. V. 56. P. 307–317.
- Obermayer R., Leitch I. J., Hanson L., Bennett M. D. Nuclear DNA C-values in 30 species double the familial representation in pteridophytes // Annals Bot. 2002. V. 90. N. 2. P. 209–217.
- Ohri D., Khoshoo T. N. Genome size in gymnosperms // Plant Syst. Evol. 1986. V. 153. N. 1. P. 119–132.
- Purayil F. T., Kurup S. S., Alkhaili M. M., Tawfik N. H., Al Dhaheri S. M., Cheruth A. J., Al Dhaheri S. S., Subramaniam S. ISSR-assisted analysis of clonal fidelity supported with SEM and histology using *in vitro* propagated plants of *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori – An endangered desert tree // South Afr. J. Bot. 2018. V. 114. P. 163–170.

- Ray T., Dutta I., Saha P., Das S., Roy S. C. Genetic stability of three economically important micropropagated banana (*Musa* spp.) cultivars of lower Indo-Gangetic plains, as assessed by RAPD and ISSR markers // *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 2006. V. 85. P. 11–21.
- Rees H., Teoh S. B., Jones L. M. Heterochromatization and the possibility of gene inactivation in B chromosomes of *Picea glauca* // *Heredity*. 1977. V. 38. N. 2. P. 272.
- Saker M. M., Bekheet S. A., Taha H. S., Fahmy A. S., Moursy H. A. Detection of somaclonal variations in tissue culture-derived date palm plants using isoenzyme analysis and RAPD fingerprints // *Biol. Plant.* 2000. V. 43. N. 3. P. 347–351.
- Tagaki H., Sugawara S., Saito T., Tasaki H., Yuanxue L., Guan K., Han D.-S., Godo T., Nakano M. Plant regeneration via direct and indirect adventitious shoot formation and chromosome-doubled somaclonal variation in *Titanotrichum oldhamii* (Hemsl.) Solereder // *Plant Biotechnol. Rep.* 2011. V. 5. N. 2. P. 187–195.
- Tang W., Newton R. J. Plant regeneration from callus cultures derived from mature zygotic embryos in white pine (*Pinus strobus* L.) // *Plant Cell Rep.* 2005. V. 24. N. 1. P. 1–9.
- Teoh S. B., Rees H. B chromosomes in white spruce // *Proc. Roy. Soc. London. Ser. Biol. Sci.* 1977. V. 198. N. 1133. P. 325–344.
- Zaytseva Y. G., Poluboyarova T. V., Novikova T. I. Effects of thidiazuron on *in vitro* morphogenic response of *Rhododendron sichotense* Pojark. and *Rhododendron catawbiense* cv. Grandiflorum leaf explants // *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 2016. V. 52. N. 1. P. 56–63.
- Zaytseva Y. G., Novikova T. I. TDZ-induced morphogenesis pathways in woody plant culture // *Thidiazuron: from urea derivative to plant growth regulator*. Chap. 3. Singapore: Springer Nature, 2018. P. 61–91.

STUDY OF THE GENETIC VARIABILITY OF ADVENTIVE MICROSHOOTS OF *Picea pungens* Engelm. USING DNA MARKERS AND FLOW CYTOMETRY

T. V. Zheleznicenko¹, D. S. Muraseva¹, S. V. Asbaganov¹, M. S. Voronkova¹,
A. V. Zaushintsena², T. I. Novikova¹

¹ Central Siberian Botanical Garden, Russian Academy of Sciences, Siberian Branch
Zolotodolinskaya str., 101, Novosibirsk, 630090 Russian Federation

² Kemerovo State University
Krasnaya str., 6, Kemerovo, 650000 Russian Federation

E-mail: zhelez05@mail.ru, dsmuraseva@csbg.nsc.ru, cryonus@mail.ru, bmc_87@mail.ru,
alexaz58@yandex.ru, tin27@mail.ru

For the first time, the genetic variability/stability of blue spruce *Picea pungens* Engelm. microshoots obtained *in vitro* by direct regeneration from zygotic embryos under the influence of a synthetic growth regulator with cytokinin activity N-phenyl-N'-1, 2, 3-thidiazuroil-5-urea or thidiazuron (TDZ) using ISSR and RAPD analysis, as well as by flow cytometry, was studied. Shoot formation was induced at ½ LV medium using two concentrations of TDZ (0.5 or 1 µM) for 28 days, then plant material was transferred to a hormone-free nutrient medium ½ LV for 35 days. The formed microshoots were separated from the explant's tissues and cultured on the same hormone-free medium for another 35 days, than their genetic stability was evaluated. To evaluate the effect of each concentration of the growth regulator on the genome's stability, microshoots formed by three different genotypes of donor plants were used. ISSR analysis revealed a slight polymorphism between the blue spruce microshoots formed by the same genotype. The genetic variability of regenerants in individual genotypes ranged from 1.29 to 1.58 %, while other genotypes have 100 % genetically stable microshoots. At the same time, RAPD analysis did not show differences between the analyzed samples; all studied primers initiated monomorphic spectra. Flow cytometry found that all the studied samples were diploid. The DNA content (2C) in microshoots ranged from (38.86 ± 0.55) – (40.35 ± 0.30) pg, and the genome size (1C) was (18 961.79 ± 256.91) – (19 933.27 ± 526.35) Mbp. The obtained results indicate a low somaclonal variability of blue spruce microshoots formed *in vitro* under as a result of direct regeneration from zygotic embryos under the influence of the studied concentrations in the TDZ .

Keywords: *in vitro* culture, microshoots regeneration, thidiazuron, ISSR and RAPD analysis, flow cytometry, blue spruce.

How to cite: Zheleznicenko T. V., Muraseva D. S., Asbaganov S. V., Voronkova M. S., Zaushintsena A. V., Novikova T. I. Study of the genetic variability of adventive microshoots of *Picea pungens* Engelm., using DNA markers and flow cytometry // *Sibirskij Lesnoj Zhurnal* (Sib. J. For. Sci.). 2020. N 4. P. 45–54 (in Russian with English abstract and references).